



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Estudio Fitoquímico de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. (*Asteraceae*):
Una contribución al conocimiento de su eficacia y desarrollo de las pruebas
de identidad**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. SOFÍA PADILLA MAYNE

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., enero 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
VOCAL	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
VOCAL	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
VOCAL	Dr. Sol Cristians Niizawa
SECRETARIO	Dr. Andrés Navarrete Castro

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo brindado para continuar con mi preparación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca brindada para realizar mis estudios de maestría (No. de becario 771856) y por el financiamiento otorgado a través del proyecto CONACyT (A1_S_11226).

A la Dra. Rachel Mata Essayag por la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo de investigación, por sus valiosas enseñanzas y consejos. Por ser una gran mentora y un ejemplo a seguir. Gracias.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su importante asesoría técnica, por el tiempo y el apoyo proporcionados durante el desarrollo de este proyecto

A la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz por sus consejos y asesoría técnica.

A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes por su asesoría y el tiempo compartido.

Al Dr. José Serafín Calderón Pardo por sus sugerencias acerca del proyecto y haber proporcionado la especie vegetal.

A la Dra. Martha L. Macías Ruvalcaba por el apoyo brindado en el análisis estructural de los compuestos estudiados.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química: a la Q. Georgina Duarte Lisci, por su asesoría y apoyo en los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial y de la microextracción en fase sólida, y a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo.

Al M. en C. Rafael Torres Colín, del Instituto de Biología, UNAM, por realizar la identificación botánica del material vegetal.

A los miembros del jurado asignado, por sus valiosas observaciones que enriquecieron y mejoraron el contenido de la tesis.

A mi familia y a mis amigos.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE ESQUEMAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
ANTECEDENTES.....	13
1.1 Generalidades sobre el género <i>Melampodium</i>	13
1.2 <i>Melampodium divaricatum</i> (Rich.) DC.....	17
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	27
2.1 Justificación.....	27
2.2 Objetivo general	27
2.3 Objetivos particulares	28
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Material vegetal	28
3.2 Obtención del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i>	28
3.3 Estudio químico	29
3.3.1 Obtención de las fracciones orgánicas del extracto acuoso	29
3.3.2 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de AcOEt	29
3.3.3 Aislamiento y purificación de 59 y 61 de la fracción de CH ₂ Cl ₂	30
3.3.4 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico total	32
3.4 Acetilación de 61	33
3.5 Preparación del aceite esencial.....	34
3.6 Análisis de microextracción en fase sólida (MEFS).....	34
3.7 Instrumentación y condiciones cromatográficas para el análisis de la fracción de AcOEt y del aceite esencial.....	35
3.8 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Determinación de la composición química de la decocción	37
4.1.2.1 N-[(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2' <i>R</i> *,4 <i>Z</i>)-4-tetracosenamida (61)	45
4.2 Establecimiento de las pruebas químicas de identidad	50

4.2.1 Composición química del aceite esencial	50
4.2.2 Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles	55
5. CONCLUSIONES	57
6. PERSPECTIVAS	58
7. BIBLIOGRAFÍA	58
8. APÉNDICE I	67
9. APÉNDICE II	73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reunión de fracciones del fraccionamiento del reparto de AcOEt.....	29
Tabla 2. Reunión de fracciones del fraccionamiento del reparto de CH ₂ Cl ₂	31
Tabla 3. Gradiente de elución utilizado en el análisis por CLUE-EM para el establecimiento del perfil de la fracción de AcOEt	35
Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN (700 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) del compuesto 59	44
Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN (700 MHz, Piridina- <i>d</i> ₅) del compuesto 61	49
Tabla 6. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de <i>M. divaricatum</i>	53
Tabla 7. Compuestos volátiles de las partes aéreas de <i>M. divaricatum</i> obtenidas por MEFS.....	55

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Diagrama del fraccionamiento del extracto orgánico total de <i>M. divaricatum</i>	33
Esquema 2. Reacción de acetilación de 61	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Melampodium</i> . Imagen modificada de Global biodiversity information facility (Gbif, 2019).....	13
Figura 2. <i>Melampodium divaricatum</i> (Rich.) DC. (<i>Asteraceae</i>). Imágenes obtenidas de https://www.naturalista.mx/observations/29622514	18
Figura 3. Curso temporal (0-30 min) del efecto antinociceptivo de la decocción de <i>M. divaricatum</i> en la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada punto representa el promedio del tiempo invertido en lamer ± EEM de los animales de cada grupo (n=6).....	23
Figura 4. Efecto antinociceptivo de la decocción de <i>M. divaricatum</i> en la primera fase o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva ± EEM de los animales de cada grupo (n=6). ANADEVA, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$	23
Figura 5. Efecto antinociceptivo de la decocción de <i>M. divaricatum</i> en la segunda fase o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva ± EEM de los animales de cada grupo (n=6). ANADEVA, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$	24
Figura 6. Curso temporal de la prueba de la formalina de la decocción de <i>M. divaricatum</i> en ratones hiperglucémicos	25

Figura 7. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> en la primera fase o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEVa, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$	26
Figura 8. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> en la segunda fase o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEVa, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$	26
Figura 9. Cromatograma de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de <i>M. divaricatum</i> obtenido por PDA, con $\lambda = 254$ nm.....	37
Figura 10. A) Cromatograma de iones totales en EM-ESI (modo negativo). B) Espectro de UV mostrando los máximos de absorbancia.....	38
Figura 11. Correlaciones clave en HMBC (C \rightarrow H) para la asignación de H-5, H-20, H-9, H-14 y que el carbono cuaternario oxigenado C-16.....	42
Figura 12. Correlaciones clave en NOESY para la orientación relativa de los sustituyentes en el kaurano.....	42
Figura 13. Derivado acetilado del compuesto 61	46
Figura 14. Estructuras parciales del compuesto 61 . a) Correlaciones clave en COSY (H \rightarrow H); b) Correlaciones clave en HMBC (C \rightarrow H); c) Fragmentos en DART+ del residuo ácido; d) Fragmento en DART+ del residuo 2-amino-1,3,4-triol.....	47
Figura 15. Estructura de N-[(2S,3S,4R)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2'R*,4Z)-4-tetracosenamida.....	49
Figura 16. Constituyentes que se encuentran en mayor proporción en el AE de <i>M. divaricatum</i>	51
Figura 17. Cromatografía en capa fina del AE de <i>M. divaricatum</i> . Sistema de elución: Hex/CH ₂ Cl ₂ (1:1).....	52
Figura 18. Cromatograma iónico total del aceite esencial de <i>M. divaricatum</i> analizado por CG-EM.....	52
Figura 19. Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de <i>M. divaricatum</i> analizado en una columna capilar DB-5 por la técnica MEFS utilizando una fibra de DVB/CAR/PDMS.....	56

ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotación óptica específica a 20°C
°C	Grados Centígrados
2-Mebut	Ácido 2-metilbutírico
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
AcOH	Ácido acético
AcO	Acetato
Ang	Ácido angélico
CAR	Carboxen
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CG	Cromatografía de Gases
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
CLUE	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
cm	Centímetro
DART	Análisis Directo en Tiempo Real
DIC	Diclofenaco
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil Sulfóxido Deuterado
DVB	Divinil Benceno
EM	Espectrometría de Masas
EM-IE	Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico
EM-ESI	Espectrometría de Masas de Ionización por Electro-Spray
eV	Electronvolt
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
h	Horas
H	Hidrógeno
H ₂ O	Agua
H ₂ O _{dd}	Agua desionizada
HCl	Ácido clorhídrico
He	Helio
Hex	Hexano
HS	Head Space
IE	Impacto Electrónico
IR	Índice de Retención
Ival	Ácido isovalérico
kg	Kilogramo
l	Litro
MeOH	Metanol
μl	Microlitro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minutos
msnm	Metros sobre el Nivel del Mar
<i>m/z</i>	Relación Masa/Carga

MEFS	Micro Extracción en Fase Sólida
NA	Nicotinamida
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
nm	Nanómetro
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDMS	Poli-Dimetil Siloxano
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
s	Segundos
STZ	Estreptozotocina
UA	Unidades de Absorbancia
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
VEH	Vehículo

RESUMEN

El presente trabajo describe el estudio químico de la especie vegetal *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. (*Asteraceae*), la cual se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor estomacal, muscular y de articulaciones, entre otros padecimientos.

El estudio químico de la decocción se realizó a partir de las fracciones de diclorometano y acetato de etilo. Los compuestos mayoritarios fueron los flavonoides isoquercitrina e hiperósido con propiedades antinociceptivas comprobadas. También se analizó el extracto orgánico íntegro. El proceso descrito permitió la obtención de dos compuestos novedosos los cuales se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como 3- α -3-O- β -D-glucopiranosil-16- α -hidroxi-*ent*-kaurano y N-[(2S, 3S, 4R)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2'*R**,4Z)-4-tetracosenamida.

El análisis de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de la planta se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Dichos componentes se identificaron mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con los de la Biblioteca de espectros de masas NIST 98 y la biblioteca del equipo, así como de sus índices de retención en relación con una serie homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ calculados de acuerdo con Van Den Dool y Kratz (1963) y con los valores reportados en la literatura (Adams, 2007). Los resultados mostraron que el β -cariofileno, el germacreno-D, β -elemeno, δ -elemeno, el γ -patchuleno y el 7-*epi*- α -selineno destacan por encontrarse en mayor proporción. Estos concuerdan con los obtenidos mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (MEFS), la cual permitió la identificación de β -cariofileno (60 %) como el componente volátil más abundante de *Melampodium divaricatum*.

ABSTRACT

The present work describes the chemical study of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. (*Asteraceae*), which is a medicinal plant used traditionally for treating stomachaches, muscular and joint pain, among other ailments.

The chemical study of the decoction was carried out using the dichloromethanic and ethyl acetate extracts. The main compounds were the flavonoids isoquercitrin and hyperoside, both with proven antinociceptive effect. The whole organic extract was also analyzed. This process allowed the identification of two novel compounds characterized through spectroscopic and spectrometric techniques as 3- α -3-O- β -D-glucopyranosil-16- α -hydroxy-*ent*-kaurane and N-[(2S, 3S, 4R)-3,4-dihydroxy-1-(hydroxymethyl) octadecyl]-2'-hydroxy-(2'R*,4Z)-4-tetracosenamide.

The present volatile compounds in the essential oil were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). All compounds were identified by comparison of their mass spectral data with those of NIST Mass Spectral Library 98 and equipment libraries as well as by comparison of their retention indices relative to a homologous series of C₈-C₂₀ *n*-alkanes calculated according to Van Den Dool and Kratz (1963) and with literature values described by Adams (2007). This analysis showed β -caryophyllene, germacrene-D, β -elemene, δ -elemene, γ -patchulene and 7-*epi*- α -selinene, to be in great proportion. These results agree with the ones observed through the technique of solid-phase microextraction, being β -caryophyllene (60 %) the volatile compound with more abundance in *Melampodium divaricatum*.

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre el género *Melampodium*

El género *Melampodium* (*Asteraceae*) se describe por primera vez por Linneo (1753) en su obra “Species Plantarum 2” donde se le refiere como *Melampus medicus graecus*. Posteriormente, Gray (1884) y Cockerell (1905) afirman que el nombre del género proviene de los vocablos griegos ‘μέλας, μέλαιν-α, μέλαν’, que significa oscuro o negro, y ‘πούς, ποδοσ’, que significa pie. De acuerdo con Stuessy (1972), el género comprende alrededor de 45 especies concentradas en México, donde se halla su mayor diversidad, y se distribuye desde la zona centro-sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Brasil (Rzedowski y Rzedowski 2011; Adegbite *et al.*, 2019), donde se encuentra de manera disyunta. Recientemente se describieron dos especies, una en África occidental (Adegbite *et al.*, 2019) y la otra en la India (Jagtap *et al.*, 2017). Algunas especies son adventicias en las Antillas, en el sur de Asia, Australia y Nueva Zelanda (Figura 1).

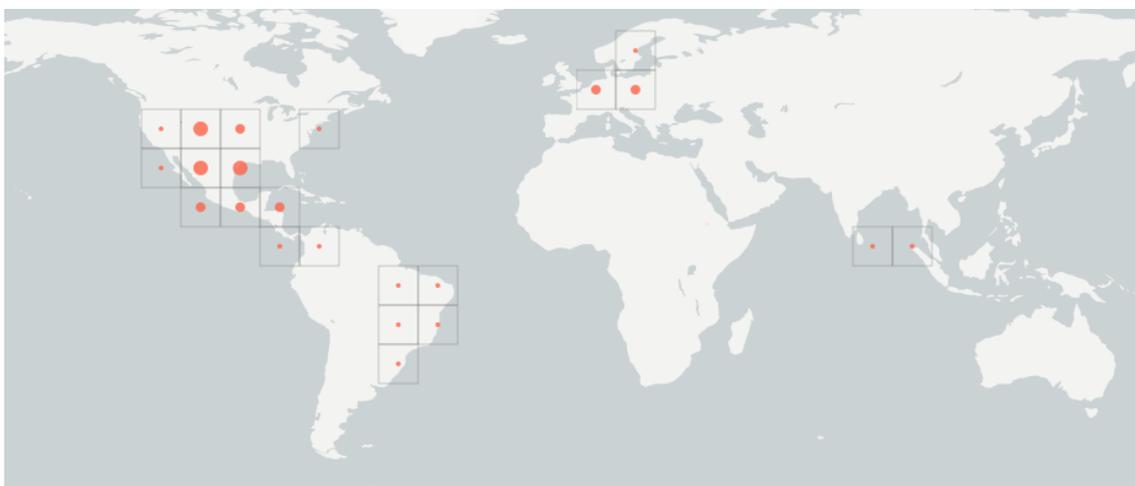
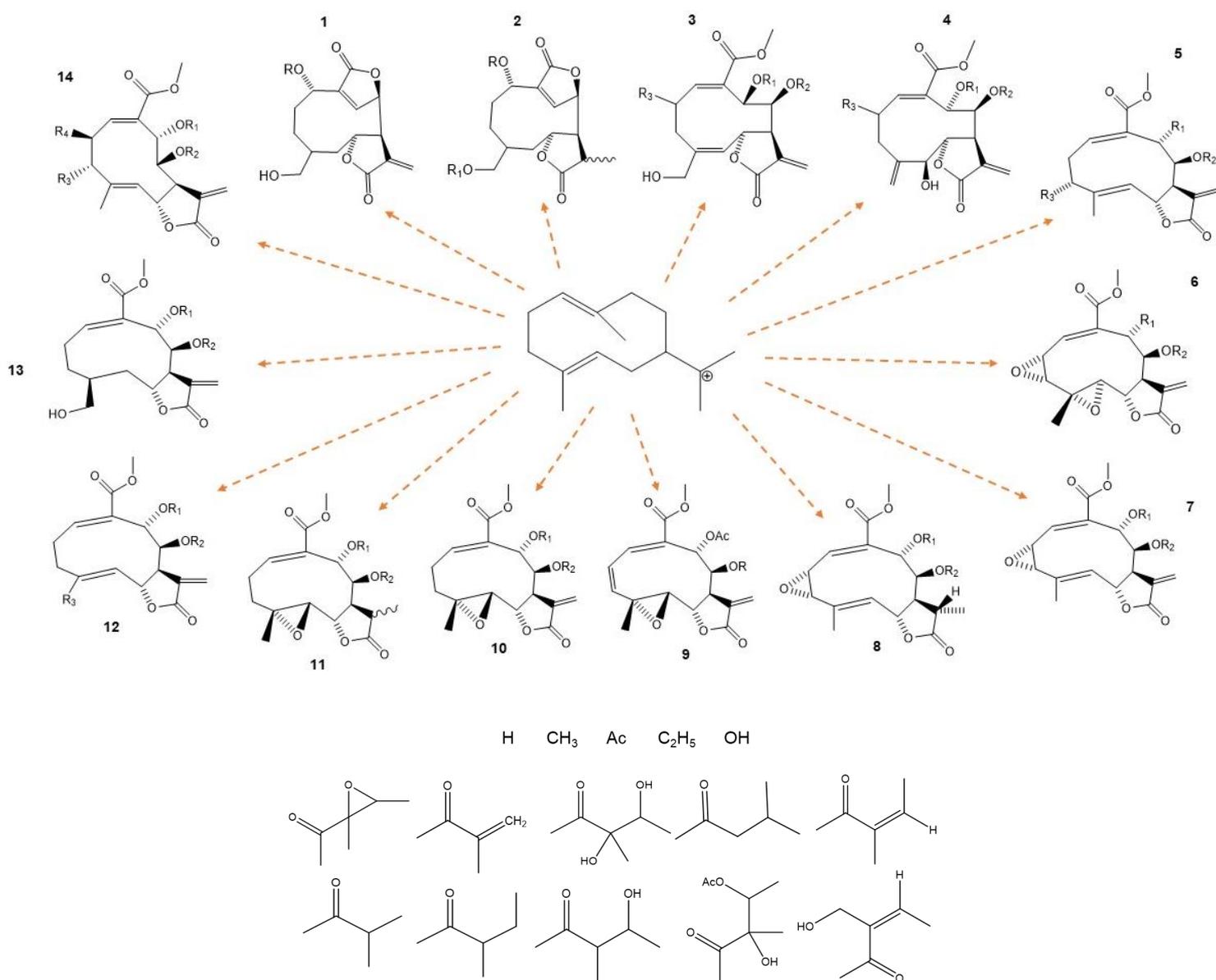


Figura 1. Distribución del género *Melampodium* desde 1731 hasta el 2019. Imagen modificada de Global biodiversity information facility (Gbif, 2019).

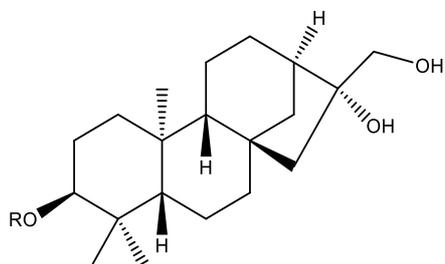
Algunas especies de *Melampodium* que destacan debido a su valor medicinal son *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., *Melampodium montanum* Benth. y

Melampodium glabrum S. Wats., esta última utilizada en la medicina veterinaria (Rzedowski y Rzedowski, 2011).

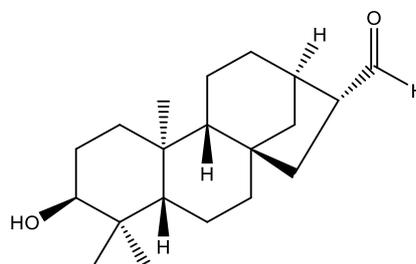
El análisis químico de varias especies del género ha permitido el aislamiento de metabolitos de origen terpenoide, principalmente. Así, las lactonas sesquiterpénicas, como son las germacranólidas **1-2**, la *cis, cis*-germacranólida **3** y las melampólidas **5-14**, se han aislado de las especies *M. americanum*, *M. camphoratum*, *M. cinereum*, *M. diffusum*, *M. leucanthum*, *M. longicorne*, *M. longipilum*, *M. perfoliatum*, *M. pilosum* y *M. rosei* (Seaman, 1982; Weidenhamer *et al.*, 1990; Arciniegas, *et al.*, 2016). Todos estos compuestos forman ésteres con distintos residuos de ácidos orgánicos pequeños.



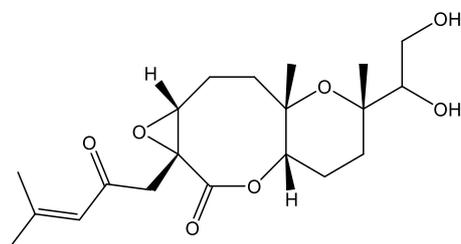
Los *ent*-kauranos **15–17** y las lactonas diterpénicas **18** y **19** se aislaron de *M. perfoliatum* (Arciniegas, *et al.*, 2016); en tanto que los oxepanos **20a** y **20b** se aislaron de *M. diffusum* (Quijano y Fischer, 1984).



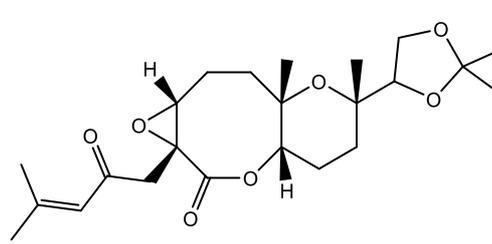
15 R=H
16 R=Glc



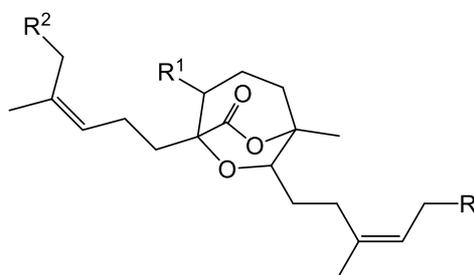
17



18

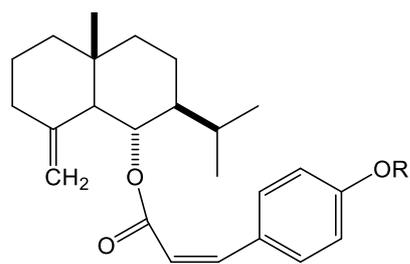
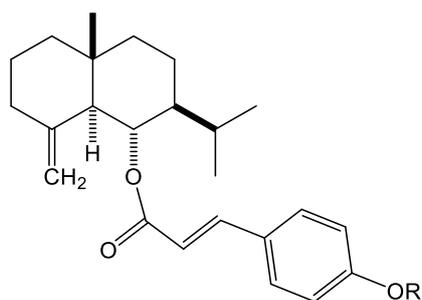


19



	R	R ¹	R ²
20a	OH	OH	OAc
20b	OH	OH	OH

Chaturvedula y colaboradores (2004) aislaron del extracto de acetato de etilo de *Melampodium camphoratum* seis sesquiterpenos de tipo eudesmano **21 – 27**, incluyendo el cumarato de 6-*epi*- β -verbesinol.



21 R = CH₃

22 R = CO(CH₂)₁₆CH₃

23 R = CO(CH₂)₁₄CH₃

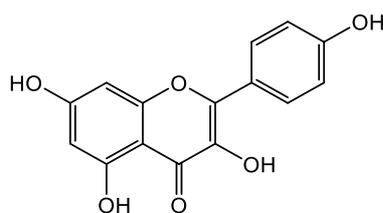
24 R = CO(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₅CH₃

27 R = H

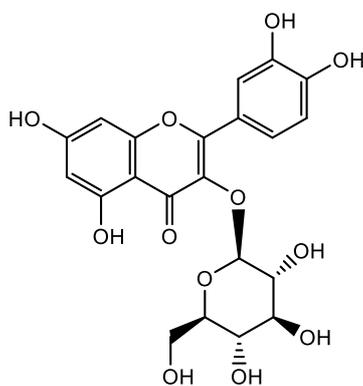
25 R = H

26 R = COCH₃

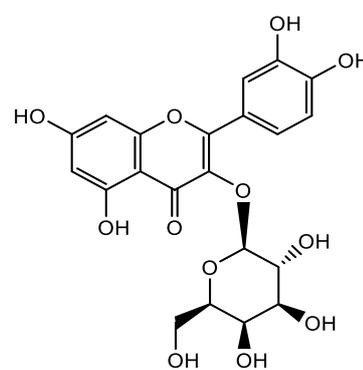
Bohm y Stuessy (1991) describen que especies *M. americanum*, *M. aureum*, *M. bibracteatum* y *M. longipilum* contienen flavonoides como campferol **28**, 3-O-β-D-glucopiranosido de quercetina (isoquercitrina) **29**, 3-O-β-D-galactopiranosido de quercetina (hiperósido) **30**, 3-O-rutinósido de quercetina (rutina) **31**, 5,6,7,4'-tetrahidroxi-3-metoxi flavona **32**, 3,7-dimetil éter de quercetgetina (tomentina) **33**, 3,6,7-trimetil éter de quercetagetina (crisosplenol-D) **34**, 3,6,7,3'-tetrametil éter de quercetagetina (crisosplenetina) **35**, 3,6,7,3',4'-pentametil éter de quercetagetina (artemetina) **36** y acacetina **37**.



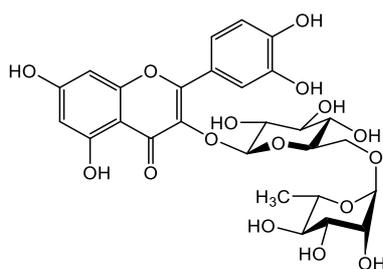
28



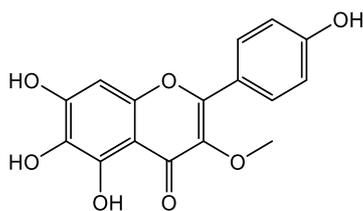
29



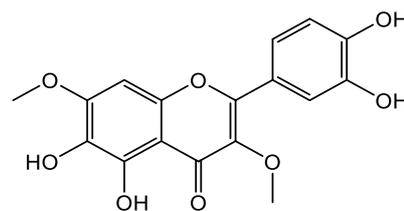
30



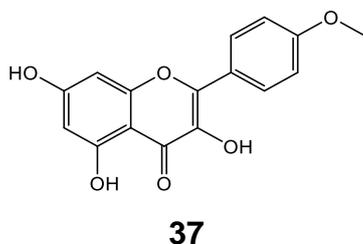
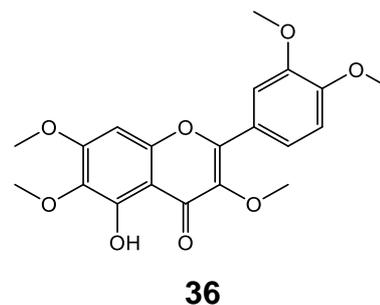
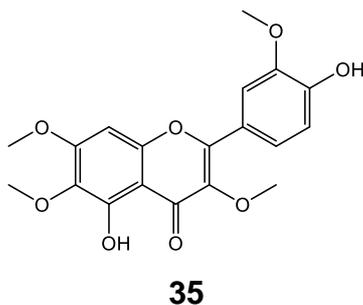
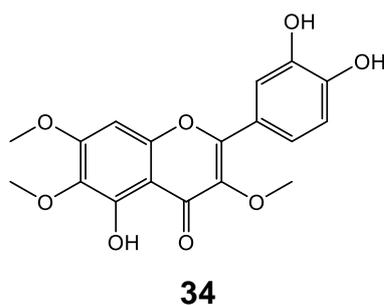
31



32



33



1.2 *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC.

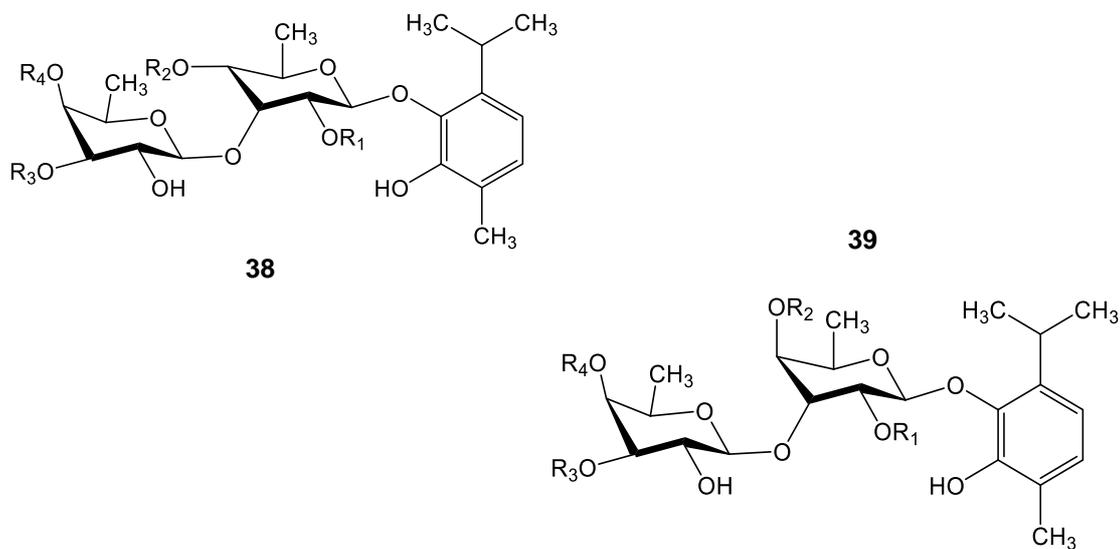
Melampodium divaricatum es una hierba anual erecta o rastrera, cuya altura va de los 15 cm a 1 m con 20 cm; los tallos, por lo común, están ramificados, con hojas opuestas y sésiles o con pecíolos alados y cortos que miden entre 2 y 15 mm de largo y se caracterizan por sus formas ovada, rómbica o lanceada de 5 a 10 cm de largo por 1 a 6 cm de anchura. Las flores son liguladas, observan un color amarillo o amarillo-anaranjado y miden de 3.5 a 9 mm de largo (Figura 2) (CONABIO, 2019). La especie se designa popularmente en la región central del país con varios nombres como ‘andan’i (lengua purépecha), ‘coronilla’, ‘mariquita’, ‘nixtamal crudo’, ‘rosa amarilla’ y ‘sorbetana’ (Rzedowski y Rzedowski, 2011). En Morelos se le conoce como ‘acahual amarillo’; ‘ojo de perico’ y ‘hierba aguada’ en Oaxaca; ‘margarita’ en Sinaloa; ‘botón de oro’ en Honduras; y ‘caléndula falsa’ en Brasil (Nogueira *et al.*, 2006). Habita en climas cálido y semicálido desde los 150 hasta los 1500 msnm.



Figura 2. *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. (Asteraceae). Imágenes obtenidas de <https://www.naturalista.mx/observations/29622514>

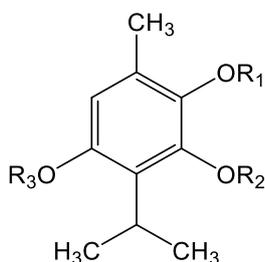
En México, la infusión de toda la planta, administrada oralmente o como cataplasma sobre el pecho, se usa para el tratamiento de la embolia (Martínez Alfaro, 1984). En Yucatán el cocimiento frío y endulzado se emplea como un remedio para la disentería y catarro intestinal. También se usa como sustituto del té de China, diaforético, “para suavizar el vientre el segundo día de empleo” (Martínez, 1989) y para curar granos. En Morelos, Monroy-Ortiz y Castillo-España (2007) señalan que las hojas se usan para lavar heridas y bajar la fiebre. En Oaxaca se emplea como relajante muscular. En Nayarit se utiliza para bajar la fiebre y disminuir las ansias tras la picadura de un alacrán. En Veracruz y en Puebla, sola o combinada con otras hierbas, alivia el “susto”. Según reportes, se emplea como antigripal, antiemético, antiséptico en diversos padecimientos (orzuelo, enfermedades de los genitales, etc.) y eupéptico. En Guatemala sus hojas se aprovechan para el tratamiento de dolores estomacales y la totalidad de la planta es utilizada contra la influenza (Girón, 1991). En Brasil, las hojas se consumen para disminuir la fiebre, como diurético, carminativo, para el dolor de estómago, cólicos, dolores musculares, dolor en articulaciones, reumatismo, palpitaciones, vértigo, ictericia y como antimalárico (Botsaris, 2007). Finalmente, Morton (1981) refiere su aplicación como anticonvulsivante. Además de sus usos medicinales, *M. divaricatum* se utiliza como planta ornamental o de ornado (Rzedowski y Rzedowski, 2011) y melífera (CICY, 2019).

Desde el punto de vista químico, a partir de las raíces y de las partes aéreas de *M. divaricatum* se han aislado metabolitos secundarios pertenecientes a las categorías de los terpenoides incluyendo los sesquiterpenoides (**42-44**), un diterpenoide (**45**) y monoterpenoides incluyendo varios derivados glicosilados y esterificados del 2-hidroxitimol y 2,5-hidroxitimol, respectivamente (Bohlmann y Le Van, 1977) (Hubert y Wiemer, 1985). Los azúcares presentes en los glicósidos son la fucosa y la quinovosa (Hüther *et al.*, 1999).



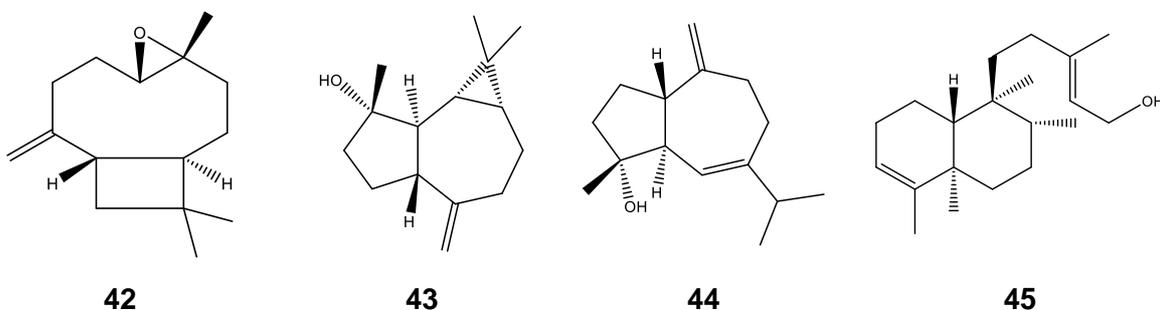
R = H, Ang, AcOH, 2-Mebut, Ival

Schüngel y Passreiter (2002) reportaron el aislamiento de dos derivados de ésteres de 2,5-dihidroxitimol: 2,5-diangeoiloxitimol **40** y angelato 5-angeloiloxi-2-hidroxitimol **41**.

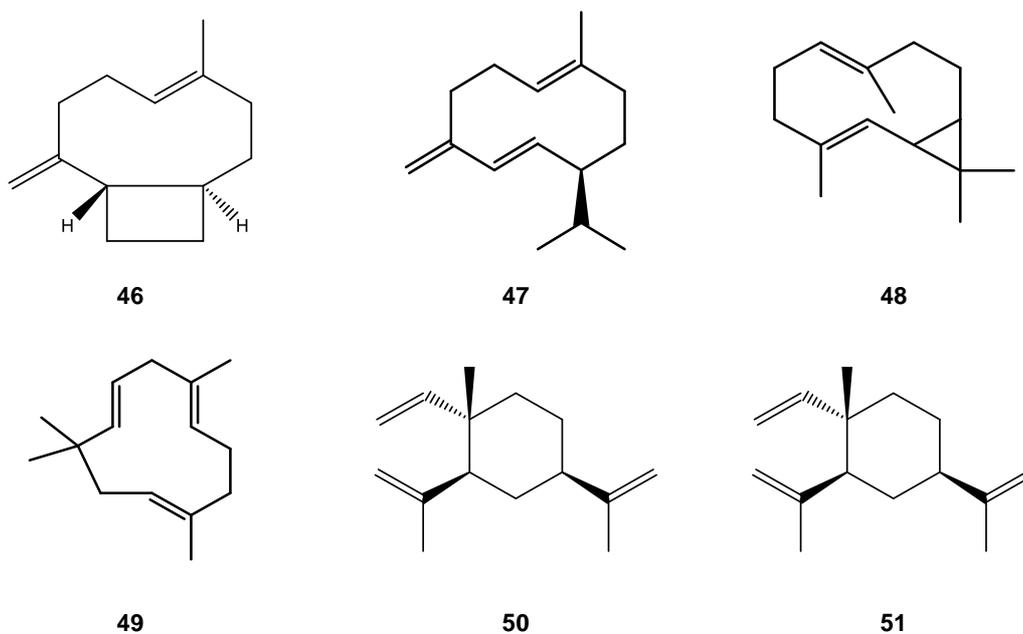


	R ₁	R ₂	R ₃
40	Ang	H	Ang
41	H	Ang	Ang

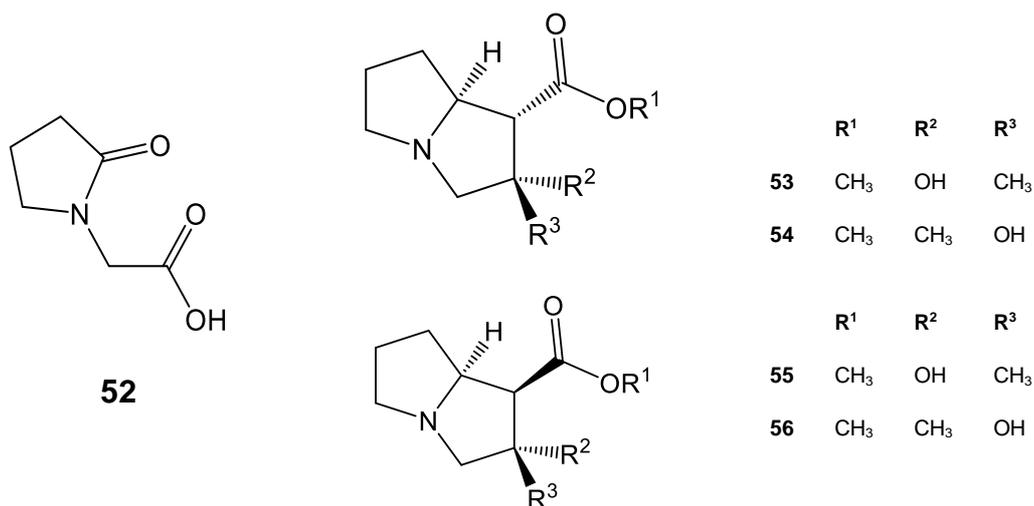
Hubert y Wiemer (1985) lograron aislar del extracto clorofórmico de las hojas y los tallos los sesquiterpenoides óxido de cariofileno **42**, espatulenol **43** y guaianol **44**, así como el kolavenol **45**.



El análisis por CG-EM del aceite esencial de la planta recolectada en Brasil (Duarte Moreira *et al.*, 2014) indicó la presencia de (*E*)-cariofileno **46** (56.0%), germacreno-D **47** (12.7%), biciclogermacreno **48** (9.2%), óxido de cariofileno **42** (3.0%), α -humuleno **49** (1.9%), espatulenol **43** (1.9%), cariofil-4(14), 8(15)-dien-5-ol **50** (1.5%) y el β -elemeno **51** (1.4%).

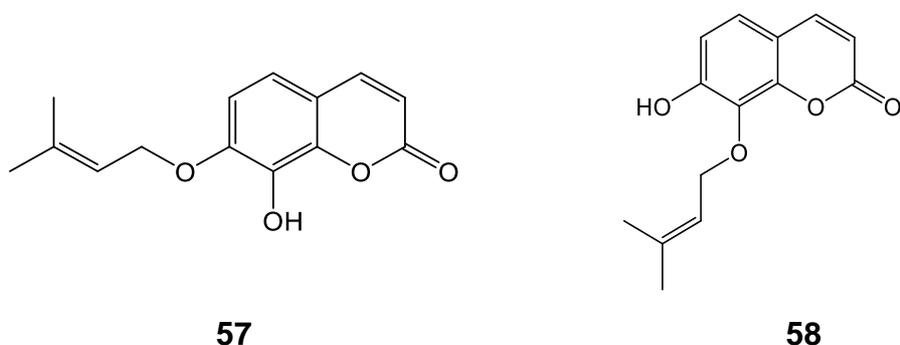


La planta contiene también alcaloides pirrolidínicos y pirrolizidínicos no tóxicos que fueron identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) como ácido pirrolidín-2-acético **52** y su éster metílico, tusilágino **53**, isotusilágino **54** y los epímeros *neo*-tusilágino **55** y *neo*-isotusilágino **56**. Estos productos son comunes en especies pertenecientes a las tribus *Senecioneae* y *Eupatorieae* de las asteráceas (Schüngel y Passreiter, 2000).



A través de la cromatografía en capa fina (CCF) se estableció la presencia de campferol y de dos glicósidos de quercetina, cuyos perfiles son semejantes a los de la isoquercitrina y la rutina (Bohm y Stuessy, 1991).

Finalmente, Borges del Castillo y colaboradores (1984) analizaron el extracto etanólico de las partes aéreas de *M. divaricatum* recolectada en El Salvador y aislaron dos isómeros de cumarina: 8-hidroxi-7-(3'-metil-2'-buteniloxi) cumarina **57** y 7-hidroxi-8-(3'-metil-2'-buteniloxi) cumarina **58**.



Con respecto a los estudios biológicos, un extracto alcohólico de las flores de *M. divaricatum* presentó un efecto antimutagénico contra la aflatoxina B₁, el benzo(α)pireno y la daunomicina. Además, no indujo un aumento significativo en la frecuencia normal de mutaciones en la cepa *Salmonella typhimurium* (Nogueira *et al.*, 2006). Por otra parte, un extracto clorofórmico de tallos y hojas de la planta tiene un efecto repelente contra hormigas de la especie *Atta cephalotes* (Hubert y Wiemer, 1985).

El aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas de la planta recolectada en Brasil fue objeto de dos estudios. En el primero estableció la actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Pelissari *et al.*, 2010); y en el segundo, se determinó la actividad anticariogénica del aceite esencial contra *Streptococcus mitis* y *Streptococcus mutans* (Duarte Moreira *et al.*, 2014).

En un estudio que antecede al presente trabajo se estableció el potencial antinociceptivo de un extracto acuoso de *M. divaricatum* (31.6, 100 y 316.2 mg/kg) utilizando el modelo de la formalina en ratones (Padilla, 2017). La inyección de formalina en la pata del ratón produce una respuesta bifásica, que provoca que el animal se lama o mordisquea la extremidad (Lee *et al.*, 2011). Los resultados indicaron que el tiempo de lamida de los ratones administrados con las tres dosis ensayadas disminuyó en comparación con los ratones tratados con vehículo (VEH) (Figura 3). Los ratones pretratados con las dosis de 100 y 316.2 mg/kg de la decocción de *M. divaricatum* mostraron una disminución significativa en la respuesta al estímulo químico durante la primera fase de la prueba, en comparación con el vehículo y con el fármaco de referencia, diclofenaco (DIC) (Figura 4). Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo producido por la decocción de *M. divaricatum* podría ser mediado por la modulación de la actividad de las fibras sensoriales, principalmente de tipo C, las cuales son activadas directamente por la formalina vía los canales iónicos TRPA1 y TRPV1 (McNamara *et al.*, 2007).

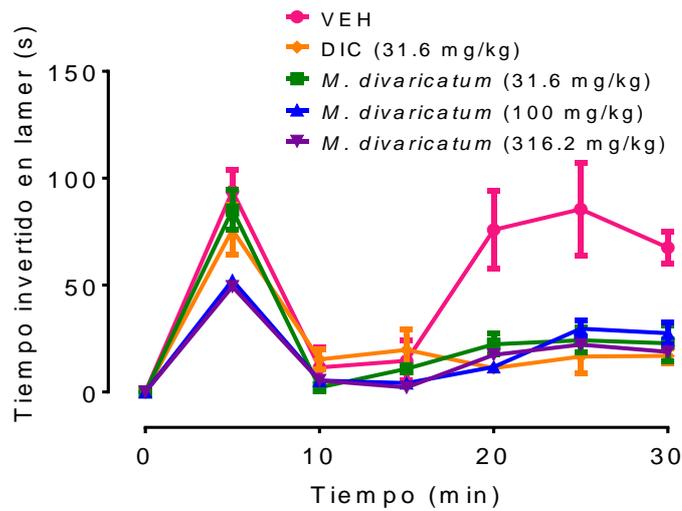


Figura 3. Curso temporal (0-30 min) del efecto antinociceptivo de la decocción de *M. divaricatum* en la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada punto representa el promedio del tiempo invertido en lamer \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$).

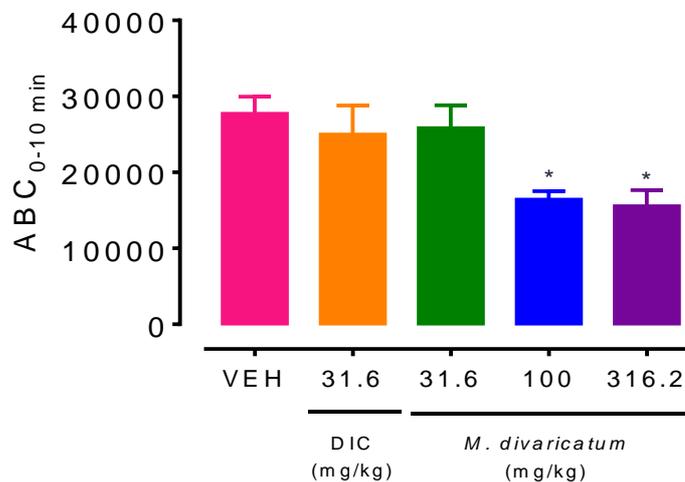


Figura 4. Efecto antinociceptivo de la decocción de *M. divaricatum* en la primera fase o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEV, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

En la segunda fase o fase inflamatoria, se observó también una disminución significativa de la respuesta nociceptiva inducida por la formalina, de manera comparable al diclofenaco (Figura 5). El efecto antinociceptivo no fue dosis-dependiente. Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo producido por la decocción está relacionado con un efecto antiinflamatorio que previene la sensibilización central de las fibras sensoriales primarias.

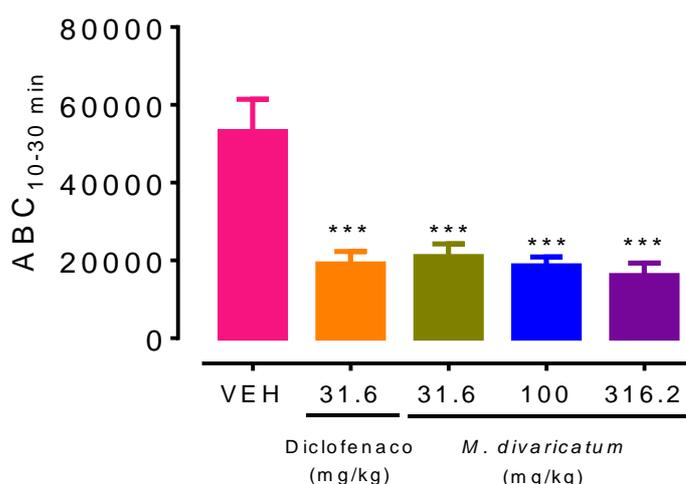


Figura 5. Efecto antinociceptivo de la decocción de *M. divaricatum* en la segunda fase o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEVA, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

El dolor neuropático es el resultado de una lesión o disfunción del SNC o del SNP. Este tipo de dolor se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo, hiperalgesia y alodinia (Woolf, 2004). Algunos ejemplos de dolor neuropático son: la neuropatía diabética, polineuropatía por SIDA, neuralgia post-herpética, radiculopatía lumbar (Koltzenburg y Scadding, 2001).

La neuropatía diabética es una de las complicaciones a largo plazo más frecuentes de la diabetes, se estima que alrededor del 50 % o más de los pacientes diabéticos la padece (Sundara Rajan *et al.*, 2013). Esta complicación produce anormalidades sensoriales, incluyendo parestesia, hiperalgesia y entumecimiento (Peltier *et al.*, 2014). De acuerdo con esto, el siguiente paso en esta investigación fue determinar

el posible potencial de la decocción de *M. divaricatum* como agente antihiperalgésico para el tratamiento de la neuropatía diabética. En otro grupo de experimentos en ratones hiperglucémicos NA/STZ -hiperalgésicos, el preparado tradicional redujo el tiempo de lamida en ambas fases de la prueba de la formalina (Figura 6). La administración de formalina al 1% en ratones hiperglucémicos produce un incremento de la respuesta nociceptiva en comparación con ratones normoglucémicos debido a una reducción del umbral nociceptivo a estímulos químicos (Martínez *et al.*, 2017). Durante la primera fase de la prueba de la formalina, la decocción de *M. divaricatum* redujo de manera significativa y dosis-dependiente la hiperalgnesia producida por la presencia del estímulo químico, este efecto fue equiparable al producido por el fármaco de referencia gabapentina (Figura 7). Además, la decocción redujo la hiperalgnesia a las tres dosis ensayadas durante la segunda fase de la prueba (Figura 8). Estos resultados sugieren el potencial antihiperalgésico de la decocción de *M. divaricatum* para el tratamiento de la neuropatía diabética.

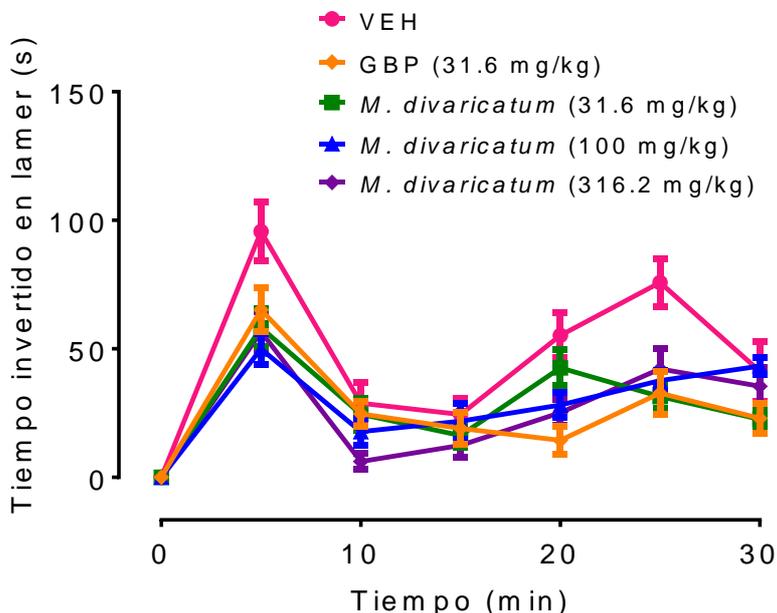


Figura 6. Curso temporal de la prueba de la formalina de la decocción de *M. divaricatum* en ratones hiperglucémicos.

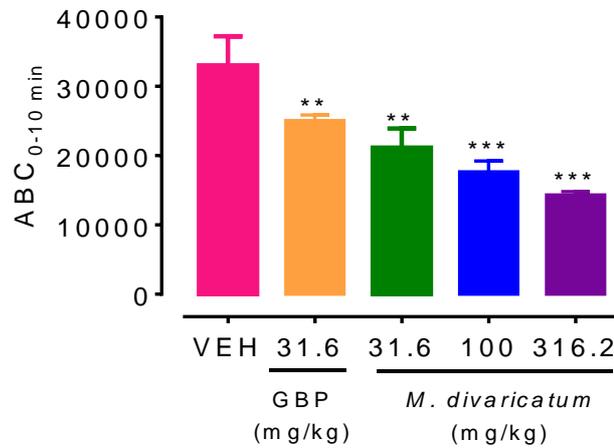


Figura 7. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de *M. divaricatum* en la primera fase o neurogénica de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEV, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

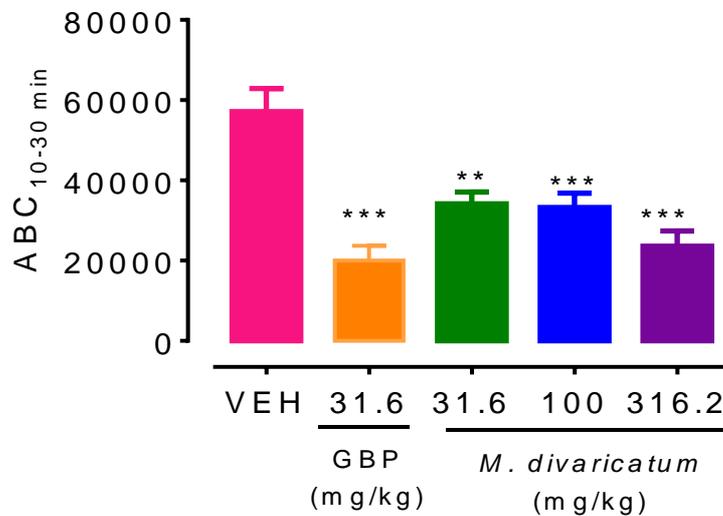


Figura 8. Efecto antihiperalgésico del extracto acuoso de *M. divaricatum* en la segunda fase o inflamatoria de la prueba de la formalina en ratones hiperglucémicos. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n=6$). ANADEV, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

El uso de plantas medicinales en México se encuentra muy arraigado en la población desde tiempos prehispánicos, en particular en las zonas rurales. Actualmente esta práctica se ha popularizado, principalmente debido a la falsa premisa de que lo natural es inocuo. Ante esta demanda es necesario establecer la eficacia, calidad y seguridad de estos recursos naturales con el propósito de garantizar su uso racional y establecer las herramientas regulatorias apropiadas. En el estudio que antecede al presente trabajo (Padilla, 2017) fue posible evaluar la seguridad y eficacia preclínica de la decocción de *M. divaricatum* para aliviar padecimientos dolorosos; no obstante, aún es necesario establecer sus compuestos activos y parámetros de calidad que garanticen su identidad y contenido de principios activos. El conjunto de todos estos resultados permitirá en un futuro integrar la monografía farmacopéica de la especie. Cabe señalar que en México existen numerosas especies de *Melampodium*, similares morfológicamente; sin embargo, no todas son medicinales. Entonces, el establecimiento de sus parámetros de calidad evitará que *M. divaricatum* sea adulterada o sustituida por otras especies que podrían ser tóxicas e ineficientes para los consumidores. Todas estas consideraciones justifican ampliamente el estudio químico de *M. divaricatum* en el marco de los objetivos que se enlistan a continuación.

2.2 Objetivo general

Determinar los principios activos responsables de la actividad antinociceptiva detectada en la decocción de la planta e iniciar los estudios conducentes al desarrollo de las pruebas de identidad de *M. divaricatum* con el propósito de contribuir a su uso racional.

2.3 Objetivos particulares

1. Establecer el perfil cromatográfico de la fracción más activa de la decocción de la planta.
2. Establecer al menos uno de los metabolitos responsables del efecto antinociceptivo de la decocción de la planta.
3. Realizar el estudio químico del extracto íntegro y del aceite esencial de la planta con el propósito de establecer los compuestos marcadores.
4. Caracterizar los metabolitos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Material vegetal

Las partes aéreas de la especie vegetal *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., fueron colectadas por el Dr. José Serafín Calderón Pardo en la Colonia Ampliación Chapultepec en el Municipio de Cuernavaca, estado de Morelos, en abril y junio del 2018. Una muestra de referencia se encuentra en el Herbario Nacional (MEXU) con el número de voucher 1465411. La identificación de la especie fue establecida por el M. en C. Rafael Torres Colín.

3.2 Obtención del extracto acuoso de *M. divaricatum*

El extracto acuoso de la planta se preparó mediante la técnica de decocción de las partes aéreas. Se colocaron 10 g de material vegetal seco y molido en contacto con 1 l de agua hirviendo; el extracto resultante se dejó reposar durante 5 min. Al término del periodo de extracción, el preparado se filtró y concentró a sequedad utilizando un rotaevaporador (BÜCHI R-II-HB) adaptado a una bomba de vacío (BÜCHI-V-710). El rendimiento del extracto acuoso total de *Melampodium divaricatum* fue del 8.79% (87.89 mg/g de droga cruda).

3.3 Estudio químico

3.3.1 Obtención de las fracciones orgánicas del extracto acuoso

El fraccionamiento del extracto acuoso se llevó a cabo mediante un método de reparto utilizando como disolventes orgánicos diclorometano (CH_2Cl_2) y acetato de etilo (AcOEt). Se realizó la decocción como se describe en la sección 3.2. Después de filtrarla, ésta se colocó en un embudo de separación de 1000 ml y se agregaron 500 ml de disolvente. El embudo se agitó y posteriormente se esperó hasta observar la separación de las fases. La fracción orgánica se recuperó en un matraz. Este proceso se realizó en cinco ocasiones. Las fases orgánicas se combinaron, se filtraron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a vacío en un rotaevaporador. La fracción orgánica de AcOEt se analizó por CLUE.

3.3.2 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de AcOEt

La fracción de AcOEt (188 mg) se sometió a un fraccionamiento primario por medio de una cromatografía en columna abierta (CCA) sobre Sephadex (LH-20; Sigma-Aldrich-Fluka, MO, EE. UU.) con un volumen muerto de 200 ml, la cual se eluyó de manera isocrática utilizando una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (2:8) como fase móvil. Se colectaron 80 fracciones de 5 ml, las cuales se reunieron por su similitud cromatográfica para generar once fracciones primarias (A1 – A11), indicadas en la Tabla 1. Este proceso permitió la identificación de los flavonoides isoquercitrina **29** e hiperósido **30** en la fracción A9.

Tabla 1. Reunión de fracciones del fraccionamiento del reparto de AcOEt

Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
1-15	A1	4.1
16-19	A2	9.9
20-44	A3	110.6
45-49	A4	5.9
50-60	A5	15.8
61-69	A6	13.0

Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
70-71	A7	5.2
72-74	A8	20.4
75-76	A9	3.4
77-78	A10	0.4
79-80	A11	0.1

Isoquercitrina (**29**): Sólido amarillo; p.f. 230-232 °C. EM-ESI (modo negativo) m/z : 463.75 [M-H]⁻. IR (FT-IR) $\nu_{\text{máx}}$: 3388, 2945, 2350, 1656, 1608, 1505 cm^{-1} . UV $\lambda_{\text{máx}}$: 203.36, 255.36 y 350.36 nm. RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD): 7.73 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.61 (1H, dd, J = 2.2, 8.5 Hz, H-6'), 6.8 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.22 (2H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 5.27 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 3.71 (1H, dd, J = 12.0, 2.4 Hz, H-6''), 3.58 (1H, dd, J = 12.0, 5.2 Hz, H-6b''), 3.51- 3.22 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5'').

Hiperósido (**30**): Sólido amarillo; p.f. 230-233 °C. EM-ESI (modo negativo) m/z : 463.09 [M-H]⁻. IR (FT-IR) $\nu_{\text{máx}}$: 3268, 2975, 2903, 1652, 1605, 1504 cm^{-1} . UV $\lambda_{\text{máx}}$: 203.36, 257.36 y 346.36 nm. RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD): 7.83 (1H, d, J = 2.13 Hz, H-2'), 7.58 (2H, dd, J = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.86 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (2H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.15 (1H, J = 6.64 Hz, H-1''), 3.64 (1H, dd, J = 11.1, 6.04 Hz, H-6''), 3.55-3.47 (1H, m, H-2''-5''). RMN-¹³C (100 MHz, CD₃OD): 178.1 (C-4), 164.7 (C-7), 161.6 (C-5), 157.4 (C-9), 157.0 (C-2), 148.5 (C-4), 144.3 (C-3'), 134.33 (C-3), 130.8 (C-1'), 121.5 (C-5'), 116.3 (C-2'), 114.64 (C-10), 103.9 (C-1''), 98.48 (C-6), 93.23 (C-8), 75.76 (C-3''), 73.7 (C-5''), 71.7 (C-2''), 68.6 (C-4''), 60.5 (C-6'').

3.3.3 Aislamiento y purificación de **59** y **61** de la fracción de CH₂Cl₂

La fracción de CH₂Cl₂ (1.080 g) se sometió a un fraccionamiento primario a través de una cromatografía en columna rápida (tipo "flash") en un cromatógrafo Teledyne ISCO CombiFlashRfLumen equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD, por sus siglas en inglés); se utilizó como fase estacionaria un cartucho de 80 g de sílice RediSepRf high performance GOLD y como fase móvil un gradiente de Hex-AcOEt-MeOH.

Como resultado de este proceso se obtuvieron cinco series (I-V) de fracciones (Tabla 2). Dentro de éstas se seleccionaron las fracciones de las series III y IV. Las otras fracciones contenían los flavonoides aislados de la fracción de acetato de etilo. Las fracciones de las series III y IV se combinaron; la mezcla resultante se concentró al vacío. Al reconstituir con acetona precipitó el producto **59**.

Tabla 2. Reunión de fracciones del fraccionamiento del reparto de CH₂Cl₂

Fracciones combinadas	No. de Serie	Peso (mg)
1-70	I	466.7
1-70	II	166.2
1-70	III	180.5
1-70	IV	161.1
1-22	V	102.8

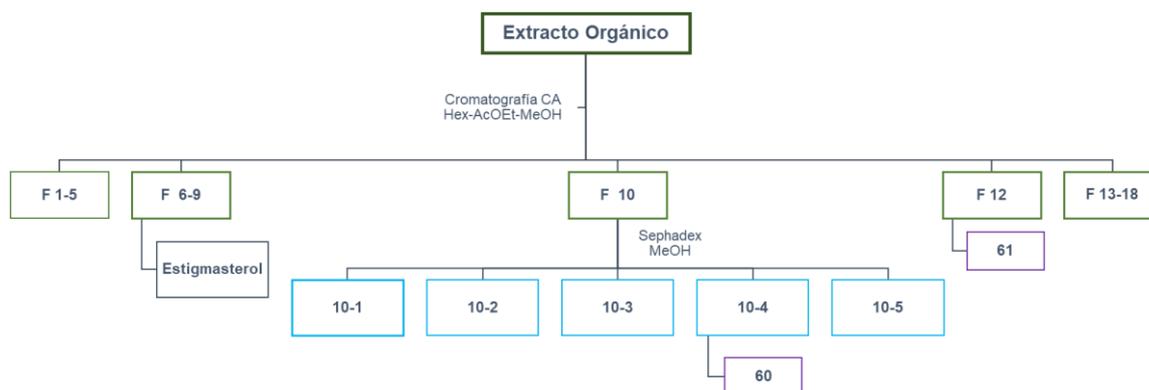
3- α -3-O- β -D-glucopiranosil-16- α -hidroxi-*ent*-kaurano (**59**): Sólido blanco; $[\alpha]_D^{20} = -31.11$ (c=0.09, MeOH); p.f. 260 °C. EM-ESI (modo positivo) *m/z*: 491.78 [M+Na]⁺ (C₂₆H₄₄O₇Na masa calculada 491.29844) IR (FT-IR) $\nu_{\text{máx}}$: 3348.08, 2925.32, 2866.49, 1072.57, 1017.28 cm⁻¹. RMN-¹H (700 MHz, DMSO-*d*₆) y RMN-¹³C (175 MHz, DMSO-*d*₆) se encuentran en la Tabla 5.

De las fracciones de la serie V precipitaron espontáneamente 10 mg del compuesto **61**.

N-[(2*S*, 3*S*, 4*R*)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2'*R**,4*Z*)-4-tetracosenamida (**61**): Sólido blanco; p.f. 136 °C. $[\alpha]_D^{20} = +13$ (c=0.1, piridina). EM-DART (modo positivo) *m/z*: 665, 316, 298 [M+H]⁺; masas exactas, EM-ESI (modo positivo): 682.63270 *m/z*, (C₄₂H₈₄N₁O₅ masa calculada 682.63495). IR (FT-IR) $\nu_{\text{máx}}$: 3331.30, 3211.51, 2917.03, 2849.48, 1619.23, 1610.62 cm⁻¹. RMN-¹H (700 MHz, Piridina-*d*₅) y RMN-¹³C (175 MHz, Piridina-*d*₅) se encuentran en la Tabla 7.

3.3.4 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico total

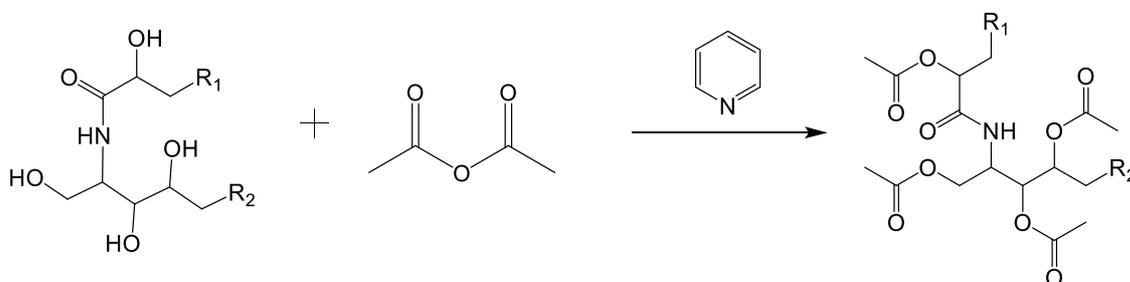
El extracto orgánico en mediana escala se preparó por un proceso de maceración a partir de material vegetal seco y molido (1 kg) utilizando una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (7:3; 15 l) como disolvente de extracción, durante 21 días. Al término del periodo de extracción, el extracto orgánico se separó del material vegetal por filtración y se concentró a sequedad obteniéndose 146.406 g de un residuo verde oscuro. El extracto orgánico total se sometió a un fraccionamiento primario (43.0128 g) utilizando una CCA sobre gel de sílice (1.400 kg) y como fase móvil un gradiente de elución con mezclas de Hex-AcOEt (100:0 → 0:100) y AcOEt-MeOH (0:100 → 50:50). Se recolectaron fracciones de 1 litro, las cuales se reunieron por su similitud cromatográfica para generar 18 fracciones secundarias (**F**₁- **F**₁₈). De estas fracciones sólo se estudiaron **F**₁₀ y **F**₁₂. Las más polares contenían los flavonoides caracterizados en la infusión y las menos polares una gran cantidad de pigmentos y estigmasterol, el cual fue detectado cromatográficamente desde **F**₆ hasta **F**₉. De esas fracciones precipitó 1 g de estigmasterol identificado por comparación con una muestra auténtica. De la **F**₁₀ (1.2 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta utilizando Sephadex (LH-20; Sigma-Aldrich-Fluka, MO, EE. UU.) como soporte cromatográfico y metanol como fase móvil para generar cinco fracciones secundarias (**F**₁₀₋₁ – **F**₁₀₋₅). De la fracción **F**₁₀₋₄ se obtuvieron 5 mg del producto **60** que se encuentra en proceso de caracterización. De la fracción **F**₁₀₋₂ se obtuvieron 679.4 mg de una mezcla de compuestos que aún no se resuelve. De la fracción primaria **F**₁₂ (163.8 mg) precipitaron espontáneamente 51.3 mg de un sólido blanco que fue caracterizado como 1,3,4-tetrahidroxi-2-[2'-hidroxi-3'-tetracosenoilamino]-octadecano (**61**). En el Esquema 1 se muestra un resumen de la obtención de los metabolitos secundarios **60** y **61**.



Esquema 1. Diagrama del fraccionamiento del extracto orgánico total de *M. divaricatum*.

3.4 Acetilación de **61**

Como se abordará en la sección de resultados, el objetivo de la acetilación del compuesto **61** fue simplificar el espectro de RMN ^1H y así facilitar la elucidación del producto natural. El Esquema 2 muestra la reacción empleada para la acetilación del compuesto **61**.



Esquema 2. Reacción de acetilación de **61**.

En un matraz de 10 ml provisto con una parrilla de agitación magnética, se adicionaron 3.1 mg del compuesto, 0.2 ml de anhídrido acético y 0.2 ml de piridina. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 16 horas. Al término de este tiempo, la mezcla se acidificó con una solución de HCl al 2% para formar la sal de piridinio; posteriormente, se realizaron repartos con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio; a continuación, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. El producto

resultante se purificó a través de una cromatografía en columna abierta con gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil CHCl_3 .

N-[(2*S*, 3*S*, 4*R*)-3,4-diacetil-1-(acetoximetil) octadecil]-2'-acetoxi-(2'*R**,4*Z*)-4-tetracosenamida (**61a**): Sólido vitreo; EM-IE *m/z* (int rel): 386 (20), 305 (100), 241 (40), 178 (80), 104 (75), 91 (95). IR (FT-IR) $\nu_{\text{máx}}$: 2917.03, 2849.48, 1720, 1619.23, 1610.62 cm^{-1} . Los espectros de RMN- ^1H (700 MHz,) y RMN- ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) se encuentran en el apéndice II.

3.5 Preparación del aceite esencial

El aceite esencial de la planta se preparó a partir de las partes aéreas frescas y fragmentadas grosso modo (200 g) mediante hidrodestilación durante 4 h. El material destilado fue particionado con CH_2Cl_2 (2 x 100 ml). Las fracciones orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron al vacío. El aceite se almacenó en viales ámbar a 4 °C hasta su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

3.6 Análisis de microextracción en fase sólida (MEFS)

Los compuestos volátiles presentes en la droga cruda se separaron e identificaron utilizando MEFS (Pawliszyn, 1977). Para este análisis se utilizaron fibras recubiertas con CAR/DVB/PDMS de 1 cm. Las fibras se acondicionan antes de uso en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 250 °C por 2 h. El procedimiento de extracción se realizó de acuerdo con lo descrito por Ovalle-Magallanes y colaboradores (2014), de la siguiente manera: las fases de la muestra que contenían material seco (20 mg), cloruro de sodio (7.5 mg) y agua destilada (5 ml) se colocaron en viales adecuados; después, las agujas que contenían la fibra del dispositivo de MEFS se introdujeron a través del septum de los viales y se dejó durante 5 min a temperatura ambiente, con una velocidad de agitación de 600 rpm. Luego de la toma de muestra, la desorción de los analitos se hizo térmicamente en el cromatógrafo; posteriormente se analizaron utilizando

las condiciones de CG descritas. Los análisis se realizaron por triplicado y se utilizaron las partes aéreas secas y molidas.

3.7 Instrumentación y condiciones cromatográficas para el análisis de la fracción de AcOEt y del aceite esencial

El perfil cromatográfico de la fracción orgánica se obtuvo con un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas (CLUE-EM) equipado con una bomba cuaternaria, un automuestreador, un detector de UV con un arreglo de fotodiodos, una fuente de ionización en electrospray y un detector ELSD SQ2. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa Acquity (Waters, Miliford, MA, EE. UU.). Se utilizó una columna BEH Shield RP18 y un gradiente de elución de ACN y H₂O_{dd} (ácido fórmico 0.1%), con un flujo de 0.3 ml/min. El gradiente de elución se describe en la Tabla 3. Las condiciones de ionización en los estudios por EM fueron las siguientes: voltaje capilar (Kv): 3.5 (ionización positiva) y 2.5 (ionización negativa); con (V): 4.5; temperatura de la fuente: 120°C; temperatura de desolvatación: 360°C; flujo del gas de desolvatación (l/h): 571.

Tabla 3. Gradiente de elución utilizado en el análisis por CLUE-EM para el establecimiento del perfil de la fracción de AcOEt

Tiempo (min)	%ACN	%H ₂ O (0.1% de ácido fórmico)
0	15	85
3	35	65
5	45	55
8	65	35
10	80	20
11	100	0.0
12	100	0.0
12.5	15	85
15	15	85

El aceite esencial se analizó por CG-EM en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890N equipado con una columna capilar DB-5 de sílice fundida no polar (20 m x 0.18 mm; grosor de la película 0.18 μm , Agilent HP), acoplado a un detector de masas con tiempo de vuelo LECO (MS-TOF, Agilent Technology, Santa Clara, CA) con un voltaje de ionización de 70 eV. Las condiciones de operación fueron las siguientes: el inyector funcionó en modo Split (relación 20:1), a 300 °C; la temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante 3 min e incrementó 20 °C/min hasta alcanzar 300 °C, la cual que se mantuvo durante 50 min. El gas portador (He) se ajustó a un flujo de 1 ml/min. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con los de la Biblioteca de espectros de masas NIST 98 y la biblioteca del equipo, así como de sus índices de retención en relación con una serie homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ calculados de acuerdo con Van Den Dool y Kratz (1963) y con los valores reportados en la literatura (Adams, 2007).

3.8 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron por la técnica de reflectancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 400. Los análisis de rotación óptica se realizaron en un polarímetro Perkin-Elmer 343 a 25°C en metanol y piridina y a la longitud de onda de la línea D-sodio ($\lambda=589$ nm).

El análisis de espectrometría de masas por DART se realizó en modo positivo, en un equipo JEOL The AccuTOF JMS-T100L, así como el análisis de masas exactas realizado por ESI en modo positivo. Finalmente, el análisis por impacto electrónico se realizó en modo positivo, en un equipo JEOL MStation JMS-700.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H, 400 MHz y 700 MHz) y de carbono (RMN-¹³C, 700 MHz) se registraron en un equipo Bruker AVANCE III HD, equipado con una criosonda TCI de 5 mm o en un equipo Varian, utilizando CDCl₃, DMSO-*d*₆ o Piridina-*d*₅ como disolvente y tetrametilsilano como estándar interno, en el Instituto de Química de la UNAM.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la composición química de la decocción

4.1.1 Fracción de Acetato de Etilo

Con el propósito de determinar la composición del preparado tradicional de la planta, y a la postre los principios antinociceptivos de ésta, se realizó el fraccionamiento preliminar de la decocción vía un proceso de reparto con acetato de etilo. Este disolvente se utilizó debido a que extraía la mayor cantidad de compuestos de acuerdo con los perfiles cromatográficos.

En la Figura 9 se ilustra el cromatograma de la fracción de acetato de etilo; los compuestos mayoritarios en la fracción presentaron el perfil de UV característico de compuestos eran de tipo flavonoide los cuales se identificaron tentativamente a partir de la relación m/z correspondiente al $[M-1]^-$ como glicósidos derivados de la quercetina (Figura 10).

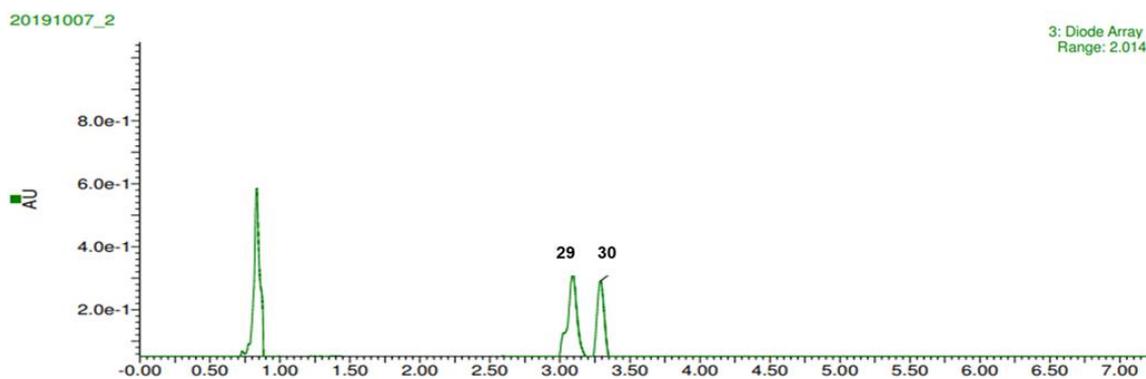


Figura 9. Cromatograma de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *M. divaricatum* obtenido por PDA, con $\lambda = 254$ nm.

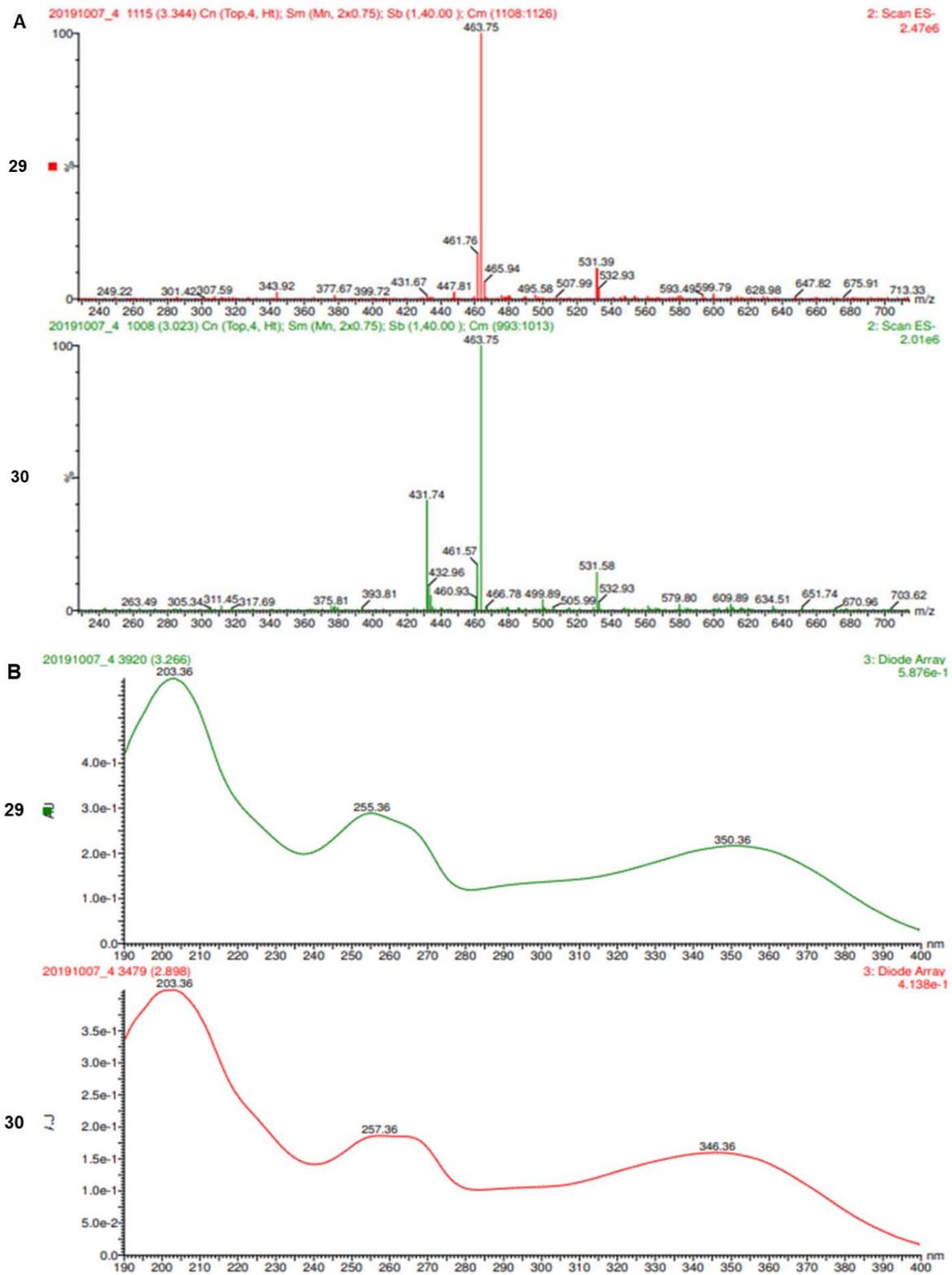


Figura 10. A) Cromatograma de iones totales en EM-ESI (modo negativo). B) Espectro de UV mostrando los máximos de absorción.

El estudio fitoquímico de la fracción se llevó a cabo mediante el uso de técnicas cromatográficas en columna abierta (Sephadex LH-20) y de alta eficiencia. El resultado de este proceso fue el aislamiento de la mezcla de isoquercitrina **29** e hiperósido **30**. Estos productos se caracterizaron por comparación de sus parámetros espectroscópicos, incluyendo los de RMN, espectrométricos y físicos con aquellos descritos previamente para estos productos. También se realizaron pruebas de coelución cromatográficas con muestras auténticas. Este estudio representa el primer aislamiento de estos productos de *Melampodium divaricatum*. Sus espectros de UV presentaron los máximos de absorción típicos de flavonoles. Sus espectros de RMN-¹H (Figuras E1 y E2) presentan los sistemas AB y ABX típicos del flavonol quercetina y, señales para una unidad sacárida. El espectro de RMN-¹³C (Figura E3) corroboró la presencia del núcleo quercetina (Albadawi *et al.*, 2017) en la molécula y que el producto **30** es el 3-O-galactósido y el **29** es el 3-O-glucósido (Han *et al.*, 2004). En el espectro de RMN protónico, los hidrógenos anoméricos aparecen a δ 5.27 (d, $J= 7.5$ Hz) para **29** y δ 5.18 (d, $J= 7.8$ Hz) para **30**. En ambos casos la magnitud de la constante de acoplamiento indicó la configuración α del hidrógeno anomérico y su relación *trans*-diaxial con H-2' de la unidad sacárida. La configuración D del azúcar se asume con base en consideraciones biogénicas. La presencia de estos compuestos en la decocción justifica el efecto antinociceptivo de ésta, previamente detectado mediante la prueba de la formalina. En general los flavonoides poseen actividad biológica como antiinflamatorios, antinociceptivos y antioxidantes (Havsteen, 1983; Middleton y Kandaswami, 1992; Kim *et al.*, 1998). En lo particular, previamente se describió que una mezcla 7:3 de hiperósido e isoquercitrina provoca un efecto antinociceptivo significativo en la prueba de estiramiento abdominal (inducido por *p*-benzoquinona) (Erdemoglu *et al.*, 2008). Rylski y colaboradores (1979) demostraron que el hiperósido a dosis entre 3.5 y 10 mg/kg administrado vía *i.p.* demostró un efecto antinociceptivo dependiente de la concentración en el modelo de la placa caliente. En otros estudios se ha demostrado también que el producto presenta un bajo efecto antiinflamatorio en un modelo de edema de oreja inducido por aceite de Croton en ratón (Sosa *et al.*, 2007), reduce la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Hammer *et al.*, 2007), disminuye la producción de NO en macrófagos estimulados por lipopolisacárido (LPS) (Lee *et al.*, 2008), reduce el

edema de pata inducido por carragenina y el de oreja inducido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) en ratones (Erdemoglu *et al.*, 2008). Por otro lado, la quercetina también posee efectos antinociceptivos en varios modelos incluyendo el de la placa caliente, el de estiramiento abdominal inducido por ácido acético, formalina, capsaicina, glutamato y retirada de la cola en roedores, entre otros. Anjaneyulu y Chopra (2003) demostraron que la quercetina mejora el dolor neuropático en ratas diabéticas. Sus efectos antinociceptivos están mediados por los sistemas opioide, serotoninérgico, GABAérgico y nitrérgico. A una dosis de 100 mg/kg, la quercetina inhibe la respuesta antinociceptiva de la prueba de la formalina y en el modelo PIFIR (*Pain Induced Functional Impairment Model in Rats*) (Martínez *et al.*, 2009) y a una concentración 100 μ M inhibe la fosforilación de cinasas inducida por LPS (Lee *et al.*, 2008). Cabe destacar que Chang y colaboradores (2005) estudiaron las características farmacocinéticas del hiperósido y de la isoquercitrina y encontraron que esta última se hidroliza con mayor facilidad que el hiperósido en el tracto gastrointestinal antes de ser absorbidos y pasar a circulación sistémica. Esto sugiere que la naturaleza del azúcar de los diferentes derivados de la quercetina repercute en los perfiles de absorción. Además de los estudios de la actividad antinociceptiva de la isoquercitrina e hiperósido, es necesario señalar que muchas plantas que contienen ambos glicósidos o uno de ellos han demostrado un efecto antinociceptivo importante (Mio *et al.*, 2002; Erdemoglu *et al.*, 2008; Galeotti *et al.*, 2010; Schulte Haas *et al.*, 2010; Küpeli Akkol *et al.*, 2012; Bahamonde *et al.*, 2013; *inter alia*). Así, por ejemplo, la decocción de las flores de *Chilothrichum diffusum* (G. Forst.) Kuntze. (*Asteraceae*) presentó un efecto antinociceptivo significativo en el modelo la placa caliente; los principales constituyentes del extracto activo fueron hiperósido, isoquercitrina y otros derivados de la quercetina y campferol (Bahamonde *et al.*, 2013).

4.1.2 Fracción de Diclorometano

La fracción de diclorometano mostró una gran similitud a la fracción de acetato de etilo. El fraccionamiento de la misma, mediante cromatografía rápida tipo flash, permitió el aislamiento de un producto de naturaleza terpenoide y una ceramida.

El primero se obtuvo como un sólido blanco que se caracterizó como 3- α -O- β -D-glucopiranosil-16- α -hidroxi-*ent*-kaurano. La fórmula molecular del producto se estableció como C₂₆H₄₄O₇ por EM tipo ESI⁺. Esta fórmula permite cinco grados de insaturación. El espectro en el IR (Figura E4) presentó bandas de estiramiento C—H en la región 2925-2866 cm⁻¹ y de estiramiento O—H alrededor de 3348 cm⁻¹, indicativas de un producto hidrocarbonado con grupos hidroxilos. Los espectros de RMN (Tabla 4) indicaron que el producto era un glicósido de un diterpenoide de tipo kaurano (Castro *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 2010; Arciniegas *et al.*, 2016; *inter alia*). Así, el espectro de RMN-¹³C (Figura E6) presentó 26 señales de las cuales seis corresponden a la glucosa (δ_c 61.3, 70.3, 76.6, 73.5, 77.0, 100.7) y 20 al esqueleto hidrocarbonado. De éstas últimas, cuatro corresponden a metilos unidos a carbonos cuaternarios (δ_c 16.6, 17.5, 28.3, 24.4), cuatro a metinos, ocho a metilenos y cuatro a carbonos cuaternarios, uno de ellos unido a una función oxigenada (Liu *et al.*, 2003; Arciniegas *et al.*, 2016). El análisis de los espectros de RMN-¹H y HSQC (Figuras E5 y E7), y la comparación con los desplazamientos químicos reportados para otros kauranos (Tori *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2010; Topcu *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; *inter alia*), permitieron la asignación de la mayoría de los carbonos y protones de la molécula (Figura E9). Así el hidrógeno anomérico se apreció como un doblete ($J = 7.7$ Hz) en δ_H 4.14, lo que sugiere su orientación axial; este hidrógeno mostró una correlación con el carbono en δ_c 84.0 (C-3) en el experimento HMBC; la clara correlación de las señales de los protones de los metilos geminales en C-4 (δ_H 0.71 y δ_H 0.93) con la señal en δ_c 84.0 corroboró la asignación de C-3, y que la glucosa se encontraba unida al oxígeno en esta posición. El patrón de acoplamiento de H-3 (dd, $J = 12.9, 4.8$ Hz) observado en el espectro de RMN-¹H, permitió establecer su orientación beta axial, por lo tanto, la función oxigenada se encuentra alfa orientado. Otras correlaciones relevantes observadas en el HMBC (Figura E8) se resumen en la Figura 10; en conjunto todas estas permitieron asignar H-5, H-20, H-9, H-14, y que el carbono cuaternario oxigenado corresponde a C-16. Las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura E10), las cuales se resumen en la Figura 11, confirman la orientación relativa de los sustituyentes en el esqueleto kaurano.

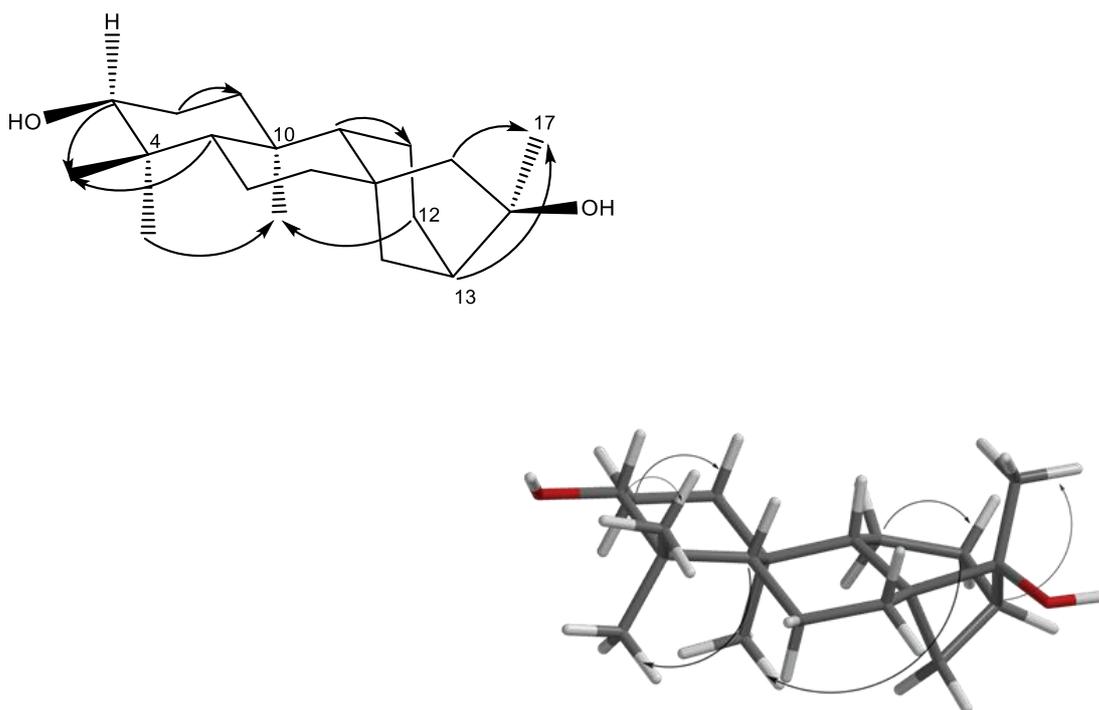


Figura 11. Correlaciones clave en HMBC (C→H) para la asignación de H-5, H-20, H-9, H-14 y que el carbono cuaternario oxigenado C-16.

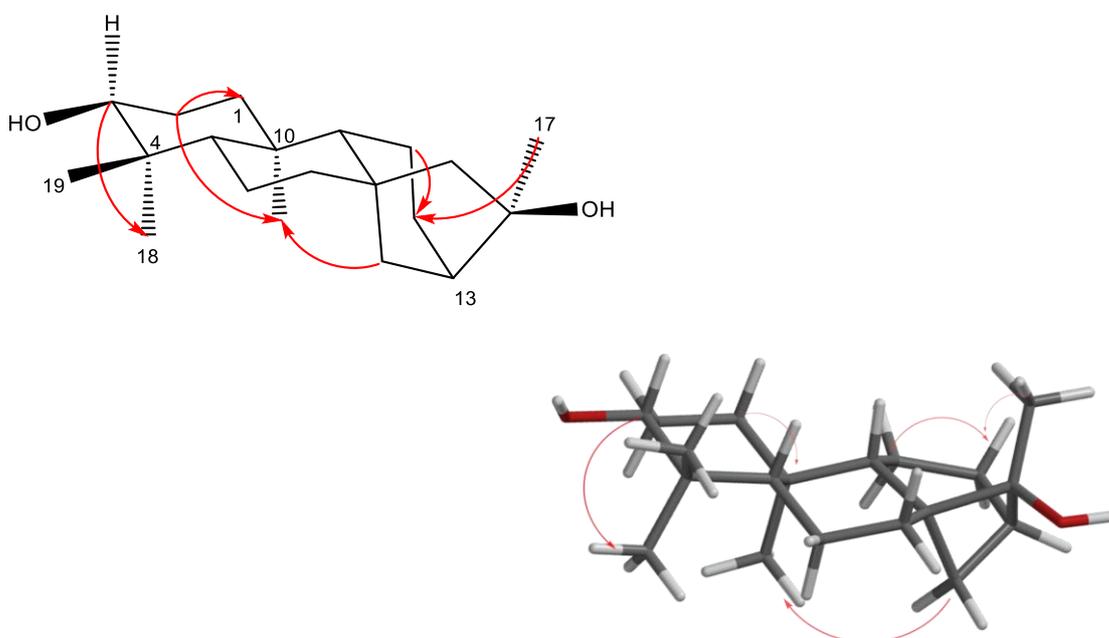


Figura 12. Correlaciones clave en NOESY para la orientación relativa de los sustituyentes en el kaurano.

La comparación de la rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = -31$ del producto **59** con los de una serie de 3-O-glucósidos-16-hidroxi-*ent*-kauranos, así como consideraciones biogénicas, permiten proponer que el producto natural es un *ent*-kaurano. Así mismo, la comparación de los desplazamientos químicos en RMN-¹³C con los reportados en la literatura sugiere que el metilo en C-16 (C-17) se encuentra β -orientado y el hidroxilo α -orientado (Tori *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2017; Gobu *et al.*, 2017). Castro y colaboradores reportaron un glicósido similar, y la única diferencia radica en el patrón de acoplamiento de H-3 (dd, J=2.5 Hz). Por otra parte, la aglicona del producto **59** es idéntica a un producto reportado por Tori y colaboradores en 1993 y que fue caracterizado como 3 α ,16 α -dihidroxi-*ent*-kaurano. La presencia de este producto en la planta podría estar relacionado con el efecto antinociceptivo que ejerció la decocción durante la fase inflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA (Arciniegas *et al.*, 2016), puesto que muchos productos relacionados estructuralmente han demostrado tener actividad en otros modelos para el estudio del dolor y la inflamación (Liang *et al.*, 2019).

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN (700 MHz, DMSO-*d*₆) del compuesto **59**

Posición	Tipo	δ_C	δ_H (J en Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	CH ₂	38.4	1.46-1.77 (m)	H-2	H-20	
2	CH ₂	26.6	1.46-1.50 (m)	H-1, H-3	H-1	H-1, H-20
3	CH	84.0	3.1 (dd, 12.9, 4.8)	H-2	H-18, H-19, H-1'	H-18, H-1'
4	C	37.9	--		H-3, H-18, H-19	
5	CH	55.1	0.7 (d, 1.4)	H-6	H-18, H-19	
6	CH ₂	19.9	1.46, s	H-7	H-18, H-19	
7	CH ₂	41.7	1.4-1.50, m	H-6	H-6	
8	C	44.5	--		H-15, H-20	
9	CH	56.3	0.9, m	H-20	H-11, H-20	
10	C	36.9	--			
11	CH ₂	17.8	0.98-1.47 (d, 3.5)	H-12	H-1	H-12
12	CH ₂	22.9	1.48-1.68, m	H-11	H-10, H-20	H-11, H-17
13	CH	47.8	1.72, m		H-15, H-17	
14	CH ₂	37.8	0.7-1.75, m		H-11	H-20
15	CH ₂	57.5	1.38-1.43, m		H-17	H-14
16	C	76.8	--		H-14, H-15, H-17	
17	CH ₃	24.4	1.21, s	H-15	H-15, OH	H-12
18	CH ₃	28.3	0.71, s	H-3, H-19	H-3, H-19	H-4'
19	CH ₃	16.6	0.93, s	H-6, H-18	H-3	
20	CH ₃	17.5	0.98, s	H-9	H-5, H-18	H-14
1'	CH	100.7	4.14 (d, 7.7)	H-2'		
2'	CH	73.5	2.89, m	H-1', H-3'	H-3'	
3'	CH	76.6	3.12, s	H-6'	H-2', H-5'	
4'	CH	70.3	3.15	H-5'	H-3'	H-18
5'	CH	77.0	3.03, s	H-4'	H-1', H-2', H-4'	H-1'
6'	CH ₂	61.3	3.64 – 3.04 (dd, 3.6, 8.0)	H-3'	H-5'	

4.1.2.1 N-[(2S, 3S, 4R)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2'R*,4Z)-4-tetracosenamida (**61**)

El compuesto **61** fue aislado como un sólido blanco ópticamente activo ($[\alpha]_D^{20} = +13$, $c=0.1$, piridina). Su fórmula molecular fue establecida mediante espectrometría de masas exactas tipo ESI⁺ como C₄₂H₈₄N₁O₅. Esta fórmula permite dos grados de insaturación. El espectro en el IR presenta bandas intensas en 3331, 2954, 2871, 1620 y 1466 cm⁻¹ asignables a grupos hidroxilos la primera, las otras a una amida de un ácido graso. Los espectros de RMN (Tabla 5) confirmaron esta propuesta. El espectro de RMN-¹H en piridina-*d*₅ presenta señales para cinco hidrógenos intercambiables, una debido al grupo NH de la amida que aparece como un doblete ($J= 9$ Hz) en δ_H 8.6 y las restantes a grupos hidroxilos (δ_H 7.6, 6.7, 6.3, 4.9). En la zona a campo alto se observa un triplete ($J= 6.8$ Hz) asignable al metilo terminal de una cadena hidrocarbonada, como la señal integral para seis hidrógenos, se puede inferir que la molécula contiene dos de estas cadenas; este triplete correlaciona en el espectro HSQC con la señal en δ_C 15.6. Dichas cadenas se evidencian también por la presencia en los espectros de señales asignables a varios metilenos [δ_H 1.27 (m), 1.96 (m) y 2.50 (m)]. De manera adicional, los espectros de RMN presentan señales correspondientes a tres metinos [δ_H 5.14 (dd, $J= 8.94, 4.55$ Hz), 4.4 (d, $J= 5.6$ Hz), 4.3 (m); δ_C 54.24, 78.12, 74.17] y un metileno [δ_H 4.53 (dd, $J= 10.6, 4.8$ Hz), 4.45 (m) y δ_C 63.28] unidos a oxígeno y un metino unido a un grupo amino [δ_H 5.13 (dd, $J= 8.9, 4.6$ Hz), δ_C 54.24]. Las correlaciones observadas en el experimento COSY para las señales permitieron integrar el fragmento **a** que se ilustra en la Figura 14 que corresponde a un residuo 2-amino-1,3,4-triol. Entonces, el último metino unido a oxígeno se encuentra aislado de los otros tres. El tratamiento del producto natural con piridina y anhídrido acético generó el derivado tetracetilado (**61a**) (Figura 13) corroborando químicamente la presencia de los cuatro grupos hidroxilo en la molécula. Finalmente, los espectros de RMN del producto natural mostraron señales para una doble ligadura de tipo *cis* [δ_H 5.52 (m), δ_C 131.9 y δ_H 5.57 (dt, $J= 6.47$ Hz), δ_C 132.1] y para un grupo carbonilo en δ_C 176.4. Las correlaciones observadas en el HMBC para este último grupo y para el carbono en δ_C 131.9 de la doble ligadura, permitieron evidenciar la estructura parcial **b**. Los elementos estructurales evidenciados por el análisis de

los espectros de RMN permitieron entonces concluir que el producto natural es del tipo de las ceramidas.

La presencia de los fragmentos de masa 665 m/z y 316 m/z en el espectro de DART, debido a la pérdida de agua y a la ruptura alfa al grupo amida, permitió establecer la estructura del residuo ácido como se indica en la estructura parcial **c**. Por lo tanto, la estructura de la porción amina se estableció como se señala en la estructura **d**.

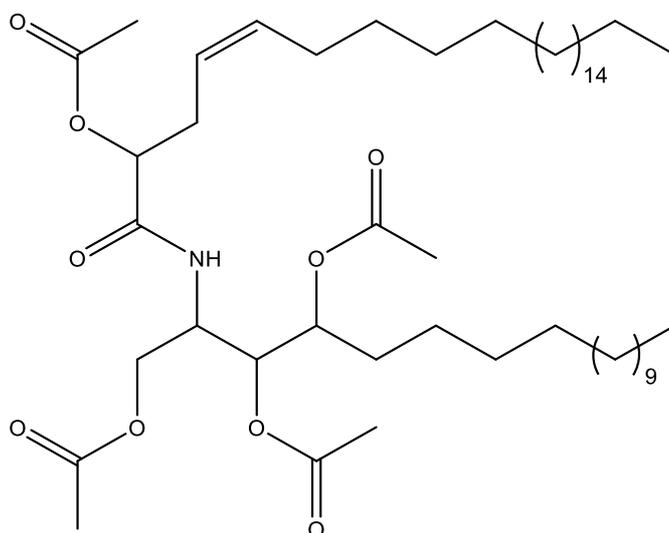


Figura 13. Derivado acetilado del compuesto **61**.

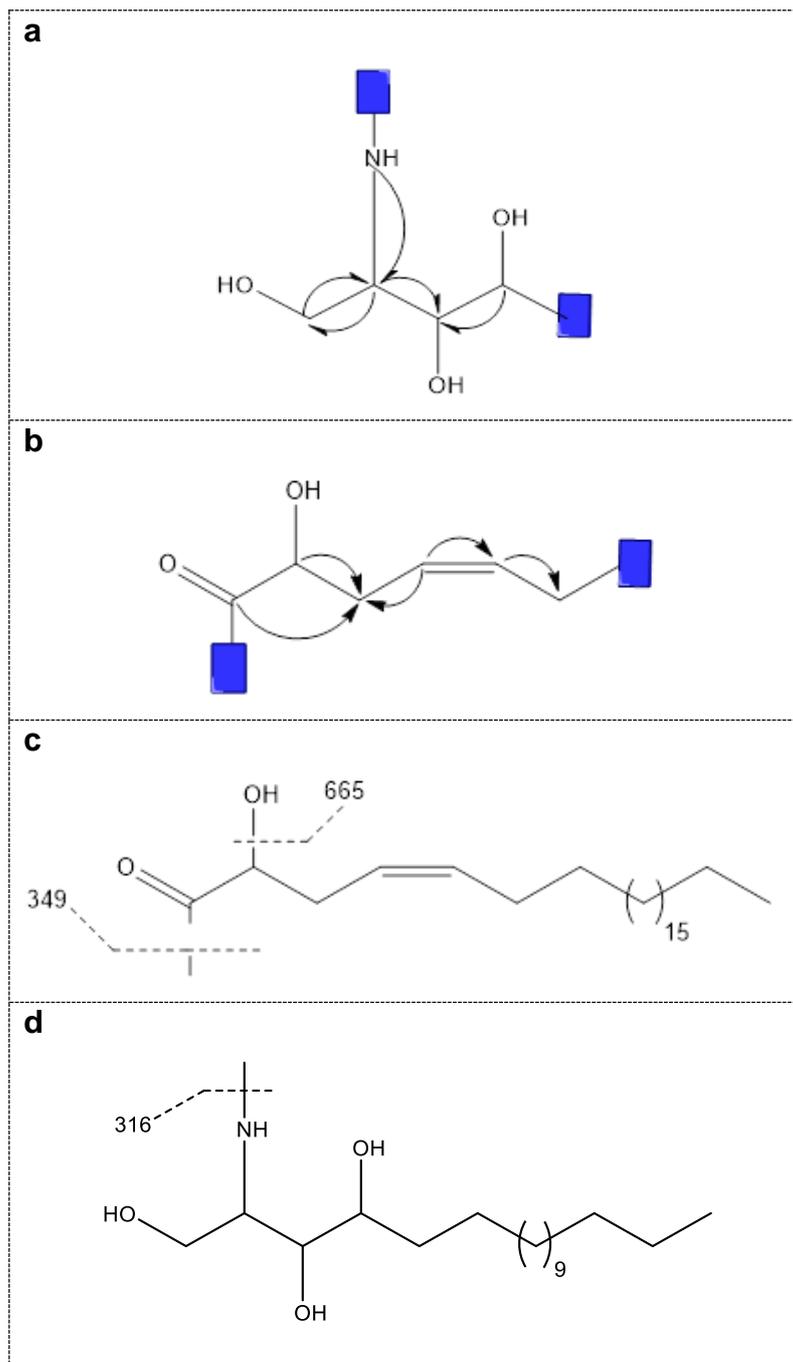
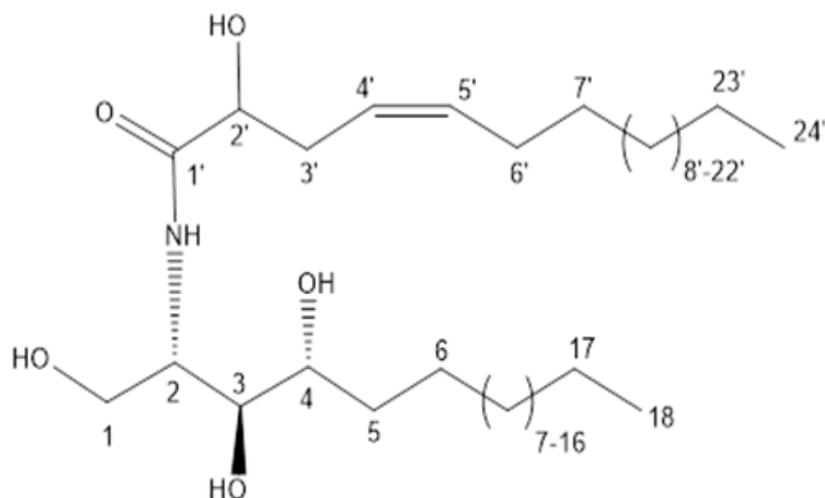


Figura 14. Estructuras parciales del compuesto **61**. **a)** Correlaciones clave en COSY (H→H); **b)** Correlaciones clave en HMBC (C→H); **c)** Fragmentos en DART+ del residuo ácido; **d)** Fragmento en DART+ del residuo 2-amino-1,3,4-triol.

La integración de los elementos estructurales, que se resumen en la Figura 14, permite proponer la estructura plana del producto como se indica a continuación.



La comparación de los desplazamientos químicos de los espectros de RMN del residuo 2-amino-1,3,4-triol, con aquellos de otras ceramidas previamente descritas en el reino vegetal, permite proponer que la configuración de los centros estereogénicos C-2, C-3 y C-4 es 2*S*, 3*S*, y 4*R*, respectivamente (Yemele Bouberte *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Eltamany *et al.*, 2015; Dawé *et al.*, 2017; *inter alia*). Cabe destacar que biogénicamente es altamente probable que la configuración en C-2' sea *R* como en otras ceramidas aisladas de la familia *Asteraceae* (Thu *et al.*, 2013; Suo *et al.*, 2014). Sin embargo, sería procedente realizar una metanólisis en medio ácido de la ceramida, y medir el dicroísmo circular del éster resultante para comprobar la estereoquímica en C-2'. Otra alternativa para determinar la configuración de ese centro sería preparar el éster de Mosher del éster metílico resultante de la reacción anterior. Con base en estas evidencias, se propone que la estructura del compuesto **61** es N-[(2*S*, 3*S*, 4*R*)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil)-octadecil]-2'-hidroxi-(2'*R**,4*Z*)-4-tetracosenamida (Figura 15), un nuevo producto natural.

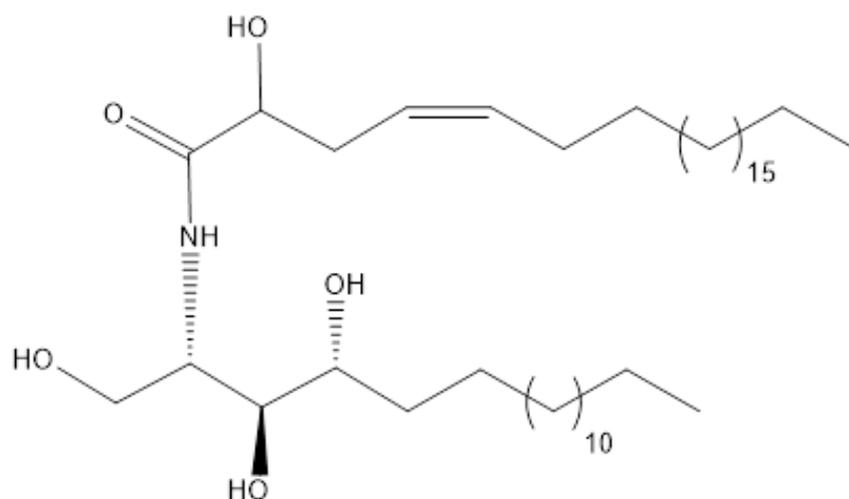


Figura 15. Estructura de N-[(2S,3S,4R)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2'R*,4Z)-4-tetracosenamida.

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN (700 MHz, Piridina-*d*₅) del compuesto **61**

Posición	Tipo	δ_c	δ_H (J en Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	CH ₂	63.28	4.53 - 4.44		H-2, H-4	H-2, H-3, H-4, H-2'
2	CH	54.24	5.13	H-1, H-3	H-1, H-3	H-1, H-3
3	CH	78.12	4.37	H-1, 2, 4	H-1, H-4, H-5	H-1, H-2, H-5
4	CH	74.17	4.31	H-1, H-3	H-2', H-5	H-5
5	CH ₂	34.26	2.16 - 2.00		H-3, H-4	
7-16	CH ₂	30.7-31.4	1.26			
17	CH ₂	24.21	1.26	H-18	H-18	H-18
18	CH ₃	15.56	0.88 (t, 6.8)	H-17	H 7-16, H-17	H-17
	NH		8.6 (d, 8.9)		H-1, 2, 3, 4	
1'	COO	176.47				NH, H-1', H-2', H-3'
2'	CH	73.73	4.64	H22	H-3', H 10'-24'	H-3', H-5'
3'	CH ₂	36.99	2.24 - 2.05			H-6', 7', 10-22'
4'	C=C	131.96	5.52 (m)	H5'	H-6', 7', 8'	H-5', H-3', H-6'
5'	C=C	132.08	5.57 (dt, 6.4)	H4'	H-6', 7', 8'	H-5', H-3', H-6'
6'	CH ₂	35.1	2.22 (m)	1.96	H-3', H-5'	H-3', H-7'
7'	CH ₂	34.6	2.175 (m)	H-6'	H 10'-22'	H4'-5', H-6'
8'	CH ₂	34.26	2.0125 (m)	H-7', H 10-22'		H-3', H-4', H-5'
9'-22'	CH ₂	30.7-31.4	1.26 (s)	H-24'	H-4', H-5'	
23'	CH ₂	24.21	1.26 (s)	H-24'	H 10'-22', H-24'	H-24'
24'	CH ₃	15.56	0.88 (t, 6.8)	H-23'	H 10-23'	H-23'

Ceramidas similares al compuesto **61**, al igual que otros esfingolípidos, han demostrado diversas actividades biológicas (Cremesti y Fischl, 2000), incluyendo las citotóxicas, antiulcerogénicas, hepatoprotectoras e inmunoestimulantes (Pei *et al.*, 2010 y referencias allí citadas). Estas actividades no están relacionadas con el uso popular de esta especie en las prácticas médicas tradicionales. Sin embargo, no se puede descartar que sus productos de degradación actúen como segundos mensajeros en procesos relacionados con el dolor (Hannun y Bell, 1989).

4.2 Establecimiento de las pruebas químicas de identidad

4.2.1 Composición química del aceite esencial

La composición de los aceites esenciales se utiliza a menudo como prueba de identidad en numerosas farmacopeas. Por lo tanto, se procedió a establecer la composición del aceite de la planta recolectada en México. La identificación de los componentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de *M. divaricatum* se llevó cabo por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). Los resultados obtenidos a partir de este análisis, realizado por triplicado, se ilustran en la Figura 18 y en la Tabla 6. El rendimiento (%) del aceite esencial obtenido a partir de *M. divaricatum* fue aproximadamente de 0.091 con base en el peso de planta fresca. Los productos se identificaron mediante la comparación de sus índices de retención con respecto a una serie homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ calculados de acuerdo con Van Den Dool y Kratz (1963) y con los reportados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) y los descritos por Adams (2007). De manera simultánea se obtuvieron los espectros de masas de los componentes de la esencia por impacto electrónico (Apéndice I). Estos espectros de masas fueron comparados con aquellos de la base de datos del equipo y con los reportados en la literatura. El análisis cromatográfico permitió la identificación de dieciséis constituyentes en el aceite esencial de *M. divaricatum*, mismos que representan el 95.62 % de su composición. De estos constituyentes, el β -cariofileno (**45**), el germacreno-D (**47**), β -elemeno (**51**), δ -elemeno (**62**), el γ -patchuleno (**63**) y el 7-*epi*- α -selineno (**64**) (Figura 16) destacan por estar en mayor proporción. La

composición encontrada para *M. divaricatum* recolectada en México muestra similitud con la reportada para la especie brasileña por Duarte Moreira y colaboradores (2014). De tal forma que ambos aceites contienen β -elemeno, β -cariofileno y germacreno-D como productos mayoritarios. Por lo tanto, uno de estos compuestos se puede seleccionar como marcador del aceite esencial y su presencia en el aceite se puede detectar por cromatografía en capa fina como se muestra en la Figura 17. En este caso se escogió el β -cariofileno que resulta fácilmente detectable en la esencia.

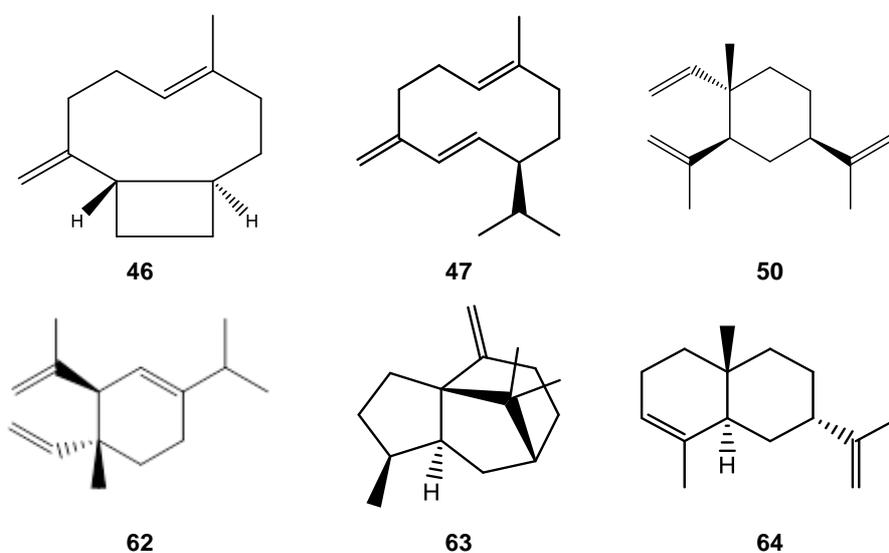


Figura 16. Constituyentes que se encuentran en mayor proporción en el AE de *M. divaricatum*.

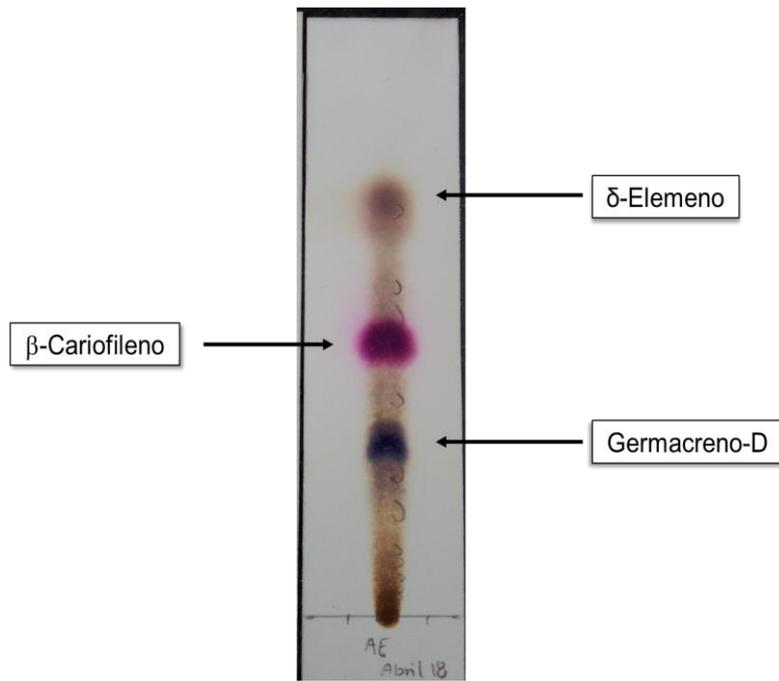


Figura 17. Cromatografía en capa fina del AE de *M. divaricatum*. Sistema de elución: Hex/CH₂Cl₂ (1:1).

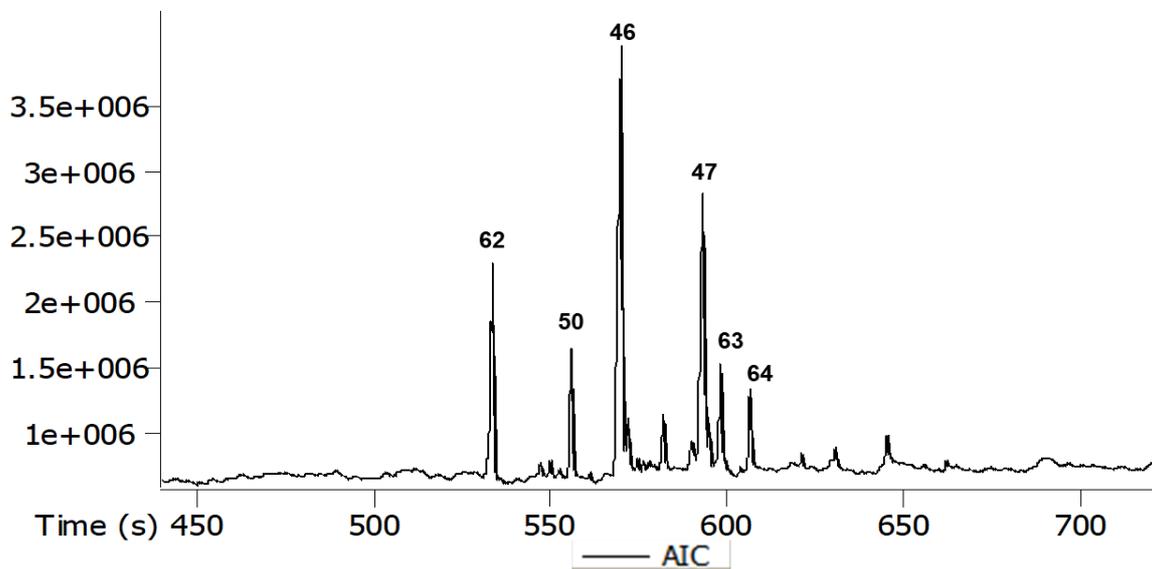


Figura 18. Cromatograma iónico total del aceite esencial de *M. divaricatum* analizado por CG-EM.

Tabla 6. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *M. divaricatum*

No.	Compuesto	IR teórico	IR experimental	Área (%)	Método de identificación
1	ND	ND	814.78	0.7426	
2	3-Hexenol	859	851.36	0.5160	EM, IR
3	Etilbenceno	857	854.35	0.4618	EM, IR
4	<i>m</i> -Xileno	864.1	862.81	0.9048	EM, IR
5	<i>o</i> -Xileno	891	886	0.3541	EM, IR
6	ND	ND	975.61	0.5174	
7	Mesitileno	994	987.22	0.9281	EM, IR
8	Undecano	1100	1100.1	0.1679	EM, IR
9	δ -Elemeno	1335	1341.6	11.6060	EM, IR
10	ND	ND	1372.9	1.5418	
11	α -Cubebeno	1345	1379.4	1.0130	EM, IR
12	β -Elemeno	1389	1393.4	6.8217	EM, IR
13	β -Cariofileno	1417	1429.8	30.3790	EM, IR
14	γ -Elemeno	1434	1434.5	3.3086	EM, IR
15	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1432	1435.1	3.5382	EM, IR
16	<i>cis</i> - β -Farneseno	1454	1442.1	0.5137	EM, IR
17	ND	ND	1446.5	0.4126	
18	α -Humuleno	1452	1461.6	3.0348	EM, IR

IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; ND: no determinado

Tabla 6. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *M. divaricatum*.

Continuación.

No.	Compuesto	IR teórico	IR experimental	Área (%)	Método de identificación
19	Germacreno-D	1481	1490.7	19.9270	EM, IR
20	γ -Patchuleno	1502	1504.4	6.1199	EM, IR
21	β -Bisaboleno	1505	1507.6	0.6930	EM, IR
22	7- <i>epi</i> - α -Selineno	1522	1526.5	5.3351	
23	ND	ND	1633.1	1.1633	
	TOTAL			95.6227	

IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; ND: no determinado

4.2.2 Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles

Con el propósito de establecer el contenido de los componentes volátiles con mayor detalle, se realizó un análisis de microextracción en fase sólida (MEFS) acoplada al CG. La MEFS es un método simple de preparación de muestra y muestreo, desarrollado inicialmente para la determinación de compuestos orgánicos volátiles presentes en el ambiente (Zabaras y Wyllie, 2005). La técnica consiste en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente polimérico seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. Cuando es térmica, con el aumento de temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas acarreador (He). En este caso se utilizó una fibra con recubrimiento de divinil benceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) que permite la extracción de terpenoides de mediana polaridad como los detectados en el aceite esencial. El resultado obtenido a partir de este análisis permitió identificar cinco constituyentes que representan el 100% de la composición total de volátiles detectados con la fibra DVB/CAR/PDMS. Al igual que en el caso de la esencia, el β -cariofileno (**46**) es el componente más abundante, presente en un 60.45% (Tabla 7 y Figura 18), seguido por el δ -elemeno (**62**) que en un 15%, el β -elemeno (**51**) en un 10%, el aromadendreno (**65**) en un 8.7% y el *cis*- α -bisaboleno (**66**) en un 5.6%.

Tabla 7. Compuestos volátiles de las partes aéreas de *M. divaricatum* obtenidas por MEFS

No.	Compuesto	IR teórico	IR experimental	Área (%)	Método de identificación
1	δ -Elemeno	1335	1328.2	15.089	EM, IR
2	β -Elemeno	1389	1380.1	10.04	EM, IR
3	β -Cariofileno	1417	1413.2	60.451	EM, IR
4	Aromadendreno	1419	1419.7	8.735	EM, IR
5	<i>cis</i> - α -Bisaboleno	1444	1446.1	5.6855	EM, IR
Total				100	

IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas

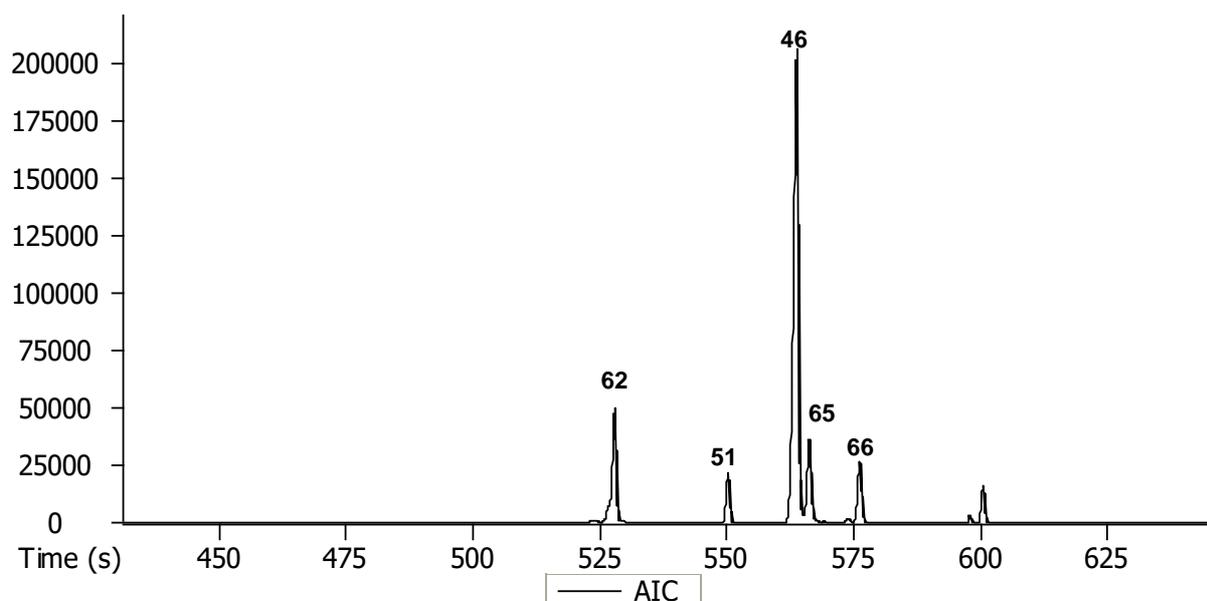
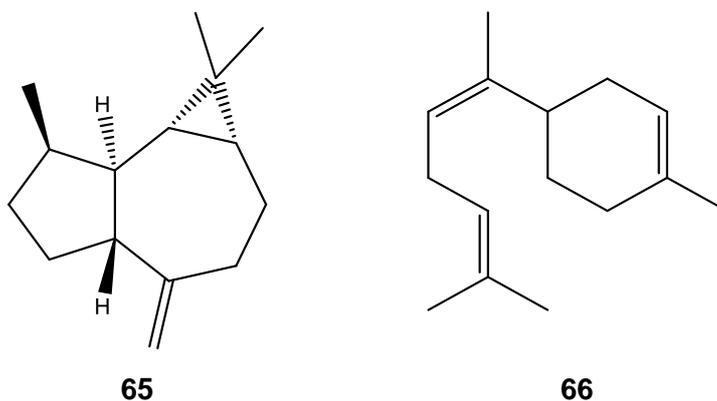


Figura 19. Cromatograma iónico total de los compuestos volátiles presentes en las partes aéreas de *M. divaricatum* analizados por la técnica MEFS utilizando una fibra de DVB/CAR/PDMS



Cabe mencionar que el β -cariofileno (**46**) se detectó en la decocción de la planta mediante cromatografía en capa delgada y de gases. Por consiguiente, es altamente probable que este compuesto contribuya también al efecto antinociceptivo de la planta. De tal manera que la administración crónica de este sesquiterpeno (10 mg/kg/60 μ l) modula la nocicepción en el modelo de la placa caliente en ratones diabéticos de tipo BALB/c. En este mismo modelo se encontró que el β -cariofileno disminuye la liberación de la sustancia P e interleucinas (IL-6 and IL-1 β). Por otra parte, muchas esencias ricas en β -cariofileno han demostrado efecto antinociceptivo en varios modelos de dolor (Aguilar-Ávila *et al.*, 2019; Saldanha *et al.*, 2019; Coelho-De-Souza *et al.*, 2018; Rabelo *et al.*, 2014; *inter alia*).

5. CONCLUSIONES

- La presencia de isoquercitrina (**29**), hiperósido (**30**) y β -cariofileno (**46**) en la decocción de *M. divaricatum* es con su efecto antinociceptivo. Ya que en trabajos previos se ha demostrado que estos productos atenúan la respuesta nociceptiva en varios modelos animales. No se puede descartar que la ceramida y el *ent*-kaurano caracterizados contribuyan también al efecto farmacológico demostrado por el preparado tradicional.
- De la fracción de diclorometano de la decocción se aislaron y purificaron dos compuestos, los cuales fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como 3- α -3-O- β -D-glucopiranosil-16- α -dihidroxi-*ent*-kaurano (**59**) y N-[(2S, 3S, 4R)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxi-(2'R*,4Z)-4-tetracosenamida (**61**). Ambos son nuevas entidades químicas. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, la estructura del *ent*-kaurano descrito por Castro y colaboradores (1989) como metabolito novedoso de *Smallanthus macvaughn* debe ser revisada. La ceramida también se obtuvo del extracto orgánico total.
- El análisis del aceite esencial por CG-EM permitió establecer un elevado porcentaje de β -cariofileno (**46**), germacreno-D (**47**), β -elemeno (**50**), δ -elemeno (**62**), γ -patchuleno (**63**) y 7-*epi*- α -selineno (**64**). La composición encontrada muestra similitud con la reportada para la especie brasileña. El β -cariofileno presente en la esencia se puede detectar fácilmente por cromatografía en capa delgada, por lo que se puede seleccionar como un producto marcador del aceite esencial de la planta.
- El análisis de los componentes volátiles, obtenidos mediante la técnica de microextracción en fase sólida, permitió la identificación de β -cariofileno (**46**) como el componente volátil más abundante.
- Esta información, en conjunto con los parámetros de eficacia generados previamente, contribuirá al uso medicinal racional de esta especie para el tratamiento de padecimientos en México.

6. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar la metanólisis y/o generar el éster de Mosher del ácido resultante para llevar a cabo experimentos de dicroísmo circular del producto natural **61** para establecer la configuración absoluta del C-2'.
- ❖ Comprobar los efectos antinociceptivos del 3- α -3-O- β -D-glucopiranosil-16- α -hidroxient-kaurano (**59**) y N-[(2S, 3S, 4R)-3,4-dihidroxi-1-(hidroximetil) octadecil]-2'-hidroxil-(2'R*,4Z)-4-tetracosenamida (**61**).
- ❖ Realizar el estudio fenológico de la especie con la finalidad de establecer la variación del contenido metabólico de la decocción y de los compuestos volátiles.
- ❖ Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar los principios activos de la planta.
- ❖ Integrar una monografía farmacopéica de la especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Vol. 456. Carol Stream, IL. Allured Publishing Corporation.

Adegbite, A.E., Ojo, F.M., Abraham, O.G., Francis, J., Balogun, S. (2019). First record of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) in West Tropical Africa. *Nordic Journal of Botany*, 1-6.

Aguilar-Ávila, D.S., Flores-Soto, M.E., Tapia-Vázquez, C., Pastor-Zarandona, O.A., López-Roa, R.I., Viveros-Paredes, J.M. (2019). β -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Attenuates Neuropathic Pain and Depressive-Like Behavior in Experimental Diabetic Mice. *Journal of Medicinal Food*, 22(5), 460-468.

Albadawi, D.A., Mothana, R.A., Khaled, J.M., Ashour, A.E., Kumar, A., Ahmad, S.F., Al-Said, M.S., Al-Rehaily, A.J., Almusayeb, N.M. (2017). Antimicrobial, anticancer, and antioxidant compounds from *Premna resinosa* growing in Saudi Arabia. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1759-1766.

Anjaneyulu, M., Chopra, K. (2003). Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27, 1001-1005.

Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A.L., Nieto-Camacho, A., Villaseñor, J.L., Romo de Vivar, A. (2016). Terpenoids from *Melampodium perfoliatum*. *Journal of Natural Products*, 79, 2780–2787.

Bahamonde, S.M.A., Flores, M.L., Córdoba, O.L., Taira, C.A., Gorzalczany, S. (2013). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliodactylon diffusum*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(4), 699-705.

Bohlmann, F., Le Van, N. (1977). Terpen-glykoside aus *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 1765-1768.

Bohm, Bruce A., Stuessy, Tod. F. (1991). Flavonoid variation in *Melampodium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19(8), 677-679.

Borges del Castillo, J., Martínez Mártir, A.I., Rodríguez-Luis, F., Rodríguez-Ubis, J.C., Vázquez-Bueno, P. (1984). Isolation and synthesis of two coumarins from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 23(4), 859-861.

Botsaris, A.S. (2007). Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, Art. No. 18.

Castro, V., Jakupovic, J., Domínguez, X.A. (1989). Melampolides from *Melampodium* and *Smallanthus* species. *Phytochemistry*, 28(10), 2727-2729.

CICY. (2019). *Melampodium divaricatum*. [En línea]. México, disponible en: https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=962

Chang, Q., Zuo, Z., Chow, M.S.S., Ho, W.K.K. (2005). Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 549-555.

Chaturvedula, V.S.P., Farooq, A., Schilling, J.K., Malone, S., Derveld, I., Werkhoven, M.C.M., Wisse, J.H., Ratsimbason, M., Kingston, D.G.I. (2004). New Eudesmane Derivatives from *Melampodium camphoratum* from the Suriname Rainforest. *Journal of Natural Products*, 67, 2053-2057.

Cheng, Z., Yang, D., Liu, Y., Hu, J., Jiang, H., Wang, P., Li, N., Zhou, J., Zhao, Y. (2010). Two new ent-kaurane diterpenoids from *Albizia mollis* (Wall.) Boiv. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(9), 1766-1769.

Cockerell, T.D.A. (1905). The name *Melampodium*. *Torreya* 5, 70.

Coelho-De-Souza, A.N., Dos-Santos, C.F., Lopes-Filho, L.N., Holanda, F.R., Oliveira, A.C., Gomes-Vasconcelos, Y.A., Oliveira, K.A., Ferreira-Da-Silva, F.W., Silva-Alves, K.S., Leal-Cardoso, J.H. (2018). Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* Benth attenuates nociception in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(11), art. no. e7356, 9 p.

CONABIO. (2019). *Melampodium divaricatum*. [En línea]. México, disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/melampodium-divaricatum/fichas/ficha.htm>

Cremesti, A.E., Fischl, A.S. (2000). Current methods for the identification and quantitation of ceramides: an overview. *Lipids*, 35(9), 937-95.

Dawé, A., Mbiantcha, M., Fongang, Y., Yousseu Nana, W., Yakai, F., Ateufack, G., Shaiq, M. A., Lubna, I., Lateef, M., Tchaleu Ngadjui, B. (2017). Piptadenin, a novel 3,4-secooleanane triterpene and piptadenamide, a new ceramide from the stem bark of *Piptadeniastrum africanum* (Hook.f.) Brenan. *Chemistry and Biodiversity*, 14, e1600215.

Duarte Moreira, R.R., Zimmermann Martins, G., Teixeira Botelho, V., dos Santos, L.E., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Andrade, G., Gomes Martins, C.H. (2014). Composition and activity against oral pathogens of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. *Chemistry & Biodiversity*, 11, 438-444.

Eltamany, E.E., Ibrahim, A.K., Radwan, M.M., ElSohly, M. A., Hassanean H.A., Ahmed, S.A. (2015). Cytotoxic ceramides from the Red Sea sponge *Spheciospongia vagabunda*. *Medicinal Chemistry Research*, 24, 3467-3473.

Erdemoglu, N., Küpeli Akkol, E., Yesilada, E., Caliş, I. (2008). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 172-178.

Ferreira, F.P., Rodrigues de Oliveira, D.C. (2010). New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. *Tetrahedron Letters*, 51, 6856-6859.

Galeotti, N., Vivoli, E., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C., Bartolini, A., Ghelardini, C. (2010). A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's Wort in mice. *Journal of Pain*, 11(2), 149-159.

Gbif. (2019). *Melampodium* L. [En línea]. México, disponible en: <https://www.gbif.org/species/3138947>

Girón, L. M., Freire, V., Alonzo, A., Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 173-187.

Gobu, F., Che, J., Zeng, J., Wei, W., Wang, W., Lin, C., Gao, K. (2017). Isolation, structure elucidation, and immunosuppressive activity of diterpenoids from *Ligularia fischeri*. *Journal of Natural Products* 80, 2263-2268.

Gray, A. (1884). Synoptical Flora of North America. Vol. 1(2), p. 238-239. Invision, Blakeman, Taylor and Co., New York.

Hammer, K.D.P., Hillwig, M.L., Solco, A.K.S., Dixon, P.M., Delte, K., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Birt, D.F. (2007). Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in AW264.7 mouse macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7323-7331.

Han, J., Bang, M., Chun, O., Kim, D., Lee, C., Baek, N. (2004). Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. *Archives of Pharmacal Research*, 27(4), 390-395.

Hannun, Y.A., Bell, R.M. (1989). Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, 27, 500-507.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141-1148.

Hoult, J.R., Moroney, M.A., Payá, M. (1994). Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods in Enzymology*, 234, 443-454.

Hubert, T. D., Wiemer, D. F. (1985). Ant-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 1197-1198.

Hüther, J., Passreiter, C. M., Wray, V., & Willuhn, G. (1999). Acylated 2-Hydroxythymol-3-O-diglycosides from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, 979-986.

Jagtap, D.G., M. Y. Bachulkar-Chokelar, S.M. Patil and S.B. Bhamburdekar. (2017) *Melampodium divaricatum* (Asteraceae-Melampodiinae): A new record for India. *Bioscience Discovery*, 8, 50-54.

Koltzenburg, M., Scadding, J. (2001). Neuropathic pain. *Current Opinion in Neurology*, 14, 641-647.

Kim, H.P., Mani, I., Iversen, L., Ziboh, V.A. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 58, 17-24.

Küpeli Akkol, E., Bahadır Acikara, Ö., Süntar, I., Ergene, B., Saltan Çitoğlu, G. (2012). Ethnopharmacological evaluation of some *Scorzonera* species: In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 261-270.

Lee, A. T. H., Ariffin, M.Z., Zhou, M., Zhou Ye, J., Moochhala, S.M., Khanna, S. (2011). Forebrain medial septum region facilitates nociception in a rat formalin model of inflammatory pain. *Pain*, 152(11), 2528-2542.

Lee, S., Park, H.S., Notsu, Y., Ban, H.S., Kim, Y.P., Ishihara, K., Hirasawa, N., Jung, S.H., Lee, Y.S., Lim, S.S., Park, E.H., Shin, K.H., Seyama, T., Hong, J., Ohuchi, K. (2008). Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lypopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. *Phytotherapy Research*, 22, 1552-1556.

Liang, Y., An, L., Shi, Z., Zhang, X., Xie, C., Tuerhong, M., Song, Z., Ohizumi, Y., Lee, D., Shuai, L., Xu, J., Guo, Y. (2019) Bioactive diterpenoids from the stems of *Euphorbia antiquorum*. *Journal of Natural Products*, 82, 1634-1644.

Liu, T., Liang, Q., Xiong, N., Dai, L., Wang, J., Ji, X., Xu, W. (2017). A new *ent*-kaurane diterpene from *Euphorbia stracheyi* Boiss. *Natural Product Research*, 31(2), 233-238.

Ma, X., Wang, Z., Zhang, L., Li, W., Deng, C., Zhong, T., Li, G., Zheng, W., Zhang, Y. (2017). Diterpenoids from *Wedelia prostrata* and their derivatives and cytotoxic activities. *Chemistry & Biodiversity*, 14, e1600423.

Martínez Alfaro, M. (1984). Medicinal plants used in a Totonac community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 203-221.

Martínez, A.L., González-Trujano M.E., Aguirre-Hernández, E., Moreno, J., Soto-Hernández, M., López-Muñoz, F.J. (2009). Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*, 56, 564-571.

Martínez, A.L., Madariaga-Mazón, A., Rivero-Cruz, I., Bye, R., Mata, R. (2017). Antidiabetic and antihyperalgesic effects of decoction and compounds from *Acourtia thurberi*. *Planta Medica*, 83(6), 534-544.

Martínez, Maximino. (1989). *Las plantas medicinales de México*. México. Ediciones Botas.

McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(33), 13525-13530.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea]. México, disponible en: <http://www-medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografía.php?l=3&t=&id=7076>

Middleton, E.J., Kandaswami, C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43(6), 1167-1179.

Miño, J., Acevedo, C., Moscatelli, V., Ferraro, G., Hnatyszyn, O. (2002). Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 179-182.

Monroy-Ortiz, C., Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Cuernavaca, Morelos, México. UAEM.

Morton, J. (1981). *Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatan*. Springfield, IL: C. Thomas.

Naturalista (2019). *Achual amarillo*. [En línea]. México, disponible en: <https://www.naturalista.mx/observations/29622514>

NIST (2018-2019). *Libro del Web de Química del NIST*. [En línea]. México, disponible en: <https://webbook.nist.gov/>

Nogueira, M. (2006). Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicology in Vitro*, 361-366.

OMS. (2002-2017). *Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*. [En línea]. México, disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4930s>

Ovalle-Magallanes, B., Rivero-Cruz, I., Mata, R. (2014). Quality control tests for the crude drug of *Conyza filaginoides*. *Pharmaceutical biology*, 52(1), 117-123.

Padilla Mayne, Sofía. (2017). *Estudio químico y farmacológico de la decocción de Melampodium divaricatum (Asteraceae)* (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practice*. John Wiley & Sons.

Pei, D., Liu, J., Di, D. (2010). Cerebroside and ceramide from the pollen of *Brassica napus* L. *Fitoterapia*, 81, 838-843.

Pelissari, G.P., Rodrigues Pietro, R.C.L., Duarte Moreira, R.R. (2010). Antibacterial activity of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae [Actividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae] *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(1), 70-74.

Peltier, A., Goutman, S.A., Callaghan, Brian C. (2014). Painful diabetic neuropathy. *British Medical Journal*, 348, g1799.

Quijano, L., Fischer, N.H. (1984). Two oxepane-type diterpene lactones from *Melampodium diffusum*. *Phytochemistry*, 23(4), 833-836.

Rabelo, A.S., Serafini, M.R., Rabelo, T.K., de Melo, M.G.D., da Silva Prado, D., Gelain, D.P., Moreira, J.C.F., dos Santos Bezerra, M., da Silva, T.B., Costa, E.V., de Lima Nogueira, P.C., de Souza Moraes, V.R., do Nascimento Prata, A.P., Quintans, L.J., Jr., Araújo, A.A.S. (2014). Chemical composition, antinociceptive, anti-inflammatory and redox properties in vitro of the essential oil from *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), art. no. 514

Rylski, M., Duríasz-Rowinka, H., Rewerski, W. (1979). The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. *Acta Physiologica Polonica*, 30, 385-388.

Rzedowski, G.C. de, Rzedowski, J. (2011). Compositae Tribu Heliantheae II (géneros Lagascea - Zinnia). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 172. Págs. 29-32.

Saldanha, A.A., Vieira, L., Ribeiro, R.I.M.D.A., Thomé, R.G., Santos, H.B.D., Silva, D.B., Carollo, C.A., Oliveira, F.M.D., Lopes, D.D.O., Siqueira, J.M.D., Soares, A.C. (2019). Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis

factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioidergic systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 231, 325-336.

Schulte Haas, J., Dischkaln Stolz, E., Heemann Betti, A., Stein, A.C., Schripsema, J., Lino von Poser, G., Kuze Rates, S.M. (2011). The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. *Planta Medica*, 77, 334-339.

Schüngel, J., Passreiter, C.M. (2000). 2-Pyrrolidineacetic Acid and Pyrrolizidine Alkaloids from *Melampodium divaricatum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 705-706.

Schüngel, J., Passreiter, C. M. (2002). New Diacylated 2-Hydroxythymol Derivatives from *Melampodium divaricatum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 966-968.

Seaman, Frederick C. (1982). Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the *Asteraceae*. *Botanical Review*, 48(2), 121-595.

Silva, D.M., Costa, E.V., Nogueira, P.C., Moraes, V.R., Cavalcanti, S.C., Salvador, M.J., Ribeiro, L.E.G., Gadelha, F.R., Barison, A., Ferreira, A.G. (2012). Ent-kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). *Química Nova*, 35(8), 1570-1576.

Sosa, S., Pace, R., Bornancin, A., Morazzoni, P., Riva, A., Tubaro, A., Della Loggia R. (2007). Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59, 703-709.

Sundara Rajan, R., de Gray, L., George, E. (2013). Painful diabetic neuropathy. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 14(5), 230–235.

Suo, M., Yang, J. (2014). Ceramides isolated from *Helianthus annuus* L. *Helvetica Chimica Acta*, 97, 355-360.

Thu, N.T.H., Ha, L.T., Nga, V.T., Tuyen, P.N.K., Quang, T.T., Danielle, F., Lawrence M., P., Phung, N.K.P. (2013). Six new phenolic glycosides and a new ceramide from the flowers of *Wedelia biflora* and their cytotoxicity against some cancer cell lines. *Natural Product Communications*, 8(3), 367-372.

Topcu, G., Ertas, A., Öztürk, M., Dincel, D., Kilic, T., Halfon, B. (2011). Ent-kaurane diterpenoids isolated from *Sideretis congesta*. *Phytochemistry Letters*, 4, 436-439.

Tori, M., Arbiyanti, H., Taira, Z., Asakawa, Y. (1993). Terpenoids of the liverwort *Frullanoides densifolia* and *Trocholejeunea sandvicensis*. *Phytochemistry*, 32(2), 335-348.

Weidenhamer, J.D., Jordan, E.D., Fischer, N.H. (1990). Evaluation of high-performance liquid and capillary gas chromatography for analysis of sesquiterpene lactones of the Melampodiinae. *Journal of Chromatography*, 504, 151-161.

Woolf, C.J. (2004). Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441-451.

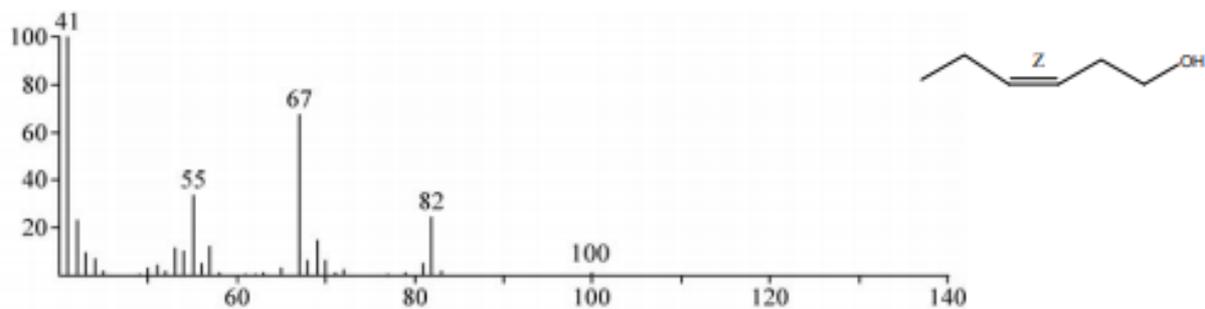
Van Den Dool, H. Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.

Yemele Bouberte, M., Krohn, K., Hussain, H., Dongo, E., Schulz, B., Hu, Q. (2006). Tithoniamarin and tithoniamide: a structurally unique isocoumarin dimer and a new ceramide from *Tithonia diversifolia*. *Natural Product Research*, 20(9), 842-849.

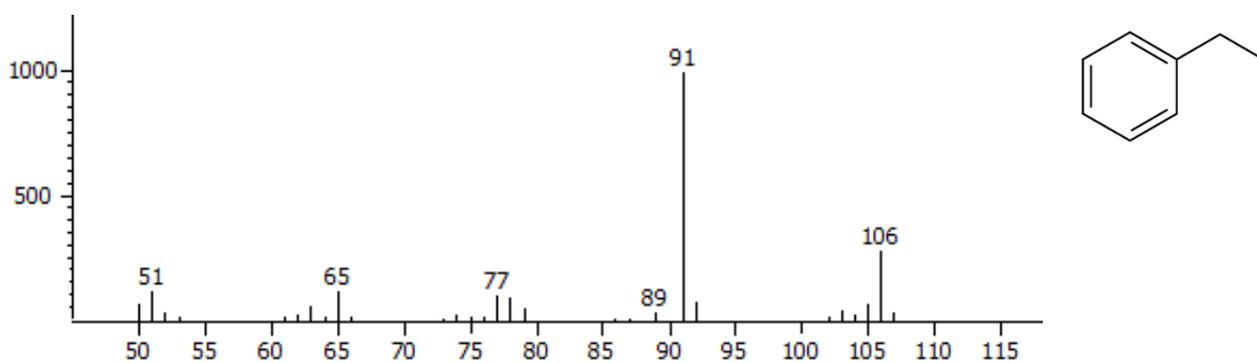
Zabaras, D., Wyllie, S.G. (2001). Quantitative analysis of terpenoids in the gas phase using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 411-416.

Zhang, C., He, X., Guan, S., Zhong, Y., Lin, C., Xiong, T., Zhu, C. (2012). New spingolipid psychotramide A-D from the stem of *Psychotria* sp. *Natural Product Research*, 26(20), 1864-1868.

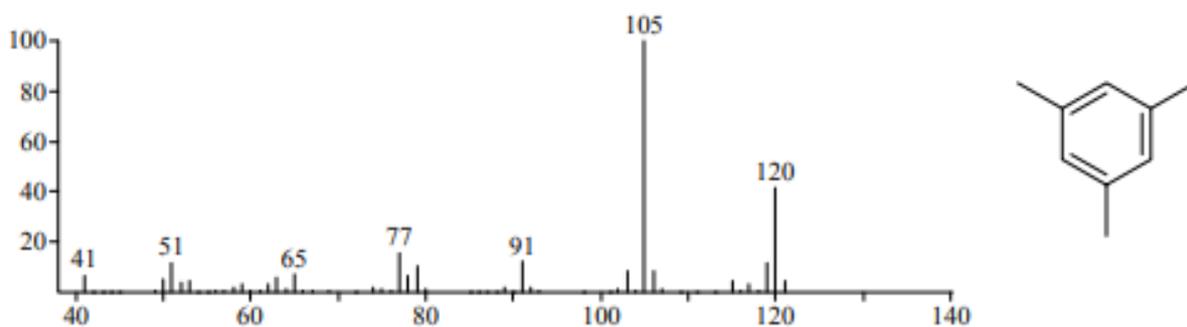
8. APÉNDICE I



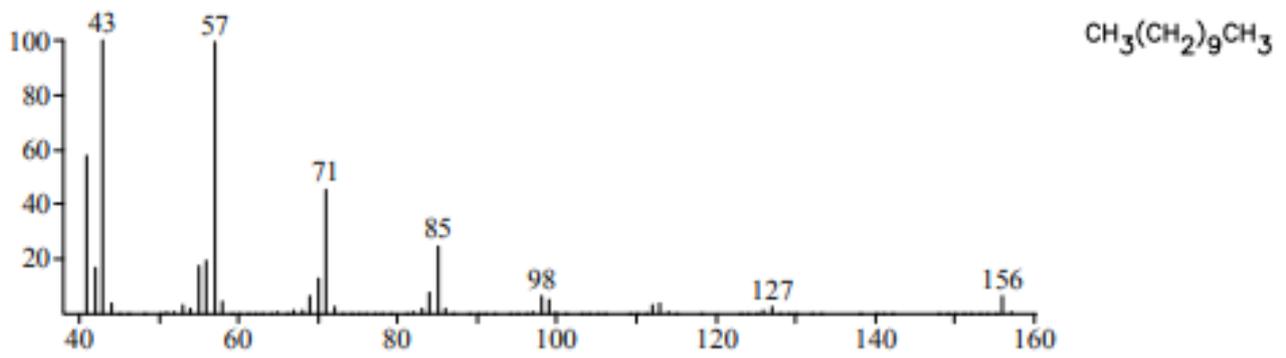
Espectro 1. Espectro de masas (IE) del 3-Hexenol



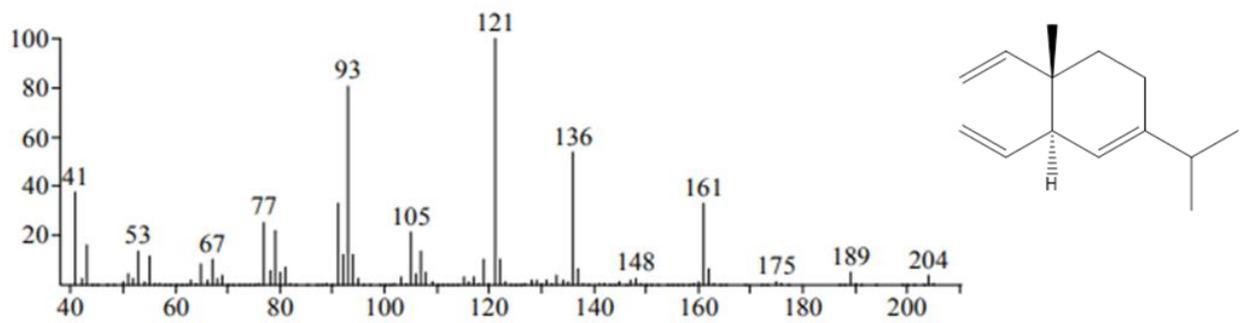
Espectro 2. Espectro de masas (IE) del Etilbenceno



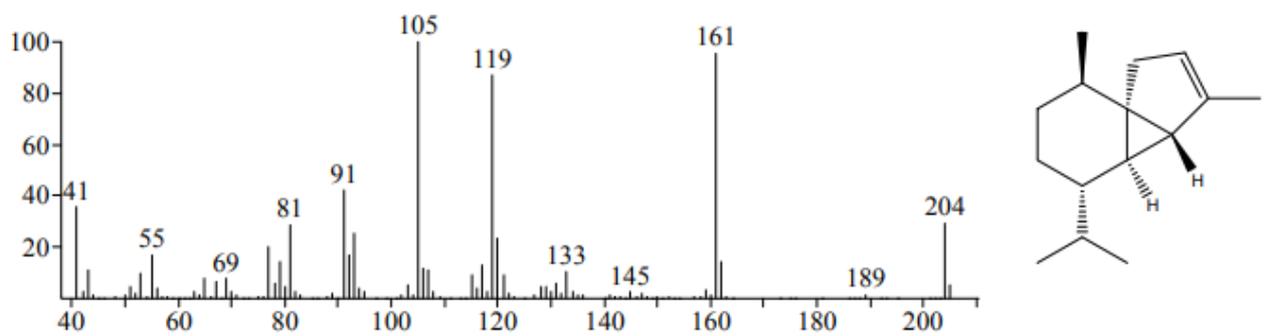
Espectro 5. Espectro de masas (IE) del Mesitileno



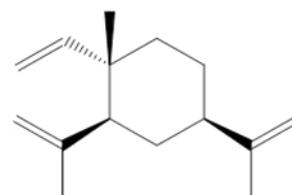
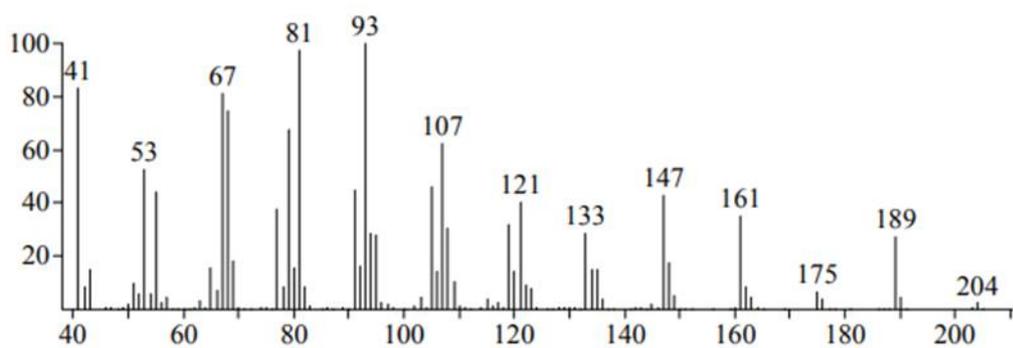
Espectro 6. Espectro de masas (IE) del Undecano



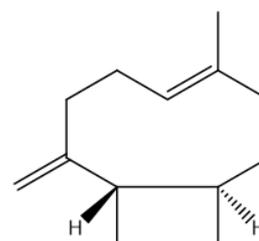
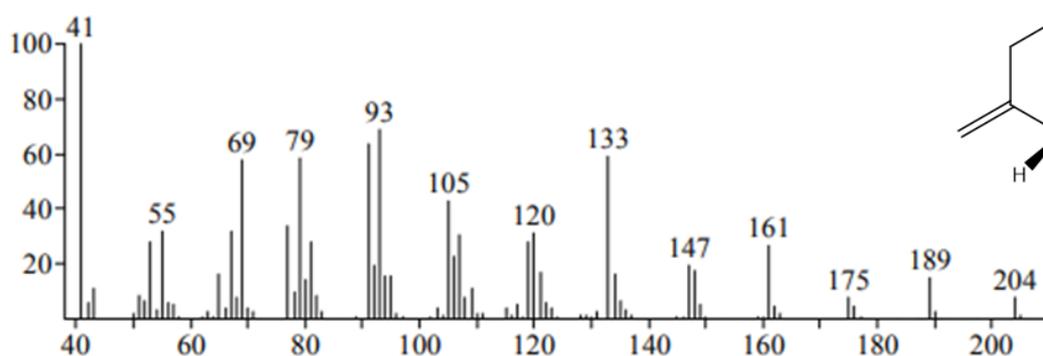
Espectro 7. Espectro de masas (IE) del δ -Elemeno



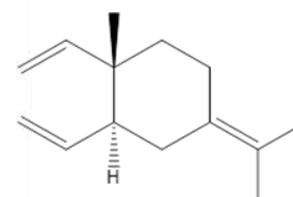
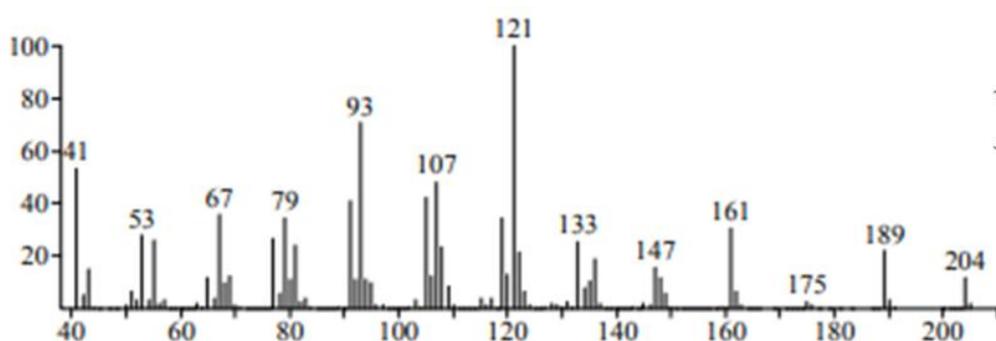
Espectro 8. Espectro de masas (IE) del α -Cubebeno



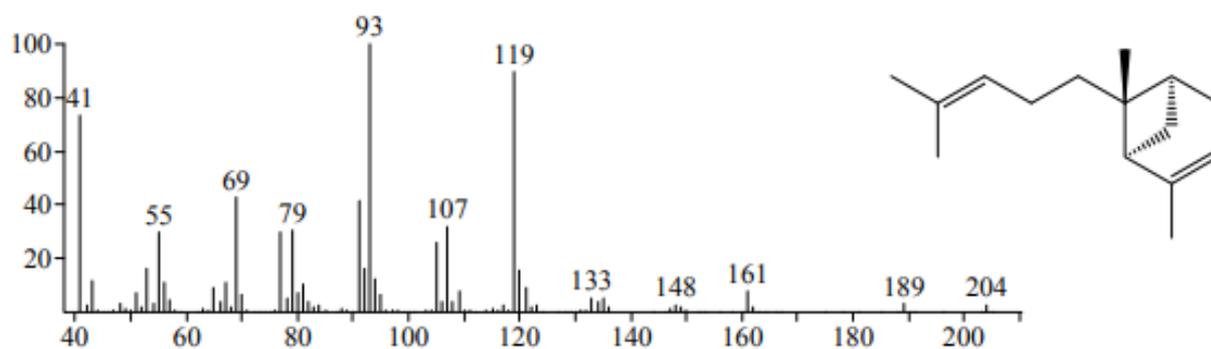
Espectro 9. Espectro de masas (IE) del β -Elemeno



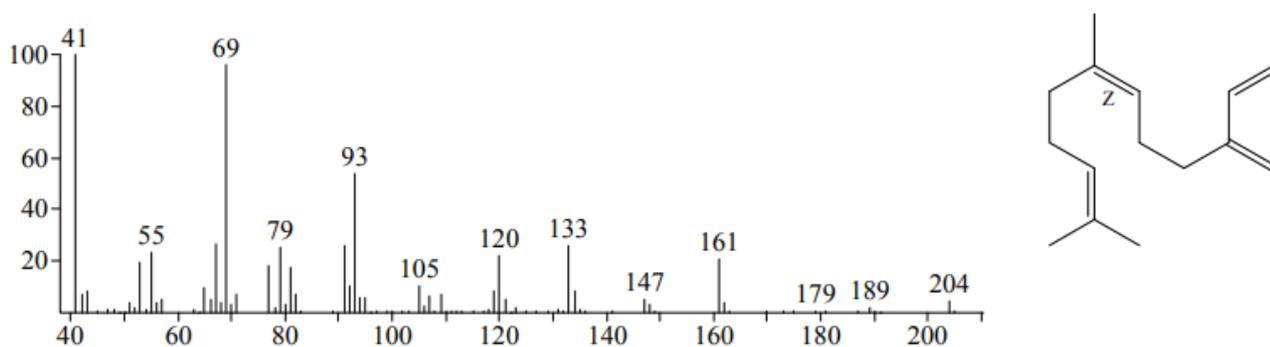
Espectro 10. Espectro de masas (IE) del β -Cariofileno



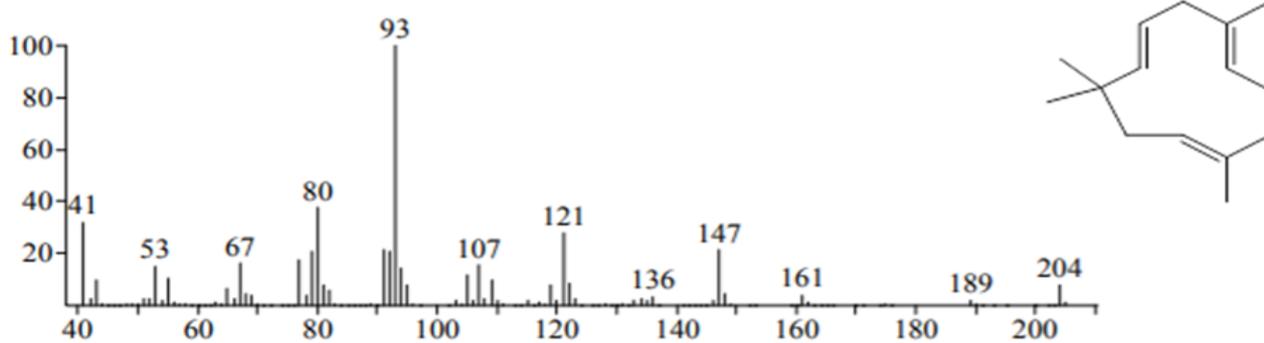
Espectro 11. Espectro de masas (IE) del γ -Elemeno



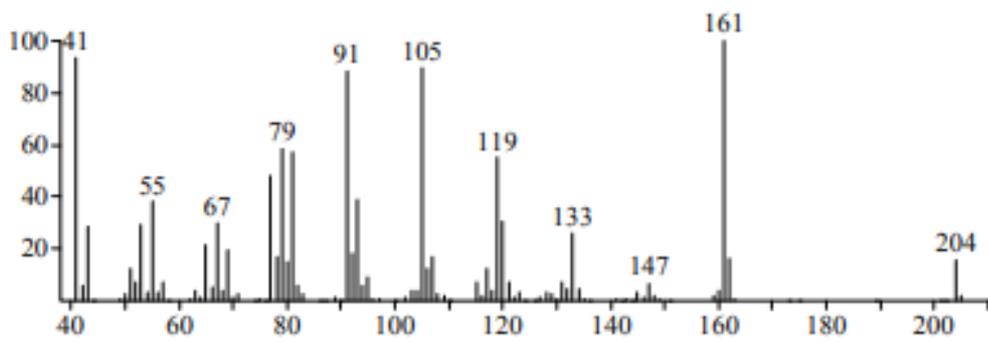
Espectro 12. Espectro de masas (IE) del *trans-α*-Bergamoteno



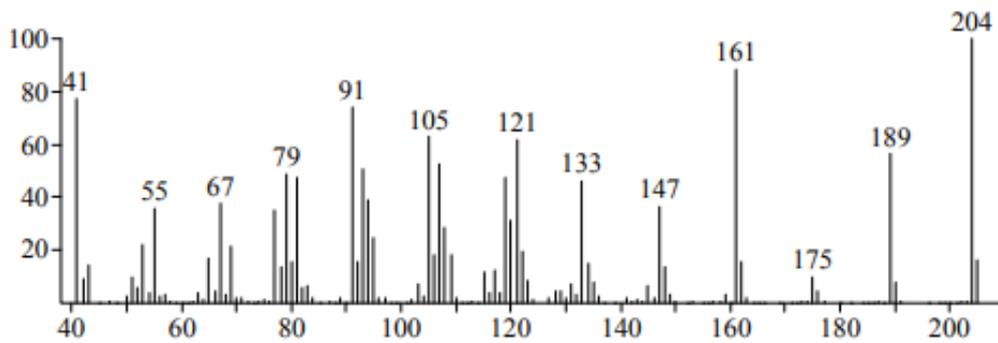
Espectro 13. Espectro de masas (IE) del *cis-β*-Farneseno



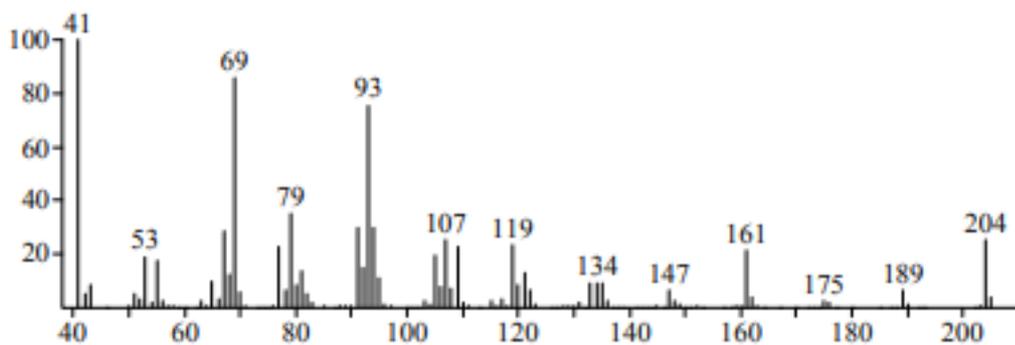
Espectro 14. Espectro de masas (IE) del *α*-Humuleno



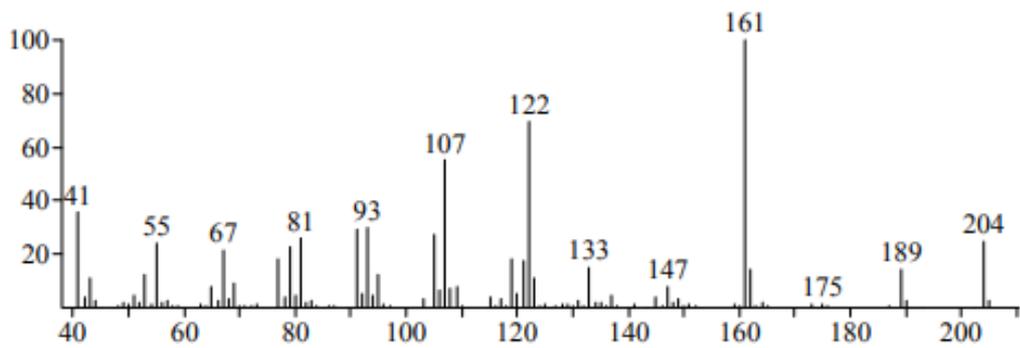
Espectro 15. Espectro de masas (IE) del Germacreno-D



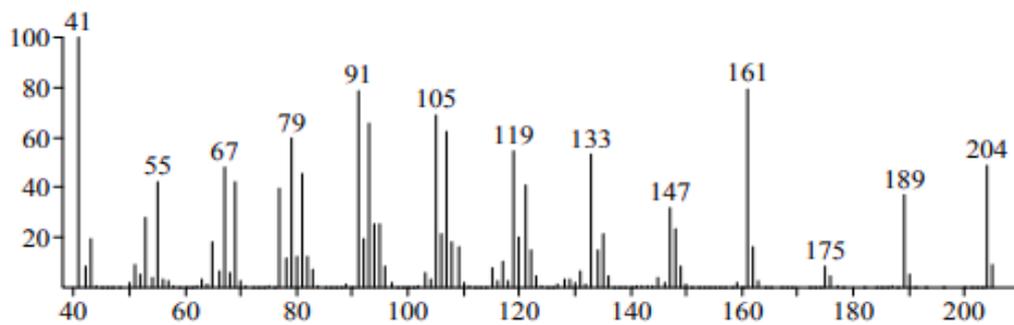
Espectro 16. Espectro de masas (IE) del γ -Patchuleno



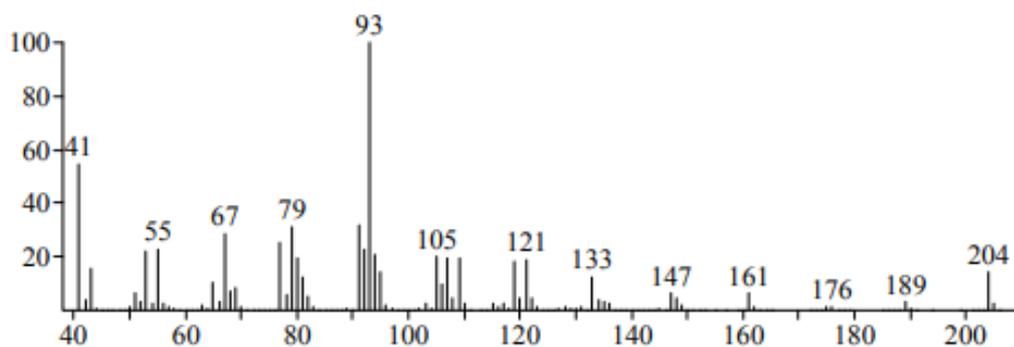
Espectro 17. Espectro de masas (IE) del β -Bisaboleno



Espectro 18. Espectro de masas (IE) del 7-*epi*-α-Selineno



Espectro 19. Espectro de masas (IE) del Aromadendreno



Espectro 20. Espectro de masas (IE) del *cis*-α-Bisaboleno

9. APÉNDICE II

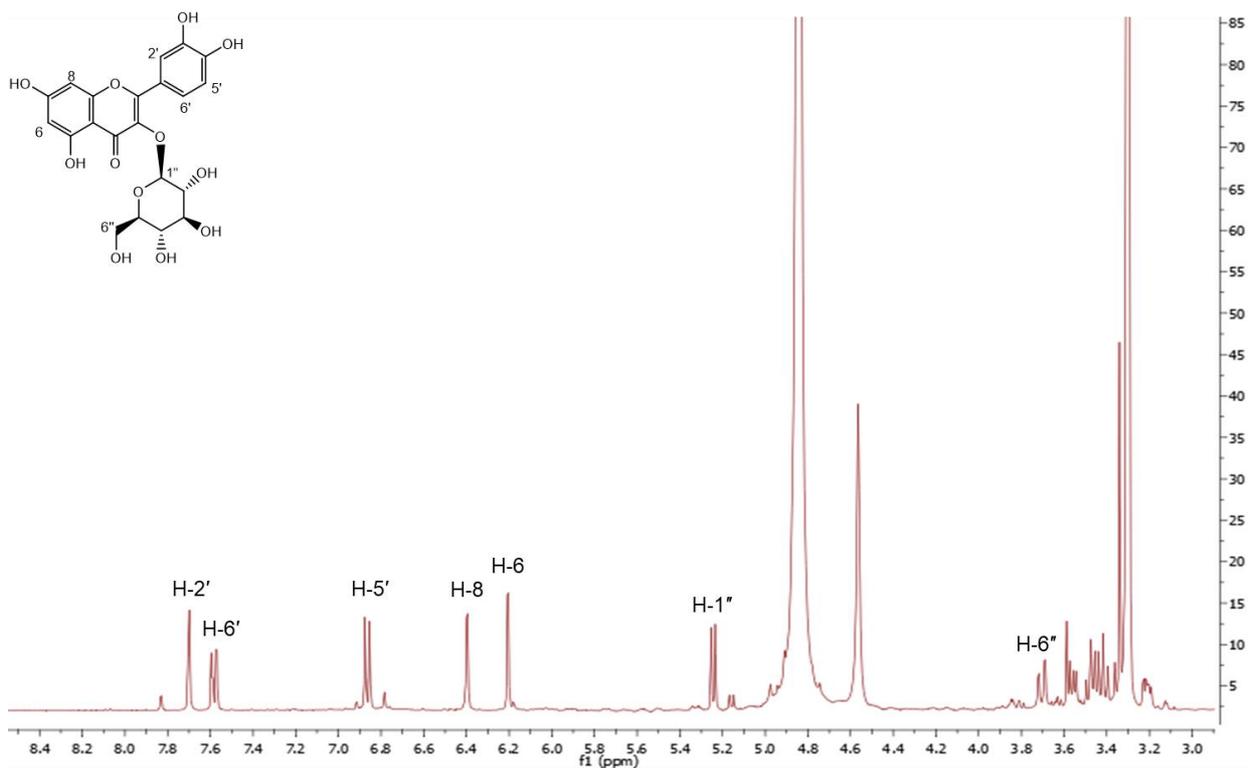


Figura E1. Espectro RMN-¹H de la isoquercitrina en CD₃OD

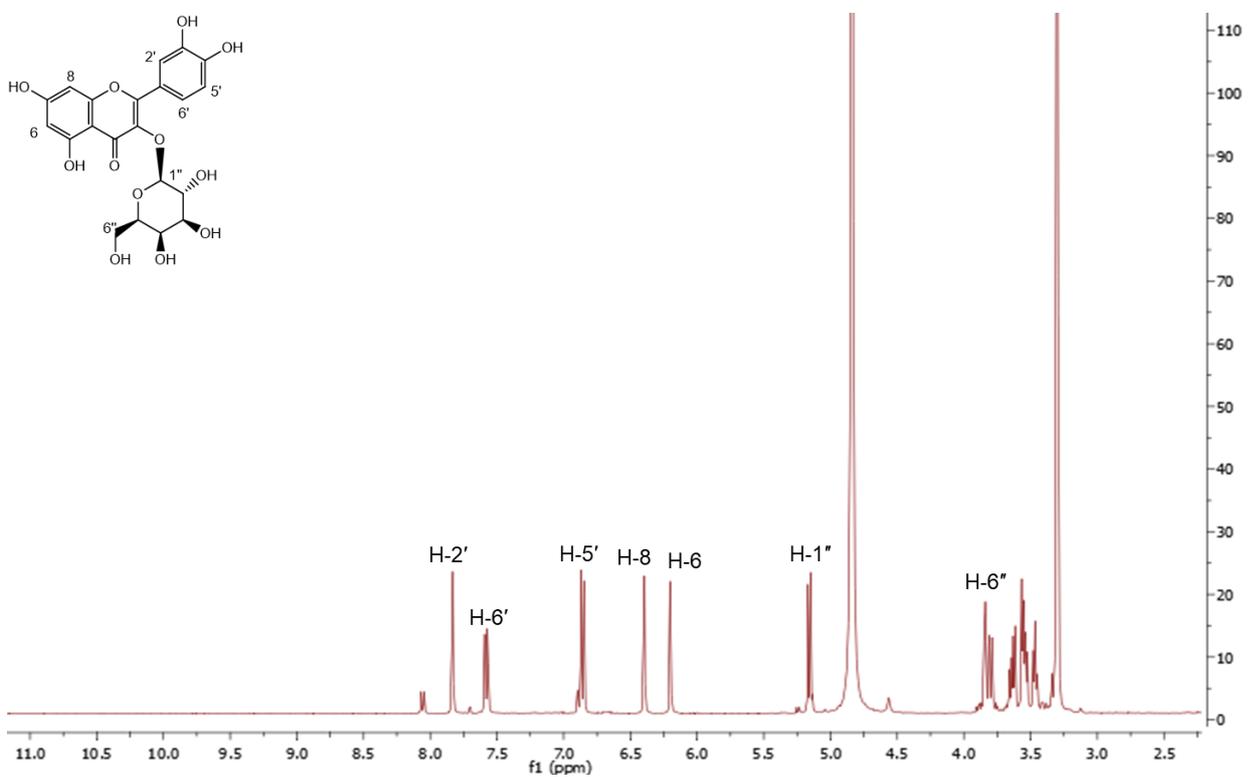


Figura E2. Espectro RMN-¹H del hiperósido en CD₃OD

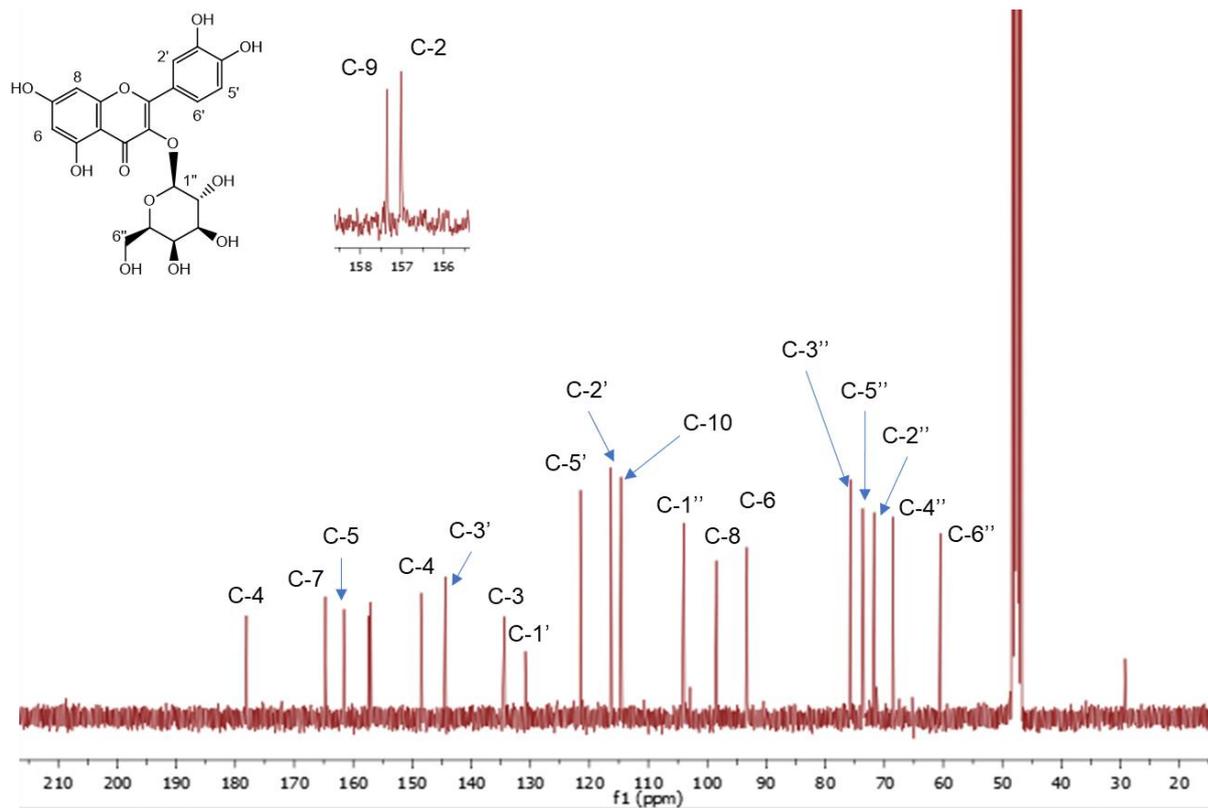


Figura E3. Espectro RMN-¹³C del hiperósido en CD₃OD

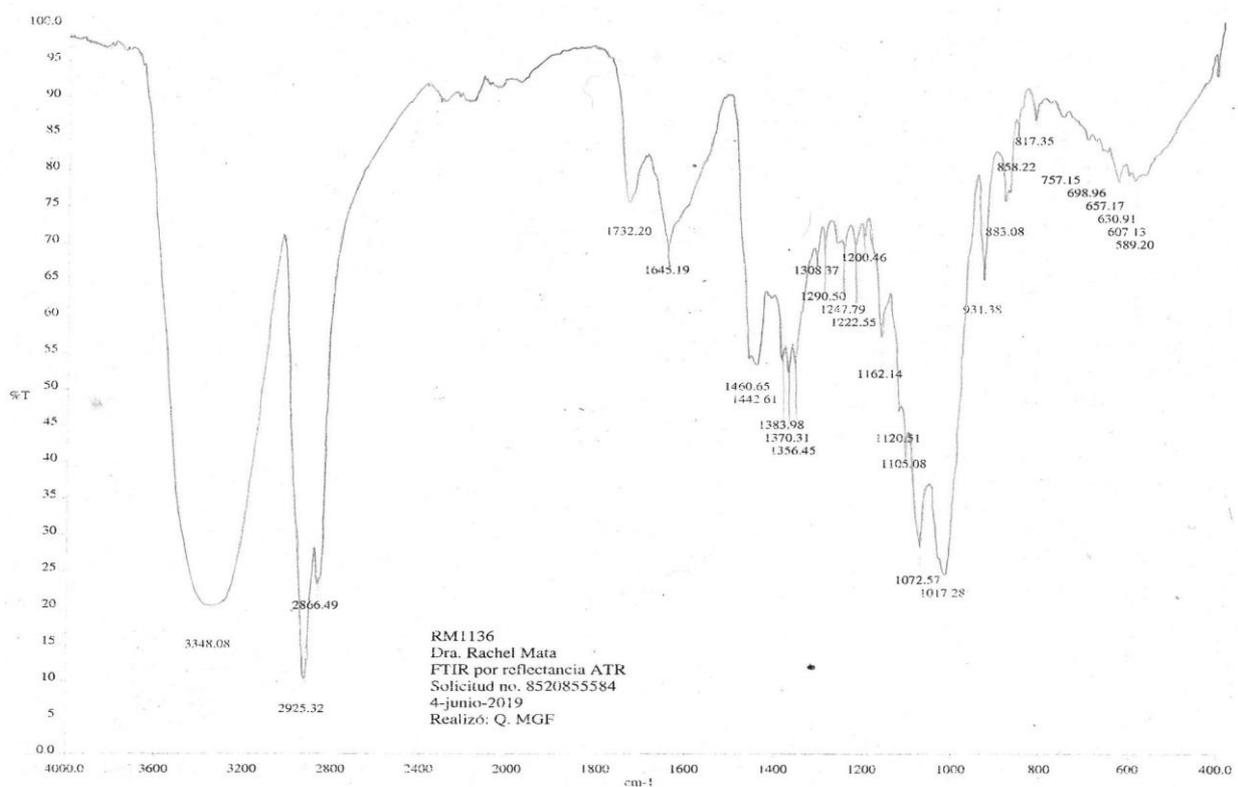


Figura E4. Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto 59

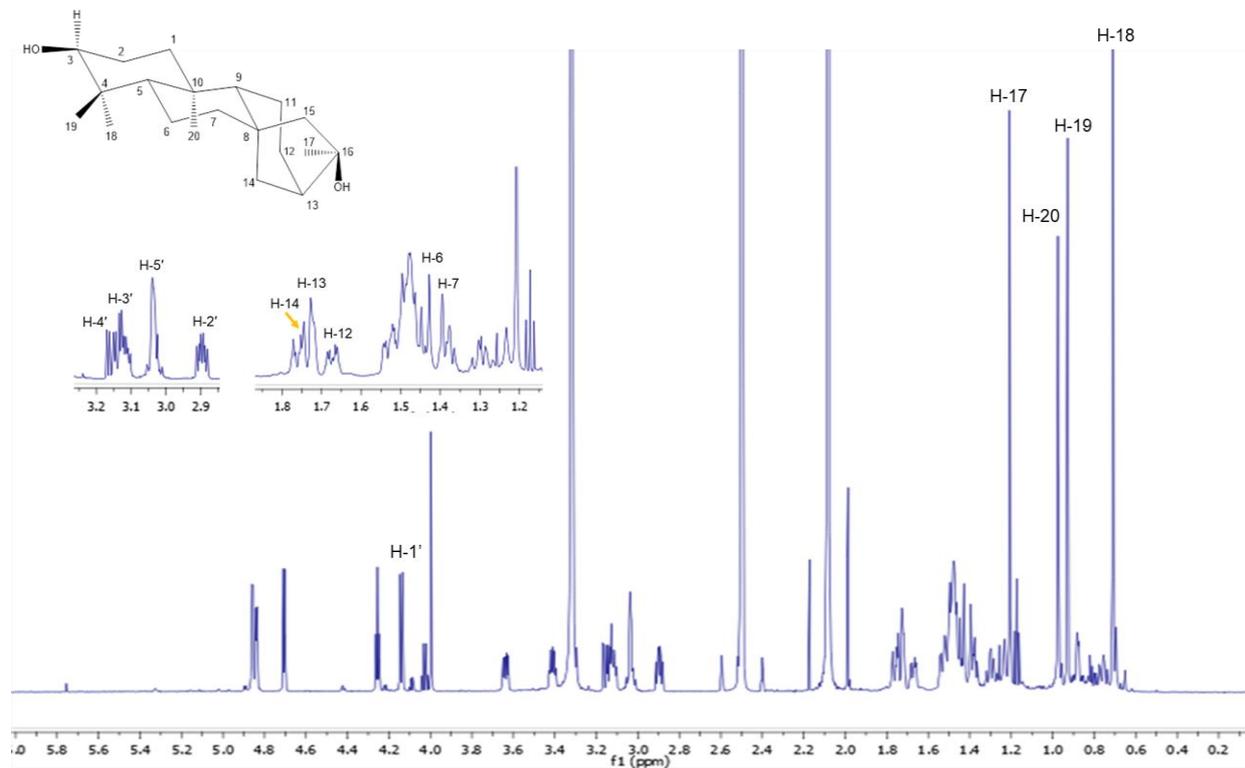


Figura E5. Espectro RMN- ^1H del compuesto **59** en $\text{DMSO-}d_6$

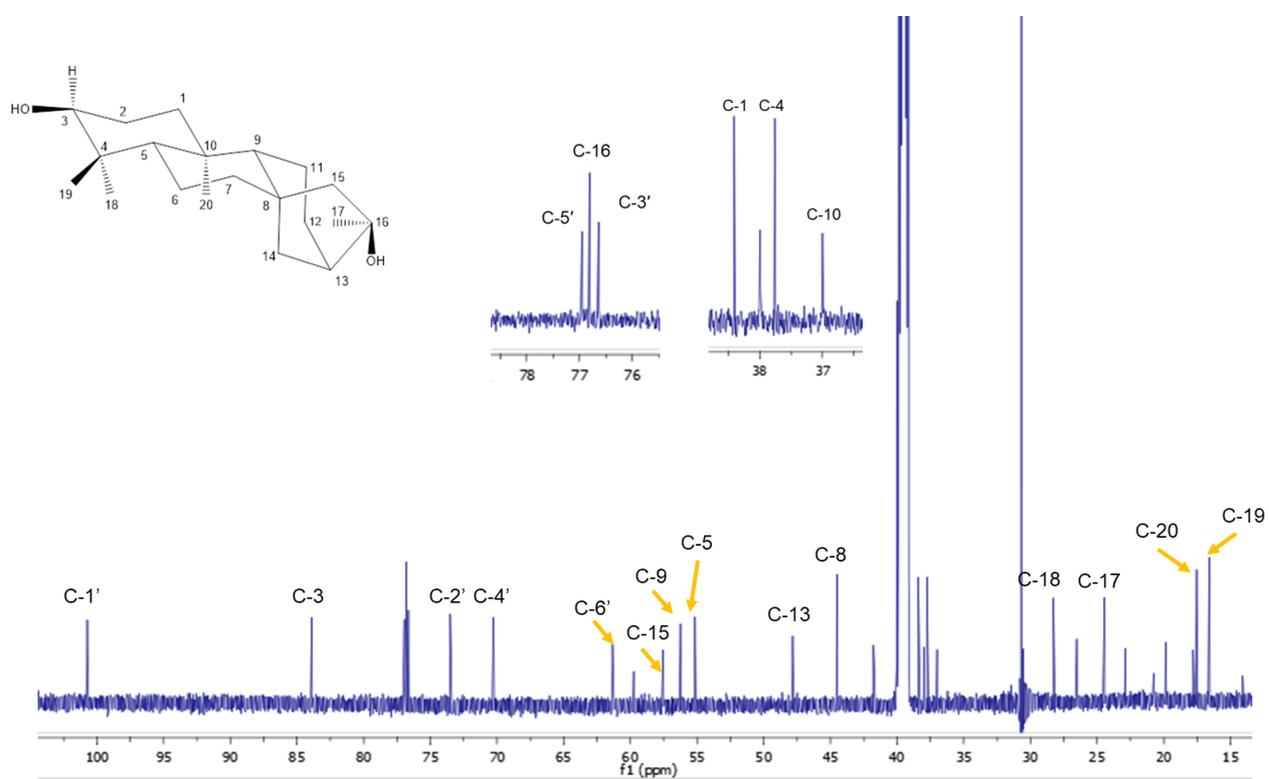


Figura E6. Espectro RMN- ^{13}C del compuesto **59** en $\text{DMSO-}d_6$

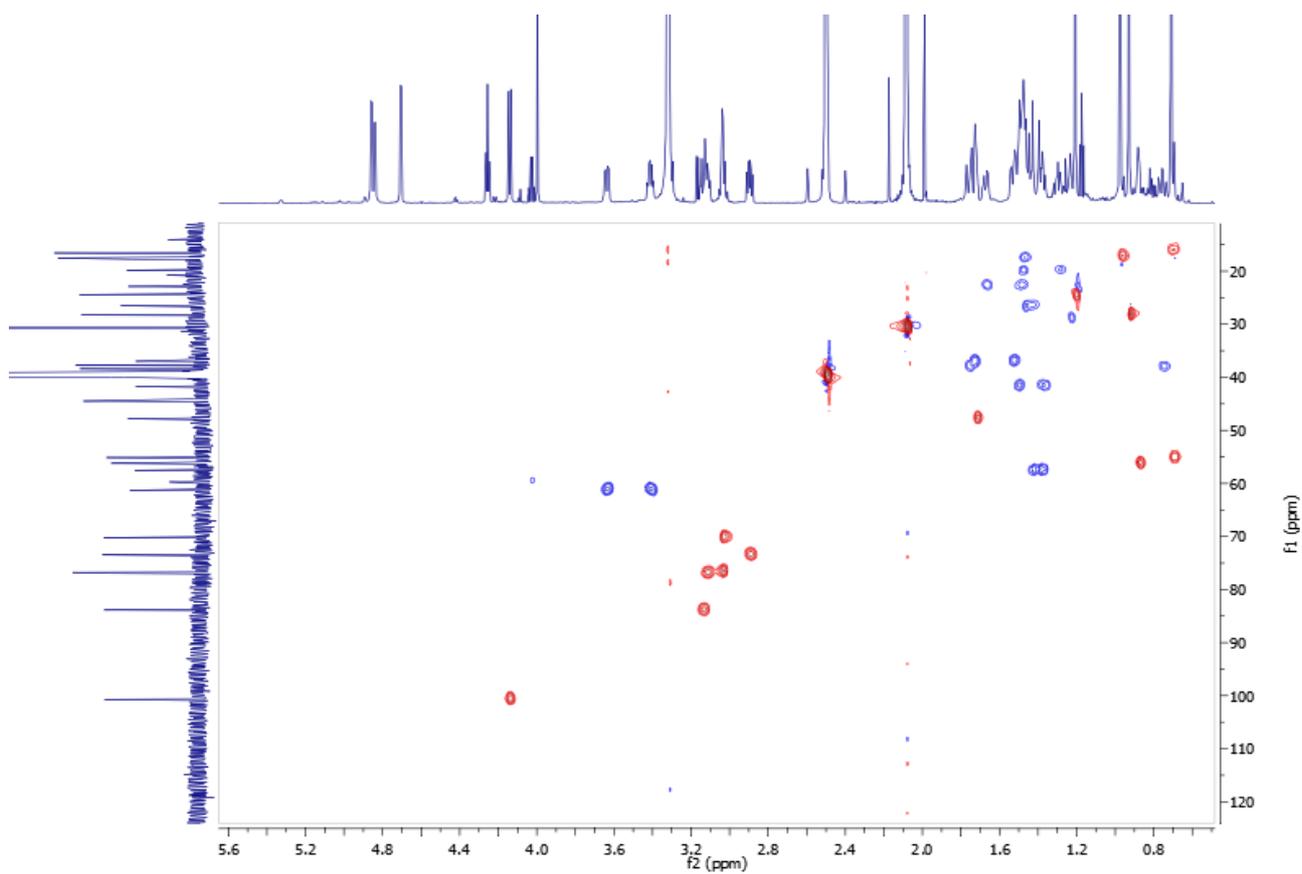


Figura E7. Experimento HSQC del compuesto 59

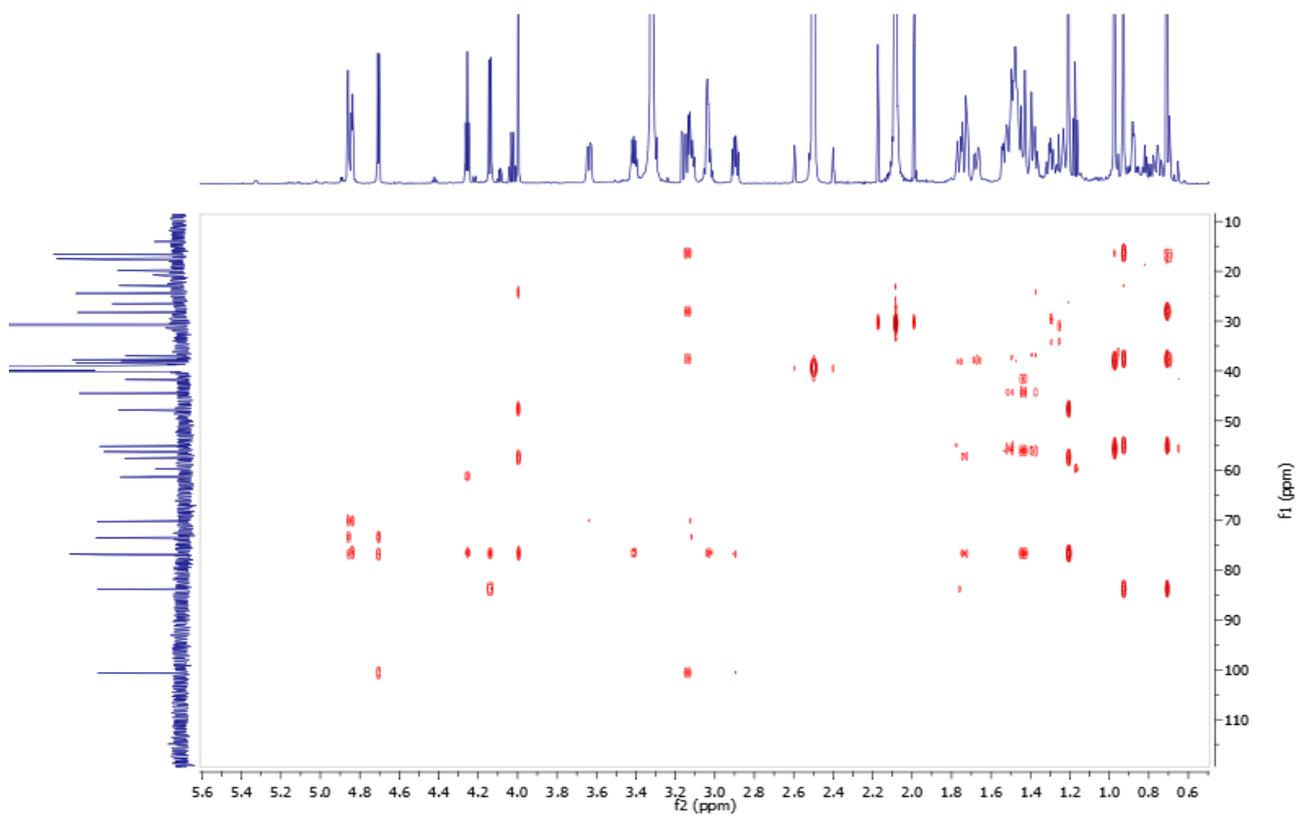


Figura E8. Experimento HMBC del compuesto 59

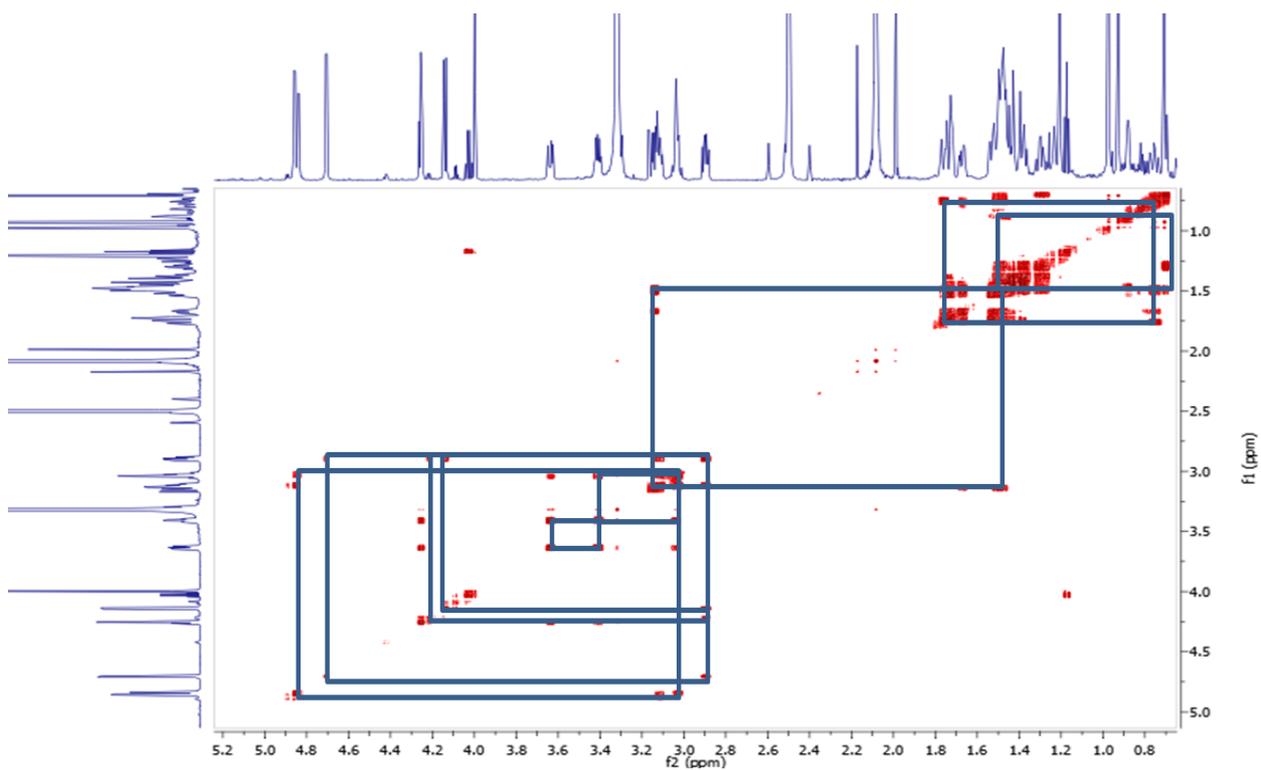


Figura E9. Experimento COSY del compuesto 59

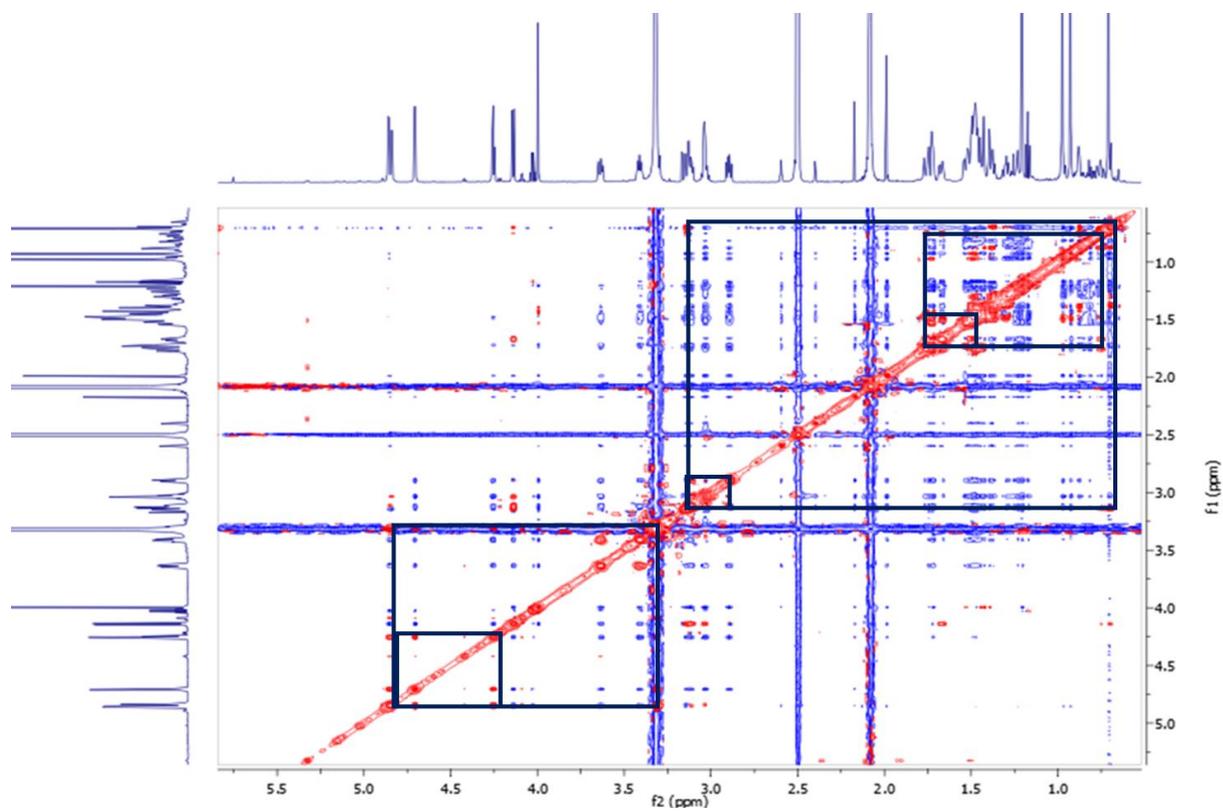


Figura E10. Experimento NOESY del compuesto 59

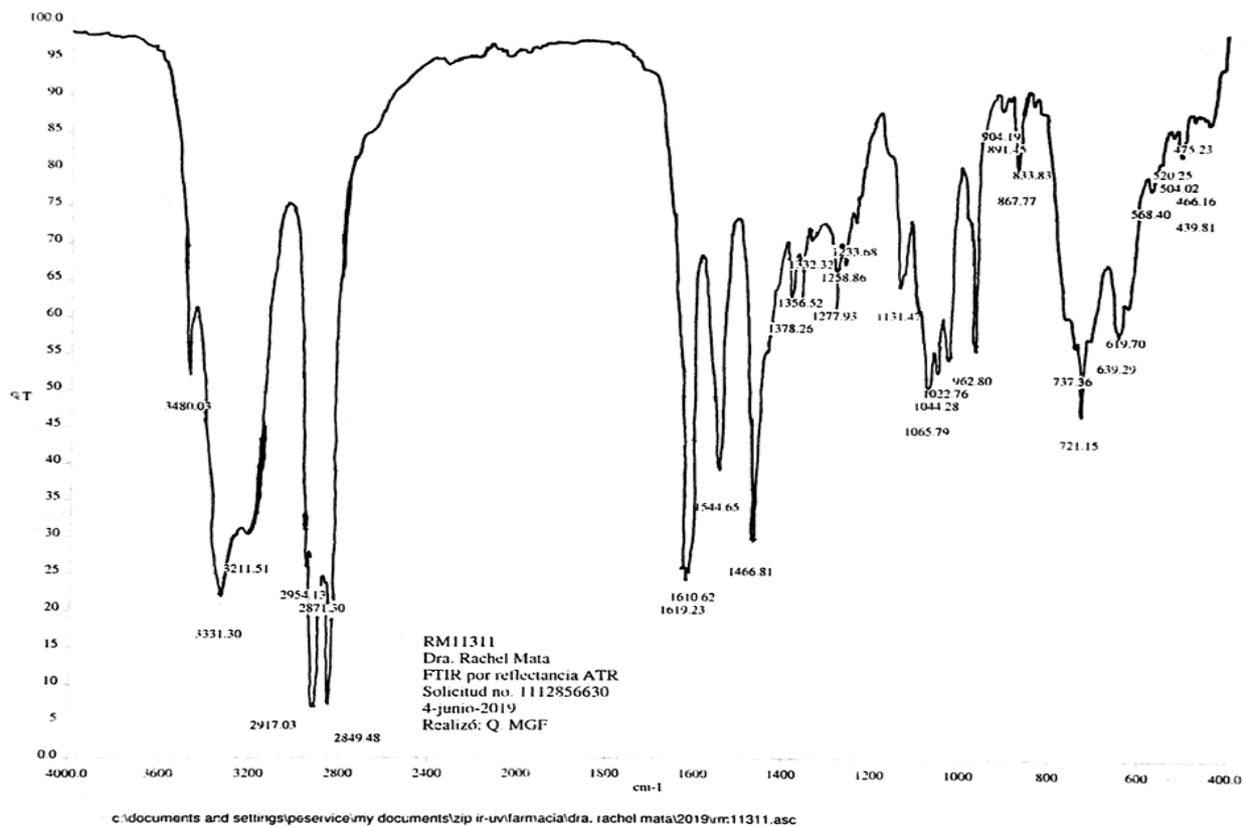


Figura E11. Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto 61

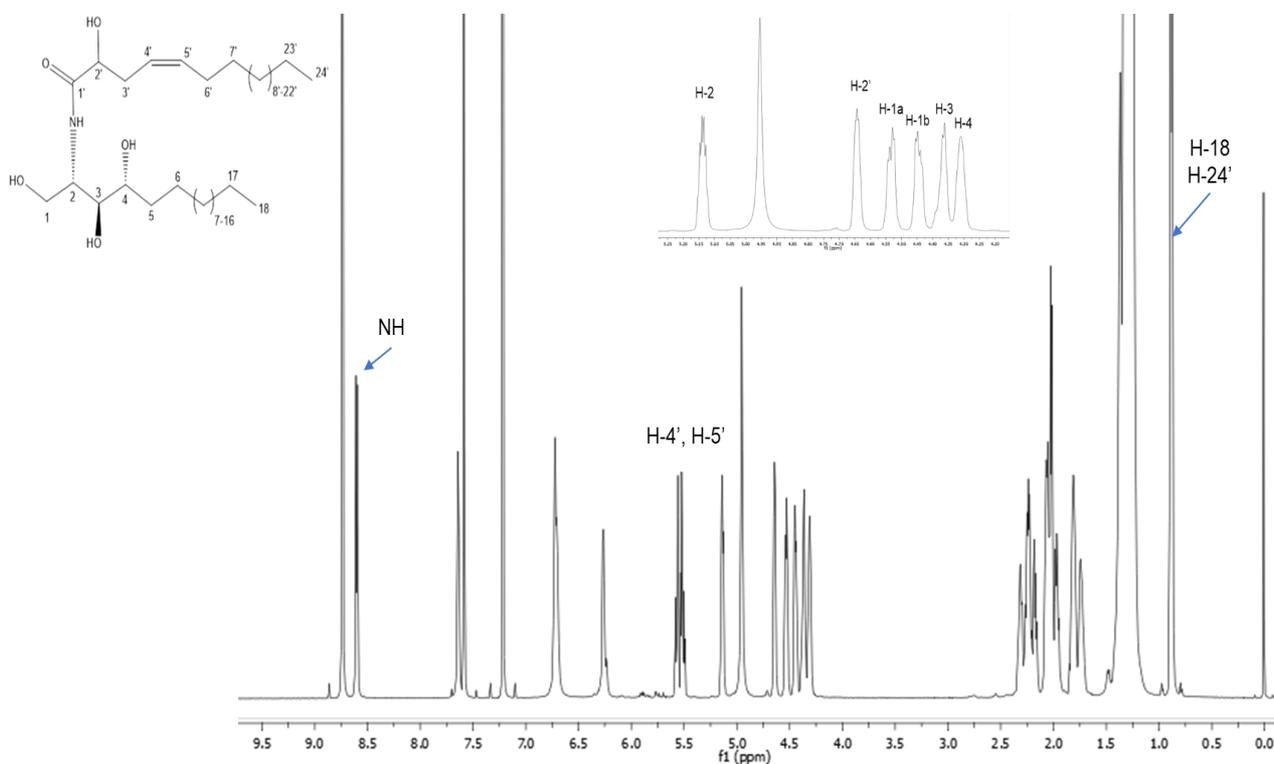


Figura E12. Espectro RMN-¹H del compuesto 61 en piridina-*d*₅

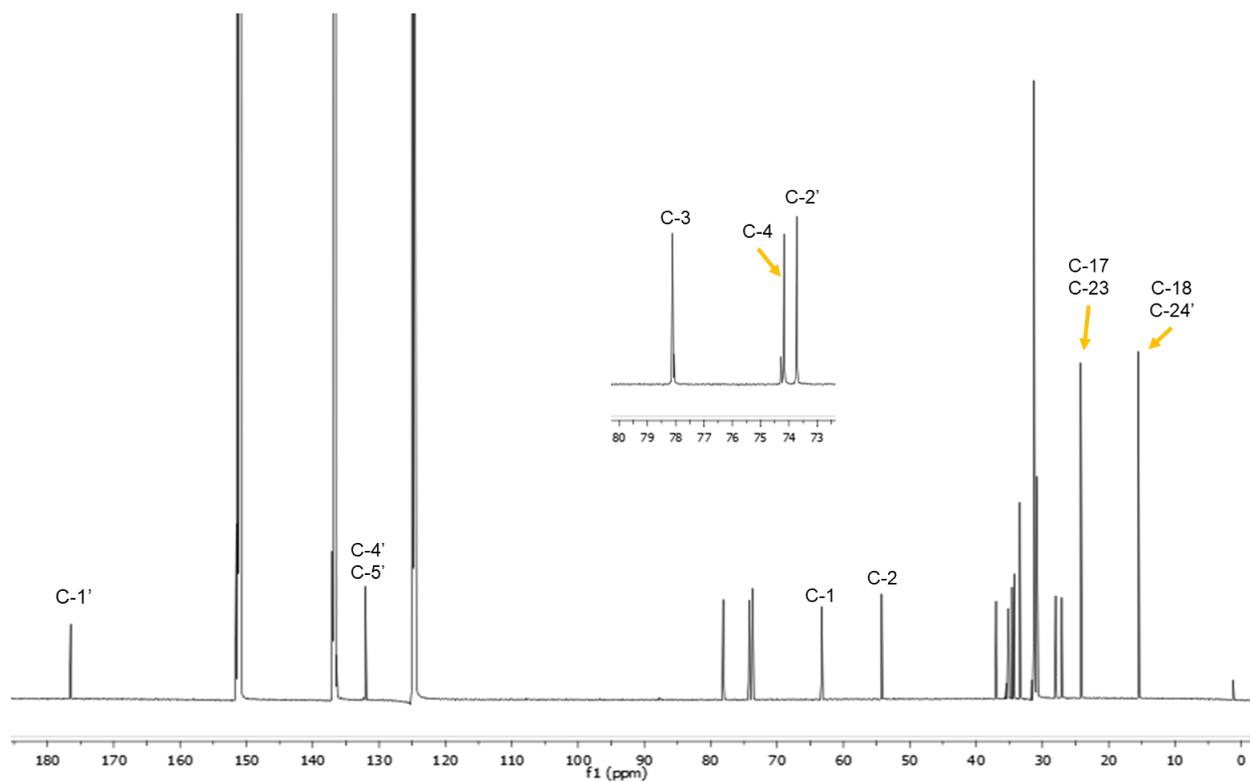


Figura E13. Espectro RMN- ^{13}C del compuesto **61** en piridina- d_5

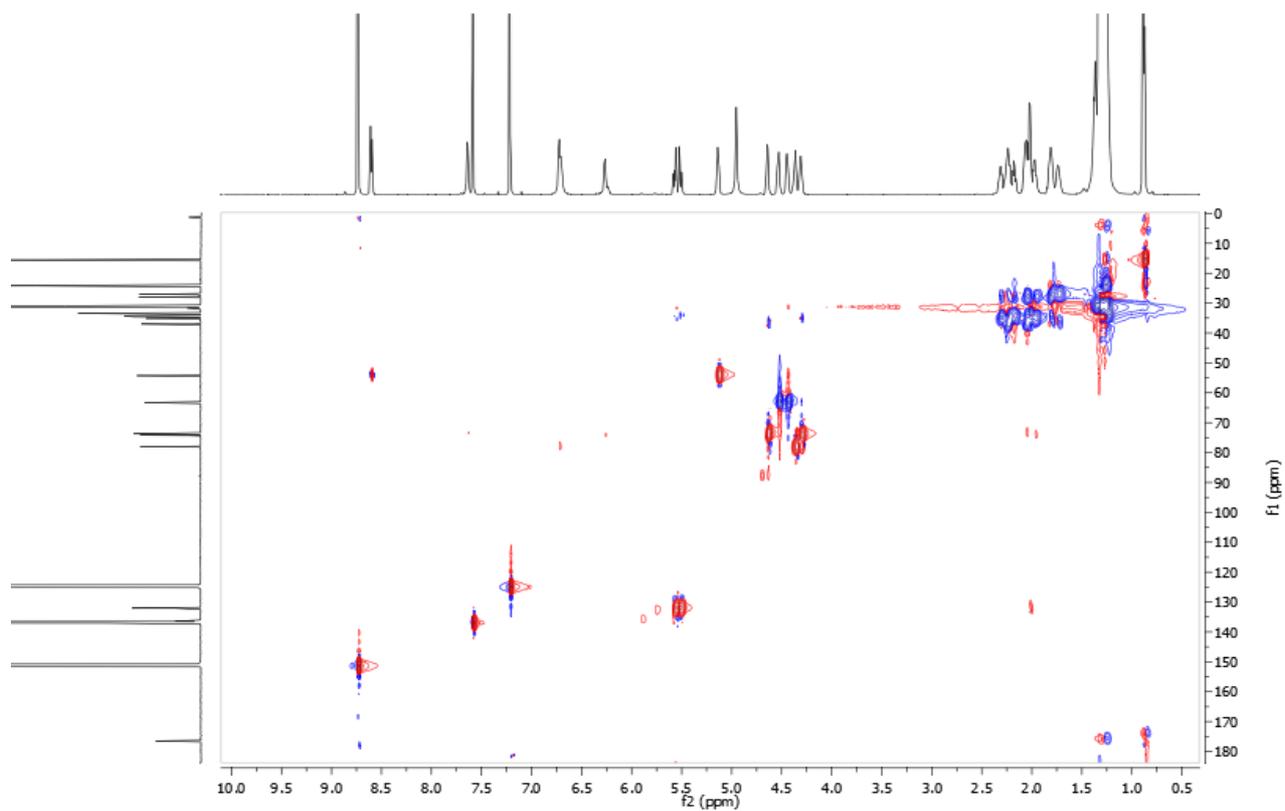


Figura E14. Experimento HSQC del compuesto **61**

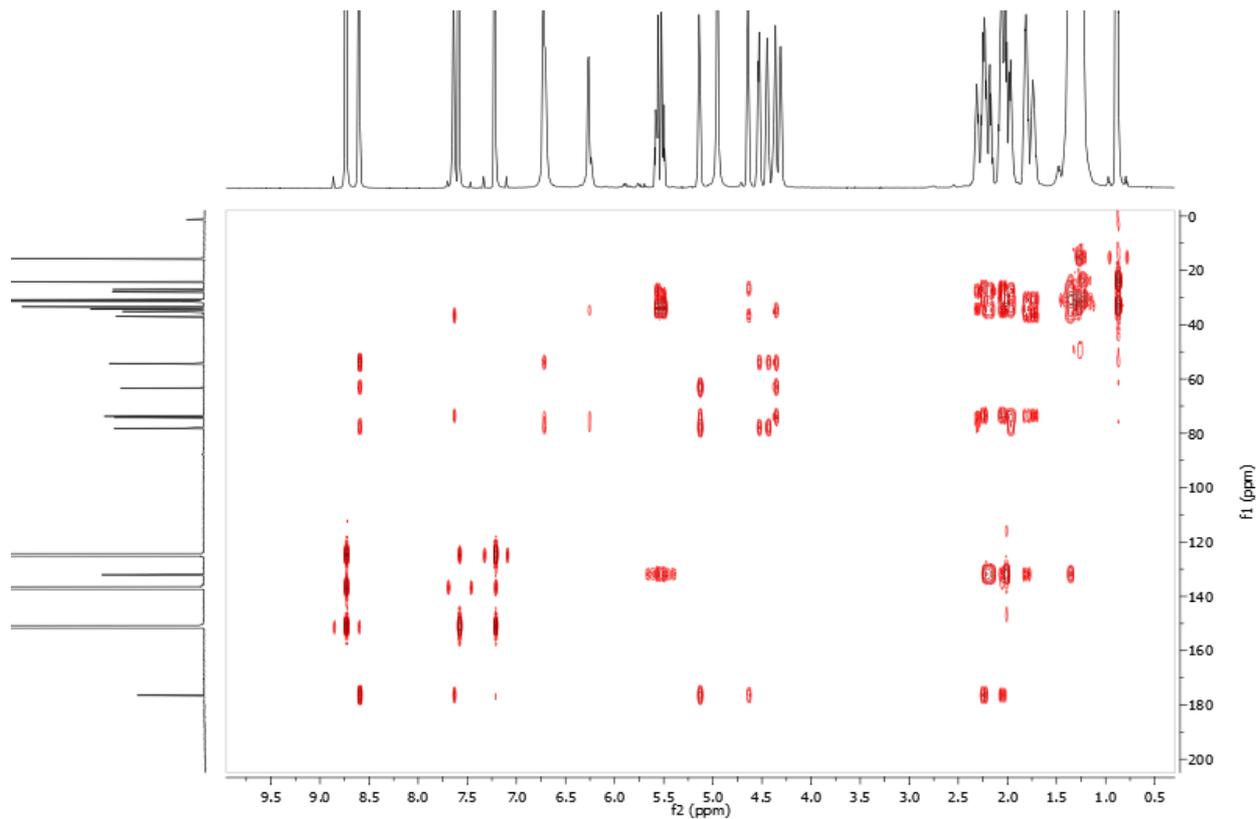


Figura E15. Experimento HMBC del compuesto **61**

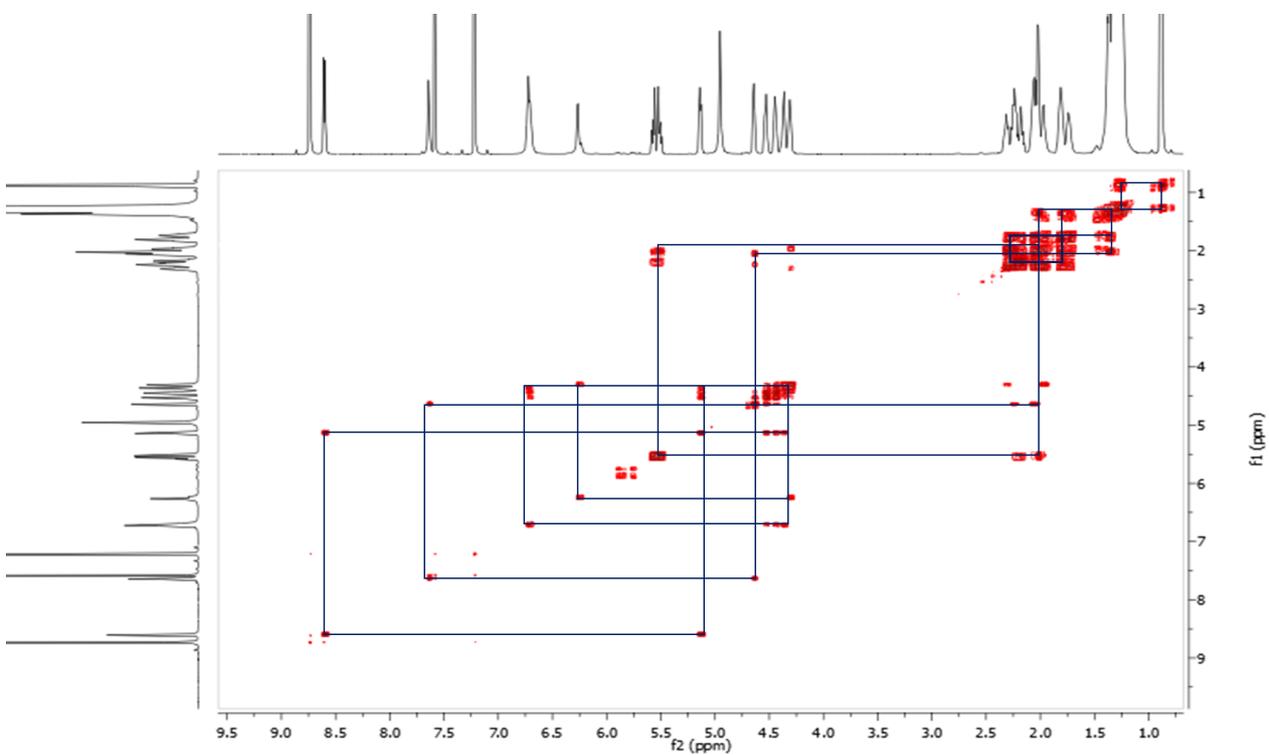


Figura E16. Experimento COSY del compuesto **61**

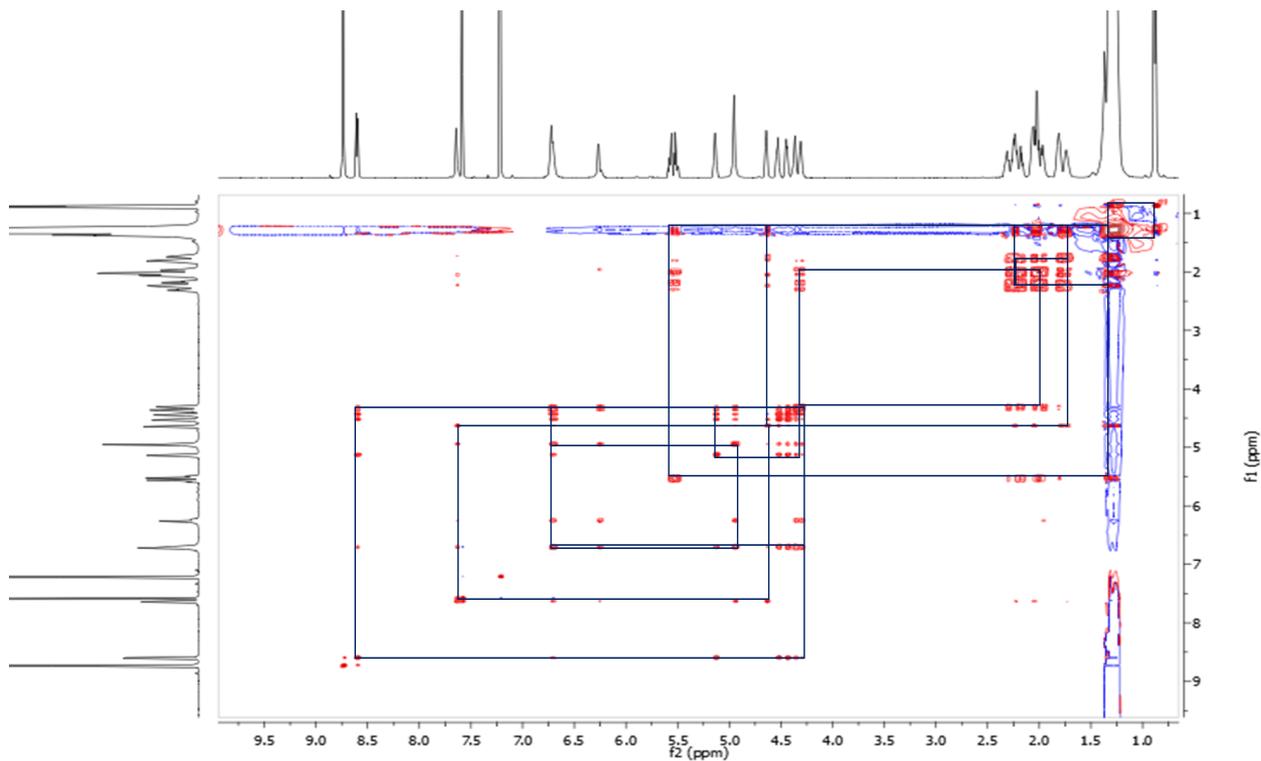


Figura E17. Experimento NOESY del compuesto 61

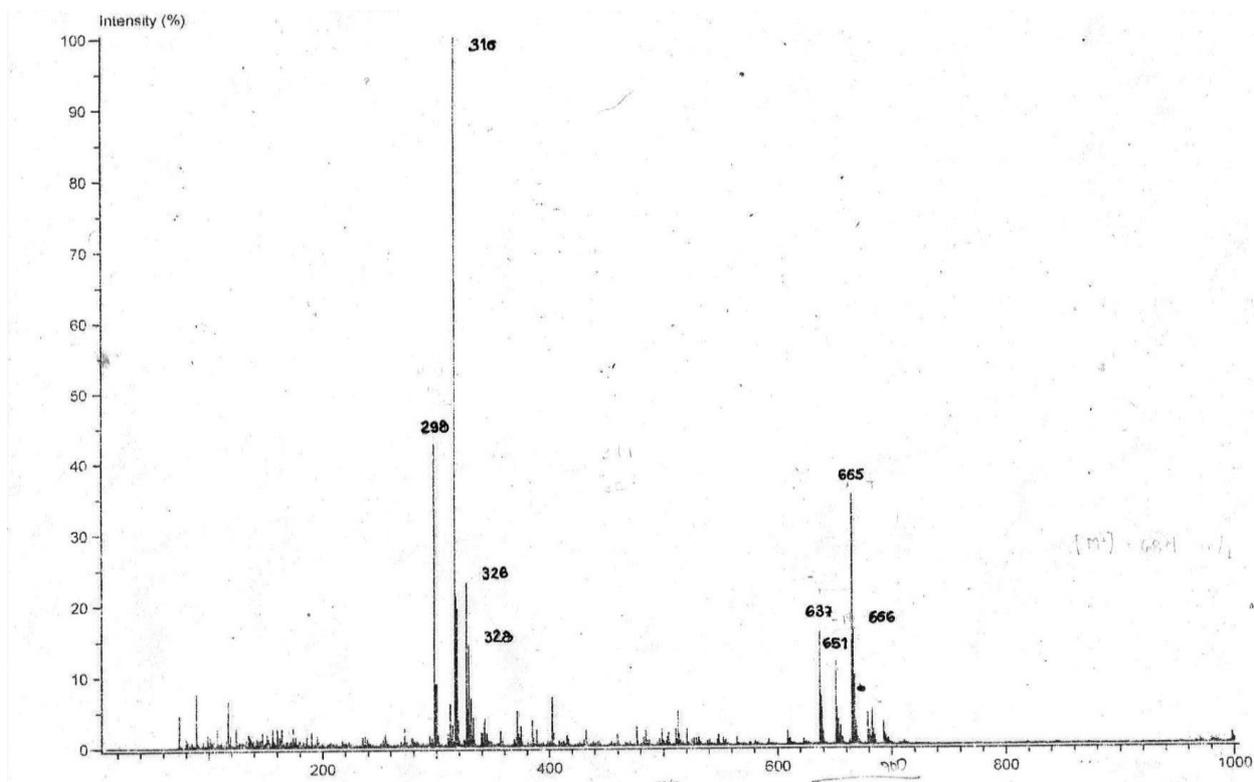
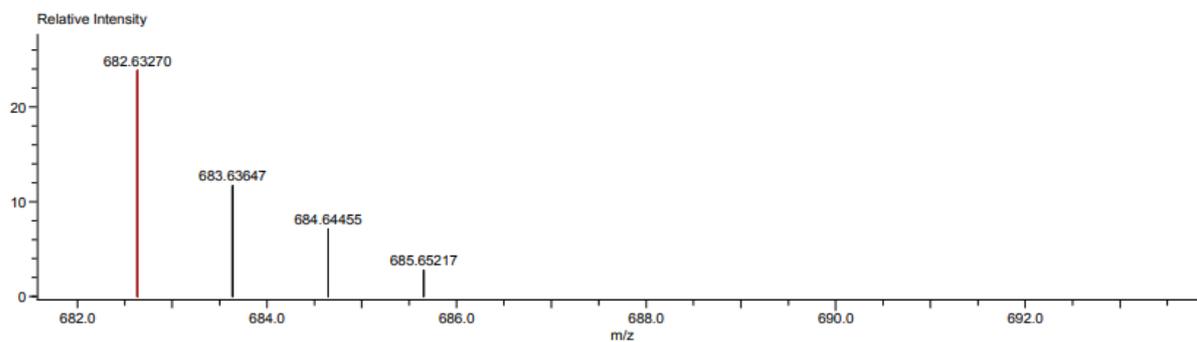


Figura E17. Espectro de masas (DART+) del compuesto 61

Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 100.0 (Fraction:Both)
Element:¹²C:0 .. 50, ¹H:0 .. 100, ¹⁴N:0 .. 1, ¹⁶O:0 .. 5



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
682.63270	236056.45	682.63495	-2.25	-3.30	¹² C ₄₂ ¹ H ₈₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₅	1.5

Figura E19. Espectro de masas exactas (ESI+) del compuesto 61

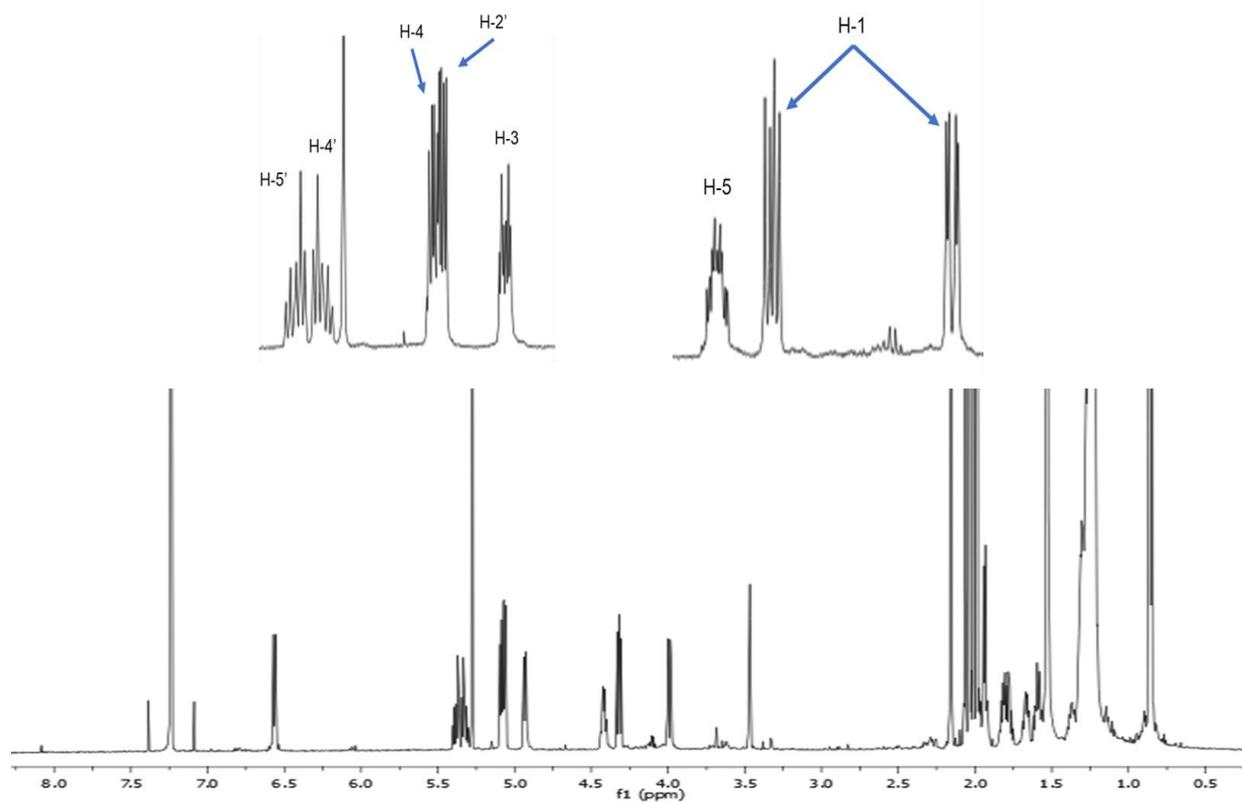


Figura E20. Espectro RMN-¹H del compuesto 61 acetilado en CDCl₃

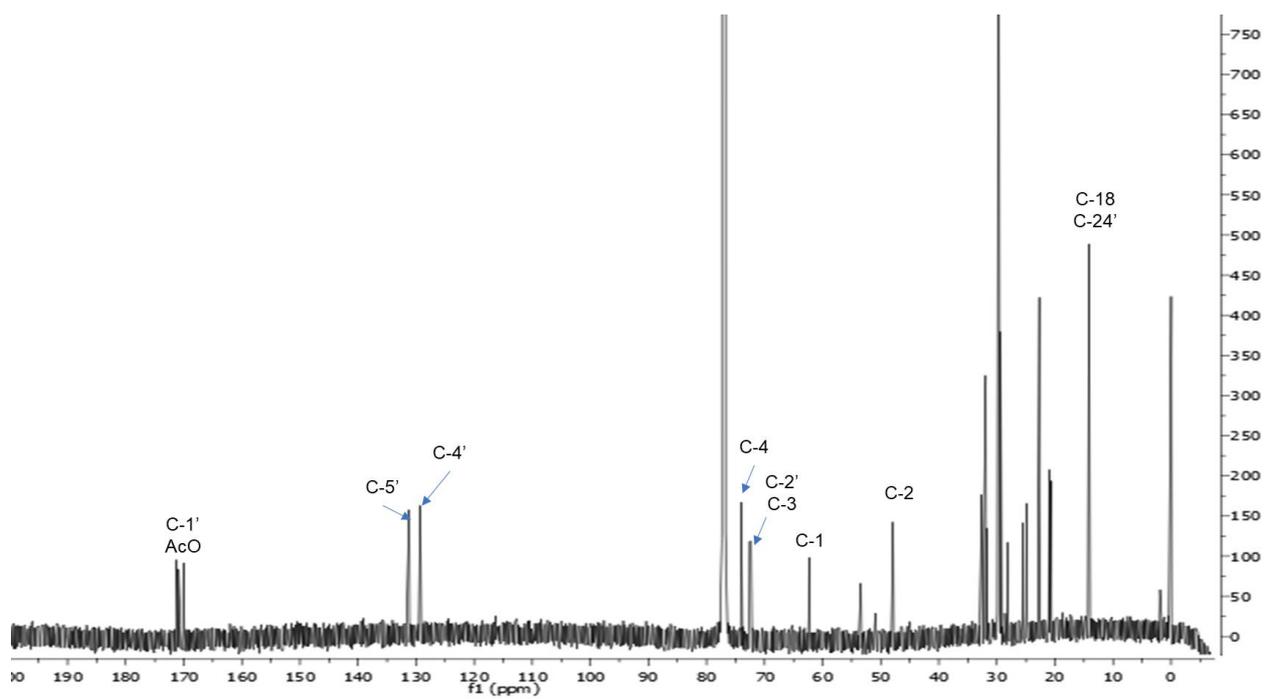


Figura E21. Espectro RMN-¹³C del compuesto **61** acetilado en CDCl₃

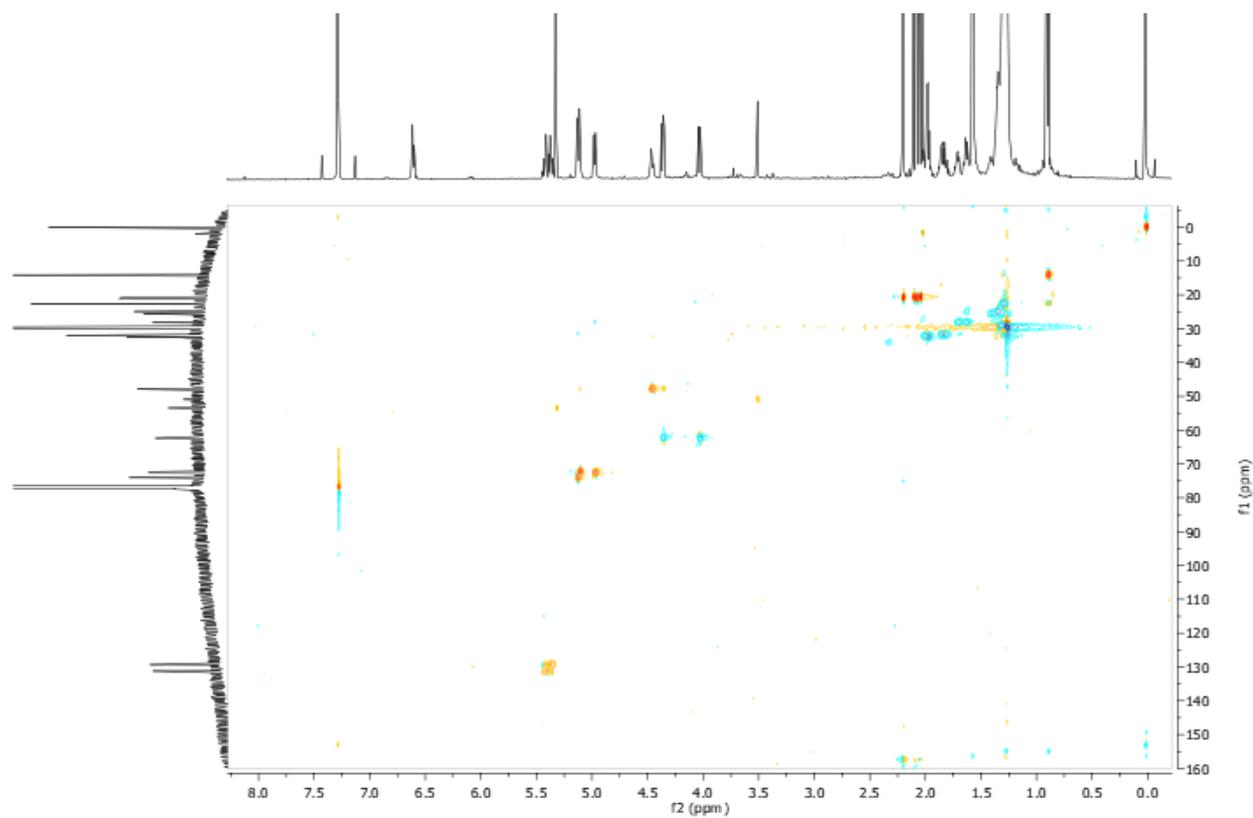


Figura E22. Experimento HSQC del compuesto **61** acetilado

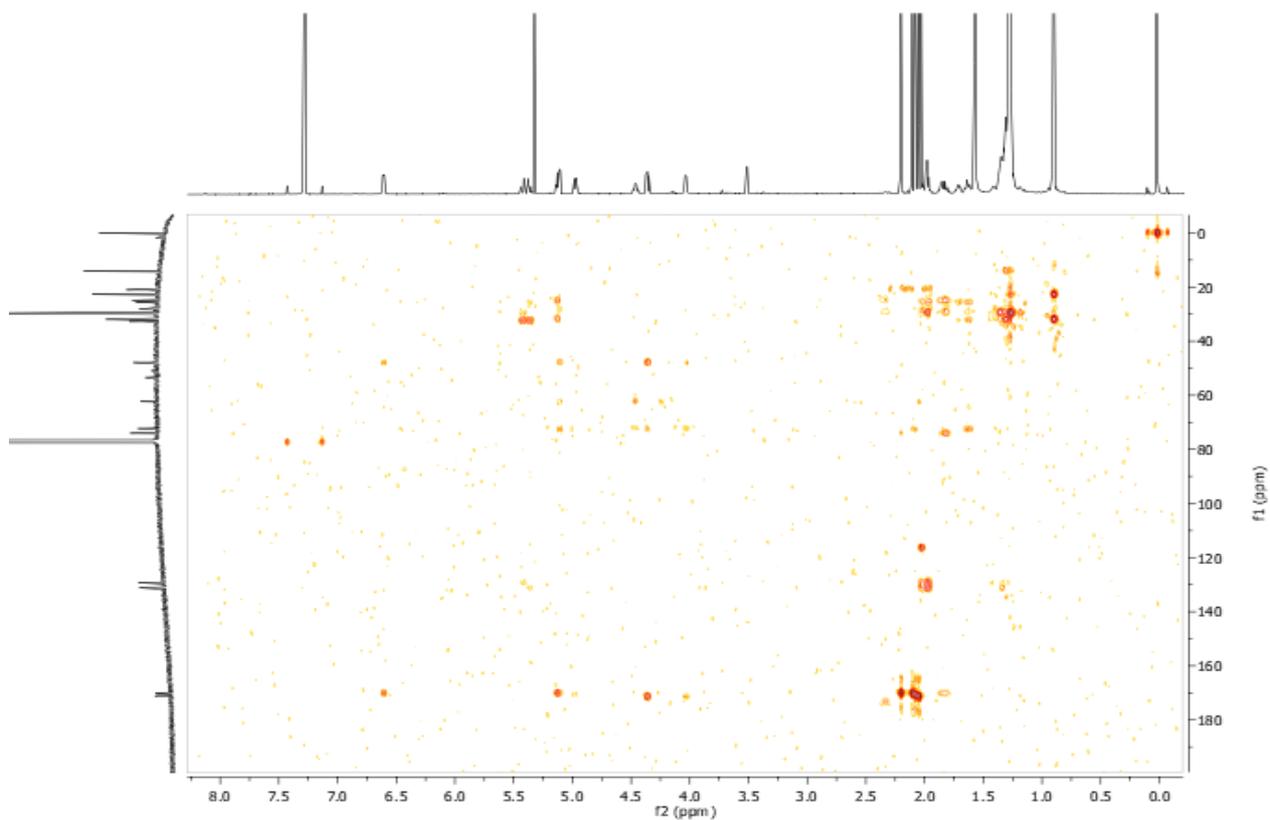


Figura E23. Experimento HMBC del compuesto **61** acetilado

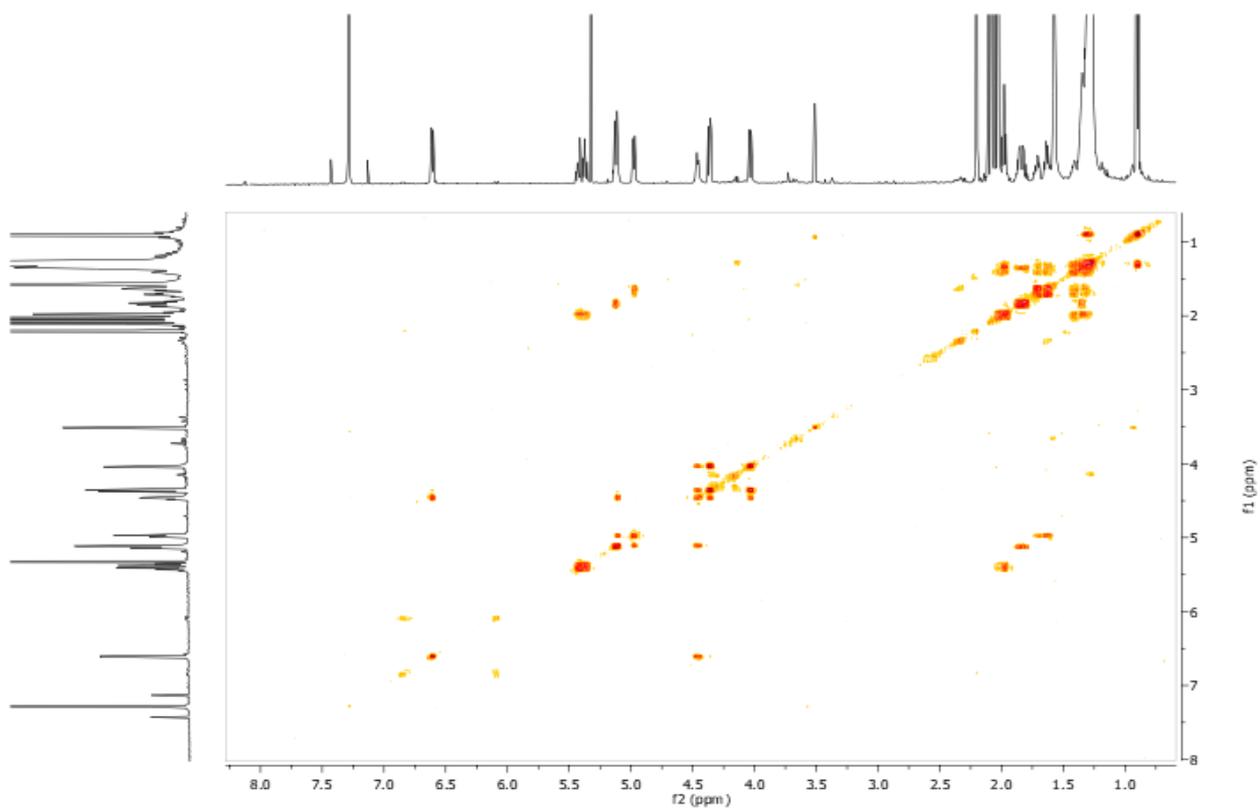


Figura E24. Experimento COSY del compuesto **61** acetilado

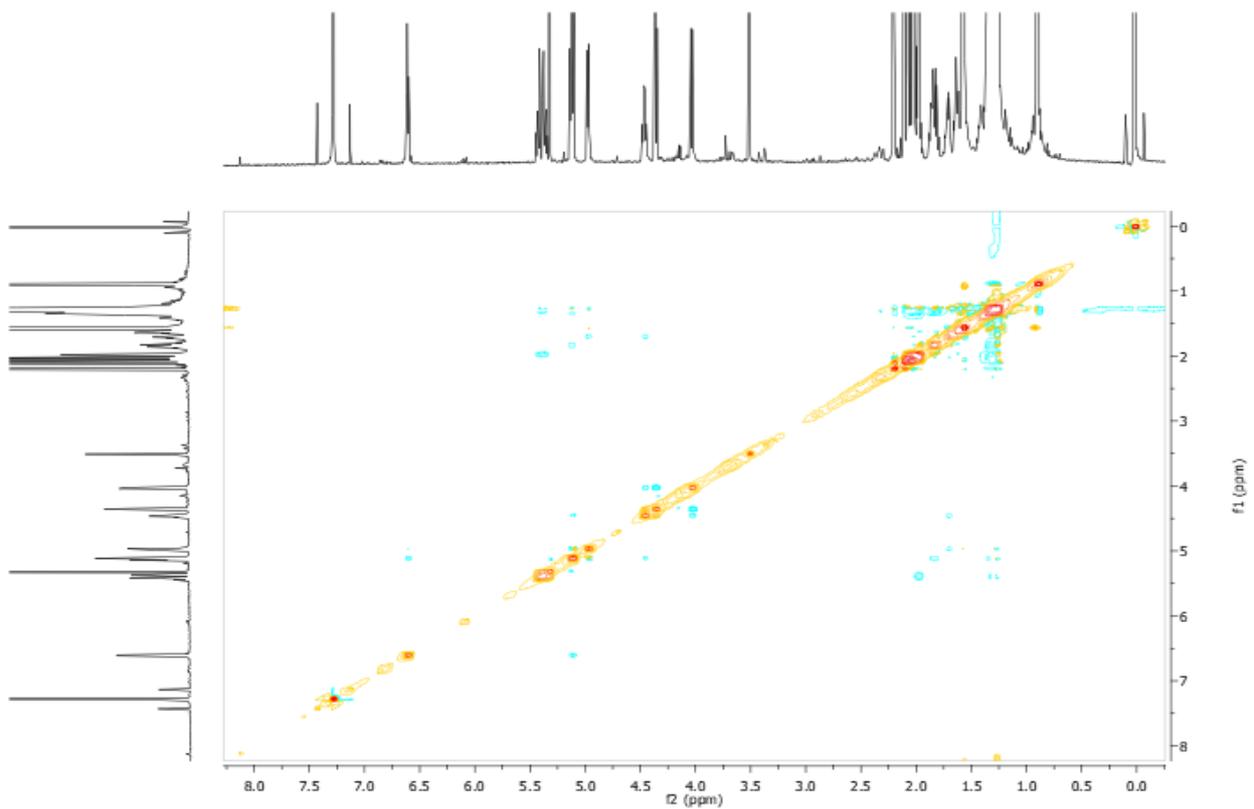


Figura E25. Experimento NOESY del compuesto **61** acetilado

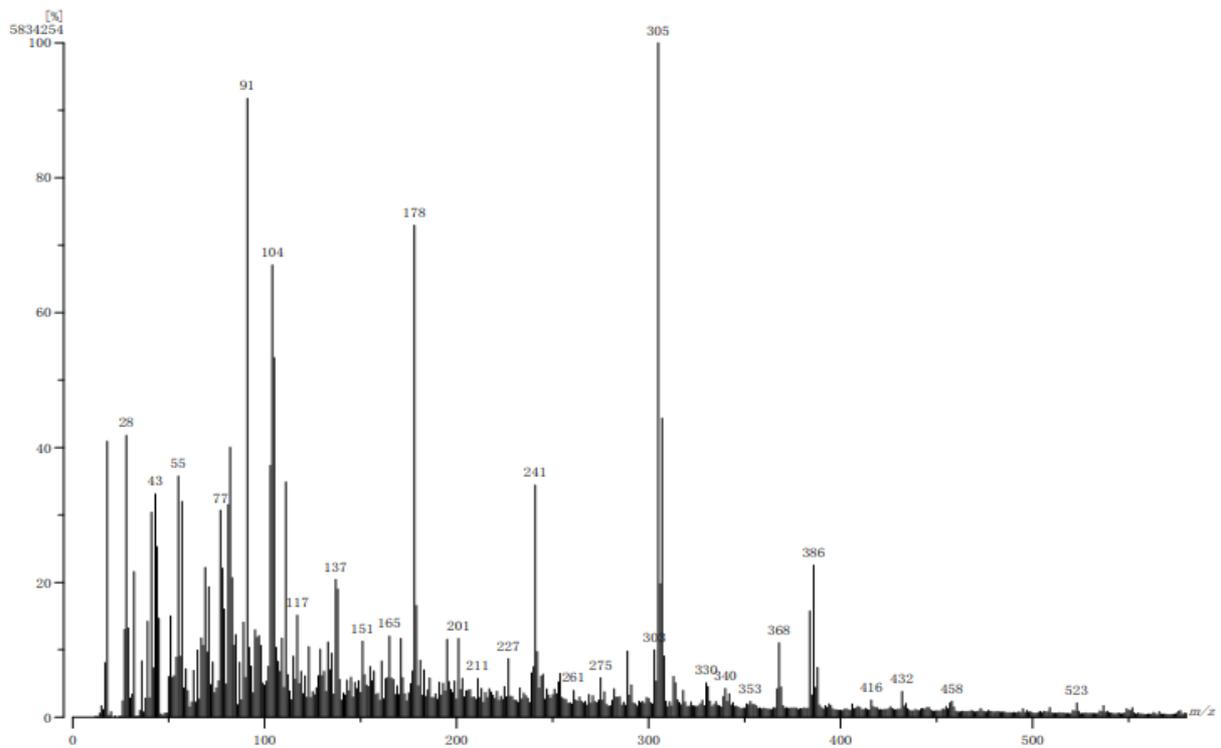


Figura E26. Espectro de masas (IE) del compuesto **61** acetilado