



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
DE LA ESPECIE VEGETAL *Diospyros xolocotzii* (EBENACEAE)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. LADY OLIVIA PÉREZ VALERA

DR. E. GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Actividades académicas

Los resultados obtenidos de este trabajo fueron presentados en las siguientes actividades académicas.

Actividad académica	Lugar y fecha	Modalidad	Trabajo
14ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales	Cuernavaca, Morelos, México 23-26 mayo 2018	Cartel	Constituyentes químicos de la especie vegetal <i>Diospyros xolocotz</i> (Ebenaceae)
Simposio Interno del Instituto de Química, UNAM.	Ciudad de México. 13-15 junio 2018	Cartel	Constituyentes químicos de la especie vegetal <i>Diospyros xolocotz</i> (Ebenaceae)

Jurado

Presidente. Dr, Leovigildo Quijano

Vocal. Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents

Vocal. M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Vocal. Dr. Martín Torres Valencia

Secretario. Dr. Fausto Rivero Cruz

Éste trabajo se realizó en el laboratorio 1-C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Q.A. Lady Olivia Pérez Valera

Sustentante

Dr. Guillermo Delgado Lamas

Tutor

Agradecimientos

Al CONACyT (becario 771691) y DGAPA UNAM (PAPIIT-IG200318).

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM.

Al Instituto de Química, UNAM.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por su apoyo y paciencia en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Francisco J. Espinosa-García (Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM, Campus Morelia) y al Dr. Santiago Arizaga (Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Campus Morelia) por la colecta e identificación del material vegetal.

A los miembros del jurado: Dr. Leovigildo Quijano, Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents, M. en C. Emma Maldonado Jiménez, Dr. Jesús Martín Torres Valencia y Dr. José Fausto Rivero Cruz.

A los miembros del personal técnico académico del Instituto de Química de la UNAM. M. en C. Elizabeth Huerta Salazar del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear; a la Dra. Ma. del Carmen García González y al Dr. Javier Pérez Flores, del laboratorio de espectrometría de masas, y al M. en C. Antonio Nieto Camacho, del laboratorio de pruebas biológicas.

A mis compañeros del laboratorio 1-C: Fabiola López, José Luis Ávila, Luann Martínez, Yesica Cruz, Isabel Silva, Luis Romero y Adriana Neira.

A Rocío Aguilar por su ayuda y consejos.

Dedicatoria

A mi familia por apoyarme en hacer realidad mis sueños.

.

Contenido

1. Introducción	1
2. Justificación	2
3. Antecedentes	3
3.1 Familia Ebenaceae	4
3.2 Género <i>Diospyros</i>	4
3.3 <i>Diospyros xolocotzii</i>	9
3.4 Generalidades acerca de los triterpenos	10
4. Hipótesis y objetivos	14
4.1 Hipótesis	14
4.2 Objetivo general	14
4.3 Objetivos específicos	14
5. Resultados y discusión	15
5.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados	15
5.2 Resultados de actividad anti-nociceptiva	24
6. Conclusiones	27
7. Parte experimental	28
7.1 Material vegetal	28
7.2 Materiales y equipos	28
7.3 Extracción y aislamiento	29
7.4 Características físicas y datos espectroscópicos de los compuestos aislados	31
7.5 Prueba biológica	39
8. Anexos	41
8.1 Espectros	41
Espectro 1. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃). Hexadecanoato de α -amirina (25)	42
Espectro 2. RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃). Hexadecanoato de α -amirina (25)	43
Espectro 3. EMIE 70 eV. Hexadecanoato de α -amirina (25)	44
Espectro 4. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃). α -amirina (10), β -amirina (9) y bauerenol (12)	45
Espectro 5. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃). α -amirina (10), β -amirina (9) y bauerenol (12)	46
Espectro 6. EMIE 70 eV. α -amirina (10)	47
Espectro 7. EMIE 70 eV. β -amirina (9)	48
Espectro 8. EMIE 70 eV. Bauerenol (12)	49
Espectro 9 RMN ¹ H. (400 MHz, CDCl ₃). β -sitosterol (26) y estigmasterol (27)	50

Espectro 10. RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃). β-sitosterol (26) y estigmasterol (27).	51
Espectro 11. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃). Uvaol (28).....	52
Espectro 12. RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃). Uvaol (28).	53
Espectro 13. EMIE 70 eV. Uvaol (28).....	54
Espectro 14. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃). Ácido betulínico (8).	55
Espectro 15. RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃). Ácido betulínico (8).	56
Espectro 16. EMIE 70 eV. Ácido betulínico (8).	57
Espectro 17. RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆). Ácido ursólico (6).	58
Espectro 18. RMN ¹ H (100 MHz, DMSO-d ₆). Ácido ursólico (6).	59
Espectro 19. EMIE 70 eV. Ácido ursólico (6).	60
Espectro 20. RMN ¹ H. (400 MHz, C ₅ D ₅ N). β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (29).....	61
Espectro 21. RMN ¹³ C. (100 MHz, C ₅ D ₅ N). β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (29).....	62
9. Referencias.....	63

Abreviaturas y acrónimos

AcOEt	Acetato de etilo
μm	Micrómetros
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CPP	Cromatografía con presión positiva
d	Señal doble
d a	Señal doble ancha
dd	Señal doble de doble
dt	Señal doble de triple
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	Electrón-Volt
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
nm	Nanómetros
Pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Singulete
s a	Singulete ancho
t	Señal triple
δ_{H}	Desplazamiento químico de protón
δ_{C}	Desplazamiento químico de carbono
λ	Longitud de onda

1. Introducción

Se ha informado que en el mundo existen aproximadamente 450,000 especies de plantas, y se estima que aún existe entre un 10 y 20% de especies vegetales de las que no se tiene registro, debido a que presumiblemente se encuentran en regiones de gran biodiversidad poco exploradas, ubicadas en países como México, Ecuador, Paraguay, Colombia, Sudáfrica, y Australia, entre otros [1]. Por lo tanto, un primer desafío referente al estudio de la vegetación es aumentar los esfuerzos de exploración para hallar nuevas especies de plantas, y el segundo, es estudiarlas no sólo a nivel taxonómico y ecológico, sino químico, ya que los metabolitos secundarios presentes en ellas constituyen herramientas que permiten investigar las interacciones ecológicas que existen en la naturaleza, lo cual es necesario para la conservación y aprovechamiento racional de la biodiversidad. Por ejemplo, recientemente se han identificado molecularmente los compuestos volátiles de la planta carnívora *Nepenthes rafflesiana*, encontrándose que emula el contenido de otras especies vegetales para lograr atraer a ciertos insectos, y así lograr su supervivencia [2].

Es reconocido que el conocimiento sobre la estructura molecular y las actividades biológicas de los productos naturales son de interés en diversos ámbitos. Por ejemplo, ciertos metabolitos secundarios aislados del género *Diospyros*, como triterpenos y naftoquinonas poseen propiedades antivirales, antifúngicas y antimicrobianas [3]. Por lo que la búsqueda de nuevas sustancias de interés farmacológico, agroalimentario y ecológico es una línea de investigación muy amplia, particularmente para los países poseedores de biodiversidad.

En relación con ciertos padecimientos humanos y de acuerdo con investigaciones epidemiológicas recientes, se ha registrado que existe un incremento en el dolor crónico [4], por lo que existe la necesidad de buscar sustancias con actividad analgésica, ya que la mayoría de los fármacos empleados tienen la desventaja de tener efectos secundarios. Ejemplo de ello es el uso de opioides como terapia de larga duración para el tratamiento del dolor crónico, los cuales no son tan efectivos ni tan seguros como se estimó inicialmente [5].

2. Justificación

Diospyros xolocotzii (Ebenaceae) es una especie vegetal endémica de México, la cual no ha sido estudiada químicamente. Cuando se describió por Madrigal Sánchez y Rzedowski en 1985 [6], la observación inicial fue el número limitado de individuos que conformaban a la población encontrada en el estado de Michoacán, únicamente veinte individuos. En 2014 el grupo de trabajo del Dr. Santiago Arizaga encontró tres nuevas poblaciones en el estado de Guanajuato, pero considerando el número de individuos de este vegetal, se cataloga como una especie amenazada [7].

Así, una de las justificaciones para llevar a cabo este estudio, es generar conocimiento científico sobre el contenido metabólico de la especie y contextualizarlo con el conocimiento de las especies del género ya analizadas químicamente, ya que algunas son empleadas con fines alimentarios, ornamentales, cosmetológicos y medicinales, entre otros. Adicionalmente, a partir de observaciones ecológicas realizadas por colegas botánicos (comunicación personal con el Dr. Francisco J. Espinosa-García, del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM), *D. xolocotzii* presenta cierta resistencia al ataque de algunos insectos, por lo que sus metabolitos secundarios pueden estar asociados a dicha actividad. A partir de las muestras aisladas disponibles, y con el objetivo de generar conocimiento sobre las propiedades biológicas del extracto y de las sustancias aisladas, en este trabajo se consideró pertinente la realización de bioevaluaciones en un modelo de anti-nocicepción, ya que hay evidencia del uso de especies del género *Diospyros* como *D. marítima* o *D. lotus* con fines analgésicos [8, 9].

3. Antecedentes



Diospyros xolocotzii.

Foto tomada de <http://ecojardinunam.wordpress.com/zapoteprieto>

3.1 Familia Ebenaceae

La familia Ebenaceae se encuentra distribuida en regiones tropicales de Asia, África, Australia y América, y se vincula estrechamente con las familias Sapotaceae y Styracaceae [10]. Las ebenáceas se dividen en dos subfamilias, la primera es la Lissocarpoideae que involucra al género *Lisocarpa* con 9 especies y la segunda es la Ebenoideae la cual incluye a los géneros *Euclea*, *Royena* y *Diospyros*, con aproximadamente 500-600 especies [11], siendo este último el más representativo.

3.2 Género *Diospyros*

3.2.1 Generalidades

El género *Diospyros* está conformado por alrededor de 500 especies de las cuales 120 se encuentran en América y 20 en México. Su distribución se extiende por las costas del océano Pacífico, el Golfo de México y el Eje Volcánico [12].

Dentro de dicho género destaca la presencia de especies de alto valor comercial y agrícola como es el caso de *D. ebenum*, reconocida por la explotación de su madera (ébano) o *D. kaki*, cuyo fruto posee un alto contenido de minerales como zinc, calcio, potasio, hierro y magnesio [13]. El uso empírico de especies de este grupo de plantas se encuentra bien documentado en la medicina tradicional china. Por ejemplo, el té de hojas de *D. kaki* ha sido consumido por siglos y está asociado con la disminución de presión arterial y colesterol, y la decocción de las hojas ha sido empleada con fines cosméticos [14]. En este rubro también destaca *D. lotus*, la cual es reconocida como materia prima para preparaciones con propiedades antiinflamatorias, sedantes y anti-nociceptivas [9].

Las semillas de *D. mespiliformis* son fuente de carbohidratos solubles y un alto porcentaje de ácido linolénico, que puede contribuir a la síntesis de eicosanoides en el cuerpo humano, los cuales se conocen por participar en procesos gastrointestinales, renales y cardiovasculares [15].

En el caso de México las especies de *Diospyros* que destacan son *D. digyna* (Fig. 1) o zapote negro que es la más ampliamente distribuida en nuestro país, sobre todo en las

regiones cálidas que comprenden los estados de Jalisco a Chiapas, Veracruz y Yucatán [16]. Es una especie de importancia agronómica y alimentaria por su fruto comestible [17] y su uso empírico en el tratamiento de erupciones en la piel, tiña y lepra se documenta en la *Real Expedición Botánica a Nueva España* realizada a finales del siglo XVIII [18].



Fig. 1. Ilustración de *D. digyna* o tlietzapotl de la Real Expedición Botánica a Nueva España.
Imagen tomada de la Real Expedición a Nueva España [8]

Otro ejemplo es *D. anisandra*, que en la medicina tradicional Maya es usada de manera tópica para aliviar enfermedades de la piel [19].

Desde el punto de vista ecológico, se ha registrado la interacción de diferentes especies de *Diospyros* con el insecto *Hypocala andremona*, que de acuerdo con informes experimentales interactúa de diferente forma con distintas especies. Por ejemplo, la larva tiene mayor predilección por alimentarse del follaje de *D. digyna*, mientras que al evaluar especies como *D. montana* y *D. mespiliformis* el porcentaje de sobrevivencia del insecto fue del 0%, mientras que en *D. digyna* fue del 64% [20].

3.2.2 Constituyentes químicos del género *Diospyros*

De acuerdo con una revisión de este grupo florístico [21], uno de los primeros estudios sobre los constituyentes químicos data de 1929, donde se reportó el aislamiento de *d*-manitol a partir del fruto de *D. kaki* y en 1952 se informó que 2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona o plumbagina, procedente *D. hebecarpa*, es un compuesto bioactivo.

Cabe mencionar que en el género *Diospyros* los triterpenos se encuentran ampliamente distribuidos en más del 90% de las especies y son encontrados en las hojas y la corteza. La mayoría de los triterpenos aislados a partir de este grupo vegetal tienen esqueletos pentacíclicos de lupano (1), ursano (2), oleanano (3), taraxerano (4) y friedelano (5) (Fig. 2).

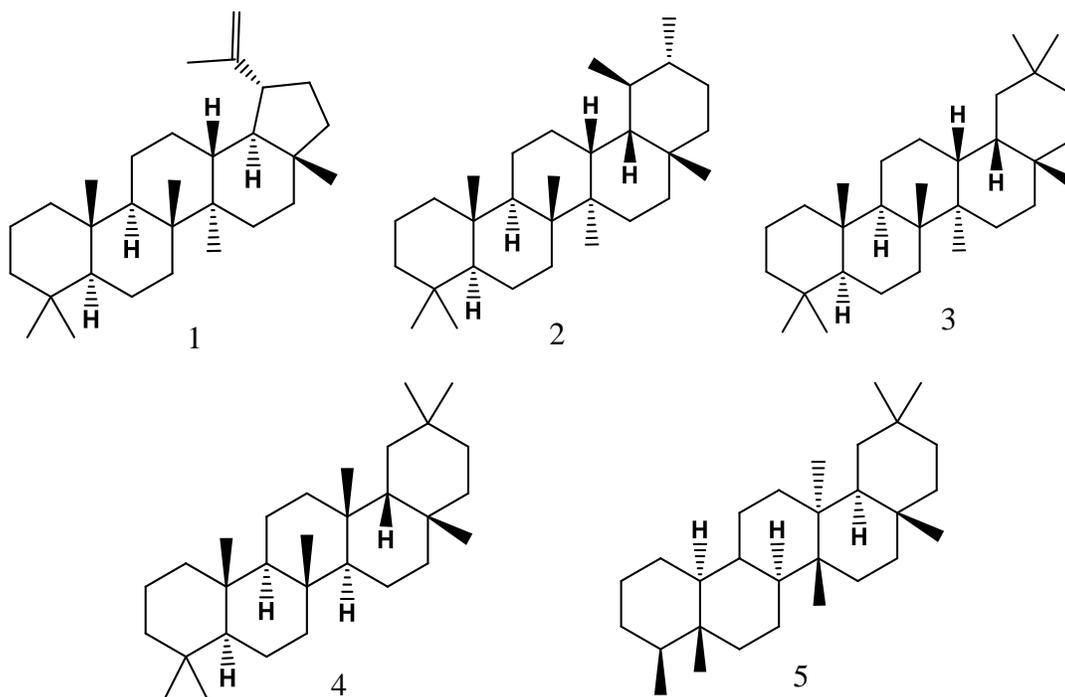


Fig. 2. Esqueletos de triterpenos pentacíclicos recurrentes en el género *Diospyros*.

Con el aislamiento y caracterización de los ácidos ursólico (6), oleanólico (7) y betulínico (8) a partir del caqui japonés en 1955 dio inicio el estudio de triterpenos en el género *Diospyros* (Fig. 3), también se han hallado β -amirina (9), α -amirina (10), betulina

(11), bauerenol (12), 3 β -acetoxi-urs-11-en-28,13-ólida (13) y ácido morólico (14), por mencionar algunos (Fig. 3).

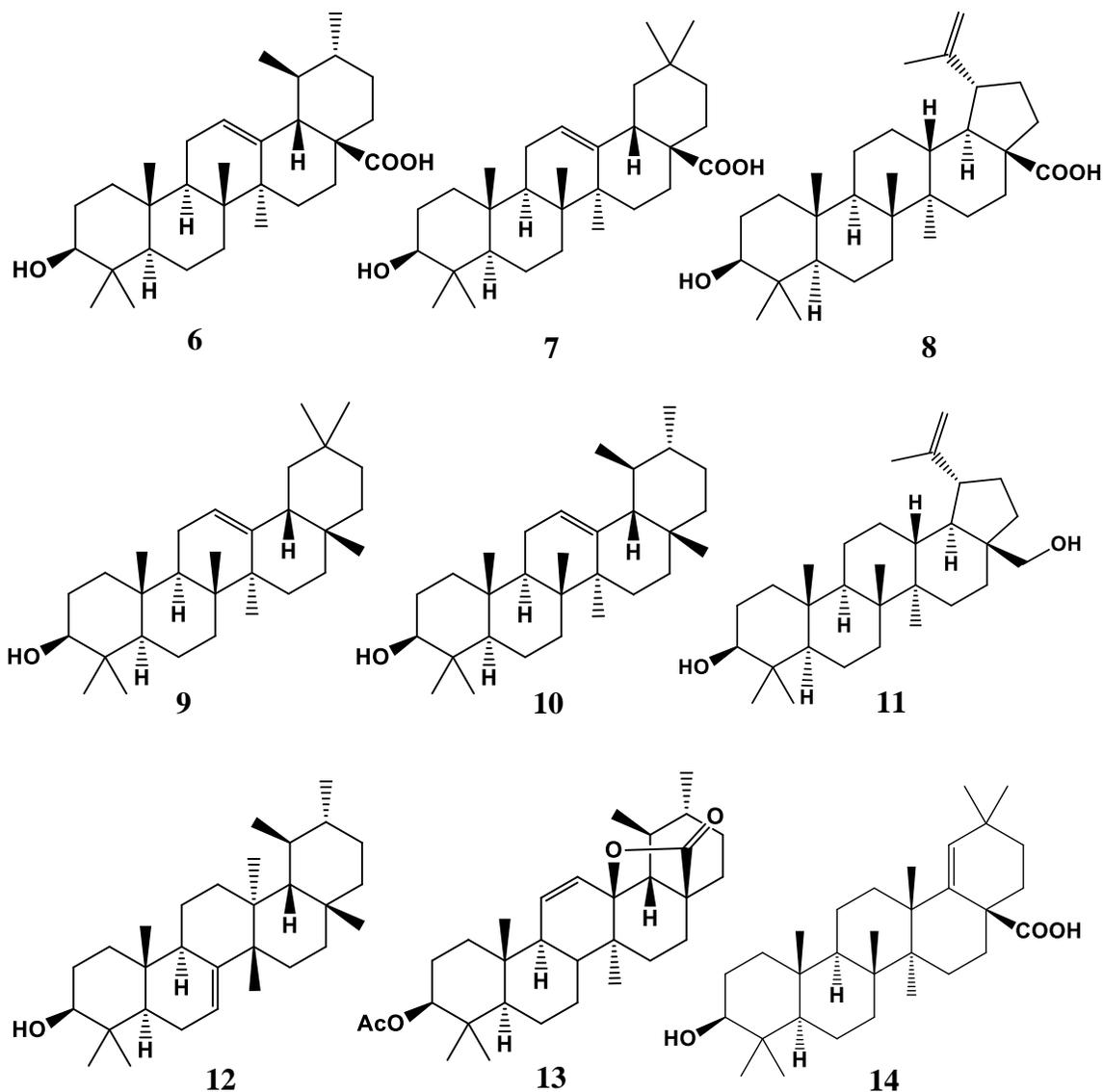


Fig. 3. Algunos triterpenos pentacíclicos aislados de especies del género *Diospyros*.

Además de triterpenos pentacíclicos, las naftoquinonas son metabolitos secundarios que se han aislado a partir de algunas especies de *Diospyros* [22, 23], como plumbagina (15), ismailina (16), canaliculatina (17) y gerberinol (18). En especies como *D. kaki* se han aislado

3.3 *Diospyros xolocotzii*

Diospyros xolocotzii (Fig. 5), conocido como zapote prieto o aguacatillo, es un zapote silvestre de fruto comestible endémico de México y localizado en los estados de Michoacán y Guanajuato. De acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010 es una especie catalogada en peligro de extinción, esto se debe al crecimiento de la población de sus alrededores que demanda tierras de cultivo. Se descubrió en el estado de Michoacán, registrándose inicialmente una población de 20 árboles en 1985, y posteriormente una población más abundante en 2014. Su hábitat se caracteriza como matorral subtropical de suelo arcilloso. Recibe su nombre en honor al botánico mexicano Efraím Hernández Xolocotzi (1913-1991). No se tiene registro de su uso en la medicina tradicional [6, 7].



Fig. 5. *Diospyros xolocotzii* (zapote prieto).

[Imagen tomada de <http://ecojardinunam.wordpress.com/zapoteprieto>]

La descripción botánica realizada por Madrigal-Sánchez y Rzedowski en 1988 corresponde a un árbol caducifolio de 4-7 m de altura, corteza de color gris oscuro, fruto subgloboso de 3.0-4.5 cm de largo por 2.5-3.5 cm de ancho de color castaño oscuro y en la madurez de color negro, y de sabor dulce. Las hojas son de forma obovada de 2-3.5 cm de longitud de color verde opaco [6]. Es importante resaltar que la especie *D. xolocotzii* (zapote prieto) es distinta al zapote negro, *D. digyna* [sin. *D. nigra*].

3.4 Generalidades acerca de los triterpenos

Los triterpenos son un grupo diverso de metabolitos secundarios presentes principalmente en las plantas superiores, constituidos de 30 átomos de carbono, se dividen en compuestos de cadena abierta, tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos [26].

Biogénicamente derivan del escualeno, un triterpeno de cadena lineal de gran importancia ya que mediante la intervención de diferentes enzimas triterpen-sintasas es el precursor de otros triterpenos [27] generando alrededor de 200 esqueletos diferentes [28].

En el esquema de la figura 6a se muestra un ejemplo de biosíntesis de triterpenos a partir de escualeno [A] el cual por acción de la enzima epoxidasa del escualeno, una flavoproteína que requiere O_2 y el cofactor NADPH da lugar al intermediario (3*S*)-2,3-óxido de escualeno [B] que adquiere una conformación silla-silla-silla-bote y cuya ciclación inicia mediante la adición electrofílica de un protón que promueve la ruptura del epóxido y genera un carbocatión terciario [C] desencadenando una reacción en cadena que promueve la ciclación de [C] dando lugar a la formación del catión damarenilo [D]. Mediante una transposición de Wagner-Meerwein se expande el anillo D por migración del carbono 16 y formar el catión bacarenilo [E]. La ciclación de este por la cara β da lugar al catión lupeilo [F] (Fig. 6b) a partir del cual se puede derivar el triterpeno lupeol (**24**) mediante la eliminación de un H^+ en C-29 y una posterior oxidación en C-28, para obtener ácido betulínico (**8**). Por otro lado la estabilización del catión [F] puede darse por migración de C-21 y expansión del anillo E y formar el catión oleanilo [I]. La migración del $-CH_3-20\alpha$ a $C-19\alpha$ genera el catión 20-taraxasterilo [J] que por una serie de transposiciones 1,2 de hidruro y un cambio conformacional forma el catión α -amirilo [L] el cual se estabiliza por eliminación del protón en la posición 12α , generando el triterpeno α -amirina (**10**). De manera similar, a partir del catión oleanilo [I] se genera la β -amirina (**9**).

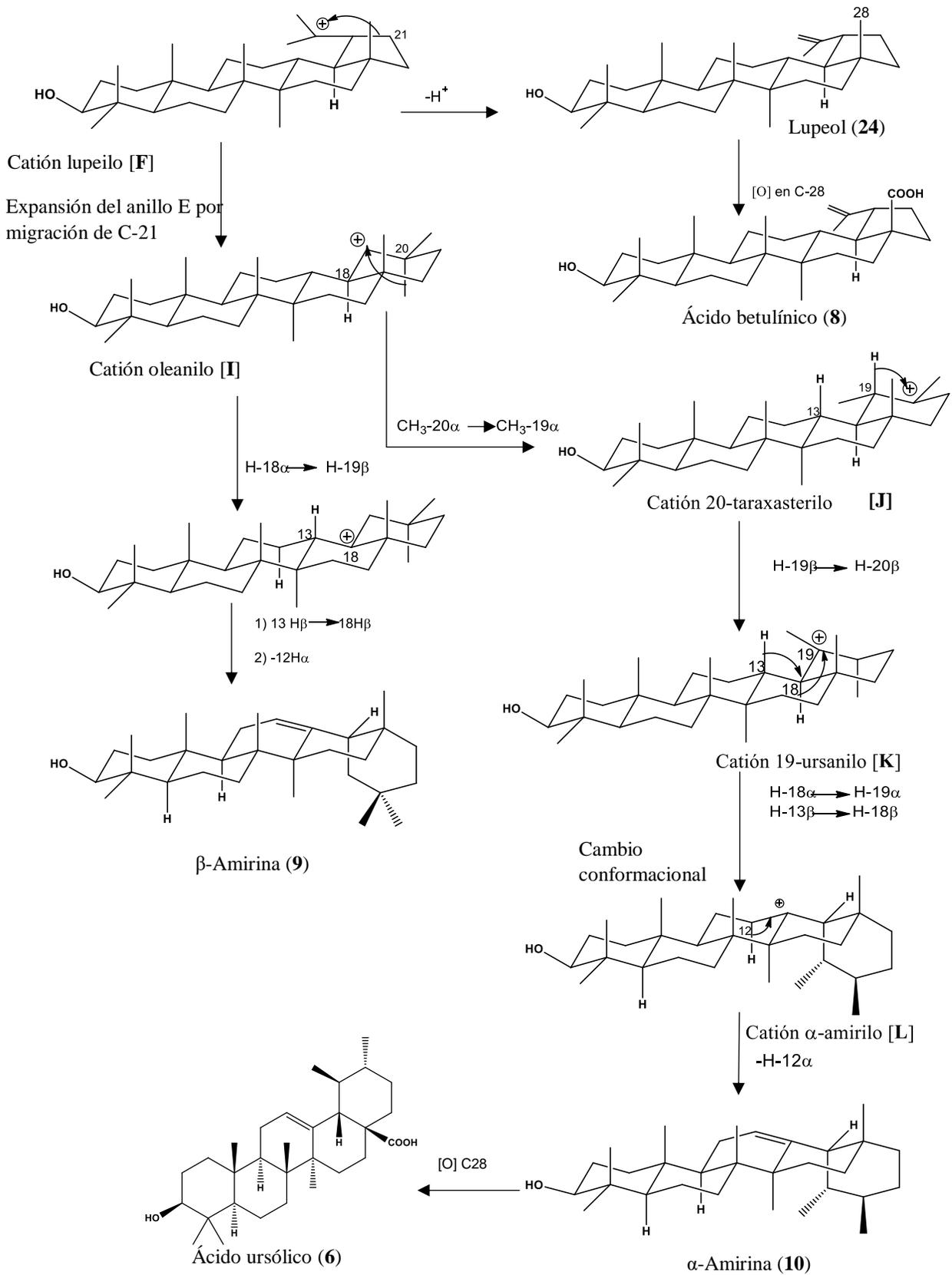


Fig. 6b. Esquema biosintético de triterpenos.

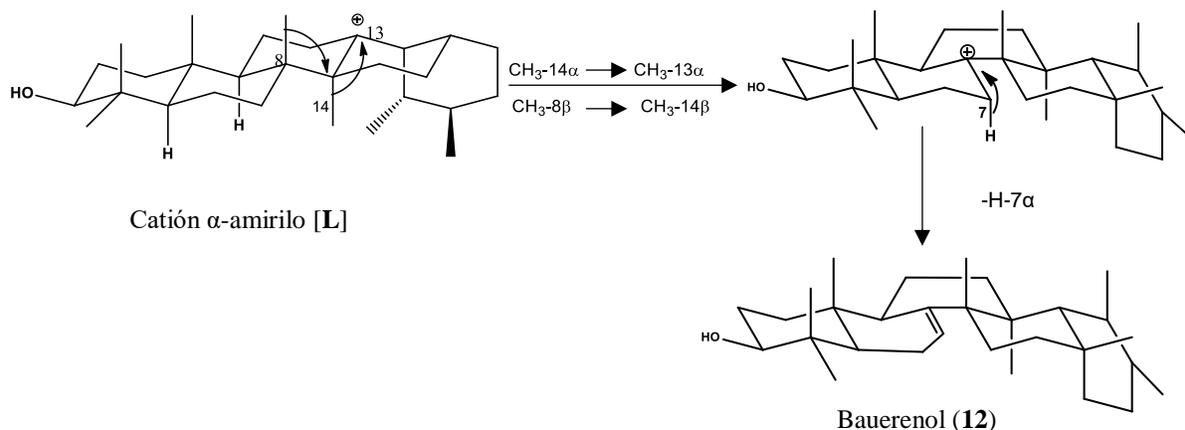


Fig. 6c. Esquema biosintético de triterpenos.

A partir del catión α -amirilo [L], mediante transposiciones 1,2 del metilo, $\text{CH}_3\text{-}14\alpha$ a $\text{CH}_3\text{-}13\alpha$ y $\text{CH}_3\text{-}8\beta$ a $\text{CH}_3\text{-}14\beta$, un cambio en la conformación en el anillo C y la estabilización del catión C-8 por eliminación de $7\text{-H}\alpha$ se genera al bauerenol (**12**) (Fig. 6c) [27, 28].

En lo que respecta a las actividades biológicas de los triterpenos, existen algunos que han sido ampliamente estudiados, como el ácido ursólico (**6**), conocido por su actividad citotóxica frente a células tumorales de cáncer de próstata [29] o su actividad ansiolítica [30]; el ácido betulínico (**8**) es conocido por su citotoxicidad frente a diferentes tipos de células tumorales y agentes infecciosos [31]; β -amirina (**9**) promueve la angiogénesis endotelial celular, además de tener otras actividades como antiinflamatoria, citotóxica y analgésica [32], por mencionar algunos ejemplos.

En relación con su papel ecológico, se ha determinado que algunos de ellos son capaces de actuar frente a ciertos insectos como inhibidores de la ingesta, como el caso de uvaol (**28**) o ácido betulínico (**6**), que actúan sobre *Spodoptera littoralis* y *S. frugiperda*, respectivamente [33].

4. Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

Considerando la información generada en estudios químico-biológicos previos de especies pertenecientes al género *Diospyros*, el análisis de la composición química del extracto orgánico de las hojas de *D. xolocotzii* (Ebenaceae), permitirá el aislamiento de compuestos estructuralmente similares a los encontrados en otras especies de este grupo, que eventualmente puedan presentar actividad analgésica.

4.2 Objetivo general

- Generar conocimiento científico referente a los productos naturales presentes en las partes aéreas de *Diospyros xolocotzii*.

4.3 Objetivos específicos

- Aislar los metabolitos secundarios a partir del extracto CH₂Cl₂:MeOH (1:1) de las hojas de *D. xolocotzii* empleando los procedimientos convencionales de investigación química.
- Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en *D. xolocotzii* mediante el análisis de los datos obtenidos a partir de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Ponderar el potencial de la actividad anti-nociceptiva, tanto del extracto como de las sustancias aisladas, mediante un bioensayo *in vivo*.

5. Resultados y discusión

A partir de los diferentes procesos cromatográficos realizados al extracto de las partes aéreas (hojas) de *D. xolocotzii*, se aislaron y caracterizaron diez metabolitos secundarios los cuales se enuncian en orden de polaridad creciente con respecto al fraccionamiento primario: hexadecanoato de α -amirina (**25**), α -amirina (**10**), β -amirina (**9**), bauerenol (**12**), β -sitosterol (**26**), estigmasterol (**27**), uvaol (**28**), ácido betulínico (**8**), ácido ursólico (**6**) y β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**29**).

A continuación se expondrán las evidencias espectroscópicas y espectrométricas que permitieron la determinación de las estructuras moleculares de cada una de las sustancias aisladas.

5.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados

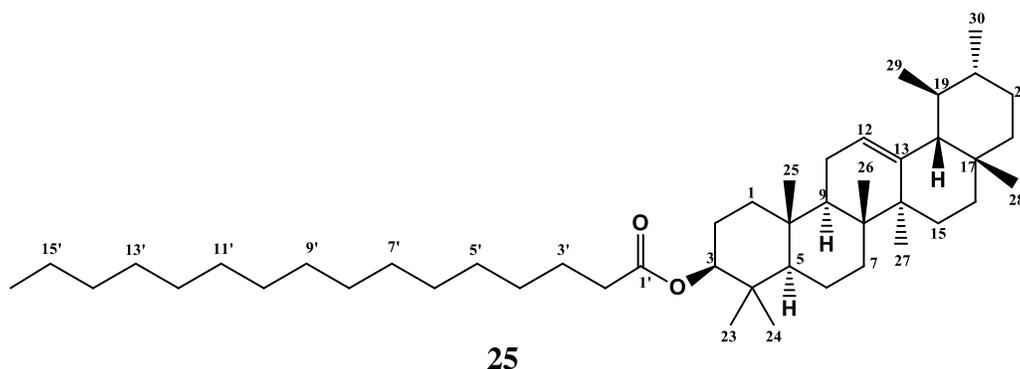
5.1.2 Hexadecanoato de α -amirina (**25**)

En el espectro de RMN ^1H (espectro 1) de esta sustancia se observaron a campo alto (δ_{H} 2.5-0.5) señales de metilos y metilenos alifáticos que corresponden a un perfil de un triterpeno. Además, sobresale una señal simple ancha en δ_{H} 1.26 característica de metilenos de cadena lineal, por lo que presumiblemente se trata de un triterpeno esterificado con un residuo de ácido graso. Esto se dedujo de la señal doble de doble en δ_{H} 4.51 ($J = 10.5, 5.7$ Hz) asignada al protón geminal al éster, H-3 α y de la señal en δ_{C} 80.6 asignada a un carbono unido a oxígeno (C-3). Por otro lado, se observa una señal en δ_{C} 173.6 (espectro 2) atribuida a un grupo carbonilo de éster (C-1') así como una señal triple δ_{H} 2.29 que corresponde a dos protones alfa a un grupo carbonilo

La señal triple en δ_{H} 5.13 ($J = 3.7$ Hz) junto con las señales en δ_{C} 124.3 (CH) y δ_{C} 139.6 (C) son consistentes con la presencia de un doble enlace en CH-12. [34, 35]

En el espectro 3 (EMIE) del compuesto **25** se observó un ion molecular $[\text{M}]^{+\cdot}$ 664 consistente con un compuesto de fórmula $\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{O}_2$, el pico base m/z 218 [100 %] corresponde a la fragmentación del anillo C que se origina mediante una reacción de retro Diels-Alder, dicho fragmento es precursor del ion m/z 203 $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}]^+$ por pérdida de un grupo metilo. El

fragmento de m/z 409 (5) $[M-C_{16}H_{31}O_2]^+$ corresponde a la pérdida completa del residuo de ácido graso. Por otro lado, el fragmento de m/z 189 está constituido por el anillo A/B. Dadas las evidencias espectroscópicas, la estructura propuesta para esta sustancia es el hexadecanoato de α -amirina [40, 63].



5.1.3 Mezcla de α -amirina (**10**), β -amirina (**9**) y bauerenol (**12**)

Se aisló un sólido incoloro en cuyo espectro de RMN 1H (espectro 4) se observó un perfil característico de triterpenos, ya que al igual que en el caso de la sustancia **25** las señales de metilos y metilenos a campo alto fueron indicativas de ello. Las señales de tres dobles enlaces trisustituídos permitió determinar que se trata de una mezcla de α -amirina (δ_H 5.12, 124.4 CH-12; δ_C 139.6 C-13), β -amirina (δ_H 5.18 CH-12) y bauerenol (δ_H 5.41, δ_C 116.4 CH-7; δ_C 145.3 C-8). [36-39]

El doble de doble en δ_H 3.24 ($J = 10.5, 5.6$ Hz) fue asignado a H-3 α , mientras que las señales de carbono δ_C 79.3 y δ_C 79.0 son característicos de carbonos unidos a oxígeno asignados a C-3, en el caso de bauerenol y β -amirina la señal de C-3 (δ_C 79.06) se traslapa [38].

Cabe mencionar que mediante el análisis CG-EMIE fue posible confirmar que esta muestra consiste en una mezcla de isómeros, ya que el ion molecular de las tres sustancias fue $[M]^{++}$ 426, correspondiente a una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. Dos de los triterpenos presentaron una fragmentación similar (espectros 6 y 7), de acuerdo con lo informado por Budzikiewicz, los triterpenos de tipo ursano y oleanano insaturados en $\Delta^{12,13}$ se fragmentan mediante una reacción retro Diels-Alder sobre el anillo C concordante con el pico base observado en m/z

218 [100%] en los dos casos [40, 41], lo que permitió confirmar la presencia de α y β -amirina (**10** y **9**) en conjunción con los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C discutidos con anterioridad.

En lo que respecta al tercer triterpeno, su patrón de fragmentación (espectro 8) es distinto al de los compuestos previamente analizados, ya que se observó un pico base de m/z 247 [100%]. La fragmentación informada para isómeros de bauerano $\Delta^{7,8}$ procede mediante la migración de hidruro de C-9 a C-7 y la migración del enlace doble de C-7 a C-8, seguida de la fragmentación del anillo C y la posterior ionización del enlace sigma entre C-15 y C-16 como se observa en la figura 7 [40, 42], por lo que se determinó que se trata de un compuesto con esqueleto de bauerano. Tanto la EMIE así como la RMN ^1H y ^{13}C permitieron determinar la estructura de bauerenol (**12**) mediante la comparación directa de los datos espectroscópicos informados [39].

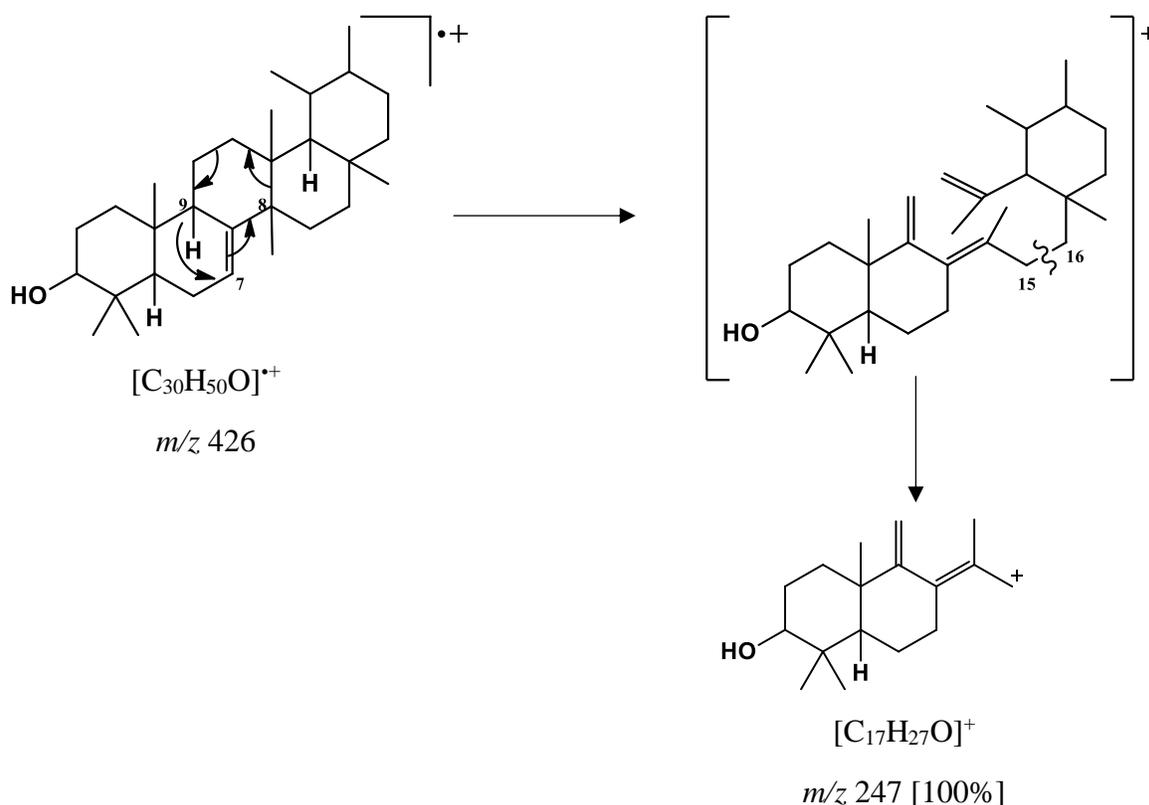
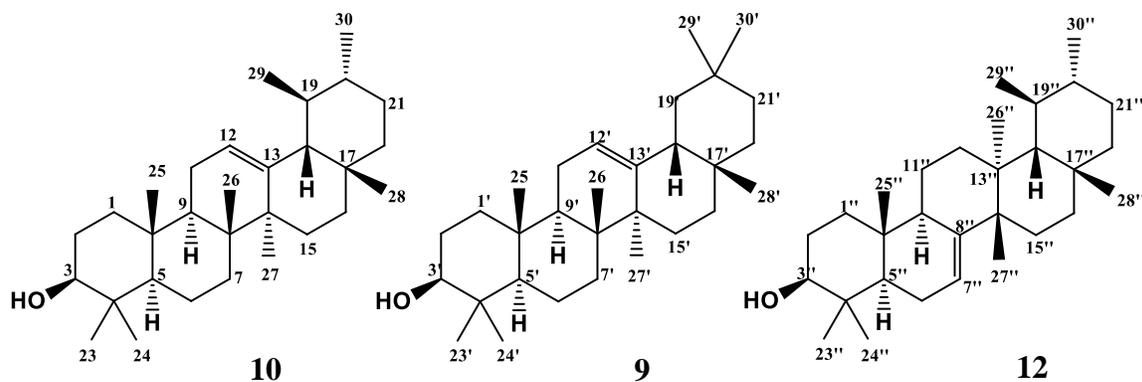


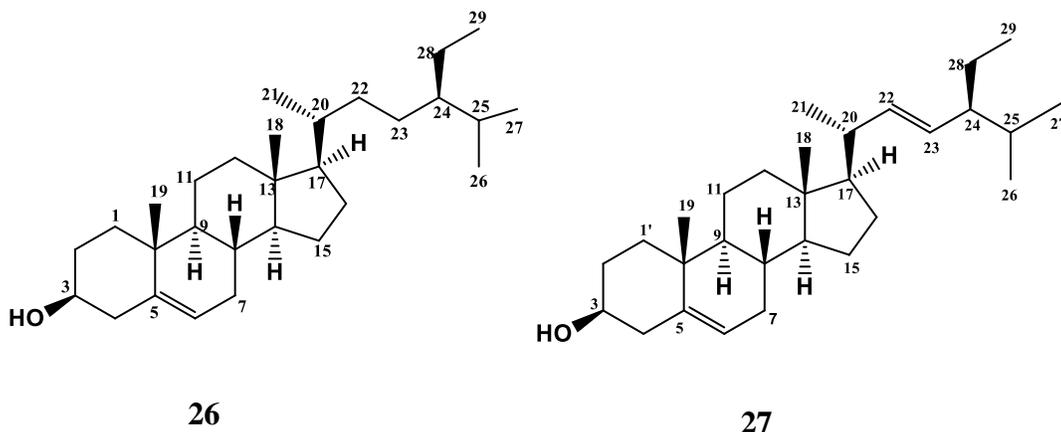
Fig 7. Fragmentación sugerida para bauerenol a partir de lo informado para triterpenos con esqueleto de bauerano $\Delta^{7,8}$ propuesta por Budzikiewicz [40].

Dada la evidencia experimental comparada con los datos reportados en la literatura [36-42] se concluye que el sólido aislado a partir de la fracción C es una mezcla de α -amirina (**10**), β -amirina (**9**) y bauerenol (**12**) en una proporción (6:1:10). La mezcla de éstos triterpenos se ha informado previamente en las especies *Ardisia elliptica* y *Cinnamomum cebuense* [38, 43].



5.1.3 Mezcla de β -sitosterol (**26**) y estigmasterol (**27**)

El sólido aislado a partir de la fracción D-7 se observó como una sola mancha en CCF. El espectro de RMN ^1H (espectro 9) mostró, a campo alto, señales características de esterol (δ_{H} 0.68-1.01). En δ_{H} 5.35 se distingue una señal doble ancha ($J = 5.21$ Hz) asignada a H-6, así como señales de carbonos olefínicos en δ_{C} 140.9 (C-5) y δ_{C} 121.9 (CH-6) (espectro 10). La señal doble de doble de doble de doble en δ_{H} 3.52 ($J = 11.1, 11.1, 5.3, 4.1$ Hz) corresponde a un protón geminal a un grupo hidroxilo y fue asignada a H-3 α . Las señales descritas con anterioridad corresponden a datos informados para β -sitosterol (**26**). Sin embargo, las señales dobles de dobles en δ_{H} 5.15 ($J = 15.2, 8.6$ Hz) y en δ_{H} 5.01 ($J = 15.2, 8.6$ Hz) corresponden a una olefina *trans*-disustituida y fueron asignadas a H-22 y H-23 del estigmasterol (**27**), por lo que se concluye que se trata de una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol. La comparación de los datos espectroscópicos con los informados en la literatura permitió la confirmación de las dos estructuras [44, 45, 46].

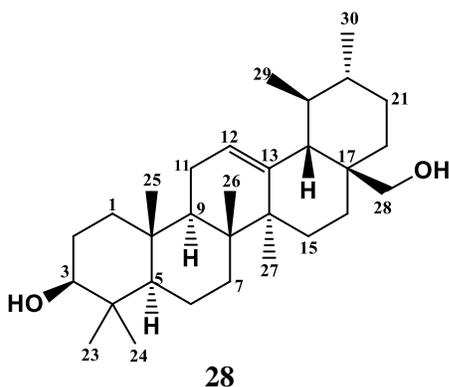


5.1.4 Uvaol (28)

El espectro de RMN ^1H (espectro 11) de **28** presenta similitudes con el espectro de las sustancias **10**, **9** y **12**, por lo tanto, se propone que el compuesto aislado es un triterpeno. Efectivamente, mediante los experimentos DEPT 90 y 135 se identificaron las señales de los 30 carbonos de la molécula como 7 metinos, 10 metilenos, 7 metilos y 6 carbonos cuaternarios, lo que es congruente con un esqueleto de triterpeno pentacíclico. Las señales distintivas del espectro de RMN ^{13}C (espectro 12) se observaron en δ_{C} 138.7 (C-13) y δ_{C} 125.0 (CH-12) que corresponden a carbonos olefínicos. El triplete en δ_{H} 5.14 ($J = 3.6$ Hz) en el espectro de RMN ^1H , fue asignado al protón vinílico (H-12) que se acopla con H-11 β y H-11 α . Las señales dobles en δ_{H} 3.53 ($J = 11$ Hz) y en δ_{H} 3.19 ($J = 11$ Hz) corresponden a los protones geminales, H-28a y H-28b, que junto con la señal en δ_{C} 69.9 se asignaron al oximetileno CH_2 -28. La señal doble de doble en δ_{H} 3.22 ($J = 10.8, 5.1$ Hz), que se superpone parcialmente con la señal doble en δ_{H} 3.19, se asignó al protón H-3 α . Las señales a campo alto de metilos en δ_{H} 1.10, 1.00, 0.99, 0.94, 0.93, 0.81 y 0.79 corresponden a los metilos 27, 26, 23, 30, 24, 29 y 25 respectivamente [47-49]

El ion molecular $[\text{M}]^{+442}$ que se observa en el espectro de EMIE (espectro 13) de la sustancia **28** corresponde a un compuesto de fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$. El fragmento m/z 234 $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}]^{+}$ se conforma por el anillo D/E y se genera por la ruptura del anillo C por medio de una reacción retro Diels-Alder, a partir de este ion se deriva el pico base de m/z 203 [100 %] $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}]^{+}$, debido a la pérdida de un grupo hidroximetileno. Finalmente, el ion de

m/z 189 corresponde a los anillos A/B previa deshidratación. Por lo anterior, esta sustancia corresponde a uvaol, lo que se confirma por comparación directa con una muestra auténtica y con los datos espectroscópicos informados en la literatura [40, 49].



5.1.5 Ácido betulínico (**8**)

A diferencia de las sustancias discutidas anteriormente, en el espectro de RMN ^1H de la sustancia **8** (espectro 14), sobresalen señales características de un grupo isopropenilo, específicamente, dos señales dobles anchas, una en δ_{H} 4.74 ($J = 2.3$ Hz) y otra en δ_{H} 4.61 ($J = 2.3$ Hz), así como una señal simple en δ_{H} 1.69 (3H), que se asignaron a H-29a, H-29b y CH_3 -30, respectivamente. En el espectro 15 se observaron señales de carbonos olefínicos δ_{C} 150.4 y δ_{C} 109.7 asignadas a C-20 y C-29. Por otro lado, la señal en δ_{C} 179.7 fue indicativa de grupo carbonilo de ácido carboxílico que se asignó a C-28. En δ_{H} 3.00 se observó una señal ddd ($J = 10.4, 10.4, 4.3$ Hz) asignada al hidrógeno alílico H-19. Las señales a campo alto en δ_{H} 1.69, 0.98, 0.97, 0.94, 0.82 y 0.75 se asignaron a los metilos 30, 27, 26, 23, 25 y 24 respectivamente [22, 50-52]. Con la evidencia espectroscópica se dedujo que el compuesto **8** presenta un esqueleto de lupano y corresponde al ácido betulínico (**8**).

El patrón de fragmentación del espectro de masas por impacto electrónico (espectro 16) proporcionó evidencia adicional respecto a la estructura **8**, ya que se observó un ion molecular $[\text{M}]^{++}$ 456, consistente con un compuesto de fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$, así como un pico base m/z 189 [100 %], el cual es representativo de triterpenos con esqueleto de

lupano, dicho fragmento contiene al anillo D/E y al residuo de isopropenilo (Fig. 8), esta racionalización se realizó con respecto a lo informado para moléculas análogas [53].

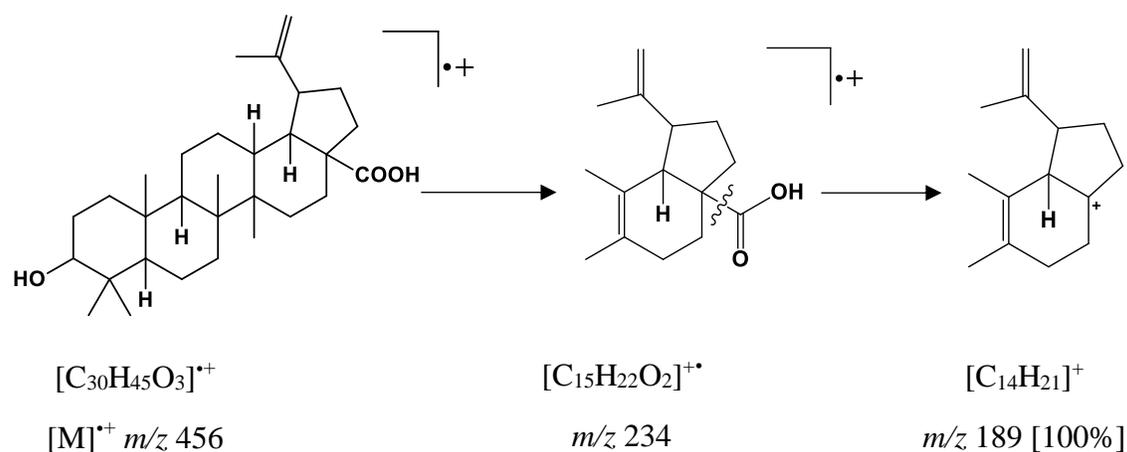
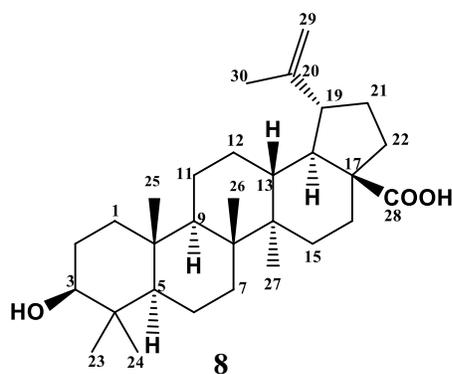


Fig. 8. Fragmentación sugerida para ácido betulínico a partir de lo informado para triterpenos con esqueleto de lupano [53].

Dadas las evidencias espectroscópicas y la comparación con datos reportados en la literatura se confirma que la sustancia **8** corresponde a ácido betulínico.

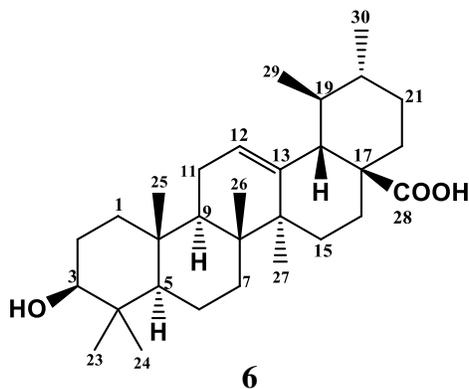


5.1.6 Ácido ursólico (**6**)

En la CCF del compuesto **6** se observó una mancha que se arrastra sobre la sílice y que revela de color rosa con sulfato cérico amoniacal. La afinidad de **6** por la fase estacionaria es indicativa de la existencia de un grupo funcional polar en su estructura, como un ácido

carboxílico. Al analizar su espectro de RMN ^1H (espectro 17) se observó una señal simple en δ_{H} 11.92, asignable a un protón de ácido carboxílico, lo que es concordante con la suposición planteada inicialmente. La señal observada en δ_{C} 178.74 en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 18) confirma la presencia del grupo carboxílico. La presencia de un oximetino queda evidenciada por la señal ddd en δ_{H} 3.00 ($J = 10.3, 5.3, 5.3$ Hz) del espectro de RMN ^1H (espectro 17) y por la señal δ_{C} 77.30 característica de carbono secundario unido a hidroxilo (espectro 18). Mediante los experimentos DEPT 90 y 135 se determinó que el compuesto aislado presentaba 7 metinos, 9 metilenos, 7 metilos y 7 carbonos cuaternarios, por lo que se establece la fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (confirmada por la espectrometría de masas), correspondiente a una sustancia con 7 grados de insaturación, lo cual estaría de acuerdo con un triterpeno pentacíclico con dos grados de insaturación adicionales. Un grado de insaturación corresponde al ácido carboxílico, por lo que la insaturación adicional corresponde a una olefina, ya que se observan las señales de dos carbonos olefínicos en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 18) en δ_{C} 138.7 y δ_{C} 125.0. La señal doble en δ_{H} 2.11 ($J = 10.8$ Hz) fue asignada al protón alílico ubicado en la fusión de los anillos D y E (H-18).

En el espectro de masas de **6** (espectro 19), se observó un ion molecular $[\text{M}]^{+\cdot}$ m/z 456 concordante con un compuesto de fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (espectro 19). Se observó un pico base en m/z 248 $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2]^{+\cdot}$ [100%] generado mediante una reacción retro Diels-Alder a nivel del anillo C, ruptura clásica de triterpenos pentacíclicos insaturados $\Delta^{12,13}$ [40]. Con base en la evidencia experimental y mediante la comparación de los datos espectroscópicos con los informados en la literatura se concluyó que el compuesto **6** es ácido ursólico [54-56].



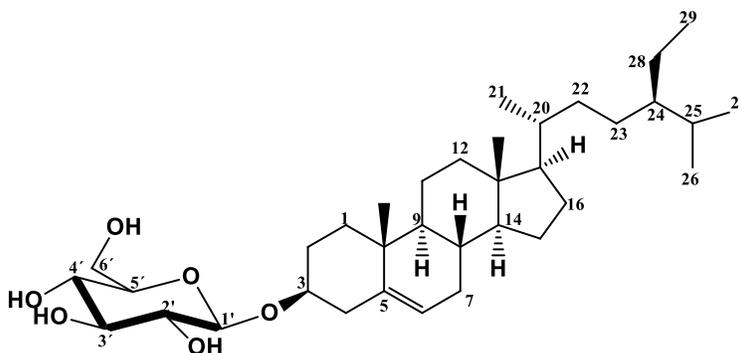
5.1.7 β -D-Glucopiranosido de β -sitosterilo (**29**)

En el espectro de RMN ^1H de esta sustancia (espectro 20) resaltó la presencia de varias señales comprendidas en el intervalo de δ_{H} 4.70 y 3.90 asignables a oximetinos de un carbohidrato, lo cual es consistente con la señal doble en δ_{H} 5.08 ($J = 7.7$ Hz), asignable al protón anomérico H-1'. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 21) se observa una señal en δ_{C} 103.0 asignado al carbono anomérico C-1'. La señal doble de doble en δ_{H} 4.44 ($J = 11.7, 5.2$ Hz) y en δ_{H} 4.60 ($J = 11.7, 2.5$ Hz) corresponden a protones metilénicos asignados H-6'b y H-6'a de la glucosa.

Además, son reconocibles las señales de β -sitosterol (**26**), discutidas anteriormente en la mezcla de esta sustancia con estigmasterol (**27**). En el espectro de RMN ^1H se observa una señal simple en δ_{H} 0.68 y una señal doble en δ_{H} 1.01 características de β -sitosterol, además de una señal múltiple en δ_{H} 5.37 que corresponde a un protón vinílico asignado a H-6. Se observan señales en δ_{C} 141.3 y δ_{C} 122.3 asignadas a los carbonos vinílicos C-5 y C-6 respectivamente.

Los datos espectroscópicos fueron comparados con la literatura y el compuesto aislado se identificó como β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo [58].

La masa de esta sustancia se determinó por análisis directo en tiempo real, el ion molecular de $[\text{M}+\text{H}]^+$ 577 correlaciona con una sustancia de fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$.



29

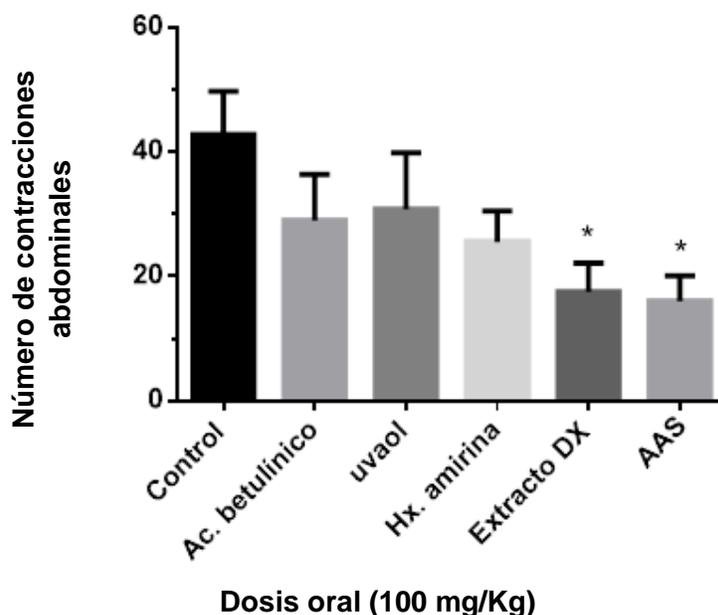
5.2 Resultados de actividad anti-nociceptiva.

La evaluación de la actividad anti-nociceptiva de tres sustancias aisladas a partir de *D. xolocotzii*, hexadecanoato de α -amirina (**25**), uvaol (**28**), ácido betulínico (**8**) y el extracto CH₂Cl₂:MeOH, se desarrolló mediante un modelo de contracción abdominal (writhing). Cabe mencionar que el ácido ursólico (**6**) no fue evaluado ya que su actividad anti-nociceptiva en este modelo ya ha sido informada [60, 65].

El bioensayo de actividad anti-nociceptiva se caracteriza por la administración intraperitoneal de sustancias químicas como ácido acético, fenilquinona o sulfato de magnesio que generan irritación visceral e inducen el dolor de tipo periférico. Después de la administración del agente nociceptor, la respuesta observada es el estiramiento longitudinal del torso seguida del arqueamiento cóncavo del mismo y su posterior extensión [61].

En este bioensayo, pueden emplearse diferentes sustancias analgésicas de referencia (controles positivos), como aspirina, paracetamol, atropina, las cuales se han informado que disminuyen el número de contracciones abdominales en este tipo de bioensayos [62]

La descripción técnica del bioensayo se incluye en la parte experimental (página 41). En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos a partir de este bioensayo. Los grupos evaluados fueron los siguientes: el control negativo fue el vehículo de administración (tween 80), ácido acetil salicílico (ASS) fue empleado como sustancia analgésica de referencia, hexadecanoato de α -amirina (**25**), uvaol (**28**), ácido betulínico (**8**), y el extracto de diclorometano-metanol de *D. xolocotzii*. Se registró el número de contracciones abdominales de cada sustancia y/o extracto y se comparó contra el grupo del control negativo. Al disminuir el número de contracciones abdominales la actividad analgésica de la sustancia y/o extracto evaluado es mayor. Lo que se observa en la gráfica 1 es que tanto el extracto como las sustancias puras ensayadas disminuyen el número de contracciones. Sin embargo, solo el extracto muestra una actividad analgésica estadísticamente significativa frente al control (tween 80), excluyendo a las sustancias **25**.



Gráfica 1. Evaluación de la actividad anti-nociceptiva en un modelo de contracción abdominal en ratón. Grupos evaluados: control (-): tween 80, ácido acetil salicílico (ASS), ácido betulínico (8), uvaol (28), hexadecanoato de α -amirina (25) y extracto de *D. xolocotzii*. *Resultados estadísticamente significativos.

Estos resultados sugieren que existe un efecto sinérgico en la bioactividad de los metabolitos presentes en el extracto de *D. xolocotzii*, ya que al evaluar los compuestos puros no se observó diferencia estadísticamente significativa frente al grupo control. En este contexto, es pertinente mencionar que se ha informado que la mezcla isomérica de triterpenos α - y β -amirina posee efecto analgésico mediante la interacción con los receptores de cannabinoides (CB₁ y CB₂) e inhibición de mediadores químicos como TNF- α , Il-1 β , Il-6 procedentes de células del sistema inmune involucrados en procesos inflamatorios, ya que al activarse los receptores CB₁ y CB₂ mediante el enlace de α/β -amirina disminuyen los niveles de Il-1b, Il-6 y citocina C [58], los cuales actúan sobre terminales nerviosas periféricas de las neuronas nociceptoras que producen la sensibilización al dolor [64]. Dada la similitud estructural del hexadecanoato de α -amirina

(25) y uvaol (28) con las sustancias mencionadas es plausible que estas sustancias tengan efecto analgésico mediante los mismos mecanismos.

El porcentaje de inhibición de nocicepción de las sustancias evaluadas del extracto de *D. xolocotzii* se muestra en la Tabla 1. Como se observa, el porcentaje de inhibición del extracto fue de $59 \pm 11\%$ y es mayor al de los compuestos evaluados de manera individual, ácido betulínico (8), uvaol (28) y hexadecanoato de α -amirina (25), pero a la vez es cercano al valor de la sustancia analgésica de referencia, ácido acetil salicílico, cuyo porcentaje de inhibición es de $63 \pm 9.5\%$.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de nocicepción.

Muestra	Dosis (mg/kg)	Contracciones abdominales (frecuencia)	Inhibición (%)
Control negativo (tween 80)	-	43 ± 6.9	-
Ácido betulínico	100	29 ± 7.4	32 ± 17
Uvaol	100	31 ± 9.1	28 ± 21
Hexadecanoato de α -amirina	100	26 ± 5.0	40 ± 12
Extracto <i>D. xolocotzii</i>	100	$18 \pm 4.7^*$	$59 \pm 11^*$
Ácido acetilsalicílico	100	$16 \pm 4.1^*$	$63 \pm 9.5^*$

Los datos representan el promedio de seis repeticiones ($n = 6$) con el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba Dunnett, los valores $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control.

6. Conclusiones

El estudio químico de las hojas de *D. xolocotzii* contribuye al conocimiento referente a su contenido metabólico, que en conjunto resulta similar al de otras especies pertenecientes a este género, ya que consiste principalmente de triterpenos pentacíclicos de tipo ursano, lupano y bauerano, además de esteroides. Sin embargo, es notable la abundancia relativa del ácido ursólico (**6**) con respecto a otras especies de este género, cabe señalar que el ácido ursólico es una sustancia con varias bioactividades reconocidas [29, 30, 60]. Por otro lado, la bioevaluación preliminar del efecto anti-nociceptivo del extracto de las partes aéreas de *D. xolocotzii* así como de las tres sustancias puras permitió establecer que el extracto presenta un efecto significativo, mientras que la bioactividad de los compuestos puros no fue relevante. Lo anterior permite suponer que existe un efecto sinérgico de las diferentes sustancias que se manifiesta en la bioactividad del extracto.

7. Parte experimental

7.1 Material vegetal

Las partes aéreas (hojas) de la especie vegetal *D. xolocotzii* fueron colectadas en San José de las Pilas en el municipio de Acámbaro, Guanajuato, ubicación geográfica que corresponde a las coordenadas 19°59'58" N, 100°53'32" O. La colecta e identificación fueron realizadas por el Dr. Francisco J. Espinosa y el Dr. Santiago Arizaga. El material vegetal fue cotejado con ejemplares depositados en los herbarios del Instituto de Ecología del Bajío (IEB) y de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (EBUM).

7.2 Materiales y equipos

Durante los procesos cromatográficos se empleó como fase estacionaria gel de sílice (SiO_2) de tamaños de malla 70-230 y 230-400 (Merck), además de un cartucho de sílice químicamente modificada (C-18) de tamaño de partícula 40-63 μm (Büchi). En algunos procedimientos cromatográficos se empleó un equipo Sepacore de Büchi, conformado por un controlador Büchi C-620, colector de fracciones Büchi C-660, detector UV Büchi C-640 y un sistema de bombas binarias Büchi C-605.

Los disolventes empleados durante las diferentes operaciones experimentales fueron hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol, tolueno y acetonitrilo. El seguimiento de los procesos cromatográficos se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatofolios de sílica gel de Merck® 60 F₂₅₄. Para la visualización de la CCF se empleó una lámpara de luz UV de λ de 254 y 365 nm y una solución de sulfato cérico amoniacal $((\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4)$ al 1% con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns y no fueron corregidos. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en los equipos Bruker Avance III (400 MHz) y Bruker Fourier (300 MHz). Los disolventes deuterados empleados fueron cloroformo (Sigma-Aldrich), dimetilsulfóxido (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) y piridina (Sigma-Aldrich). Los espectros de masas fueron obtenidos mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV en un espectrómetro Jeol SX 102 A y en un espectrómetro de

masas Jeol AccuTOF JMS-T100LC. En el análisis de la mezcla de α -amirina (**10**), β -amirina (**9**) y buarenol (**12**) se empleó un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas Jeol, JSM-GC Mate II, una columna Agilent technologies 30m x 0.320 mm, película 0.25 micras. El análisis cromatográfico se desarrolló en un rango de temperatura de 60-235 °C.

En la evaluación de actividad anti-nociceptiva se empleó un modelo de contracción abdominal en ratones CD-1 macho de 25-30 g de peso, como vehículo se empleó una solución de Tween 80 al 0.2% en agua, una solución de ácido acético al 0.5 % como agente promotor de la nocicepción y como sustancia analgésica de referencia ácido acetil salicílico [8, 59]

7.3 Extracción y aislamiento

El material vegetal seco y molido (1.73 kg) fue macerado durante tres días con una mezcla de disolventes CH₂Cl₂:MeOH en una proporción (1:1). Se concentró el sobrenadante a presión reducida cada 24 h. Finalmente se obtuvieron 190 g de extracto. La separación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía en columna (CC), cromatografía con presión positiva (CPP) en un equipo Sepacore y se dio seguimiento mediante cromatografía en capa fina (CCF).

El extracto se adsorbió sobre sílice de malla 70-230. La elución se llevó a cabo en gradiente con mezclas de hexano:acetato de etilo. Se finalizó la elución con una mezcla de acetona:metanol (Fig. 8). Se obtuvieron en total 420 fracciones de 250 mL y se reunieron en seis fracciones (A – F) de acuerdo a su similitud cromatográfica (Tabla 2). El aislamiento de los metabolitos secundarios se muestra de manera esquemática en la figura 8.

Tabla 2. Fracciones primarias obtenidas a partir del extracto CH₂Cl₂:MeOH (1:1) de *D. xolocotzii*.

Fracción	Masa de la fracción (g)
A	0.42
B	11.33
C	3.30
D	11.20
E	23.25
F	70.0

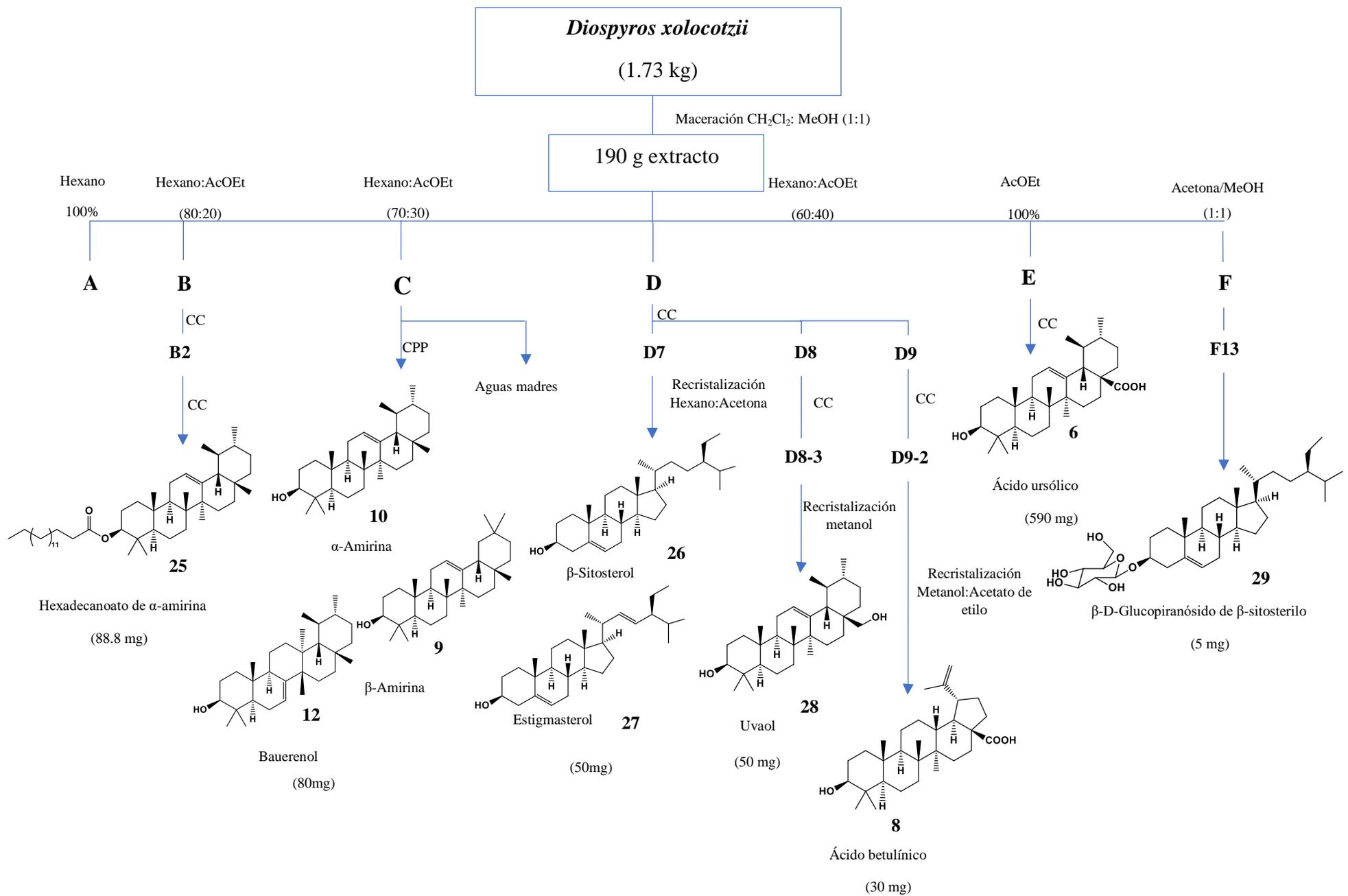
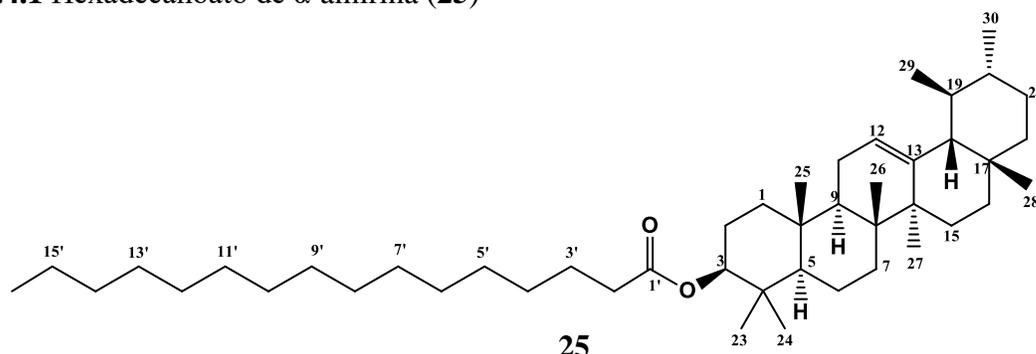


Fig. 8. Diagrama de aislamiento de metabolitos de *D. xolocotzii*

7.4 Características físicas y datos espectroscópicos de los compuestos aislados

7.4.1 Hexadecanoato de α -amirina (**25**)



La fracción B fue sometida a CC, se empleó como fase móvil una mezcla de hexano y acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Se colectaron 180 eluatos de 125 mL que fueron reunidos conforme a su perfil cromatográfico en 11 fracciones (B1-B11). La fracción B2 fue sometida a un nuevo procedimiento cromatográfico (CC), la elución se llevó a cabo de manera isocrática con una mezcla de cloroformo y tolueno 95:5. Este procedimiento permitió el aislamiento de hexadecanoato de α -amirina (**25**).

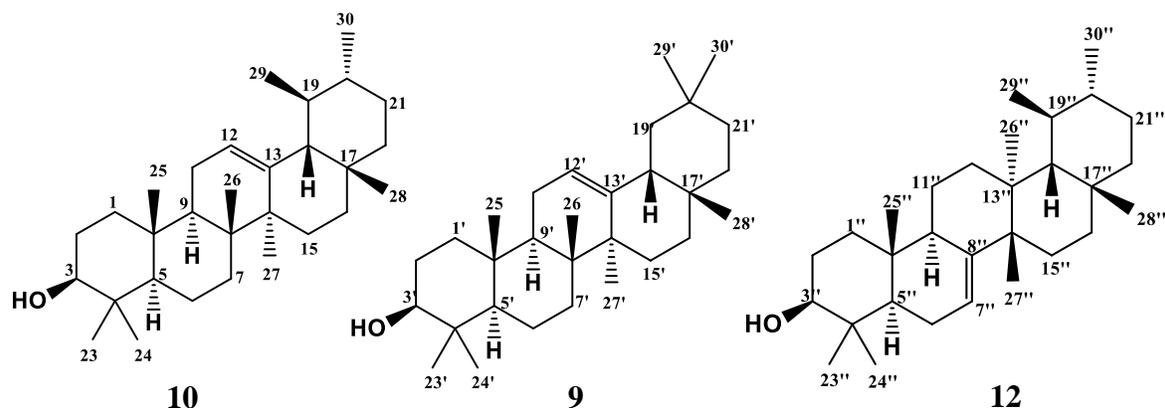
Aceite incoloro *R_f* 0.85 (95:5 hexano: acetato de etilo).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ_{H} 4.51 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.7 Hz, H-3 α), 5.13 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-12), 2.29 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, 2H-2'), 1.26 (-CH₂-, sa., H-4'-H13'), 1.07 (3H, s, 27-CH₃), 1.01 (3H, s, CH₃-26), 0.98 (3H, s, CH₃-25), 0.91 (3H, s, CH₃-30), 0.87 (3H, s, CH₃-24), 0.80 (3H, s, CH₃-29).

RMN ¹³C (CDCl₃; 100 MHz): δ_{C} 173.6 (C-1'), 139.6 (C-13), 124.3 (C-12), 80.6 (C-3), 59.0 (C-18), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 42.0 (C-14), 41.5 (C-22), 40.0 (C-8), 39.7 (C-19), 39.6 (C-20), 38.4 (C-1), 37.7 (C-4), 36.8 (C-10), 34.8 (C-2'), 33.7 (C-17), 32.9 (C-7), 31.9 (C-3'), 31.3 (C-21), 29.7-23.6 (C-4'-C-13'), 28.7 (C-28), 28.1 (C-23), 26.6 (C-16), 25.2 (C-2), (C-15), 23.4 (C-11), 23.2 (C-27), 22.7 (C-15'), 21.4 (C-30), 18.3 (C-6), 17.5 (C-29), 16.9 (C-24), 16.8 (C-26), 15.7 (C-25), 14.1 (C-16'). [34, 35].

EMIE: (70 eV) *m/z* (%): 664 (5) [M]⁺, 257 (14), 218 (100), 409 (5), 203 (25), 189 (27).

7.4.2 Mezcla de α -amirina (**10**), β -amirina (**9**) y bauerenol (**12**)



A partir de la fracción C se obtuvo un sólido que fue lavado con acetona y separado de las aguas madres con una pipeta Pasteur. Se obtuvo un sólido blanco de *R_f* 0.6 (7:3 hexano:acetato de etilo). Mediante su análisis por RMN ¹H y RMN ¹³C se observaron señales concordantes con una mezcla de triterpenos. La mezcla fue analizada por CG-EMIE como un análisis preliminar de los compuestos presentes en ella y posteriormente purificada por CPP en un equipo Sepacore, se empleó un soporte C-18 como fase estacionaria y como fase móvil acetonitrilo (100%). La elución se llevó a cabo de manera isocrática. El análisis espectroscópico permitió establecer la presencia de α -amirina (**10**), β -amirina (**9**) y bauerenol (**12**) que se encuentran en una proporción relativa (6:1:10).

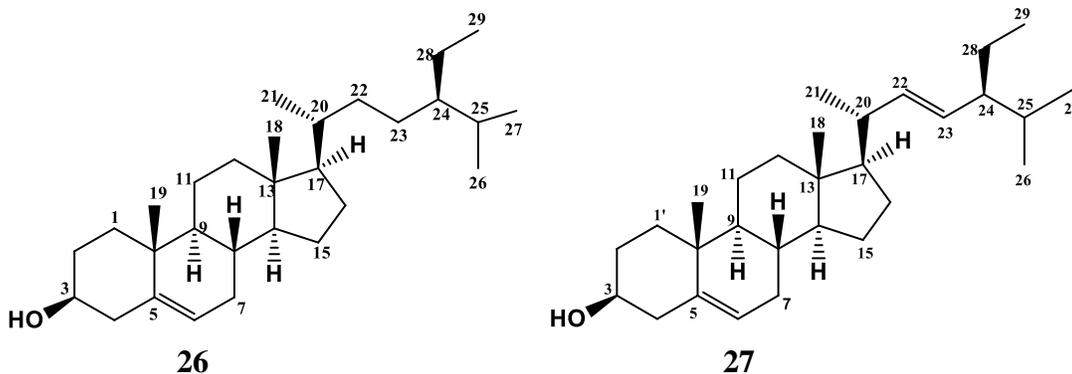
Agujas blancas. Pf 197-200°C. *R_f* 0.6 (7:3 hexano:acetato de etilo).

En la Tabla 3 se muestran los datos de RMN y EMIE de la mezcla de los compuestos **10**, **9** y **12**. Los datos fueron comparados con los reportados en la literatura [36-43].

Tabla 3. Datos de RMN ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz) y EMIE (70 eV) de α -amirina (**10**), β -amirina (**9**) y baurenol (**12**).

H, C	10			9			12		
	δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}	EMIE <i>m/z</i> [%]	δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}	EMIE <i>m/z</i> [%]	δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}	EMIE <i>m/z</i> [%]
3	3.24 (dd, 10.5, 5.6)	79.3	$\text{M}^{+\cdot}$ 426 [10], 218 [100],	3.24 (dd, 10.5, 5.6)	79.0	$\text{M}^{+\cdot}$ 426 [7], 218 [100], 203 [50], 189 [20].	3.24 (dd, 10.5, 5.6)	79.0	$\text{M}^{+\cdot}$ 426 [9], 393 [10]. 411 [25],
7	----	----	203 [26], 189 [25]	----	----		5.41 (dd 3.42)	116.4	247[100], 229 [65].
8	----	----		----	----		----	145.3	
12	5.12 (t, 3.7)	124.4		5.18 (t, 3.6)	121.7		----	----	
13	----	139.6		----	145.3		----	----	

7.4.3 Mezcla de β -sitosterol (**26**) y estigmasterol (**27**).



De la fracción D se realizó una separación mediante CC empleando mezclas de hexano: acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Se colectaron 281 eluatos de 200 mL que fueron reunidos en 11 fracciones conforme a su perfil cromatográfico en CCF (D1-D11). En la fracción D7 eluida en 9:1 hexano:acetato de etilo, se aisló sólido blanco que fue recrystalizado con hexano-acetona. Se obtuvo un sólido blanco en forma de agujas con un *R_f*

0.43 (7:3 hexano:acetato de etilo). El procedimiento anterior permitió el aislamiento de la mezcla de β -sitosterol (**26**) y estigmasterol (**27**)

Sólido blanco en forma de agujas finas. Pf 131-133°C. *Rf* 0.43 (7:3 hexano:acetato de etilo).

A continuación se presentan los datos espectroscópicos de β -sitosterol (**26**) los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura [44-46].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ_H 5.35 (1H, d a., $J = 5.21$ Hz, H-6), 3.52 (1H, tdd, $J = 11.1, 5.3$ Hz, H-3 α), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J = 6.56$ Hz, H-21), 0.68 (3H, s, H-18).

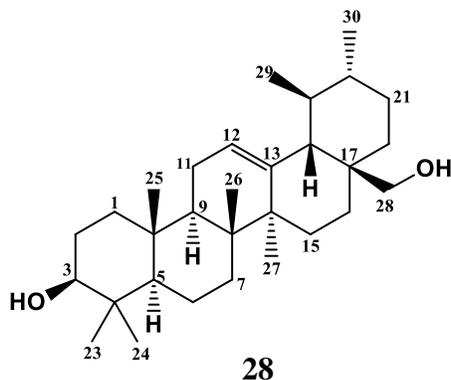
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ_C 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 71.9 (C-3), 56.9 (C-14), 56.2 (C-17), 50.3 (C-9), 46.0 (C-24), 42.4 (C-4), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.7 (C-10), 36.3 (C-20), 34.1 (C-22), 32.0 (C-7), 31.8 (C-2), 29.3 (C-25), 28.4 (C-16), 26.2 (C-23), 24.5 (C-15), 23.2 (C-28), 21.2 (C-11), 19.5 (C-26), 19.2 (C-19), 18.9 (C-21), 12.1 (C-29), 12.0 (C-18).

Sólido blanco en forma de agujas finas. Pf 131-133°C. (literatura: 134-136 °C) [45]. *Rf* 0.43 (7:3 hexano:acetato de etilo). Los datos espectroscópicos de estigmasterol (**27**) se muestran a continuación y son concordantes con los reportados en la literatura [44-46].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ_H 5.35 (1H, d a., $J = 5.2$ Hz, H-6), 5.15 (1H, dd, $J = 15.2, 8.6$ Hz, H-22), 5.01 (1H, d, $J = 15.1, 8.6$ Hz, H-23), 3.52 (1H, dddd, $J = 11.1, 11.1, 5.3, 4.1$ Hz, H-3).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ_C 140.9 (C-5), 138.4 (C-22), 121.9 (C-6), 129.4 (C-23), 71.9 (C-3), 56.9 (C-14), 56.2 (C-17), 51.4 (C-24), 50.3 (C-9), 42.5 (C-4), 40.6 (C-20), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.7 (C-10), 32.0 (C-7, C-8, C-25), 31.8 (C-2), 29.0 (C-16), 25.5 (C-28), 24.4 (C-15), 21.4 (C-26), 21.2 (C-11, C-21), 19.5 (C-19), 19.1 (C-27), 12.4 (C-29), 12.2 (C-18).

7.4.4 Uvaol (28)



La fracción D8 se separó mediante CC, la fase móvil empleada fue una mezcla de *n*-hexano y acetato de etilo en orden creciente de polaridad.

A partir de la subfracción D8-3, eluida con 80:20 hexano:acetato de etilo, (Fig. 8), se aisló un sólido blanco que fue recristalizado con metanol. El análisis de los datos espectroscópicos permitió identificar al compuesto aislado como uvaol [47-49]. El compuesto aislado se comparó con una muestra auténtica de uvaol (28) disponible en el laboratorio.

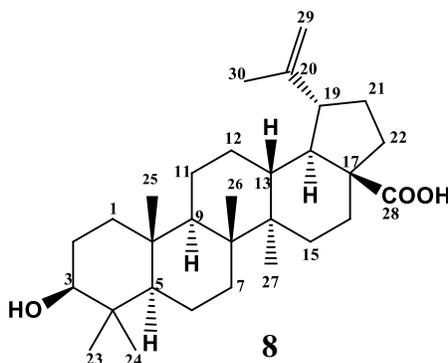
Sólido blanco en forma de agujas. Pf 218-220 °C (literatura: 222-224 °C) [49]. *R_f* 0.40 (7:3 hexano:acetato de etilo).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ_H 5.14 (1H, t, *J* = 3.69 Hz, H-12), 3.53 (1H, d, *J* = 11 Hz, H-28 a), 3.19 (1H, d, *J* = 11 Hz, H-28 b), 3.22 (1H, dd, *J* = 10.8, 5.1 Hz, 3-H_α), 1.10 (3H, s, CH₃-27), 1.00 (3H, s, CH₃-26), 0.99 (3H, s, CH₃-23), 0.94 (3H, d, *J* = 7.4 Hz, CH₃-30), 0.93 (3H, s, CH₃-24), 0.81 (3H, d, *J* = 6 Hz, CH₃-29), 0.79 (3H, s, CH₃-25).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ_C 138.7 (C-13), 125.0 (C-12), 79.0 (C-3), 69.9 (C-28), 55.2 (C-5), 54.0 (C-18), 47.7 (C-9), 42.0 (C-14), 40.0 (C-8), 39.4 (C-20), 39.4 (C-19), 38.8 (C-1), 38.0 (C-10), 36.9 (C-17), 35.2 (C-16), 32.8 (C-7), 30.6 (C-21), 30.6 (C-22), 28.1 (C-23), 27.2 (C-2), 26.0 (C-15), 23.4 (C-11), 23.3 (C-27), 21.3 (C-30), 18.3 (C-6), 17.3 (C-26), 16.8 (C-29), 15.7 (C-25), 15.6 (C-24).

EMIE 70 eV. *m/z* (%): 442 (5) [M⁺], 234 (14), 203 (100).

7.4.5 Ácido betulínico (8)



La fracción D9, eluida con 90:10 hexano:acetato de etilo, se sometió a CC y se empleó como fase móvil una mezcla hexano:acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Se generaron 62 eluatos de 100 mL y fueron reunidos con respecto a su perfil cromatográfico (D9-1 a D9-3). A partir de la fracción D9-2, eluida en 80:20 hexano:acetato de etilo, se aisló un sólido blanco que fue recrystalizado con metanol:acetato de etilo. Finalmente se obtuvo un sólido en forma de agujas blancas que se identificó como ácido betulínico (8).

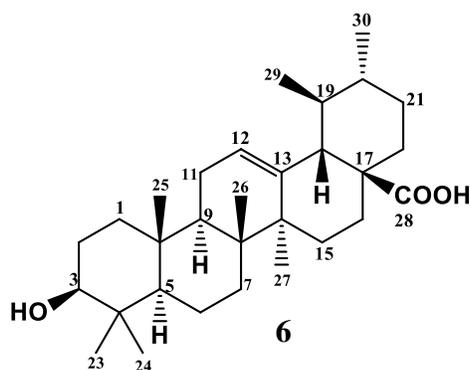
Agujas blancas. P f. > 300°C (literatura: 317-319°C) [9]. *R_f* 0.53 (7:3 hexano:acetato de etilo). Los datos espectroscópicos se compararon con los informados en la literatura [22,50-53].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ_H 4.74 (1H,d, *J* = 2.3 Hz, 29-a), 4.61 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, 29-b), 3.19 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.0 Hz, H-3), 3.00 (1H, ddd, *J* = 10.4, 10.4, 4.3 Hz, H-19), 1.69 (3H, s, CH₃-30), 0.98 (3H, s, CH₃-27), 0.97 (3H, s, CH₃-26), 0.94 (3H, s, CH₃-23), 0.82 (3H, s, CH₃-25), 0.75 (3H, s, CH₃-24).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ_C 179.7 (C-28), 150.4 (C-20), 109.7 (C-29), 79.0 (C-3), 56.3 (C-17), 55.4 (C-5), 50.5 (C-9), 49.3 (C-18), 46.9 (C-19), 42.4 (C-14), 40.7 (C-8), 38.9 (C-4), 38.7 (C-13), 38.4 (C-1), 37.2 (C-10), 37.0 (C-22), 34.3 (C-7), 32.1 (C-16), 30.5 (C-21), 29.7 (C-15), 28.0 (C-23), 27.4 (C-2), 25.5 (C-12), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 16.1 (C-26), 16.0 (C-25), 15.3 (C-24), 14.7 (C-27).

EMIE 70 eV. *m/z* (%): 456 (30) [M]⁺, 438 (15), 411 (10), 203 (65), 189 (100).

7.4.6 Ácido ursólico (6)



La fase móvil empleada en la CC de la fracción E fue una mezcla diclorometano:metanol de polaridad creciente, se colectaron 255 eluatos de 200 mL, los cuales se reunieron en 12 fracciones (E1-E12). A partir de la fracción E9, eluida en 95:5 CH₂Cl₂:MeOH, se aisló un precipitado que fue recristalizado con diclorometano:metanol y se empleó carbón activado para remover impurezas coloridas. Finalmente se obtuvo un sólido blanco amorfo. Mediante la comparación de los datos espectroscópicos informados en la literatura se determinó que la estructura de este compuesto corresponde al ácido ursólico (**6**) [54-56].

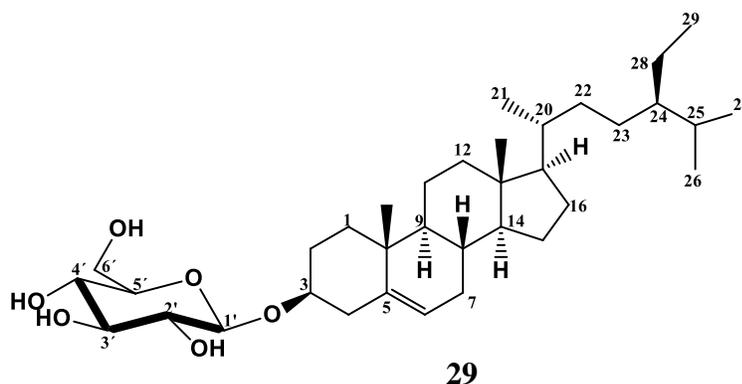
Sólido blanco amorfo. Pf 279-282 °C (lit. 283-285°C) [57]. *R_f* 0.7 (1:1 diclorometano:metanol).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ_H 11.93 (1H, s, -COOH), 5.13 (1H, t, *J* = 3.64 Hz, 12-H), 4.28 (1H, d, *J* = 5.16 Hz, 3-OH), 3.00 (1H, ddd, *J* = 10.3, 5.3, 5.3 Hz, H_α-3), 2.11 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-18), 1.04 (3H, s, CH₃-24), 0.90 (3H, d, *J* = 7.8 Hz CH₃-29), 0.89 (3H, s, CH₃-27), 0.87 (3H, s, CH₃-23), 0.81 (3H, d, *J* = 6.41 Hz, CH₃-30), 0.75 (3H, s, CH₃-26), 0.68 (3H, s, CH₃-25).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): δ_C 178.7 (C-28), 138.7 (C-13), 125.0 (C-12), 77.3 (C-3), 55.2 (C-5), 52.8 (C-18), 47.5 (C-9), 47.3 (C-17), 42.1 (C-14), 39.0 (C-20), 38.9 (C-19), 38.8 (C-8), 38.7 (C-4), 37.0 (C-10), 36.8 (C-22), 33.2 (C-7), 30.6 (C-21), 28.7 (C-23), 28.0 (C-15), 27.4 (C-2), 24.3 (C-16), 23.7 (C-27), 23.3 (C-11), 21.5 (C-30), 18.5 (C-6), 17.5 (C-26), 17.4 (C-29), 16.5 (C-24), 15.7 (C-25).

EMIE 70 eV. *m/z* (%): 456 (2) [M⁺], 248 (100), 203 (45).

7.4.7 β -D-Glucopiranosido de β -sitosterilo (**29**)



La fracción F se sometió a CC y se empleó una mezcla de diclorometano:metanol como fase móvil en orden creciente de polaridad, se colectaron 492 eluatos de 250 mL. En la fracción F-13, eluida en 80:20 CH_2Cl_2 :MeOH se obtuvo un sólido que fue recrystalizado con cloroformo:metanol. El análisis espectroscópico permitió identificar al compuesto como β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**29**) [58].

Rf 0.67 (85:15 CH_2Cl_2 :MeOH)

RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ_{H} 5.37 (1H, m, H-6), 5.08 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.60 (1H, dd, $J = 11.7, 2.5$ Hz, H-6'a), 4.44 (1H, dd, $J = 11.7, 5.20$ Hz, H-6'b), 4.31 (1H, dd, $J = 7.00, 2.9$ Hz, H-3'), 4.09 (1H, m, H-4'), 4.01 (1H, m, H-2'), 1.01 (3-H, d, $J = 6.54$ Hz, CH_3 -21), 0.68 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ_{C} 141.3 (C-5), 122.3 (C-6), 103.0 (C-1'), 79.0 (C-3), 78.9 (C-3'), 78.5 (C-5'), 75.8 (C-2'), 72.1 (C-4'), 63.3 (C-6'), 57.3 (C-14), 56.7 (C-17), 50.8 (C-9), 46.5 (C-24), 42.9 (C-13), 40.4 (C-12), 39.8 (C-1), 37.9 (C-10), 37.4 (C-20), 36.8 (C-22), 34.5 (C-7), 32.5 (C-2), 30.0 (C-16), 26.8 (C-15), 24.9 (C-28), 23.8 (C-11), 19.85 (C-19), 19.64 (C-27), 19.44 (C-21), 12.58 (C-29), 12.40 (C-18).

EM-ADTR m/z 577 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$,

7.5 Prueba biológica

7.5.1 Bioensayo de actividad anti-nociceptiva

Para la evaluación de la actividad anti-nociceptiva se formaron grupos de 6 ratones macho con un peso entre 30-40 g (Tabla 4). Los animales se dejaron en ayuno de 3 a 4 horas.

Tabla 4. Grupos evaluados en la prueba anti-nociceptiva.

Grupos
Grupo I (Control negativo: tween 80)
Grupo II (Ácido betulínico)
Grupo III (Uvaol)
Grupo IV (Hexadecanoato de α -amirina)
Grupo V (Extracto de <i>D. xolocotzii</i>)
Grupo VI (Ácido acetil salicílico)

Las muestras se disolvieron en Tween 80 al 0.5% a una concentración de 10 mg/mL y se administró un volumen de 0.1 mL/10 g de peso de ratón (dosis 100 mg/Kg) por vía oral. Como estándar de referencia se empleó ácido acetilsalicílico a la misma dosis. El grupo control fue administrado solo con la solución de Tween 80 al 0.5%. Transcurrida una hora (tiempo de absorción), se administró por vía intraperitoneal a cada ratón 0.1 ml/10 g de peso de una solución de ácido acético glacial al 0.6% disuelto en solución salina al 0.9%. Transcurridos 5 minutos se registró el número de contracciones abdominales de cada ratón durante 20 minutos.

Se tomó como modelo el bioensayo desarrollado por Collier *et al.* 1968 con algunas modificaciones [63].

El porcentaje de inhibición se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = ((C-T)/T)*100$$

En donde:

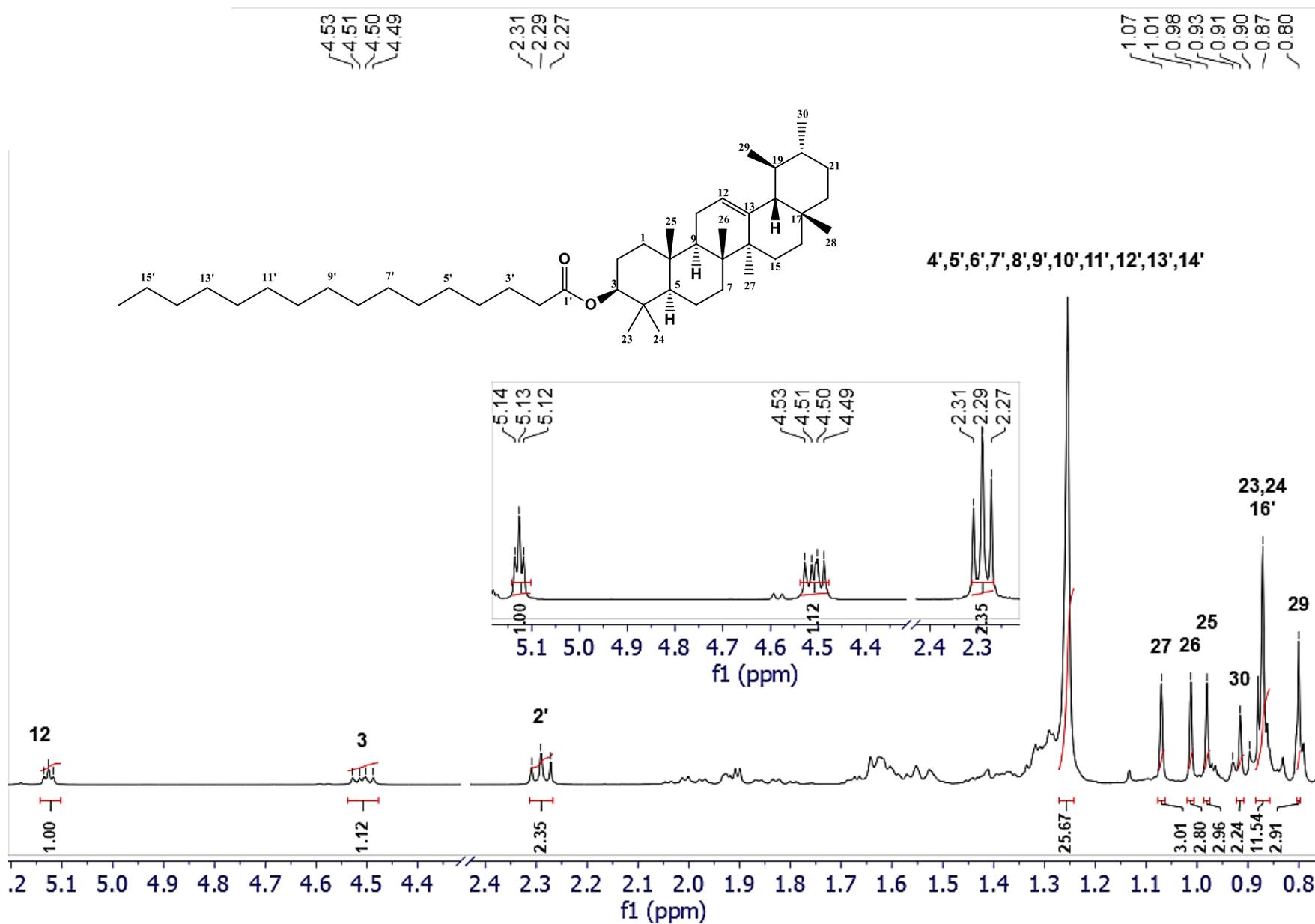
C= Grupo administrado con tween 80 y ácido acético.

T= Grupo administrado con muestra y ácido acético.

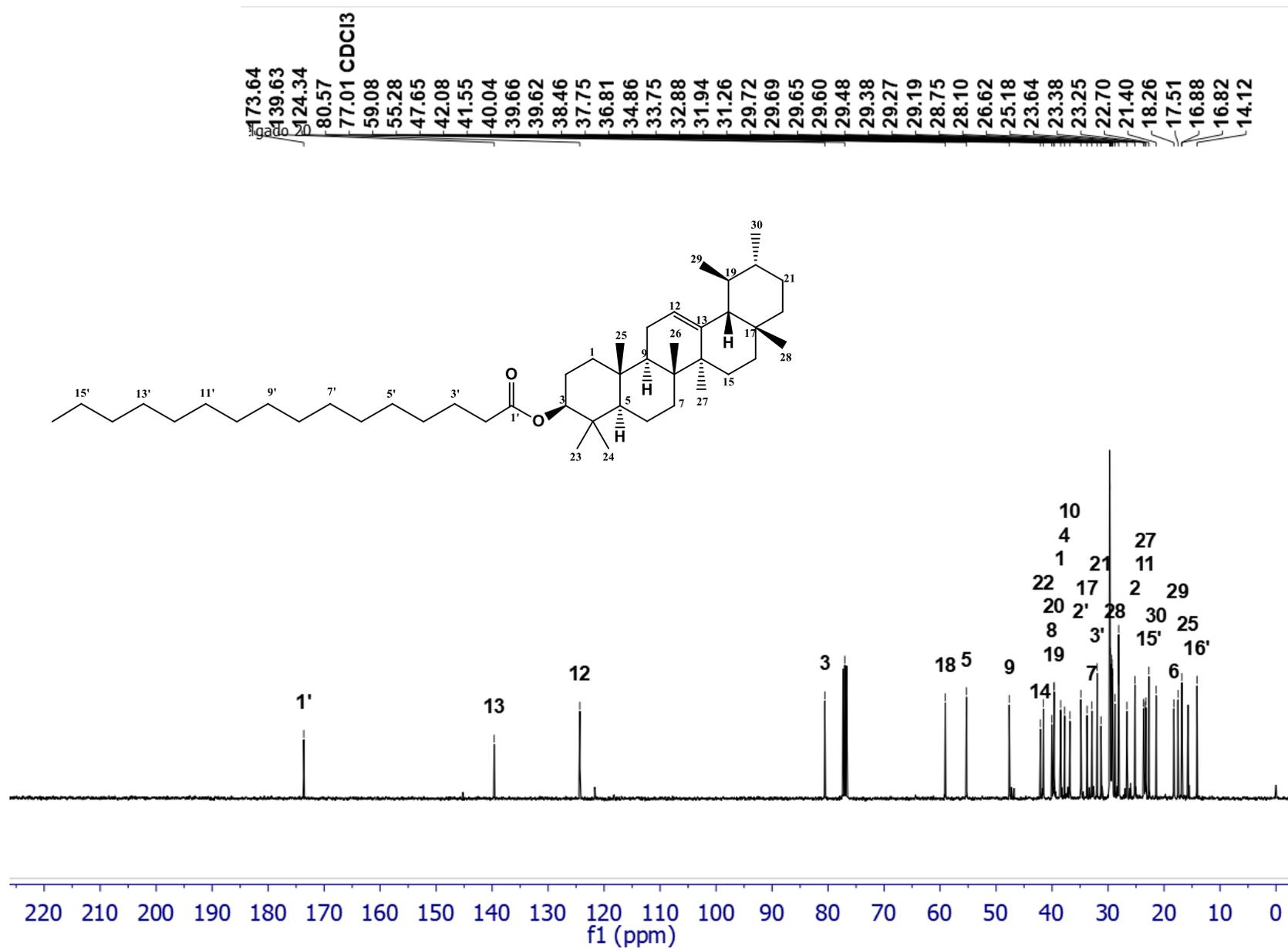
Los resultados del bioensayo fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM) y se analizaron estadísticamente por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba *Dunnnett* para el análisis de comparaciones múltiples los valores $p \leq 0.5$ (*) y $p \leq (**)$ 0.1 se consideran valores significativos frente al control.

8. Anexos

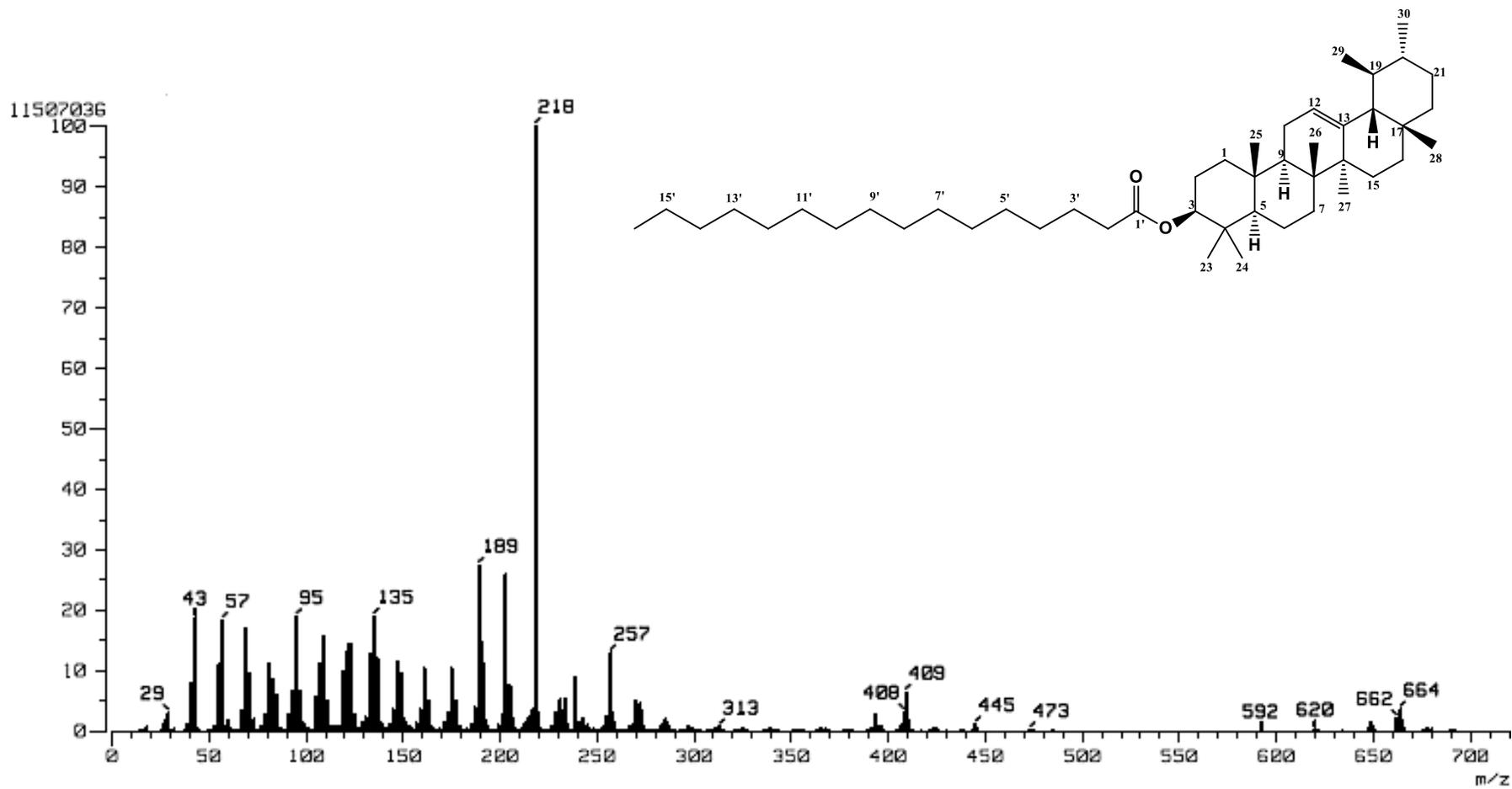
8.1 Espectros



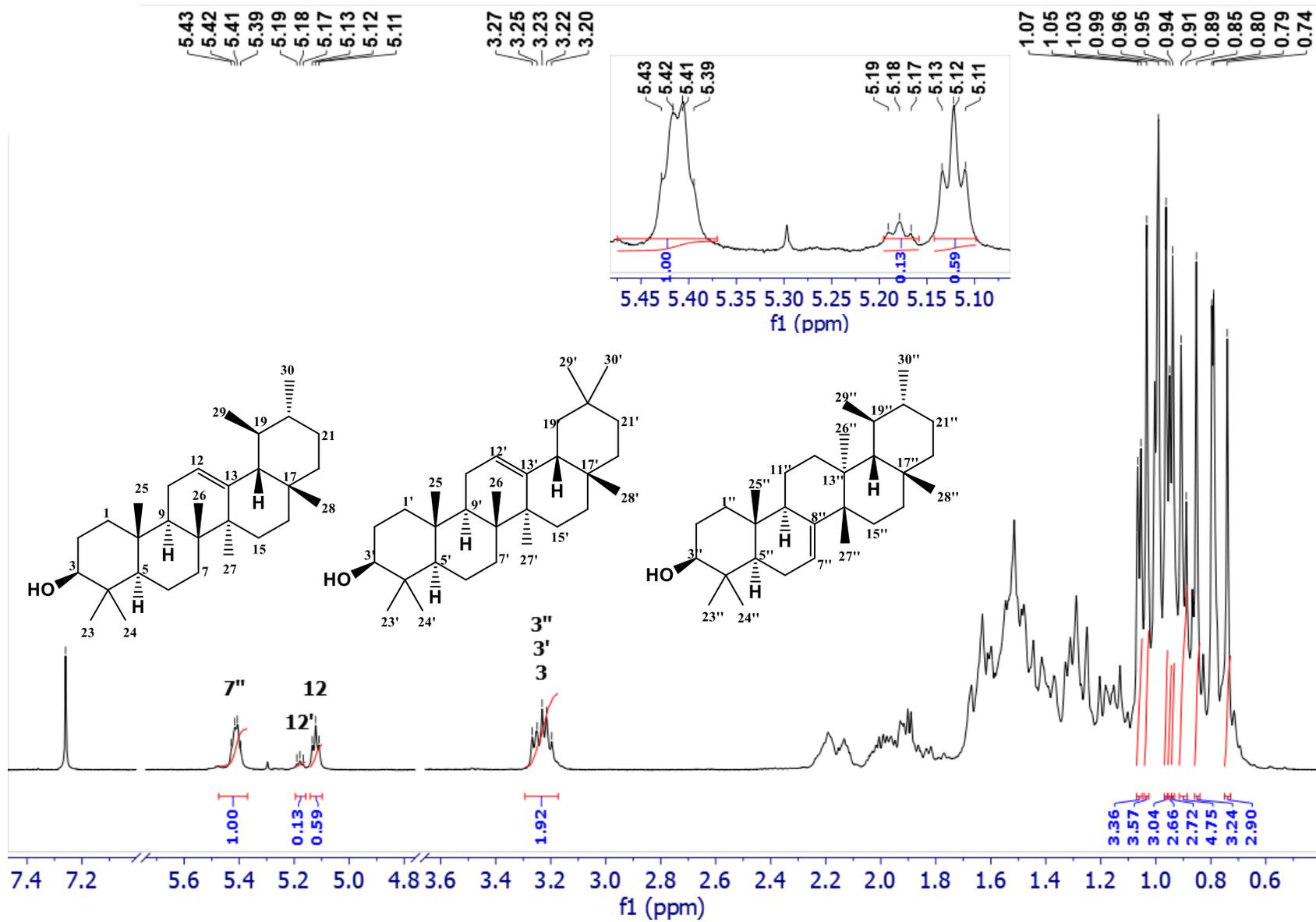
Espectro 1. RMN^1H (400 MHz, CDCl_3). Hexadecanoato de α -amirina (25).



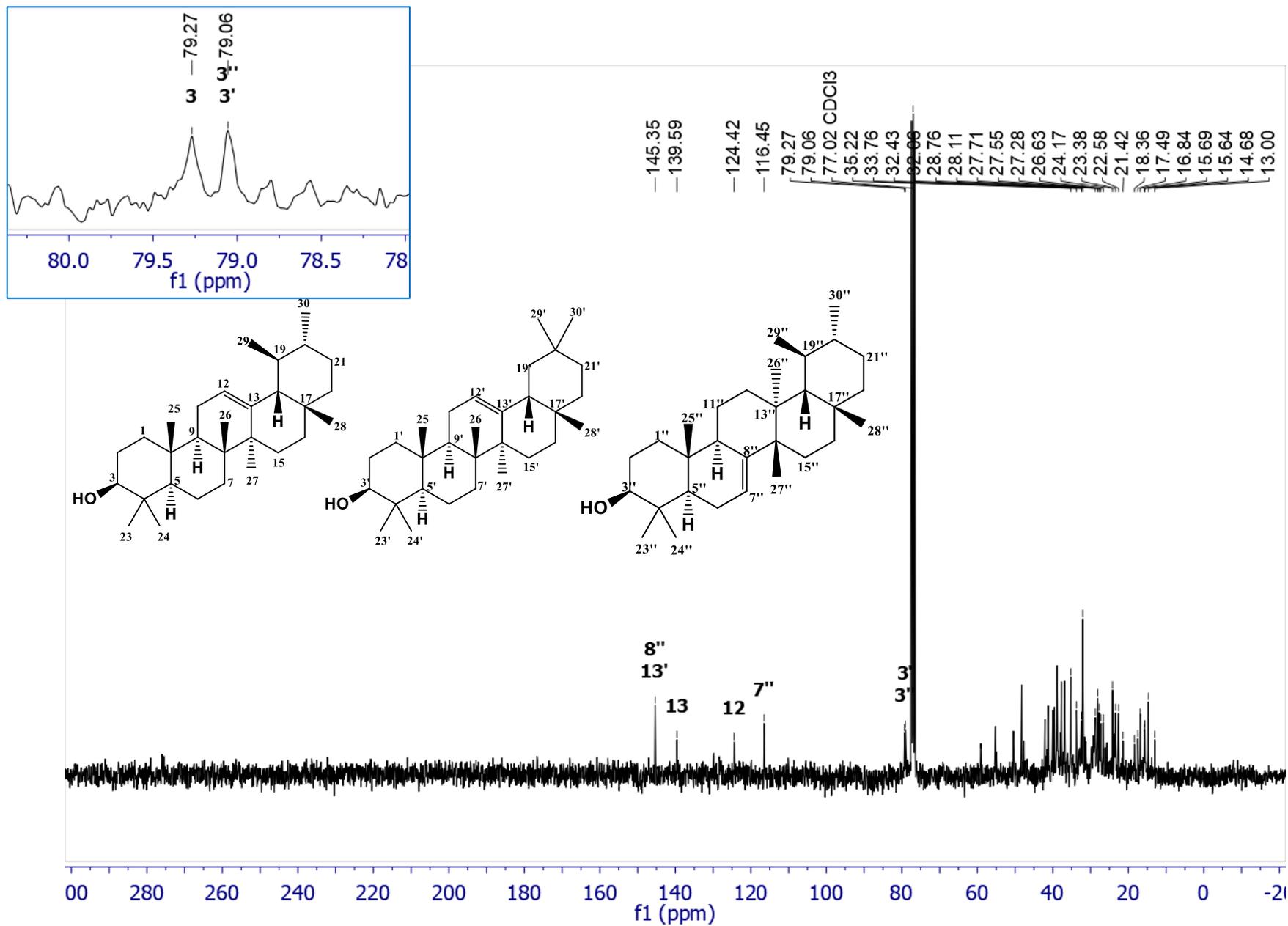
Espectro 2. RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3). Hexadecanoato de α -amirina (25).



Espectro 3. EMIE 70 eV. Hexadecanoato de α -amirina (25).



Espectro 4. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3). α -amirina (10), β -amirina (9) y bauerenol (12).



Espectro 5. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3). α -amirina (10), β -amirina (9) y bauerenol (12).

File: 311 DD-C-1
Sample: Dr Delgado Guillermo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

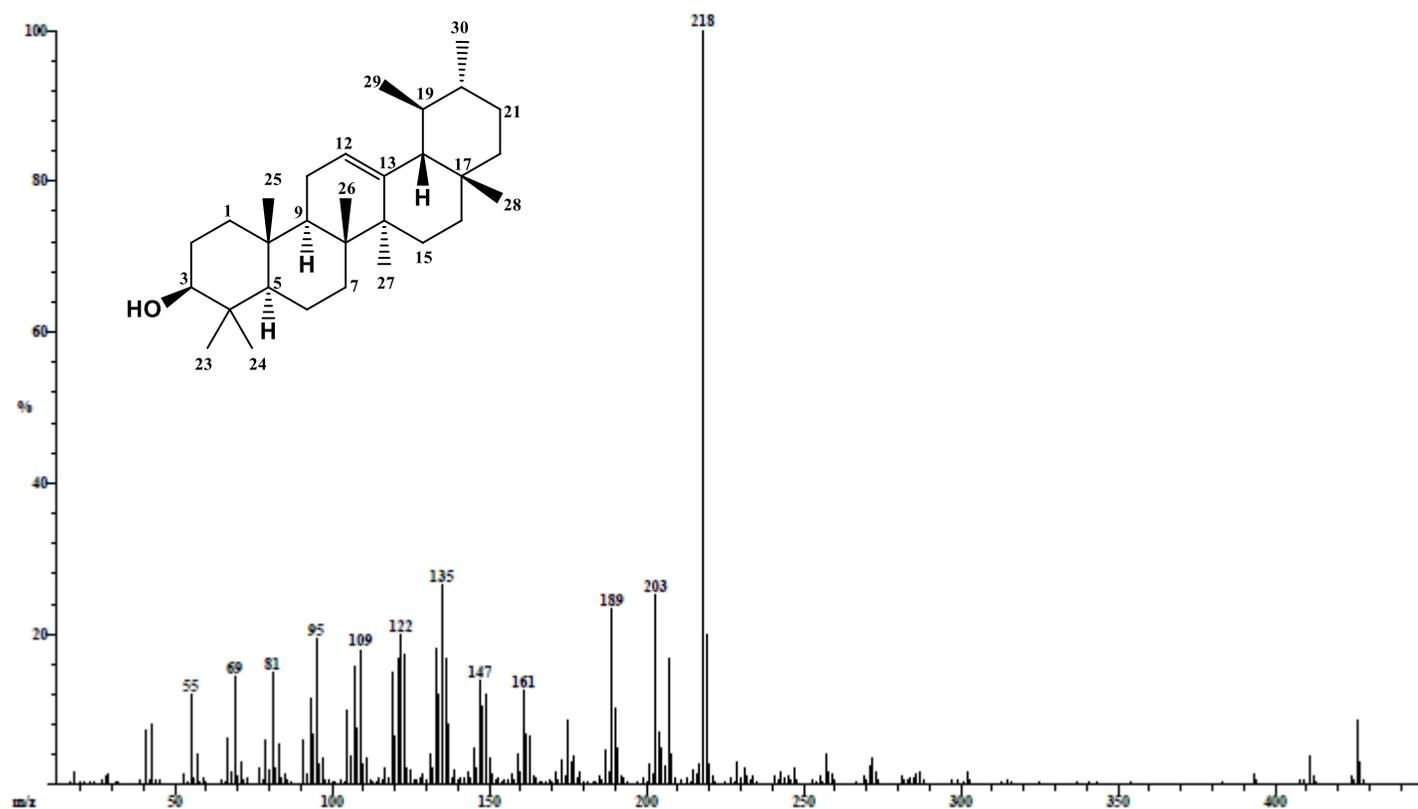
Date Run: 03-05-2018 (Time Run: 17:31:58)

Ionization mode: EI+

Scan: 2776
Base: m/z 218; 3.5%FS TIC: 1288600

R.T.: 27.12

#Ions: 271



Espectro 6. EMIE 70 eV. α -amirina (10).

File: 311 DD-C-1
Sample: Dr Delgado Guillermo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 03-05-2018 (Time Run: 17:31:58)

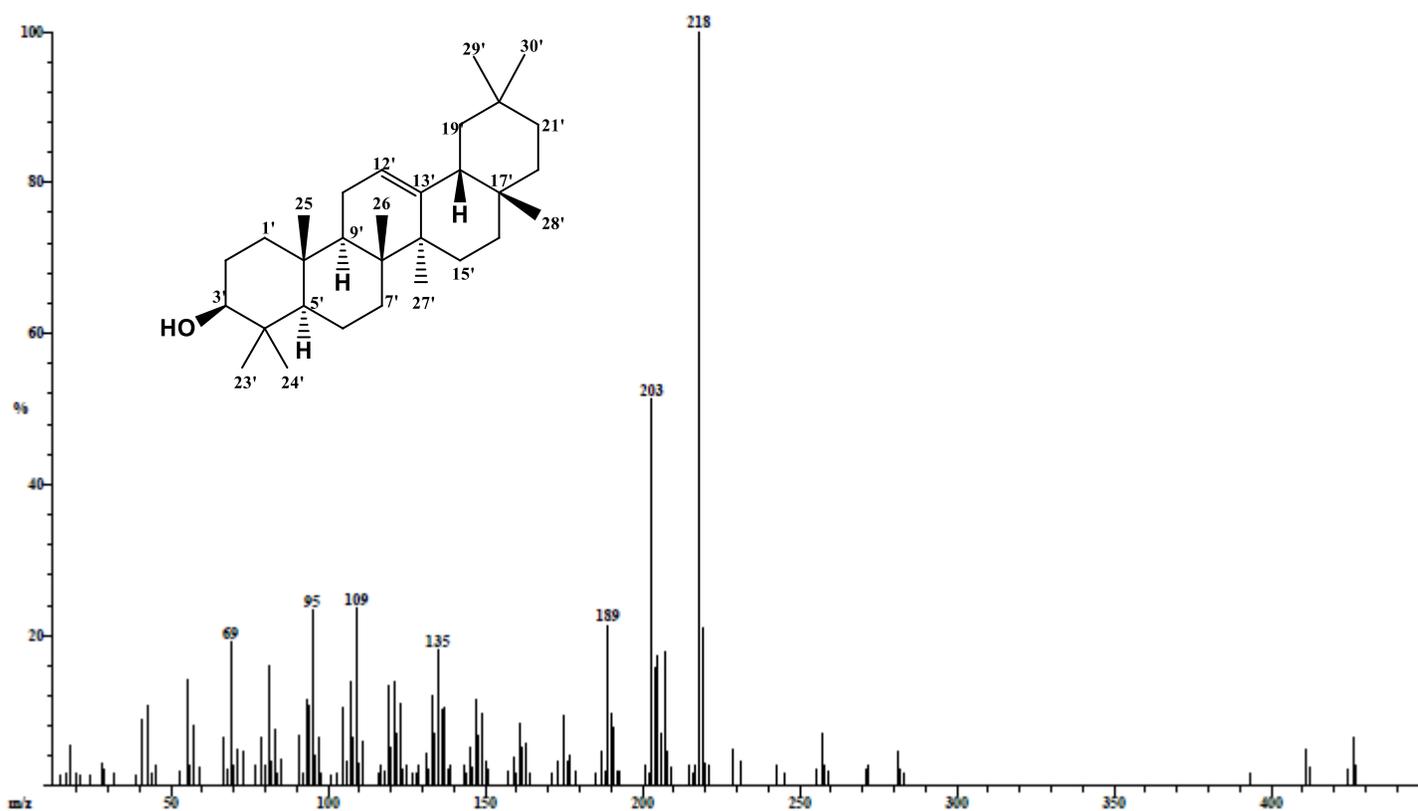
Ionization mode: EI+

Scan: 2724

R.T.: 26.69

#Ions: 165

Base: m/z 218; .7%FS TIC: 289032



Espectro 7. EMIE 70 eV. β -amirina (9).

File: 311 DD-C-1
Sample: Dr Delgado Guillermo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

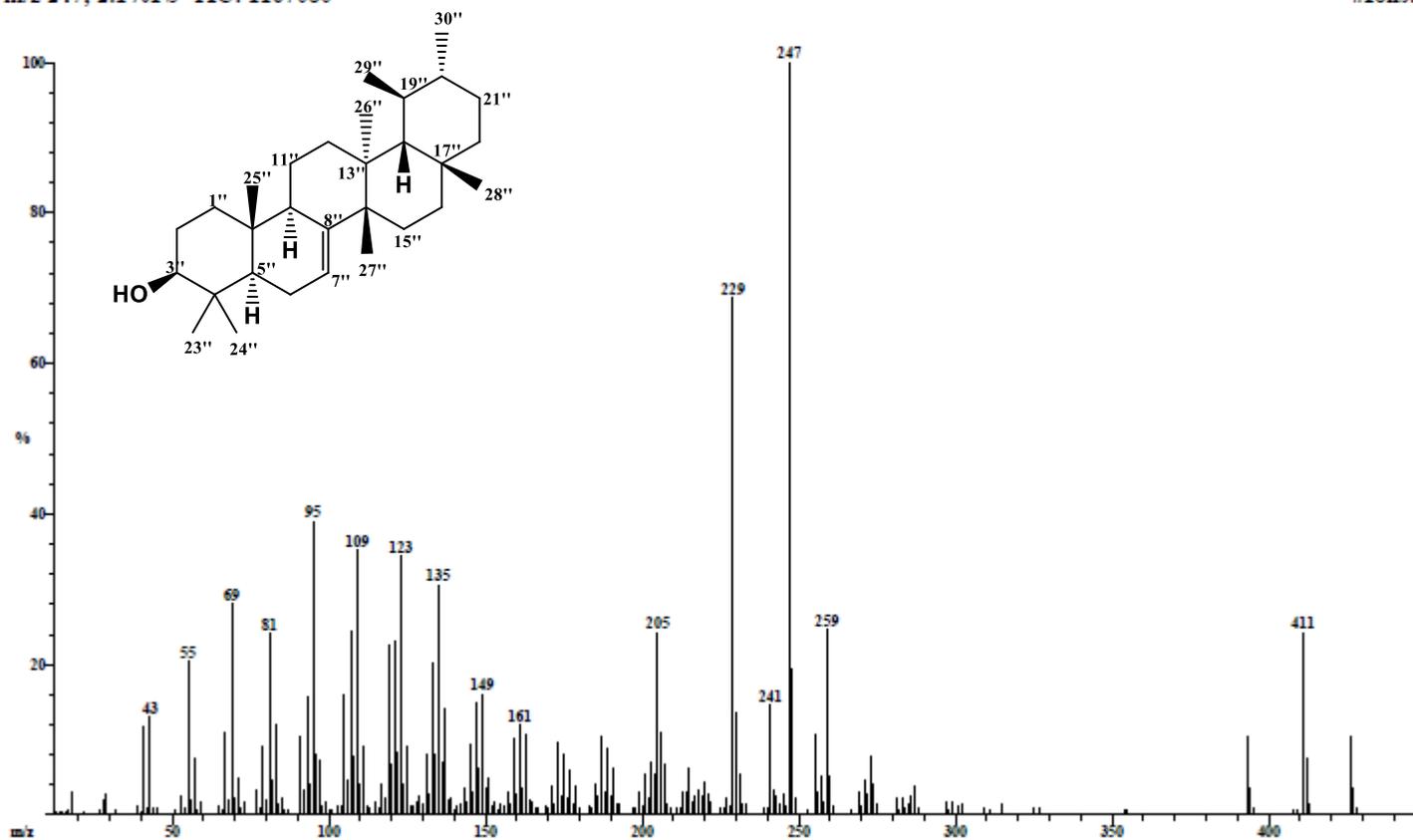
Date Run: 03-05-2018 (Time Run: 17:31:58)

Ionization mode: EI+

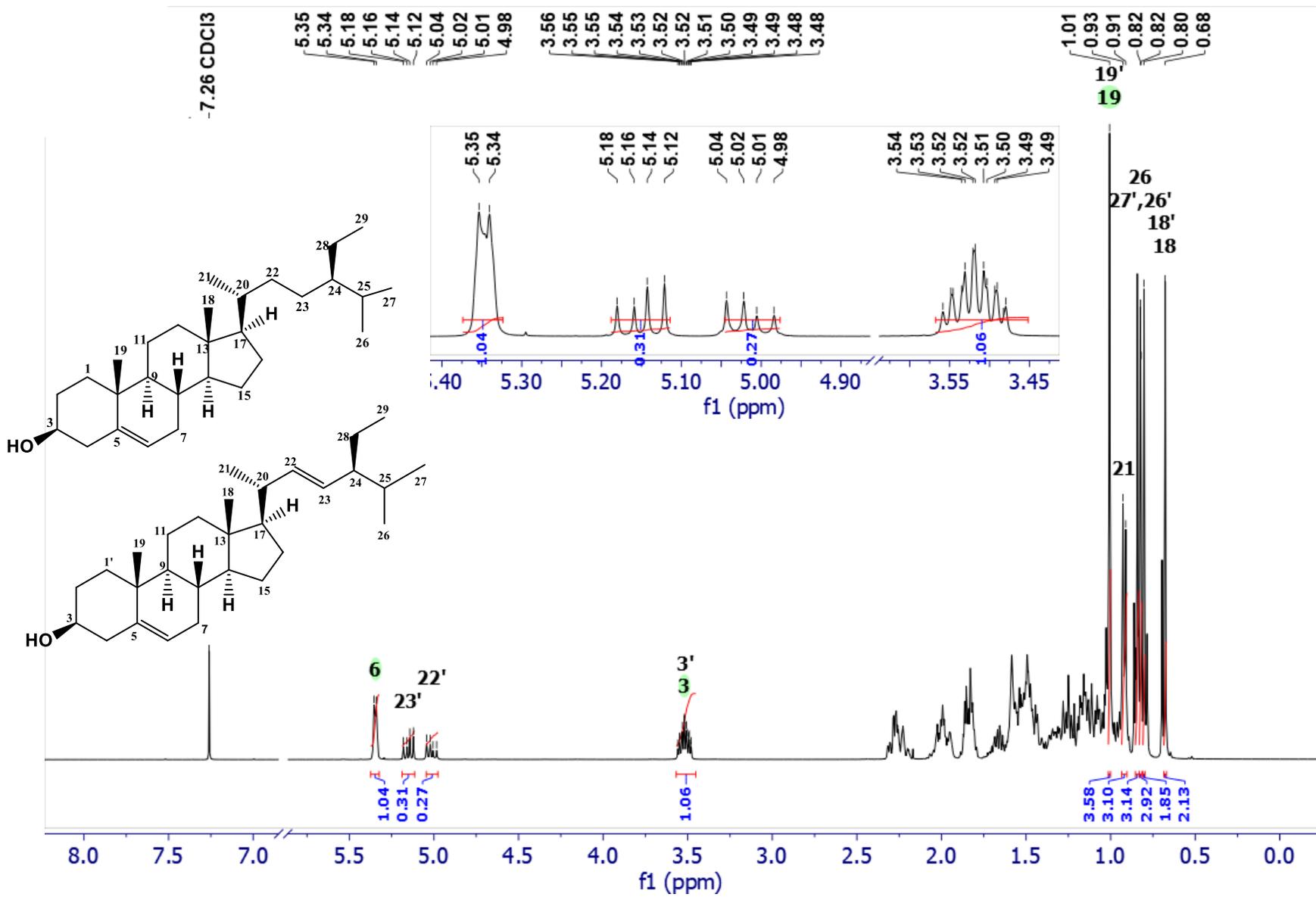
Scan: 2891
Base: m/z 247; 2.1%FS TIC: 1167080

R.T.: 28.08

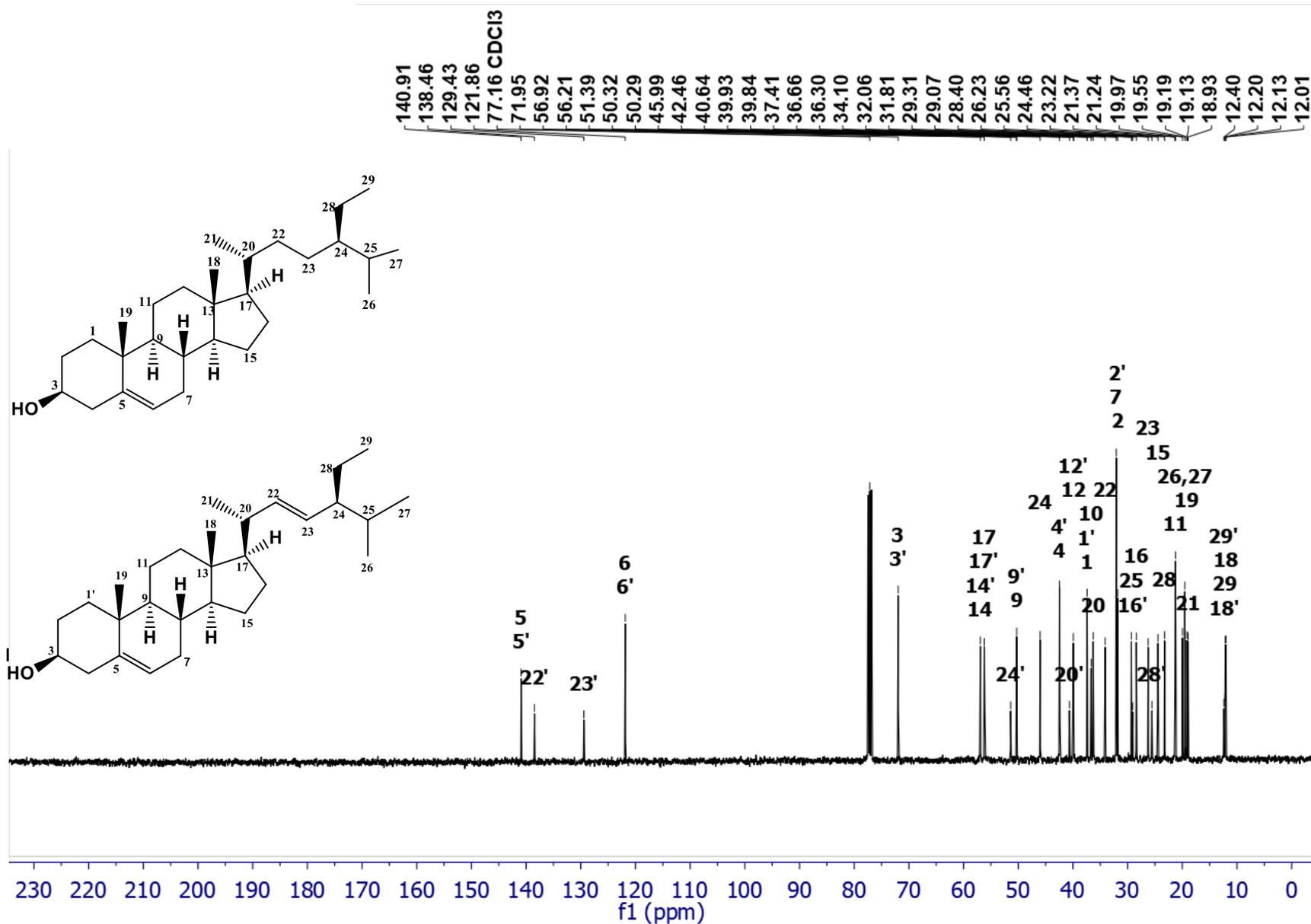
#Ions: 265



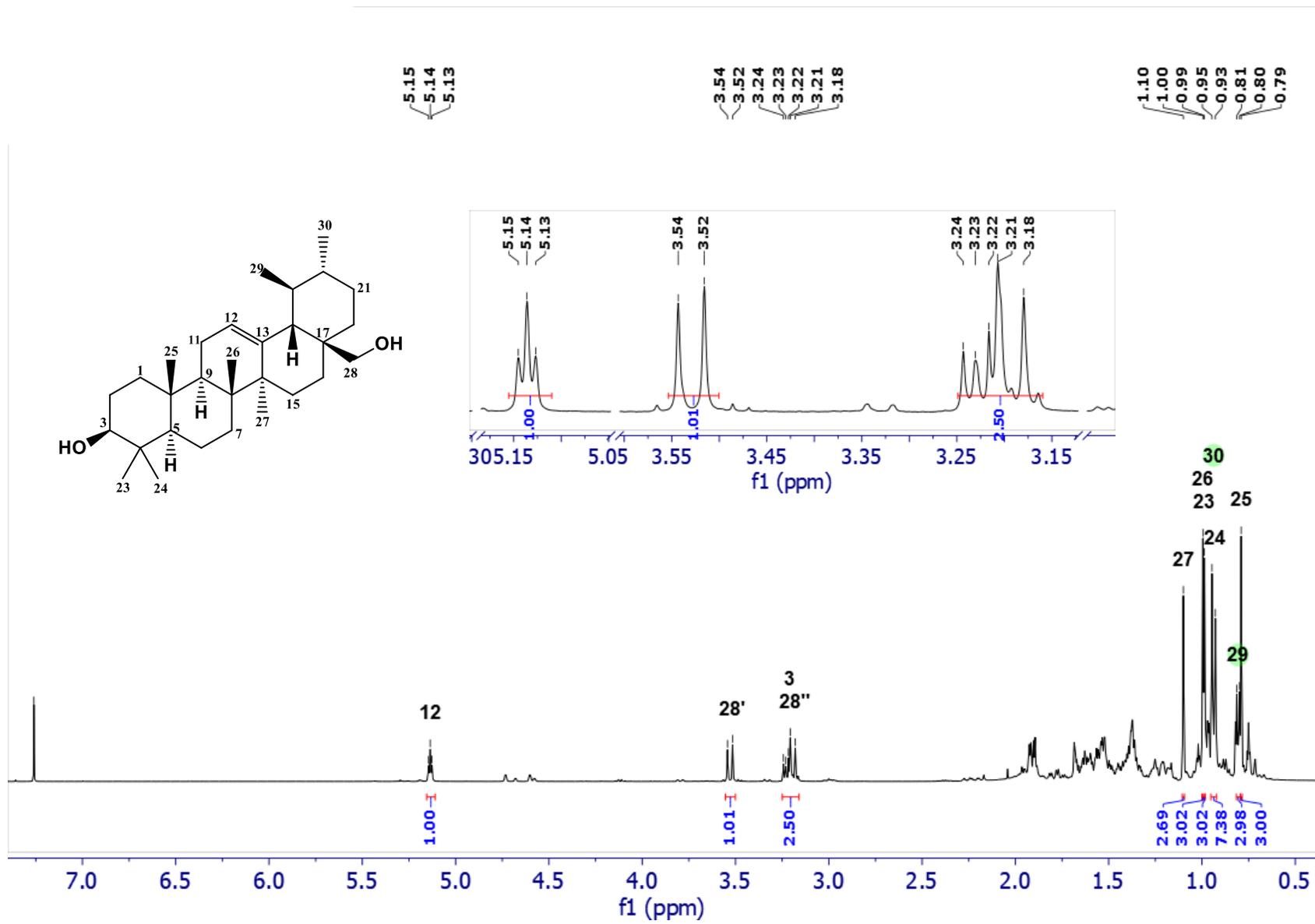
Espectro 8. EMIE 70 eV. Bauerenol (12).



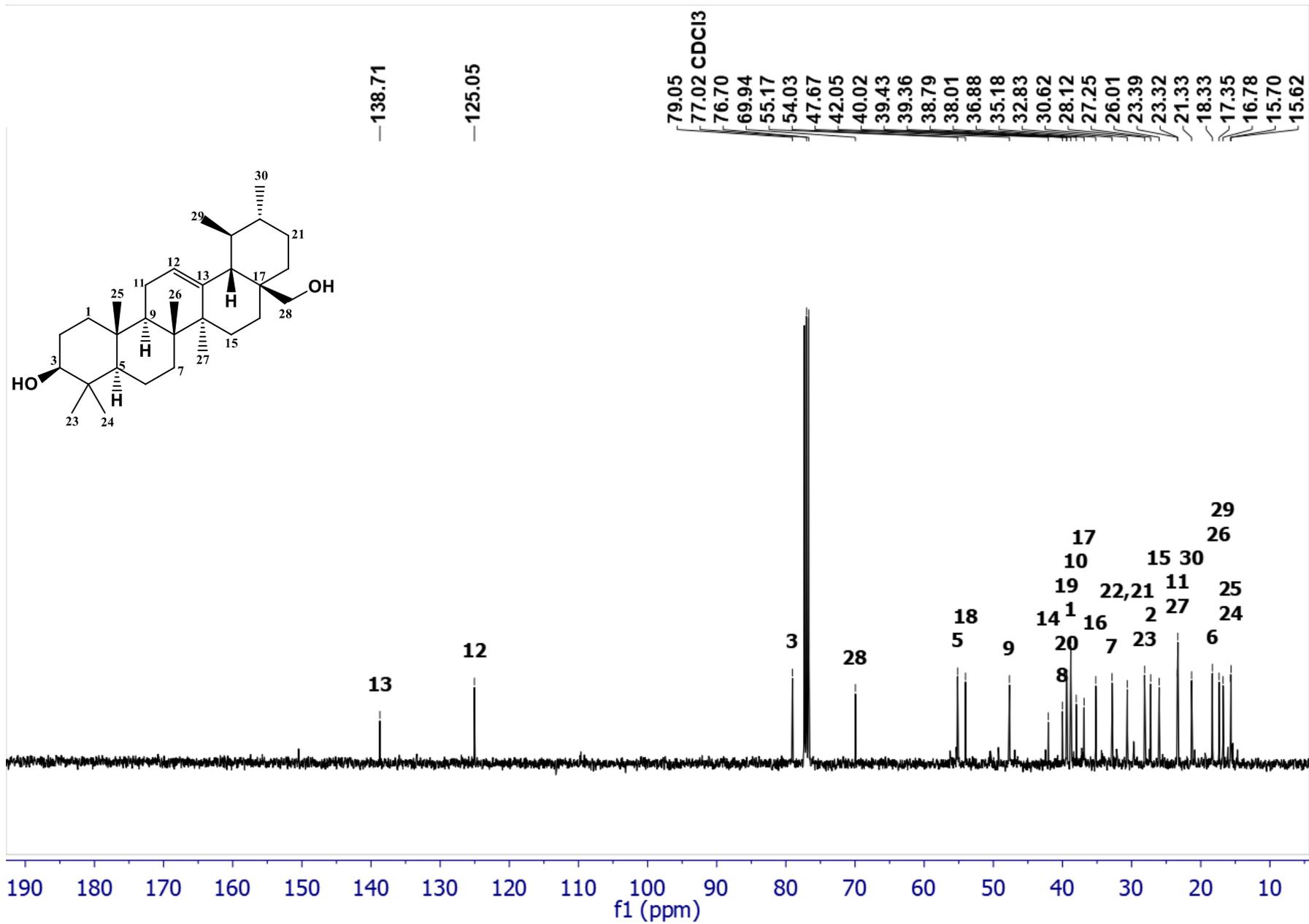
Espectro 9 RMN ¹H. (400 MHz, CDCl₃). β-sitosterol (26) y estigmasterol (27).



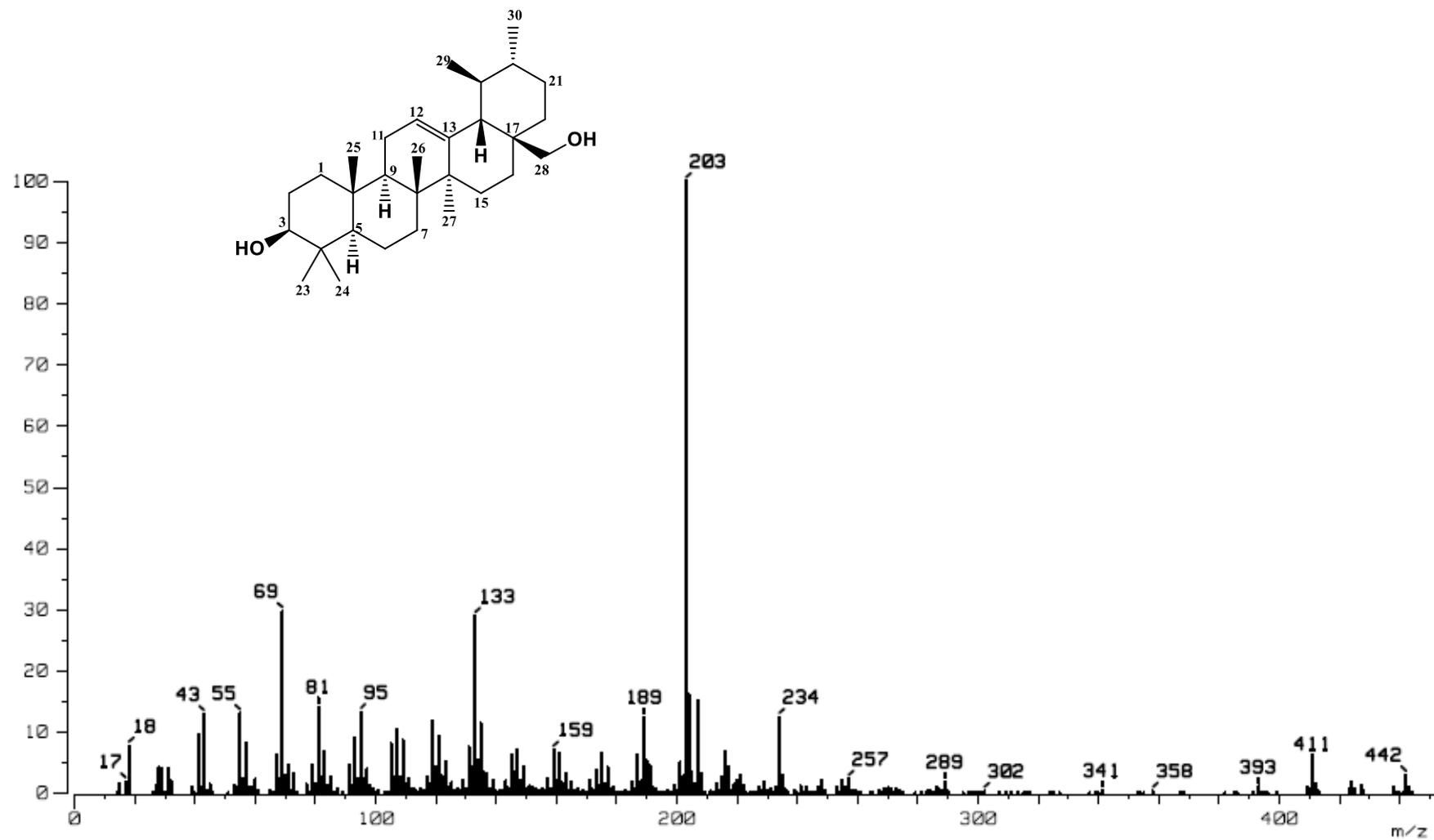
Espectro 10. RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃). β-sitosterol (**26**) y estigmasterol (**27**).



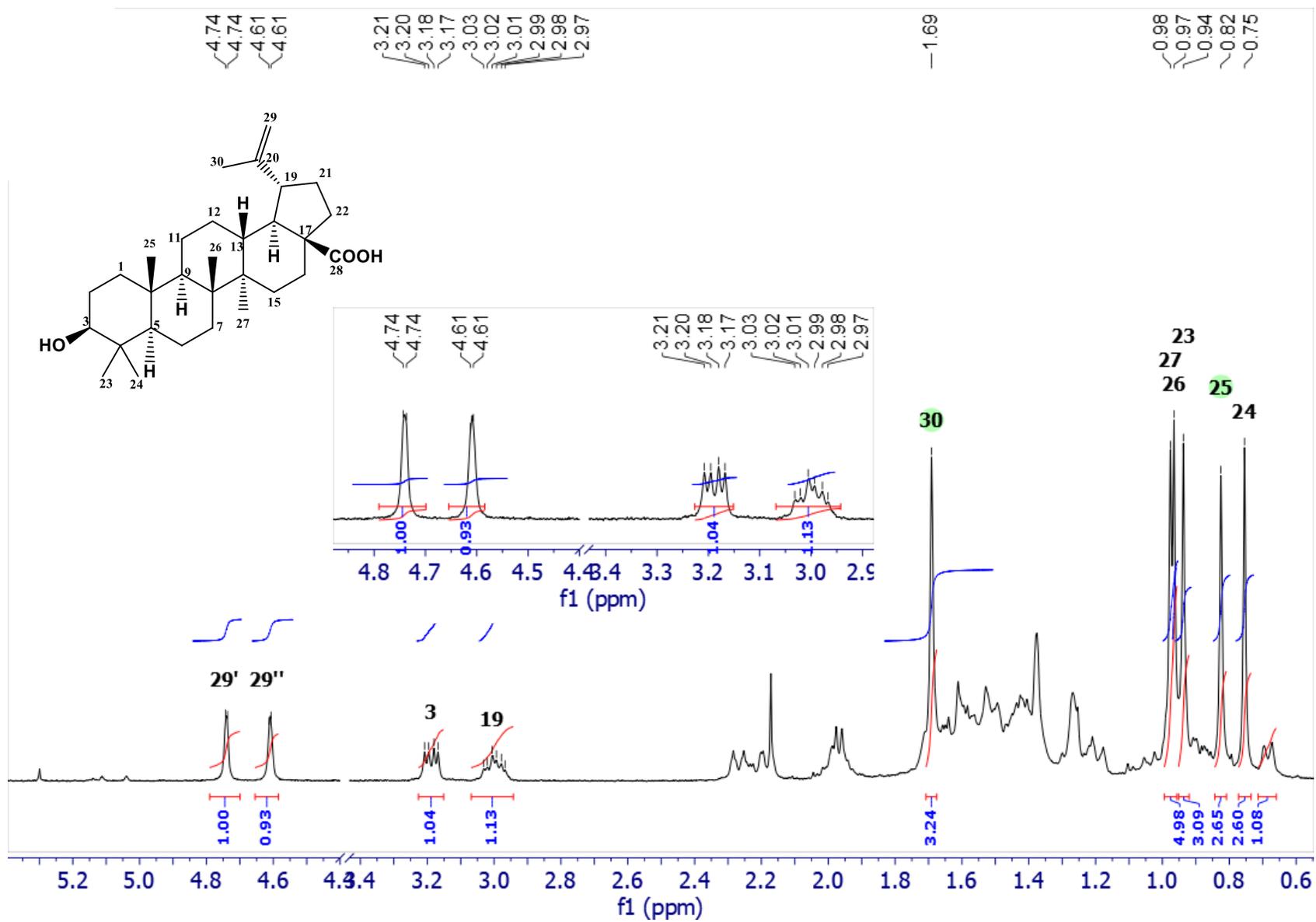
Espectro 11. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃). Uvaol (28).



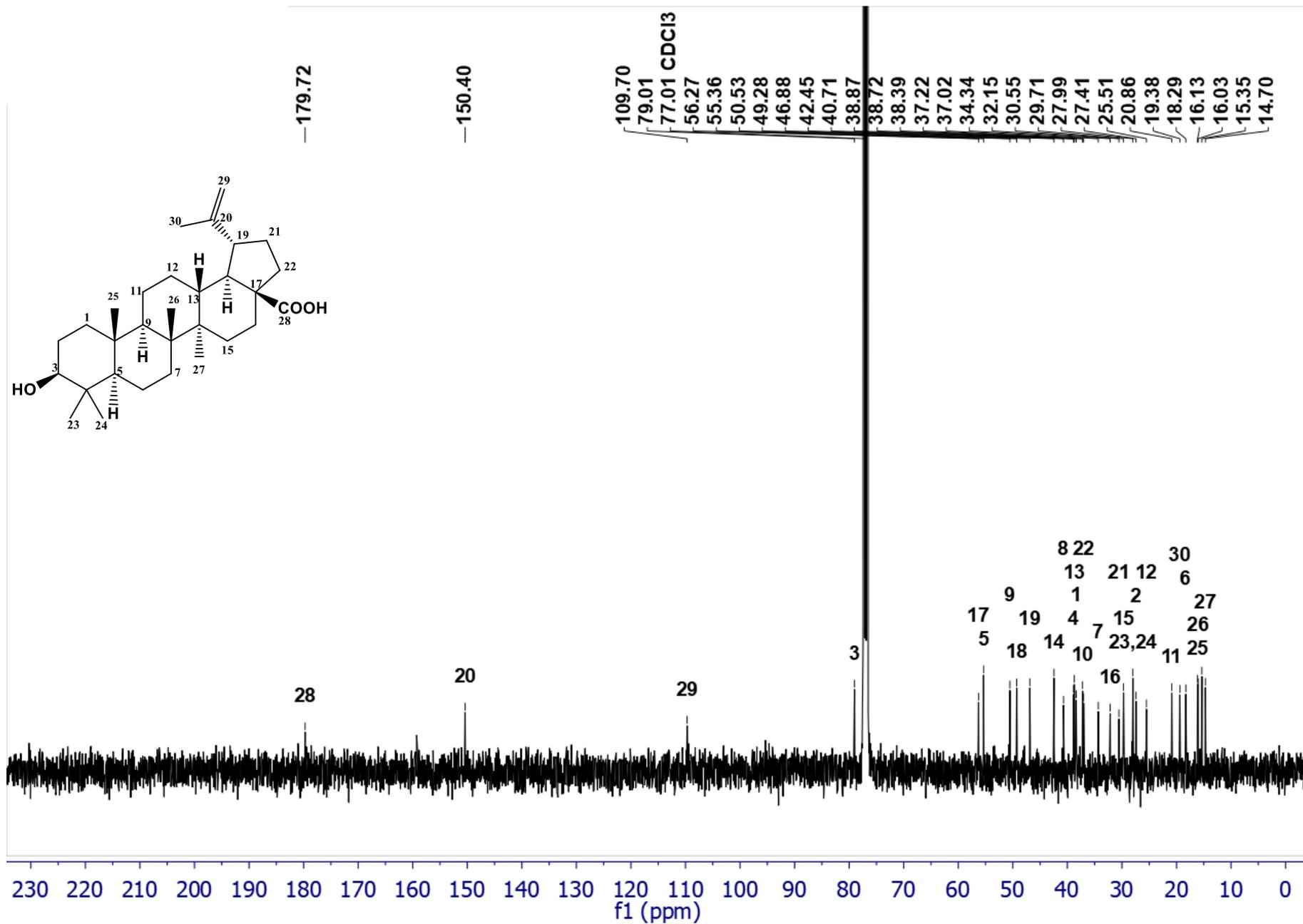
Espectro 12. RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3). Uvaol (28).



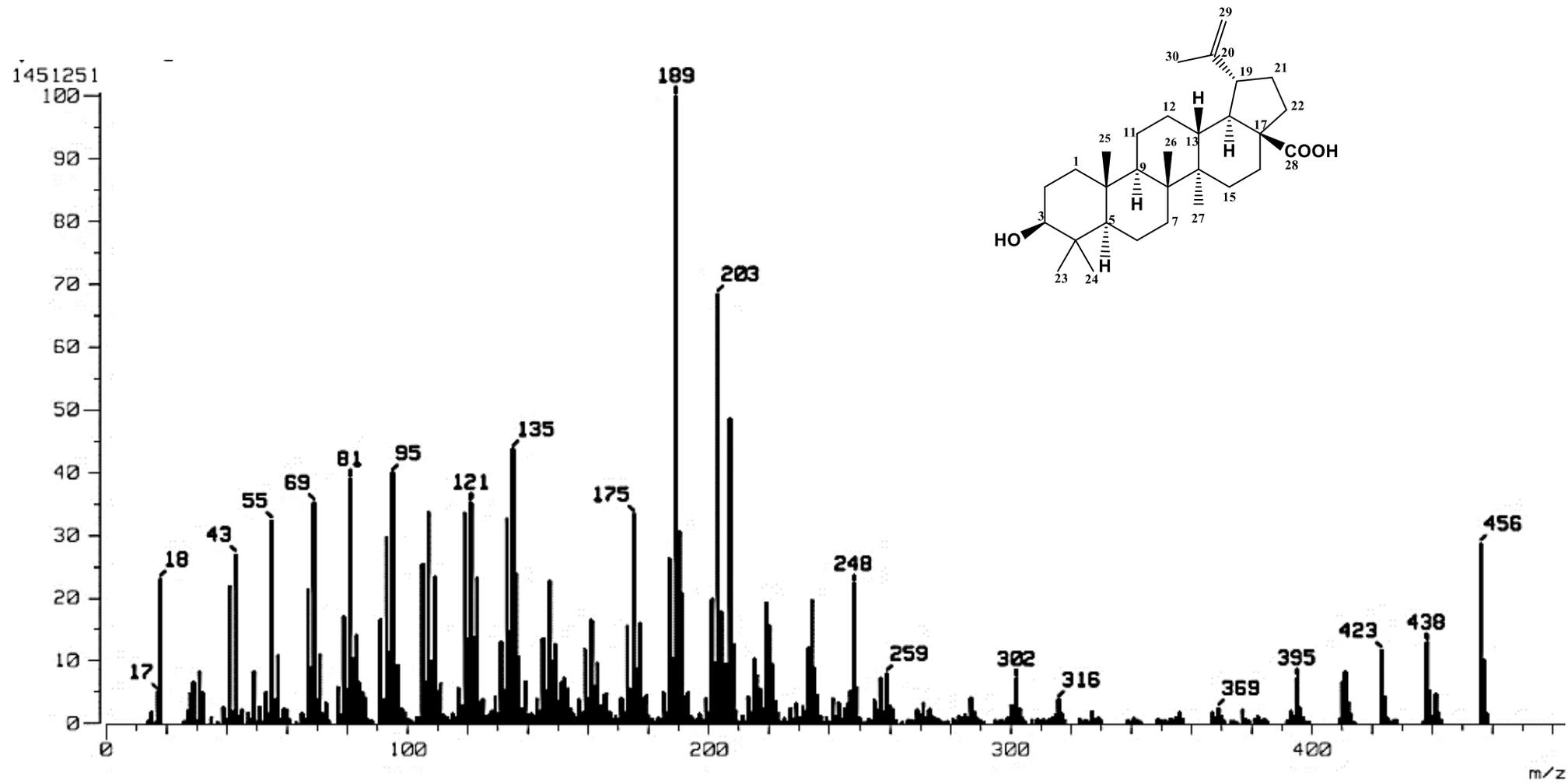
Espectro 13. EMIE 70 eV. Uvaol (**28**).



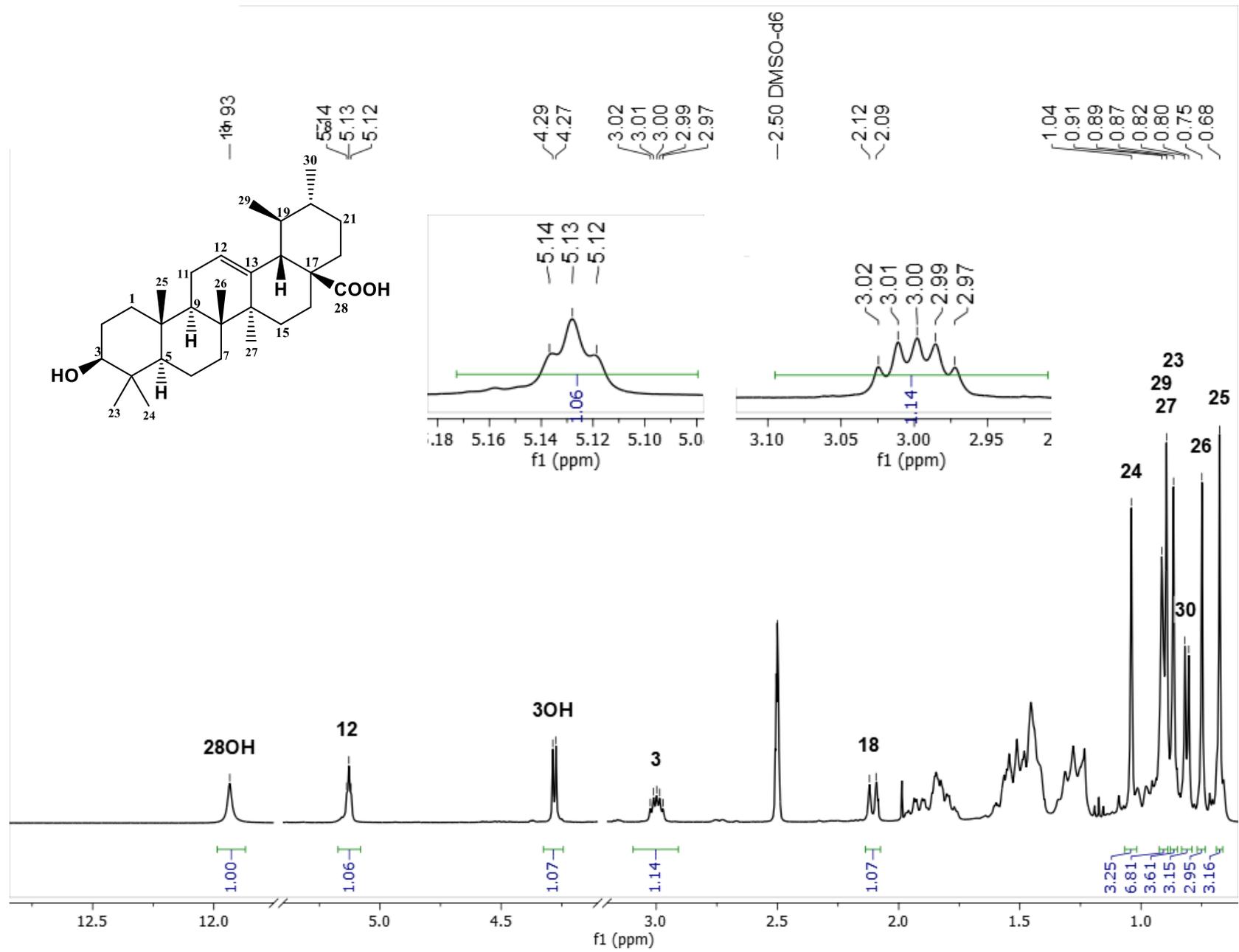
Espectro 14. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃). Ácido betulínico (8).



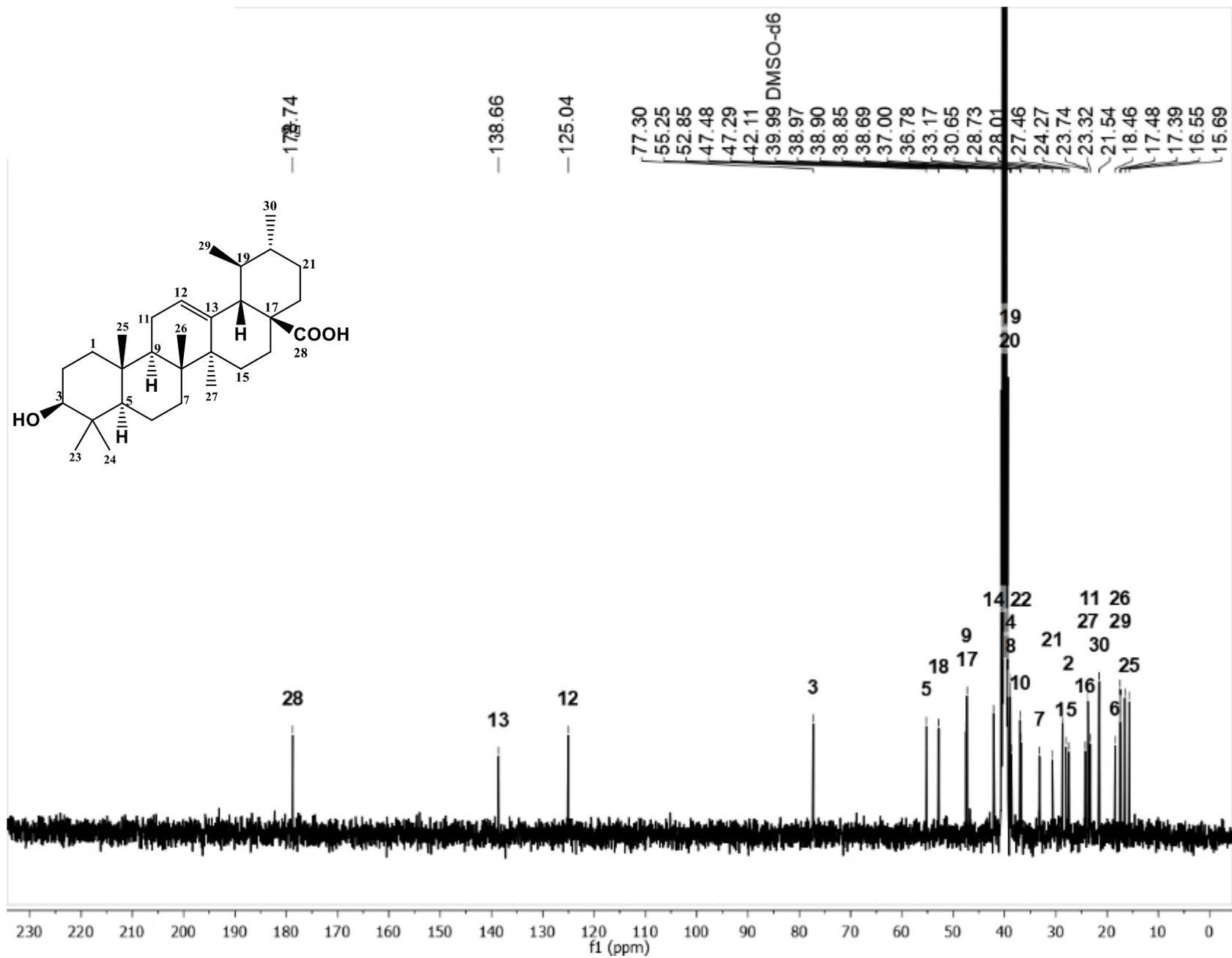
Espectro 15. RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃). Ácido betulínico (8).



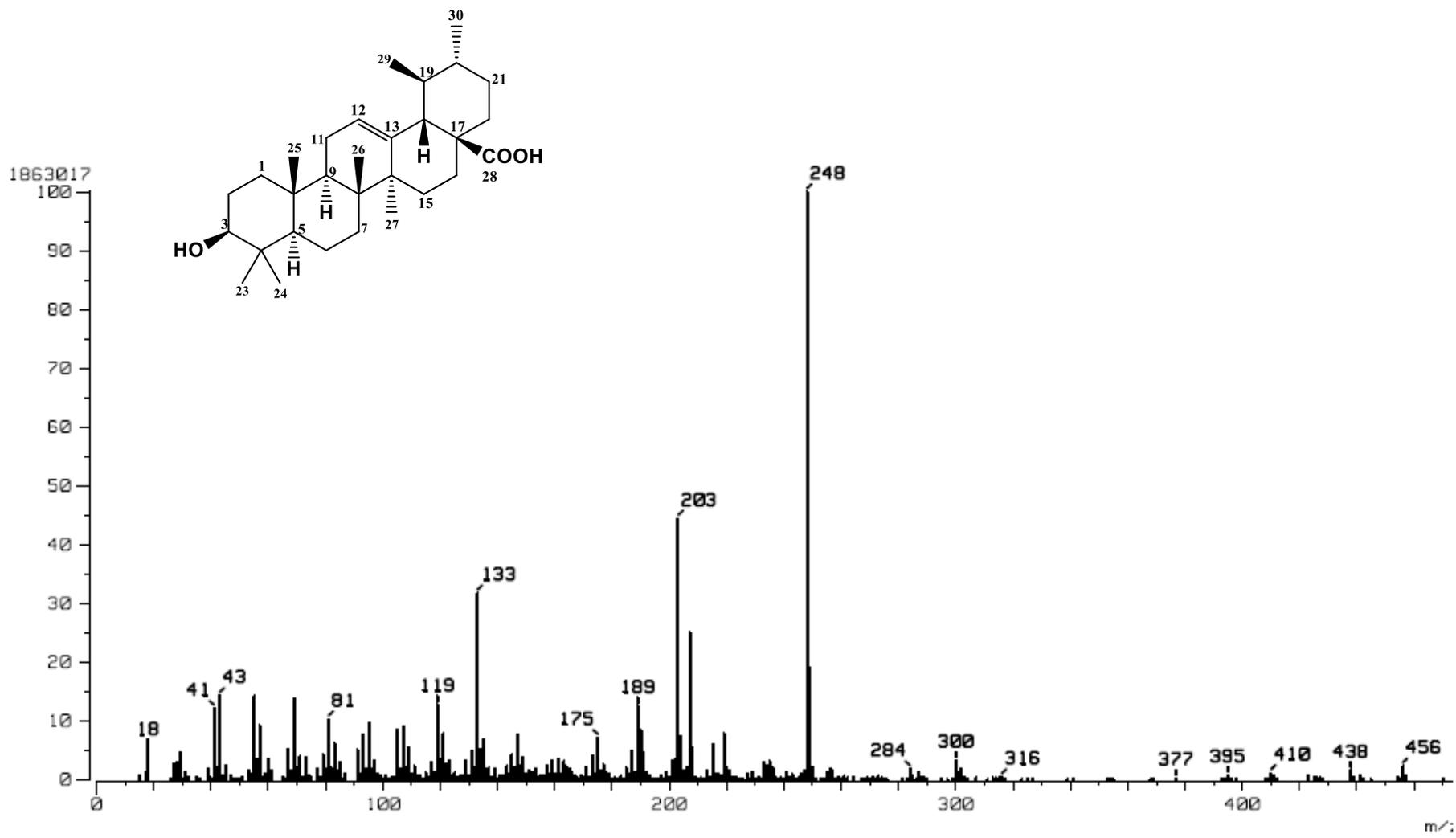
Espectro 16. EMIE 70 eV. Ácido betulínico (8).



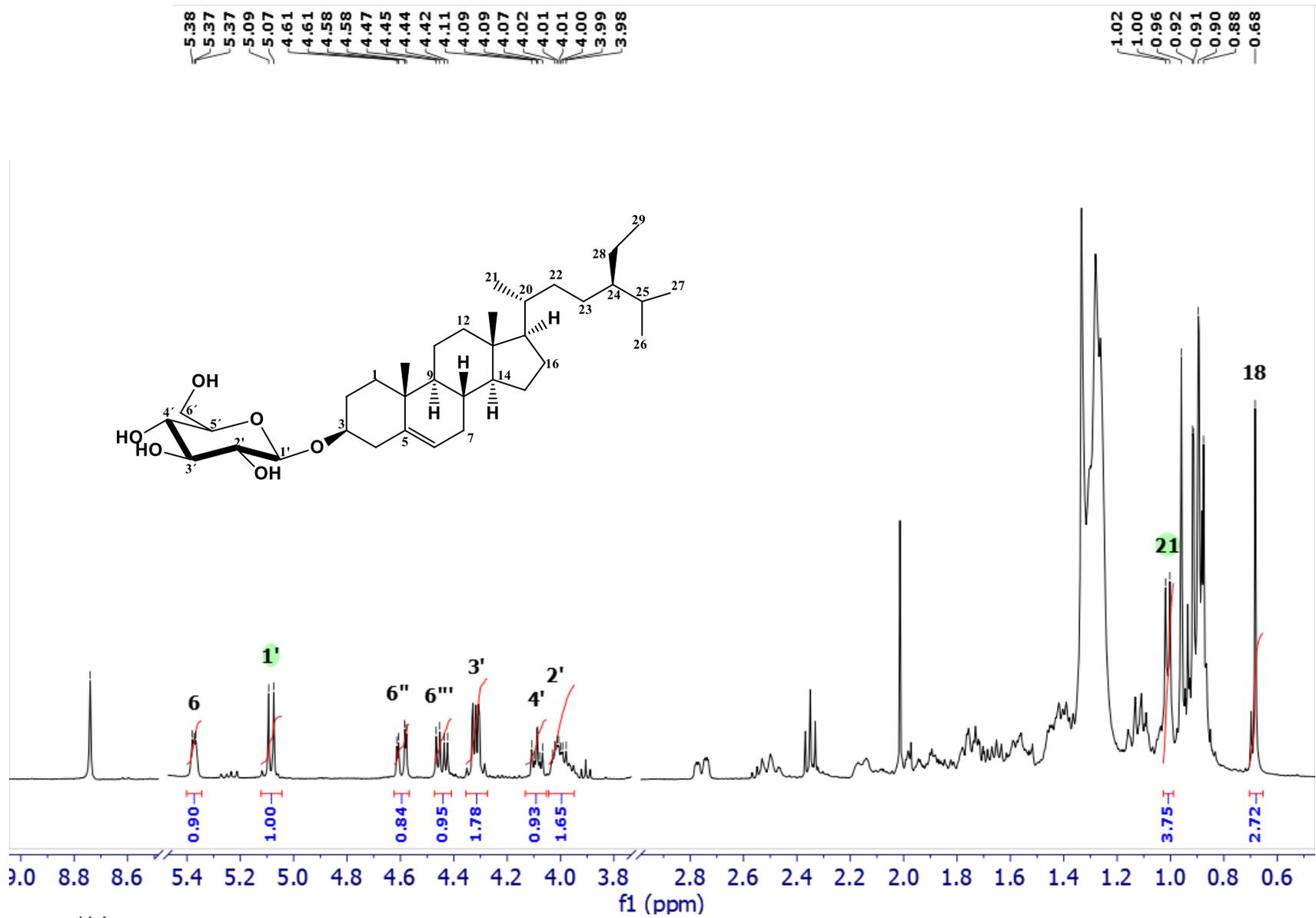
Espectro 17. RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆). Ácido ursólico (6).



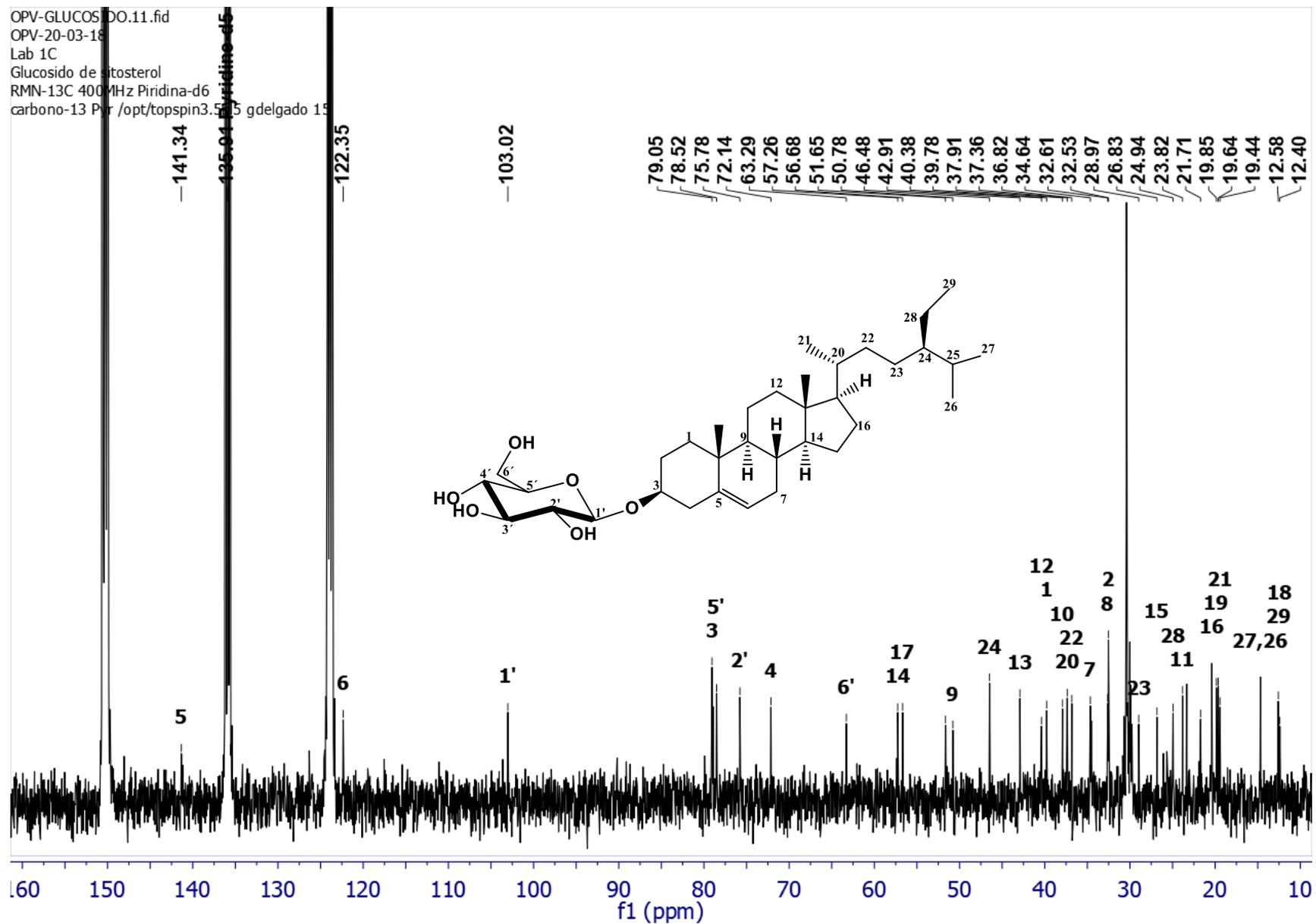
Espectro 18. RMN ^1H (100 MHz, DMSO-d₆). Ácido ursólico (6).



Espectro 19. EMIE 70 eV. Ácido ursólico (6).



Espectro 20. RMN ^1H . (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (29).



Espectro 21. RMN ^{13}C . (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**29**).

9. Referencias

1. Pimm, S.; Joppa, L. How many plants species are there, Where are they, and at what rate are they going extinct? *Ann. Missouri Bot. Gard.* **2015**, *100*, 170-176.
2. Di Giusto, B.; Bessiere, J.; Guérout, M.; Lim, L.; Marshall, D.; Hossaert, M. Flower-scent mimicry masks a deadly trap in the carnivorous plant *Nepenthes rafflesiana*. *J. Ecol.* **2010**, *98*, 845-856.
3. Peyrat, L.; Eparvier, V.; Eydoux, C.; Guillemot, J.; Stien, D.; Litaudon, M. Chemical diversity and antiviral potential in the pantropical *Diospyros* genus. *Fitoterapia* **2016**, *112*, 9-15.
4. Møller, A.; Jensen, T. Pain and genes: Genetic contribution to pain variability, chronic pain and analgesic responses. *Eur. J. Pain Suppl.* **2010**, *4*, 197-201.
5. Manhapra, A.; Becker, W. Pain and Addiction: An Integrative Therapeutic Approach. *Med. Clin. North Am.* **2018**, *102*, 745-763.
6. Madrigal-Sánchez, X.; Rzedowski, J. Una especie nueva de *Diospyros* (Ebenaceae) del municipio de Morelia, estado de Michoacán (México). *Act. Bot. Mex.* **1988**, *1*, 3-6.
7. Torres, I.; Arizaga, S. Nota sobre nuevas localidades de poblaciones silvestres del zapote prieto (*Diospyros xolocotzii*, Ebenaceae), especie amenazada del occidente de México *Act. Bot. Mex.* **2014**, *107*, 19-26.
8. Chang, T.; Huang, S.; Chang, Y.; Chang, C.; Yang, H.; Deng, Y.; Kuo, Y.; Huang, G. Analgesic effects and Mechanisms Anti-inflammation de Taraxeren-3-one from *Diospyros marítima* in Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9112-9119.
9. Uddin, G.; Rauf, A.; Siddiqui, B.; Muhammad, N.; Khan, A. Ali, S. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L. *Phytomed.* **2014**, *21*, 954-959.
10. Kelly, M.; Ochoterena, H.; Medina, R. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.* **2001**, *34*, 1-5.

11. Geeraerts, A.; Raeymakers, J.; Vinckier, S.; Pletsers, A.; Smets, E.; Huysmans, S. Systematic palynology Ebenaceae with focus on Ebenoideae: Morphological diversity and character evolution. *Rev. Paleo. & Palyn.* **2009**, *153*, 336-353.
12. Díaz, R.; Cuevas, J.; Segura, L.; Basurto, F. Panbiogeographic analysis of *Diospyros* spp. (Ebenaceae) in Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* **2015**, *6*, 187-200.
13. Rauf, A.; Uddin, G.; Patel, S.; Khan, A.; Ahsan, S.; Bawazeer, S.; Ahmad, K.; Muhammad, N.; Mubarak, M.; *Diospyros*, an under-utilized, multipurpose plant genus: A review. *Biomed. & Pharm.* **2017**, *91*, 714-730.
14. Xie, C.; Xie, Z.; Xu, X.; Yang, D. Persimmon (*Diospyros kaki*) leaves: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *J. Ethnopharm.* **2015**, *163*, 229-240.
15. Chivandi, E.; Erlwagner, K. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Chapter 10. Elsevier. **2011**. 147-152.
16. Kim, L.T. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Springer. **2012**. 425-427.
17. Yahia, E.; Gutiérrez-Orozco, F.; Arvizu, C. Phytochemical and antioxidant characterization of the fruit of black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2210-2216.
18. Mociño, J. M.; Sessé, M. *La Real Expedición Botánica a Nueva España*. De la familia Chloranthaceae a familia Euphorbiaceae. Siglo XXI Editores. **2010**, Vol. 5, 230-231.
19. Ankli, A.; Sticher, O.; Heinrich, M. Medical Ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers' consensus as a quantitative criterion. *Econom. Bot.* **1999**, *53*, 144-160.
20. Hallman, G.; Knight R. *Hypocala andremona* (Lepidoptera: Noctuidae) development on eight species of *Diospyros* (Ebenaceae). *The Fla. Entomol.* **1993**, *76*, 461-465.
21. Mallavadhani, U.V.; Panda, A.K.; Rao, Y.R. Pharmacology and Chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 901-951.
22. Lenta, B.; Ngamgwe, R.; Kamdem, L.; Ngatchou, J.; Tantangmo, F.; Antheaume, C.; Kaiser, M.; Ngouela, S.; Tsamo, E.; Sewald, N. Compounds from *Diospyros canaliculata* (Ebenaceae) and their Antiparasitic Activities. *Int. Res. J. Pure and Appl. Chem.* **2015**, *6*, 56-65.

23. Quintanal-Novelo, C.; Moo-Puc, R.; Chale-Dzul, J.; Cáceres-Farfán, M.; Méndez-González, M.; Borges-Argaez. Cytotoxic constituents from the steam bark of *Diospyros cuenata* Standl. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *27*, 1594-1597.
24. Huang, S.; Qiao, J.; Sun, X.; Gao, P. Li, L.; Liu, Q.; Sun, B.; Wu, D.; Song, S. Secoiridoids and lignans from the leaves of *Diospyros kaki* Thumb. with antioxidant and neuroprotective activities. *J. Funct. Foods* **2016**, *24*, 183-195.
25. Rashed, K.; Ciric, A.; Glamoclija, J.; Sokovic, M. Antibacterial and Antifungal activities of metanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *59*, 210-215.
26. Romo, A. Productos Naturales de la Flora Mexicana. Limusa. 1ª Edición. **1985**, 155.
27. Talapatra S.; Talapatra, B. Chemistry of Plant Natural Products. **2015**. Springer. Chapter 10. 517-548.
28. Xu, R.; Faczio, G.; Matsuda, S. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-291.
29. Kassi, E.; Papoutsis, Z.; Pratsinis, H.; Aligiannis, N.; Manoussakis, M.; Moutsatsou, P. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2007**, *133*, 493-500.
30. Collá, A.; RosA, J.; Cunha, M.; Rodrigues, A. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. *Eur. J. Pharm.* **2015**, *758*, 171-176.
31. Basu, S., Ma, R.; Boyle, P.; Mikulla, B.; Bradley, M.; Smith B.; Basu, M.; Banerjee, S. Apoptosis of human carcinoma cells in the presence of potential anti-cancer drugs: III. Treatment of Colo-205 and SKBR3 cells with: cis-platin, tamoxifen, melphalan, betulinic acid, L-PDMP, L-PPMP, and GD3 gangloside. *Glyc. J.* **2004**, *20*, 563-577.
32. Ishii, M.; Nakahara, T.; Ikeuchi, S.; Nishimura, M. β -amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2015**, *467*, 676-682.
33. González, A.; López-Balboa, C.; Santana, O. Reina, M.; Fraga, B.; Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 245-260.
34. Mallavadhani, U.; Mahapatra, A.; Jamil, K.; Reddy, P.; Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1576-1579.

35. Wu, Y.; Zhang, W.; Li, J.; Liu, N. Chemical constituents of flowers and fruits of *Rabdosia excisa*. *Chin. J. Nat. Med.* **2012**, *10*, 43-47.
36. Chen, D.; Xu, F.; Zhang, P.; Deng, J.; Sun, H.; Wen, X.; Liu, J. Practical Synthesis of α -Amyrin, β -Amyrin, and Lupeol: The Potential Natural Inhibitors of Human Oxidosqualene Cyclase. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2017**, *350*, 1-9.
37. Kushiro, T.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. β -Amyrin synthase. Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 238-244.
38. Raga, D.; Herrera, A.; Ragasa, C. Angio-suppressive triterpenoids from *Ardisia cf. elliptica* (subgenus *Tinus*) on duck (*Anas platyrhynchos* L.) chorioallantoic membrane. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 128-138.
39. Maeksuriyen, D.; Dhammika, N.; Phoebe, C.; Cordell, G.; Two triterpenes from *Davidsonia pruriens*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1685-1689.
40. Budzikiewicz, H.; Wilson, J.; Djerassi, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3688-3699.
41. Wagner, U.; Kratky, Ch.; Budzikiewicz, H.; Reynolds, W.; Mazzola E.P.; Nathan, J.; Gordillo-Román, B.; Soukup, R.; Soukup, K. Progress in the chemistry of organic natural products. Springer. Switzerland. **2015**, 90-99.
42. Talapatra, S.; Subrata, S.; Talapatra, B. A new pentacyclic triterpene alcohol from *Evodia fraxinifolia* Hook F. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *57*, 5963-5968.
43. Ragasa, C.; Espineli, D.; Agoo, E. Chemical constituents of *Cinnamomum cebuense*. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 264-268.
44. Koingduang, D.; Wungsintaweekul, J.; De-Eknamkul, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4067-4072.
45. Pierre, L.; Moses, M. Isolation and Characterisation of stigmasterol and β -sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.* **2015**, *2*, 88-95.

46. De-Eknamkul, W.; Potduang, B. Biosynthesis of b-sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 389-398.
47. D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Oriano, P.; Pacifico, S. Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. *Annurca apple*. *Food Chem.* **2006**, *98*, 285-290.
48. Zakaria, M.; Jeffreys J.; Waterman, P.; Zhong, S. Naphtoquinones and triterpenes from some Asian *Diospyros* species. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1481-1484.
49. Siddiqui, S.; Hafeez, F.; Begum, S.; Siddiqui, B. Kaneric acid, a new triterpene from the leaves of *Nerium Oleander*. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1086-1090.
50. Frighetto, N.; Welendorf, R.; Pereira, A.; Nakamura, M.; Siani, A. *Phytochem. Anal.* Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by High-speed Counter-current Chromatography. *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 411-414.
51. Galgon, T.; Höke, D.; Dräger, B. Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 187-190.
52. Siddiqui, S.; Hafeez, F.; Begum, S.; Siddiqui, B. Oleanderol, A new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 229-233.
53. Heinzen H.; Vries, J.; Moyna, P.; Remberg, G.; Martínez, R.; Tietze, L. Mass spectrometry of labelled triterpenoids: Thermospray and Electron Impact Ionization Analysis. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 237-244.
54. Tshilanda, D.; Onyamboko, D.; Babady-Bila, P.; Ngbolua, K.; Tshibangu, D.; Dibwe, E.; Mpiana, P. Anti-sickling activity of ursolic acid isolated from the leaves of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). *Nat. Prod. Bioprospect.* **2015**, *5*, 215-221.
55. Wu, L. Wang, G.; Shen, T.; Qiang, Q.; Xue, Q.; Chen, M.; Zhang, J.; Luo, Y.; Hong, Y.; Si, C.; Hu, W. Chemical constituents of leaves of *Mahonia bealei*. *Chem. Nat. Comp.* **2018**, *54*, 210-212.
56. Ragasa, C.; Espineli, D.; Shen, C. Cytotoxic triterpene from *Barringtonia asiatica*. *Pharm. Chem. J.* **2014**, *48*, 531-535.
57. Mendive, J. The occurrence of α -amyrin and ursolic acid in the leaves of *Ilex paraguariensis*. *J. Org. Chem.* **1940**, *05*, 235-237.

58. Kojina, H.; Sato, N.; Hatano, A., Ogura, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2351-2355.
59. Simão, K.; Paszcuk, A.; Passos, G.; Silva, E.; Freire, A.; Meotti, F.; Calixto, J. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α , β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain* **2011**, *152*, 1872-1887.
60. Martínez, A.; González-Trujano, M.; Chávez, M.; Pellicer, F. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from Rosemary in visceral nociception. *J. Ethnopharm.* **2012**, *142*, 28-34.
61. Langford, D.; Mogil, J. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Pain Testing in the laboratory Mouse. Chapter 23. Second edition. Elsevier Inc. **2008**. 553.
62. Collier, H.; Dinneen, L.; Johnson A.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmac. Chemother.* **1968**, *32*, 295-310.
63. Pereira, A.; Carbonell, S.; Radler, F. Fernandes A. Barnes, R. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry with glass capillary columns for screening of natural products. *J. Chrom.* **2002**, *947*, 255-265.
64. Pinho-Ribeiro, F.; Verri, W.; Chiu, I. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends in Immunology.* **2017**, *38*, 5-19.
65. González-Trujano, M.; Ventura-Martínez, R.; Chávez, M.; Díaz- Reval, I. Pellicer, F. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med.* **2012**, *78*, 793-796.