Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Aislamiento y elucidación estructural de withanolidos de Datura ferox, Jaborosa runcinata y Jaborosa ordonelliana

Cirigliano, Adriana Mónica

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Cirigliano, Adriana Mónica. (2001). Aislamiento y elucidación estructural de withanolidos de Datura ferox, Jaborosa runcinata y Jaborosa ordonelliana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3354_Cirigliano.pdf

Cita tipo Chicago:
Cirigliano, Adriana Mónica. "Aislamiento y elucidación estructural de withanolidos de Datura ferox, Jaborosa runcinata y Jaborosa ordonelliana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3354_Cirigliano.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Aislamiento y Elucidación Estructural de Withanólidos de Datura ferox, Jaborosa runcinata y Jaborosa odonelliana

Adriana Mónica Cirigliano

3394

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *DATURA FEROX*, *JABOROSA RUNCINATA* Y *JABOROSA ODONELLIANA*

Director de Tesis

Dra Adriana Silvia Veleiro

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Orgánica

Adriana Mónica Cirigliano

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

№ 3354

-2001-

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE WITHANOLIDOS DE *DATURA FEROX, JABOROSA RUNCINATA* Y *JABOROSA ODONELLIANA*.

Se describe el aislamiento y elucidación estructural de los withanólidos presentes en las especies *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* y *Jaborosa odonelliana*, utilizando técnicas espectroscópicas combinadas con modelado molecular. De la especie *Datura ferox* recolectada en la provincia de Córdoba, se aislaron, por dos métodos diferentes, cuatro withanólidos novedosos: el 15–hidroxiderivado de la nicandrina B y las daturolactonas 5, 6 y 7, además de siete withanólidos conocidos, withaferoxólido, withanólido mayoritario de esta especie, withanicandrina, withastramonólido, withametelina E y las daturolactonas 1, 2 y 3. De la especie *Jaborosa runcinata* recolectada en la provincia de Entre Ríos, se aislaron siete jaborosolactonas novedosas de tipo espiránico: las jaborosolactonas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9. Estos compuestos presentaron un sistema 17(20)-en-22-ceto, funcionalización no encontrada previamente en la familia de los withanólidos, siendo la principal diferencia entre los mismos la sustitución en el anillo B. De la especie *Jaborosa odonelliana* recolectada en la provincia de Salta en abril y diciembre, se aislaron, además de jaborosolactona P, compuesto mayoritario previamente reportado en esta planta, seis withanólidos espiránicos novedosos: las jaborosolactonas 10, 11, 12, 13 , 14 y 15. Como en el caso de los withanólidos aislados de *Jaborosa runcinata*, la principal diferencia entre los compuestos aislados era la sustitución en los anillos A y B, siendo la cantidad y tipo de withanólidos diferente en ambas épocas de recolección. Esta variación estacional había sido encontrada previamente en otro tipo de Solanáceas, habiéndose relacionado en algunos casos, con mecanismos de defensa química. Los compuestos mayoritarios de las especies antes mencionadas se evaluaron como antialimentarios de larvas de insectos y como agentes quimiopreventivos del cáncer obteniéndose resultados prometedores.

Palabras claves: *Datura ferox*; *Jaborosa runcinata*; *Jaborosa odonelliana*; Solanaceae; withanólidos; daturolactona; jaborosolactona; antialimentario; anticancerígeno.

ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF WITHANOLIDES FROM *DATURA FEROX, JABOROSA RUNCINATA* Y *JABOROSA ODONELLIANA.*

The isolation and structural elucidation of the withanolides from *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* and *Jaborosa odonelliana*, using spectroscopic methods and molecular modeling are described. From plants of *Datura ferox* collected in Cordoba Province, we isolated using two different methods, four new withanolides: the 15-hydroxyderivative of nicandrin B and daturolactones 5, 6 and 7, and also seven known withanolides withaferoxolide, the major compound in this species, withanicandrine, withastramonolide, withametelin E and daturolactones 1, 2 and 3. From plants of *Jaborosa runcinata* collected in Entre Rios Province, we isolated seven new spiranoid withanolides: the jaborosolactones 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 9. These compounds present a 17(20)-en-22-keto system, a new arrangement within the withanolide family, being the main difference among them the substitution on ring B. From plants of *Jaborosa odonelliana* collected in Salta Province in April and December, we isolated besides jaborosolactone P, the major compound in this species, seven new spiranoid withanolides: the jaborosolactones 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 9. As was the case with *Jaborosa runcinata*, the main difference among the withanolides isolated from *Jaborosa odonelliana* was the substitution pattern on rings A and B. The amount and type of isolated withanolides differed depending on the collection dates. This seasonal variation has been observed in other type of Solanaceae, and it has been related to chemical defense mechanisms. The main compounds of each species were evaluated not only as antifeedant agents but also as chemopreventive agents, with promising results.

Key words: *Datura ferox*; *Jaborosa runcinata*; *Jaborosa odonelliana*; Solanaceae; withanolides; daturolactone; jaborosolactone; antifeedant; anticancer.

A mis hijos Agustina y Esteban
quienes tuvieron que convivir
con una madre tesista.

A Juan Cristóbal,
por su amor y su paciencia
a lo largo de todos estos años.

Agradezco a la Dra Adriana Veleiro
quien estuvo constantemente conmigo en esta Tesis
apoyándome en todo momento.

Agradezco además :

A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica, por haberme brindado la oportunidad y el lugar de trabajo para realizar la presente Tesis.

Al Dr. Gerardo Burton y a la Dra. María Cristina Tettamanzi por los espectros realizados en el RMN 500 MHz y RMN 200MHz.

Al Sr. Jorge Aznarez y al Sr. Gonzalo Abad por los espectros de masa y cgl-masa realizados, al Sr. Carlos Gustavo Arabéhèty por los espectros de masa FAB y los espectros de masa de alta resolución.

Al Dr. Juan Carlos Oberti, de la Universidad Nacional de Córdoba, por facilitarme el material vegetal a partir del cual se realizó el presente trabajo de Tesis.

Al Prof. Armando T. Hunziker, de la Universidad de Córdoba, por la identificación del material vegetal.

A la Dra. Graciela Mareggiani, Dra. María Inés Picollo y Dr. Eduardo Zerba (CITEFA-CIPEIN) por los ensayos de actividad antialimentaria realizados en insectos.

A la Dra. Lynda L. Song y al Dr. A. Douglas Kinghorn por los ensayos de actividad quimiopreventiva del cáncer realizados.

Al Dr. Gerardo Burton, por su ayuda en la realización de cálculos conformacionales.

Al Dr. Gerardo Burton, por haberme dado la posibilidad de iniciar esta Tesis, por su ayuda, por su apoyo constante, sus consejos y su comprensión a lo largo de esta Tesis.

A los profesores del Departamento de Química Orgánica por su apoyo y consejos.

A todos los compañeros del Departamento de Química Orgánica por el afecto y el apoyo que me brindaron siempre.

A mis compañeros de laboratorio Adriana S. Veleiro, Alberto Ghini, M. Cristina Tettamanzi, M. O. Violeta Benedetti, Eduardo Sproviero, Andrés Ferrara, Daniel Nicoletti, María Cristina Monteserín, María Joselevich, Pablo H. Dichenna, Fernando J. Duran, Rosana I. Misico, Flavia M. Morelli, Florencia Speroni y Esteban Ceccarelli, por compartir las alegrías, las tristezas y el trabajo diario.

A los "vecinos", Jorge Palermo, Gabriela M. Cabrera, María Florencia Rodriguez Brasco, Laura Hernández Franco, Laura Levy, por sus consejos y su charla cotidiana.

A Andrea Brutomesso, Alejandro Chiocconi, Mirta Fascio, Miriam Martins Alho, Guadalupe García Liñares, Raquel Goldberg, Mariano Castro, Henry Hughes, Alejandra Ponce, Laura M. Iannone, María Inés Errea, Verónica Montesano, Rosalía Agusti, por todos los momentos compartidos.

A mis amigas químicas cordobesas, Gloria M. Bonetto y Rosana I. Misico, por estos años de amistad y comprensión.

A Olga Fernandez, Rosa Ricarte, Mabel Delgado, Virginio Pereyra, Sergio E. Jacobo, Eduardo López y María del Carmen Ares por su diaria y desinteresada colaboración.

A la Sra Ana Burton, por las pequeñas cosas diarias y por su amable y desinteresada colaboración.

Al personal de la biblioteca de la Facultad.

"El sabio no es el hombre que da las respuestas correctas sino aquel que realiza las preguntas correctas."

Claude Levi-Strauss

INDICE

Capítulo 1: Introducción

- Generalidades 5
- Clasificación de los withanólidos 8
- Biogénesis de withanólidos. Quimiotipos 12
- Propiedades biológicas de los withanólidos 15
- Withanólidos en el género *Datura* 19
- Withanólidos en el género *Jaborosa* 22
- Objetivos de la Tesis 28

Capítulo 2: Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de *Datura ferox*

- Withanólidos de *Datura ferox* 35
- Esquema separativo I 36
  - 15β-hidroxinicandrina B 38
- Esquema separativo II 44
  - Daturolactona 5 46
  - Daturolactona 6 51
  - Daturolactona 7 54
- Withanólidos de flores de *Datura ferox* 59

Capítulo 3: Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de *Jaborosa runcinata*

- Withanólidos de *Jaborosa runcinata* 65
  - Jaborosolactona 1 67
  - Jaborosolactona 2 74
  - Jaborosolactona 3 76
  - Jaborosolactona 4 80
  - Jaborosolactona 5 84
  - Jaborosolactona 6 y Jaborosolactona 9 88

Capítulo 4: Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de *Jaborosa odonelliana*

- Withanólidos de *Jaborosa odonelliana* (abril y diciembre) 97
- Jaborosolactonas 10-14 100
- Jaborosolactona 15 107

Capítulo 5: Actividad biológica

- Actividad antialimentaria de withanólidos aislados de *Datura ferox* y *Jaborosa odonelliana* 117
- Actividad quimiopreventiva del cáncer de withanólidos aislados de *Datura ferox, jaborosa runcinata* y *Jaborosa odonelliana* 122

Capítulo 6: Parte experimental

- Generalidades 129
- Aislamiento de withanólidos de *Datura ferox* 135

  Extracción y fraccionamiento del material vegetal 135

  - Separación cromatográfica de los componentes de *Datura ferox* 135
    - Fraccionamiento de la fracción I 135
    - Fraccionamiento de la fracción II 139
  - Propiedasdes físicas de los withanólidos aislados 139
- Aislamiento de withanólidos de flores de *Datura ferox* 141
  - Extracción y fraccionamiento del material vegetal 141
  - Separación cromatográfica de los componentes de las flores de *Datura ferox* 141
- Aislamiento de withanólidos de *Jaborosa runcinata* 145
  - Extracción y fraccionamiento del material vegetal 145
  - Separación cromatográfica de los componentes de *J. runcinata* 145
  - Propiedades físicas de los withanólidos aislados 147

- Aislamiento de withanólidos de *Jaborosa odonelliana* 153
  - Extracción y fraccionamiento del material vegetal 153
  - Separación cromatográfica de los componentes de *Jaborosa odonelliana* (abril) 153
  - Separación cromatográfica de los componentes de *Jaborosa odonelliana* (diciembre) 156
  - Propiedades físicas de los withanólidos aislados 157
- Actividad biológica de withanólidos aislados de *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* y *Jaborosa odonelliana* 160

Apéndice 163

Resumen 167

Resumen de estructuras 173

Bibliografía 179

ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etilo
c	cuarteto
CCD	cromatografía analítica en capa delgada
CCP	cromatografía en capa preparativa
CE_{50}	concentración efectiva 50%
CF	cromatografía flash
CFCS	cromatografía flash en columna seca
CFFR	cromatografía flash en fase reversa
CFV	cromatografía flash por vacío
CI_{50}	concentración inhibitoria 50 %
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
COSY-45	espectro de correlación homonuclear H-H
COSY DQF	espectro de correlación homonuclear H-H de doble filtro cuántico
COSYLR	espectro de correlación homonuclear H-H a larga distancia
CPFR	cromatografía preparativa en fase reversa
DEPT-135	incremento libre de distorsión por transferencia de polarización con pulso mezcla de 135°
DMBA	9,10-dimetil-1,2-benzoantraceno
δ	desplazamiento químico
d	doblete
dd	doble doblete
ddd	doble doble doblete
dt	doble triplete
EM	espectroscopía de masa
EMAR	espectroscopía de masa de alta resolución

EMFAB	espectroscopía de masa por ionización por bombardeo con átomos rápidos
EMIE	espectroscopía de masa de impacto electrónico
FT IR	espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier
g	gramo
Hz	hertz
HETCOR	espectro de correlación homonuclear C-H
HPTLC RP-18	cromatografía en capa delgada en fase reversa de alta resolución
IE	ionización por impacto electrónico
IQ	índice quimiopreventivo
IR	infrarrojo
IsoPrOH	isopropanol
J	constante de acoplamiento spin spin
λ	longitud de onda
m	multiplete
M^+	ión molecular
Me	metilo
MeOH	metanol
MHz	megahertz
m/z	relación masa/carga
ND	no determinada
NOE	efecto Overhauser nuclear
NOESY	espectro de correlación homonuclear por efecto Overhauser nuclear
RMN ^{1}H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN ^{13}C	resonancia magnética nuclear de carbono
pág.	página
PF	punto de fusión

QR	quinona-reductasa
s	singulete
sa	singulete ancho
t	triplete
TD_{50}	tiempo de desarrollo 50%
t_r	tiempo de retención
TMS	tetrametilsilano
µl	microlitro
UV	ultravioleta
$W_{½}$	ancho de la señal a media altura

Capítulo 1

Introducción

GENERALIDADES

Originalmente, se llamó withanólidos a un grupo de esteroides de 28 carbonos construidos sobre la base de un esqueleto ergostano, en el cual el C-22 y el C-26 se encontraban oxidados formando una δ-lactona en la cadena lateral. En la **Figura 1**, se representa el esqueleto básico de un withanólido.

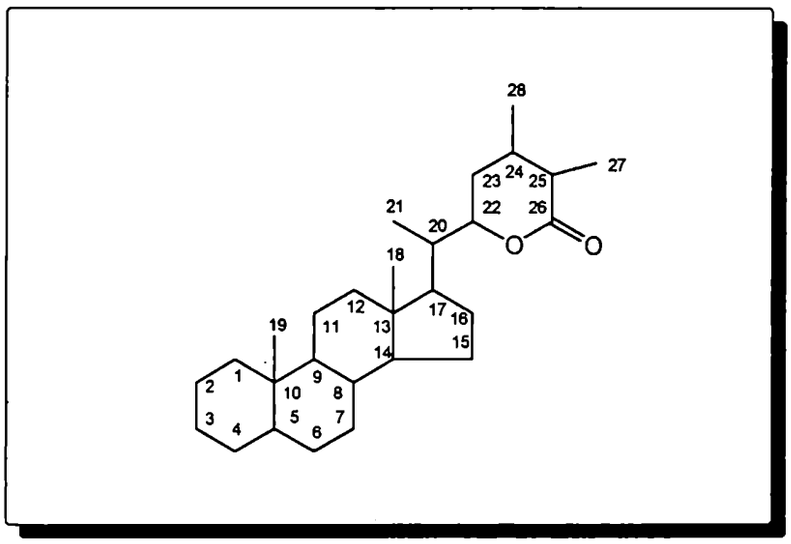


Figura 1. Esqueleto básico de un withanólido

Los primeros compuestos de este tipo se aislaron de la planta medicinal india *Withania somnifera* de la cual deriva su nombre (Kurup, 1956 y Yarden *et al.*, 1962). Posteriormente, se encontraron varios compuestos biogenéticamente relacionados a los withanólidos, en los cuales el esqueleto carbocíclico, la cadena lateral o ambos se hallaban modificados. Si bien se propuso agrupar bajo el nombre general de withaesteroides a todos los withanólidos, con o sin modificaciones, esta denominación no fue totalmente aceptada.

Tabla 1. Géneros y especies que contienen withanólidos. Se señalan algunas publicaciones realizadas con otros nombres en las notas al pie.

Acnistus	*A. arborescens* [1]
Datura	*D. ferox, D. metel,* [2] *D. quercifolia, D. stramonium* [3] y *D. tatura*
Deprea	*D. orinocensis*
Discopodium	*D. penninerviium*
Dunalia	*D. brachyacantha* y *D. solanaceae*
Exodeconus	*E. maritimus*
Hyocyamus	*H. niger*
Iochroma	*I. australe,* [4] *I. coccineum, I. fuchsioides* e *I. gesneroides*
Jaborosa	*J. bergii, J. integrifolia, J. lacianata,* [5] *J. leucotricha, J. magellanica, J. odonelliana* y *J. sativa*
Lycium	*L. chinensis* y *L. halimifolium*
Nicandra	*N. physaloides*
Phylalis	*P. alkekengi, P. angulata, P. ixocarpa, P. lancifolia, P. minima, P. peruviana, P. philadelphica, P. pruinosa, P. pubescens* y *P. viscosa*
Salpichroa	*S. origanifolia*
Tubocapsicum	*T. anomalum*
Vassobia	*V. breviflora,* [6] *V. lorentzzi*
Withania	*W. aristata, W. coagulans, W. frutescens* y *W. somnifera*
Witheringia	*W. coccoloboides*

[1] *Sub nom. Acnistus ramiflorum* (Usubillaga *et al.*, 1992).

[2] *Sub nom. Datura fastuosa* (Manickam *et al.*, 1993).

[3] *Sub nom. Datura tatula* (Manickam *et al.*, 1996).

[4] *Sub nom. Acnistus australis* (Kirson *et al.*, 1970).

[5] *Sub nom. Trechonaetes laciniata* (Lavie *et al.*, 1987).

[6] *Sub nom. Acnistus breviflorus* (Monteagudo *et al.*, 1994).

Al presente, se conocen más de 300 compuestos de este tipo y se han publicado recientemente dos trabajos de revisión (Ray, 1994 y Anjaleyulu *et al.*, 1998).

La biogénesis de los withanólidos es casi un monopolio de plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae*, y dentro de ésta, de la subfamilia *Solanoideae*. No se tiene información, hasta ahora, sobre la presencia de estos compuestos en especies de la subfamilia *Cestroideae*.

En al **Tabla 1**, se detallan los géneros y especies que figuran en literatura como productos de withanólidos en *Solanaceae* (Burton y Oberti, 2000).

Fuera de esta familia, se encontraron withanólidos en *Cassia siamea* (*Leguminosae*) (Srivastava, 1992) y *Ajuga parviflora* (*Labiatae*) (Khan, P. *et al.*, 1999; Nawaz *et al.*, 1999; 2000).

Por otra parte, en el reino animal, se han detectado algunas estructuras relacionadas, como por ejemplo, en la tortuga *Amyda japonica* (Fujimoto *et al.*, 1985), en corales blandos del género *Minabea* (Ksebati *et al.*, 1988) y de la especie *Sarcophyton crassocaule* (Anjaneluyu *et al.*, 2000) y en una esponja del género *Strongylacidon* (Carney *et al.*, 1993). Todos ellos se caracterizan por tener 27 átomos de carbono (en lugar de los 28 átomos) como es típico de los esteroides de origen animal.

Las plantas que producen withanólidos presentan la característica de poseer sistemas enzimáticos capaces de oxidar prácticamente todos los átomos de carbono del esqueleto carbocíclico y de la cadena lateral. Hasta el momento, se han aislado withanólidos con funciones oxigenadas en todos los carbonos excepto en el carbono 10. Además de esta variedad de funciones oxigenadas, los withanólidos pueden presentar numerosas modificaciones, las cuales involucran ruptura y/o formación de nuevos enlaces, aromatización y diversos tipos de reordenamiento que dan lugar a una amplia variedad de estructuras.

CLASIFICACION DE LOS WITHANOLIDOS

La presencia de un grupo lactona o lactol en la cadena lateral del compuesto es una característica de los withanólidos. En algunos casos, dicha cadena se encuentra fusionada al esqueleto carbocíclico mediante enlaces C-C o a través de puentes oxígeno.

Una primera clasificación basada en estructuras fundamentales, ha sido propuesta por A. B. Ray (Ray *et al.*, 1994). G. Burton y J. C. Oberti incorporaron a las estructuras de tipo trechonólido, a las de tipo espiránico y a las de tipo sativólido en esta clasificación (Burton y Oberti, 2000).

Se puede dividir a los withanólidos en dos grupos en base al tamaño del anillo en la cadena lateral:

- GRUPO A : con δ-lactona o δ-lactol.
- GRUPO B : con γ-lactona.

GRUPO A : WITHANOLIDOS CON δ-LACTONA O δ-LACTOL EN LA CADENA LATERAL.

La mayoría de los compuestos aislados pertenecen a este grupo, pudiéndose dividir en 9 subgrupos representados en la **Figura 2**: (i) withanólidos con esqueleto "normal", (ii) withafisalinas, (iii) fisalinas, (iv) acnistinas, (v) withajardinas, (vi) withametelinas, (vii) sativólidos, (viii) withanólidos con anillo A aromático (ix) withanólidos con anillo D aromático.

Los withanólidos con esqueleto "normal" son los más abundantes y posiblemente los precursores de muchos otros withanólidos. Dentro de este tipo, se encuentran compuestos con la cadena lateral orientada tanto 17β como 17α siendo más abundante la orientación β.

Las withafisalinas (ii) presentan una lactona adicional que une el esqueleto carbocíclico con la cadena lateral, formada entre el C-18 oxidado y el C-20. Este tipo de compuestos característico del género *Physalis*, se ha encontrado recientemente en

Vassobia lorentzii (Misico *et al.*, 2000) y en *Dunalia brachyacantha* (Silva *et al.*,1999) en algunos casos como mezcla epimérica de lactoles en C-18.

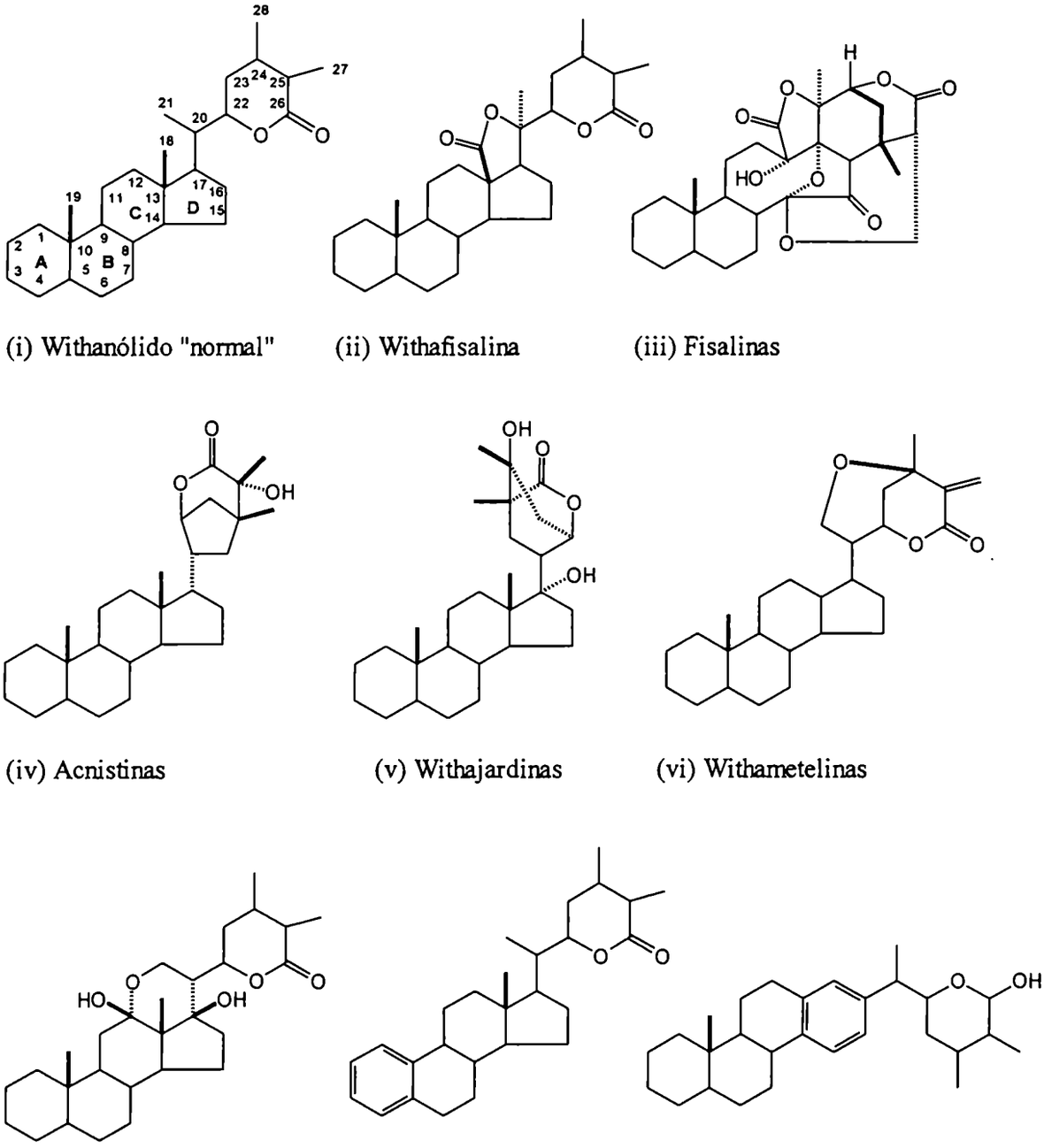


Figura 2. GRUPO A: Estructuras base de withanólidos con δ-lactona o δ-lactol

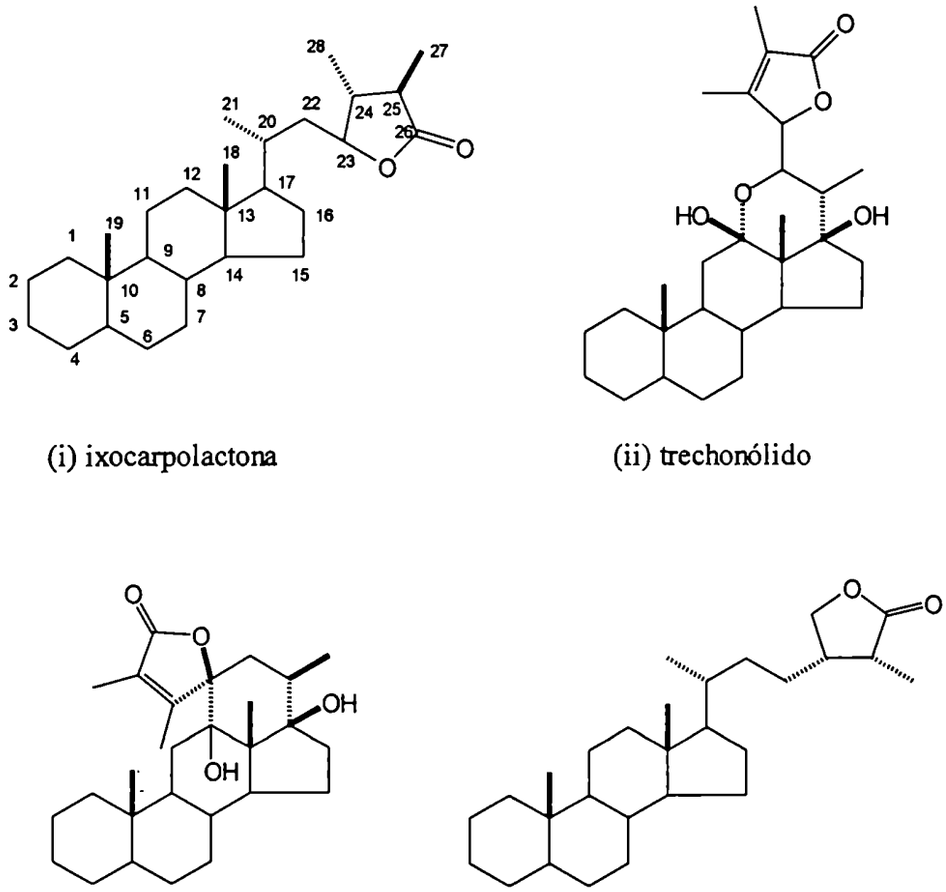
Las fisalinas (iii) fueron aisladas de varias especies de *Physalis* y forman uno de los grupos de withanólidos más complejos. Estos 13,14-seco-16,24-ciclowithaesteroides presentan un ciclo γ-lactónico adicional fusionado con el anillo D al igual que las withafisalinas. Se cree que estos últimos compuestos son intermediarios en la conversión biosintética entre los withanólidos y las fisalinas. Recientemente, se ha publicado un trabajo de revisión sobre los withanólidos aislados del genéro *Physalis* (Tomassini *et al.*, 2000).

Las acnistinas (iv), las withajardinas (v) y las withametelinas (vi) tienen en común una cadena lateral bicíclica, y su biosíntesis se explica a partir de un precursor con C-21 funcionalizado. En las acnistinas (iv), el anillo adicional de cinco miembros se forma por la unión de los C-21 y C-24; éstas se han aislado de las especies *Acnistus ramiflorum* (Usubillaga *et al.*, 1992), *Tubocapsicum anomalum* (Lavie *et al.*, 1987) y *Dunalia solanacea* (Fajardo *et al.*, 1991 y Luis *et al*, 1994a, 1994b). En las withajardinas (v), aisladas de *Deprea orinocensis*, el anillo adicional es de seis miembros y se forma por unión de los carbonos 21 y 25 (Luis *et al.*, 1994c y Echeverri *et al.*, 1995). Por último, las withametelinas (vi), aisladas de *Datura metel*, son withanólidos cuya cadena lateral forma un biciclo a través de un puente oxigenado entre C-21 y C-24; en este caso, el anillo adicional que se forma es de seis miembros (Gupta *et al.*, 1992). Relacionados con las withametelinas, se encuentran los sativólidos (vii) aislados de *Jaborosa sativa*, los cuales poseen también un puente oxigenado involucrando al C-21 pero con C-12 para dar un lactol. (Bonetto *et al.*, 1995).

Los subgrupos (viii) y (ix) se caracterizan por la presencia de un anillo A o D aromático respectivamente. Dentro de los withanólidos con anillo A aromático (viii), podemos mencionar a la jaborosolactona Q, aislado de la especie *Jaborosa leucotricha* (Veleiro *et al.*, 1992b). Durante años se pensó que los withanólidos con anillo D aromático (ix) estaban restringidos a la especie *Nicandra physaloides*, de la cual fue aislado el primer compuesto de este tipo, la nicandrenona (Bates *et al.*, 1972 y Begley *et al.*, 1972). En el año 1992, se aisló un withanólido con anillo aromático de plantas de *Salpichroa origanifolia* llamado salpichrólido A (Veleiro *et al*, 1992a) y posteriormente se aislaron de esta especie un grupo de compuestos relacionados (Tettamanzi, 2000).

GRUPO B : WITHANOLIDOS CON γ–LACTONA EN LA CADENA LATERAL.

Dentro de este grupo (**Figura 3**), podemos encontrar: (i) ixocarpalactonas, (ii) trechonólidos, (iii) withanólidos espiránicos y (iv) perulactonas.



(i) ixocarpolactona (ii) trechonólido

(iii) espiránico (iv) perulactona

Figura 3. GRUPO B: Estructuras base de withanólidos con γ–lactona.

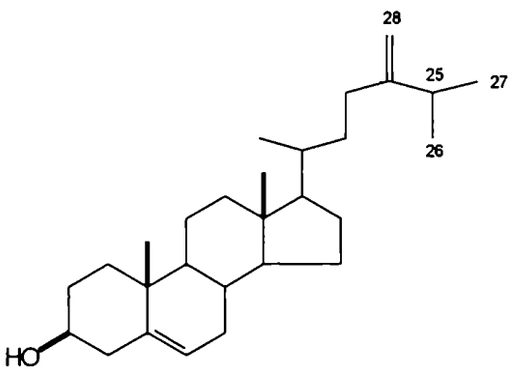
La presencia de una función oxigenada en C-23 permite la formación de una 26,23-γ-lactona. Este tipo de anillo se encuentra presente en las ixocarpalactonas (i) aisladas de la especie *Physalis ixocarpa* (Kirson *et al.*, 1979), en los withanólidos de tipo trechonólido (ii), aislados de las especies *Jaborosa laciniata* (ex-Trechonetes) (Lavie *et al.*, 1987), *J. magellanica* (Parvez *et al.*, 1988) y *J. sativa* (Bonetto *et al.*, 1995) y en los

withanólidos espiránicos (iii), de los cuales con anterioridad a esta Tesis, se conocía un único ejemplo aislado de *J. odonelliana* (Monteagudo *et al.*, 1990).

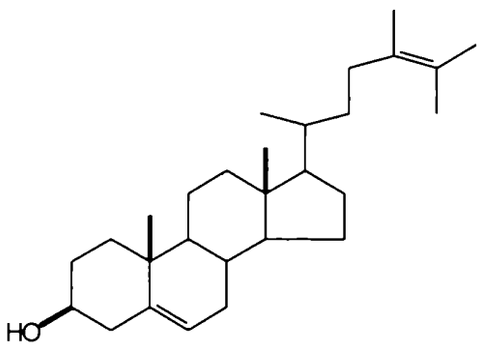
Por otro lado, las perulactonas (iv) presentan una γ-lactona con el anillo lactónico formado entre C-26 y C-28. De este subgrupo, se conocen sólo las perulactonas A y B aisladas de *Physalis peruviana* (Gottlieb *et al.*, 1980)

BIOGENESIS DE WITHANOLIDOS. QUIMIOTIPOS.

Resulta de particular importancia la presencia de esteroles de 28 carbonos con cadena lateral insaturada en plantas que producen withanólidos, ya que se ha demostrado que algunos de éstos son precursores en la biogénesis de lactonas esteroidales-C_{28}. A modo de ejemplo, podemos mencionar al 24-metilencolesterol (**1**) y al 24-metilcolesta-5,24-dien-3β-ol (**2**), aislados de *Withania somnifera* (Lockley *et al.*, 1974).



(**1**)



(**2**)

Vande Velde y colaboradores propusieron el camino esquematizado en la **Figura 4**, para la biosíntesis del sistema Δ^2-1-ceto en el anillo A, el cual resulta posible teniendo en cuenta que se aislaron de la misma especie, withanólidos con un sistema 1α,3β-dihidroxi-5-eno junto a otros del tipo 2-en-1-ona (Gottlieb *et al.*, 1980 y Vande Velde *et al.*, 1981)

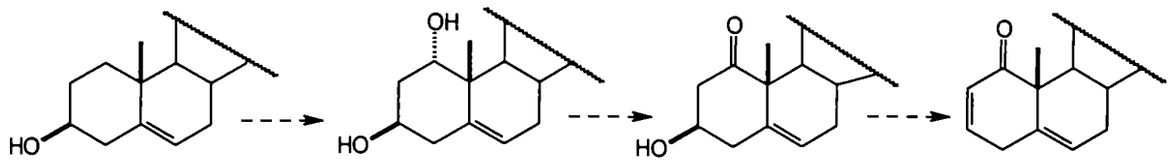


Figura 4. Formación del sistema Δ^2-1-ceto en el anillo A de los withanólidos.

Teniendo en cuenta el tipo de compuestos que se describirán en esta tesis, resulta interesante destacar la posible relación biosintética entre withanólidos de tipo espiránico y de tipo trechonólido. Son ejemplos de este tipo de compuestos el trechonólido A (**3**) aislado por primera vez de *Jaborosa laciniata* y la jaborosolactona P (**4**), aislada de *Jaborosa odonelliana*. Para estos compuestos, pueden proponerse precursores biosintéticos epiméricos en C-22 (**Figura 5**).

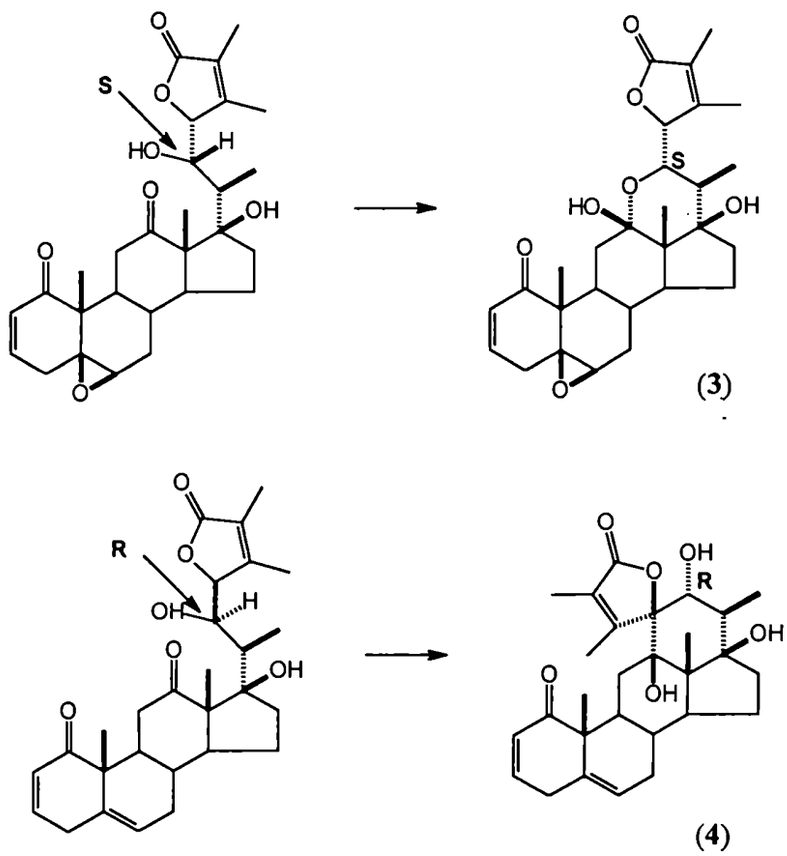


Figura 5. Posibles precursores biosintéticos de trechonólido (**3**) y jaborosolactona P (**4**)

En el epímero 22S, la formación del hemicetal entre el 22-hidroxi y el 12-ceto conduce al trechonólido A en que el anillo lactónico es ecuatorial (**Figura 5**). La misma ciclación en el epímero 22R conduciría a un epímero del trechonólido con el anillo lactónico axial, mientras que la ciclación del C-23 sobre el C-12 conduce al withanólido espiránico con el sustituyente en C-22 (hidroxilo) ecuatorial (**Figura 5**). Es interesante destacar que la jaborosolactona P (**4**) es el primer withanólido aislado con configuración R en C-22.

Un hecho particularmente interesante entre las especies que producen withanólidos es la variabilidad en el tipo y la cantidad de estos compuestos en función de la época del año y de la ubicación geográfica. En el caso de *Withania somnifera*, la variabilidad geográfica se ha asociado a la existencia de quimiotipos, es decir, ejemplares que son morfológicamente idénticos pero difieren en los compuestos que biosintetizan. Por ejemplo, Abraham y colaboradores (Abraham *et al.*, 1968), al examinar ejemplares de *Withania somnifera* recolectados en diferentes lugares de Israel, descubrieron tres quimiotipos que llamaron I, II y III, y que resultaron diferentes de otros encontrados en India y en Sudáfrica. La característica del quimiotipo I es la ausencia de hidroxilo en C-20 en los withanólidos que produce, en cambio en el quimiotipo II resultan mayoritarios los 20-hidroxiwithanólidos. Por otra parte, el quimiotipo III también elabora 20-hidroxiwithanólidos y contiene compuestos con cadena lateral orientada tanto 17α como 17β.

Se comprobó que la presencia de diferentes clases de withanólidos en cada uno de los quimiotipos está controlada genéticamente. Esto se verificó por medio de polinización cruzada de quimiotipos, de los que se obtuvieron híbridos cuyos componentes mayoritarios presentaban sustituyentes concordantes con los de los quimiotipos originales (Glotter, 1991). Por otra parte, la formación de compuestos mayoritarios se interpretó en términos genéticos como resultado de prevalecer los caracteres dominantes frente a los recesivos de cada quimiotipo (Lavie *et al.*, 1975). De esto puede deducirse que por polinización cruzada de los quimiotipos adecuados podrían llegar a obtenerse withanólidos con nuevas combinaciones de sustituyentes de interés.

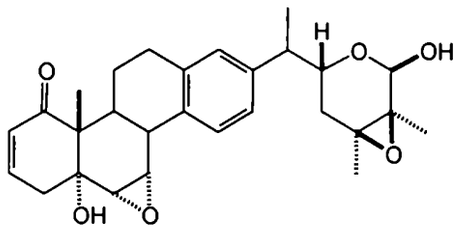
PROPIEDADES BIOLOGICAS DE LOS WITHANOLIDOS

Durante años se atribuyeron diversas propiedades terapéuticas a plantas capaces de biosintetizar withaesteroides. Una de las especies más populares y estudiadas fue la *Withania somnifera*, la cual fue utilizada en la India por sus propiedades sedativas, hipnóticas y antisépticas. Al aislarse withanólidos en forma pura, se pudo estudiar la actividad biológica de los mismos encontrándose compuestos con propiedades antimicrobiana, antiinflamatoria, hepatoprotectora, inmunomoduladora, anticonvulsiva, antitumoral y antialimentaria. Una descripción más detallada se puede encontrar en un trabajo de revisión reciente (Anjaneyulu *et al.*, 1998).

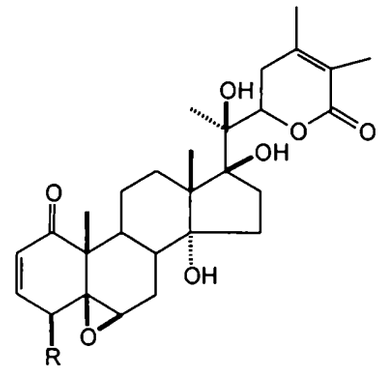
Los primeros antecedentes de withanólidos con actividad antialimentaria fueron informados por Nalbandov y colaboradores quienes ensayaron a la nicandrenona (Nic-1) (**5**) aislada de *Nicandra physaloides* frente a larvas de *Manduca sexta* (gusano del tabaco) (Nalbandov *et al.*,1964). Posteriormente se encontraron withanólidos con propiedades antialimentarias en otras Solanáceas, descriptos en forma detallada en Tettamanzi, M. C., 2000. También presentan este tipo de propiedades, el withanólido E (**6**), 4β-hidroxiwithanólido E (**7**) y una serie de compuestos relacionados aislados de *Physalis peruviana* (Asher *et al.*, 1987; Waiss *et al.*, 1993; Elliger *et al.*, 1994).

Es de destacar al comparar las estructuras de los withanólidos con actividad antialimentaria, el esquema de sustitución común de los anillos A y B en la nicandrenona (**5**), la nicalbina A (**8**), la nicalbina B (**9**), la withanicandrina (**10**) y la daturolactona 2 (**11**) aisladas de *Nicandra physaloides* y/o *Datura quercifolia* (Asher *et al.*, 1987).

Recientemente, se informó este tipo de actividad para el salpichrólido A (**12**) y otros compuestos relacionados aislados de la planta *Salpichroa origanifolia* (Mareggiani *et al.*, 2000). La presencia de este tipo de compuestos en *Salpichroa origanifolia* así como la del withanólido E (**6**) en frutos de *Physalis peruviana* (Baumann *et al.*, 1993) fue relacionada con mecanismos de defensa química de la planta.

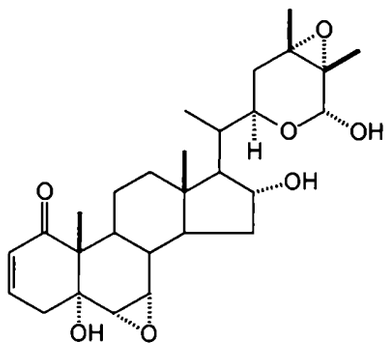


(5)

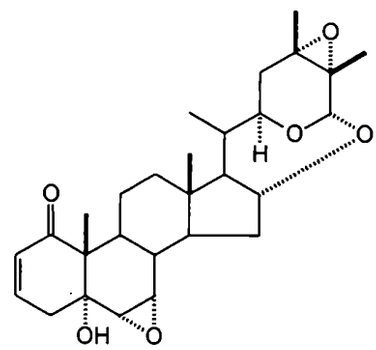


(6) R = H

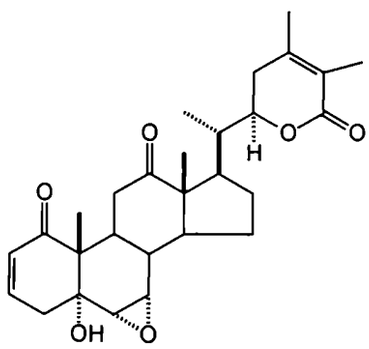
(7) R = OH



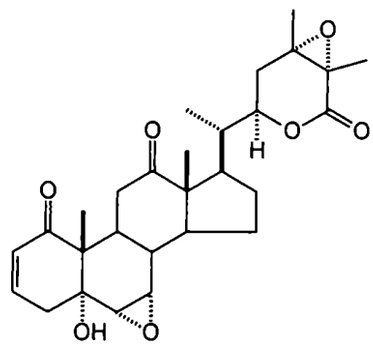
(8)



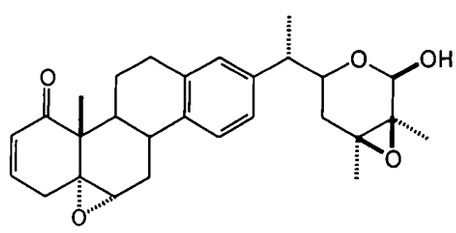
(9)



(10)

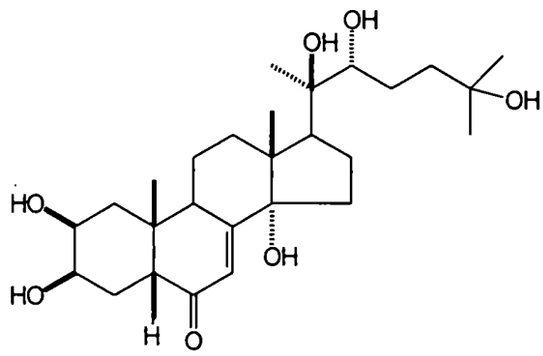


(11)



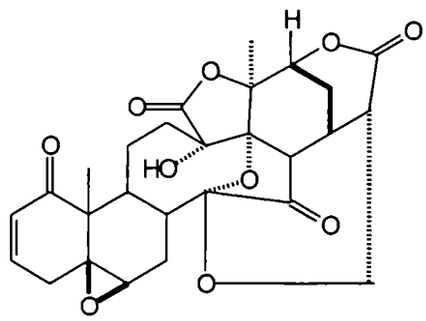
(12)

Teniendo en cuenta que los ecdisteroides controlan el desarrollo de insectos en todos los estadíos de su ciclo de vida y dada la similitud estructural entre este tipo de compuestos y los withanólidos, Dinan y colaboradores estudiaron la actividad de varios de estos compuestos como posibles agonistas o antagonistas de la 20-hidroxiecdisona (**13**) (Dinan *et al.*, 1999 y referencias allí citadas). El método desarrollado consiste en observar los cambios producidos por los compuestos estudiados en líneas celulares de *Drosophila* melanogaster B II (sangre tumorosa) en presencia de 20-hidroxiecdisona (**13**). Si bien ninguno de los compuestos ensayados presentó actividad como agonista, varios withanólidos actuaron como antagonistas, lo cual permite pensar que una posible función biológica de los withanólidos en las plantas puede ser la de antagonizar la acción de ecdisteroides en insectos herbívoros.



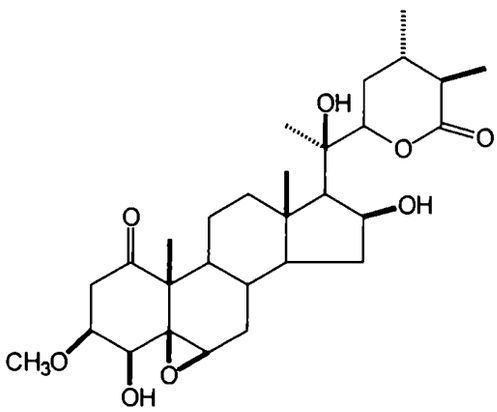
(**13**)

Con respecto al aislamiento de withanólidos con actividad anticancerígena, podemos mencionar, en los últimos años, a la fisalina F (**14**) aislada de *Physalis angulata*, la cual mostró citotoxicidad contra cinco líneas celulares cancerosas: Calu-1 (pulmón), Colo-205 (colón), HA225 (hepatoma), HeLa (cuello de útero) y KB (nasofaringe); este compuesto también presentó actividad antitumoral *in vivo* en el sistema de ensayo para la línea celular "murina' P388 de leucemia linfocítica (Chiang *et al.*, 1992).

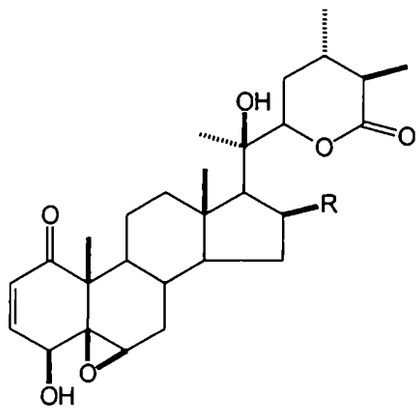


(14)

Recientemente, Kennely y colaboradores informaron que tres withanólidos, la 2,3-dihidro-3-metoxiwithafisacarpina (**15**), la withafisacarpina (**16**) y el 24,25-dihidrowithanólido D (**17**) aislados de los frutos de la especie *Physalis philadelphica* presentaban actividad quimiopreventiva del cáncer en base a los resultados obtenidos al trabajar con líneas celulares de hepatoma murino Hepa 1c1c7, TAOc1BP^{r}c1 y BP^{r}c1 (Kennelly *et al.*, 1997). En dicho ensayo, se monitoreaba la inducción de la quinona-reductasa (QR) ya que su respuesta es indicativa de una elevación generalizada de los niveles enzimáticos de la fase II. Se ha determinado que esta fase es, en parte, la responsable del proceso de detoxificación de sustancias químicas carcinogénicas y otros oxidantes nocivos para la salud, estando asociada la inducción de la quinona-reductasa a una posible prevención del cáncer en el estadío de iniciación del tumor.



(**15**)



(**16**) R= OH
(**17**) R= H

WITHANOLIDOS EN EL GENERO *DATURA*

La tribu *Datureae* presenta un único género, *Datura* (Hunziker, 1984). Este género presenta hierbas anuales con hojas alternas o acopladas, flores erectas, generalmente solitarias. Si bien se postula que su origen es asiático, se encuentra ampliamente distribuido en América del Sur.

El género *Datura* es uno de los pocos géneros, dentro de la familia de las *Solanaceas*, que biosintetiza withanólidos pertenecientes al subgrupo (i) del grupo A, es decir withanólidos de esqueleto "normal", además de los específicos al subgrupo (vi) correspondiente a las withametelinas de *Datura metel* (**Figura 2**, pág. 9).

Las tres funcionalidades características que se repiten en varios withanólidos aislados del género *Datura* son la presencia de un sistema 5α-OH-6α,7α-epóxido, funciones oxigenadas en posición 12 y 21 y formación del anillo adicional del tipo withametelina.

El primer withanólido encontrado en *Datura* fue la daturolactona 1 (**18**), aislada de *Datura quercifolia* (Dhar *et al.*, 1973). Desde entonces y hasta la actualidad, se han aislado cuarenta withanólidos distintos de diferentes especies de *Datura* y sólo tres de ellos habían sido aislados en otros géneros: *Nicandra physaloides*, *Lycium chinense* y *Withania coagulans* (Ray, 1998). Se encontraron withanólidos en las siguientes especies del género *Datura* :

D. quercifolia

D. metel {*subnom D. fastuosa*}

D. stramonium {*sub nom. Datura tatula*}

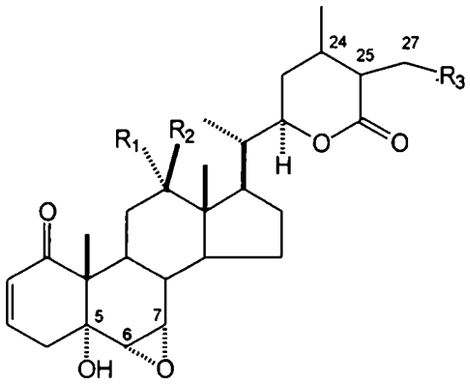
D. tatura

D. ferox

En las **Figuras 6**, **7** y **8**, se representan las distintas estructuras halladas agrupadas en base al tipo de sustitución común y en la **Tabla 2** se indica de que especies fueron aisladas.

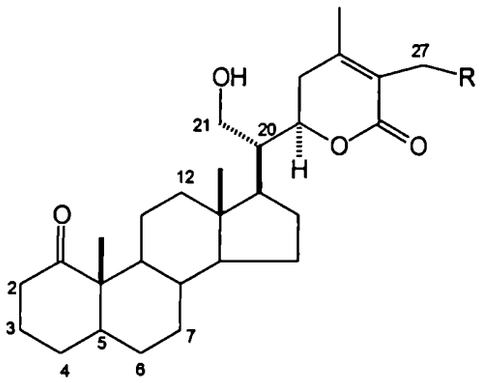
Tabla 2. Withanólidos aislados en las distintas especies del género *Datura*.

Datura quercifolia	(**10**) (Kirson *et al.*, 1972); (**11**) y (**18**) (Kalla *et al.*, 1979); (**19**) (Qurishi *et al.*, 1979-a); (**20**) (Qurishi *et al.*, 1979-b); (**21**) (Evans *et al.*, 1984); (**22**) (Bagchi *et al.*, 1984).
Datura metel	(**21**) y (**23**) (Gupta *et al.*, 1991); (**25**) (Gupta *et al.*, 1992); (**26**) (Shingu *et al.*, 1987); (**27**) (Kundu *et al.*, 1989); (**28**) y (**29**) (Gupta *et al.*, 1992); (**30**) y (**31**) (Manickam *et al.*, 1994-a); (**32**) (Manickam *et al.*, 1994-b); (**33**) (Manickam *et al.*, 1998); (**39**) (Mahmood *et al.*, 1988); (**40**) y (**41**) (Shingu *et al.*, 1989); (**42**) y (**43**) (Manickam *et al.*, 1993); (**44**) (Shingu *et al.*, 1989); (**45**) y (**46**) (Sinha *et al.*, 1989); (**47**) (Gupta *et al.*, 1991); (**48**) y (**49**) (Jahromi *et al.*, 1993); (**50**) (Manickam *et al.*, 1994-b); (**51**) (Siddiqui *et al.*, 1987); (**52**) (Shingu *et al.*, 1987); (**53**) (Shingu *et al.*, 1989).
Datura stramonium	(**18**) (Evans *et al.*, 1984); (**26**) (Tursunova *et al.*, 1978); (**34**) (Manickam *et al.*, 1996a); (**35**), (**36**) y (**37**) (Srivastava *et al.*, 1996); (**38**) (Manickam *et al.*, 1996b).
Datura tatura	(**54**) y (**55**) (Shingu *et al.*, 1990)
Datura ferox	(**18**), (**20**), (**22**) y (**10**) (Evans *et al.*, 1984).



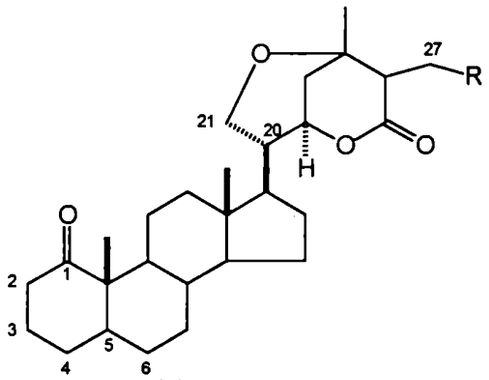
(**10**) R_1, R_2=O, R_3=H, Δ^{24}
(**11**) R_1, R_2=O, 24,25-epoxi
(**18**) R_1=OH, R_2=H, 24,25-epoxi
(**19**) R_1= R_2=H, 24,25-epoxi
(**20**) R_1=R_3=H, R_2=OH, Δ^{24}
(**21**) R_1=R_2=R_3=H, Δ^{24}
(**22**) R_1=OH, R_2=R_3=H, Δ^{24}
(**23**) R_1=R_2=H, R_3=OH, Δ^{24}
(**24**) R_1=R_3=OH, R_2=H, Δ^{24}
(**25**) R_1=H, R_2=R_3=OH, Δ^{24}

Figura 6. Withanólidos con sustitución 5α-hidroxi-6α,7α-epóxido aislados del género *Datura*.

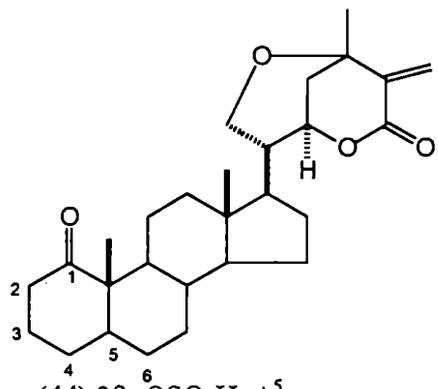


(**26**) R=Oglc, $\Delta^{2,5}$
(**27**) R=OMe, $\Delta^{2,5}$
(**28**) R=H, 5α-OH, 6β-OH
(**29**) R=H, 5α-OH, 6β-OH, Δ^{2},
(**30**) R=OH, 5β,6β-epoxi, Δ^{2}
(**31**) R=OH, 5α-OH, 6β-OH, Δ^{2}
(**32**) R=OMe, 5α-OH, 6β-OH, Δ^{2}
(**33**) R= OH, 5α-OH, 6β-OH, 12β-OH, Δ^{2}
(**34**) R=H, 5β,6β-epoxi
(**35**) R=H, 5β,6β-epoxi, 12β-OH, Δ^{2}
(**36**) R=H, 6β-OH, 12β-OH, $\Delta^{2,5}$
(**37**) R=H, 5α-OH, 6β-OH, 12β-OH, Δ^{2}
(**38**) R=H, 5β,6β-epoxi, Δ^{2}

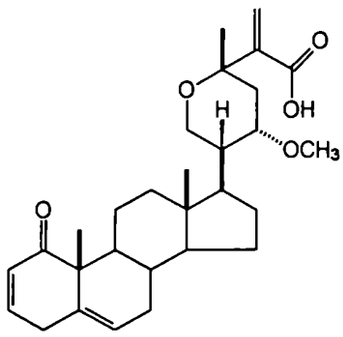
Figura 7. Withanólidos con sustitución 21-hidroxi aislados del género *Datura*.



(**39**) R=OH, $\Delta^{2,5}$
(**40**) R =OMe, $\Delta^{2,5}$
(**41**) R =OGlc, $\Delta^{2,5}$
(**42**) R=OH, 5β,6β-epoxi
(**43**) R=OH, 5β,6β-epoxi, Δ^{2}

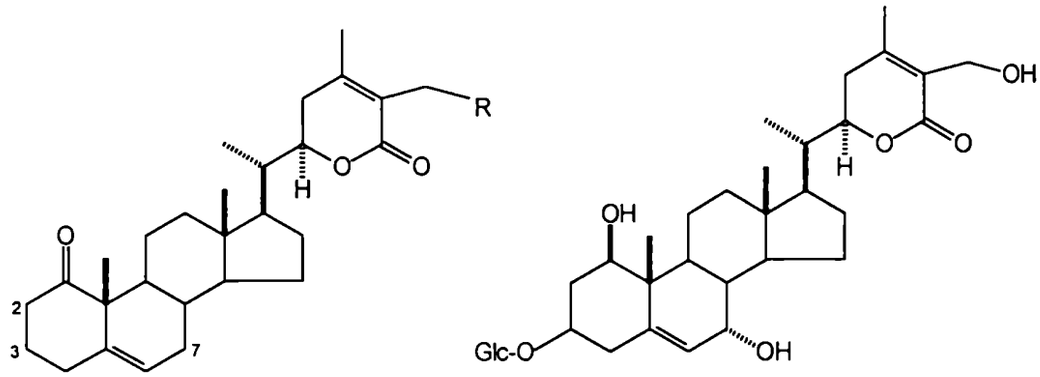


(**44**) 3β–OSO_3H, Δ^{5}
(**45**) $\Delta^{3,5}$
(**46**) $\Delta^{2,5}$
(**47**) 6β-OH, $\Delta^{2,4}$
(**48**) 5β,6β-epoxi, Δ^{2}
(**49**) 6α-OH, 6β-OH, Δ^{2}
(**50**) 3β-OMe, 5β,6β-epoxi



(**51**)

Figura 8. Withanólidos con anillo adicional del tipo withametelina aislados del género *Datura*.



(**52**) R=Oglc, Δ^2
(**53**) R=OMe, 3β–OSO_3H
(**54**) R=Oglc, 7α-OH, Δ^2

(**55**)

Figura 9. Otros withanólidos aislados del género *Datura*.

La especie *Datura quercifolia* se caracteriza por biosintetizar withanólidos con una sustitución 5α-hidroxi-6α,7α-epóxido (**Figura 6**) mientras que en la especie *Datura metel* (subnom. *Datura fastuosa)*, la mayoría de los withanólidos aislados presentan una función oxigenada en C-21 (**Figura 7**). De la especie *Datura ferox*, una de las especies que fue objeto de estudio en esta Tesis, se habían aislado cuatro withanólidos hasta el año 1993: las daturolactonas 1 (**18**) y 3 (**20**), el withaferoxólido (**22**) y la withanicandrina (**10**) (Evans *et al.*, 1984). Estos compuestos tienen en común la funcionalidad 5α-hidroxi-6α,7α-epóxido en el anillo B y una función oxigenada en posición 12.

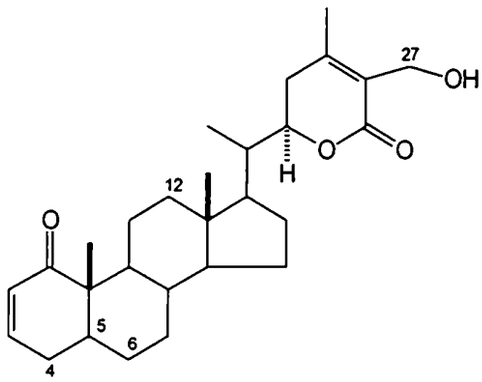
WITHANOLIDOS EN EL GENERO *JABOROSA*

Perteneciente a la subfamilia *Solanoideae*, la tribu *Jaboroseae* se subdivide en dos genéros, *Salpichroa* y *Jaborosa*. Este último está constituido por 23 especies de las cuales 22 crecen en Argentina (*Jaborosa pinnata* es exclusivamente chilena) (Barboza *et al.*, 1998). Las plantas habitan en suelos pedregosos de alta montaña, en lugares semiáridos y, en contados casos, en zonas húmedas, a veces inundables. Las 22 especies halladas son: *J. integrifolia*, *J. odonelliana*, *J. oxipetala*, *J. runcinata*, *J. ameghinoi*, *J. araucana*, *J.*

bergii, *J. cabrerae*, *J. caulescens*, *J. chubutensis*, *J. kurtzii*, *J. laciniata*, *J. lanigera*, *J. leucotricha*, *J. magellanica*, *J. parviflora*, *J. reflexa*, *J. riojana*, *J. rotacea*, *J. sativa*, *J. squarrosa* y *J. volkmannii*.

En las **Figuras 10-16** y en la **Tabla 3**, se representan las distintas estructuras aisladas de las diferentes especies de *Jaborosa*.

Los primeros withanólidos encontrados dentro de este género, fueron las jaborosolactonas A (**56**) y B (**57**), aisladas de *Jaborosa integrifolia* Todos los withanólidos aislados de esta especie se caracterizan por poseer una funcionalidad 27-OH y difieren entre sí en la sustitución de los anillos A y B (**Figura 10**).



(**56**) 5β,6β-epoxi.
(**57**) Δ^4, 6β-OH.
(**58**) 5β-OH, 6α-Cl.
(**59**) 5α-OH, 6β-OH.
(**60**) 5α-Cl, 6β-OH.
(**61**) 5α-OH, 6β-OH, 12α-OH

Figura 10. Withanólidos aislados de *Jaborosa integrifolia*.

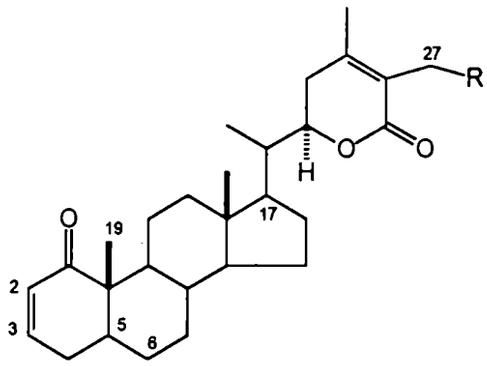
Desde el punto de vista fitoquímico, *Jaborosa leucotricha* es una de las especies más estudiadas. El hecho de haber aislado simultáneamente 19-hidroxiwithanólidos y withanólidos con anillo A aromático de esta planta, sugiere como posible ruta biosintética para la formación de estos últimos la eliminación oxidativa del CH_3-19 (comparar las jaborosolactonas V (**64**) y Q (**69**)) (**Figura 11**). Cabe destacar la variabilidad de estructuras aisladas de *Jaborosa leucotricha* en función de la época del año o del lugar en que se realizó la recolección de las plantas.

Tabla 3. Withanólidos aislados en las distintas especies del género *Jaborosa*.

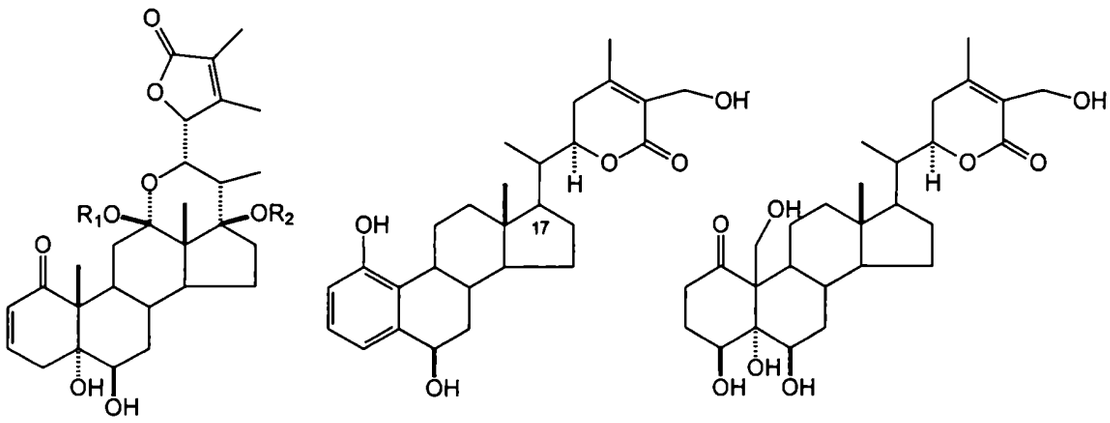
Jaborosa integrifolia	(**56**) y (**57**) (Tschesche *et al.*, 1966); (**58**), (**59**), (**60**) y (**61**) (Tschesche *et al.*, 1968, 1972).	**Figura 10**
Jaborosa leucotricha	(**62**) (Lavie *et al.*, 1986); (**63**) (Monteagudo *et al.*, 1989); (**64**) y (**65**) (Misico *et al.*, 1996), (**66**), (**67**) y (**68**) (Misico *et al.*, 1997); (**69**) (Veleiro *et al.*, 1992), (**70**) (Misico *et al.*, 1997); (**71**) (Misico *et al.*, 1996).	**Figura 11**
Jaborosa laciniata	(**3**) (Lavie *et al.*, 1987)	**Figura 12**
Jaborosa magellanica	(**3**) (Parvaez *et al.*, 1988); (**67**), (**72**), (**73**), (**74**) y (**75**) (Fajardo *et al.*, 1991); (**76**) (Cárcamo *et al.*, 1993); (**77**) (Fajardo *et al.*, 1991); (**78**) (Fajardo *et al.*, 1987).	**Figura 13**
Jaborosa bergii	(**79**), (**80**), (**81**), (**82**) y (**83**) (Monteagudo *et al.*, 1988)	**Figura 14**
Jaborosa sativa	(**85**), (**86**), (**87**) y (**88**) (Bonetto *et al.*, 1996)	**Figura 15**
Jaborosa odonelliana	(**4**) (Monteagudo *et al.*, 1990)	**Figura 16**

Cabe mencionar que la jaborosolactona M (**3**) aislada por Parvaez *et al.* de *Jaborosa magellanica*, es idéntica al trechonólido A aislado anteriormente de *J. laciniata*. El nombre de jaborosolactona M se ha reservado para el compuesto **80** aislado de *J. bergii* en el mismo año (Monteagudo *et al.*, 1988). *Jaborosa leucotricha* y *Jaborosa magellanica* son las únicas especies conocidas hasta el momento capaces de biosintetizar withanólidos con anillo A aromático (**Figura 11** y **13**).

En los withanólidos aislados de *J. bergii*, es característica la presencia de sustituyentes hidroxilo en posición 14β y 17β (**Figura 14**).



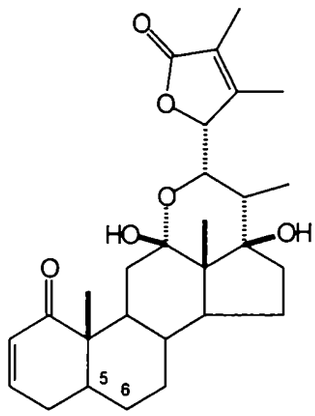
(**62**) R = H, 5β, 6β-epoxi, 17α-OH.
(**63**) R = OH, 2,3-dihidro, 5β,6β-epoxi, 17α-OH, 19-OH.
(**64**) R = OH, 5β,6β-epoxi, 19-OH.
(**65**) R = OH, 2,3-dihidro, 5β,6β-epoxi, 19-OH.
(**66**) R = H, 5α-OH,6β-OH, 17β-OH.



(**67**) $R_1 = R_2 = H$
(**68**) $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$
(**69**)
(**70**) 17α-OH.
(**71**)

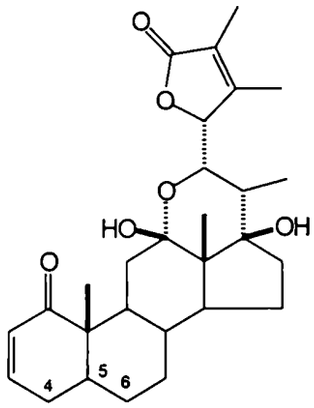
Figura 11. Withanólidos aislados de *Jaborosa leucotricha.*

Tres de los compuestos aislados de *Jaborosa sativa* presentan un hemiacetal cíclico formado a partir de una cetona en C-12 y un hidroxilo en C-21. Los withanólidos con este tipo de ciclo adicional se han denominado sativólidos (**Figura 15**).

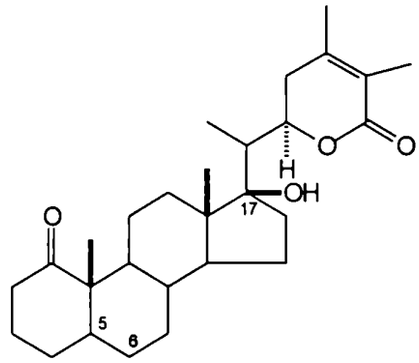


(3) 5β, 6β-epoxi.

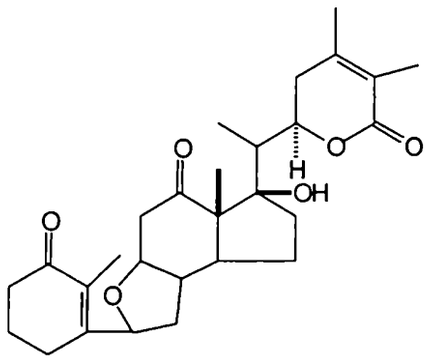
Figura 12 . Withanólido aislado de *Jaborosa laciniata.*



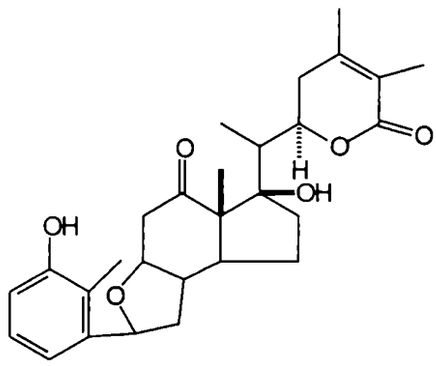
(3) 5β,6β-epoxi,
(67) 5α-OH, 6β-OH
(72) 5α-OH, 6-ceto
(73) 5β-OH, 6α-Cl
(74) Δ^4, 6α-Cl



(75) 5α-OH, 6β-OH.
(76) 5β,6β-epoxi.

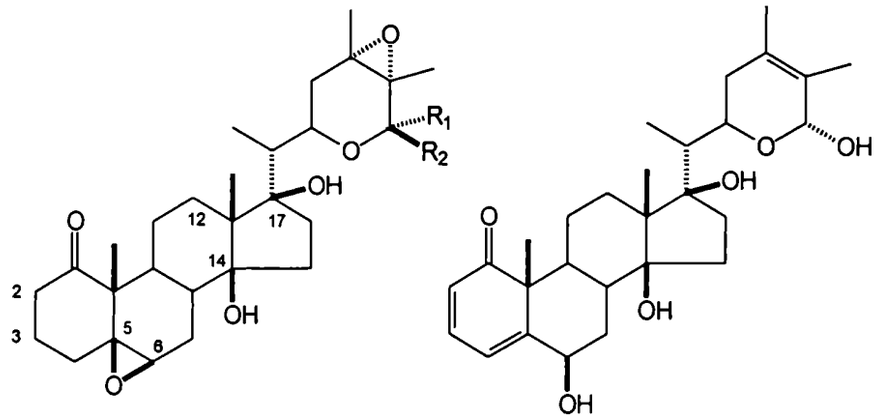


(77)



(78)

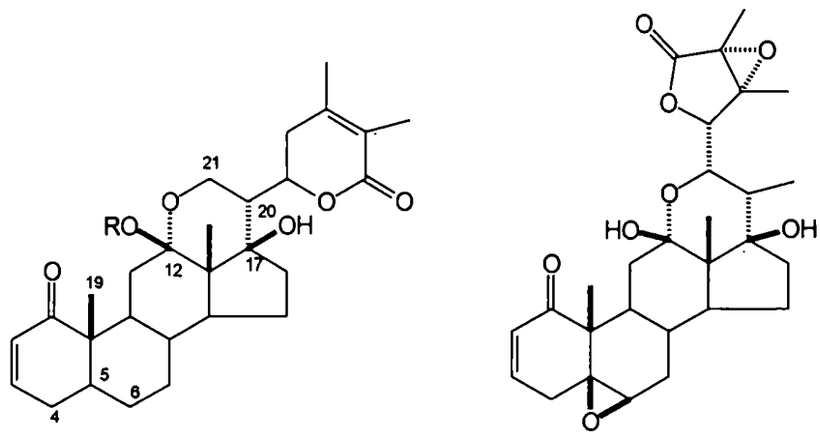
Figura 13. Withanólidos aislados de *Jaborosa magellanica.*



(79) R_1= OH, R_2=H, Δ^2
(80) R_1, R_2= O, Δ^2
(81) R_1= OH, R_2=H
(82) R_1, R_2=O

(83)

Figura 14 Withanólidos aislados de *Jaborosa bergii.*



(85) R = H, Δ^4, 6β-OH.
(86) R = H, 5α-OH, 6β-OH.
(87) R = CH_3, 5α-OH, 6β-Cl.

(88)

Figura 15. Withanólidos aislados de la *Jaborosa sativa.*

De *Jaborosa odonelliana*, una de las especies objeto de estudio en esta Tesis, sólo se había aislado la jaborosolactona P (**4**) (Monteagudo *et al.*, 1990) (**Figura 16**), siendo este compuesto el primer withanólido aislado con anillo espiránico.

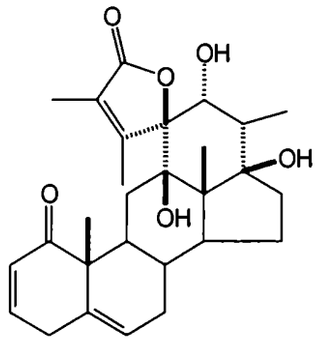


Figura 16. Unico withanólido aislado de *Jaborosa odonelliana* con anterioridad a esta Tesis

En lo descripto anteriormente, se observa que el género *Jaborosa* se caracteriza por biosintetizar withanólidos con funcionalidad muy variada aún dentro de una misma especie, como en el caso de *Jaborosa leucotricha* y *Jaborosa magellanica*. Este hecho hace interesante su estudio debido a la posible variedad de actividades biológicas que podrían presentar estos compuestos.

OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de esta tesis es el estudio de los withanólidos presentes en las especies *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* y *Jaborosa odonelliana* teniendo en cuenta su posible acción como insecticidas naturales, agentes quimiopreventivos de cáncer y su uso como marcadores quimiotaxonómicos.

Como se mencionó anteriormente, varios de los withanólidos con propiedades antialimentarias poseen una sustitución 5α-hidroxi-6α,7α-epoxi (pág. 15), siendo esta funcionalidad típica de withanólidos aislados de algunas especies de *Datura* (pág. 20); en particular de la especie *Datura ferox* asiática, se había aislado el withaferoxólido (**22**) como componente mayoritario. Se decidió, por lo tanto, estudiar a la especie *Datura*

Con respecto al género *Jaborosa*, varias de sus especies han sido objeto de estudio en nuestro grupo de trabajo en los últimos años. Como ya se mencionó, en estudios previos realizados sobre *Jaborosa odonelliana* recolectada en la provincia de Salta, se aisló un único withanólido, la jaborosolactona P (**4**). Este compuesto presentaba un anillo γ-lactona espiránico, funcionalización no encontrada anteriormente en la familia de los withanólidos. Por otra parte, estudios preliminares realizados sobre plantas de *Jaborosa runcinata*, indicaron que la misma contenía withanólidos de estructura relacionada a los de *Jaborosa odonelliana*. En base a estos antecedentes, se decidió hacer un estudio exhaustivo de los withanólidos de ambas especies, dado que lo inusual de estas estructuras, hace interesante el estudio de sus actividades biológicas.

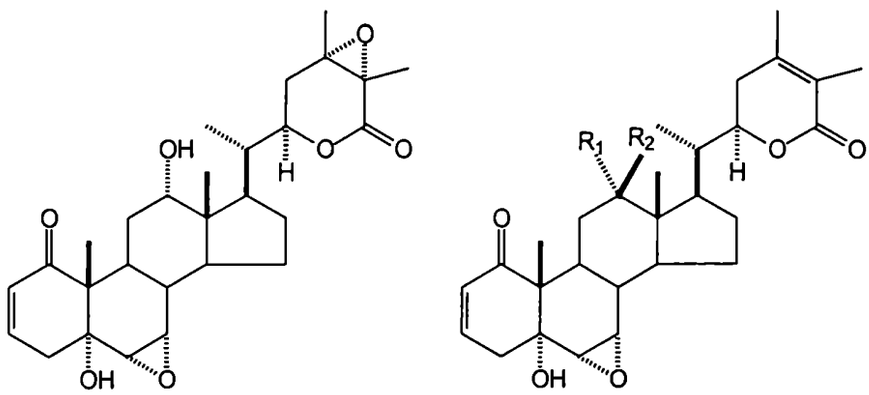
Capítulo 2

Aislamiento y Elucidación Estructural de Withanólidos de Datura ferox

WITHANOLIDOS DE *DATURA FEROX*

La especie *Datura ferox* (Lam.), conocida vulgarmente en la Argentina como "chamico", es originaria de Asia y adventicia en América. Se encuentra distribuida en América del Sur apareciendo en suelos modificados y es sumamente tóxica tanto para humanos como para ganado debido a la presencia de alcaloides tales como atropina, hiosciamina e hioscina, entre otros.

Como se mencionó anteriormente, hasta el año 1993, se habían aislado de la especie *Datura ferox* cuatro withanólidos: la withanicandrina (**10**), las daturolactonas 1 (**18**) y 3 (**20**) y el withaferoxólido, también denominado nicandrina B (**22**) (Evans. *et al,*, 1984). (**Figura 17**)



(**18**)

(**10**) $R_1,R_2 = O$
(**20**) $R_1 = H, R_2 = OH$
(**22**) $R_1 = OH, R_2 = H$

Figura 17. Withanólidos aislados de *Datura ferox* hasta 1993.

La especie *Datura ferox* se recolectó en San Antonio de Litín, sobre ruta provincial N° 3, a 50 km al norte de la ciudad de BellVille (provincia de Córdoba), en el mes de diciembre. El material vegetal seco y molido se trató primero con cloroformo:acetona:metanol (1:1:1) y luego con hexano:metanol:agua (10:3:1) a temperatura ambiente (ver detalles en la Parte Experimental, Capítulo 6). La fase

orgánica obtenida se evaporó a presión reducida hasta sequedad obteniéndose un residuo que contenía los compuestos de interés.

El análisis de la composición de dicho extracto por cromatografía en capa delgada utilizando distintos sistemas de solventes, reveló la existencia de una mezcla muy compleja para la cual no coincidía el número de componentes al usar distintos eluyentes. Por este motivo, se ensayaron dos esquemas de separación diferentes (**I** y **II**) dividiendo al extracto original en dos fracciones.

A continuación, se detallan ambos procedimientos seguidos.

ESQUEMA SEPARATIVO I

Una parte del extracto se sometió al esquema separativo de la **Figura 18** aislándose cuatro fracciones principales que contenían withanólidos (los detalles se encuentran en la Parte Experimental, Capítulo 6).

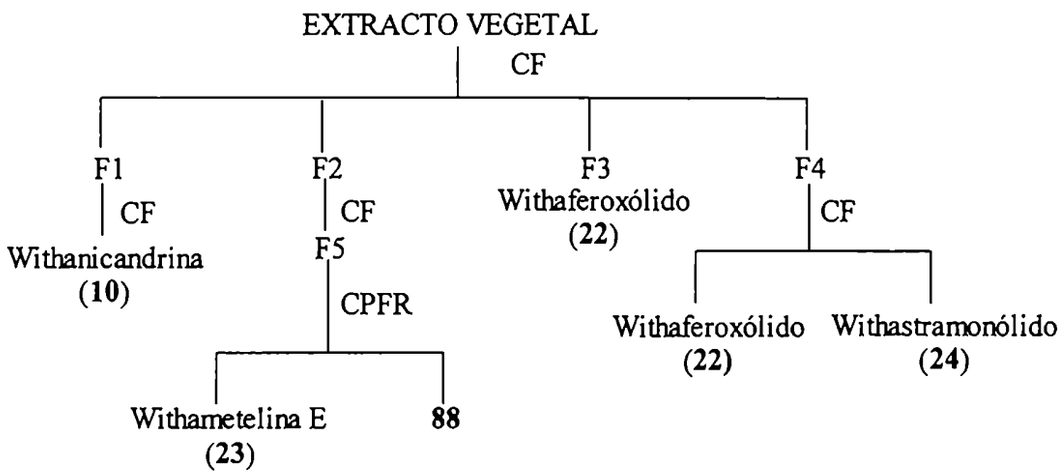


Figura 18: Esquema separativo **I** seguido en el procesamiento del extracto de *Datura ferox*. CF: cromatografía flash; CPFR: cromatografía preparativa en fase reversa.

Al ser purificadas dichas fracciones mediante el uso de cromatografía flash y cromatografía en capa delgada preparativa, se aislaron cinco withanólidos (**Figura 19**). Cuatro de ellos resultaron de estructura conocida: el withaferoxólido (**22**), withanólido

mayoritario de esta especie (Evans *et al.*,1984), la withanicandrina (**10**) (Kirson. *et al.*, 1972), la withametelina E (**23**) (Gupta *et al.*, 1992) y el withastramonólido (**24**) (Tursunova *et al.*,1976).

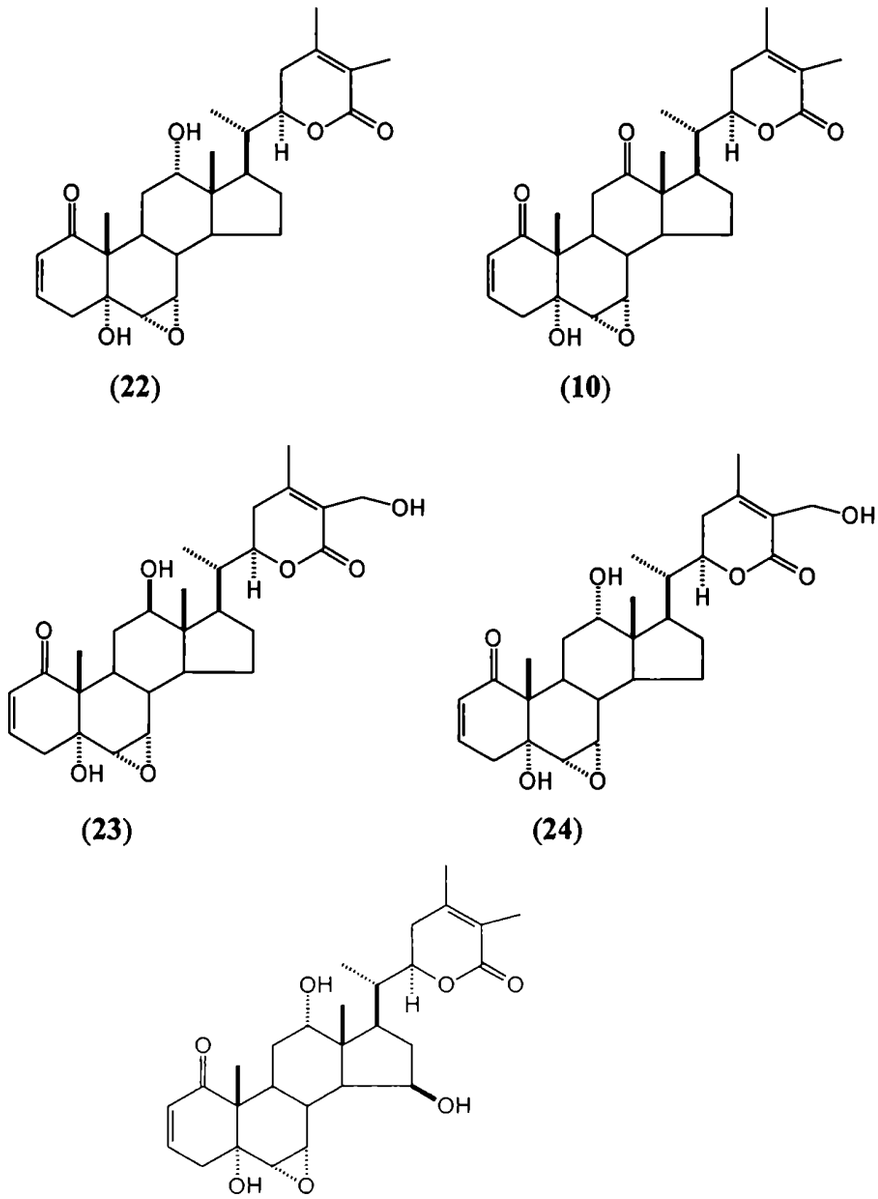


Figura 19 . Withanólidos de *Datura ferox* siguiendo el esquema I (**Fig. 18**).

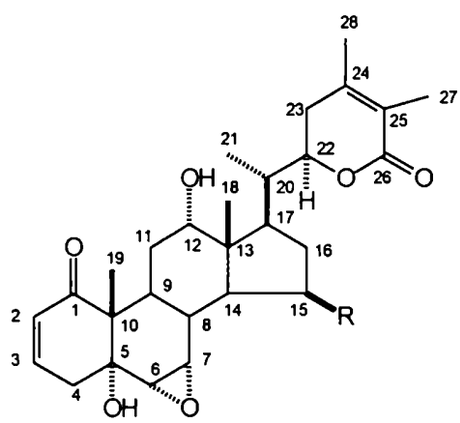
Estos withanólidos fueron identificados por comparación con los espectros RMN ^{1}H y ^{13}C descriptos en literatura. En el caso de la withanicandrina (**10**) no se encontraba

descripto el espectro de RMN ^{13}C, por lo cual, el mismo fue asignado y se incluye en el Apéndice (pág. 163).

El quinto compuesto no había sido aislado previamente. A continuación, se describen y analizan las evidencias espectroscópicas que llevaron a determinar su estructura como el 15β-hidroxiderivado de la nicandrina B o withaferoxólido (**22**).

15β-hidroxinicandrina B (88)

Los espectros de RMN ^{1}H y RMN ^{13}C de la 15β-hidroxinicandrina B (**88**), resultaron semejantes a los del withaferoxólido (**22**) salvo las señales correspondientes al anillo D (**Tablas 4** y **5**).



(**88**) R = OH
(**22**) R = H

El espectro RMN ^{1}H del compuesto **88** (**Tabla 4**) presentaba, a campos bajos, las señales típicas de un sistema 2-en-1-ona sin sustituyente en C-4, en el anillo A: un doble doblete a δ 5,87 correspondiente al H-2 y un doble doble doblete a δ 6,61 asignado a H-3.

La señal a δ 3,05 (*d*, J = 3,8 Hz) fue asignada al H-6 por comparación con otros withanólidos conocidos con funcionalización 6α,7α-epoxi.

Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de la 15β-hidroxinicandrina B (**88**) y señales relevantes del withaferoxólido (**22**).

H	88	22	H	88	22
2	5,87 *dd* (10,1; 2,9)	5,84 *dd* (10,1; 2,1)	16α	2,32 *ddd* (14,1; 13,3; 5,5)	
3	6,61 *ddd* (10,1; 5,0; 2,5)	6,60 *ddd* (10,1; 4,8; 2,5)	16β	1,41 *ddd* (14,1; 9,0; 1,7)	
4α	2,52 *dd* (18,0; 5,0)	2,52 *dd* (19,0; 4,8)	17	1,92 *ddd* (13,3; 9,0; 1,7)	
4β	2,70 *ddd* (18,0; 2,9; 2,5)	2,70 *ddd* (19,0; 2,5;2,1)	18	1,06 *s*	0,77 *s*
6	3,05 *d* (3,8)	3,04 *d* (3,8)	19	1,20 *s*	1,17 *s*
7	3,72 *dd* (3,8; 1,7)	3,31 *dd* (3,8; 1,8)	20	2,12 *m*	1,95 *m*
8	2,21 *dt* (10,8; 1,7)	1,80 *dt* (10,7; 1,8)	21	1,10 *d* (6,5)	1,09 *d* (5,8)
9	2,10 *dt* (10,8; 2,7)	_	22	4,35 *dt* (13,5; 3,5)	4,37 *dt* (13,0; 3,0)
11α	2,85 *dt* (13,0; 2,7)	2,87 *dt* (13,6; 3,2)	23α	1,99 *dd* (18,3; 3,5)	2,01 *dd* (18,0; 3,0)
11β	1,61 *ddd* (13,0; 10,8; 3,5)	1,61 *ddd* (13,6; 10,4; 3,4)	23β	2,51 *dd* (18,3; 13,5)	2,51 *dd* (18,0; 13,0)
12	3,96 *sa* ($W_{1/2}$ 6,0)	4,03 *sa* ($W_{1/2}$ 6,0)	27	1,89 *s*	1,87 *s*
14	1,87 *dd* (10,8; 5,5)	_	28	1,94 *s*	1,94 *s*
15	4,45 *dt* (5,5; 1,7)	_			

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se indican en Hz entre paréntesis.

Los dos singuletes a δ 1,89 y 1,94 indicaban la presencia de una cadena lateral de tipo δ-lactona-α,β-insaturada con metilos en las posiciones 24 y 25. A campos altos del espectro, se encontraban tres señales a δ 1,06, 1,10 y 1,20, asignadas a los metilos 18, 21 y 19 respectivamente. La señal ancha observada a δ 3,96 ($W_{1/2}$ 6,0 Hz) resultaba característica del H-12 de los 12α-hidroxiwithanólidos tal como el withaferoxólido (**22**) (Evans *et al.*,1984).

Las principales diferencias con respecto al espectro de RMN ^{1}H del withaferoxólido (**22**) eran el corrimiento a campos bajos (0,41 ppm) de la señal correspondiente al H-7 y la presencia de una señal adicional a δ 4,45 asignada a H-15, la cual sugería la existencia de una funcionalidad 15-hidroxi.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de la 15β-hidroxinicandrina B (**88**).

C	δ	C	δ	C	δ
1	203,6	11	29,9	20	38,8
2	128,9	12	73,1	21	12,1
3	140,0	13	46,7	22	78,4
4	36,8	14	48,4	23	29,9
5	73,4	15	69,8	24	149,4
6	56,2	16	40,7	25	122,0
7	56,7	17	43,4	26	167,3
8	32,6	18	14,7	27	12,5
9	28,9	19	15,0	28	20,5
10	50,7				

El espectro de RMN ^{13}C de la 15β–hidroxinicandrina B (**88**) (**Tabla 5**), complementado con el espectro DEPT, era concordante con la estructura propuesta. Se observaba una señal a δ 203,6 correspondiente al grupo carbonilo en C-1 y las cuatro señales olefínicas entre 122,0 y 150,0 ppm correspondientes a los dobles enlaces entre

C-2/C-3 y C-24/C-25. Las señales a 73,4 ppm, 56,2 ppm y 56,7 ppm, asignadas a C-5, C-6 y C-7 respectivamente, confirmaban la presencia de un 5α-hidroxi-6α,7α-epoxiwithanólido.

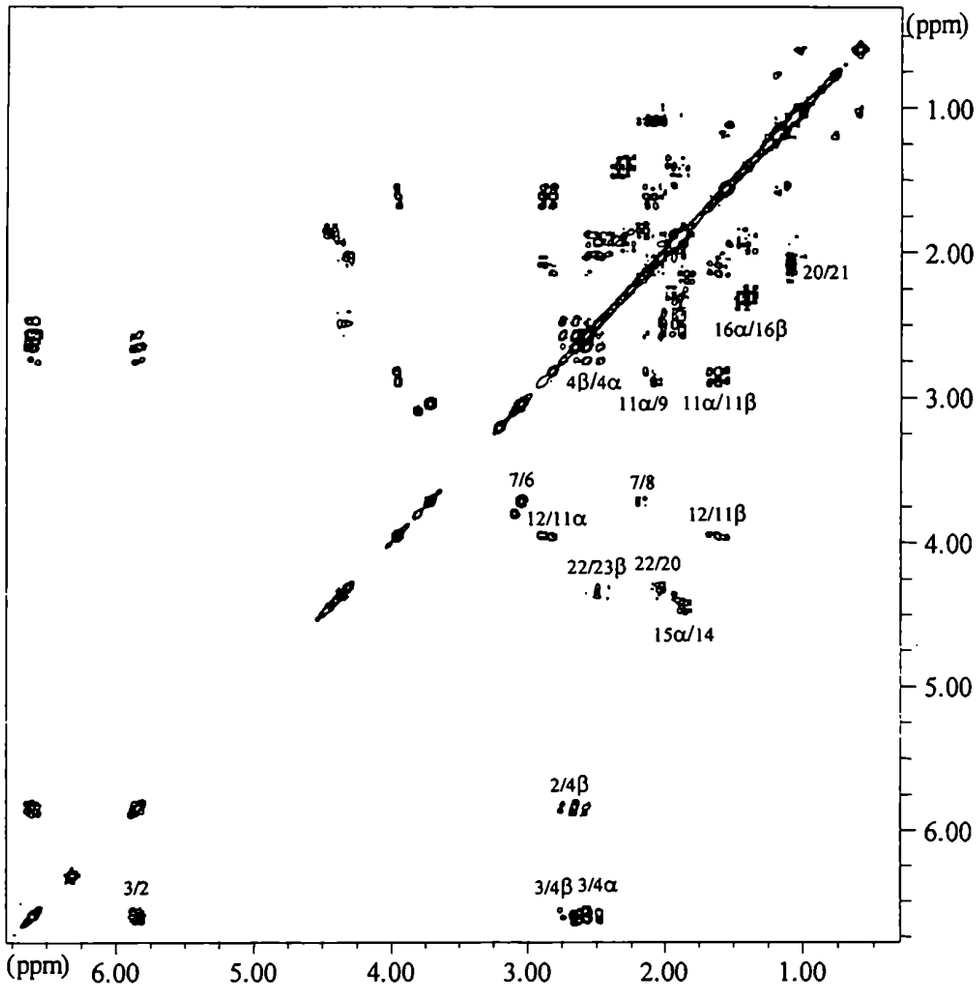


Figura 20. Espectro COSY-45 de la 15β-hidroxinicandrina B (**88**).

Las principales diferencias entre los espectros de RMN ^{13}C del compuesto **88** (**Tabla 5**) y del withaferoxólido (**22**) (ver Apéndice pág. 163) se observaban en las señales correspondientes al anillo D, en particular la señal a δ 69,8, asignada a C-15, estaba de acuerdo con la presencia de un grupo hidroxilo en esta posición.

Las correlaciones observadas en los espectros COSY-DQF y COSY-45 (**Figura 20**) permitieron confirmar las asignaciones detalladas en la **Tabla 4**. En particular, el COSY-DQF mostró la correlación entre H-15/H-16.

La estereoquímica del C-15 se estableció por un experimento NOESY y consideraciones de modelado molecular usando el método semiempírico AM1 (**Tabla 6**). El espectro NOESY mostró una fuerte correlación entre las señales a δ 4,45 (asignada a H-15) y δ 3,72 (correspondiente al H-7).

Tabla 6. Correlaciones más importantes obtenidas del espectro NOESY de 15β-hidroxinicandrina B (**88**).[a]

H	Correlaciones NOESY	Distancia H-H (Å)[b]
7	H-15	2,8
8	H-18, H-19	< 2,4
11β	H-18, H-19	< 2,2
12	H-18	2,4
20	H-18	2,4

[a] no se incluyen las interacciones entre hidrógenos vecinos y geminales.
[b] Distancias calculadas para el confórmero más estable de **88** (Hyperchem 5.1, AM1)

Si bien los cálculos mediante modelado molecular (AM1) para los confórmeros más estables de los distintos isómeros posibles del compuesto **88** indicaban que la distancia H-15/H-7 era menor de 3,0 Å tanto para el isómero α como para el isómero β, la ausencia de correlación en el espectro NOESY para el par H-15/H-18, concordaban con un grupo hidroxilo en posición β (**Figura 21**).

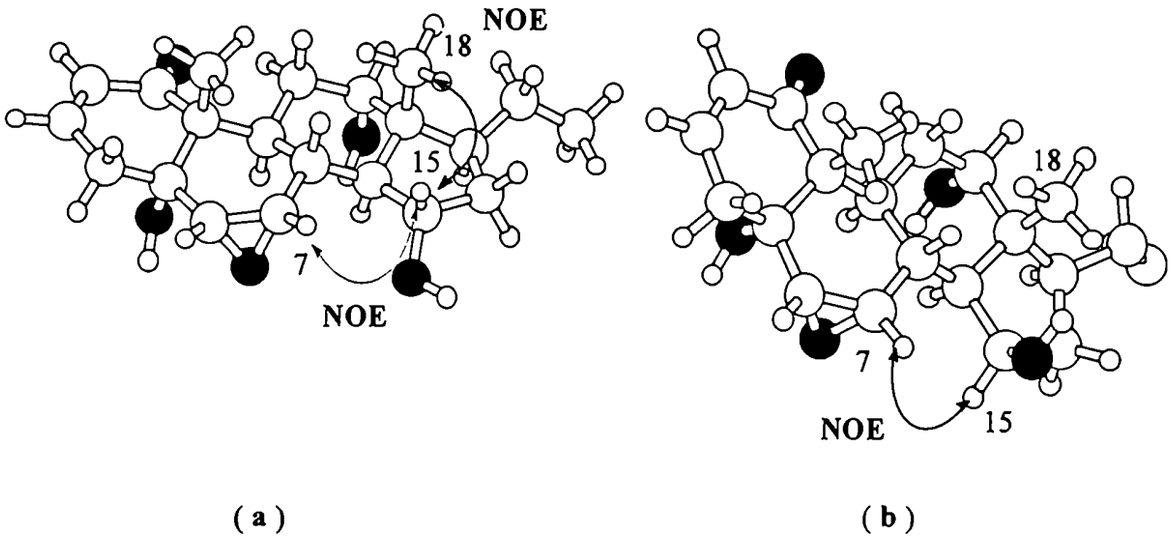


Figura 21 . Conformación de mínima energía (AM1) para los anillos A, B, C y D de la 15α-hidroxinicandrina B (**a**) y la 15β-hidroxinicandrina B (**b**) .

El espectro de masa FAB (alcohol *m*-nitrobencílico, KCl) de **88** mostró un ión $[M + K]^+$ a m/z 525, de acuerdo con la estructura propuesta. El espectro de masa de impacto electrónico (EMIE), presentó el ión molecular a m/z 486; en la **Figura 22**, se muestran las principales rupturas observadas, en particular, la ruptura del enlace entre C-20 y C-22 conduce a la obtención de dos fragmentos de m/z 361 y 125 siendo este último ión característico de una δ-lactona-α,β-insaturada.

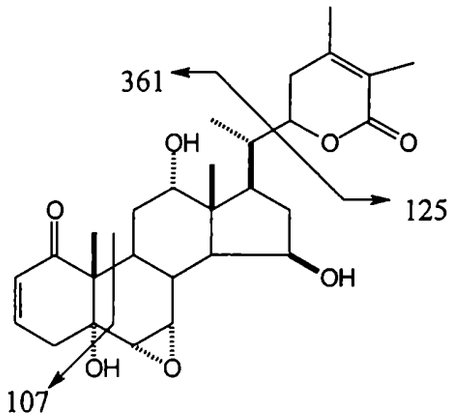
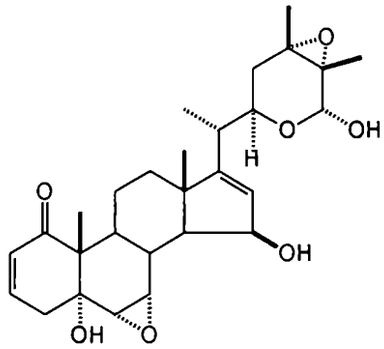


Figura 22. Fragmentaciones características en el espectro de masa de **88**.

Hasta el momento, sólo se había descripto un 15β-hidroxiwithanólido, la nicafisalina C (**89**), aislada de *Nicandra physaloides* (Shingu *et al*, 1994).



(**89**)

ESQUEMA SEPARATIVO II

La otra parte del extracto de *Datura ferox* se sometió al esquema separativo de la **Figura 23** aislándose cuatro fracciones principales que contenían withanólidos (los detalles se encuentran en la Parte Experimental, Capítulo 6).

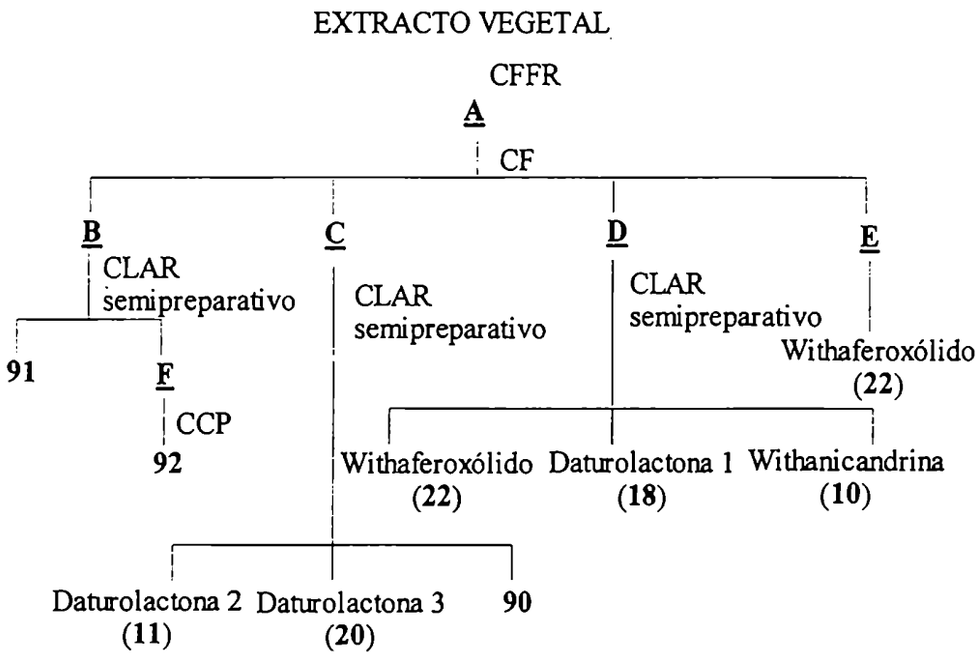
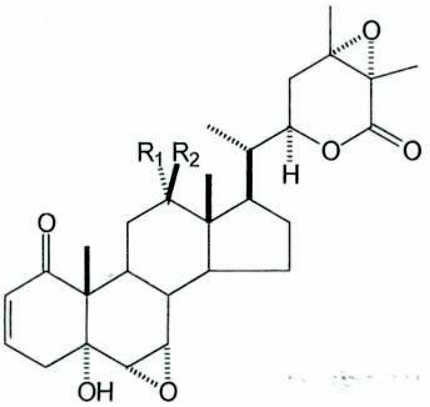
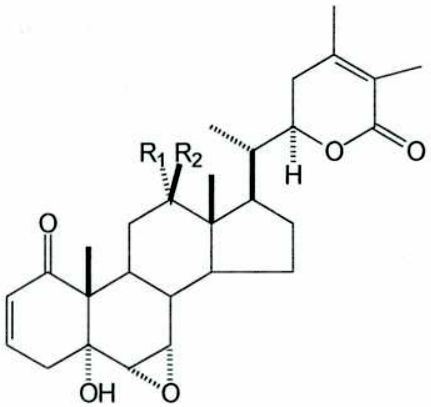


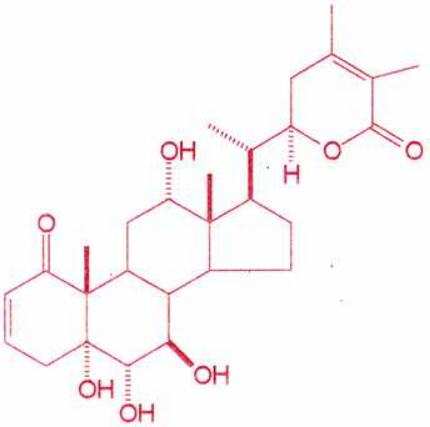
Figura 23 : Esquema separativo **II** seguido en el procesamiento del extracto de *Datura ferox*. CFFR: cromatografía flash en fase reversa; CF: cromatografía flash; CCP: cromatografía en capa preparativa, CLAR: cromatografía líquida de alta resolución.



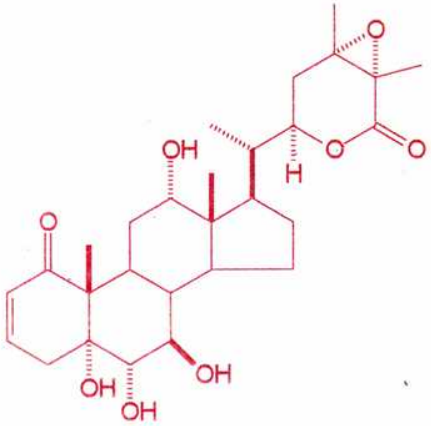
(**10**) $R_1,R_2 = O$
(**20**) $R_1 = H; R_2 = OH$
(**22**) $R_1 = OH; R_2 = H$



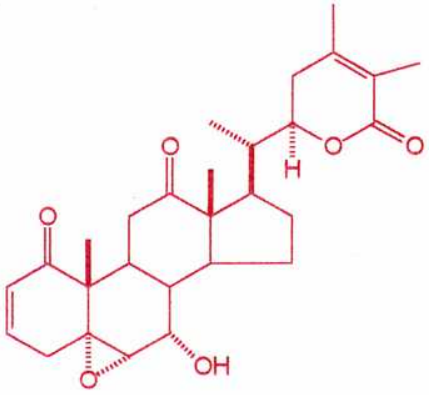
(**11**) $R_1,R_2 = O$
(**18**) $R_1 = OH; R_2 = H$



(**90**)



(**91**)



(**92**)

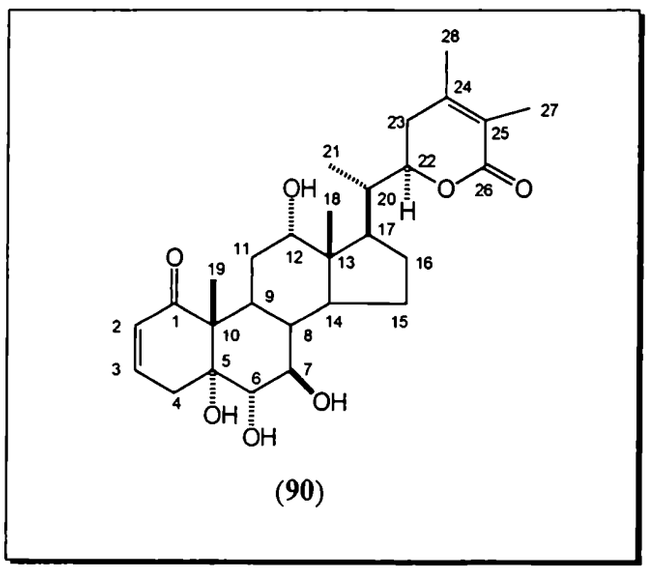
Figura 24. Withanólidos de *Datura ferox* aislados siguiendo el esquema **II** (**Fig. 23**).

Dichas fracciones fueron purificadas por CLAR semipreparativa aislándose ocho withanólidos. Cinco de estos compuestos resultaron de estructura conocida (**Figura 24**): withanicandrina (**10**), withaferoxólido (**22**) (Kirson *et al.*, 1972), también aislados al utilizar el esquema separativo I descripto anteriormente, y daturolactona 1 (**18**), daturolactona 2 (**11**) (Kalla *et al.*, 1979) y daturolactona 3 (**20**) (Qurishi *et al.*, 1979) aisladas previamente de *Datura quercifolia*. Estos withanólidos fueron identificados por comparación de sus espectros RMN ^{1}H y RMN ^{13}C con los descriptos en literatura.

En el caso de las daturolactonas 1 (**18**) y 2 (**11**), no se encontraban descriptos los espectros de RMN ^{13}C; los mismos fueron asignados y se indican en el Apéndice (pág. 163). A continuación, se describen y analizan las evidencias espectroscópicas que llevaron a determinar la estructura de los nuevos withanólidos llamados daturolactona 5 (**90**), daturolactona 6 (**91**) y daturolactona 7 (**92**) (**Figura 24**).

Daturolactona 5 (90)

El espectro de RMN ^{1}H de la daturolactona 5 (**90**) (**Tabla 7**), aislada en la fracción C (**Figura 23**), presentaba diferencias significativas respecto del withaferoxólido (**22**) (**Tabla 5**) en las señales correspondientes a los anillos A y B. Se observaban los desplazamientos químicos y las multiplicidades típicas de un sistema 2-en-1-ona no sustituido en posición 4, con señales a δ 5,91, 6,60, 2,57 y 2,70 asignadas a H-2, H-3, H-4α y H-4β.



(**90**)

A campos altos del espectro, se encontraban tres señales a δ 0,76, 1,10 y 1,20, asignadas a los metilos 18, 21 y 19 respectivamente.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H de daturolactona 5 (**90**)

H	δ	H	δ	H	δ
2	5,91 *dd* (10,0; 2,5)	11α	2,40 *m*	21	1,10 *d* (6,0)
3	6,60 *ddd* (10,0; 4,7; 2,5)	11β	1,61 *m*	22	4,38 *dt* (13,3; 3,5)
4α	2,57 *dd* (18,0; 4,7)	12	3,96 *sa* ($W_{1/2}$ 6,0)	23α	2,10 *m*
4β	2,70 *dt* (18,0; 2,5)	18	0,76 *s*	23β	2,50 *m*
6	3,66 *d* (9,5)	19	1,20 *s*	27	1,87 *s*
7	3,94 *t* (9,5)	20	1,90 *m*	28	1,94 *s*

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Tabla 8. Correlaciones más importantes obtenidas del espectro NOESY de la daturolactona 5 (**90**)[a].

H	Correlaciones NOESY	Distancia H-H (Å)[b]
6	H-4β	2,4
	H-19	2,2
12	H-18	2,4
	H-21	2,0

[a] no se incluyen las interacciones entre hidrógenos vecinos y geminales.
[b] Distancias calculadas para el confórmero más estable de **92** (AMPAC 5.0, AM1)

El doblete a δ 3,66 se asignó al H-6 basándose en los picos de correlación con el H-4β y el H-19, observados en el espectro NOESY (**Tabla 8**) en función de las distancias entre los átomos de H involucrados obtenidos por el método AM1 para los distintos confórmeros (**Figura 25**). Este valor de desplazamiento químico indicaba que el compuesto no presentaba, a diferencia de los aislados anteriormente, un epóxido en posición 6α,7α.

Las correlaciones NOE del H-12β con H-18 y H-21 eran concordantes con una estereoquímica α para el hidroxilo en C-12 (**Tabla 8**).

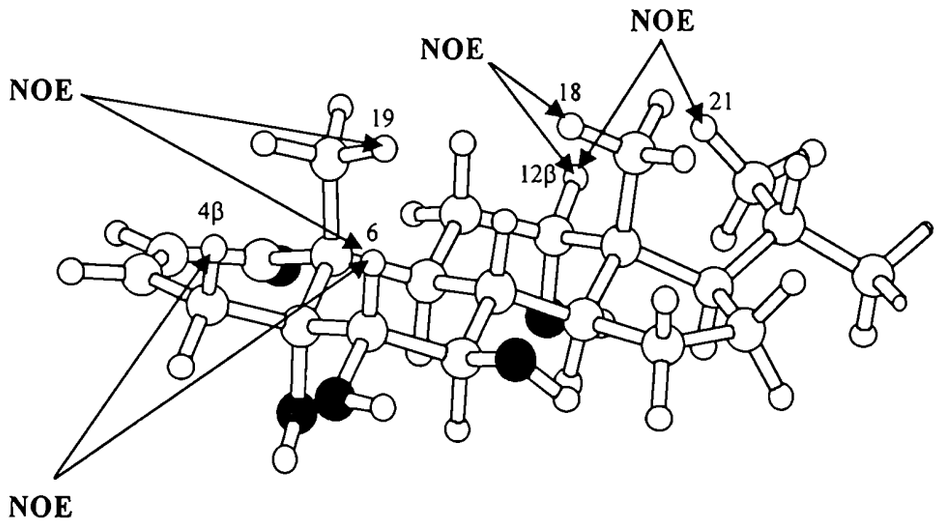


Figura 25 .Conformación de mínima energía (AM1) para los anillos A, B, C y D de **90** .

El espectro COSY ^{1}H-^{1}H (**Figura 26**) de **90** mostraba una correlación de la señal del H-6 (δ 3,66) con el triplete a δ 3,94 (J = 9,5 Hz) asignada al H-7. Los valores altos (9,5 Hz) de las constantes de acoplamiento para los pares H6/H7 y H7/H8 indicaban que ambos hidrógenos se encontraban axiales. Esto sólo sería posible si los hidrógenos antes mencionados se encontraran con una orientación β para el H-6 y α para el H-7.

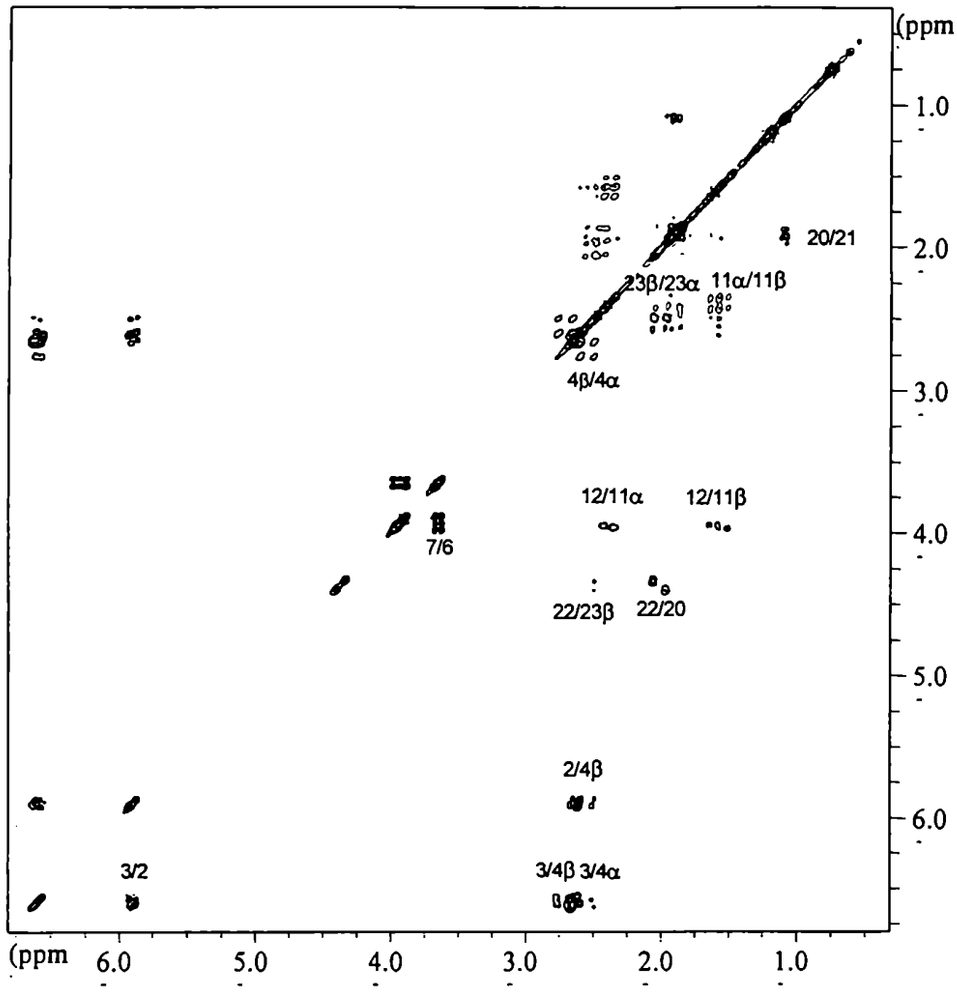


Figura 26. Espectro COSY-45 de la daturolactona 5 (**90**)

El espectro de RMN ^{13}C de la daturolactona 5 (**90**) (**Tabla 9**), complementado con el espectro DEPT, mostraba tres carbonos asignados a 78,1, 75,9 y 68,7 ppm correspondientes a C-5, C-6 y C-7 respectivamente. La irradiación selectiva del ^{1}H a δ 3,66 permitió confirmar la asignación del C-6. Estos datos, junto con los descriptos anteriormente, estaban de acuerdo con un 5α,6α,7β-trihidroxiwithanólido.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de la daturolactona 5 (**90**)

C	δ	C	δ	C	δ
1	203,0	11	31,9	20	39,0
2	128,2	12	71,5	21	12,7
3	141,3	13	47,9	22	78,6
4	35,5	14	41,4	23	29,6
5	78,1	15	26,9[b]	24	149,7
6	75,9[a]	16	26,5[b]	25	121,7
7	68,7	17	42,9	26	167,0
8	48,2	18	11,9	27	12,3[a]
9	34,9	19	14,7	28	20,4
10	50,4				

[a] Asignado por desacoplamiento selectivo del protón a δ 3,66.
[b] Las asignaciones son intercambiables.

El espectro de masa de impacto electrónico (EMIE), presentó el ión molecular a m/z 488; en la **Figura 27** se muestran las principales rupturas observadas. La ruptura del enlace entre C-20 y C-22 conduce a la obtención de dos fragmentos de m/z 363 y 125 siendo este último ión característico de una δ-lactona-α,β-insaturada.

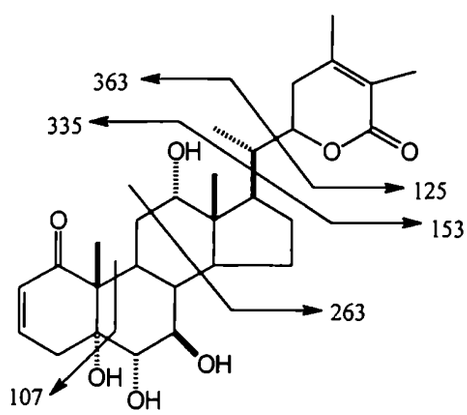
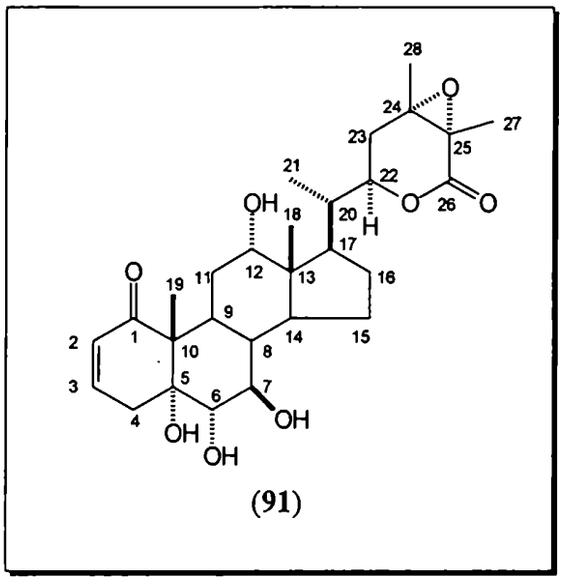


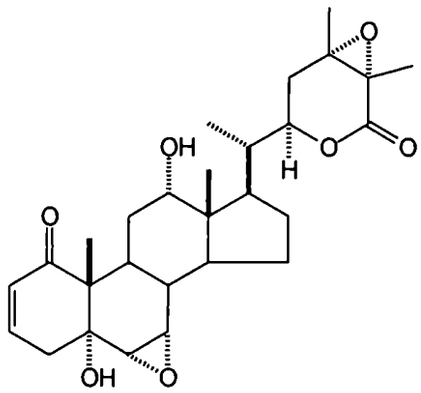
Figura 27. Fragmentaciones características en el espectro de masa de **90**.

Daturolactona 6 (91)

Los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 10**) y ^{13}C (**Tabla 11**) del compuesto **91**, denominado daturolactona 6, aislado en la fracción <u>B</u> (**Figura 23**), mostraban gran similitud con los correspondientes a los de daturolactona 5 (**90**) (**Tablas 7** y **9**), encontrándose las diferencias principales en los desplazamientos químicos de la cadena lateral.



(91)



(18)

La presencia en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 11**), complementado con el DEPT, de sólo 2 señales de carbonos olefínicos a δ 128,3 y δ 140,9 asignadas al sistema 2-en-1-ona, sumado al hecho que se encontraron dos señales de carbono no protonados a δ 62,8 y 59,3, sugerían la presencia de una 24α,25α-epoxilactona en la cadena lateral.

Esta funcionalización estaba de acuerdo con el desplazamiento químico a campos más bajos (δ 169,0) correspondiente al C-26, en el espectro de RMN ^{13}C, y a la presencia de los singuletes observados a δ 1,50 (Me-27) y δ 1,57 (Me-28) en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 10**), semejantes a los obtenidos para la cadena lateral de la daturolactona 1 (**18**) (Apéndice pág. 163).

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de la daturolactona 6 (**91**)

H	δ	H	δ	H	δ
2	5,92 *dd* (10,1; 2,5)	11α	2,47 *m*	21	1,02 *d* (6,0)
3	6,60 *ddd* (10,1; 4,5; 2,5)	11β	1,62 *m*	22	4,55 *ddd* (13,0; 5,0; 2,0)
4α	2,60 *dd* (18,0; 4,5)	12	3,96 *sa* ($W_{1/2}$ 6,0)	23α	2,06 *m*
4β	2,70 *dt* (18,0; 2,5)	18	0,75 *s*	23β	2,06 *m*
6	3,67 *d* (9,4)	19	1,21 *s*	27	1,50 *s*
7	3,94 *t* (9,4)	20	1,89 *m*	28	1,57 *s*

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de la daturolactona 6 (**91**)

C	δ	C	δ	C	δ
1	203,0	11	32,2	20	38,7
2	128,3	12	71,8	21	12,8
3	140,9	13	47,9	22	76,5
4	35,7	14	41,6	23	28,8
5	78,2	15	26,9[a]	24	62,8
6	75,9	16	26,4[a]	25	59,3
7	68,9	17	42,8	26	169,0
8	48,3	18	11,6	27	15,2
9	35,0	19	14,7	28	17,9
10	50,1				

[a] Las asignaciones son intercambiables.

En la **Figura 28**, se indican las principales correlaciones observadas en el espectro COSY-45 del compuesto **91**.

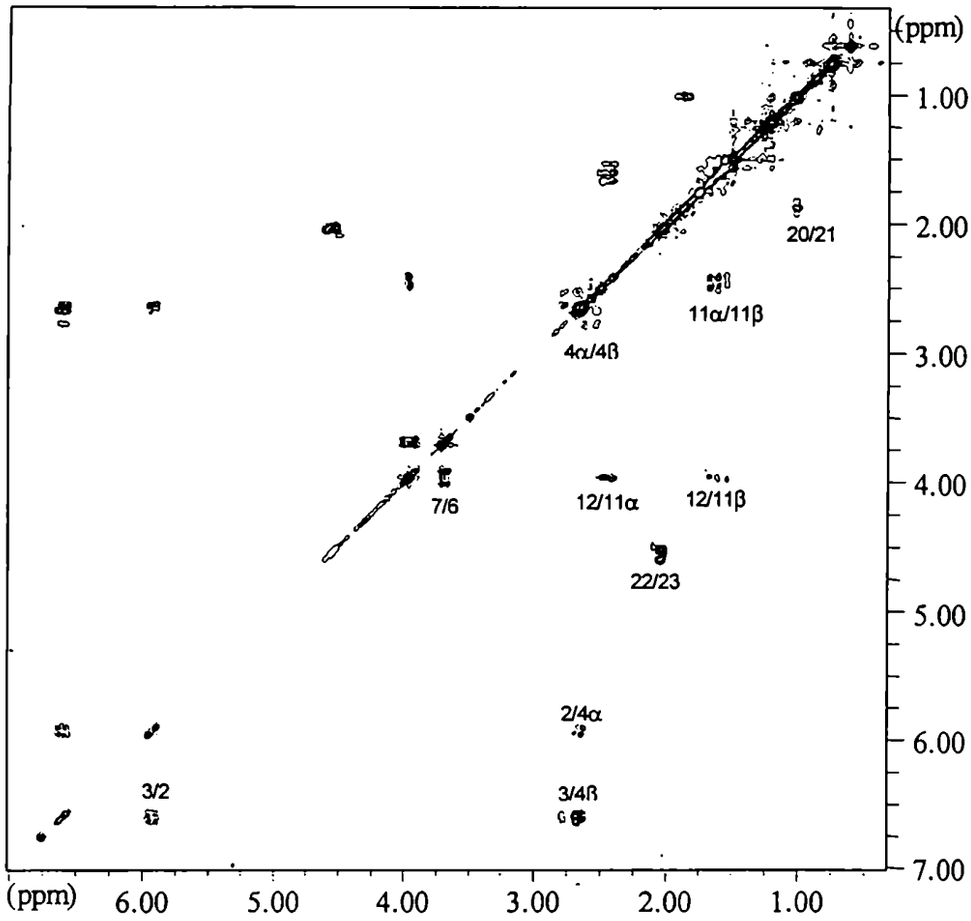


Figura 28. Espectro COSY-45 de la daturolactona 6 (**91**).

El espectro de masa FAB presentó un ión cuasimolecular $[M+1]^+$ a m/z 505 (100) consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{40}O_8$. En el espectro de masa de impacto electrónico (EMIE), la ruptura del enlace entre C-20 y C-22 dio lugar a los fragmentos de m/z 363 y 141 (**Figura 29**), este último correspondiente a la epoxilactona en la cadena lateral, lo cual confirmaba la estructura propuesta.

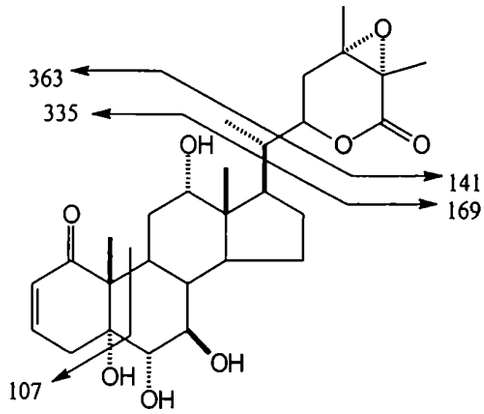
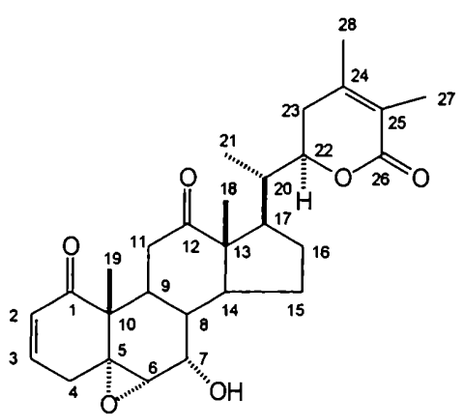


Figura 29 . Fragmentaciones características en el espectro de masa de **91**

Daturolactona 7 (92)

El espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 12**) del compuesto **92**, denominado daturolactona 7, aislado en la fracción **F** (**Figura 23**), mostraba un sistema característico de 2-en-1-ona sin sustitución en el C-4 observándose señales a δ 6,00, 6,80 y 3,15 correspondientes a los H-2, H-3 y H-4β respectivamente. Sin embargo, estas señales se encontraban a campos más bajos que las de los 5α-hidroxi-6α,7α-epoxiwithanólidos previamente mencionados. Esto indicaba un patrón de sustitución diferente en el anillo B.



(92)

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de la daturolactona 7 (**92**)

H	δ	H	δ	H	δ
2	6,00 *dd* (10,0; 2,5)	11α	3,09 *dd* (12,5;5,0)	22	4,36 *dt* (13,0; 3,0)
3	6,80 *ddd* (10,0; 5,0; 2,5)	11β	2,55 *t* (12,5)	23α	2,02 *m*
4α	2,02 *dd* (18,0; 5,0)	18	1,05 *s*	23β	2,02 *m*
4β	3,15 *dt* (18,0; 2,5)	19	1,44 *s*	27	1,85 *s*
6	3,41 *d* (5,0)	20	1,88 *m*	28	1,95 *s*
7	3,97[a] *dd* (5,0; 3,6)	21	0,95 *d* (6,8)		

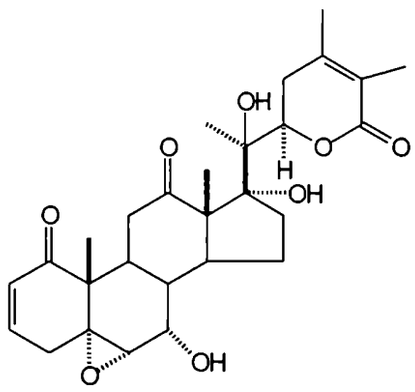
[a] Asignación realizada luego del intercambio con D_2O.
Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de la daturolactona 7 (**92**)

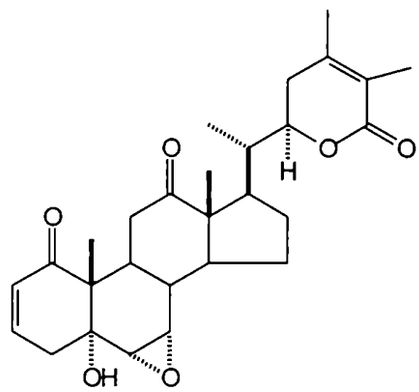
C	δ	C	δ	C	δ
1	202,0	11	38,4	20	39,6
2	128,7	12	209,0	21	13,4
3	142,2	13	56,0	22	78,4
4	33,7	14	51,2	23	29,7
5	61,5	15	24,7	24	149,0
6	63,7	16	26,8	25	122,0
7	68,0	17	42,4	26	169,0
8	35,6	18	11,5	27	12,5
9	38,0	19	15,4	28	20,5
10	49,2				

El espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 13**), complementado con el DEPT, mostraba señales correspondientes a carbonos oxigenados a δ 68,0, 63,7 y 61,5, las cuales fueron asignadas a los C-7, C-6 y C-5 de un 5,6-epoxi-7-hidroxiwithanólido respectivamente.

Esta funcionalización estaba de acuerdo con la correlación observada en el espectro COSY-45 (**Figura 30**) entre las señales a δ 3,41 y 3,97, asignadas a H-6 y H-7, respectivamente. La constante de acoplamiento pequeña (3,6 Hz) entre H-7 y H-8 permitió suponer que el H-7 se encontraba en posición ecuatorial y por lo tanto se trataría de un 7α-hidroxiwithanólido. Por otro lado, la constante de acoplamiento de 5 Hz entre H-6 y H-7β es consistente con un epóxido en α, como el del withanólido Y (**93**) (Besalle *et al.*, 1987), aislado de *Withania somnifera.*



(93)



(10)

Para confirmar la esteroquímica del epóxido en posición 5,6, se calcularon las constantes de acoplamiento de los dos posibles estereosiómeros aplicando la ecuación de Altona (Hasnoot *et al*, 1980) a las geometrías obtenidas por cálculos semiempíricos AM1 (AMPAC 5.0) (**Figura 31**) En el caso del isómero 5α,6α-epóxido, se obtuvieron valores de acoplamiento de 6,4 y 3,7 Hz para los pares H-6β/H-7β y H-7β/H-8β, respectivamente. Estos resultados coinciden con los observados en el espectro de RMN ^{1}H (5,0 y 3,6 Hz). En el caso del epóxido 5β,6β, el valor de J calculado, para el par H-6α/H-7β, resultó de sólo 3,0 Hz (**Tabla 14**).

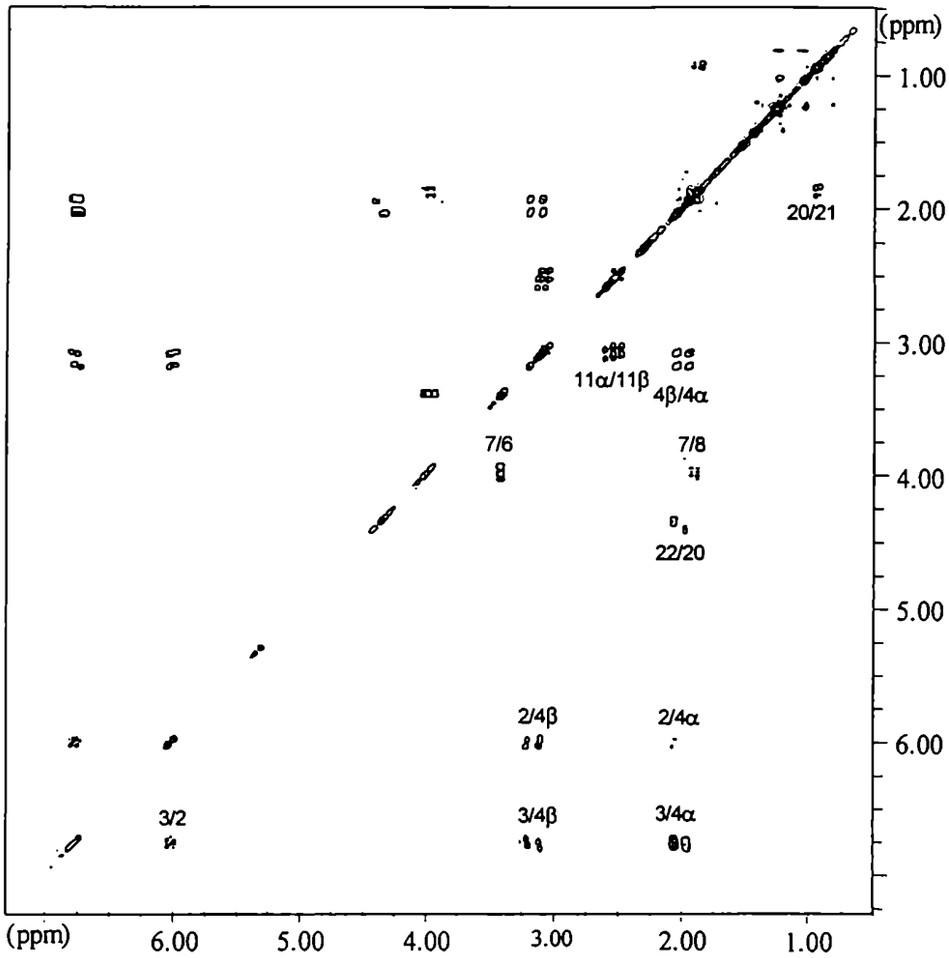


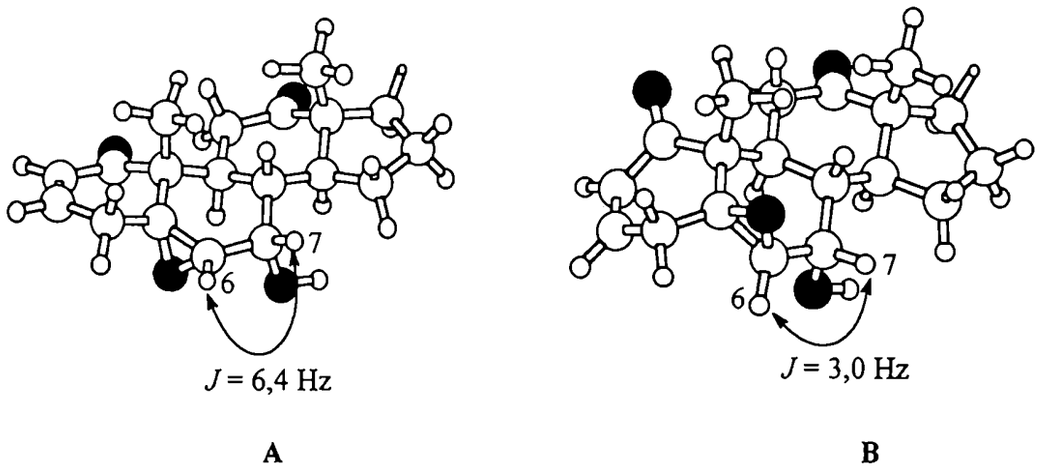
Figura 30. Espectro COSY-45 de la daturolactona 7 (**92**)

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en los espectros RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY-45 y los cálculos realizados, se pudo confirmar la presencia de un sistema 5α,6α-epoxi-7α-hidroxiwithanólido en el anillo B.

Con respecto a los anillos C y D y la cadena lateral, los datos espectroscópicos obtenidos (**Tablas 12** y **13**), indicaban la presencia de cetona en C-12 y una δ-lactona-α,β-insaturada en la cadena lateral, sustitución idéntica a la encontrada en la withanicandrina (**10**). En particular, la presencia de la cetona fue confirmada por la señal correspondiente al C-12 a δ 209,0 y por las señales observadas en el espectro de RMN ^{1}H a δ 3,09, 2,55, 1,05 y 0,95 asignadas respectivamente a H-11α, H-11β, H-18 y H-21.

Tabla 14. Comparación de las constantes de acoplamiento del H-7β calculadas para los confórmeros de mínima energía (AM1) del 5α,6α-epóxido y 5β-6β-epóxido con los datos experimentales de la daturolactona 7 (**92**).

	J (Hz)		
	5α,6α-epóxido	5β-6β-epóxido	**92**
H-6β/H-7β	6,4	---	5,0
H-6α/H-7β		< 3	
H-7β/H-8β	3,7	1,5	3,6



A **B**

Figura 31. Confórmeros de mínima energía (AM1, AMPAC 5.0) del 5α,6α-epóxido (**A**) y 5β,6β-epóxido (**B**) en **92** y J calculados.

El espectro de masa FAB presentó un ión cuasimolecular $[M+1]^+$ a m/z 469 (100) consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_6$. En el espectro de masa de impacto electrónico (EMIE), se observaron el pico a m/z 468 correspondiente al M^+ y los fragmentos a m/z 343 y 125 (**Figura 32**) provenientes de la ruptura del enlace entre C-20 y C-22 siendo este último ión, característico de una δ-lactona-α-β-insaturada.

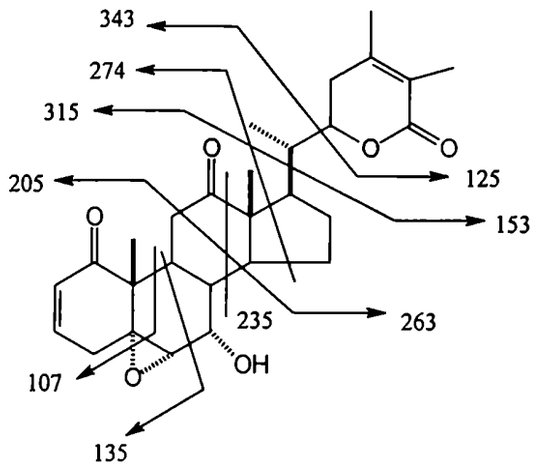


Figura 32. Fragmentaciones características en el espectro de masa de **92**.

WITHANOLIDOS DE FLORES DE *DATURA FEROX*

Los extractos etéreo y etanólico se purificaron por cromatografía flash en vacío tal como se describe en la Parte Experimental (Capítulo 6), separándose tres fracciones que contenían cuatro withanólidos: el withaferoxólido (**22**), la daturolactona 1 (**18**), la withanicandrina (**10**) y la daturolactona 2 (**11**). Dichos compuestos fueron identificados por comparación con los aislados anteriormente y con datos de literatura (Evans *et al.*, 1984).

Capítulo 3

Aislamiento y Elucidación Estructural de Withanólidos de Jaborosa runcinata

WITHANOLIDOS DE *JABOROSA RUNCINATA*

La especie *Jaborosa runcinata* (Lam.), conocida vulgarmente como "flor de sapo" o "yerba de San Juan", convive con *J. integrifolia* en el este de Argentina (Santa Fé, Entre Ríos y Buenos Aires) y en el sur de Uruguay, principalmente en las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay.

Las hojas y los tallos de *Jaborosa runcinata* se recolectaron en el Establecimiento "El Jagüel", Ciudad de Paraná, provincia de Entre Ríos en el mes de marzo. El material vegetal obtenido, seco y molido se extrajo, primero con éter etílico y posteriormente con etanol a temperatura ambiente. Los extractos etéreo y etanólico se evaporaron conjuntamente ya que no diferían apreciablemente en su composición al analizarlos por CCD.

El residuo obtenido se sometió al esquema separativo de la **Figura 33** aislándose cinco fracciones principales que contenían los withanólidos (los detalles se encuentran en la Parte Experimental, Capítulo 6).

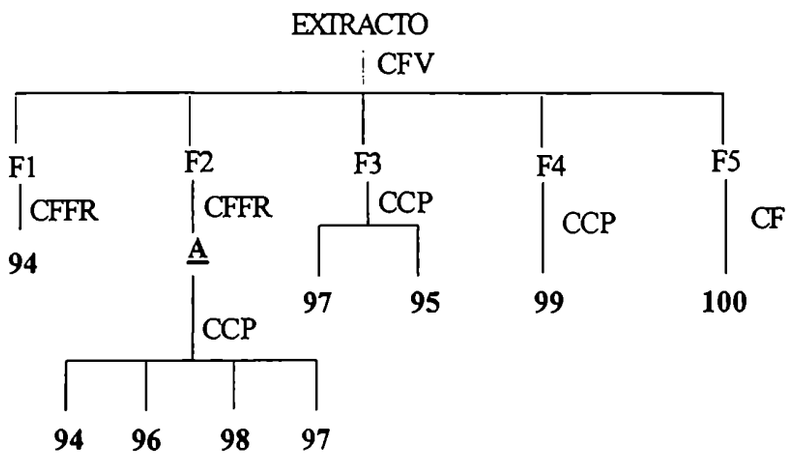
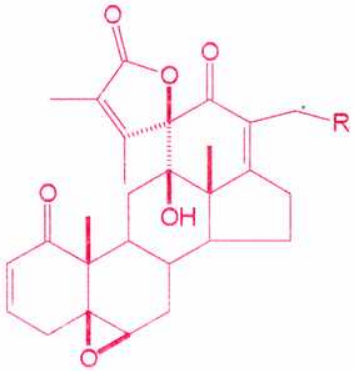
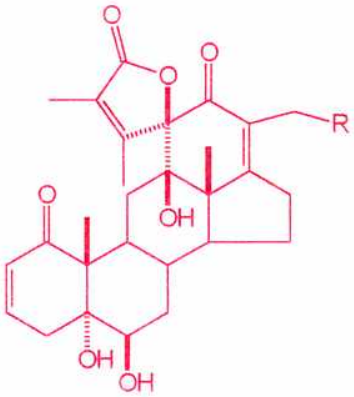


Figura 33. Esquema seguido en el fraccionamiento de *Jaborosa runcinata* .
CFV: cromatografía flash por vacío; CFFR: cromatografía flash en fase reversa; CCP: cromatografía en capa preparativa; CF: cromatografía flash.

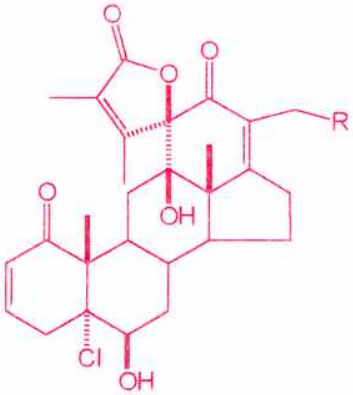
El estudio de las fracciones por las distintas técnicas cromatográficas mencionadas condujo a la obtención de siete withanólidos novedosos (**Figura 34**). A continuación, se describen y analizan las evidencias espectroscópicas que llevaron a determinar las estructuras de estos compuestos.



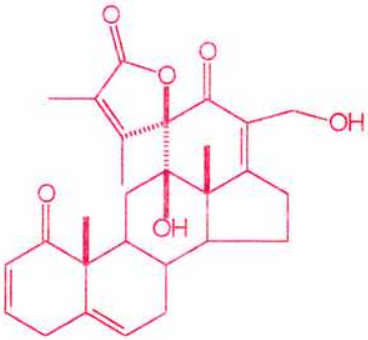
(**94**) R = H
(**97**) R = OH



(**95**) R = H
(**100**) R = OH



(**96**) R = H
(**99**) R = OH

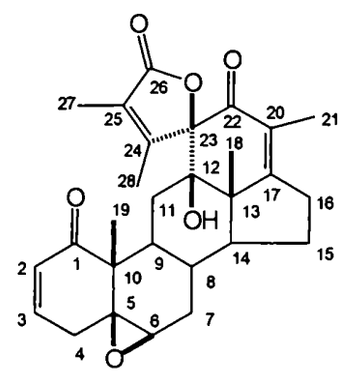


(**98**)

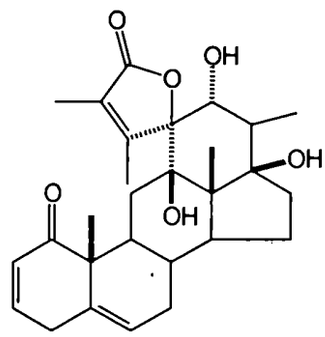
Figura 34. Withanólidos aislados de *Jaborosa runcinata*.

Jaborosolactona 1 (94)

La jaborosolactona 1 (**94**) fue el withanólido mayoritario aislado de esta planta. El espectro RMN ^{1}H del compuesto (**Tabla 15**) presentaba, a campos bajos, las señales típicas de un sistema 2-en-1-ona no sustituido en C-4: un doble doblete a δ 5,94 correspondiente al H-2 y un doble doble doblete a δ 6,79 asignado a H-3. La señal a δ 3,13 (*d*, J = 2,7 Hz) asignada al H-6 y el valor bajo de la constante de acoplamiento con el H-7β, indicaba la presencia de un epóxido 5β,6β.



(94)



(4)

Las señales de los dos metilos a δ 1,97 y δ 2,23, la ausencia de una señal para el hidrógeno de la δ-lactona en la región de 4-5 ppm y la señal observada en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 16**) a 91,4 ppm asignada al C-23, estaban de acuerdo con la presencia de un sistema espiránico con una γ-lactona insaturada entre los C-23 y C-28 como el descripto previamente para la jaborosolactona P (**4**) aislada de *Jaborosa odonelliana* (Monteagudo *et al.*,1990). Como en esta última, se observaba el acoplamiento homoalílico de largo alcance de 1 Hz entre los metilos 27 y 28, que aparecen como cuartetos (J = 1 Hz), típico del sistema de γ-lactona α,β-insaturada,

Tabla 15. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de jaborosolactona 1 (**94**).

H	δ	H	δ	H	δ
2	5,94 *dd* (10,1; 2,4)	7β	2,07 *m*	16	2,48 *m*
3	6,79 *ddd* (10,1; 6,0; 2,4)	8	1,6 *m*	18	1,05 *s*
4α	1,94 *dd* (19,2; 6,0)	9	1,44 *m*	19	1,18 *s*
4β	2,94 *dt* (19,2; 2,4)	11α	2,33 *m*	21	1,71 *s*
6	3,13 *d* (2,7)	11β	1,50 *m*	27	1,97 *c* (1,0)
7α	1,44 *m*	15	1,71 *m*	28	2,23 *c* (1,0)

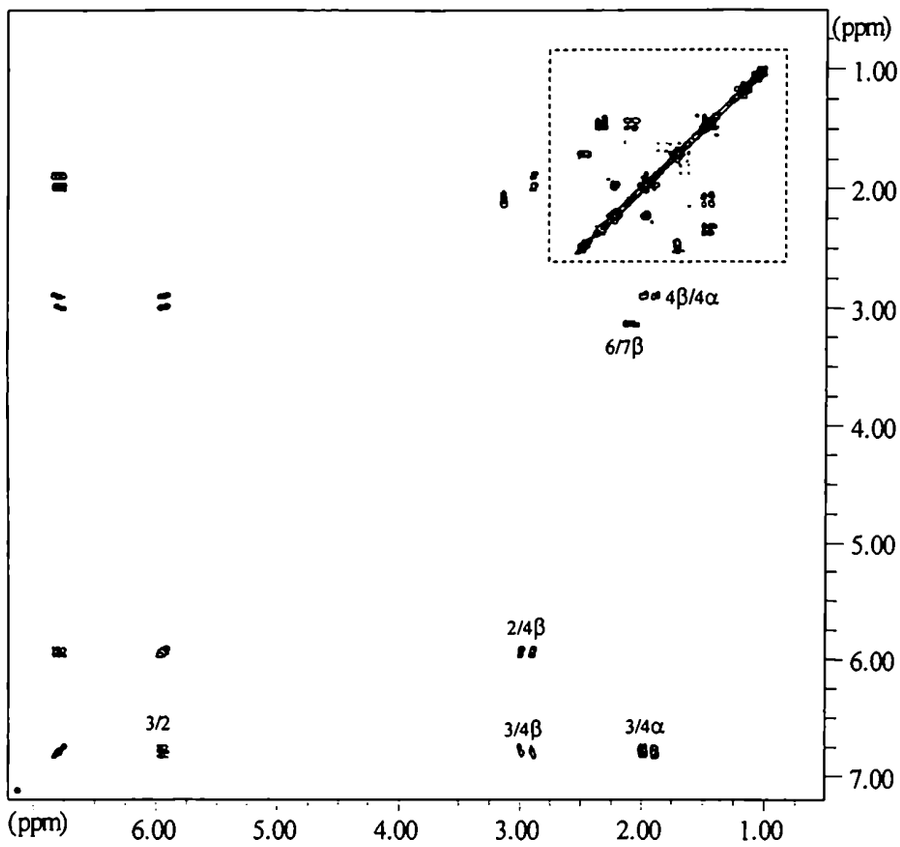
Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **94** (**Tabla 16**) mostraba 3 señales correspondientes a carbonilos a δ 202,6, 173,1 y 192,9, asignadas respectivamente a C-1, C-26 y C-22. Además de los desplazamientos químicos del C-10, del C-13 y del C-23, a 47,7 ppm, 48,3 y 91,4 ppm respectivamente, se encontraban otras dos señales correspondientes a C cuaternarios a 61,8 y 75,3 ppm. La primera de ellas fue asignada al C-5 del epóxido 5β,6β por comparación con withanólidos conocidos con esta funcionalidad, mientras que la segunda se atribuyó a la presencia de un hidroxilo en el C-12. Por otro lado, se observaban seis resonancias de carbonos olefínicos entre 123 y 164 ppm; las señales a δ 128,9 y 144,2 correspondían al sistema 2-en-1-ona y las otras dos señales a δ 160,5 y 127,8, al doble enlace en la γ-lactona α,β-insaturada. Por último, las señales a 124,4 y 162,8 ppm fueron asignadas al C-20 y C-17 respectivamente. La presencia del doble enlace en esta posición concordaba con el desplazamiento químico y la multiplicidad observada para el metilo del C-21 en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 15**).

Tabla 16. Correlaciones en el espectro HETCOR de jaborosolactona 1 (**94**).

		δ_H				δ_H	
C	δ_C	α	β	C	δ_C	α	β
1	202,6			15	23,3	1,71	1,71
2	128,9	5,94		16	25,8	2,48	2,48
3	144,2	6,79		17	162,8		
4	32,9	1,94	2,94	18	14,5	1,05	
5	61,8			19	15,0	1,18	
6	63,6	3,13		20	124,4		
7	29,6	1,44	2,07	21	12,3	1,71	
8	29,3		1,60	22	192,9		
9	42,1	1,44		23	91,4		
10	47,7			24	160,5		
11	35,0	2,33	1,50	25	127,8		
12	75,3			26	173,1		
13	48,3			27	8,9	1,97	
14	46,8	2,20		28	16,0	2,23	

Las asignaciones espectrales fueron confirmadas por los espectros COSY-45 (**Figura 35**), COSY de largo alcance, HETCOR (**Tabla 16**) y NOESY. El espectro HETCOR permitió la asignación inequívoca de los cinco metilos presentes en el molécula . Por otro lado, se pudo determinar, en dicho espectro, la correlación entre la señal a δ 25,8 correspondiente al C-16, con el multiplete a δ 2,48 asignado a ambos H-16.



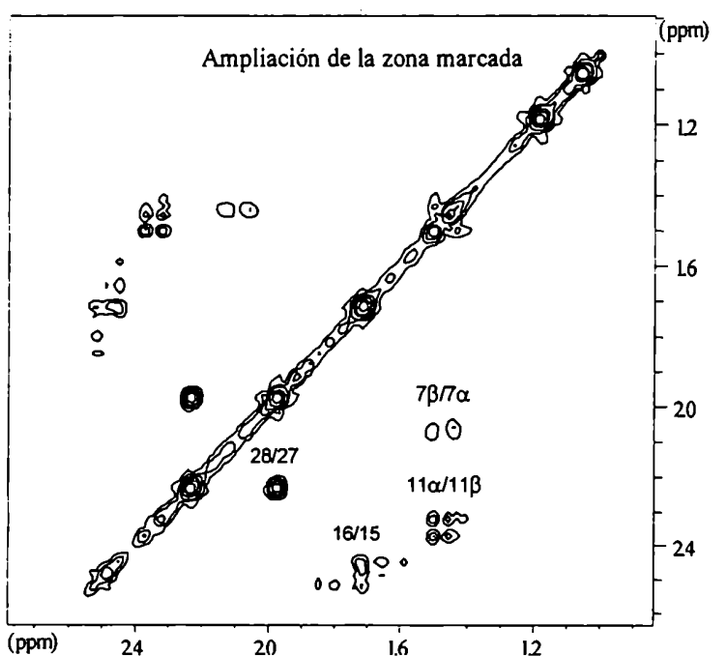


Figura 35. Espectro COSY-45 de jaborosolactona 1 **(94)**.

El experimento COSY de largo alcance mostraba correlación a larga distancia entre el H-21 (1,71 ppm) y el H-16 (2,48 ppm) (**Figura 36**), la cual apoyaba la presencia de la funcionalización de tipo 17(20)-en-22-ceto propuesta para dicha molécula.

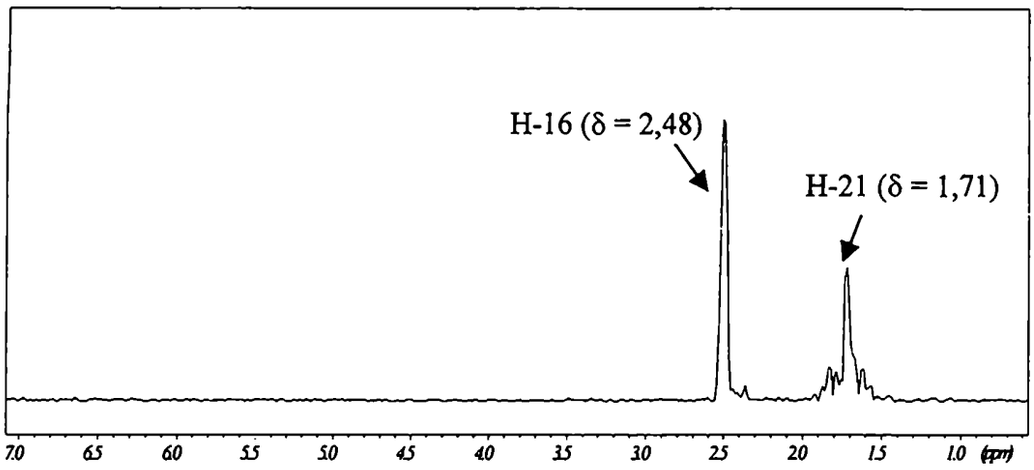


Figura 36. Espectro COSY de largo alcance de jaborosolactona 1 (**94**). Fila correspondiente a la señal a δ = 2,48 (H-16).

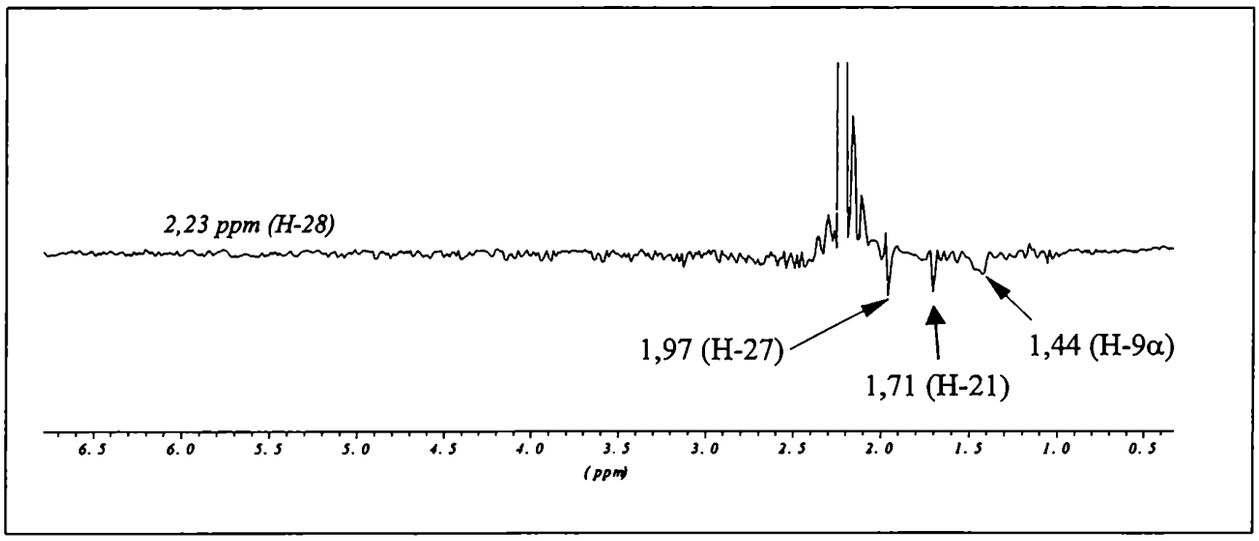


Figura 37. Espectro NOESY de jaborosolactona 1 (**94**). Fila correspondiente a la señal a δ = 2,23 ppm asignada al H-28.

Por último, la estereoquímica del centro espiránico (C-23) se dedujo a partir del espectro NOESY (**Figura 37**) y cálculos de modelado molecular (AM1, AMPAC 5,0) considerando que la estereoquímica de la fusión entre los anillos B/C y C/D correspondía a la de un esqueleto esteroidal clásico.

La **Tabla 17** muestra las correlaciones más importantes observadas en el espectro NOESY junto con las distancias calculadas entre los hidrógenos correspondientes. Las correlaciones intensas observadas para los pares H-28/H-9 y H-28/H-21 indicaban que el metilo en C-28 estaba ubicado en la cara α del núcleo esteroidal. Este arreglo, únicamente era posible si el esteroisómero era 23R (**Figura 38**) lo cual coincidía con la estereoquímica encontrada en la jaborosolactona P (**4**) aislada de *Jaborosa odonelliana* (Monteagudo *et al.*,1990).

Tabla 17. Correlaciones encontradas en el espectro NOESY [(a)] de jaborosolactona 1 (**95**).

H	δ	correlaciona con δ[(b)]
4α	1,94	3,13 (H-6, 2.3)
4β	2,94	1,18 (H-19, 2.3)
8	1,60	1,05 (H-18, 2.2)
9	1,44	2,23 (H-28, 2.3)
11β	1,50	1,05 (H-18, 2.4)
		1,18 (H-19, 2.2)
16	2,48	1,05 (H-18, 2.4)
		1,71 (H-21, 2.4)
21	1,71	2,48 (H-16, 2.4)
		2,23 (H-28, 2.8)
27	1,97	2.23 (H-28, 2.4)

[(a)] No se incluyen interacciones entre hidrógenos vecinales y geminales.
[(b)] Las distancias (Å), obtenidas por cálculos AM1, entre hidrógenos interactuantes, se indican entre paréntesis. Cuando existe más de un hidrógeno en una determinada posición, se indica sólo la distancia más corta.

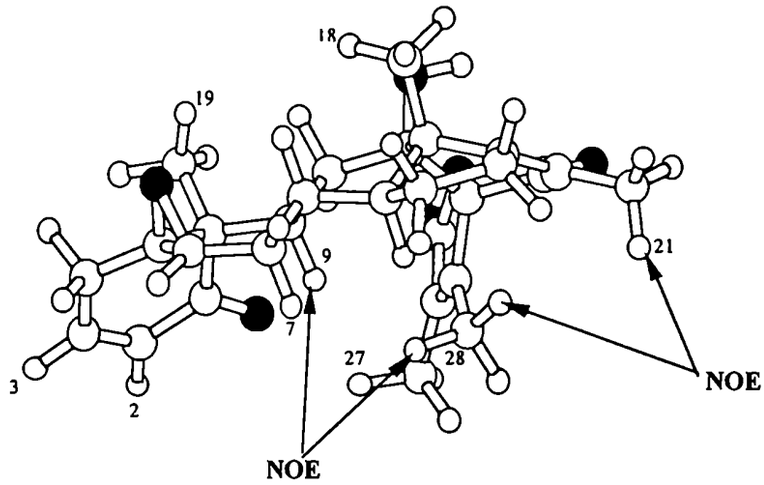


Figura 38. Conformación de mínima energía de jaborosolactona 1 (**94**) obtenida mediante cálculos AM1 (AMPAC 5.0)

En el espectro de masa de alta resolución, se observaba un pico correspondiente al ión molecular a m/z 464,2197 (valor calculado 464,2199) lo que estaba de acuerdo con la fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_6$ propuesta para esta molécula. El espectro de masa de impacto electrónico mostraba, entre otros, un pequeño pico correspondiente al ión molecular $[M^+]$ a m/z 464 (2%), un fragmento de m/z 97 (13%) ($C_5H_5O_2$), proveniente del anillo de la γ-lactona (C-24-C-28) y un pico a m/z 339 (26 %) $[M^+$-97-28] correspondiente a la ruptura entre C-23 y C-24 y C-23 y el O de la lactona, seguida de una pérdida de CO (**Figura 39**). Esta fragmentación fue característica de las siete jaborosolactonas espiránicas aisladas.

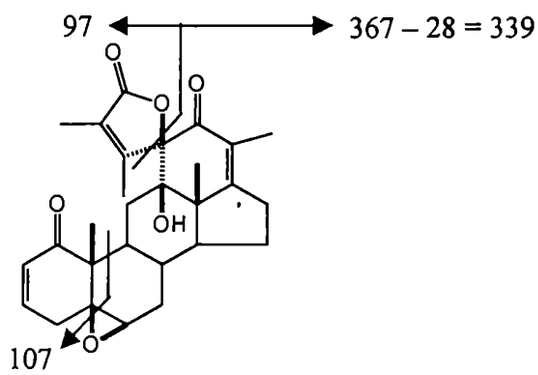
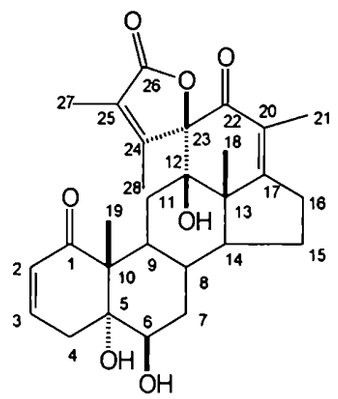


Figura 39. Fragmentaciones características en el espectro de masa de jaborosolactona 1 (**94**).

Jaborosolactona 2 (95)

Los valores de los desplazamientos en los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 18**) y de RMN ^{13}C (**Tabla 19**), para jaborosolactona 2 (**95**), eran muy similares a los obtenidos para jaborosolactona 1 (**94**), salvo los correspondientes a los anillos A y B.



(95)

Las señales a δ 5,84 (doble doble doblete, para el H-2) y δ 6,60 (doble doble doblete, para el H-3) en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 18**), indicaban nuevamente un arreglo de tipo 2-en-1-ona. Sin embargo, comparando con el compuesto anterior, la aparición de estas señales a campos más altos al igual que la correspondiente al metilo del C-19 (δ 1,26), evidenciaron un patrón de sustitución diferente en el anillo B. El desplazamiento químico del H-6, δ 3,68 (*t*, J = 2,6 Hz), a campos más bajos, y su pequeño acoplamiento con ambos hidrógenos de la posición 7 indicaban una orientación α del H-6. Esta señal junto con las señales a δ 77,9 y 74,0, en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 19**), asignadas a C-5 y C-6 respectivamente indicaban la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 5α y 6β, un patrón de sustitución típico de diversos withanólidos que derivan biosintéticamente de los correspondientes 5β,6β-epóxidos (Veleiro *et al*, 1985).

Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de jaborosolactona 2 (**95**).

H	δ	H	δ	H	δ
2	5,84 *ddd* (10,2; 2,4; 1,0)	7α	1,60 *m*	18	1,11 *s*
3	6,60 *ddd* (10,2; 5,0; 2,4)	7β	1,85 *m*	19	1,26 *s*
4α	2,09 *ddd* (19,6; 5,0; 1,0)	11α	2,35 *m*	21	1,75 *s*
4β	3,25 *dt* (19,6; 2,4)	11β	1,45 *m*	27	2,03 *c* (1,0)
6	3,68 *t* (2,6)	16	2,50 *m*	28	2,25 *c* (1,0)

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de jaborosolactona 2 (**95**)

C	δ	C	δ	C	δ
1	203,0	11	35,6	20	124,4
2	128,5	12	75,6	21	12,3
3	141,5	13	48,7	22	193,1
4	34,5	14	46,7	23	91,6
5	77,9	15	23,3	24	160,5
6	74,0	16	25,8	25	128,1
7	32,1	17	162,9	26	173,0
8	29,5	18	14,8	27	9,0
9	38,5	19	15,0	28	16,0
10	51,7				

El resto de las asignaciones para los espectros de RMN^{1}H (**Tabla 18**) y de RMN ^{13}C (**Tabla 19**) del compuesto se hicieron por comparación con jaborosolactona 1 (**94**) y fueron confirmadas por los espectros DEPT y COSY-45. La estereoquímica del centro espiránico (C-23) se determinó como 23R como en el caso de jaborosolactona 1 (**94**).

El espectro de masa de alta resolución mostró un pico correspondiente al ión molecular m/z 482,2308 (valor calculado 482,2305) el cual estaba de acuerdo con la fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_7$ propuesta para este compuesto. En la **Figura 40**, se muestran las principales rupturas correspondientes a este compuesto, observadas en el espectro de masa de impacto electrónico, características también de jaborosolactona 1 (**94**).

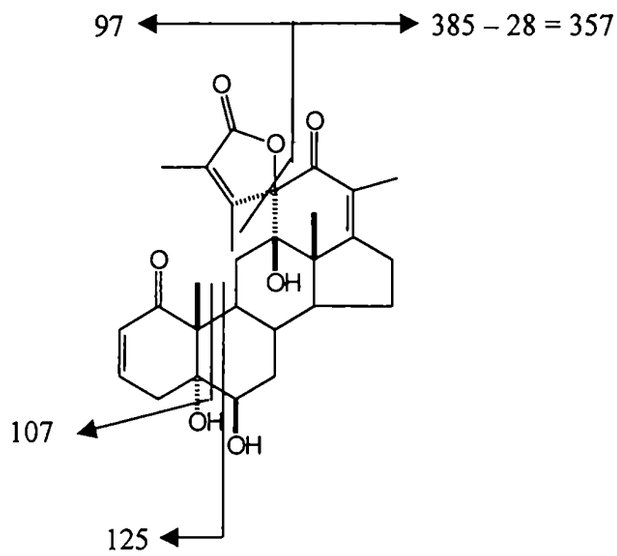
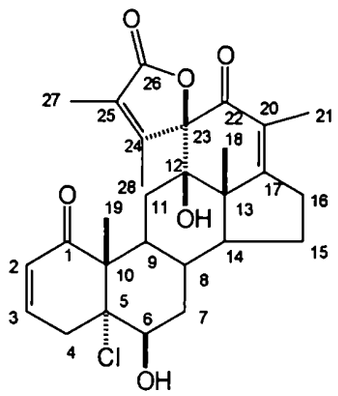


Figura 40. Fragmentaciones características en el espectro de masa de jaborosolactona 2 (**95**).

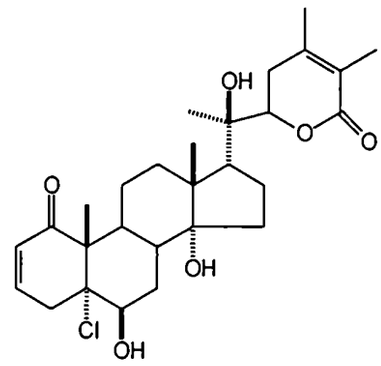
Jaborosolactona 3 (96)

En el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 20**) de jaborosolactona 3 (**96**), las señales a δ 5,86 (para el H-2) y δ 6,63 (para el H-3) indicaban un arreglo de tipo 2-en-1-ona. El desplazamiento químico a δ 4,03 asignado al H-6 fue de suma utilidad ya que respondía a

la resonancia de un H axial (α) característico de un patrón de sustitución 5α-cloro-6β-hidroxi presente en numerosos wihanólidos conocidos, entre ellos, el withanólido C (**101**), aislado de *Withania somnifera* (Besalle *et al*, 1992).



(**96**)



(**101**)

Tabla 20. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de jaborosolactona 3 (**96**) y señales relevantes del withanólido C (**101**).

H	96	101	H	96	H	96
2	5,86 *dd* (10,2; 2,1)	5,89 *dd* (10,0; 2,5)	7α	1;73 *m*	18	1,10 *s*
3	6,63 *ddd* (10,0; 5,0; 2,1)	6,68 *ddd* (10,0; 5,0; 2,5)	7β	2,17 *m*	19	1,29 *s*
4α	2,53 *dd* (20,0; 5,0)		11α	2,35 *m*	21	1,73 *s*
4β	3,46 *dt* (20,0; 2,1)	3,51 *ddd* (20,0; 2,5; 2,0)	11β	1,50 *m*	27	2,01 *c* (1,0)
6	4,03 *sa* ($W_{1/2}$ 6,4)	4,08 *sa* ($W_{1/2}$ 6,7)	16	2,60 *m*	28	2,24 *c* (1,0)

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis. Los datos del withanólido C (**101**) fueron tomados de Besalle *et al*, 1992.

El resto de los desplazamientos químicos observados, en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 20**), no difería apreciablemente de los valores hallados para jaborosolactona 1 (**94**).

Tabla 21. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de jaborosolactona 3 (**96**) y señales relevantes del withanólido C (**101**) (Besalle *et al*, 1992).

C	96	101	C	96	C	96
1	203,0	202,5	11	34,4	20	124,5
2	128,4	128,5	12	75,5	21	12,3
3	141,2	142,0	13	48,7	22	193,0
4	37,1	37,4	14	46,6	23	91,4
5	78,8	80,4	15	23,4	24	161,0
6	74,4	74,7	16	25,8	25	128,0
7	32,4	32,4	17	162,5	26	173,0
8	29,7	29,7	18	14,8	27	9,0
9	39,1	39,1	19	15,6	28	16,0
10	52,1	52,1				

El patrón de sustitución en el anillo B fue confirmado mediante el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 21**) dado que las señales a δ 78,8 y 74,4 ppm asignadas al C-5 y C-6 respectivamente, estaban de acuerdo con la estereoquímica propuesta (Besalle *et al*, 1992; Veleiro *et al*, 1992). El resto de las asignaciones para el espectro de RMN ^{13}C del compuesto (**Tabla 21**), complementado por el espectro DEPT, se hicieron por comparación con las jaborosolactonas 1 (**94**) y 2 (**95**). En la **Figura 41**, se muestran las correlaciones H-H correspondientes a los anillos A y B, observadas en el espectro COSY 45.

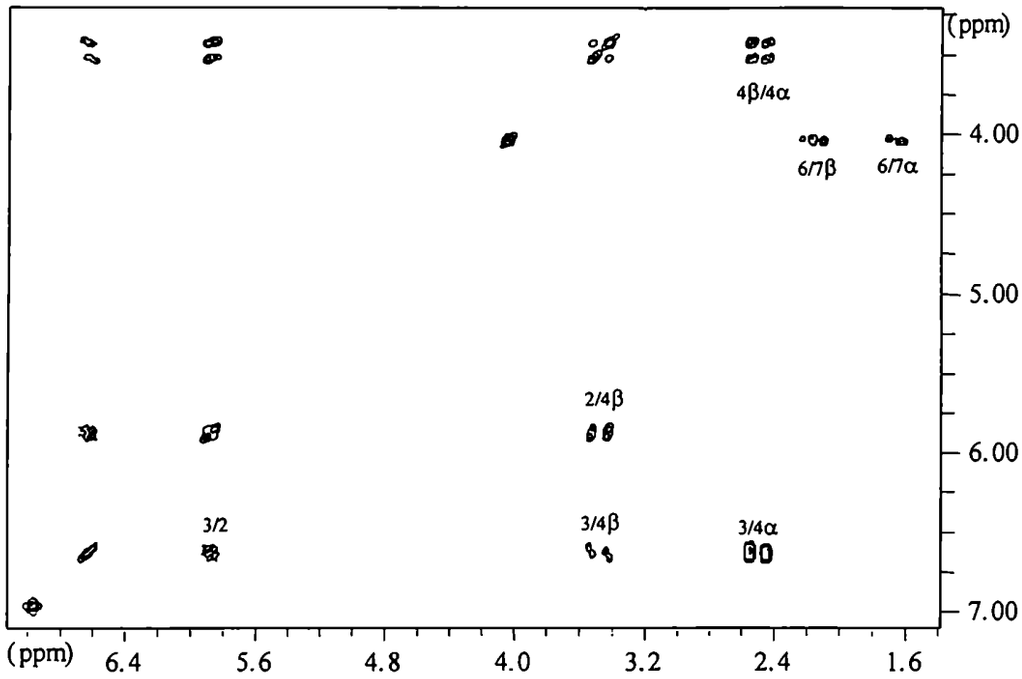


Figura 41. Fragmento del espectro COSY-45 de jaborosolactona 3 (**96**) mostrando corrrelaciones de los anillos A y B

La fórmula molecular asignada a jaborosolactona 3 (**96**), $C_{28}H_{33}O_6Cl$, estaba de acuerdo con el ión molecular m/z 500,1965 (valor calculado 500,1966) observado en el espectro de masa de alta resolución. En la **Figura 42**, se muestran las principales rupturas correspondientes a este compuesto, observadas en el espectro de masa de impacto electrónico.

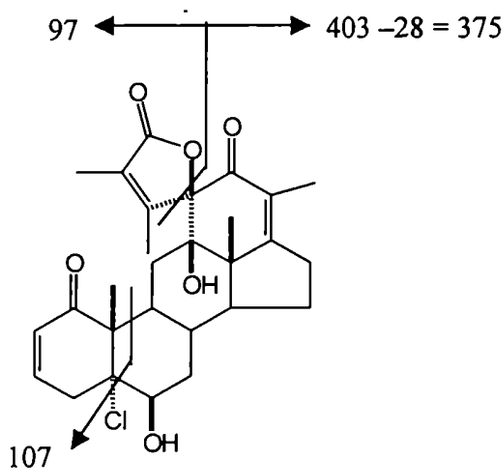
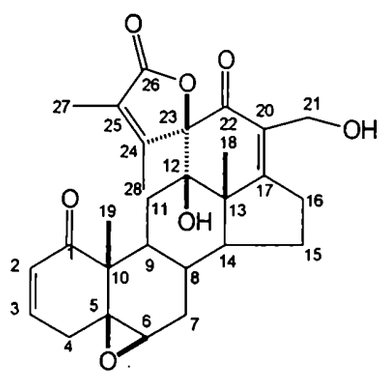


Figura 42. Fragmentaciones características en el espectro de masa de jaborosolactona 3 (**96**).

Jaborosolactona 4 (97)

Los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 22**) y ^{13}C (**Tabla 23**) de jaborosolactona 4 (**97**) fueron muy similares a los encontrados para jaborosolactona 1 (**94**) (**Tabla 13** y **14**). Sin embargo, la ausencia del singulete correspondiente al H-21 a campos altos y la aparición de un cuarteto AB a 4,18 – 4,30 ppm sugirieron la presencia de un sustituyente hidroxilo en el C-21. La señal para un metileno a δ 58,5 en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 23**) confirmaba esta funcionalidad. Debido a esta sustitución, las resonancias correspondientes a C-20 y C-17 aparecían desplazadas a campos más bajos (127,6 y 166,6 ppm, respectivamente).



(97)

Las asignaciones espectrales fueron confirmadas por espectros HETCOR, DEPT, COSY-45 (**Figura 43**) , COSY de largo alcance y NOESY (**Tabla 24**).

El cuarteto AB a δ 4,18-4,30 asignado al CH_2-21 correlacionaba con la señal a 58,5 ppm (C-21) en el espectro HETCOR y con la señal a 2,60 ppm (H-16) en el experimento COSY de largo alcance (**Figura 44**), confirmando la presencia de un sistema 17(20)-en-22-ceto y de un sustituyente OH en el C-21.

Tabla 22. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de jaborosolactona 4 (**97**).

H	δ	H	δ	H	δ
2	5,94 *dd* (10,2; 2,4)	7β	2,05 *m*	18	1,09 *s*
3	6,80 *ddd* (10,2; 6,0; 2,4)	8	1,65 *m*	19	1,19 *s*
4α	1,92 *dd* (19,0; 6,0)	9	1,44 *m*	21a	4,30 *d* (12,3)
4β	2,95 *dt* (19,0; 2,4)	11α	2,36 *m*	21b	4,18 *d* (12,3)
6	3,15 *d* (2,5)	11β	1,46 *m*	27	1,98 *c* (1,0)
7α	1,45 *m*	16	2,60 *m*	28	2,23 *c0* (1,0)

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Tabla 23. Desplazamientos químicos de ^{13}C de jaborosolactona 4 (**97**).

C	δ	C	δ	C	δ
1	202,7	11	35,9	20	127,6
2	128,9	12	75,3	21	58,5
3	144,4	13	48,7	22	193,0
4	32,9	14	46,6	23	91,2
5	61,8	15	23,3	24	159,9
6	63,6	16	25,3	25	128,3
7	29,6	17	166,6	26	173,0
8	29,4	18	14,5	27	9,0
9	42,0	19	15,1	28	16,0
10	47,8				

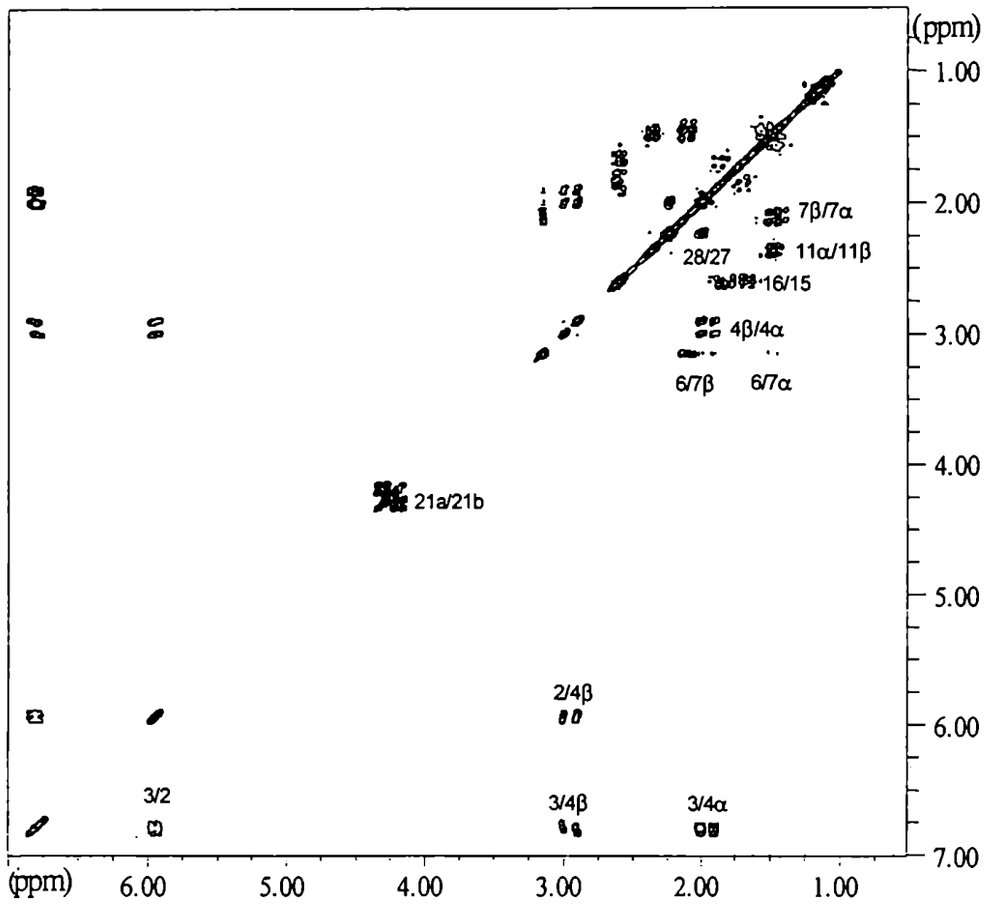


Figura 43. Espectro COSY-45 de jaborosolactona 4 (**97**)

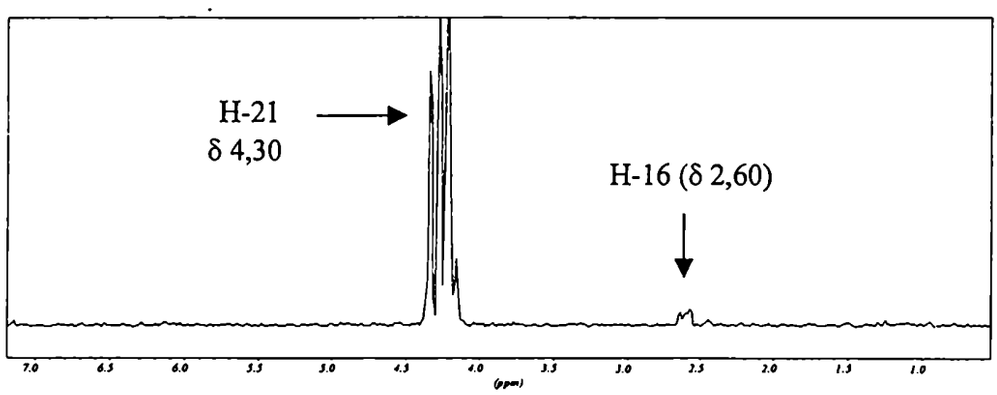


Figura 44. Espectro COSY de largo alcance de jaborosolactona 4 (**97**). Fila correspondiente a la señal a δ = 4,30 (H-21).

Tabla 24. Correlaciones encontradas en el espectro NOESY [(a)] de jaborosolactona 4 (**97**).

H	δ	correlaciona con δ[(b)]
4α	1,92	3,15 (H-6, 2.3)
4β	2,95	1,19 (H-19, 2.3)
8β	1,65	1,09 (H-18, 2.2)
9α	1,44	2,23 (H-28, 2.2)
11β	1,46	1,09 (H-18, 2.4)
		1,19 (H-19, 2.2)

H	δ	correlaciona con δ[(b)]
16	2,60	1,09 (H-18, 2.4)
		4,18 (H-21b, 2.1)
21	4,18	2,60 (H-16, 2.1)
27	1,98	2.23 (H-28, 2.4)

[(a)] No se incluyen interacciones entre hidrógenos vecinales y geminales.
[(b)] Las distancias (Å) obtenidas por cálculos AM1, entre hidrógenos interactuantes, se indican entre paréntesis. Cuando existe más de un hidrógeno en una determinada posición, se indica sólo la distancia más corta.

Al igual que para jaborosolactona 1 (**94**), se observaba, en el espectro NOESY, una fuerte correlación entre el par H-28/H-9 confirmando la estereoquímica 23R. En este caso, no se observaba correlación para el par H-28/H-21 en concordancia con los cálculos AM1 (**Figura 45**), los cuales predecían una distancia mayor de 3,6 Å (**Tabla 24**).

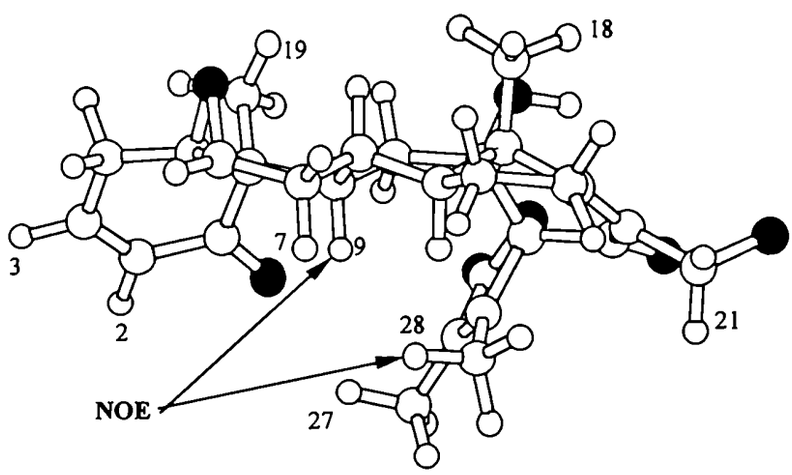


Figura 45 . Conformación de mínima energía de jaborosolactona 4 (**97**) obtenida mediante cálculos AM1 (AMPAC 5.0) y datos de los espectros de RMN-^{1}H y NOESY.

El espectro de masa de alta resolución de jaborosolactona 4 (**97**) no presentaba un ión molecular M^+ sino que se observaba un pico a m/z 462,2041 (valor calculado 462,2042), correspondiente a la pérdida de agua ($C_{28}H_{30}O_6$). Por otro lado, el espectro de masa FAB (tioglicerol, KCl) mostraba un ión $[M + K]^+$ a m/z 519, el cual resultaba concordante con la estructura propuesta. En el espectro de masa de impacto electrónico, se observaban los fragmentos correspondientes a la ruptura de γ-lactona (C-24-C-28) : los iones de m/z 462 $[M - H_2O]^+$, y 97 (7%) ($C_5H_5O_2$), al igual que en las jaborosolactonas antes mencionadas (**Figura 46**).

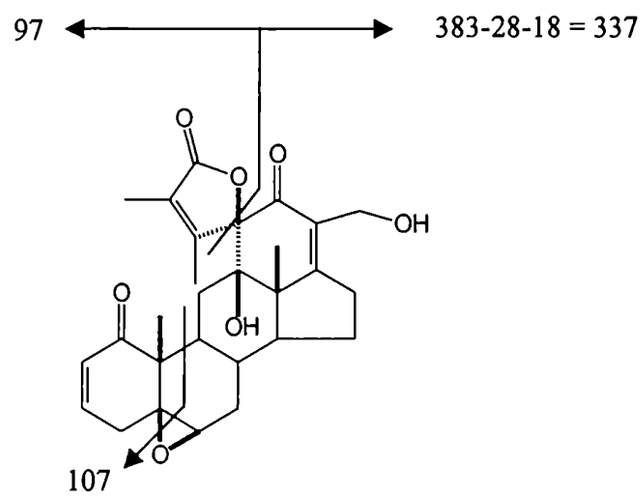
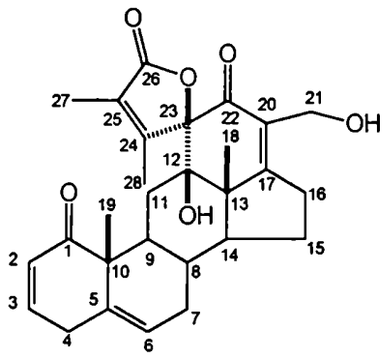


Figura 46. Fragmentaciones características en el espectro de masa de jaborosolactona 4 (**97**).

Jaborosolactona 5 (98)

Las señales a δ 5,81 (H-2) y δ 6,73 (H-3), en el espectro de RMN ^1H de la jaborosolactona 5 (**98**) (**Tabla 25**), indicaban nuevamente un arreglo de tipo 2-en-1-ona no sustituído en C-4. Comparando con la jaborosolactona 4 (**97**), la aparición de estas señales a campos más altos y la presencia de una señal a δ 5,53 asignada al H-6, evidenciaban un patrón de sustitución diferente en el anillo B. Dicho patrón resultó muy

similar al observado en los 1-oxo-2,5-dien-withanólidos tal como la jaborosolactona P (**4**) aislada de *Jaborosa odonelliana* (Monteagudo *et al.*,1990).



(**98**)

Tabla 25. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de jaborosolactona 5 (**98**) y señales relevantes de jaborosolactona P (**4**).

H	98	4	H	98	H	98
2	5,81 *dd* (10,0; 2,0)	5,83 *dd* (10,0; 2,5)	7α	1,74 *m*	19	1,17 *s*
3	6,73 *ddd* (10,0; 5,0; 2,5)	6,74 *ddd* (10,0; 5,0; 2,0)	7β	2,05 *m*	21a	4,33 *d* (12,2)
4α	2,83 *dd* (19,0; 5,0)	2,81 *dd* (21,0; 5,0)	11α	2,51 *m*	21b	4,20 *d* (12,2)
4β	3,25 *ddd* (19,0; 2,5; 2,0)	3,25 *brd* (21,0)	11β	1,52 *m*	27	2,02 *c* (1,0)
6	5,53 *m*	5,59 *d* (6,0)	16	2,61 *m*	28	2,25 *c* (1,0)
			18	1,14 *s*		

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis. Los datos de jaborosolactona P (**4**) fueron tomados de Monteagudo *et al.*, 1990.

En la **Figura 47**, se muestran las principales correlaciones correspondientes a los anillos A y B observadas en el espectro COSY-45.

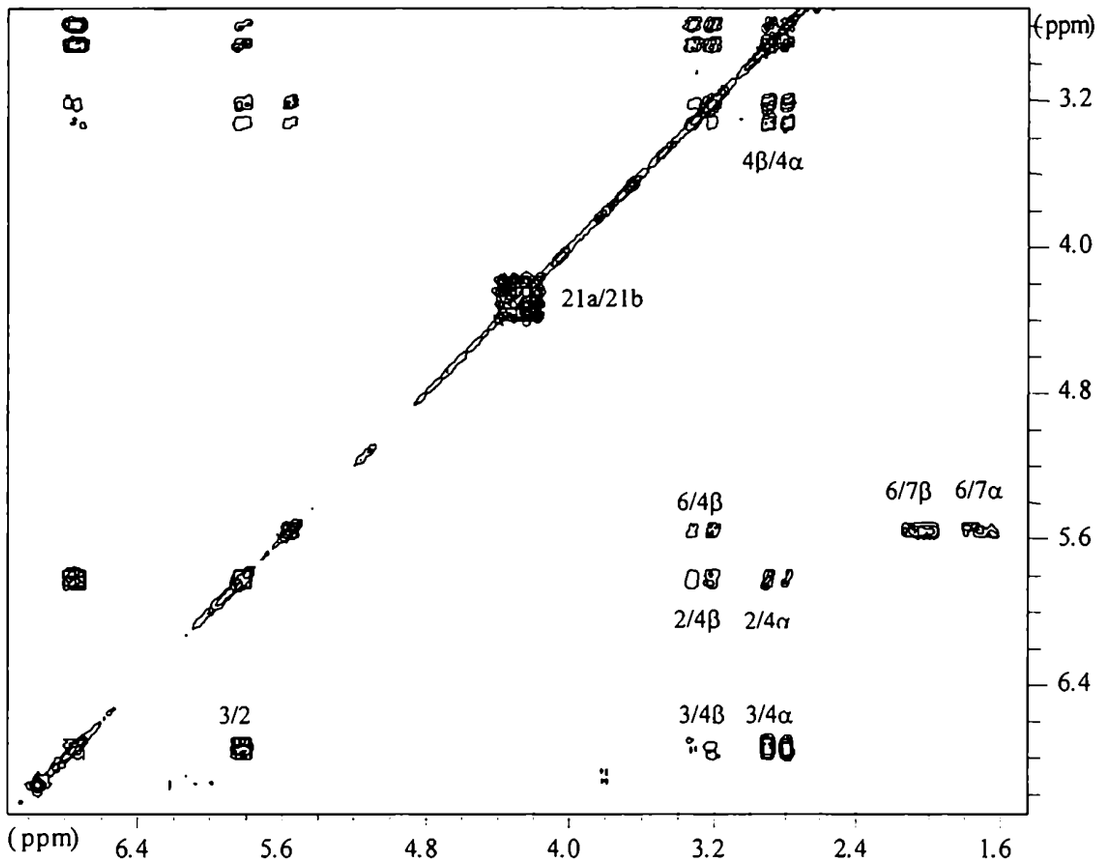


Figura 47. Fragmento del espectro COSY-45 de jaborosolactona 5 (**98**) correspondiente a los anillos A y B.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 26**) se observaban las correspondientes señales olefínicas a δ 135,4 y 124,1, asignadas a C-5 y C-6, las cuales apoyaban la estructura propuesta. El resto de los desplazamientos químicos de hidrógenos y carbonos encontrados en los espectros de RMN ^{1}H y de RMN ^{13}C, para los anillos C y D y para la cadena lateral (**Tabla 25** y **26**), no diferían mayormente de los descriptos para la jaborosolactona 4 (**97**). La estereoquímica del centro espiránico (C-23) se asignó como 23-R al igual que los compuestos anteriores.

Tabla 26. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de jaborosolactona 5 (**98**) y señales de los anillos A y B de jaborosolactona P (**4**). (Los datos de jaborosolactona P (**4**) fueron tomados de Monteagudo *et al.*, 1990)

C	98	4	C	98	C	98
1	202,8	202,8	11	29,7	20	127,6
2	127,7	127,3	12	75,6	21	58,7
3	145,0	144,8	13	48,7	22	193,0
4	33,3	33,3	14	46,9	23	91,2
5	135,4	136,0	15	23,3	24	159,5
6	124,1	124,2	16	25,3	25	128,4
7	35,0	34,0	17	166,4	26	173,0
8	32,1	32,6	18	14,4	27	9,0
9	40,7	40,0	19	18,5	28	15,9
10	49,9	50,0				

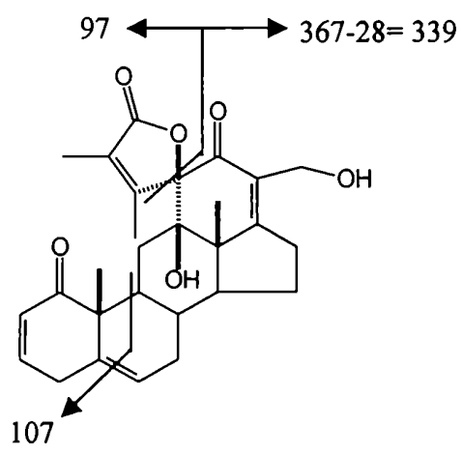


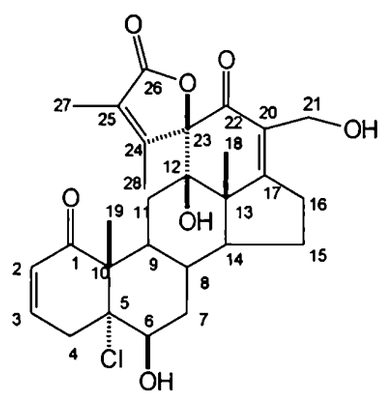
Figura 48. Fragmentaciones características en el espectro de masa de jaborosolactona 5 (**98**)

El espectro de masa FAB (alcohol m-nitrobencílico, KCl) de **98** mostró un ión $[M + K]^+$ a m/z 503, de acuerdo con la estructura propuesta. Por otro lado, el espectro de

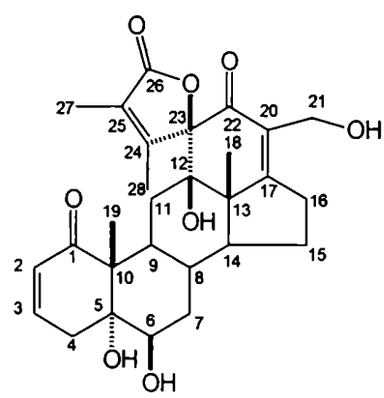
masa de alta resolución de la jaborosolactona 5 (**98**) no presentó un ión molecular M^+ sino que se observó un pico a m/z 446,2095 (valor calculado 446,2093), correspondiente a la pérdida de agua ($C_{28}H_{30}O_5$). El espectro de impacto electrónico mostraba un pico a m/z 446 correspondiente al ión $[M - H_2O]^+$ y las rupturas características de esta familia indicadas en la **Figura 48**.

Jaborosolactona 6 (99) y Jaborosolactona 9 (100)

Estos compuestos fueron aislados como componentes minoritarios en *Jaborosa runcinata*. Los datos obtenidos en los espectros de RMN ^1H (**Tabla 27**) y de RMN ^{13}C (**Tabla 28**) mostraban, para ambos compuestos, la ausencia del singulete correspondiente al H-21 a campos altos y la aparición de un cuarteto AB entre 4,20–4,35 ppm debido a la presencia de un sustituyente hidroxilo en el C-21.



(99)



(100)

En el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 27**) de jaborosolactona 6 (**99**), las señales a δ 5,85 (H-2), 6,65 (H-3) y 4,03 (H-6) evidenciaban el patrón de sustitución 5α-cloro-6β-hidroxi-2-en-1-ona igual al presente en jaborosolactona 3 (**96**).

Tabla 27. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) de las jaborosolactonas 6 (**99**) y 9 (**100**).

H	99	100	H	99	100
2	5,85 *dd* (12,0; 2,0)	5,82 *dd* (10,1; 2,2)	18	1,14 *s*	1,14 *s*
3	6,65 *ddd* (12,0; 5,0; 2,0)	6,60 *ddd* (10,1; 5,0; 2,2)	19	1,29 *s*	1,26 *s*
4α	2,09 *dd* (20,0; 5,0)	2,10 *dd* (19,2; 5,0)	21a	4,35 *d* (12,2)	4,33 *d* (12,3)
4β	3,45 *dt* (20,0; 2,0)	3,25 *dt* (19,2; 2,2)	21b	4,20 *d* (12,2)	4,21 *d* (12,3)
6	4,03 *sa*	3,66 *t* (2,6)	27	2,02 *q* (1,0)	2,03 *c* (1,0)
16	2,60 *m*	2,64 *m*	28	2,23 *q* (1,0)	2,25 *c* (1,0)

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Los valores de los desplazamientos en los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 27**) y de RMN ^{13}C (**Tabla 28**), para la jaborosolactona 9 (**100**), fueron muy similares a los obtenidos para la jaborosolactona 2 (**95**). En el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 28**), las señales a δ 5,82 (H-2), 6,60 (H-3) y 3,66 (H-6) indicaban así, un arreglo de tipo 5α,6β-dihidroxi-2-en-1-ona. El resto de los datos espectroscópicos estaba de acuerdo con las estructuras propuestas.

Tabla 28. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C de las jaborosolactonas 6 (**99**) y 9 (**100**).

C	99	100	C	99	100	C	99	100
1	203,3	203,3	11	34,4	35,4	20	128,0	127,3
2	128,3	128,8	12	77,0	75,2	21	58,7	58,2
3	141,3	141,9	13	48,5	48,9	22	193,0	193,5
4	37,1	34,3	14	46,3	46,4	23	91,0	91,0
5	78,2	79,7	15	23,3	23,3	24	159,9	161,9
6	74,3	73,8	16	25,2	25,3	25	128,0	128,1
7	32,3	31,9	17	165,8	165,6	26	173,2	173,4
8	29,7	29,5	18	14,7	14,8	27	9,0	18,9
9	39,0	38,3	19	15,5	15,1	28	15,9	12,1
10	52,0	51,6						

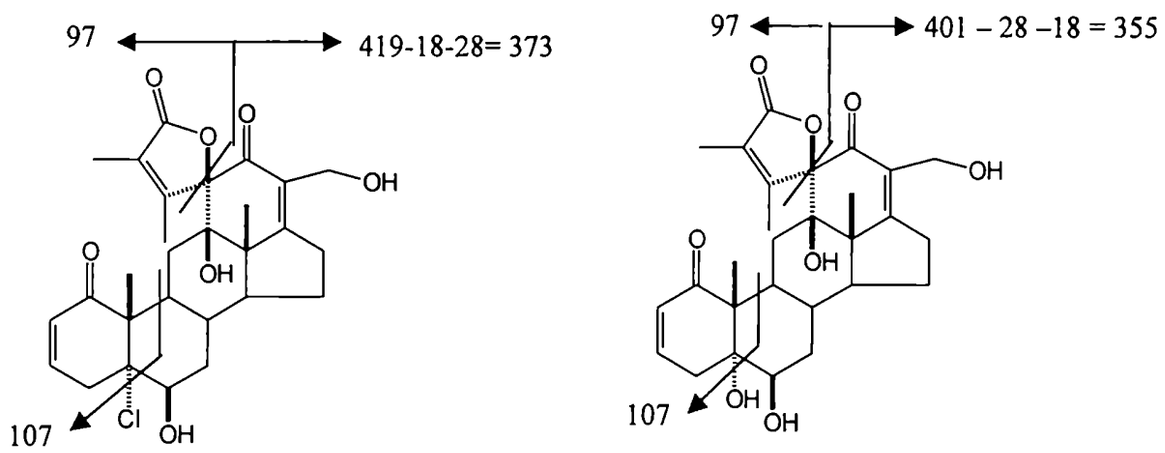


Figura 49. Fragmentaciones características en el espectro de masa de las jaborosolactonas 6 (**99**) y 9 (**100**).

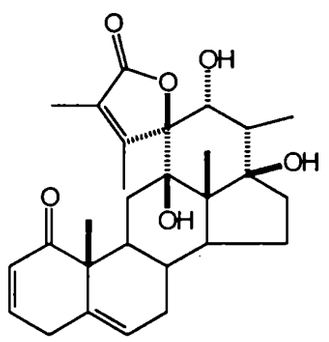
Los espectros de masa FAB de la jaborosolactona 6 (**99**) (alcohol m-nitrobencílico, KCl) y de la jaborosolactona 9 (**100**) (glicerol) mostraban un ión $[M + K - H_2O]^+$ a m/z 573 y un ión $[M + 1]^+$ a m/z 499, respectivamente, los cuales resultaban coherentes con las estructuras y fórmulas propuestas ($C_{28}H_{33}O_7Cl$ y $C_{28}H_{34}O_8$). En los espectros de masa de impacto electrónico de las jaborosolactonas 6 (**99**) y 7 (**100**), se observaban las rupturas características de este tipo de compuestos (**Figura 49**).

Capítulo 4

Aislamiento y Elucidación Estructural de Withanólidos de Jaborosa odonelliana

WITHANOLIDOS DE *JABOROSA ODONELLIANA* (ABRIL Y DICIEMBRE)

La especie *Jaborosa odonelliana* (Hunz.) habita en la región biogeográfica Chaqueña (Salta, Tucumán y Santiago del Estero) entre 700 y 1000 m de altitud, sobre todo en suelos arenosos o áridos. En estudios previos realizados sobre esta especie, se había aislado la jaborosolactona P (**4**), el primer withanólido de tipo espiránico descripto y único hasta los encontrados en la presente Tesis (Monteagudo *et al.*, 1990) (**Figura 50**).



(**4**)

Figura 50. Unico withanólido aislado de la especie *Jaborosa odonelliana* con anterioridad a esta Tesis.

Las hojas y tallos de *Jaborosa odonelliana* se recolectaron en el Jardín de La Candelaria, provincia de Salta en dos épocas diferentes del año: otoño (abril) y primavera (diciembre). El material vegetal obtenido, seco y molido se procesó separadamente extrayéndose primero, con éter etílico y posteriormente con etanol. Los extractos etéreos y etanólicos se evaporaron conjuntamente a presión reducida y la separación de ambos extractos (otoño y primavera) se llevó a cabo utilizando cromatografía flash por vacío. Las **Figuras 51** y **52** muestran el esquema de separación aplicado en ambos casos (los detalles se encuentran en la Parte Experimental, Capítulo 6).

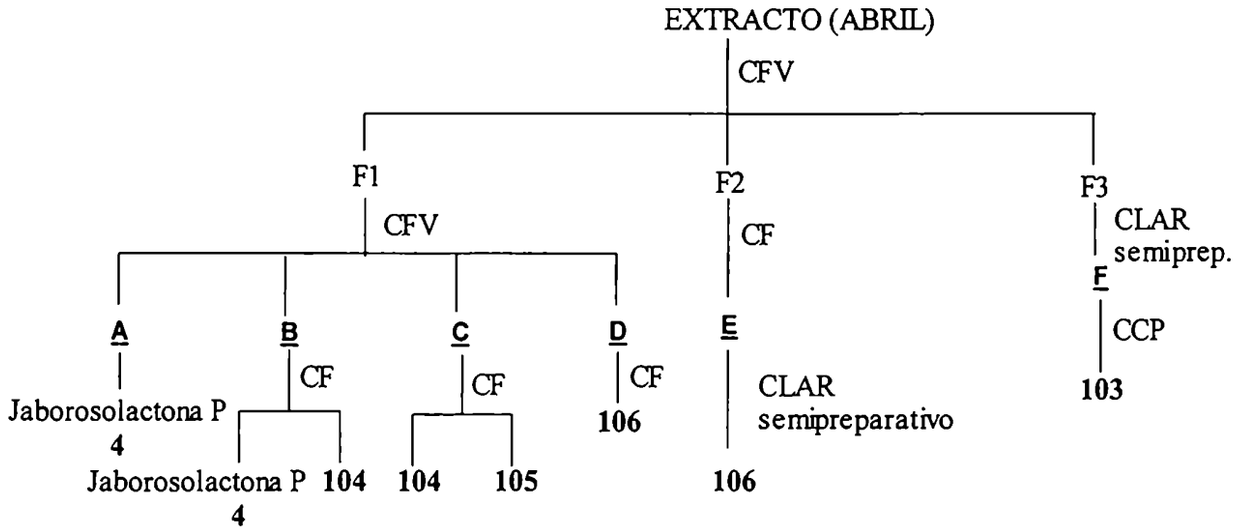


Figura 51. Esquema separativo seguido en el procesamiento del extracto de *Jaborosa odonelliana* (abril). CFV: cromatografía flash por vacío, CF: cromatografía flash; CCP: cromatografía en capa preparativa, CLAR: cromatografía líquida de alta resolución.

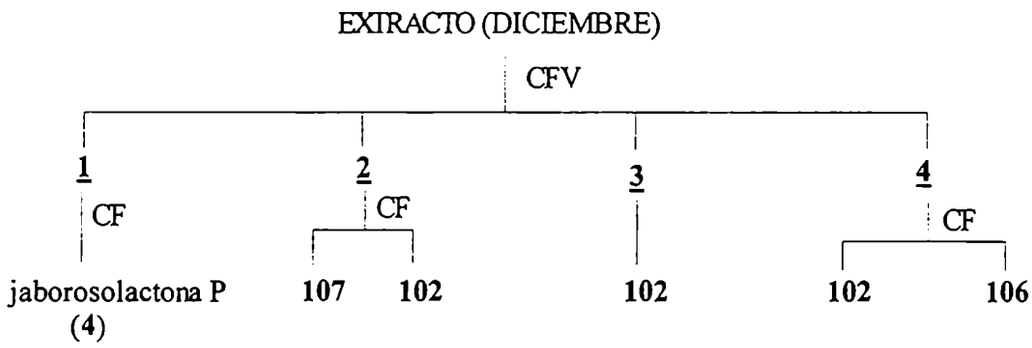
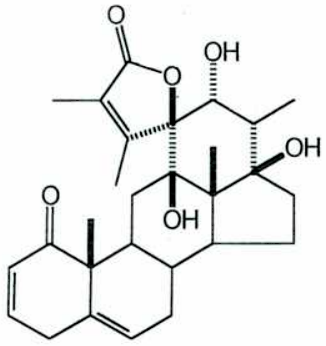
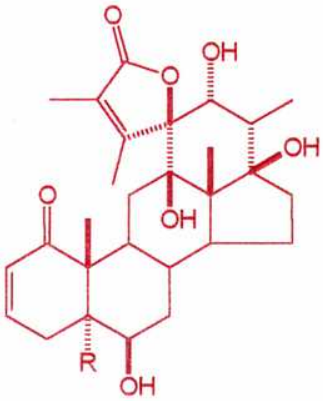


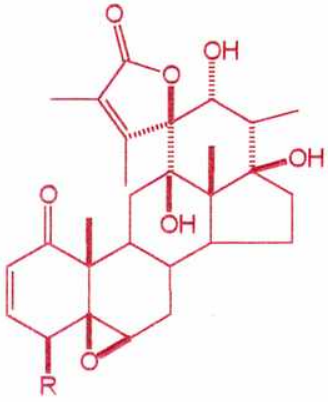
Figura 52. Esquema separativo seguido en el procesamiento del extracto de *Jaborosa odonelliana* (diciembre). CFV: cromatografía flash por vacío, CF: cromatografía flash.



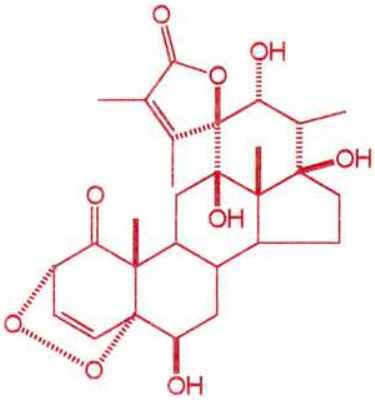
(4)



(102) R = Cl
(105) R = OH
(106) R = OCH_3



(103) R = H
(104) R= OH



(107)

Figura 53. Withanólidos aislados de *Jaborosa odonelliana*.

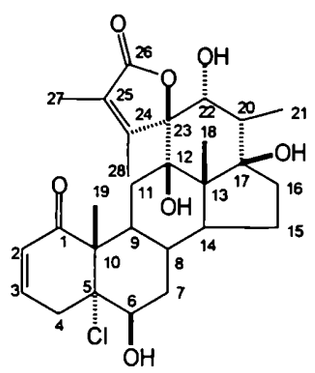
De ambos extractos se aisló el compuesto conocido, jaborosalactona P (**4**), el cual fue identificado por comparación con los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C descriptos anteriormente (Monteagudo *et al.*, 1990). Los seis withanólidos restantes presentaban estructuras novedosas (**Figura 53**), siendo todas ellas de tipo espiránico y con el mismo patrón de sustitución para los anillos C, D y la cadena lateral que jaborosalactona P (**4**) (**Tablas 29** y **30**). La existencia de una lactona insaturada entre C-23 y C-28 estaba de acuerdo con la presencia de señales en el rango de δ 1.82-2,31, correspondientes a los metilos 27 y 28 (**Tabla 29**); por otra parte el doblete asignado a C-21 indicaba la ausencia

de sustitución en C-20. El espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 30**) mostraba tres señales correspondientes a carbonos oxigenados entre δ 71,0-83,0 asignados a los carbonos 12, 17 y 22, mientras que la señal entre δ 97.0-97.5 correspondía al C-23 del sistema espiránico. La estereoquímica de los anillos C, D y la cadena lateral se estableció por comparación con los datos espectroscópicos de jaborosalactona P (**4**) cuya estructura fue determinada por rayos X (Monteagudo *et al.*, 1990).

A continuación, se describen y analizan las evidencias espectroscópicas que llevaron a determinar las estructuras de los nuevos withanólidos aislados, teniendo en cuenta que las principales diferencias entre ellos radican en los anillos A y B del núcleo esteroidal.

Jaborosolactonas 10-14

Jaborosolactona 10 (**102**) se aisló como componente mayoritario junto con jaborosolactona P (**4**) de las plantas recolectadas en el mes de diciembre.



(**102**)

Tabla 29. Desplazamientos químicos de ^{1}H (δ) de las jaborosolactonas P (**4**), 10 (**102**), 11 (**103**), 12 (**104**), 13 (**105**) y 14 (**106**). Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

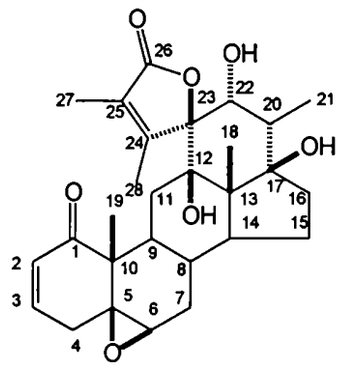
H	4	102	103	104	105	106
2	5,83 *dd* (10,0; 2,5)	5,84 *dd* (10,0; 2,3)	5,93 *dd* (10,0; 2,5)	6,08 *d* (10,0)	5,82 *dd* (10,2; 2,4)	5,79 *dd* (10,2; 2,7)
3	6,74 *ddd* (10,0; 5,0; 2,0)	6,61 *ddd* (10,0; 5,0; 2,3)	6,80 *ddd* (10,0; 6,0; 2.5)	6,90 *dd* (10,0 ; 5,7)	6,55 *ddd* (10,2; 5,1; 2,4)	6,50 *ddd* (10,2; 5,2; 2,7)
4α	2,81 *dd* (21,0; 5,0)	2,49 *dd* (20,1; 5,0)	1,99 *dd* (19,0; 6,0)	3,76 *d* (5,7)	2,1 *dd* (19,7; 5,1)	2,38 *dd* (20,0; 5,2)
4β	3,28 *da* (21,0)	3,50 *dt* (20,1; 2,3)	2,95 *dt* (19,0; 2,5)	–	3,30 *dt* (19,7; 2,4)	3,00 *dt* (20,0; 2,7)
6	5,59 *d* (6,0)	3,95 *t* (2,5)	3,13 *d* (2,5)	3,25 *sa* ($W_{1/2}$ 5,2)	3,51 *sa* ($W_{1/2}$ 5,2)	3,91 *t* (2,5)
7α	1,78 *m*	1,73 *m*	1,45 *m*	1,84 *m*	1,59 *m*	1,59 *m*
7β	2,22 *m*	2,15 *m*	2,07 *m*	2,23 *m*	2,23 *m*	1,80 *m*
11α	2,48 *m*	2,40 *m*	2,36 *m*	2,18 *m*	2,25 *m*	2,40 *m*
11β	1,50 *m*	1,34 *m*	1,34 *m*	1,23 *m*	1,30 *m*	1,40 *m*
18	1,15 *s*	1,14 *s*	1,11 *s*	1,10 *s*	1,14 *s*	1,17 *s*
19	1,20 *s*	1,34*s*	1,19 *s*	1,36 *s*	1,26 *s*	1,26 *s*
20	2,06 *m*	2,15 *m*	2,09 *m*	1,96 *m*	2,10 *m*	2,16 *m*
21	1,21 *d* (7,0)	1,17 *d* (6,6)	1,17 *d* (7,0)	1,21 *d* (7,0)	1,17 *d* (6,6)	1,21 *d* (6,4)
22	4,22 *d* (12,5)	4,19 *d* (12,3)	4,22 *d* (12,4)	4,20 *d* (12,4)	4,19 *d* (12,4)	4,26 *d* (12,3)
27	1,91 *s*	1,82 *s*	1,85 *c* (0.7)	1,82 *c* (0.7)	1,82 *s*	1,83 *s*
28	2,27 *s*	2,30 *s*	2,22 *c* (0,7)	2,21 *c* (0,7)	2,30 *s*	2,31 *s*
5-OCH_3			-	-		3,04 *s*

Tabla 30. Desplazamientos químicos de ^{13}C de las jaborosolactonas P (**4**), 10 (**102**), 11 (**103**), 12 (**104**), 13 (**105**) y 14 (**106**).

C	4	102	103	104	105	106
1	202,8	200,3	203,0	201,1	203,8	202,3
2	127,3	128,3	128,8	131,2	129,0	129,2
3	144,8	141,1	145,0	142,5	141,3	138,5
4	33,3	36,9	33,3	69,3	36,1	27,3
5	136,0	81,6	62,0	62,7	77,7	81,4
6	124,2	73,8	63,1	63,7	74,4	68,3
7	34,0	34,2	29,7	29,7	31,5	34,3
8	32,6	29,5	29,1	34,2	29,3	29,0
9	40,0	38,5	41,7	44,2	37,6	37,2
10	50,0	50,5	50,3	47,6	50,0	50,0
11	30,0	31,2	30,5	30,4	29,7	31,5
12	82,0	82,6	82,0	82,6	82,4	82,4
13	51,2	53,3	53,4	50,1	52,0	53,0
14	44,1	44,1	44,1	41,4	44,1	44,8
15	23,2	23,2	23,1	23,1	23,4	23,4
16	32,1	32,6	32,4	31,3	33,0	33,2
17	82,9	83,0	82,8	82,6	82,9	82,9
18	12,7	13,0	12,8	12,7	13,0	12,9
19	18,2	15,4	14,7	17,1	14,6	14,7
20	40,5	40,8	40,5	40,5	40,6	40,7
21	11,3	11,2	11,2	11,2	11,2	11,3
22	71,0	71,1	71,8	71,5	71,9	71,7
23	97,6	97,0	97,0	97,1	97,6	97,3
24	157,5	158,1	157,0	157,8	158,4	157,5
25	130,7	130,8	130,5	130,5	131,0	130,9
26	173,3	173,5	173,2	173,5	171,0	173,0
27	9,5	9,4	9,6	9,4	9,6	9,4
28	18,7	18,6	18,7	18,7	18,3	18,5
OCH_3	-	-	-	-	-	49,9

En el espectro de RMN ^{1}H del compuesto **102**, las señales a 5,84 (H-2) y 6,61 ppm (H-3) indicaban un arreglo de tipo 2-en-1-ona no sustituido en C-4, en el anillo A (**Tabla 29**). La presencia de una señal ancha a δ 3,95 asignada al H-6, sugería la existencia de un sistema 5α-cloro-6β-hidroxi como el descripto anteriormente para la jaborosolactona 3 (**96**), aislada de *Jaborosa runcinata* (Capítulo 3, pág. 77). Las señales a δ 81,6 y 73,8, en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 30**) asignadas al C-5 y C-6 respectivamente confirmaban el patrón de sustitución del anillo B.

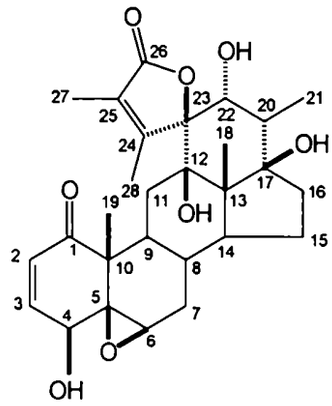
El espectro de RMN ^{1}H de jaborosalactona 11 (**103**) (**Tabla 29**) presentaba también las señales típicas de un sistema 2-en-1-ona no sustituido en C-4: un doble doblete a δ 5.93 correspondiente al H-2 y un doble doble doblete a δ 6.80 asignado a H-3.



(**103**)

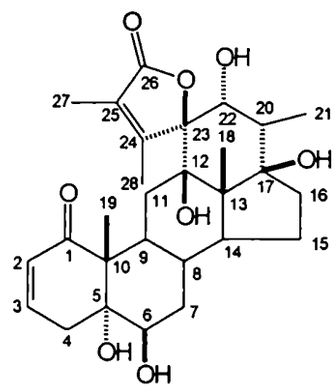
La señal a δ 3.13 (*d*, J = 2,5 Hz) correspondiente al H-6 indicaba la presencia de un epóxido 5β,6β. Estos datos fueron similares a los de compuestos con dicho patrón de sustitución en el género *Jaborosa*, por ejemplo, jaborosalactona 1 (**94**), aislada de *Jaborosa runcinata* (Capítulo 3, pág. 67). El espectro de RMN ^{13}C del compuesto (**Tabla 30**) mostró 2 señales a 62,0 y 63,1 ppm asignadas a C-5 y C-6 respectivamente, concordantes con esta funcionalización.

El espectro RMN ^{1}H de jaborosalactona 12 (**104**) (**Tabla 29**) presentaba, a campos bajos, un doblete a δ 6,08 correspondiente al H-2 y un doble doblete a δ 6,90 asignado a H-3. Dichos desplazamientos químicos y la señal a δ 3,76 (*d*, J = 5,7 Hz) asignada al H-4, indicaban la existencia de un hidroxilo en dicha posición con orientación β. La señal a 3,25 (*ba*) fue asignada al H-6 de un epóxido 5β,6β. Esta funcionalidad estaba de acuerdo con las señales en el espectro de RMN ^{13}C a 62,7, 63,7 y 69,3 ppm correspondientes a C-5, C-6 y C-4 respectivamente (**Tabla 30**).



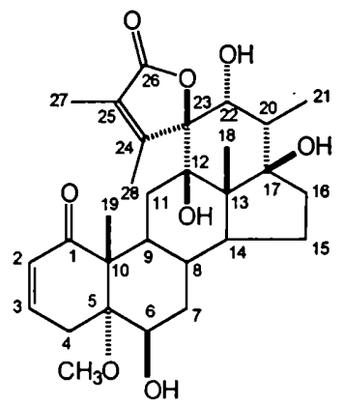
(104)

Los valores de los desplazamientos en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 29**), para jaborosolactona 13 (**105**), δ 5,82, (H-2), y δ 6,55, (H-3), indicaban un arreglo de tipo 2-en-1-ona no sustituido en C-4. El desplazamiento químico del H-6 (δ 3,51, *ba*) y del CH_3-19 (δ 1,26) en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 29**), y las señales en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 30**) a δ 77,7 y 74,7, asignadas a C-5 y C-6 respectivamente, evidenciaban la presencia de un 5α,6β-diol.



(105)

Los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 27**) y de RMN ^{13}C (**Tabla 30**), para jaborosolactona 14 (**106**), eran muy similares a los obtenidos para jaborosolactona 13 (**105**) indicando la presencia de un sistema 2-en-1-ona en el anillo pero con una sustitución diferente en el anillo B. Las principales diferencias en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 29**) de este compuesto fueron el desplazamiento a campos bajos (δ 3,91 (*ba*)) de la señal de H-6 y la presencia de un singulete adicional a δ 3,04, el cual sugería la presencia de un OCH_3 unido al C-5. Esta observación fue concordante con las señales, en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 30**), a δ 81,4 y 68,3 asignadas a C-5 y C-6 respectivamente y la señal adicional a δ 49,9 ppm correspondiente a la presencia de un grupo metoxilo.



(**106**)

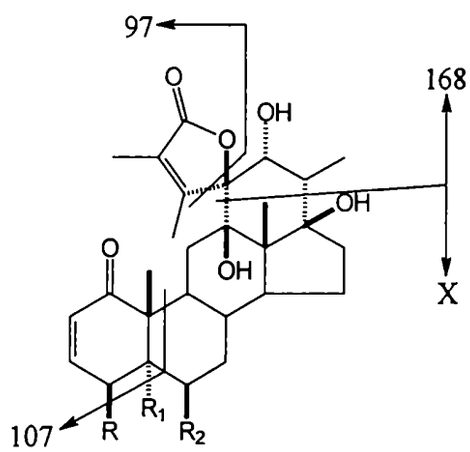
Todas las asignaciones espectroscópicas descriptas anteriormente para las jaborosolactonas 10-14 fueron confirmadas por los espectros DEPT y COSY-45 obtenidos para cada una de ellas.

En la **Tabla 31**, se indican los iones observados en los espectros de masa de alta resolución correspondientes a los compuestos **102** a **106**, los cuales están de acuerdo con las fórmulas moleculares propuestas en cada caso.

Tabla 31. Iones presentes en el espectro de masa de alta resolución de las jaborosolactonas 10 (**102**), 11 (**103**), 12 (**104**), 13 (**105**) y 14 (**106**).

Compuesto	Fórmula molecular	$M^+ - 2\ H_2O$	M^+	Valor calculado
102	$C_{28}H_{37}O_7Cl$	484,2020		484,2017
103	$C_{28}H_{36}O_7$		484,2470	484,2461
104	$C_{28}H_{36}O_8$		500,2419	500,2410
105	$C_{28}H_{38}O_8$		502,2570	502,2566
106	$C_{29}H_{40}O_8$	480,2520		480,2512

En el espectro de masa de impacto electrónico de las seis jaborosolactonas descriptas se observaron picos correspondientes a la ruptura simultánea entre C-23 y C-12 y entre C-20 y C-17, siendo el ión observado a m/z 168 característico de esta familia de compuestos (**Figura 54**). Por otro lado se hallaron las rupturas propias esperadas de cada compuesto (ver Capítulo 6: Parte Experimental).

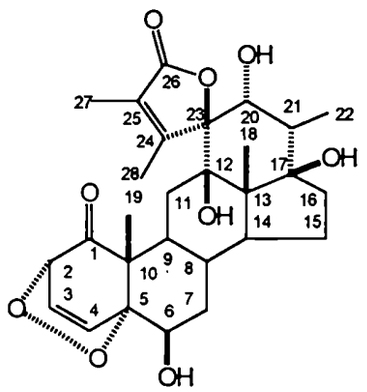


(**102**) R = H, R_1 = Cl, R_2 = OH; X : m/z = 351.
(**103**) R = H, R_1 = R_2 = O; X : m/z = 315.
(**104**) R = OH, R_1 = R_2 = O; X : m/z = 331.
(**105**) R = H, R_1 = OH, R_2 = OH; X : m/z = 334.
(**106**) R = H, R_1 = OCH_3, R_2 = OH; X : m/z = 348

Figura 54. Fragmentaciones características en el espectro de masa de las jaborosolactonas 10 (**102**), 11 (**103**), 12 (**104**), 13 (**105**) y 14 (**106**).

Jaborosolactona 15 (107)

Los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 32**) y ^{13}C (**Tabla 33**) de jaborosolactona 15 (**107**) resultaban coincidentes con los del compuesto **4** para los anillos C y D y la cadena lateral. El espectro de RMN ^{13}C mostraba la existencia de un carbonilo y de un doble enlace no conjugado en el anillo A (**Tabla 33**), sin embargo, los hidrógenos olefínicos (δ 6,64 y δ 6,99 para H-3 y H-4 respectivamente) (**Tabla 32**) se encontraban desplazados a campos más bajos y presentaban una constante de acoplamiento menor (8,4 Hz) que la correspondiente a las otras jaborosolactonas (~ 10 Hz) descriptas.



(**107**)

En el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 33**), se observaba además del carbono carbonílico correspondiente a C-1 (204,9 ppm), un carbono oxigenado no protonado a δ 81,2 y dos metinos oxigenados a δ 78,4 y 66,3, los cuales estaban de acuerdo con la presencia de señales a δ 4,40 y 3,98 en el espectro de RMN ^{1}H (**Tabla 32**), todas ellas correspondientes a los anillos A y B. La señal a δ 3,98 fue asignada al H-6 de un 6β-hidroxiwithanólido por comparación con las jaborosolactonas 10 (**102**), 13 (**105**) y 14 (**106**) mientras que el singulete a δ 1,17 se asignó al CH_3-18.

Tabla 32. Desplazamientos químicos de RMN ^{1}H (δ) a 500,13 MHz de jaborosolactona 15 (**107**)

H	δ	H	δ	H	δ
2	4,40 *dd* (6,38; 1,37)	7α	1,50 *m*	21	1,17 *d* (6,2)
3	6,64 *dd* (8,40; 6,38)	7β	1,73 *m*	22	4,18 *d* (12,3)
4	6,99 *dd* (8,40; 1,37)	18	1,17 *s*	27	1,78 *d* (0,9)
6	3,98 *t* (2,73)	19	1,22 *s*	28	2,35 *d* (0,9)
		20	2,09 *m*		

Los δ están referidos a TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en Hz entre paréntesis.

Tabla 33. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C, a 125,13 MHz, de jaborosolactona 15 (**107**).

C	δ	C	δ	C	δ
1	204,9	11	30,9	20	40,6
2	78,4	12	81,5	21	11,2
3	126,3	13	50,6	22	71,2
4	141,2	14	44,7	23	97,4
5	81,2	15	23,0	24	159,2
6	66,3	16	33,6	25	129,4
7	34,1	17	82,7	26	172,9
8	28,7	18	13,0	27	8,9
9	38,5	19	18,4	28	18,6
10	47,8				

En base a los datos anteriores, se pudo concluir que los sistemas de la **Figura 55** forman parte de los anillos A y B en un arreglo distinto a una 2-en-1-ona. Los datos espectroscópicos concordaban con los de las fisalinas K (**108**) y Q (**109**) aisladas de *Physalis alkekengi* (Makino *et al.*, 1995), que presentaban un sistema endoperóxido en el anillo A. La mayor diferencia en los valores de desplazamiento químico se observaba en el correspondiente a la resonancia del CH_3-19 en el espectro de RMN ^{13}C (**Tabla 33**), coincidiendo el valor de δ 18,4 encontrado para la jaborosolactona 15 (**107**) con el informado para la fisalina K (**108**) mientras que este valor para la fisalina Q (**109**) era de 14,9 ppm.

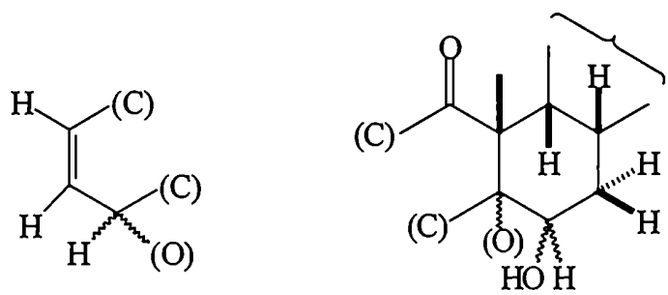
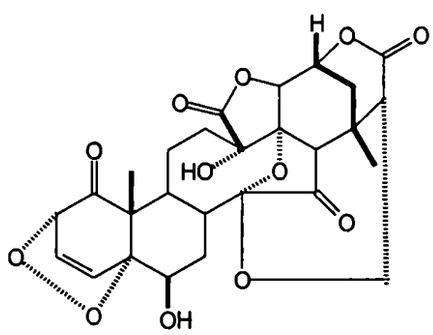
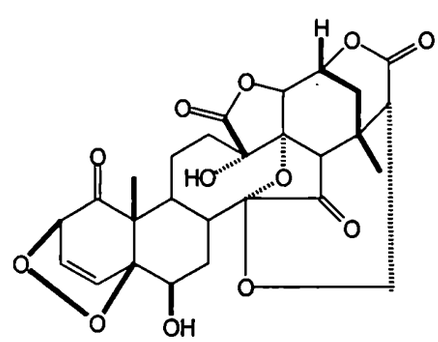


Figura 55. Estructuras parciales en los anillos A y B.



(108)



(109)

Si bien los cálculos mediante modelado molecular (AM1, Hyperchem 5.1) para los confórmeros más estables de los endoperóxidos α y β del compuesto **107** indicaban que la distancia entre H-4/H-6 era menor de 3,0 Å tanto para el isómero α como para el

isómero β, la presencia de una correlación para el par H-4/H-19 y la ausencia de correlación para el par H-4/H-7, en el espectro NOESY (**Figura 56**), indicaba que el grupo endoperóxido se encontraba en posición α (**Figura 57**).

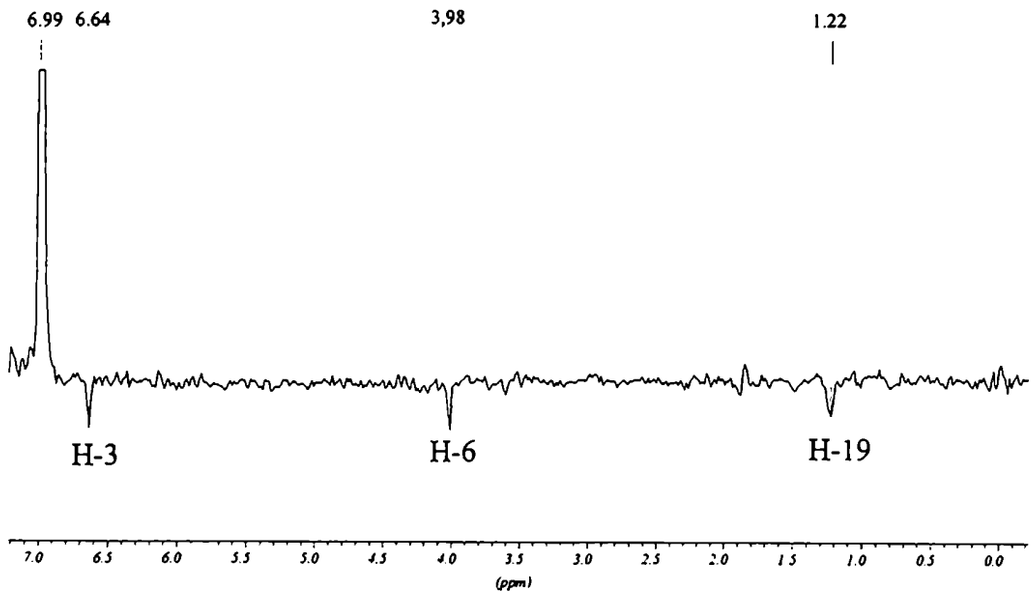


Figura 56. Espectro NOESY de la jaborosolactona 15 (**107**) .
Fila correspondiente a la señal a δ = 6,99 ppm asignada al H-4.

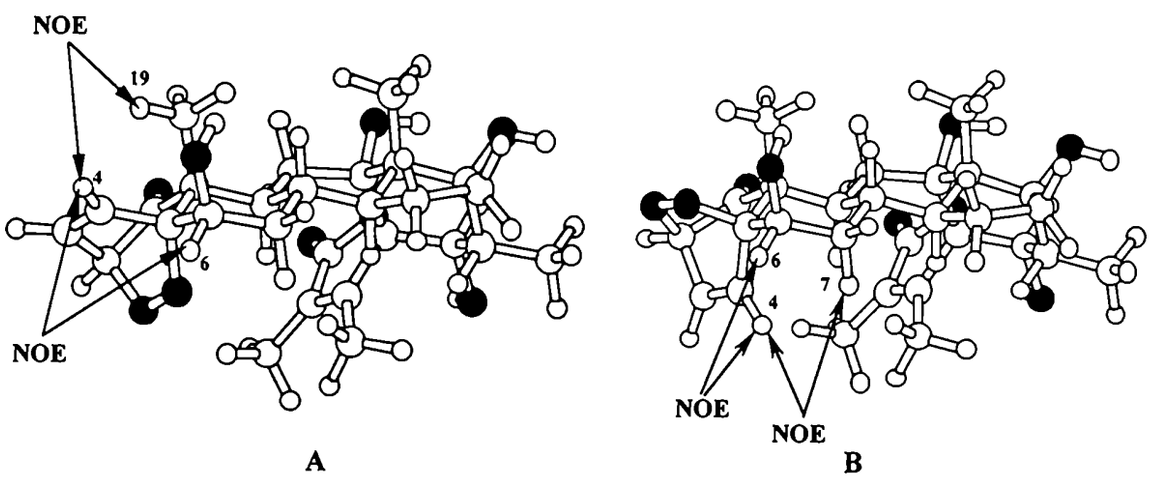


Figura 57. Confórmeros de mínima energía (AM1, Hyperchem 5.1) del 2α,5α-endoperóxido (**A**) y 2β-5β-endoperóxido (**B**)

El resto de las asignaciones para los espectros de RMN ^{1}H (**Tabla 33**) y de RMN ^{13}C (**Tabla 34**) del compuesto **107** se hicieron por comparación con las jaborosolactonas anteriores, y fueron confirmadas con los espectros DEPT y COSY-45 (**Figura 58**).

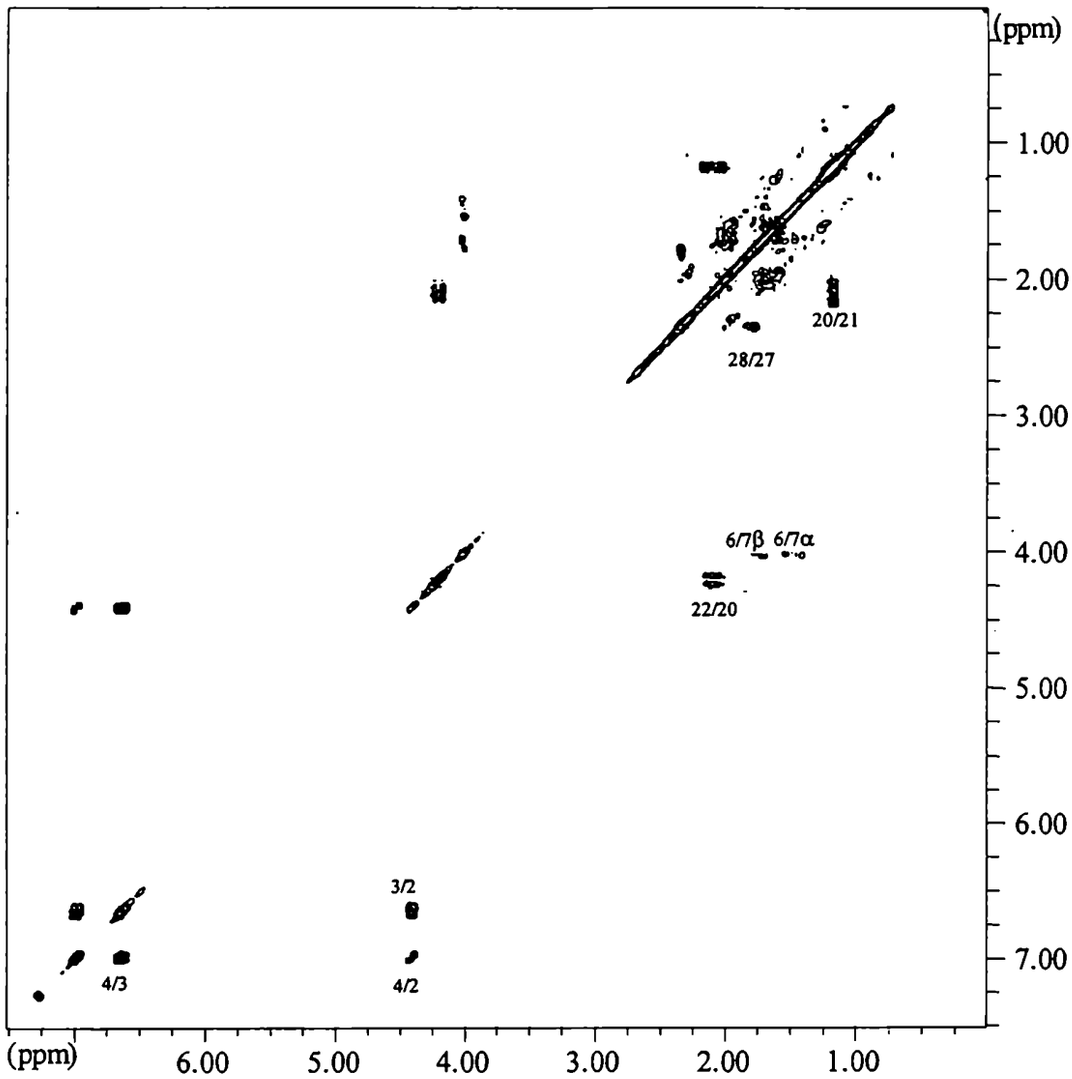


Figura 58. Espectro COSY-45 de la jaborosolactona 15 (**107**).

El espectro de masa de alta resolución mostró un pico correspondiente al ión m/z 516,2359 (valor calculado 516,2351) correspondiente al $[M^{+}]$, el cual estaba de acuerdo con la fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_{9}$. El espectro de masa de impacto electrónico mostró un pequeño pico del ión molecular $[M^{+}]$ a m/z 516 (0, 4%) y los picos a m/z 168 (14,0 %)

y a m/z 348 (1,0 %) correspondientes a la ruptura simultánea de las uniones entre C-23–C-12 y C-20–C-17 (**Figura 59**), ruptura característica observada en esta familia de compuestos.

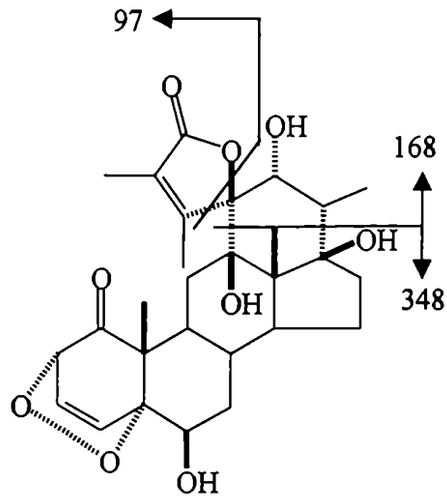


Figura 59. Fragmentaciones características en el espectro de masa de jaborosolactona 15 (**107**).

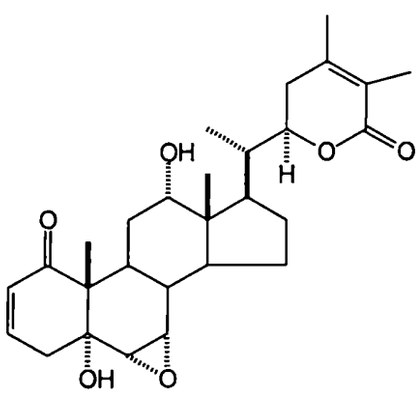
Capítulo 5

Actividad Biológica

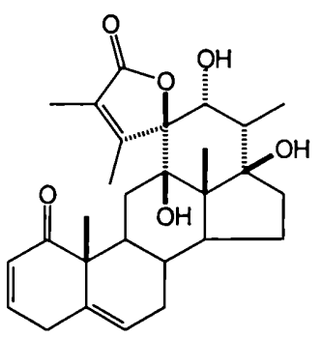
I. ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE WITHANOLIDOS AISLADOS DE *DATURA FEROX* Y *JABOROSA ODONELLIANA*

De acuerdo a lo mencionado en la Introducción (Capítulo 1, pág. 15), los primeros antecedentes de withanólidos con actividad antialimentaria fueron informados por Nalbandov y colaboradores, quienes ensayaron la nicandrenona (Nic-1) (**5**), aislada de *Nicandra physaloides*, frente a larvas de *Manduca sexta* (gusano del tabaco) (Nalbandov *et al.*, 1964). Posteriormente, se aislaron withanólidos con propiedades antialimentarias de otras especies de Solanáceas. Se estudió además la participación en mecanismos de defensa química de los withanólidos presentes en frutos de *Physalis peruviana* (Baumann *et al.*, 1993) y de los salpichrólidos aislados de partes aéreas de *Salpichroa origanifolia* (Mareggiani *et al.*, 2000, 2001)

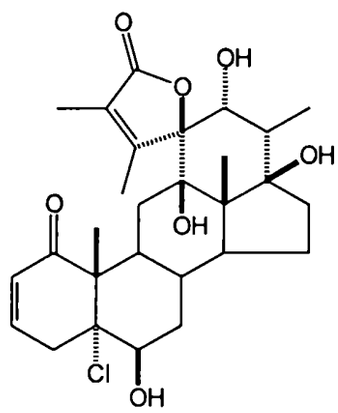
Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió estudiar la actividad antialimentaria de los componentes mayoritarios de *D. ferox* (el withaferoxólido (**22**)) y de *Jaborosa odonelliana* (jaborosolactona P (**4**) y jaborosolactona 10 (**102**)). Dicha actividad se estudió frente a los insectos *Musca domestica* (Díptera), especie propagadora de numerosas enfermedades, y *Tribolium castaneum* (Coleóptera), considerado una de las plagas más importantes para los granos y harinas almacenados. Se utilizaron estos insectos teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente con los withanólidos aislados de *Salpichroa origanifolia* (Mareggiani *et al.*, 2000)



(**22**)



(**4**)



(**102**)

Los estudios de actividad antialimentaria fueron realizados por la Dra Graciela Mareggiani (Facultad de Agronomía, UBA) y parte de los mismos se encuentran detallados en su Tesis Doctoral (Mareggiani, 1999).

A continuación, se resumen los resultados obtenidos en ambas especies de insectos.

A) Ensayos realizados con *Musca domestica*

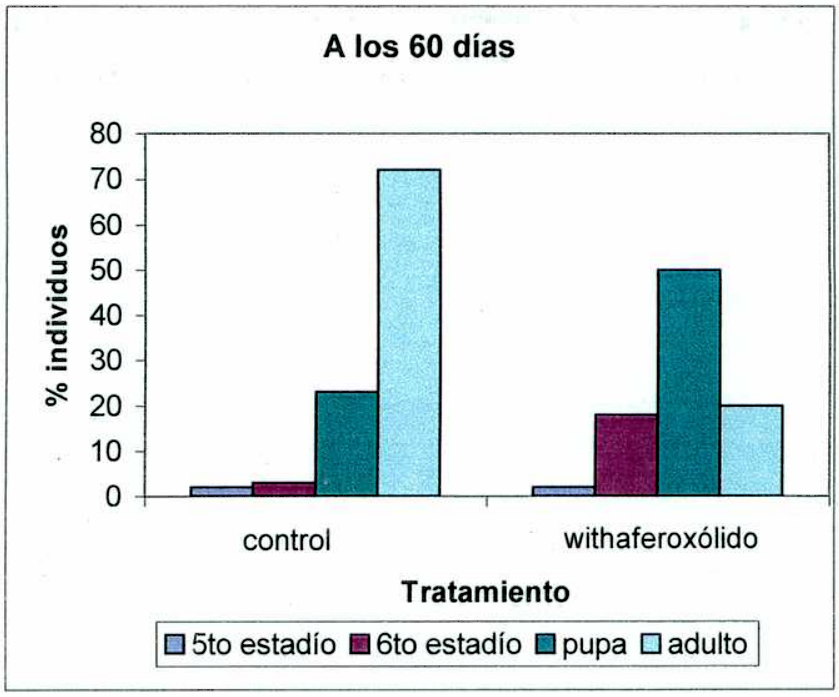
Se incubaron larvas neonatas con alimento tratado con withaferoxólido (**22**) en concentraciones de 100, 500 y 2000 ppm. Paralelamente, se utilizaron dos tipos de controles, uno con alimento sin tratar y uno sin alimento (ayuno). En este caso, no se observaron demoras en el desarrollo aún para las concentraciones más altas.

B) Ensayos realizados con *Tribolium castaneum.*

Se estudió el crecimiento de grupos de larvas incubadas en harina impregnada con soluciones de 500 ppm de withaferoxólido (**22**) en acetona y como control, larvas a las cuales se incubó con alimento sin tratar. Se registró durante 80 días de incubación el porcentaje de individuos en distintos estadíos del desarrollo (**Figura 60**).

Los resultados obtenidos indican que el withaferoxólido produce retardo en el desarrollo a la concentración estudiada. A los 60 días de exposición, más de un 70% de los insectos controles pasaron al estado adulto, mientras que sólo un 20% de las larvas expuestas al withaferoxólido (**22**) alcanzaron este estadío. A los 80 días, la diferencia sigue siendo significativa (**Figura 60**).

Con los datos registrados sobre el número de individuos que alcanzaron el estado adulto con distintos tiempos de incubación durante 100 días, se calculó el tiempo de desarrollo TD_{50} (tiempo necesario para que el 50% de las larvas expuestas alcancen el estado adulto), obteniéndose un TD_{50} de 57,0 días para el control y de 68,9 días para las larvas expuestas. Estos valores indican que el withaferoxólido fue efectivo en demorar el desarrollo.



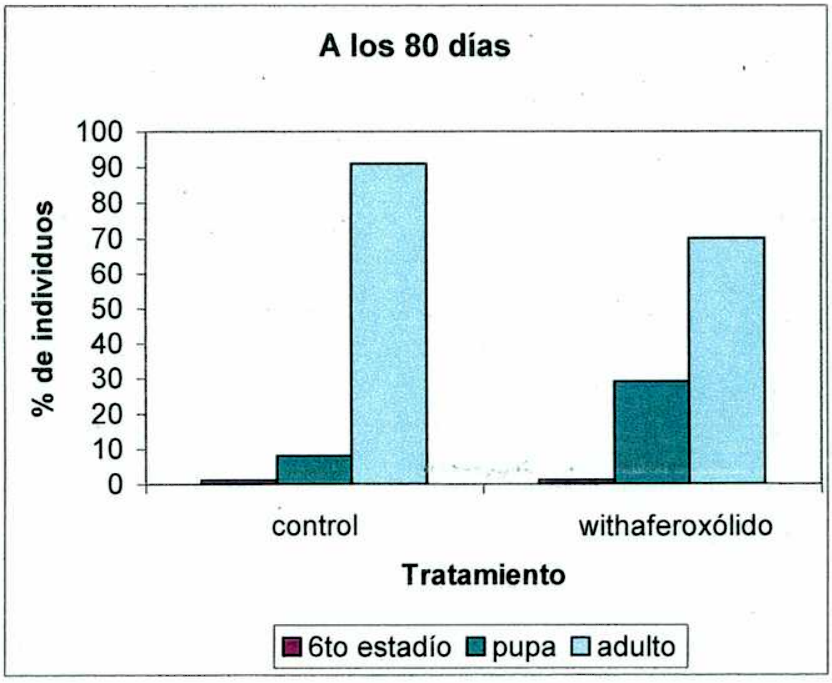


Figura 60. Porcentaje de individuos de *Tribolium castaneum* en los estadíos de desarrollo alcanzados, a los 60 y 80 días de incubación con alimento tratado con withaferoxólido (**22**).

En base a los resultados obtenidos, se comparó la actividad de la nicandrenona (**5**), el salpichrólido A (**12**) y el withaferoxólido (**22**) sobre insectos de *Tribolium castaneum*, teniendo en cuenta que la nicandrenona (**5**) presenta una combinación estructural de los dos compuestos (Mareggiani, G. *et al.*, 2001).

En la **Tabla 34**, se observa que si bien a los 57,1 días de iniciado el bioensayo, el 50% de los individuos habían alcanzado el estado adulto, esto no ocurre con los insectos tratados con cualquiera de los tres withanólidos. En el caso de la nicandrenona (**5**), la demora fue significativamente mayor que para el salpicrólido A (**12**) y el withaferoxólido (**22**).

Tabla 34. Tiempo de desarrollo requerido para la emergencia del 50 % de los adultos (TD_{50}) de *Tribolium castaneum*, alimentados con harina tratada con 500 ppm de nicandrenona (**5**), salpicrólido A (**12**) y withaferoxólido (**22**) respectivamente.

Tratamiento	**TD_{50} (días)**
control	57,1 (54,9-59,1)
nicandrenona	77,5 (74,7-80,2)
salpichrólido A	70,2 (67,8-72,5)
withaferoxólido	68,9 (66,7-71,2)

La actividad antialimentaria semejante para los tres compuestos sobre *Tribolium castaneum* se explicaría por la similitud estructural entre ellos. Sin embargo, cabe destacar que mientras el salpichrólido A (**12**) presenta actividad en *Tribolium castaneum* y en *Musca domestica*, el withaferoxólido no resultó activo en esta última especie, lo cual muestra que la actividad de los withanólidos depende además, de la especie de insecto en estudio.

Para la determinación de la actividad antialimentaria de los componentes mayoritarios de *J. odonelliana*, jaborosolactona P (**4**) y jaborosolactona 10 (**102**), se incubaron larvas neonatas de *Tribolium castaneum* con alimento tratado con los withanólidos de interés en concentraciones de 500 ppm, utilizando como control alimento sin tratar; el desarrollo de las larvas se controló a intervalos de diez días, durante 100 días. Como en el caso anterior, las demoras en el desarrollo se determinaron midiendo el tiempo de desarrollo TD_{50} (tiempo necesario para que el 50 de las larvas expuestas alcancen el estado adulto) (**Tabla 35**).. Se observó que a la concentración utilizada, la jaborosolactona P (**4**) dio lugar a una importante demora en el desarrollo (**Tabla 35**), mientras que el tiempo de emergencia de los adultos para jaborosolactona 10 (**102**) fue similar al del control.

Tabla 35. Tiempo de desarrollo requerido para la emergencia del 50% de los adultos (TD_{50}) de *Tribolium castaneum*, alimentados con harina tratada con 500 ppm de jaborosolactona P (**4**) o jaborosolactona 10 (**102**).

Compuesto	TD_{50} (días)
control	55,6 (52,3 – 58,8)
jaborosolactona P	82,57 (72,9 – 96,6)
jaborosolactona 10	53,1 (51,9 – 54,2)

II. ACTIVIDAD QUIMIOPREVENTIVA DEL CANCER DE WITHANOLIDOS AISLADOS DE *DATURA FEROX*, *JABOROSA RUNCINATA* Y *JABOROSA ODONELLIANA*

La quimioprevención del cáncer, un término acuñado por el Dr Michael Sporn (Sporn *et al.*, 1976) estudia la prevención o bien el retraso del proceso carcinogénico en humanos mediante el uso de agentes farmacológicos o por la ingesta de sustancias naturales en la dieta.

Para detectar posibles agentes quimiopreventivos del cáncer, se emplean una serie de ensayos *in vitro* (Pezzuto *et al.*, 1999). Uno de dichos procedimientos monitorea la inducción de la enzima quinona-reductasa (QR) utilizando células Hepa 1c1c7. Se ha determinado que la inducción de dicha enzima es indicativa de una elevación generalizada de los niveles enzimáticos de la fase II, responsable del proceso de detoxificación de sustancias químicas carcinogénicas y otros oxidantes nocivos para la salud. Más aún, la inducción de la QR sugiere una prevención del cáncer en el estadío de iniciación del tumor (Pezzuto *et al.*, 1995) habiéndose usado este modelo para estudiar la actividad quimiopreventiva del cáncer utilizando sulforafano (**110**), aislado del bróccoli, con resultados muy prometedores.

Como se mencionó en la Introducción (pág. 18), en la búsqueda de productos naturales útiles para dicho fin, los primeros antecedentes de withanólidos con actividad quimiopreventiva del cáncer fueron informados por Kennelly y colaboradores, quienes ensayaron con buenos resultados whitafisacarpina (**16**), 2,3-dihidro-3-metoxiwithafisacarpina (**15**) y 24,25-dihidrowithanólido D (**17**) aislados de frutos de *Physalis philadelphica*, frente a las líneas celulares Hepa 1c1c7, TAOc1BP^{r}c1 y BP^{r}c1 (**Tabla 36**) (Kennelly *et al.*, 1997).

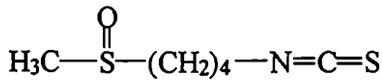
Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió estudiar las propiedades quimiopreventivas del cáncer del componente mayoritario de *D. ferox*, el withaferoxólido (**22**), del componente mayoritario de *J. runcinata*, jaborosolactona 1 (**94**), y de los componentes mayoritarios de *J. odonelliana*, jaborosolactona P (**4**), jaborosolactona 10 (**102**) y jaborosolactona 14 (**106**) frente a las lineas celulares Hepa 1c1c7.

Dichos estudios fueron realizados por el grupo del Dr. Douglas Kinghorn, en el Departamento de Química Medicinal y Farmacognosia, en la Universidad de Illinois, Chicago. En la **Tabla 36**, se detallan los resultados obtenidos para los withanólidos mencionados.

Tabla 36. Citotoxicidad e índice quimiopreventivo de withanólidos descriptos previamente (Kennelly *et al.*, 1997) y aislados en esta Tesis, comparados con el sulforafano (**110**) .

Compuesto	CD (μM)	CQ (μM)	CI_{50} (μM)	IQ
withaferoxólido (**22**)	14,5	40,8	> 42,5	2,95
jaborosolactona 1 (**94**)	0,28	1,27	8,1	28,9
jaborosolactona P (**4**)	0,75	ND	> 42,7	> 56,9
jaborosolactona 10 (**102**)	9,32	ND	> 39,0	> 4,2
jaborosolactona 14 (**106**)	7,32	ND	> 38,0	> 5,2
2,3-dihidro-3-metoxiwithafisacarpina (**15**)	7,8	37,5	46,9	6,0
withafisacarpina (**16**)	0,43	1,9	4,8	11,1
24,25-dihidrowithanólido D (**17**)	0,70	3,8	5,5	7,8
Sulforafano (**110**)	0,49	10,6	11,7	23,9

CD: Concentración requerida para obtener el doble de la actividad específica de la QR
CQ: Concentración requerida para obtener el cuadruple de la actividad específica de la QR
CI_{50}: Concentración de inhibición del 50% del crecimiento de las células.
IQ: Indice quimiopreventivo; CI_{50}/CD.
ND: no determinada.



(110)

El sulforafano (**110**), aislado del bróccoli, ha sido descripto como un potente inductor de las enzimas de detoxificación de la fase II y produjo una importante inhibición en la carcinogénesis mamaria de ratas inducida por DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzoantraceno) (Zhang *et al.*, 1992). Los parámetros utilizados para la medición de la inducción de esta fase, a través del aumento en la actividad enzimática de la quinona reductasa, son CD (concentración requerida para obtener el doble de la actividad específica de la QR) y CQ (concentración requerida para obtener el cuadruple de la actividad específica de la QR). Por otra parte, se debe considerar la citotoxicidad de las sustancias en estudio (CI_{50}), que debería ser lo más baja posible. Se estableció entonces un índice quimiopreventivo definido como IQ = CI_{50}/CD que será tanto mayor, y en consecuencia más favorable, cuanto menor sea la citotoxicidad del compuesto y menor sea la concentración requerida para inducir la quinona reductasa (Kennelly *et al.*, 1997). Si se considera como referencia al sulforafano (**110**), se observa que si bien los withanólidos **16** y **17**, descriptos previamente, tienen un valor de CD bajo, su citotoxicidad es alta, resultando peores agentes quimiopreventivos que el compuesto de referencia (**Tabla 36**). En cuanto a los withanólidos estudiados en esta Tesis, se puede observar que todos los compuestos pertenecientes al género *Jaborosa* presentan actividad inductora de quinona reductasa; jaborosolactona I (**94**) y jaborosolactona P (**4**) resultaron mejores agentes quimiopreventivos que el sulforafano usado como control, con un índice quimiopreventivo superior.

Es de destacar que la jaborosolactona P (**4**) no presentó citotoxicidad a las concentraciones máximas ensayadas, si bien posee una actividad inductora de quinona reductasa comparable al sulforafano.

Capítulo 6

Parte

Experimental

GENERALIDADES

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no se corrigieron.

Los espectros de absorción en el infrarrojo se determinaron utilizando un espectrofotómetro Nicolet Magna 550 FT IR. Los espectros UV se realizaron con un espectrofotómetro Hewlett Packard 8451A con arreglo de diodos, para *Datura ferox* y *Jaborosa runcinata*, y con un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos, para *Jaborosa odonelliana*, en solución de metanol en ambos casos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H (RMN ^{1}H) y de ^{13}C (RMN ^{13}C) se midieron en espectrómetros Bruker AC-200 (200,13 y 50,32 MHz respectivamente) y Bruker AM-500 (500,13 y 125,13 MHz) (LANAIS RMN-500). Las determinaciones se realizaron en tubos de 5 mm de diámetro, en solución de deuterocloroformo (Cl_3CD) y usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) respecto de la resonancia del TMS (0,00 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz) y las multiplicidades se indican en cada caso como singulete (*s*), señal ancha (*sa*), doblete (*d*), triplete (*t*), cuarteto (*c*), doble doblete (*dd*), doble doble doblete (*ddd*) y multiplete (*m*).

El número de protones unidos a ^{13}C se determinó en base a las fases relativas de las señales en los espectros obtenidos por medio de la técnica de incremento libre de distorsión por transferencia de polarización (DEPT-135) (Zilm *et al.*, 1982). Los espectros de RMN ^{13}C con desacople selectivo se obtuvieron por irradiación de la señal de hidrógeno deseada con una frecuencia única de baja potencia (B_2/γ~150Hz).

Los espectros de correlación homonuclear ^{1}H-^{1}H (COSY-45) y heteronuclear ^{1}H-^{13}C (HETCOR), correlación a larga distancia ^{1}H-^{1}H (COSY-LR) y correlación ^{1}H-^{1}H por NOE (NOESY), se midieron usando el software standard de los espectrómetros y se procesaron con WIN2D-NMR 6.0

Los espectros de masa por introducción directa se realizaron en espectrómetros de masa TRIO-2 VG Masslab y Shimadzu QP-5000, ionizando por impacto electrónico a 70 ev (IE). Los espectros de masa de alta resolución (EMAR) y los espectros de masa por bombardeo de átomos rápidos (EMFAB) se realizaron en un espectrómetro ZAB-SEQ (BEQQ) (VG Analytical) utilizando el detector de tercera región libre de campo (LANAIS-EMAR, CONICET-FCEN,UBA).

La rotación específica se midió en un polarímetro Perkin-Elmer 343, en metanol.

La geometría de los compuestos fue optimizada sin restricciones utilizando el programa AMPAC 5.1 (AMPAC 5.1, © 1994 Semichem, 7128 Summit, Shawnee, KS 66216) en una estación de trabajo Sun modelo Sparcstation 20 con nivel de teoría AM1 (Dewar *et al.*, 1985) o el programa Hyperchem 5.1 en computadoras tipo PC .

Las cromatografías analíticas en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatoplacas de gel de sílice, en soporte de aluminio (Sílicagel 60 F_{254}, Merck o Aldrich) o en fase reversa HPTLC RP-18 (Aldrich). La detección se realizó pulverizando sobre las placas una solución de ácido sulfúrico 20 % en etanol seguido de calentamiento a 120 °C. De la misma manera se realizaron las cromatografías en capa delgada del tipo preparativo (CCP), pero en este caso la detección se realizó con luz UV (254 nm).

Las cromatografías flash (CF) en columna y las cromatografías flash en fase reversa (CFFR) en columna se realizaron en Sílicagel 60, malla 230-400 (Merck) y Sílicagel-C18 (Aldrich) respectivamente, aplicando en ambos casos presión de nitrógeno para acelerar el paso del solvente. (Still *et al.*, 1978). Los solventes de elución se indican en cada caso.

Las cromatografías flash por vacío (CFV) se realizaron con sílicagel (Sílicagel 60 G, Merck), empleando embudos con placa filtrante de vidrio sinterizado y haciendo vacío para acelerar el paso del solvente. (Harwood, 1985). Los solventes de elución se indican en cada caso.

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) se realizaron en un cromatógrafo líquido, con bomba Jasco PU-980, detector UV Spectra System UV 2000 e inyector automático de volumen variable Spectra Series AS3000; las condiciones usadas

se indican para cada caso en particular. Las columnas de fase reversa RP-18 utilizadas fueron YMC-Pack-ODS-A 5μm (250 x 10 mm) para *Datura ferox* e YMC-Pack-ODS-AQ 5μm (250 x 10 mm) para *Jaborosa odonelliana*. Para este tipo de cromatografía se utilizaron solventes grado HPLC los cuales fueron filtrados a través de membranas de teflón de 0,45 μm de tamaño de poro; las muestras fueron filtradas a través de minicolumnas de fase reversa (LiChrolut RP-18, Merck).

Datura ferox

AISLAMIENTO DE WITHANOLIDOS DE *DATURA FEROX*.

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *Datura ferox* se recolectaron en San Antonio de Litín, sobre ruta provincial N° 3, a 50 km al norte de la ciudad de BellVille, provincia de Córdoba, en el mes de diciembre de 1993 y la planta fue identificada por el Ing. A. T. Hunziker; un ejemplar de herbario se encuentra depositado en el Museo Botánico (CORD). Las hojas secas y molidas (1437 g) se extrajeron primero con cloroformo:acetona:metanol, a temperatura ambiente; la solución resultante se filtró y se llevó a sequedad. Al residuo obtenido (residuo 1), se le realizó una partición con hexano:metanol:agua (10:3:1) descartándose la fase hexano. La fase metanólica se concentró a temperatura ambiente y se extrajo en forma exhaustiva con cloroformo. La fase orgánica obtenida se evaporó a presión reducida hasta sequedad obteniéndose 5,41 g de residuo (residuo 2). El esquema separativo se resume en la **Figura 61**.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS COMPONENTES DE *DATURA FEROX*

El estudio de los withanólidos presentes en la planta mencionada se realizó separando el extracto vegetal obtenido en 2 fracciones **I** (3,15 g) y **II** (2,26 g), las cuales se procesaron según se describe a continuación.

FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCION I

La fracción **I** (3,15 g) se separó por una columna flash eluyendo con mezclas AcOEt:Hexano:Isopropanol 30:3:2 obteniéndose 4 fracciones principales F1, F2 , F3 y F4 **(Figura 62)**.

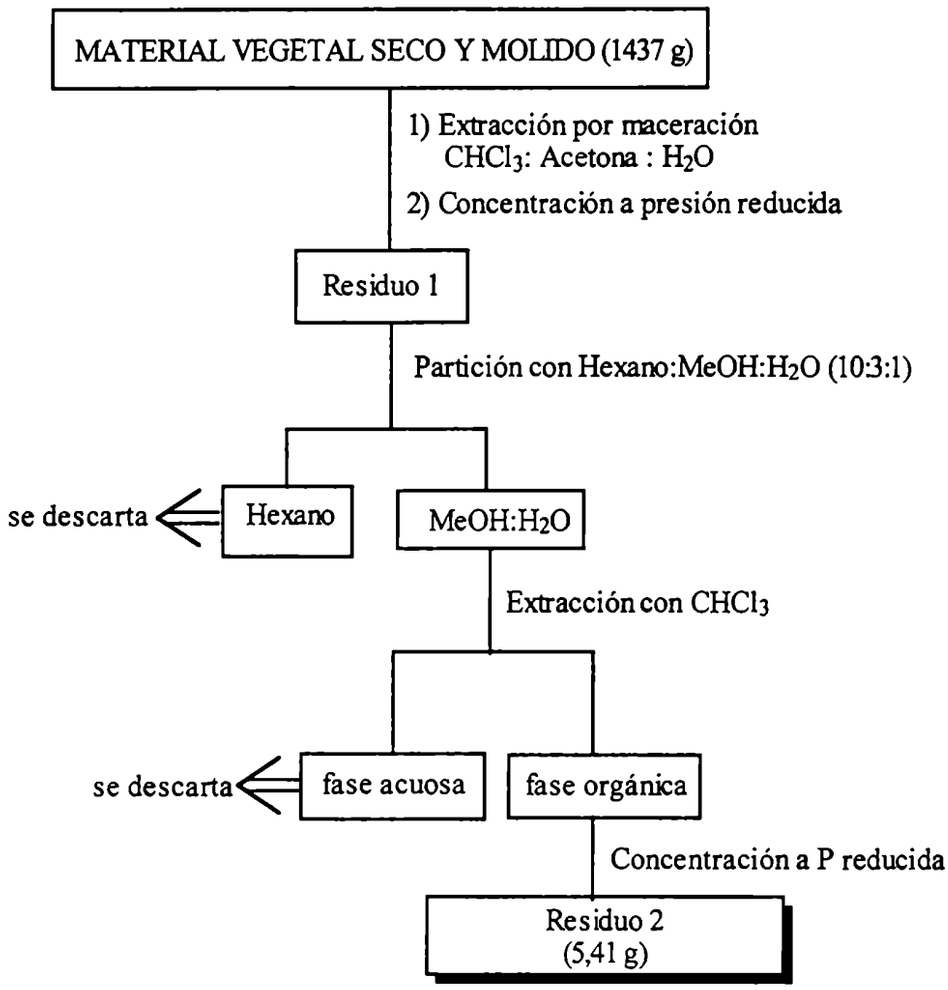


Figura 61. Esquema separativo para la obtención del extracto vegetal de *Datura ferox*.

La fracción menos polar F1 (32,1 mg) se purificó por cromatografía flash en columna eluyendo con AcOEt:Hexano:Isopropanol 100:10:1 obteniéndose el withanólido aislado previamente: la withanicandrina (**10**) (10,6 mg).

De la fracción F2 (129,5 mg), luego de su purificación por cromatografía flash en columna, eluyendo con AcOEt:Hexano:Isopropanol 50:5:1, se obtuvo una fracción que contenía withanólidos, F5. La subfracción F5 (5,3 mg) se cromatografió en CCD preparativa en fase reversa usando MeOH:agua 70:30, dando lugar a dos fracciones principales de las cuales la menos polar correspondió a la withametelina E (**23**) (1,0 mg) y la más polar, a la 15β-hidroxinicandrina B (**89**) (1,5 mgr).

La fracción F3 (30,0 mg) resultó ser el withanólido mayoritario de esta planta, el withaferoxólido (**22**).

De la purificación de la fracción F4 (126,9 mg) por columna flash eluída con AcOEt:Hexano:Isopropanol 50:5:2, se obtuvieron dos withanólidos: el withaferoxólido (**22**) (2,0 mg) y el withastramonólido (**24**) (16,0 mg).

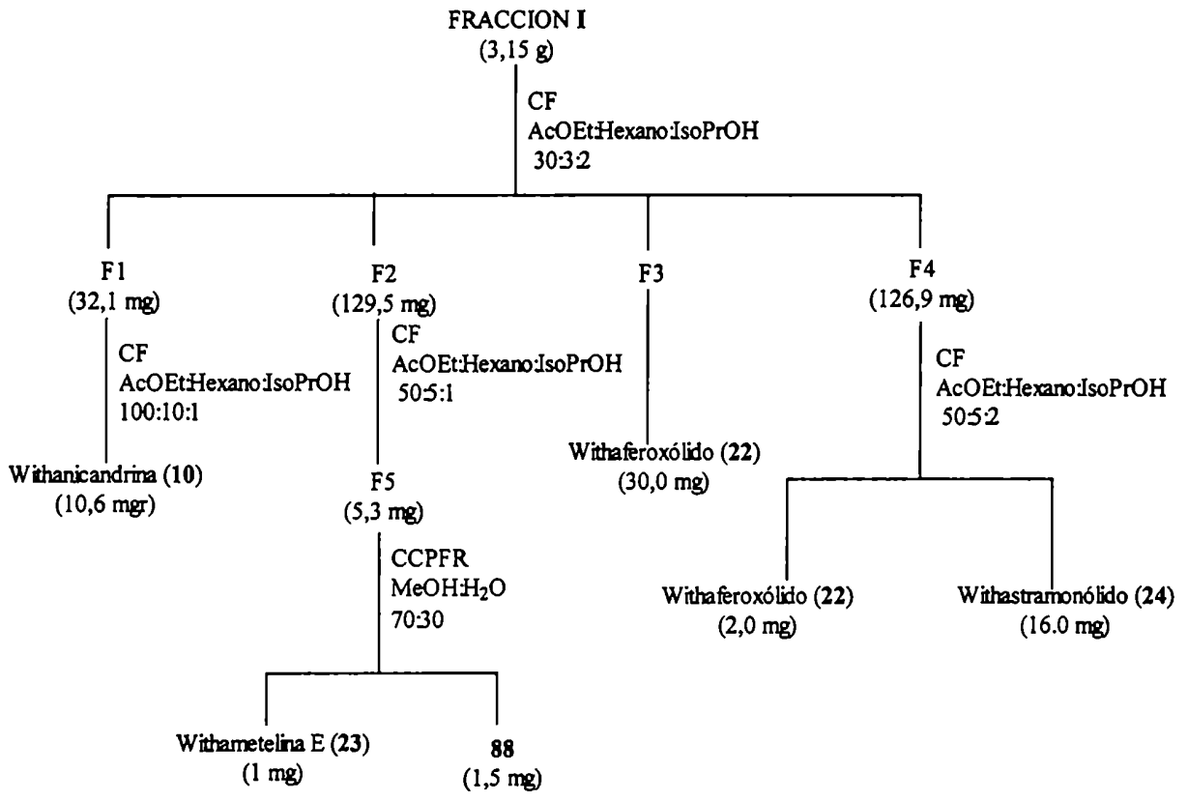


Figura 62. Separación cromatográfica de los componentes de la fracción **I** de *Datura ferox*. CF: cromatografía flash; CPFR: cromatografía preparativa en fase reversa.

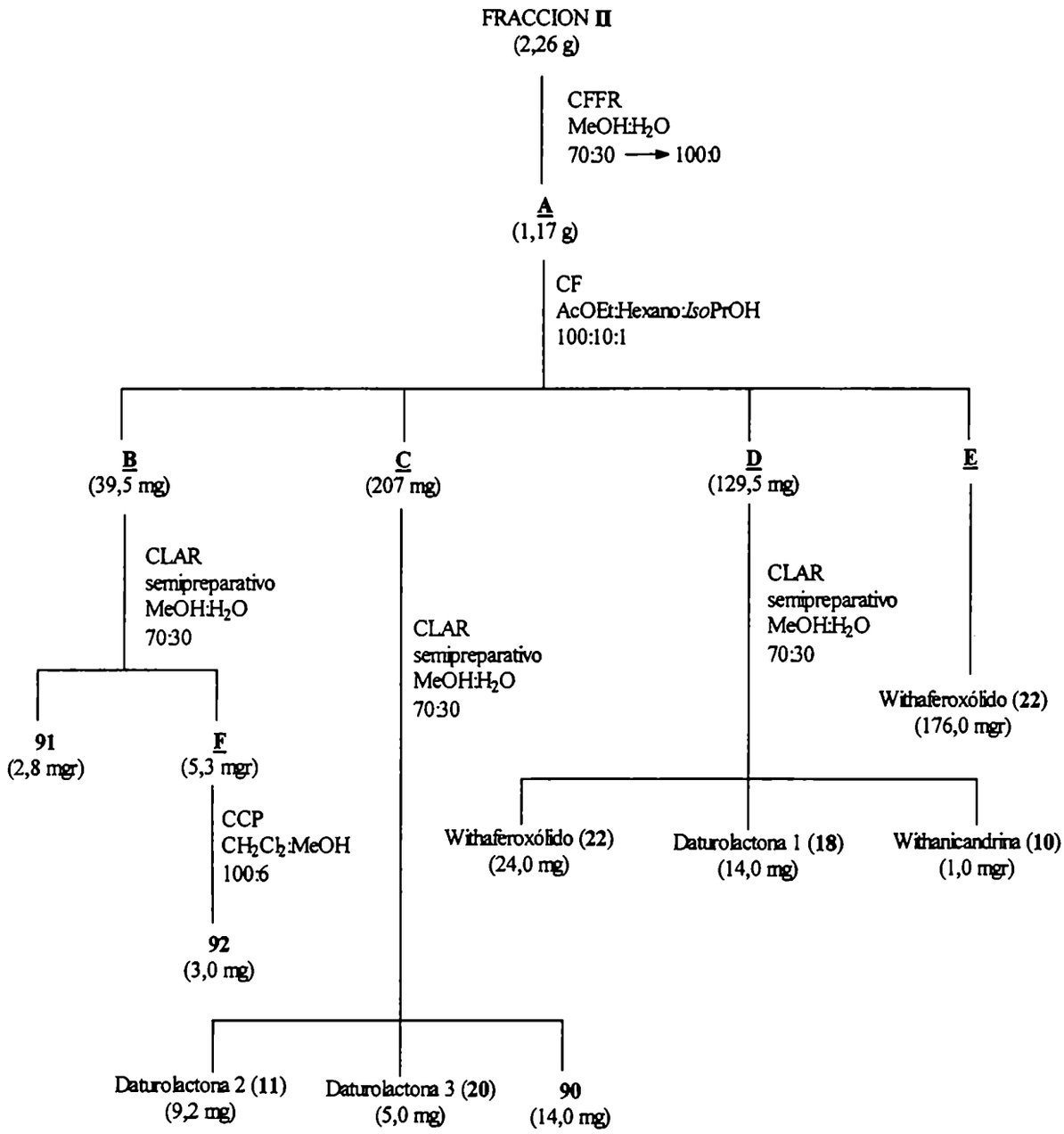


Figura 63. Separación cromatográfica de los componentes de la fracción **II** de *Datura ferox*. CFFR: cromatografía flash en fase reversa; CF: cromatografía flash; CCP: cromatografía en capa preparativa, CLAR: cromatografía líquida de alta resolución.

FRACCIONAMIENTO DE LA FRACCION II

La fracción **II** (2,26 g) se separó por una columna flash de fase reversa eluyendo con mezclas MeOH:Agua desde 70:30 hasta 100:0 dando lugar a una fracción principal A (1,17 g) que contenía los compuestos de interés (**Figura 63**).

Esta fracción se sometió a nueva columna flash con AcOEt:Hexano:Isopropanol desde 100:10:1 como solvente de elución, obteniéndose 4 fracciones principales B, C, D y E, (**Figura 63**). Las fracciones B, C y D se purificaron por CLAR en columna semipreparativa eluyendo con MeOH:H_2O 70:30 usando como detector UV-visible a λ = 245 nm.

De la fracción menos polar B (39,5 mg) se obtuvo un compuesto puro nuevo: la daturolactona 6 (**91**) (2,8 mg) y una fracción mezcla F (5,3 mg) que contenía un withanólido nuevo. Dicha fracción se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa de sílicagel con CH_2Cl_2:MeOH 100:6 como eluyente obteniéndose la daturolactona 7 (**92**) (3,0 mg).

La fracción C (207 mg) se purificó dando lugar a 2 withanólidos conocidos: la daturolactona 2 (**11**) (9,2 mgr) y la daturolactona 3 (**20**) (5,0 mg), junto con un withanólido nuevo, la daturolactona 5 (**90**) (14,0 mg).

De la purificación de la fracción D (129,5 mg), se separaron tres withanólidos conocidos, el withaferoxólido (**22**) (24,0 mg), la daturolactona 1 (**18**) (14.0 mgr) y la withanicandrina (**10**) (1,0 mg).

Por último, la fracción E (176,0 mg) correspondió al withanólido mayoritario: el withaferoxólido (**22**).

PROPIEDADES FISICAS DE LOS WITHANOLIDOS AISLADOS

15β-hidroxinicandrina B (88)

(17R, 20S, 22R)-5α, 12α, 15β-trihidroxi-6α,7α-epoxi-1-oxowitha-2,24-dienólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 266-267 °C; **UV** λ_{max}= 223 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3560, 3450, 1710, 1690; **RMN** ^{1}**H** (200,13 MHz); ver **Tabla 4**, pág. 39; **RMN**

^{13}C (50,32 MHz): ver **Tabla 5**, pág. 40; ; **EMIE** *m/z* (%): 486 (1), 468 (10), 450 (12), 361 (3), 125 (40), 107 (5); **EMFAB** (Alcohol *m*-nitrobencílico, KCl) *m/z* (%): 525 $[M+K]^+$ (100).

Daturolactona 5 (90)

(17R, 20S, 22R)-5α,6α,7β,12α-tetrahidroxi -1-oxowitha-2,24-dienólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 277-278°; $[\alpha]^{25}_D$: -31,5° (*c* 0,2, MeOH); UV λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3425, 1675, 1537,1376, 1186; **RMN** ^1H (200,13 MHz): ver **Tabla 7**, pág. 47; **RMN** ^{13}C (50,32 MHz): ver **Tabla 9**, pág. 50; **EMIE** *m/z* (%): 488 (1), 452 (1,5), 434 (2,5), 416 (4,5), 363 (1,5), 335 (1,5), 263 (17), 153 (5,5), 125 (43), 107 (11); **EMFAB** (glicerol) *m/z* (%) : 489 $[M+H]^+$ (36).

Daturolactona 6 (91)

(17R, 20S, 22R)-24,25-epoxi-5α,6α,7β,12α-tetrahidroxi -1-oxowitha-2-enólido

Sólido amorfo; $[\alpha]^{25}_D$: -50,5° (*c* 0,2, MeOH); UV λ_{max}= 222 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3400, 1719, 1692, 1370; **RMN** ^1H (200,13): ver **Tabla 10**, pág 52; **RMN** ^{13}C (50,32 MHz): ver **Tabla 12**, pág. 52; **EMIE** *m/z* (%): 504 (1), 486 (1), 468 (1), 450 (2), 432 (2), 363 (3), 335 (3,5), 169 (5), 141 (4), 107 (11); **EMFAB** (glicerol) *m/z* (%): 505 $[M+H]^+$ (100).

Daturolactona 7 (92)

(17R, 20S, 22R)-5α, 6α-epoxi–7α-hidroxi -1,12-dioxowitha-2,24-dienólido

Sólido amorfo; $[\alpha]^{25}_D$: -43,5° (*c* 0,2, MeOH); UV λ_{max}= 214 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3405, 1728, 1648; **RMN** ^1H (200,13 MHz): ver **Tabla 12**, pág 55; **RMN** ^{13}C (50,32 MHz): ver **Tabla 13**, pág. 55; **EMIE** *m/z* (%): 468 (1,5), 450 (10), 432 (2), 344 (3), 343 (1), 315 (1,5), 274 (6), 263 (3), 235 (8), 205 (70), 153 (11), 135 (29) , 125 (100), 107 (28); **EMFAB** (glicerol) *m/z* (%): 469 $[M+H]^+$ (100).

AISLAMIENTO DE WITHANOLIDOS DE FLORES DE *DATURA FEROX*

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección de las flores se realizó en San Antonio de Litín, sobre ruta provincial N° 3, a 50 km al norte de la ciudad de BellVille, provincia de Córdoba, en el mes de diciembre. El material vegetal obtenido, seco y molido (50 g), se extrajo primero, dos veces con 2000 ml de éter etílico cada vez, a temperatura ambiente, durante 3 días y posteriormente con 2000 ml de etanol durante la misma cantidad de tiempo a temperatura ambiente. Los extractos etéreos y etanólicos se evaporaron conjuntamente a presión reducida obteniéndose 1,88 g de residuo.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS COMPONENTES DE LAS FLORES DE *DATURA FEROX*

El residuo se fraccionó por métodos cromatográficos (**Figura 64**). La separación se llevó a cabo utilizando cromatografía flash en sílicagel 60-G en un embudo de vidrio sinterizado y aplicando vacío. Se usaron como eluyentes mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente de 100:0 a 0:100 obteniéndose una fracción principal **F** (eluída con AcOEt:Hexano 70:30, 80:20 y 90:10) (423,2 mg) que contenía los withanólidos. Dicha fracción se sometió a una nueva cromatografía flash en sílicagel 60-G en un embudo de vidrio sinterizado y aplicando vacío eluyendo con mezclas de CH_2Cl_2:MeOH desde 100:2 hasta 100:6 obteniendose 3 fracciones **F1, F2** y **F3.**

La fracción menos polar **F1** (eluída con CH_2Cl_2:MeOH 100:2) (20,0 mg) se separó por cromatografía en capa delgada preparativa de sílicagel con CH_2Cl_2:MeOH 100:8 como eluyente obteniéndose la withanicandrina (**10**) (1,6 mg) y la daturolactona 2 (**11**) (4,7 mg).

La fracción **F2** (eluída con CH_2Cl_2:MeOH 100:2) (9,4 mg) se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa de sílicagel con CH_2Cl_2:MeOH 100:5 como eluyente obteniéndose daturolactona 1 (**18**) (2,0 mg).

La fracción más polar **F3** (eluída con CH_2Cl_2:MeOH 100:2) (43,7 mg) correspondió al withaferoxólido (**22**).

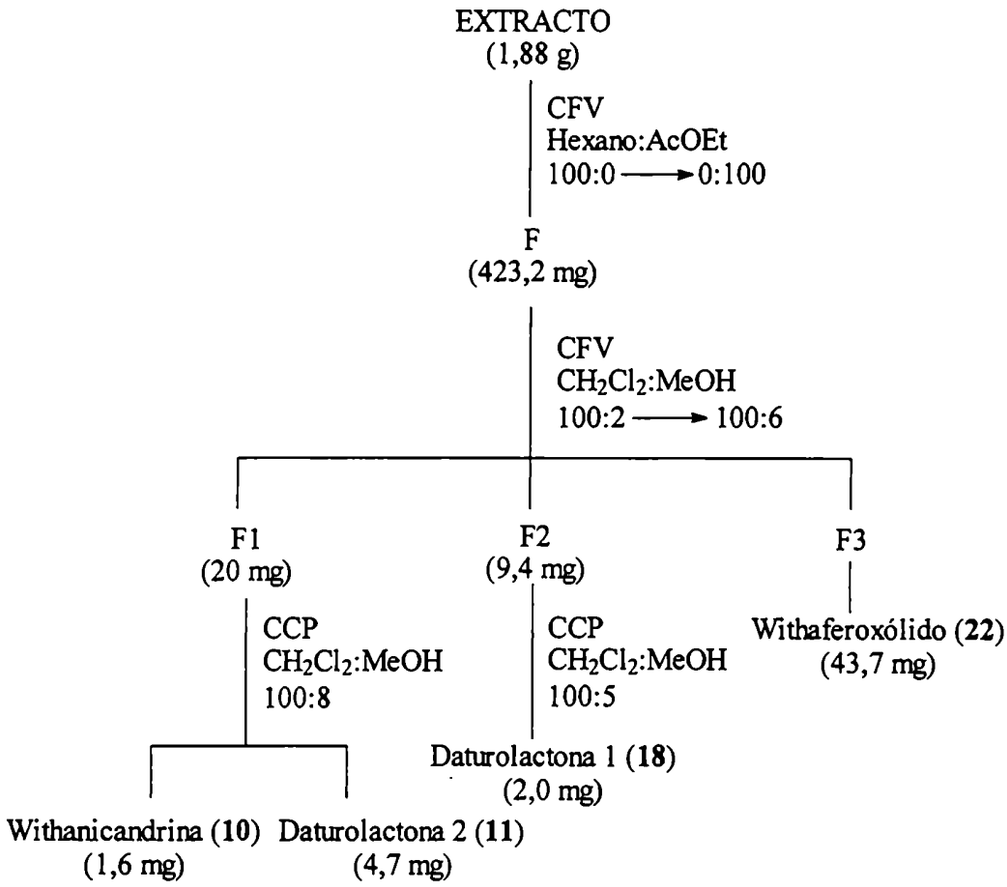


Figura 64. Separación cromatográfica de los componentes de las flores de *Datura ferox*. CFV: cromatografía flash por vacío; CCP: cromatografía en capa preparativa.

Jaborosa

runcinata

AISLAMIENTO DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA RUNCINATA*.

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas y los tallos de *Jaborosa runcinata* se recolectaron en el Establecimiento "El Jagüel", Ciudad de Paraná, provincia de Entre Ríos, en el mes de marzo de 1995 y la planta fue identificada por el Dr A. T. Hunziker; un ejemplar de herbario se encuentra depositado en el Museo Botánico (CORD) N° 248. El material vegetal obtenido, seco y molido (500 g) se extrajo primero, dos veces con 2000 ml de éter etílico cada vez, durante 3 días y posteriormente con 2000 ml de etanol durante la misma cantidad de tiempo a temperatura ambiente. Los extractos etéreos y etanólicos se evaporaron conjuntamente a presión reducida obteniéndose 935 mg de residuos.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS COMPONENTES DE *JABOROSA RUNCINATA*

La separación preliminar se llevó a cabo utilizando cromatografía flash con aplicación de vacío mediante el uso de un embudo de vidrio sinterizado. Se utilizó sílicagel 60-G como fase estacionaria y se usaron como eluyentes mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente de 100:0 a 0:100. De este modo, a partir de los 935 mg obtenidos, se obtuvieron cinco fracciones (F1 a F5) que contenían withanólidos (**Figura 65**).

La fracción menos polar F1 (eluída con AcOEt:Hexano 60:40) (88,0 mg) se purificó utilizando cromatografía flash en sílicagel de fase reversa C18 en un embudo con vidrio sinterizado y aplicando vacío, eluyendo con mezclas de Metanol:Agua desde 60:40 hasta 80:20, obteniéndose la jaborosolactona 1 (**94**) (25,6 mg).

La fracción F2 (eluída con AcOEt: Hexano 70:30) (44,0 mg) se fraccionó por una cromatografía flash en sílicagel en un embudo de vidrio sinterizado y aplicando vacío usando como solvente de elución Metanol:Agua 70:30 obteniendo una fracción principal

A (30,0 mg) la cual se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa de sílicagel eluyendo con AcOEt:Hexano 75:25 obteniéndose 4 nuevos withanólidos indicados en orden de polaridad creciente: jaborosolactona 1 (**94**) (1,0 mg), jaborosolactona 3 (**96**) (3,4 mg), jabororolactona 5 (**98**) (6,8 mg) y jaborosolactona 4 (13,0 mg) (**97**).

La fracción F3 (eluída con AcOEt: Hexano 90:10) (12,0 mg) se cromatografió en CCD preparativa usando AcOEt como eluyente, dando lugar a dos fracciones principales de las cuales la menos polar correspondió a jaborosolactona 4 (**97**) (6,0 mg) y la más polar a jaborosolactona 2 (**95**) (1,0 mgr).

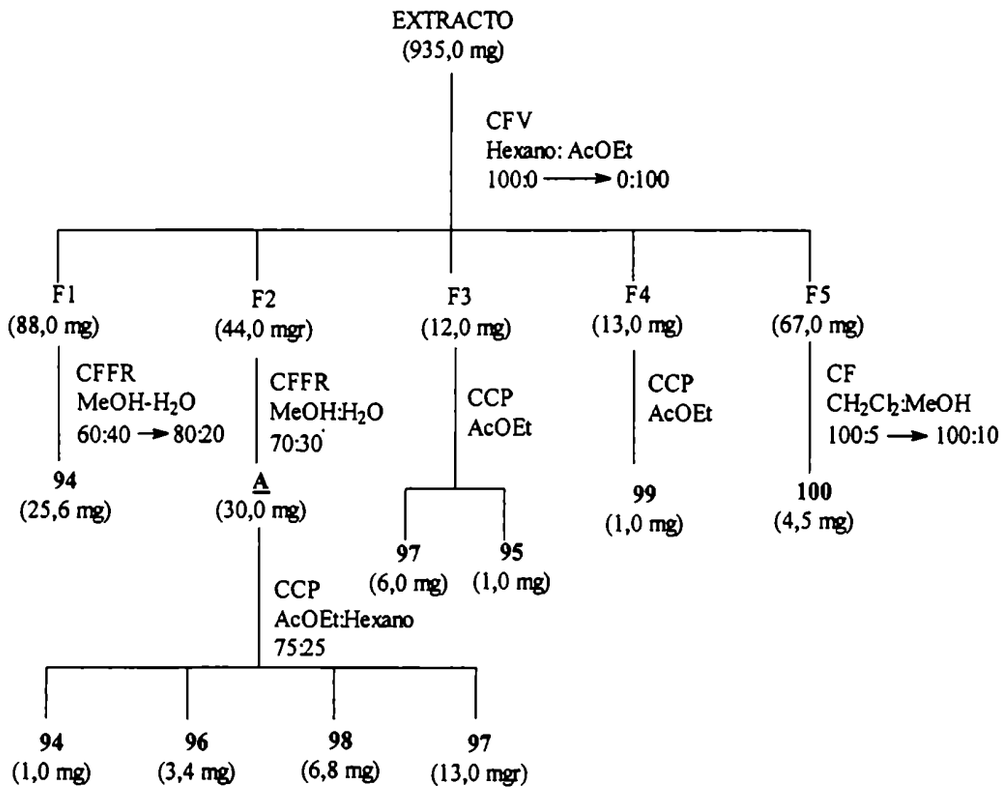


Figura 65. Separación cromatográfica de los conponentes de *Jaborosa runcinata*. CFV: cromatografía flash por vacío; CFFR: cromatografía flash en fase reversa; CCP: cromatografía en capa preparativa; CF: cromatografía flash.

De la purificación de la fracción F4 (eluída con acetato de etilo) (13,0 mg) por cromatografía en capa delgada preparativa usando AcOEt, se obtuvo un compuesto minoritario (1,0 mg) correspondiente a jaborosolactona 6 (**99**).

Por último, la fracción F5 (eluída con MeOH) (67,0 mg), se purificó por cromatografía flash con mezclas de CH_2Cl_2:MeOH desde 100:5 hasta 100:10 obteniéndose la jaborosalactona 9 (**100**) (4,5 mg).

PROPIEDADES FISICAS DE LOS WITHANOLIDOS AISLADOS

Jaborosolactona 1 (94)

(23R)-5β,6β–epoxi-12β-hidroxi-1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,17,24-trien-26,23-ólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 269-270 °C; UV λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3480, 1746, 1673, 1254, 1008; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 15**, pág 68; **RMN ^{13}C** (50,23 MHz): ver **Tabla 16**, pág. 69; **EMIE** *m/z* (%): 464 (2), 339 (26), 321 (8), 295 (6), 277 (9), 107 (11), 97 (13), 43 (100); **EMAR**: $[M]^+$ 464,2197 ($C_{28}H_{32}O_6$ calculado: 464,2199).

Jaborosolactona 2 (95)

(23R)-5α,6β,12β-trihidroxi -1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,17,24-trien-26,23-ólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 250-251 °C; UV λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3462, 1740, 1676, 1387, 1254, 1009; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 18**, pág 74; **RMN-^{13}C** (50,23 MHz): ver **Tabla 19**, pág. 75; **EMIE** *m/z* (%): 482 (3), 358 (14), 357 (60), 125 (10), 105 (8), 97 (10), 43 (100); **EMAR**: $[M]^+$ 482,2308 ($C_{28}H_{34}O_7$ calculado: 482,2305).

Jaborosolactona 3 (96)

(23R)-5α-cloro-6β,12β-dihidroxi-1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,17,24-trien-26,23-ólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 262-264 °C; UV λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3439, 1738, 1683, 1255, 1173; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 20**, pág 77; **RMN ^{13}C** (50,32 MHz): ver **Tabla 21**, pág.78; **EMIE** *m/z* (%): 500 (2), 464 (2), 446 (14), 375 (47), 339 (20), 321 (35), 107 (9), 97 (14), 43 (100); **EMAR**: $[M]^+$ 500,1965 ($C_{28}H_{33}O_6Cl$ calculado: 500.1966).

Jaborosolactona 4 (97)

(23R)-5β,6β–epoxi-12β,21-dihidroxi-1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,17,24-trien-26,23-ólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 273-274 °C; UV λ_{max}= 228 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3429, 1740, 1677, 1381, 1254, 1119; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 22**, pág 81; **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$): ver **Tabla 23**, pág. 81 ; **EMIE** $[M-H_2O]^+$ *m/z* (%): 462 (5), 444 (3), 337 (33), 319 (58), 293 (18), 107 (10), 97 (7), 43 (100) ; **EMAR**: $[M - H_2O]^+$ 462,2041 ($C_{28}H_{30}O_6$ calculado : 462,2042), **EMFAB** (alcohol *m*-nitrobencílico, KCl) *m/z* $[M + K]^+$ (%) 519 (100).

Jaborosolactona 5 (98)

(23R)-12β,21-dihidroxi-1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,5,17,24-tetraen-26,23-ólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 234-235 °C; UV λ_{max}= 226 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3477, 1754, 1672, 1387, 1260, 1014; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 25**, pág 85; **RMN-^{13}C** (50,32 MHz): ver **Tabla 26**, pág. 87; **EMIE** $[M-H_2O]^+$ *m/z* (%): 446 (3), 339 (1), 321 (15), 135 (13), 107 (6), 97 (18), 43 (100) ; **EMAR**: $[M - H_2O]^+$ 446,2095 ($C_{28}H_{30}O_6$ calculado : 462,2093), **EMFAB** (alcohol *m*-nitrobencílico, KCl) *m/z* $[M + K]^+$ (%) 503 (63).

Jaborosolactona 6 (99)

(23R)-5α-cloro-6β,12β,21-trihidroxi-1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,17,24-trien-26,23-ólido

Sólido amorfo; UV λ_{max}= 226 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3450, 1749, 1683, 1376, 1255, 1096, 1019; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 27**, pág 89; **RMN ^{13}C** (50,32 MHz): ver **Tabla 28**, pág 90. ; **EMIE** $[M-H_2O]^+$ *m/z* (%): 498 (0,6), 462 (1), 444 (2), 426 (1), 373 (3), 107 (12), 105 (16), 97 (10), 43 (100); **EMFAB** (alcohol *m*-nitrobencílico, KCl) *m/z* $[M - H_2O + K]^+$ (%) 537 (3).

Jaborosolactona 9 (100)

(23R)-5α,6β,12β,21-tetrahidroxi-1,22-dioxo-12,23-cicloergosta-2,17,24-trien-26,23-ólido

Cristales blancos (AcOEt:Hexano), **PF**: 253-255 °C; UV λ_{max}= 226 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3450, 1742, 1673, 1381, 1254, 1018; **RMN** ^{1}**H** (200,13 MHz): ver **Tabla 27**, pág 89; **RMN** ^{13}**C** (50,32 MHz): ver **Tabla 28**, pág 90; **EMIE** *m/z* (%): 444 (1), , 355 (4), 109 (13), 107 (10), 97 (20), 43 (100); **EMFAB** (glicerol) *m/z* $[M+1]^+$ (%) 499 (10).

Jaborosa odonelliana

AISLAMIENTO DE WITHANOLIDOS DE *JABOROSA ODONELLIANA*.

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas y los tallos de *Jaborosa odonelliana* se recolectaron en el Jardín de La Candelaria, provincia de Salta y la planta fue identificada por el Dr A. T. Hunziker; un ejemplar de herbario se encuentra depositado en el Museo Botánico (CORD) N° 25540. La recolección se realizó en dos épocas diferentes del año: otoño (abril de 1996) y primavera (diciembre del año 1998); el material vegetal obtenido, seco y molido (600 g y 1700 g, respectivamente), se procesó separadamente. En ambos casos, se extrajo primero, dos veces con 2000 ml de éter etílico cada vez, durante 3 días y posteriormente con 2000 ml de etanol durante la misma cantidad de tiempo a temperatura ambiente.

Dado que no se observaron diferencias apreciables en las composiciones de los extractos etéreos y etanólicos al ser analizados por CCD, se evaporaron conjuntamente obteniéndose 20,0 gr de residuo del material recolectado en otoño y 59,7 gr del material recolectado en primavera.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS COMPONENTES DE *JABOROSA ODONELLIANA* (ABRIL)

La separación preliminar se llevó a cabo utilizando cromatografía flash con aplicación de vacío mediante el uso de un embudo de vidrio sinterizado. Se utilizó sílicagel 60-G como fase estacionaria y como eluyentes, mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente de 100:0 a 0:100. De este modo, a partir de los 20,0 g obtenidos, se obtuvieron tres fracciones (F1 a F3) que contenían withanólidos (**Figura 66**).

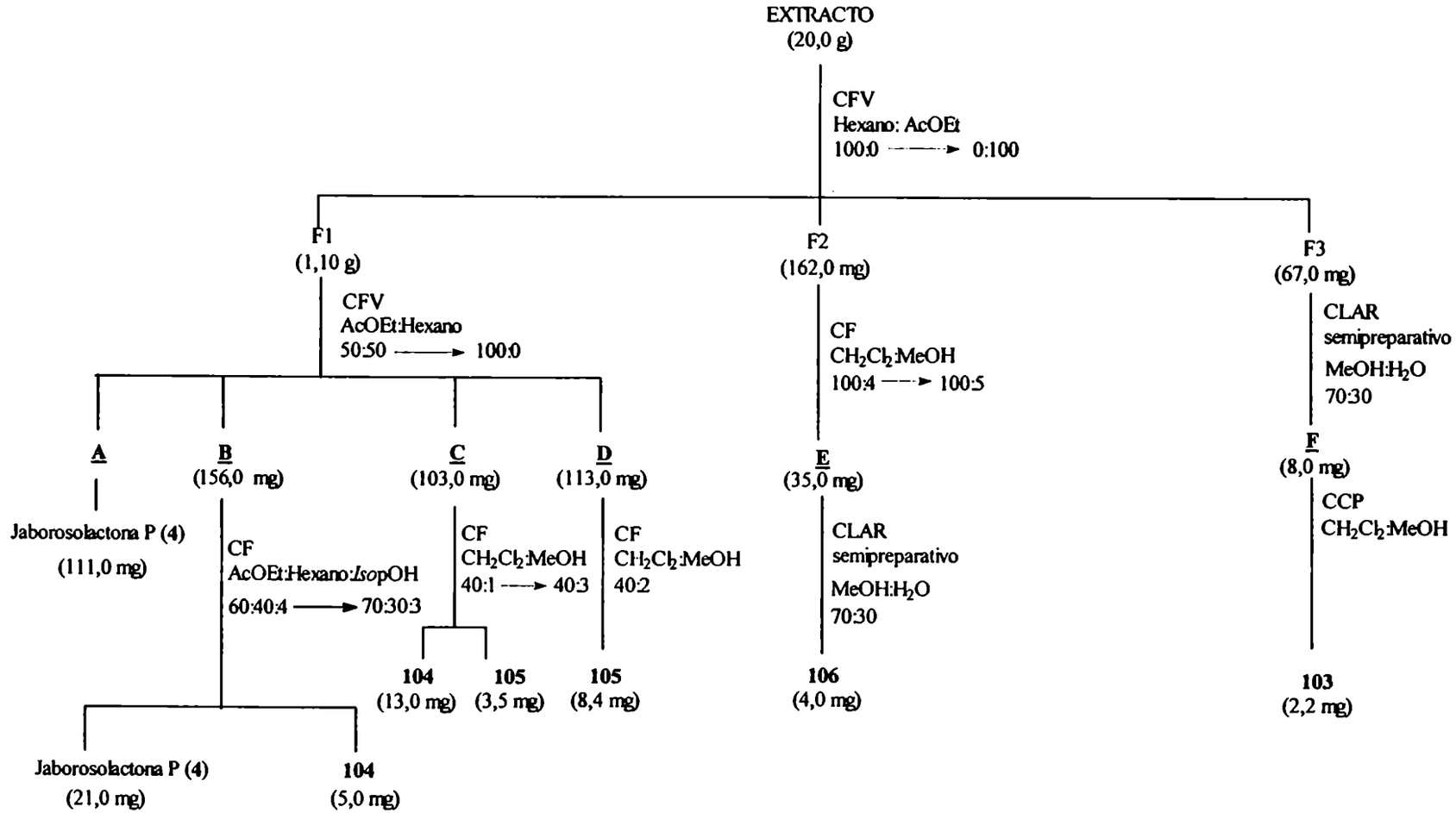


Figura 66. Separación cromatográfica de los componentes de *J. odonelliana* (abril).
CFV: cromatografía flash por vacío, CF: cromatografía flash; CCP: cromatografía en capa preparativa, CLAR: cromatografía líquida de alta resolución.

La fracción menos polar F1 (eluída con AcOEt:Hexano 70:30 y 80:20) (1,10 g) se fraccionó utilizando cromatografía flash con aplicación de vacío mediante el uso de un embudo de vidrio sinterizado. Se utilizó sílicagel 60-G (Merck) como fase estacionaria y como eluyentes mezclas de AcOEt: Hexano desde 50:50 hasta 100:0. Se obtuvieron 4 fracciones mayoritarias (A, B, C y D) que contenían withanólidos. La subfracción A, la menos polar (111,0 mg), correspondió a jaborosalactona P (**4**). De la purificación de la subfracción B (156,0 mg) por cromatografía flash con mezclas de AcOEt:Hexano:Isopropanol (60:40:4 y 70:30:3), se obtuvieron dos fracciones principales de las cuales la menos polar correspondió a jaborosalactona P (**4**) (21,0 mg) y la de mayor polaridad a jaborosolactona 12 (**104**) (5,0 mg). La subfracción C (103,0 mg) se purificó por cromatografía flash con mezclas de CH_2Cl_2:Metanol desde 40:1 hasta 40:3, dando lugar a dos fracciones, la fracción menos polar correspondió a jaborosolactona 12 (**104**) (13,0 mg) y la más polar, a jaborosolactona 13 (**105**) (3,5 mg). Por último, a partir de la subfracción D más polar (113,0 mg), y luego de purificar por columna flash con CH_2Cl_2:Metanol 40:2, se obtuvo jaborosolactona 13 (**105**) (8,4 mg).

La fracción F2 (eluída con AcOEt: Hexano 80:20 y 90:10) (162,0 mg) se purificó por una columna flash con CH_2Cl_2:MeOH como solvente de elución en mezclas de polaridad creciente (100:4 y 100:5) obteniendo una fracción principal E (35,0 mg) la cual se purificó por CLAR en columna semipreparativa eluyendo con MeOH:H_2O 70:30 usando como detector UV-visible a λ=230 nm aislándose jaborosolactona 14 (**106**) (4,0 mg).

La fracción más polar F3 (eluída con AcOEt: Hexano 90:10) (67,0 mg) se purificó por CLAR en columna semipreparativa eluyendo con MeOH:H_2O 70:30 usando como detector UV-visible a λ=230 nm obteniéndose una fracción mezcla F (8,0 mg) que contenía un withanólido nuevo. Dicha fracción se purificó por cromatografía en capa delgada preparativa de silicagel con CH_2Cl_2:MeOH 10:1 como eluyente obteniéndose jaborosolactona 11 (**103**) (2,2 mg).

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS COMPONENTES DE *JABOROSA ODONELLIANA* (DICIEMBRE).

El residuo obtenido de las fracciones etéreas y etanólicas se trató de forma similar a lo indicado en la separación anterior. La separación preliminar se llevó a cabo utilizando cromatografía flash con aplicación de vacío mediante el uso de un embudo de vidrio sinterizado. Se utilizó sílicagel 60-G (Merck) como fase estacionaria y como eluyentes, mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente de 100:0 a 0:100. De este modo, a partir de los 59,7 g iniciales, se obtuvo una fracción principal FI (1,15 g) que contenía withanólidos (**Figura 67**).

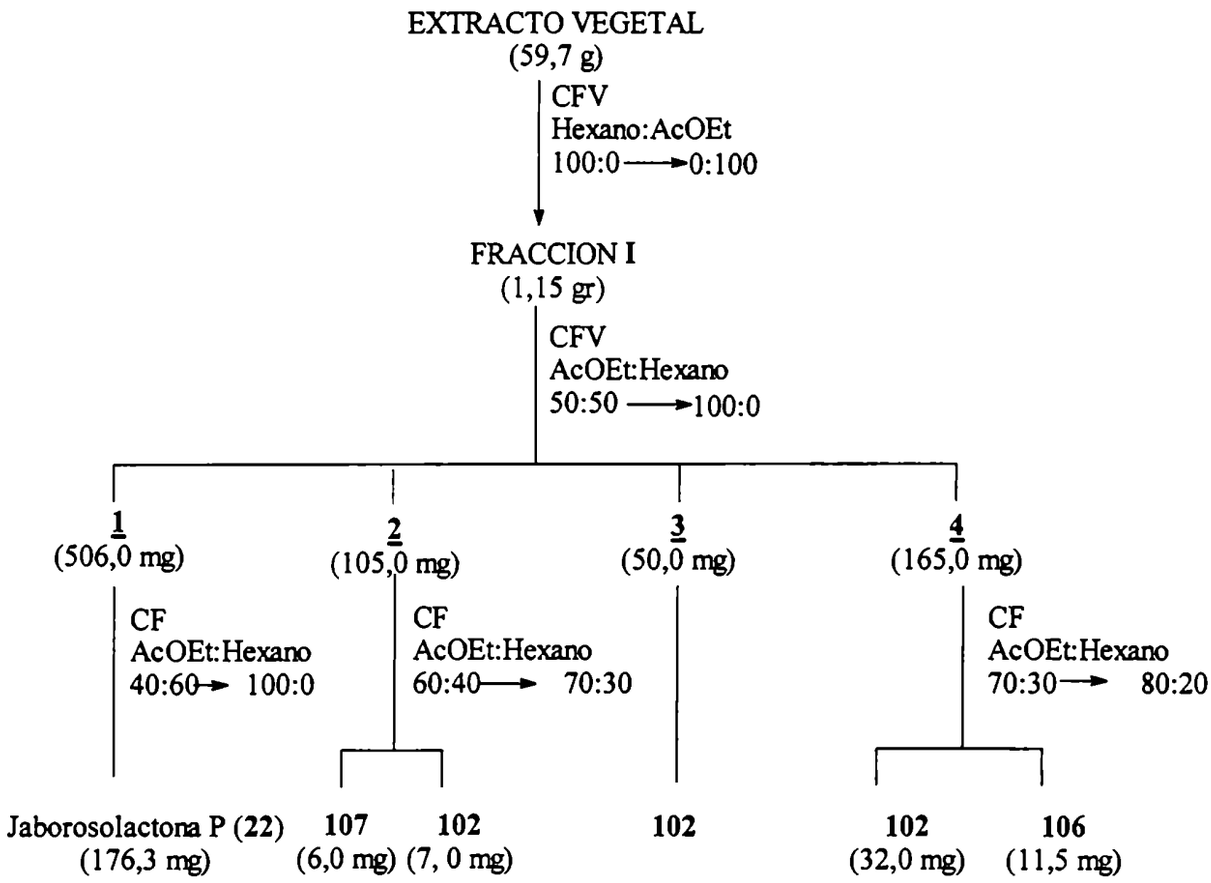


Figura 67. Separación cromatográfica de los componentes de *J. odonelliana* (diciembre). CFV: cromatografía flash por vacío, CF: cromatografía flash.

La fracción I (1,15 g) se purificó con una nueva cromatografía flash con aplicación de vacío mediante el uso de un embudo de vidrio sinterizado. Se utilizó silicagel 60-G como fase estacionaria y como eluyentes AcOEt:Hexano desde 50:50 hasta 100:0, obteniéndose cuatro fracciones 1, 2, 3 y 4 que contenían los withanólidos (**Figura 67**). La subfracción menos polar 1 (506 mg) fue posteriormente purificada por columna flash en embudo usando como eluyente AcOEt:Hexano desde 40:60 hasta 100:0 obteniéndose el withanólido conocido, jaborosolactona P (176,3 mg). La fracción 2 (105,0 mg) se purificó por columna flash de sílicagel 60 bajo presión de nitrógeno eluyendo con mezclas de AcOEt:Hexano desde 60:40 hasta 70:30, obteniendose dos fracciones mayoritarias. la fracción menos polar (6,0 mg) correspondiente a jaborosolactona 15 (**107**) (6,0 mg) y la más polar (7,0 mg) por jaborosolactona 10 (**102**). La fracción 3 contenía mayoritariamente jaborosolactona 10 (**102**) (50 mg). La subfracción 4 (165,0 mg) se purificó por columna flash de silicagel 60 bajo presión de nitrógeno, eluyendo con mezclas de AcOEt:Hexano desde 70:30 hasta 80:20, obteniéndose dos fracciones mayoritarias. la fracción menos polar (32 mg) estaba constituída por jaborosolactona 10 (**102**) y la más polar por jaborosolactona 14 (**106**) (11,5 mg).

PROPIEDADES FISICAS DE LOS WITHANOLIDOS AISLADOS

Jaborosolactona 10 (102)

(20R,22R,23S)-5α-cloro–6β,12β,17β,22α-tetrahidroxi-1-oxo-12,23-cicloergosta-2,24-dien-26,23-ólido

Cristales blancos (EtOH); **PF** : 264-265 °C, UV λ_{max}= 226 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3458, 2939, 1738, 1687, 1383, 1261, 1098; **RMN ^{1}H** (500,13 MHz): ver **Tabla 29** , pág 101; **RMN-^{13}C** (125,13 MHz): ver **Tabla 30**, pág. 102; **EMIE** *m/z* (%): 520 (0,04), 484 (0,25), 448 (0,45), 430 (0,45), 412 (0,25), 351 (5), 333 (2), 315 (5), 297 (4), 261 (3),168 (20,5), 152 (30), 135 (9), 107 (11), 97 (10), 43 (100) ; **EMFAB** (glicerol,) *m/z* (%): 521 $[M+H]^+$ (100); **EMAR**: $[M - 2\ H_2O]^+$ 484,2020 ($C_{28}H_{35}O_6Cl$ calculado: 484,2017)

Jaborosolactona 11 (103)

(20R,22R,23S)-5β,6β–epoxi-12β,17β,22α-trihidroxi-1-oxo-12,23-cicloergosta-2,24-dien-26,23-ólido

Sólido amorfo, UV λ_{max}= 225 nm; **IR** (film) ν_{max} (cm^{-1}): 3452, 2926, 1739, 1672, 1452, 1382, 1261, 1137, 1097; **RMN ^{1}H** (200,13 MHz): ver **Tabla 29** , pág 101; **RMN-^{13}C** (50,32 MHz): ver **Tabla 30**, pág. 102; **EMIE** *m/z* (%): 484 (0,6), 412 (0,4), 315 (2), 297 (2,5), 168 (12), 152 (17), 135 (6),107 (10), 97 (9), 43 (100); **EMFAB** (glicerol) *m/z* (%): 485 $[M+H]^+$ (100); **EMAR**: $[M]^+$ 484,2470 ($C_{28}H_{36}O_7$ calculado: 484,2461).

Jaborosolactona 12 (104)

(20R,22R,23S)-5β,6β–epoxi-4β,12β,17β,22α-tetrahidroxi-1-oxo-12,23-cicloergosta-2,24-dien-26,23-ólido

Sólido amorfo, UV (MeOH) λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} en cm^{-1}: 3450, 2928, 1737, 1671, 1460, 1383, 1268, 1146, 1089; **RMN ^{1}H** (500,13 MHz): ver **Tabla 29** , pág 101; **RMN-^{13}C** (125,13 MHz): ver **Tabla 30**, pág. 102; **EMIE** *m/z* (%): 500 (0,4), 331 (4), 315 (2,5), 297 (2,5), 168 (16), 152 (23), 135 (7), 107 (10), 97 (11), 43 (100); **EMFAB** (glicerol,) *m/z* (%): 501 $[M+H]^+$ (20); **EMAR**: $[M]^+$ 500,2419 ($C_{28}H_{36}O_8$ calculado: 500,2410).

Jaborosolactona 13 (105)

(20R,22R,23S)-5α,6β,12β,17β,22α-pentahidroxi-1-oxo-12,23-cicloergosta-2,24-dien-26,23-ólido

Sólido amorfo, UV (MeOH) λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} en cm^{-1}: 3432, 2924, 1734, 1671, 1465, 1380, 1260, 1080; **RMN ^{1}H** (500,13 MHz): ver **Tabla 29** , pág 101; **RMN-^{13}C** (125,13 MHz): ver **Tabla 30**, pág. 102; **EMIE** *m/z* (%): 502 (0,7), 484 (0,6), 334 (10), 316 (4,5), 298 (1), 168 (16), 152 (22), 135 (6), 107 (8), 97 (8), 43 (100); **EMFAB** (glicerol,) *m/z* (%): 503 $[M+H]^+$ (80); **EMAR**: $[M]^+$ 502,2570 ($C_{28}H_{38}O_8$ calculado : 502,2566).

Jaborosolactona 14 (106)

(20R,22R,23S)- 6β,12β,17β,22α-tetrahidroxi-5α-metoxi–1-oxo-12,23-cicloergosta-2,24-dien-26,23-ólido

Cristales blancos (EtOH); **PF** : 269-270 °C, UV (MeOH) λ_{max}= 223 nm; **IR** (film) ν_{max} en cm^{-1}: 3444, 2927, 1724, 1669, 1439, 1377, 1261, 1083; **RMN** ^{1}**H** (500,13 MHz): ver **Tabla 29** , pág 101; **RMN-**^{13}**C** (125,13 MHz): ver **Tabla 30**, pág. 102; **EMIE** *m/z* (%): 516 (0,04), 498 (0,07), 480 (0,20), 348 (6), 331 (3), 315 (5), 168 (7), 152 (0,5), 149 (37), 135 (4,5), 107 (6), 97 (11), 43 (100); **EMFAB** (glicerol,) *m/z* (%): 517 $[M+H]^+$ (100); **EMAR**: $[M-2H_20]^+$ 480,2520 ($C_{29}H_{38}O_7$ calculado : 480,2512).

Jaborosolactona 15 (107)

(20R,22R,23S)- 6β,12β,17β,22α-tetrahidroxi-2α,5α-di*O*–1-oxo-12,23-cicloergosta-3,24-dien-26,23-ólido

Sólido amorfo, UV (MeOH) λ_{max}= 224 nm; **IR** (film) ν_{max} en cm^{-1}: 3476, 2929,1746, 1671, 1448, 1384, 1081; **RMN** ^{1}**H** (500,13 MHz): ver **Tabla 32** , pág 108; **RMN-**^{13}**C** (125,13 MHz): ver **Tabla 33**, pág. 108; **EMIE** *m/z* (%): 516 (0,40), 448 (0,20), 348 (0,6), 331 (1,4), 315 (2,3), 168 (14), 152 (27), 135 (6,5), 107 (10), 97 (9), 43 (100); **EMFAB** (glicerol,) *m/z* (%): 517 $[M+H]^+$ (100); **EMAR**: $[M]^+$ 516,2351 ($C_{29}H_{34}O_8$ calculado : 516,2359).

ACTIVIDAD BIOLOGICA DE WITHANOLIDOS DE *DATURA FEROX*, *JABOROSA RUNCINATA* Y *JABOROSA ODONELLIANA*

Los estudios de acción antialimentaria y repelente de insectos de los withanólidos aislados en esta Tesis, sobre larvas neonatas y adultos de dos especies de insectos : (*Tribolium castaneum* (Coleóptera) y *Musca domestica* (Díptera)), fueron realizados por la Dra Graciela Mareggiani (Facultad de Agronomía, UBA) y el grupo del Dr Eduardo Zerba (CIPEIN-CITEFA) siendo parte de una tesis doctoral los compuestos aislados de *Datura ferox* (Mareggiani, 1999).

Los estudios de actividad quimiopreventiva del cáncer de los withanólidos descriptos fueron realizados por el grupo del Profesor Douglas Kinghorn, en el Departamento de Química Medicinal y Farmacognosia, en la Universidad de Illinois, Chicago.

En ambos estudios de actividad biológica, el compuesto utilizado fue previamente analizado cromatográficamente (CLAR) con la finalidad de constatar su pureza.

Apéndice

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DE RMN ^{13}C DE WITHAFEROXÓLIDO (**22**), WITHANICANDRINA (**10**), JABOROSOLACTONA P (**4**), DATUROLACTONA 1 (**18**) Y DATUROLACTONA 2 (**11**)

C	22	10	4	18	11
1	203,1	202,1	202,8	203,5	202,5
2	128,9	128,8	127,3	128,8	128,9
3	139,8	139,8	144,8	140,1	139,8
4	36,8	36,7	33,3	36,7	36,6
5	73,3	73,2	136,0	73,3	73,2
6	56,2	56,2	124,2	56,1	56,2
7	57,0	56,8	34,0	57,0	57,7
8	36,1	35,7	32,6	36,0	35,6
9	28,7	37,7	40,0	28,6	37,6
10	50,6	51,5	50,0	50,6	51,0
11	30,1	38,4	30,0	29,9	38,3
12	72,5	212,0	82,0	72,3	212,0
13	47,1	57,7	51,2	47,0	57,7
14	43,7	52,9	44,1	43,6	52,8
15	23,1	23,6	23,2	23,0	23,6
16	26,6	27,7	32,1	26,4	27,0
17	42,9	42,8	82,9	42,8	42,5
18	12,0	11,5	12,7	11,5	11,4
19	14,7	14,7	18,2	14,6	14,7
20	39,1	39,5	40,5	38,7	39,5
21	12,4	13,1	11,3	12,3	13,6
22	79,0	76,3	71,0	76,5	76,3
23	29,7	29,1	97,6	28,8	29,1
24	149,2	149,3	157,5	62,7	59,4
25	122,0	121,8	130,7	59,3	57,7
26	167,0	166,9	173,3	170,1	167,0
27	12,5	12,5	9,5	13,6	13,1
28	20,5	20,5	18,7	17,9	17,9

Resumen

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue el aislamiento y elucidación estructural de los withanólidos presentes en las especies *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* y *Jaborosa odonelliana* recolectadas en las provincias de Córdoba, Entre Ríos y Salta respectivamente, utilizando técnicas espectroscópicas combinadas con modelado molecular. Los compuestos mayoritarios de las especies antes mencionadas se evaluaron como antialimentarios de larvas de insectos y como agentes quimiopreventivos del cáncer.

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción al estudio de los withanólidos incluyendo su clasificación general y una breve reseña de las propiedades biológicas de los mismos, poniendo especial énfasis en las propiedades insecticidas, antialimentarias y anticancerígenas de estos compuestos. El capítulo incluye además la descripción de los withanólidos aislados de los géneros *Datura* y *Jaborosa,* a los cuales pertenecen las plantas en estudio, con anterioridad a este trabajo de Tesis. Los withanólidos encontrados en el género *Datura* se agruparon de acuerdo a los grupos funcionales presentes en la molécula, mientras que en el caso del género *Jaborosa*, se los agrupó en base a la especie de la que fueron aisladas.

En el **Capítulo 2** se describe el aislamiento y elucidación estructural de los withanólidos presentes en la especie *Datura ferox* recolectada en la provincia de Córdoba. Dicho extracto se fraccionó mediante dos métodos diferentes. Por el método **I**, se aislaron cuatro withanólidos conocidos: withaferoxólido (**22**), withanólido mayoritario de esta especie, withanicandrina (**10**), withastramonólido (**24**) y withametelina E (**23**), junto a un compuesto de estructura novedosa: 15β-hidroxinicandrina B (**88**). Este último resultó semejante al withaferoxólido (**22**) salvo en las señales correspondientes al anillo D, siendo el segundo withanólido con una funcionalización 15β-hidroxi descripto en Solanáceas. Por el método **II**, se aislaron cinco withanólidos descriptos previamente: withaferoxólido (**22**), withanicandrina (**10**), y las daturolactonas 1 (**18**), 2 (**11**) y 3 (**20**), junto con tres compuestos nuevos de tipo 7-hidroxiwithanólido: daturolactona 5 (**90**), 6 (**91**) y 7 (**92**). Es una característica común a ocho de los compuestos aislados la funcionalización 5α-hidroxi-6α,7α-epoxi típica del género *Datura*. Los compuestos **90** y **91** podrían derivar de la apertura hidrolítica de un 6α,7α-epoxiwithanólido. También se describe en este Capítulo el aislamiento y la elucidación estructural de los withanólidos

presentes en flores de esta especie, habiéndose encontrado withaferoxólido (**22**), daturolactona 1 (**18**), withanicandrina (**10**) y daturolactona 2 (**11**)

En el **Capítulo 3** se describe el aislamiento y elucidación estructural de los withanólidos presentes en *Jaborosa runcinata* recolectada en la provincia de Entre Ríos. Este extracto vegetal estaba constituido principalmente por siete withanólidos novedosos de tipo espiránico: las jaborosolactonas 1 (**94**), 2 (**95**), 3 (**96**), 4 (**97**), 5 (**98**), 6 (**99**) y 9 (**100**). Estos compuestos presentaron un sistema 17(20)-en-22-ceto, funcionalización no encontrada previamente en la familia de los withanólidos, siendo la principal diferencia entre los mismos la sustitución en las posiciones 5 y 6.

En el **Capítulo 4** se describe el aislamiento y elucidación estructural de los withanólidos presentes en *Jaborosa odonelliana* recolectada en la provincia de Salta en abril y diciembre. De ambos extractos se aisló un componente mayoritario, la jaborosolactona P (**4**) previamente descripto en esta especie, junto con seis withanólidos espiránicos novedosos: las jaborosolactonas 10 (**102**), 11 (**103**), 12 (**104**), 13 (**105**), 14 (**105**) y 15 (**106**). Como en el caso de los withanólidos aislados de *Jaborosa runcinata*, la principal diferencia entre los compuestos aislados era la sustitución en los anillos A y B, siendo la cantidad y tipo de withanólidos diferente en ambas épocas de recolección. Esta variación estacional había sido encontrada previamente en otro tipo de Solanáceas, habiéndose relacionado en algunos casos, con mecanismos de defensa química.

En el **Capítulo 5** se analiza la actividad biológica de los withanólidos presentes en forma mayoritaria en las especies *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* y *Jaborosa odonelliana*. Se resumen los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades antialimentarias de estos withanólidos frente a los insectos *Musca domestica* (Diptera) y *Tribolium castaneum* (Coleoptera). El hecho de que el withaferoxólido presentara una actividad semejante a la del salpichrólido A (**12**), frente a larvas de *Tribolium castaneum* y no resultara activo frente a larvas de *Musca domestica*, muestra que la actividad de los withanólidos varía según la especie de insecto. Esta selectividad alienta a la búsqueda de nuevos withanólidos naturales o sintéticos, que podrían representar alternativas para el control selectivo de plagas reduciendo el impacto ambiental de estas prácticas.

También se incluyen en este Capítulo los resultados obtenidos con estos mismos compuestos en ensayos de actividad quimiopreventiva del proceso tumoral. Se obtuvieron

resultados prometedores con jaborosolactona 1 (**94**), withanólido mayoritario de *Jaborosa runcinata* y con jaborosolactona P (**4**), withanólido mayoritario de *Jaborosa odonelliana*, los cuales inducen la acción de la quinona reductasa a bajas concentraciones (bajo CD) y presentan una baja toxicidad (alto CI_{50}).

En el **Capítulo 6** se describe la parte experimental con los detalles del fraccionamiento de cada uno de los extractos vegetales y sus respectivos esquemas separativos; además se presentan los datos numéricos de los espectros que no se incluyen en Tablas y otras propiedades físicas de los compuestos aislados.

En el **Apéndice**, se presentan los espectros de RMN ^{13}C de withaferoxólido (**22**), de withanicandrina (**10**), de jaborosolactona P (**4**), los cuales habían sido descriptos previamente, y de daturolactona 1 (**18**) y daturolactona 2 (**11**), descriptos por primera vez en esta Tesis.

Parte de este trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

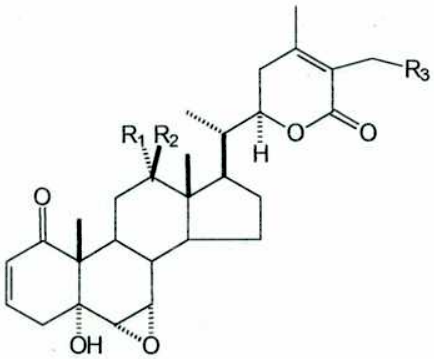
A 15*β*-hydroxywithanolide from *Datura ferox*
Adriana M. Cirigliano; Adriana S. Veleiro; Juan C. Oberti and Gerardo Burton.
Phytochemistry, **40** (2), 611-613 , 1995

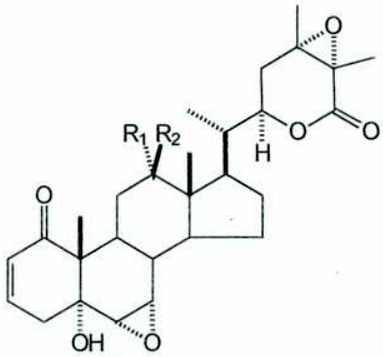
Spiranoid Withanolides from *Jaborosa runcinata* and *Jabororosa araucana*
Adriana M. Cirigliano, Adriana S. Veleiro, Gloria M. Bonetto, Juan C. Oberti and Gerardo Burton.
Journal of Natural Products, **59** (8), 717-721, 1996.

7-hydroxywithanolides from *Datura ferox*
Adriana S. Veleiro, Adriana M. Cirigliano, Juan C. Oberti and Gerardo Burton.
Journal of Natural Products, **62** (7), 1010-1012, 1999 .

Resumen de Estructuras

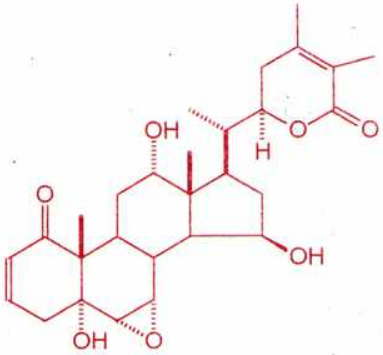
WITHANÓLIDOS AISLADOS DE *DATURA FEROX.*



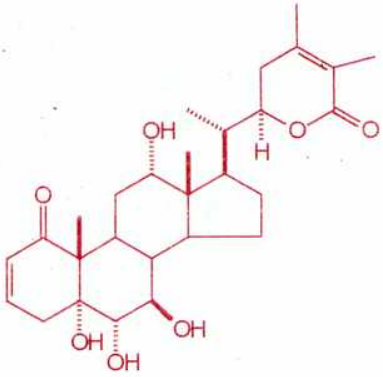


(10) $R_1, R_2 = OH; R_3 = H$
(20) $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H$
(22) $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H$
(23) $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = OH$
(24) $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = OH$

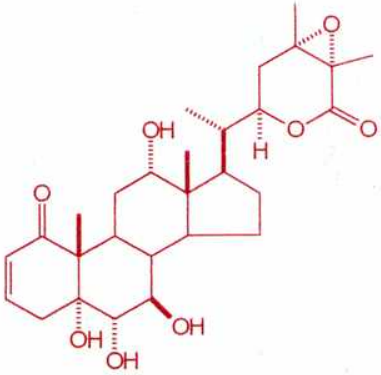
(11) $R_1, R_2 = O$
(18) $R_1 = OH; R_2 = H$



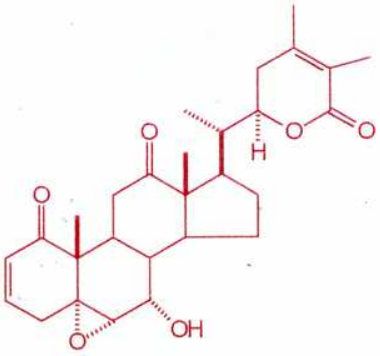
(88)



(90)

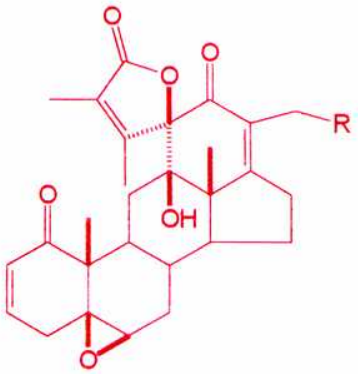


(91)

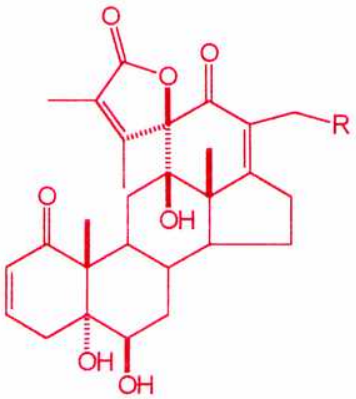


(92)

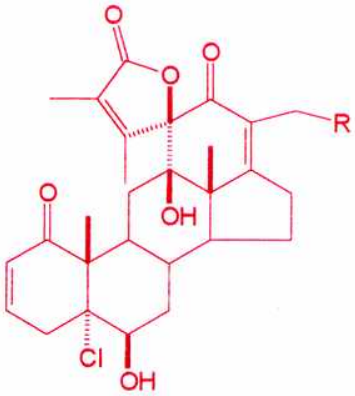
WITHANÓLIDOS AISLADOS DE *JABOROSA RUNCINATA*.



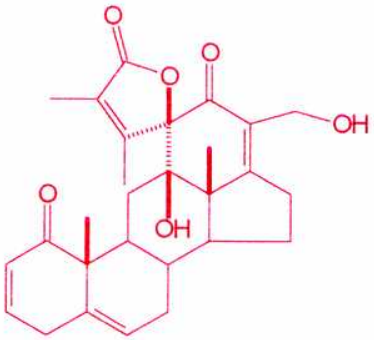
(**94**) R = H
(**97**) R = OH



(**95**) R = H
(**100**) R = OH

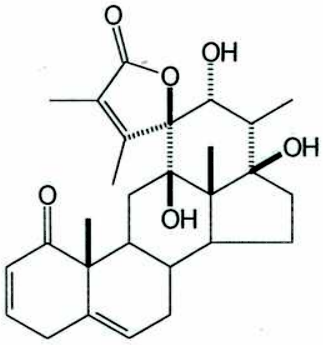


(**96**) R = H
(**99**) R = OH

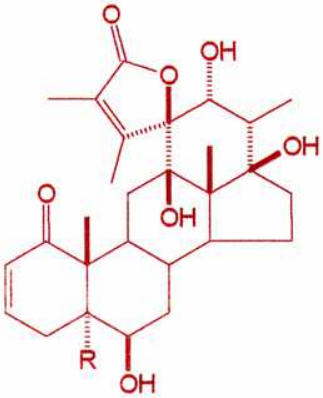


(**98**)

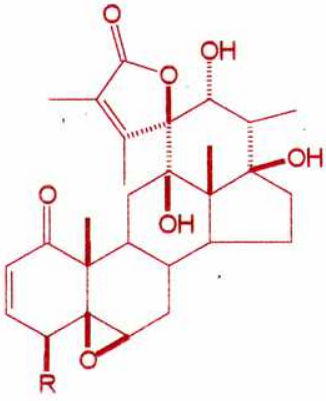
WITHANÓLIDOS AISLADOS DE *JABOROSA ODONELLIANA*.



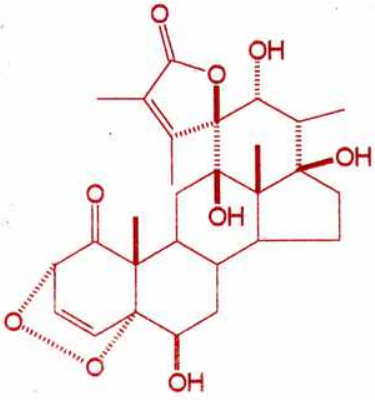
(4)



(102) R = Cl
(105) R = OH
(106) R = OCH_3



(103) R = H
(104) R= OH



(107)

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Abraham, A., Kirson, I., Glotter, E., Lavie, D.; *Phytochemistry*, **7**, 957 (1968).

Ahmad, S. Malik, A., Yasmin, R, Ullah, N., Gul, W., Khan, P. M., Nawaz, H. R., Afza, N.; *Phytochemistry*, **50**, 647 (1999).

Alfonso, D., Bernardinelli, G., Kapetanidis, I.; *Phytochemistry*, **34**, 517 (1993).

Anjaneyulu, A. S. .R., Rao, S. D., Lequerne, P. W.; *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 20 : Structure and Chemistry (part F), 135 (1998).

Anjaneyulu, A. S. R., Murthy, M. V. R. K., Gowry, P. M.; *J. Nat. Prod.*, **63**, 112 (2000).

Antoun, M. D. Abramson, D., Tyson, R. L., Chang, Ching-jer, Mc Lauglhin, J. L., Peck, G., Cassady, J. M.; *Lloydia*, **44**, 579 (1981).

Ascher, K. R. S., Eliyahu, M., Glotter, E., Goldman, A., Kirson, I., Abraham, A., Jacobson, M., Schmutterer, H.; *Phytoparasitica*, **15**, 15 (1987)

Bagchi, A.; Neggi, P., Sahai, M., Ray, A. B., Oshima, Y., Hikino, H.; *Phytochemistry*, **23**, 868 (1984).

Barboza, G. E., Hunziker, A. T.; *Flora Fanerogámica Argentina*, **54** (1998)

Bates, R. B., Eckert, D. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8258 (1972).

Baumann, T. W., Meier, C. M.; *Phytochemistry*, **33**, 317 (1993).

Begley, M. J., Crombie, L., Ham, P.J., Withing, D. A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1972).

Bessalle, R., Lavie, D., Frolow, F.; *Phytochemistry*, **26**, 1797 (1987).

Bessalle, R., Lavie, D.; *Phytochemistry*, **31**, 3648 (1992).

Bonetto, G. M., Gil, R. R., Oberti, J. C., Veleiro, A. S., Burton, G.; *J. Nat. Prod.*, **58**, 705 (1995).

Burton, G., Oberti, J. C.; *Kurtzianna*, **28**, 81 (2000).

Carcamo, C., Fajardo, V., Tojo, E.; *Heterocycles*, **36**, 1771 (1993)

Carney, J. R., Scheuer, P. J., Kelly-Borges, M.; *J. Org. Chem.*, **58**, 3460 (1993).

Chiang, H. C., Jaw, S. M., Chen, C. F., Kan, W. S.; *Anticancer Res.*, **12**, 537 (1992).

Cirigliano, A. M., Veleiro, A. S., Bonetto, G. M., Oberti, J. C., Burton,G; *J. Nat. Prod.*, **59**, 717 (1996).

Cui-Ying Ma, Williams, I. D., Chun-Tao Che; *J. Nat. Prod.*, **62**, 1445 (1999).

Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., Stewart, J. J. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902 (1985).

Dhar, K. L., Raina, M. L.; *Phytochemistry*, **12**, 476 (1973).

Dinan, L., Savchenko, T., Whiting, P., Sarker, S.; *Pesticide Science*, **55**, 331 (1999)

Echeverri, F., Quiñones, W., Torres, F., Cardona, G., Archbold, R., Luis, J. G., Gonzalez, A. G., *Phytochemistry*, **40**, 923 (1995).

Elliger, C. A., Haddon, W. F., Harden, L., Waiss Jr, A. C., Wong, R. Y. ; *J. Nat. Prod.*, **57**, 348 (1994).

Evans,W. C., Grout, R. J., Mensah, N. L. K. *Phytochemistry*, **23**, 1717 (1984).

Fajardo, V., Freyer, A., Minard, R., Shamma, M.; *Tetrahedron*, **43**, 3875 (1987).

Fajardo, V., Podesta, F., Shamma, M., Freyer, A.; *J. Nat. Prod.*, **54**, 554 (1991).

Farboodniay Jahromi, M. A., Manickham, M., Gupta, M., Oshima, Y., Hatakeyama, S., Ray, A. B.; *J. Chem. Research (S)*, 234 (1993).

Fujimoto, Y., Iwadate, H., Ikekawa, N.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2701 (1985).

Gil, R. R, Misico, R. I., Sotes, J. R., Oberti, J. C., Veleiro, A. S., Burton, G.; *J. Nat. Prod.*, **60**, 568 (1997).

Glotter, E., Kirson, I., Lavie, D., Abraham, A.; *Bioorganic Chemistry*, vol. 2, (E.E. Van Tamelen, ed.) Academic Press, New York, 57-95 (1978)

Glotter, E., Sahai, M., Kirson, I.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2241 (1985).

Glotter, E., *Natural Products Reports*, **8**, 415 (1991).

Gonzalez, A. G., Breton, J. L., Trujillo, J.; *Anales de Química*, 107 (1971).

Gonzalez, A. G., Darias, V., Martin Herrera, D. A.; *Fitoterapia*, **53**, 85 (1982).

Gottlieb, H. E., Kirson, I., Glotter, E., Ray, A. B., Sahai, M., Ali, A.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2700 (1980).

Gupta, M., Manickam, M., Bagchi, A., Ray, A. B., *J. Nat. Prod.*, **54**, 599 (1991).

Gupta, M., Manickam, M., Sinha-Bagchi, A., Ray, A. B., *Phytochemistry*, **31**, 2423 (1992).

Habtemariam, S., Gray, A. I., Waterman, P. G.; *Phytochemistry*, **34**, 807 (1993).

Habtemariam, S., Gray, A. I.; *Planta Médica*, **64**, 275 (1998).

Hänsel, R., Tung Huang, J.; *Arch. Pharm.* (Weinheim), **310**, 35 (1977).

Harwood, L. M.; *Aldrichimica Acta*, **18**, 25 (1985).

Hasnoot, C. A. G., M de Leeuw, F. A. A., Altona, C.; *Tettrahedron*, **36**, 2783 (1980).

Hunziker, A. T., Sistemática vegetal, 1984.

Jahromi, M. A. F., Manickam, M., Oshima, Y., Hatakeyama, S., Gupta, M., Ray, A. B., *J. Chem. Res. (S)*, 234 (1993).

Kalla, A. K., Raina, M. L., Dhar, K. L., Qurishi, M. A., Snatzke, G.; *Phytochemistry*, **18**, 637 (1979).

Kapetanidis, P. C., *Pharm. Acta Helv.*, 63, 263 (1988).

Kawai, M., Makino, B., Yamamura, H., Butsugan, Y. *Phytochemistry*, **43**, 661 (1996).

Kennelly, E. J., Gerhäuser, C., Song, L. L., Graham, J. G., Beecher, C. W. W., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D.; *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3771 (1997).

Khan, P. M., Nawaz, H. R., Ahmad,S., Malik, A.; *Helv. Chem. Acta*, **82**, 1423 (1999).

Kirson, I., Lavie, D., Albónico, S. M., Juliani, H. R.; *Tetrahedron*, **26**, 5063 (1970).

Kirson, I., Lavie, D., Subramanian, S. S., Sethi, P. D., Glotter, E.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2109 (1972).

Kirson, I., Cohen, A., Abraham, A; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2136 (1975).

Kirson, I., Abraham, A., Lavie, D.; *Isr. J. Chem.*, **16**, 20 (1977).

Kirson, I., Cohen, A., Greenberg, M., Gottlieb, H. E., Glotter, E., Varenne, P., Abraham, A.; *J. Chem. Res (S)*, **103**, 3926 (1979); *J. Chem. Res (M)*, 1178 (1979).

Ksebati, M. B., Schmitz, F. J.; *J. Org. Chem.*, **53**, 3926 (1988).

Kundu, S., Sinha, S. C., Bagchi, A., Ray, A. B.; *Phytochemistry*, **28**, 1769 (1989).

Kupchan, S.M., Anderson, W. K., Bollinger, P., Doskotch, R. W., Smith, R. M., Saenz Renauld, J. A., Snnoes, H. K., Burlingame, A. L., Smith, D. H.; *J. Org. Chem.*, **34**, 3858 (1987).

Kurup, P. A; *Current Sc. (India)*, **25**, 57 (1956).

Lavie, D., Kirson, I., Abraham, A.; *Isr. J. Chem.*, **14**, 60 (1975)

Lavie, D., Gottlieb, H. E., Pestchanker, M. J., Giordano, O. S.; *Phytochemistry*, **25**, 1765 (1986).

Lavie, D., Besalle, R., Pestchanker, M. J., Gottlieb, H. E., Frolow, F., Giordano, O. S.; *Phytochemistry*, **26**, 1791 (1987).

Lockley, W .J. S., Roberts, D. P., Rees, H. H., Goodwin, T. W.; *Tetrahedron Lett.*, **43**, 3773 (1974).

Luis, J. G., Echeverri, F., Gonzalez, A. G.; *Phytochemistry*, **36**, 1301 (1994a).

Luis, J. G., Echeverri, F., Gonzalez, A. G.; *Phytochemistry*, **36**, 769 (1994b).

Luis, J. G., Echeverri, F., Quiñonez, W., Gonzalez, A. G.; *Tetrahedron*, **54**, 1217 (1994c).

Mahmood, T., Ahmad, S. S., Siddiqui, S., *Heterocycles*, **27**, 101 (1988).

Makino, B., Kawai, M., Iwata, Y., Yamamura, H., Butsugan, Y., Ogawa, K., Hayashi, M.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 219 (1995).

Makino, B., Kawai, Ogura, Y., Nakanishi, M., Yamamura, H., Butsugan, Y.; *J. Nat. Prod.*, **58**, 1668 (1995).

Manickam, M., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Gupta, M., Ray, A. B., *Phytochemistry*, **34**, 868 (1993).

Manickam, M., Awasthi, S. B., Oshima, Y., Hisamichi, K., Takeshita, M. Sahai, M., Ray, A. B., *J. Chem. Research (S)*, 306 (1994-a).

Manickam, M., Kumar, S., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Ray, A. B., *J. Indian Chem. Soc.*, **71**, 393(1994-b).

Manickam, M., Awasthi, S. B., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Ray, A .B., *Phytochemistry*, **41**, 981 (1996a).

Manickam, M., Ray, A. B.; *Indian J. Chem.., Sect.* B, **35**, 1311 (1996b).

Manickam, M., Srivasta, A., Ray, A. B.; *Phytochemistry*, **47**, 1427 (1998).

Mareggiani, G., Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (1999)

Mareggiani, G., Picollo, M. I., Zerba, E., Burton, G, Tettamanzi, M. C., Benedetti-Doctorovich, V., Veleiro, A. S.; *J. Nat. Prod.*, **63**, 1113 (2000)

Mareggiani, G., Bado, S., Picollo, M. I., Zerba, E.; *Revista Asociación Toxicológica Argentina*, **8**, en prensa (2001)

Misico, R . I. , Oberti, J. C., Veleiro, A. S., Burton, G.; *J. Nat. Prod..*, **59**, 66 (1996).

Misico, R . I.., Veleiro, A. S., Burton, G, Oberti, J. C..; *Phytochemistry.*, **45**, 1045 (1997).

Misico, R.. I., Gil, R. R., Oberti, J. C., Veleiro, A. S., Burton, G.; *J. Nat. Prod.*, **63**, 1329 (2000).

Monteagudo, E. S., Burton, G., Gonzalez, C. M., Oberti, J. C., Gros, E. G.; *Phytochemistry*, **27**, 3925 (1988).

Monteagudo, E. S, Burton, G., Gros, E. G., Gonzalez, C. M., Oberti, J. C.; *Phytochemistry*, **28**, 2514 (1989).

Monteagudo, E. S, Oberti, J. C., Gros, E. G., Burton, G.; *Phytochemistry*, **29**, 933 (1990).

Monteagudo, E. S., Burton, G., Gros, E. G.; *Phytochemistry*, **35**, 927 (1994).

Nalbandov, D., Yamamoto, R. T., Fraenkel, G. S.; *J. Agric. Food. Chem.*, **12**, 55 (1964).

Nawaz, H. R., Malik, A., Khan, P. M., Ahmed, S.; *Phytochemistry*, **52**, 1361 (1999).

Nawaz, H. R., Malik, A., Muhammad, P., Ahmed, S., Riaz, M.; *Z. Naturforsch*, **55b**, 100 (2000).

Nittala,S. S., Lavie, D.; *Phytochemistry*, **20**, 2741 (1981).

Parvez, M., Fajardo, V., Shamma, M.; *Acta Cryst.*, 44, 553 (1988).

Pezzuto, J. M. *Recent Advances in Phytochemistry*, **vol. 29**, 19 (1995).

Pezzuto, J. M., Song, L. L., Lee, S. K., Shamon, L. A., Mata- Greenwood, E., Jang, M., Jeong, H-J, Pisha, E., Mehta, R., Kinghorn, D.; *Current Biol. Proc.*, (1999)

Qurishi, M. A., Dhar, K. L, Atal, C. K.; *Phytochemistry*, **18**, 253 (1979-a).

Qurishi, M. A., Kalla, A. K., Dhar, K. L.; *Phytochemistry*, **18**, 1756 (1979-b).

Raffaut, R. F., Shemluck, M. J., Le quesne, P. W; *J. Nat. Prod.*, **54**, 1601 (1991).

Rahman, Atta-ur., Shabir, M., Yousaf, M., Qureshi, S., Dur e-Shahwar, Naz, A., Iqbal Choudary, M.; *Phytochemistry*, **52**, 1361 (1999)

Ray, A. B., Gupta, M.; *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **63**, 1 (1994).

Ray, A. B.; *J. Indian Chem. Soc.*, **75**, 672 (1998).

Sharma, H., Dandiya, P. C.; *Indian Drugs*, **29**, 247 (1992).

Shingu, K., Kajimoto, T., Furusawa, Y., Nohara, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4359 (1987).

Shingu, K., Furusawa, Y., Nohara, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2132 (1989).

Shingu, K., Marubayashi, N., Ueda, I., Yahara, S., Nohara, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1107 (1990).

Shingu, K., Miyagawa, N., Yahara, S., Nohara, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1873 (1993).

Shingu, K., Yahara, S., Nohara, T.; *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 318 (1994).

Siddiqui, S., Salman, S., Mahood, T.; *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **30**, 567 (1987)

Silva, G. L., Pacciaroni, A., Oberti, J. C., Veleiro, A. S., Burton, G.; *Phytochemistry*, **34**, 871 (1993).

Silva, G. L., Burton, G. , Oberti, J. C.; *J. Nat. Prod.*, **62**, 949 (1999)

Sinha, S. C., Kundu, S.., Mauria, R., Ray, A. B., Oshima, Y., Hikino, H.; *Tetrahedron*, **45** (1989).

Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D.L.; Smith, J. M.; *Fed. Proc.*, **35**, 1332 (1976)

Srivastava, C., Manickam, M., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Gupta, M., Ray, A. B., *Nat. Prod. Sci.*, **2**, 9 (1996).

Srivastava, C., Siddiqui, I. R., Singh, J., Tiwari, H. P., *J. Indian Chem. Soc.*, **69**, 111 (1992).

Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A.; *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978).

Tettamanzi, M. C., Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G.; *Phytochemistry.*, **43**, 461(1996).

Tettamanzi, M. C., Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G.; *J. Nat. Prod.*, **61**, 338 (1998).

Tettamanzi, M. C., Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (2000).

Tomassini, T. C. B., Barbi, N. S., Ribeiro, I. M., Xavier, D. C. D.; *Quimica Nova*, **23**, 47 (2000).

Tschesche, R., Schawng, H., Legler, G.; *Tetrahedron*, **22**, 1121 (1966).

Tschesche, R., Baumgarth, M., Welzel, P.; *Tetrahedron*, **24**, 5169 (1968).

Tschesche, R., Annen, K., Welzel, P.; *Tetrahedron*, **28**, 1909 (1972).

Tursunova, R. N., Masslennikova, V. A., Abubakirov, N. K.,; *Khim. Prir. Soedin.*, 91 (1978)

Usubillaga, A., De Castellano, G., Khouri, N., Zabel, V., Watson, W. H., *An. Quim.*, **88**, 707 (1992).

Vande Velde, V., Lavie, D.; *Phytochemistry*, **20**, 1359 (1981)

Veleiro, A. S., Burton, G. , Gros, E. G..; *Phytochemistry*, **24**, 2573 (1985)

Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G.; *Phytochemistry*, **31**, 935 (1992a).

Veleiro, A. S, Trocca, C. E., Burton, G. , Oberti, J. C.; *Phytochemistry*, **31**, 2550 (1992b).

Waiss Jr, A. C., Elliger, C. A., Haddon, W. F.; Benson, M.; *J. Nat. Prod.*, **56**, 1365 (1993)

Yamamoto, R. T., Fraenkel, G. S.; *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **53**, 503 (1960).

Yarden, A., Lavie, D.; *J. Chem. Soc. (C)*, 2595 (1962).

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., Posner, G. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2399 (1992).

Zilm, K. W., Grant, D. M.; *J. Magn. Reson.*, **48**, 524 (1982)