



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización de los metabolitos mayoritarios del extracto etanólico
derivado de los frutos de *Arctostaphylos pungens* (pingüica)**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTAN

Guillermo Cardoso García

Andrés García Hernández



MÉXICO, CDMX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RIVERO CRUZ JOSÉ FAUSTO
VOCAL: Profesor: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA
SECRETARIO: Profesor: FIGUEROA SALDÍVAR MARIO ALBERTO
1er. SUPLENTE: Profesor: RIVERA CHAVEZ JOSÉ ALBERTO
2° SUPLENTE: Profesor: OVALLE MAGALLANES BERENICE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SUSTENTANTE (S):

GUILLERMO CARDOSO GARCÍA

ANDRÉS GARCÍA HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por habernos permitido realizar nuestros estudios de licenciatura en la máxima casa de estudios.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, asesoría, tiempo y amistad brindada a lo largo de la realización de este trabajo.

Al personal técnico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria USAII, por el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al proyecto PAIP 5000-9138 otorgado por el Dr. José Fausto Rivero Cruz por los recursos económicos.

A los miembros de jurado por la revisión de este trabajo.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Metabolitos primarios	2
2.2 Metabolitos secundarios.	2
2.3 Terpenoides	3
2.3.1 Biosíntesis de terpenoides.	4
2.3.2 Ácido oleanólico (1, AO).....	7
2.3.3 Ácido maslínico (2, AM).....	7
2.3.4 Ácido ursólico (3, AU).....	8
2.3.5 Uvaol (4, UV).....	8
2.3.6 Propiedades farmacológicas y aplicaciones de los ácidos oleanólico (1), maslínico (2) y ursólico (3).	9
2.3.6.1 Actividad hepatoprotectora.	10
2.3.6.2 Efecto anticancerígeno y citotóxico	10
2.3.6.3 Efecto antiinflamatorio y modulador del sistema inmune.	10
2.3.6.4 Actividad anti-VIH.....	11
2.3.6.5 Tratamiento contra la dermatitis.	11
2.6.3.6 Efecto antiparasitario.	11
2.6.3.7 Efecto neuroprotector.....	12
2.6.3.8 Agentes contra la diabetes.....	12
2.6.3.9 Actividad antiviral contra virus de la hepatitis tipo C (VHC).	12
2.6.3.10 Otros efectos.	12
2.3.7 Propiedades farmacológicas y aplicaciones del uvaol (4)	12
2.3.7.1 Efecto citotóxico.....	13
2.3.7.2 Actividad anti-VIH.....	13
2.3.7.3 Actividad hepatoprotectora.	13

2.3.7.4 Actividad antibacteriana	13
2.3.7.5 Efecto antiinflamatorio	13
2.4 Triglicéridos.	14
2.4.1 Biosíntesis de triglicéridos.....	14
2.5 Genero <i>Arctostaphylos</i>.	15
2.6 <i>Arctostaphylos pungens</i>.	16
2.6.1 Clasificación taxonómica.	17
2.6.2 Descripción botánica de <i>Arctostaphylos pungens</i>	17
2.6.3 Nombres comunes.	19
2.6.4 Usos y propiedades medicinales.	19
2.6.5 Distribución en México de <i>Arctostaphylos Pungens</i>	20
3. JUSTIFICACIÓN.	21
4. OBJETIVOS.	22
4.1 Objetivo general.	22
4.2 Objetivos particulares.	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
5.1 Materia vegetal.....	23
5.2 Obtención del extracto.....	23
5.3 Procedimientos generales de análisis.....	24
5.3.1 Análisis cromatográficos.	24
5.3.2 Determinación de las constantes espectroscópicas.	24
5.3.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	30
6.1. Obtención del extracto.....	30
6.2 Obtención y rendimiento de las fracciones.	30
6.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados.....	33
6.3.1 Ácido oleanólico (APC001).	33
6.3.2 Ácido maslínico (APC002).	37
6.3.3 Uvaol (APC003).	39
6.3.4 1,3-Dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol (APC004).	41
7 CONCLUSION	45
8. PERSPECTIVAS.....	46

9. LITERATURA CITADA.	47
ANEXO.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de los precursores biológicos de los terpenos (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo).	5
Figura 2. Rutas biogénicas hacia mono, sesqui, di y triterpenos a partir de los precursores (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo).	6
Figura 3. Estructura molecular del ácido oleanólico.....	7
Figura 4. Estructura molecular del ácido maslínico.	8
Figura 5. Estructura molecular del ácido ursólico.....	8
Figura 6. Estructura molecular del uvaol.	9
Figura 7. Ruta de biosíntesis de los TG en plantas.....	15
Figura 8. Ilustración de <i>A. pungens</i> del Códice de la Cruz y Badiano.	16
Figura 9. A) Arbusto de <i>A. pungens</i> , B) Inflorescencia, C) Hojas, D) Frutos.....	18
Figura 10. Distribución de <i>A. pungens</i> la cual abarca el sureste de Estados Unidos y principales cierras de México	20
Figura 11. Frutos molidos y secos para macerar.	23
Figura 12. A) Frutos macerados. B) Pasta seca obtenida por presión reducida.	24
Figura 13. A) Cromatografía en columna líquida al vacío del extracto con EtOH. B) Cromatografía en columna abierta de los extractos FP-Q y FP-U.....	29
Figura 14. Extracto seco obtenido de <i>A. pungens</i>	30
Figura 15. Fracciones FP-V, FP-W, FQ-7, FU-8 y FU- 11 precipitadas.	31
Figura 16. Fracción FP-Ñ.	31
Figura 17. Espectro de RMN- ¹ H del ácido oleanólico.	34
Figura 18. Espectro de RMN- ¹³ C del ácido oleanólico.	35

Figura 19. Espectro de RMN- ¹ H del ácido ursólico.	36
Figura 20. Espectro de RMN- ¹³ C del ácido ursólico.	37
Figura 21. Espectro de RMN- ¹ H del ácido maslínico.....	38
Figura 22. Espectro de RMN- ¹³ C del ácido maslínico.....	39
Figura 23. Espectro de RMN- ¹ H del uvaol.....	40
Figura 24. Espectro de RMN- ¹³ C del uvaol.....	41
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H del 1,2-dilinoleoil-3-oleoil-rac-glicerol.....	43
Figura 26. Espectro de RMN- ¹³ C del 1,2-dilinoleoil-3-oleoil-rac-glicerol.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de <i>A. pungens</i>	26
Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FP-Q.	27
Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FP-U.....	27
Tabla 4. Agrupación de las fracciones FP-Q y FP-U.....	28
Tabla 5. Peso total de las fracciones del extracto de <i>A. pungens</i>	32
Tabla 6. Peso total de las fracciones FQ y FU.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de etilo	L	Litro
AM	Ácido maslínico	LC-ESI-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ionización por electroespray
AO	Ácido oleanólico		
AU	Ácido ursólico		
CCA	Cromatografía en columna abierta		
CCF	Cromatografía en capa fina	MeOH	Metanol
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	MHz	Megahercio
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano	Msnm	Metros sobre el nivel del mar
COSY	Espectroscopía por correlación	NaOH	Hidróxido de sodio
EM	Espectrometría de masas	Nm	Nanómetros
EtOH	Etanol	RMN	Resonancia magnética nuclear
g	Gramos	p/p	Peso/peso
Hex	Hexano	Ppm	Partes por millón
kg	Kilogramo	RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear Protónica
		RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
		UV	Uvaol
		VLC	Cromatografía al vacío

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas producen y almacenan una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios. Siendo los segundos mencionados los más relevantes ya que son la fuente de compuestos biológicamente activos, estos metabolitos son acumulados en la planta y su composición química, concentración y localización varía de acuerdo con la especie o la fuente de donde son aislados (Anaya et al., 2001).

La medicina tradicional está fuertemente arraigada en la sociedad y es preferida por la mayoría de la población sobre otros tratamientos médicos. Esta medicina desempeña un papel importante en comunidades aisladas o de bajos recursos, convirtiéndose en la opción más viable y conocida a la que la población tiene acceso. Es por estas razones que las plantas y sus extractos son utilizadas por los seres humanos como fuente de agentes terapéuticos desde tiempos remotos. Actualmente, con el creciente interés que ha despertado el uso de productos herbolaria a diario se incrementa el número de estudios que confirman la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversos padecimientos (Marcano y Hasegawa, 2002; OMS, 2013). Cuando los metabolitos secundarios son aislados, purificados e identificados y su actividad biológica es probada, estos pueden utilizarse en la medicina herbolaria tradicional o bien la medicina moderna para el consumo del ser humano (Anaya et al., 2001).

Durante las últimas décadas, los estudios químicos de los extractos vegetales han permitido el aislamiento y caracterización que numerosos compuestos de interés. En la actualidad, muchos productos naturales usados en la terapéutica se obtienen a partir de las plantas medicinales las cuales son usadas tradicionalmente. Estos estudios fitoquímicos han tenido avances significativos respecto a la elucidación estructural, configuración y síntesis de los metabolitos secundarios aislados, alguno de los cuales han sido sometidos a ensayos clínicos.

La razón fundamental del interés del mundo por estas sustancias bioactivas de origen natural es debido a que aproximadamente el 80% de la población mundial que habita en los países que se en vías de desarrollo la utiliza. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que ese porcentaje de la población usa la medicina tradicional para sus necesidades (Nudelman, 2004). Por último, es importante destacar que en nuestro país una buena parte de la población no puede costearse los medicamentos existentes en el mercado y utilizan como alternativa a la medicina tradicional.

2. ANTECEDENTES

2.1 Metabolitos primarios.

Una gran diferencia que existe entre plantas y los animales es la capacidad de síntesis de numerosas y diversas sustancias de diferente naturaleza química. Estas presentan propiedades farmacológicas diversas, aunque su papel fisiológico en la planta no es conocido a veces del todo. En particular las plantas y otros organismos mediante sus procesos metabólicos sintetizan dos categorías de metabolitos: primarios y secundarios; aunque esta distinción resulta totalmente arbitraria ya que no existe división precisa entre estos (Harborne, 1997).

Los metabolitos primarios abundantes en la naturaleza son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta, se encuentran presentes en grandes cantidades, estos conducen a la síntesis de metabolitos secundarios que se acumulan en la planta en pequeñas cantidades, a veces en células especializadas, lo que dificulta su extracción. Entre estos metabolitos primarios se encuentran aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos carboxílicos, etc. (Castillo y Martínez, 2007).

2.2 Metabolitos secundarios.

Las plantas producen una gran cantidad de compuestos que no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo, estas sustancias reciben el nombre de metabolitos secundarios, los cuales son también nombrados como productos secundarios o productos naturales. Estos metabolitos no tienen una función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz y Zeiger, 2006).

Un metabolito secundario puede estar implicado en relaciones ecológicas, es decir, en la relación de la planta productora con los otros organismos de su entorno natural. Ejemplos de estos, son los pigmentos de las flores, estos atraen a los insectos polinizadores y los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos o que protegen a la planta de infecciones o de los depredadores (Abrahamson, 1989). Algunos metabolitos secundarios se caracterizan por tener una distribución restringida en el reino vegetal, se pueden encontrar en una sola especie vegetal o un grupo de

especies que están relacionadas mientras que los metabolitos primarios pueden ser ubicuos en el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

En general estos compuestos secundarios son responsables del olor, sabor y color de la planta y también de sus propiedades medicinales (Castillo y Martínez, 2007). En otros estudios se ha descrito su importancia fisiológica (los esteroides, constituyentes de las biomembranas, la lignina, polímero natural) o sirven como señales que integran la diferenciación celular y el metabolismo en diferentes partes del organismo vegetal (Piñol y Palazón, 1993).

2.3 Terpenoides.

Los terpenoides constituyen la familia más extensa, con más de 65,000 compuestos. En esta familia se incluyen compuestos con actividades farmacológicas importantes como son los esteroides, glucósidos cardiotónicos, saponinas y terpenoides modificados. Debido al extenso campo de aplicación, representan un grupo de suma importancia económica lo que permite que sigan buscando e identificando nuevas estructuras y aplicaciones (Oldfield y Lin, 2012).

En las plantas, los terpenoides intervienen en distintos procesos funcionales como son reguladores de crecimiento vegetal, pigmentos fotosintéticos, portadores de electrones y componentes estructurales de membrana. Además de estas funciones metabólicas, funcionales y estructurales muchos terpenoides intervienen en la comunicación y defensa de las plantas, como atrayentes de polinizadores o de dispersores de semillas, fitoalexinas competitivas, antibióticos y toxinas repelentes (Harborne, 1997).

Los terpenoides de origen vegetal representan un recurso natural renovable, y proporcionan un amplio rango de productos comerciales útiles, incluyendo, saborizantes, disolventes, fragancias, adhesivos, polímeros, pero sobre todo numerosos fármacos e intermediarios sintéticos. Estos compuestos se clasifican dependiendo del número de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) en:

- Monoterpenoides (10 carbonos. 2 unidades de isopreno)
- Sesquiterpenoides (15 carbonos, 3 unidades de isopreno)
- Diterpenoides (20 carbonos, 4 unidades)
- Triterpenoides (30 carbonos, 6 unidades)

- Tetraterpenoides (40 carbonos, 8 unidades).

Siendo de tal forma que los triterpenoides constituyen el grupo más extenso de terpenoides debido a su gran diversidad estructural y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en estado libre, como glicósidos o como ésteres, aunque también han sido hallados algunos importantes en el reino animal, así como en el reino fungí. En los triterpenoides se incluye el escualeno, aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón y un gran número de compuestos con distinto número de anillos. Se distinguen cuatro clases de triterpenoides: de cadena abierta, tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. Basado en sus esqueletos de carbono, se pueden clasificar en:

- Tetracíclicos: Lanostanos, dammaranos, cicloartanos o eufanos, entre otros.
- Pentacíclicos: Ursanos (ácido ursólico, uvaol), oleananos (ácido oleanólico, ácido maslínico, eritrodiol) o lupanos (lupeol, betulina, ácido betulínico) (Vincken et al., 2007).

2.3.1 Biosíntesis de terpenoides.

Los triterpenoides presentes en la naturaleza tienen su origen en el escualeno, alcohol triterpénico formado por una condensación cola-cola del farnesol. La regla biogenética del isopreno en la cual se explica que, en las plantas, la biogénesis de los compuestos terpénicos da inicio en el citosol con el ácido mevalónico (ácido (*R*)-4,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), el cual es formado por condensación de 3 unidades de acetil-CoA. Posteriormente, ocurre una activación por fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico como se representa en la Figura 1. Dando como resultado pirofosfato de 3-isopentenilo, que también se puede isomerizar en pirofosfato de 2-isopentenilo. Los cuales presentan una gran actividad de reacciones de sustitución nucleofílica. La formación del primer monoterpenoide se da cuando el pirofosfato de 3-isopentenilo desfosforila a pirofosfato de 2-isopentenilo, como se ve en la Figura 2, dando el monoterpenoide lineal pirofosfato de geranilo por una unión cabeza-cola. Este monoterpenoide puede reaccionar o ciclarse para dar origen a los más diversos esqueletos de diez carbonos (limoneno, geraniol, mentol, etc.).

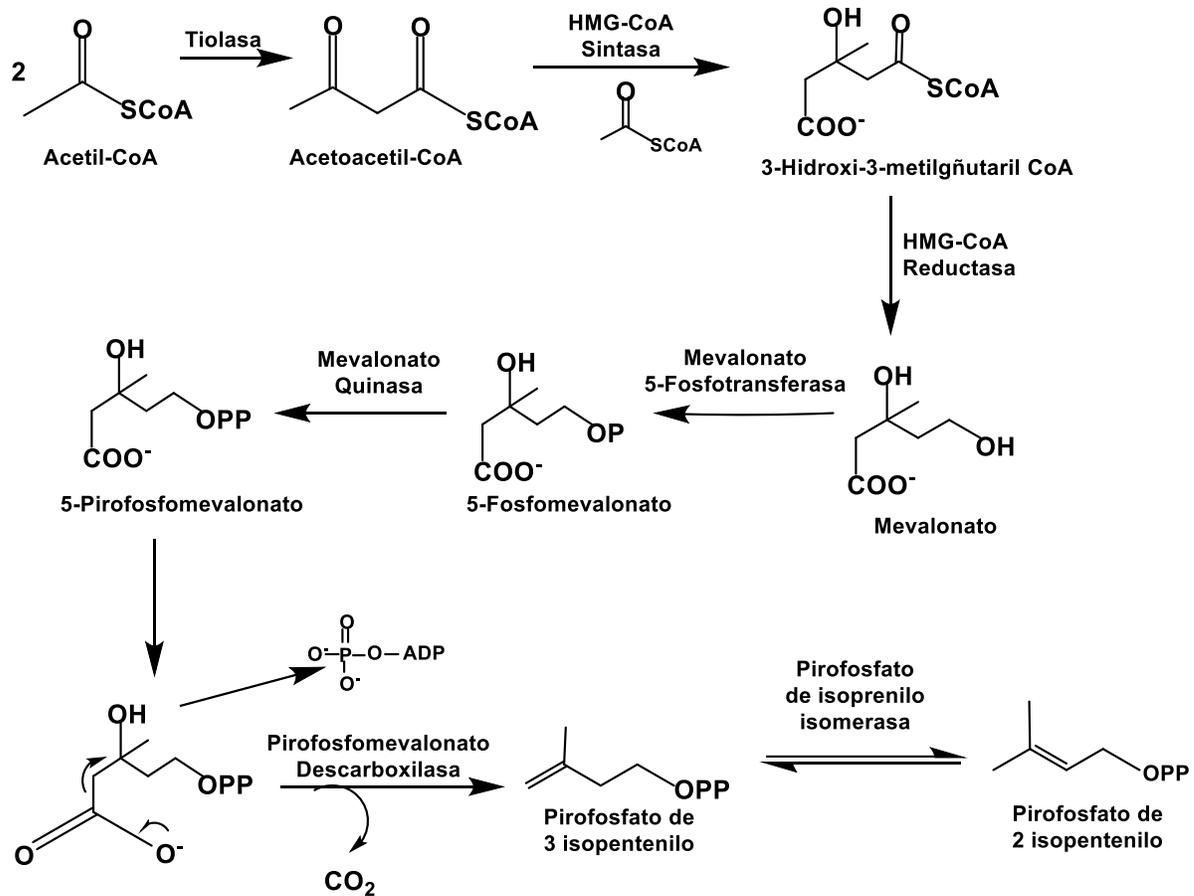


Figura 1. Biosíntesis de los precursores biológicos de los terpenos (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo).

Este monoterprenoide puede reaccionar o ciclarse para dar origen a los más diversos esqueletos de diez carbonos (limoneno, geraniol, mentol, etc.).

Posteriormente, el pirofosfato de geraniol puede reaccionar con una nueva unidad de isopreno (pirofosfato de 3-isopentenilo) por la acción de la enzima geraniol transferasa, se obtiene pirofosfato de farnesilo, el cual es la base de todos los sesquiterpenos, los cuales presentan diferentes esqueletos carbonados (drimano, eudesmanos, germacranos, etc.).

Para la síntesis de los diterpenoides el farnesil pirofosfato reacciona con pirofosfato de 3-isopentenilo, dando lugar a pirofosfato de geraniol-geraniol, intermediario precursor de los diterpenoides como (kaurano, atisanos, etc.). Por último, mediante la unión cabeza-cabeza de dos

unidades de pirofosfato de farnesilo catalizada por la enzima escualeno sintasa da como resultado el escualeno, a partir del cual se forman los triterpenoides (lupano, oleanano, ursano, etc.) (**Figura 2**).

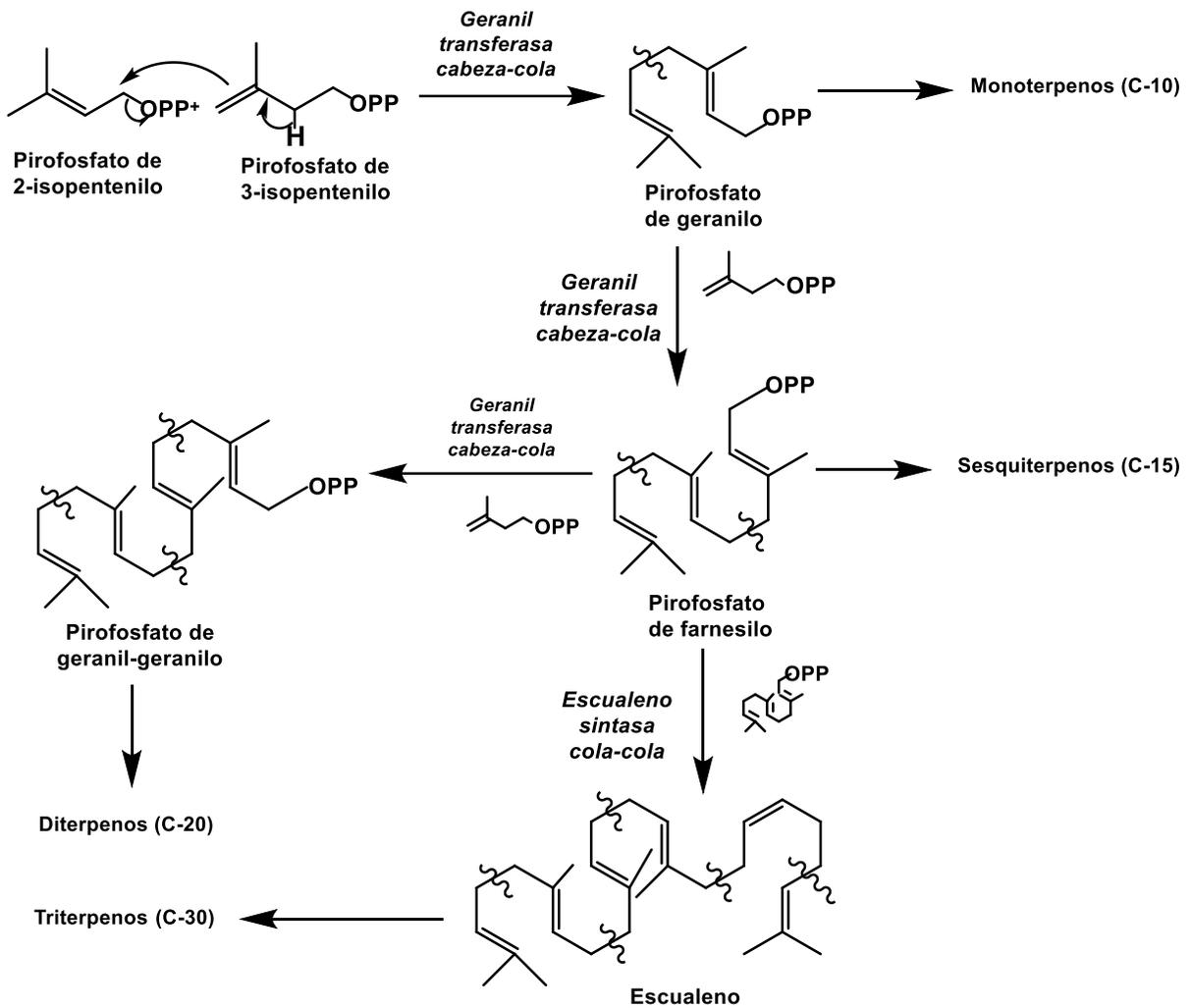


Figura 2. Rutas biogénicas hacia mono, sesqui, di y triterpenos a partir de los precursores (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo).

2.3.2 Ácido oleanólico (1, AO).

El ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) es un compuesto biológicamente activo aislado en plantas tanto de uso alimenticio como medicinal. Es un compuesto que se encuentra presente prevalentemente en plantas de la familia *Oleaceae*, como el olivo (*Olea europea*) (Shanmugam et al., 2014; Pollier y Goossens, 2012). Este compuesto pentacíclico, cuya estructura consta de 30 átomos de carbono provenientes de la condensación cola-cola de dos unidades de farnesil pirofosfato (**Figura 3**).

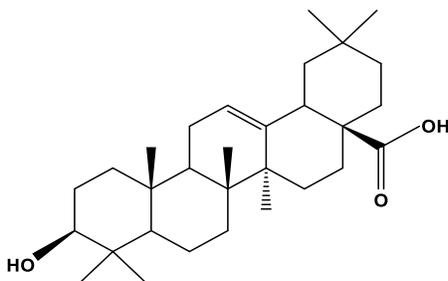


Figura 3. Estructura molecular del ácido oleanólico (1).

En los últimos años se han realizados estudios sobre las propiedades y actividades de los triterpenoides. Demostrándose que el ácido oleanólico (1) presenta varias actividades tales como: cardiovasculares, anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, hepatoprotectoras, etc. (Taiz y Zeiger, 2006)

2.3.3 Ácido maslínico (2, AM).

El ácido maslínico (ácido 2- α ,3- β -dihidroxiolcano-12-en-28-oico) (**Figura 4**). Es un triterpenoide pentacíclico abundante en la capa lipídica cuticular de las frutas de olivo (Bianchi et al., 1994) El AM presenta dos hidroxilos en los carbonos 2 y 3, un carbonilo de ácido unido al carbono 17 y un doble enlace entre los carbonos 12 y 13. Este compuesto es altamente hidrofóbico con poca solubilidad en agua. El AM posee numerosas propiedades biológicas y terapéuticas descritas en la literatura entre las que destacan: antioxidante (Montilla et al., 2003), antiinflamatoria (Marquez et al., 2006), antihipertensiva (Sánchez y Mesa, 2018), etc.

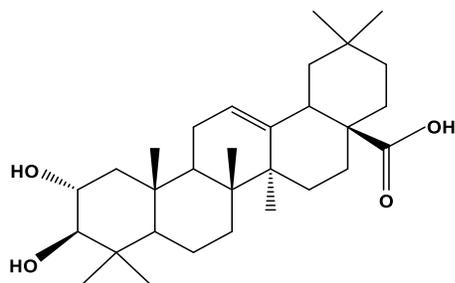


Figura 4. Estructura molecular del ácido maslínico.

2.3.4 Ácido ursólico (3, AU).

El ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-12-ursen-28-ico) (AU) es un triterpenoide pentacíclico que se encuentra en numerosas especies vegetales junto a su isómero el ácido oleanólico (Ludeña, 2018). Posee los mismos sustituyentes que el AO y la única diferencia está en la ubicación del metilo 29, el cual se encuentra unido al carbono 19 (**Figura 5**). El AU es ampliamente estudiado debido a propiedades analgésicas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Pastorello et al., 2007).

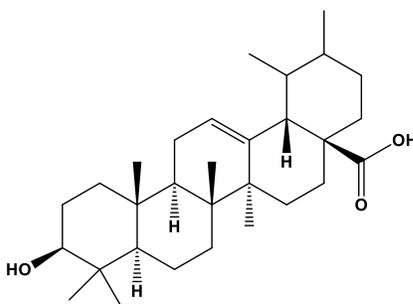


Figura 5. Estructura molecular del ácido ursólico (3).

2.3.5 Uvaol (4, UV).

El uvaol (Urs-12-ene-3,28-diol) es un triterpenoide pentacíclico, el cual ha sido ampliamente investigado por sus actividades biológicas (Amelio et al., 1992). Este compuesto a diferencia de los triterpenos anteriormente presentados (AO, AM y AU), carece del grupo carboxilo en 28 (**Figura 6**). A este terpenoide se le han reportado diversas actividades biológicas siendo las principales, las

antiinflamatorias, anticancerígenas, cardiotónicas, vasopresoras y antiarrítmicas (Somova et al., 2004).

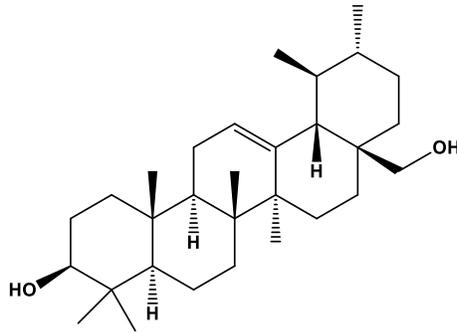


Figura 6. Estructura molecular del uvaol (4).

2.3.6 Propiedades farmacológicas y aplicaciones de los ácidos oleanólico (1), maslínico (2) y ursólico (3).

Los triterpenoides pentacíclicos han tomado relevancia debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan. La principal función biológica que cumplen estos compuestos es en las plantas y están principalmente relacionados con la defensa frente a distintos patógenos y herbívoros, por lo que se podría esperar que estos triterpenoides presenten o actúen contra ciertos patógenos causantes de enfermedades en humanos (Taiz y Zeiger, 2006).

Los ácidos maslínico (1), oleanólico (2) y el ácido ursólico (3) al igual que otros triterpenoides pentacíclicos, tienen importantes actividades biológicas que demuestran el potencial terapéutico que estos compuestos de origen natural pueden tener relacionados al cáncer, inflamación y SIDA por mencionar ciertos ejemplos. Una amplia variedad de efectos farmacológicos derivados de los ácidos oleanólico, maslínico y ursólico han sido descritos incluyendo propiedades beneficiosas sobre sistema cardiovascular (Somova et al., 2003), actividad antioxidante (Wang et al., 2013), actividad antihistamínica (Zhang y Ma, 1995), anticancerígena (Fernández et al., 2003), antiinflamatorias (Sanchez-Gonzalez et al., 2013), y antimicrobianas y así mismo algunos de estos triterpenoides se han incorporado como principios activos en cosméticos para tratamientos antiedad.

2.3.6.1 Actividad hepatoprotectora.

Los compuestos con esqueletos de oleanano han demostrado una actividad protectora del hígado frente a agentes químicos, de la fibrosis y de la cirrosis resultado de las enfermedades hepáticas (Joy Hoskeri et al., 2012; Pollier y Goossens, 2012; Zhang et al., 2012). Estos beneficios, se deben a la acción antiinflamatoria y antioxidante, así como los efectos que tiene sobre enzimas que metabolizan fármacos. El AO ocasiona el incremento de la Nrf2 nuclear, que es la llave transcripcional para la protección del hígado (Liu et al., 2008).

2.3.6.2 Efecto anticancerígeno y citotóxico

Los ácidos oleanólico (1) y maslínico (2) han manifestado efectos en diferentes estadios de desarrollo tumoral, induciendo la diferenciación celular y apoptosis. Además, ambos ácidos presentan actividad citotóxica (Lee et al., 1994) y se ha demostrado que son capaces de inhibir la proliferación de células malignas de varios tipos de tumores sin afectar a células sanas (Zuco, et al., 2002). Estos compuestos han presentado un interés creciente en la medicina por dichos efectos sobre los tumores y su baja toxicidad. La actividad que se ha demostrado es sobre líneas celulares de leucemia (Fernandes et al., 2003) y cáncer de colón (Li et al., 2002), además de que estos compuestos inhiben el desarrollo del tumor en distintas etapas incluyendo la tumorigénesis, progreso tumoral, angiogénesis y la metástasis (Sohn et al., 1995).

Los mecanismos celulares que inducen el efecto antitumoral no son bien conocidos, pero en estudios recientes se ha demostrado que estos compuestos son capaces de inducir apoptosis en células tumorales por la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), favoreciendo la disminución de potencial transmembrana de la mitocondria y la activación de caspasa-3 (Zuco et al., 2002), además de que se ha visto que producen inhibición de la actividad de la DNA topoisomerasa I, enzima participante en el papel del metabolismo del DNA, y su inhibición ha sido base del tratamiento de varios tipos de cáncer.

2.3.6.3 Efecto antiinflamatorio y modulador del sistema inmune.

El ácido maslínico tiene propiedades tanto antiinflamatorias como moduladoras del sistema inmune, la información proporcionada refiere a que el ácido maslínico inhibe la liberación de IL-6, TNF y la

producción de NO y peróxido de hidrogeno, lo que disminuye el estrés oxidativo intracelular (Huang et al., 2011).

Como se sabe los procesos inflamatorios de tipo crónico son considerados hoy en día como una de las causas más importantes de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y cáncer, es por eso que el estudio y aplicación de la actividad anti-inflamatoria que presenta el ácido maslínico, tiene una alta relevancia tanto para el tratamiento como para la prevención de estas enfermedades. Ejemplo de estas aplicaciones son que inhibe la actividad enzimática del glicógeno fosforilasa (Guan et al., 2009) y además presenta actividad hipoglucémica demostrada por vía oral en ratas diabéticas (Wen et al., 2005). Además, tiene la capacidad de proteger el daño celular por disminuir la peroxidación lipídica de membranas celulares (Montilla et al., 2003).

2.3.6.4 Actividad anti-VIH.

Tanto el ácido maslínico como el ácido oleanólico y otros derivados triterpenicos sustituidos en los carbonos 3 y 28 han presentado una actividad significativa contra el virus VIH (Mengoni et al., 2002). Además de que los hemiésteres glutáricos de ácido oleanólico revelan inhibición de la proteasa de HIV-1 (Ma et al., 1999). Los ácidos AO y AM poseen una potente actividad inhibidora *in vitro* de la proteasa del virus del VIH y actividad antiviral (Xu et al., 1996).

2.3.6.5 Tratamiento contra la dermatitis.

El AO es capaz de prevenir y tratar la dermatitis atópica y la dermatitis alérgica de contacto, esto por las propiedades inmunoregulatoras, específicamente para estos padecimientos es la inhibición de citoquinas y quimiocinas, específicamente las citocinas Th1, Th2, Th17 y Th22 (Choi et al., 2013).

2.6.3.6 Efecto antiparasitario.

Los AO y AU, han sido propuestos para el tratamiento contra el chagas, demostrando que son capaces de eliminar al parásito *T. cruzi* el cual es el responsable de esta enfermedad. Estos ácidos triterpenicos promueven el aumento de IL-10 y una reducción del interferón gama, reduciendo la parasitemia (da Silva-Ferreira et al., 2013).

2.6.3.7 Efecto neuroprotector.

Debido a los efectos antioxidantes, antiglicativos y antiapoptóticos, los ácidos triterpénicos pentacíclicos (especialmente el AO) tienen la actividad neuroprotectora y contra el envejecimiento neuronal (Tsai y Yin, 2012).

2.6.3.8 Agentes contra la diabetes.

Los AO y AU tienen descritos efectos benéficos contra la diabetes mellitus tipo 2 por la inhibición de la α -glucosidasa (Hou et al., 2009; Chen et al., 2006; Wang et al., 2010).

2.6.3.9 Actividad antiviral contra virus de la hepatitis tipo C (VHC).

Por otra parte, los AO y AU poseen actividad antiviral, causando una supresión de la replicación del VHC, dicha actividad antiviral es la supresión del NS5B RdRp del VHC, de manera no competitiva (Kong et al., 2013).

2.6.3.10 Otros efectos.

Los AO y AU poseen propiedades antiulcerosas en ratas (Gupta et al., 1981), así como insecticidas y antifúngicos (Marquina et al., 2001; Favel et al., 1994).

2.3.7 Propiedades farmacológicas y aplicaciones del uvaol (4)

Al igual que los triterpenoides pentacíclicos anteriormente mencionados (AO, AM y AU), el uvaol es un triterpenoide que ha tomado relevancia debido a sus múltiples actividades biológicas. Éste tiene importantes actividades biológicas que demuestran el potencial terapéutico que puede tener relacionado al cáncer, inflamación y antibacteriano.

Existe una amplia variedad de efectos farmacológicos descritos del uvaol los cuales incluyen propiedades antibacterianas, especialmente contra bacterias Gram positivas (Kemboi et al., 2016), cardiotónicas, antiarrítmicas (Somova et al., 2004), anticancerígeno (Ukiya et al., 2002), antiviral incluido efecto contra el VIH (Serra et al., 1994; Kashiwada., 2000) hipoglucemiante (Taniguchi et al., 2002) y efecto hepatoprotector (Liu et al., 1994).

2.3.7.1 Efecto citotóxico.

El uvaol es un modulador del flujo de salida de la bomba de eflujo de sustrato de la rodamina 123 y el bromuro de etidio por células cancerígenas además de tener un efecto de sinergismo con doxorubicina, agente anticancerígeno para el que inicialmente las células mostraron resistencia (Martins et al., 2011).

2.3.7.2 Actividad anti-VIH

El UV tiene menor efecto contra el virus del VIH en comparación con otros triterpenoides pentacíclicos, en especial comparándolo con el AM (Kashiwada., 2000).

2.3.7.3 Actividad hepatoprotectora.

El UV presenta actividad hepatoprotectora al igual que el AO debido a su acción antiinflamatoria y antioxidante (Liu et al., 1994).

2.3.7.4 Actividad antibacteriana

El UV ha demostrado una excelente actividad antimicrobiana sobre las bacterias *S. aureus* y *B. subtilis*, pero una baja actividad contra *E. coli* (Douglas et al., 2016). El posible mecanismo de acción es una interferencia con las membranas celulares, daño a enzimas, componentes estructurales y al DNA, además de una actividad antimicobacteriana para cepas de *M. tuberculosis* (Morocho et al., 2018; Martins et al., 2011).

2.3.7.5 Efecto antiinflamatorio

Por medio de modelos murinos se ha observado que el UV es capaz de inhibir la producción de IL-5 y reducir la afluencia de leucocitos (principalmente eosinófilos), sin interferir con los niveles de especies reactivas de oxígeno, volviéndolo un candidato para inflamaciones alérgicas (Agra et al., 2016).

2.4 Triglicéridos.

Los triglicéridos también conocidos como triacilgliceroles son los lípidos más simples, constituidos por tres ácidos grasos unidos mediante un enlace éster a una única molécula de glicerol. Son moléculas no polares e hidrófobas, esencialmente no solubles en agua (Nelson et al., 2012).

Su nomenclatura se basa, en si las tres cadenas de ácidos grasos son idénticas o dos o incluso las tres cadenas son distintas, en el primer caso este es nombrado como el ácido graso, en los dos casos siguientes éstos deben ser nombrados sin ambigüedades el nombre del ácido graso y su posición deben ser especificados (Iok et al., 1976; Fahy et al., 2005).

En las plantas los triglicéridos se almacenan como aceites, son especialmente importantes durante la germinación proporcionando energía, así como precursores biosintéticos durante su germinación (Nelson et al., 2012), aunque de vital importancia en este proceso las plantas nunca dejan de sintetizar a los triglicéridos hallándose principalmente en sus frutos y hojas.

2.4.1 Biosíntesis de triglicéridos

La biosíntesis de triglicéridos ha sido estudiada de manera amplia desde los años 50's, existiendo varias rutas de síntesis, descritas en diferentes organismos y tejidos, un ejemplo es la vía monoacilglicerol mediada por acil-CoA: monoacilglicerol aciltransferasa, la cual fue elucidada originalmente en animales que utilizan acil-CoA como donantes de acilo. Mientras la síntesis de TG independiente de acil-CoA catalizada por el fosfolípido diacilglicerol, se ha demostrado que la aciltransferasa también la realizan plantas y levaduras (Qin et al., 2012).

La biosíntesis más estudiada de TG (**Figura 7**). Inicia partiendo de la reacción de acilación de glicerol-3-fosfato (G3P) con acil-CoA catalizada por la enzima acil-CoA: glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) formando ácido lisofosfatídico (LPA), pasando por una segunda acilación con acil-CoA y catalizada por acil-CoA: ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAT) formando ácido fosfatídico (PA) la cual es desfosforilada por lipinas (PAP) generando 1,2-diacilglicerol (DG) finalmente es la esterificación del DG por medio de la acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGTA) produciendo el TG. A esta vía se le conoce como la vía Kennedy o vía G3P.

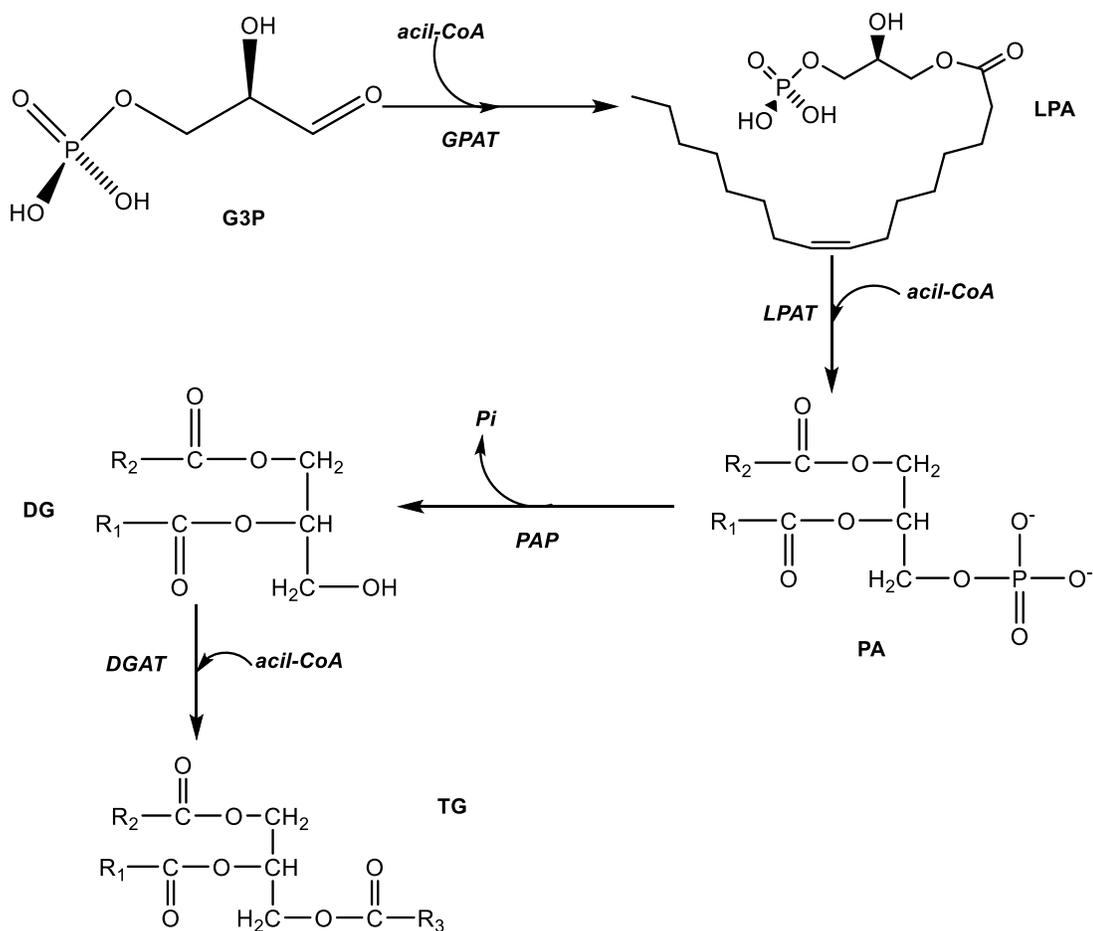


Figura 7. Ruta de biosíntesis de los TG en plantas.

2.5 Genero *Arctostaphylos*.

Arctostaphylos es un arbusto perteneciente a la familia Ericaceae, originario de América boreal, su rango de distribución va desde el sur de los Estados Unidos (California, Texas y Utah) hasta los estados de Oaxaca y Veracruz (México) con un total de 62 especies. Su crecimiento está relacionado en altitudes desde los 1,750 hasta los 3,900 m.s.n.m, asociado principalmente a zonas montañosas con climas semicálido, semiseco y templado (APMTM, 2009).

2.6 *Arctostaphylos pungens*.

Arctostaphylos pungens (**Figura 8**) mejor conocida como pingüica es una planta medicinal reconocida por sus beneficios y diversos usos para la salud además de representar una fuente de alimento para diversos animales silvestres. (APMTM, 2009)

A. pungens se establece en las primeras etapas del proceso de sucesión ecológica luego de un disturbio, por lo que se considera una especie importante para el control de erosión de suelo (Márquez et al., 2004). Se encuentra principalmente en bosque espinoso, pastizal, bosque de encino, bosque de pino y de juníperos.



Figura 8. Ilustración de *A. pungens* del Códice de la Cruz Badiano.

2.6.1 Clasificación taxonómica.

Reino: <i>Plantae</i>	Familia: <i>Ericaceae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>	Subfamilia: <i>Arbutoideae</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>	Género: <i>Arctotaphylos</i>
Orden: <i>Ericales</i>	Especie: <i>Arctotaphylos pungens</i>

2.6.2 Descripción botánica de *Arctotaphylos pungens*.

Arbusto o árbol: Arbusto de 1 a 3.5 m de altura, esta ramificado y su corteza es lisa de color café rojizo (**Figura 9A**). (APMTM, 2009)

Hojas: De soporte corto, con punta redonda, son rígidas y de color verde pálido de 1 a 3.3 cm de largo (**Figura 9B**). (APMTM, 2009)

Inflorescencias: La flor es urceolada, de color blanco a rosa mexicano y agrupada en racimos de cinco a ocho (24) flores (**Figura 9C**); puede florecer durante todo el año, pero lo hace masivamente al final del invierno, y en ocasiones, dependiendo de la abundancia de lluvias, a principios de verano. Es polinizada principalmente por abejas, aunque se ha observado también a dípteros y lepidópteros. La planta puede reproducirse vegetativamente a partir de ramas que se entierran, pero este tipo de reproducción es raro. (APMTM, 2009)

Fruto: drupa globosa deprimida, lisa, de aproximadamente 5 a 8 mm, carnosa y comestible. Madura al final de la primavera o a finales del verano. Cuando madura es de color amarillo-rojizo. Los frutos son consumidos por osos, coyotes, zorras, conejos, roedores, guajolotes silvestres e incluso por hormigas. Las semillas, en número de 4 a 7, tienen los tegumentos endurecidos (forma huesecillos) y en ocasiones permanecen unidas en grupos de dos a tres (**Figura 9D**). (APMTM, 2009)



Figura 9. A) Arbusto de *A. pungens*, **B)** Inflorescencia, **C)** Hojas, **D)** Frutos. Recuperado de <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/>

2.6.3 Nombres comunes.

Madreselva, madroño, manzanilla, manzanita, tepesquite. Estado de México: tepeisquilitl (náhuatl), pendicua, pendiqua., Hidalgo: tengüita., Chihuahua: uitzara (rarámuri), Sonora: iyoli (pima). (APMTM, 2009)

2.6.4 Usos y propiedades medicinales.

Existen registros de su uso en la medicina tradicional en México que datan del siglo XVI, cuando se cree que se usaba para tratar el asma, En el siglo XX existen registros de su uso como diurético para tratar afecciones mucosas crónicas de la vejiga, cicatrizante en vías urinarias, cistitis, pielitis y metritis. (APMTM, 2009)

En México se aprovechan los frutos y hojas para preparar remedios tradicionales para malestares como fiebre, diarrea, dolor de estómago, tos, gonorrea, reumatismo, inflamación, enfermedades venéreas, del sistema respiratorio y muy recientemente para problemas relacionados con la diabetes. aunque su uso más popular se relaciona con las afecciones renales preparando una infusión de hoja, raíz o la planta completa. (APMTM, 2009). Maximino Martínez la propone como tratamiento para la albuminuria, antiblenorrhica, anticatarral, antidiarreica, diurético, enfermedades de la vejiga. (MEXU, 2019)

2.6.5 Distribución en México de *Arctothapylos Pungens*.

La manzanita o pingüica (*A. pungens*) es una especie de arbusto Ericaceae, que en el continente americano se localiza en los ecosistemas de clima templado, desde el suroeste de los Estados Unidos, en las sierras Juárez y San Pedro Mártir de Baja California, en la Sierra Madre Occidental y hasta los bosques de Veracruz y Oaxaca. Dicha distribución se muestra en la Figura 10. (APMTM, 2009)

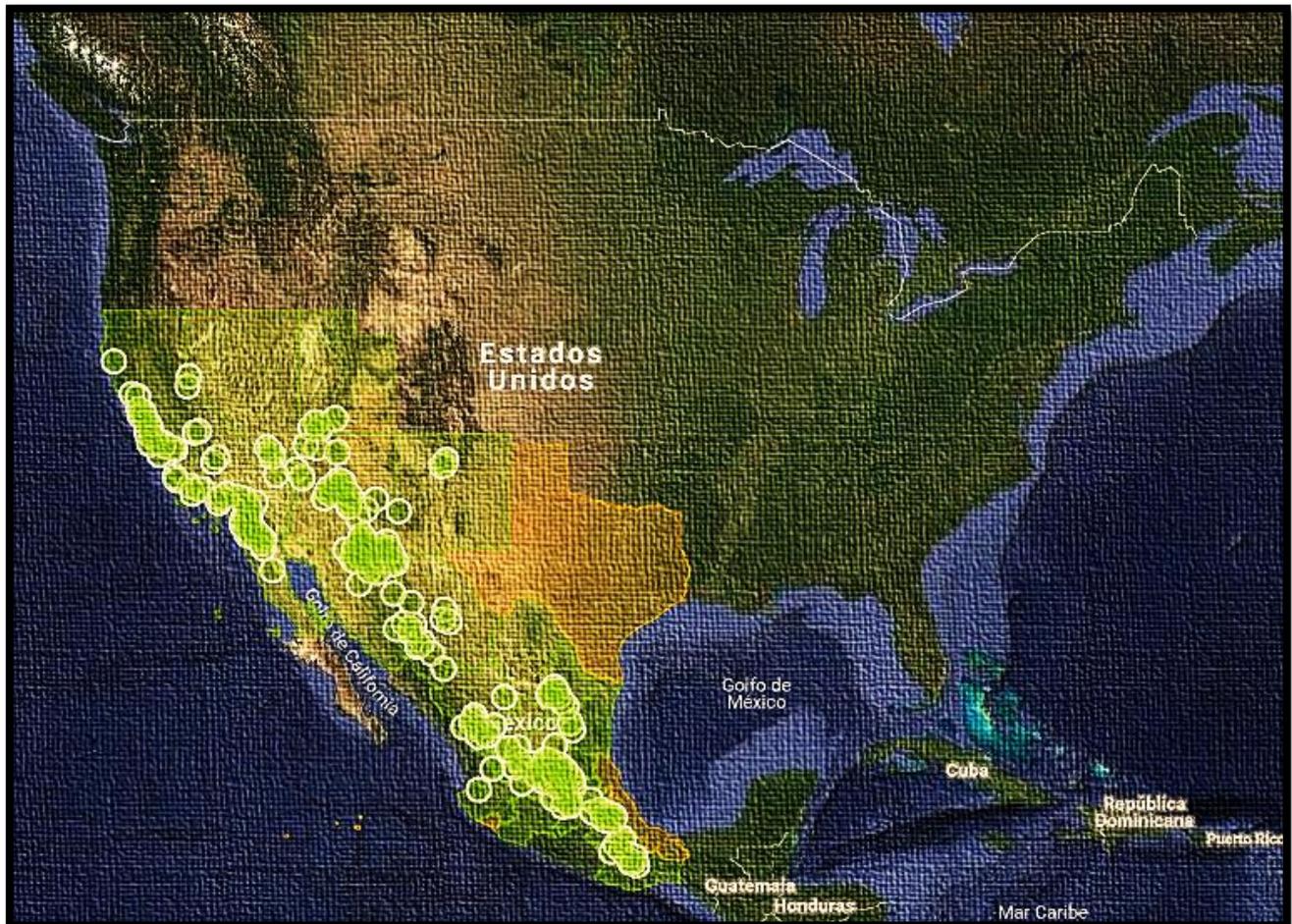


Figura 10. Distribución de *A. pungens* la cual abarca el sureste de Estados Unidos y principales sierras de México. Recuperado de <http://bdi.conabio.gob.mx/>

3. JUSTIFICACIÓN.

Las plantas producen un amplio espectro de metabolitos secundarios, los cuales participan en sus mecanismos de defensa contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Estos metabolitos son compuestos que no se asocian directamente a los procesos de crecimiento y desarrollo, sino que les confieren a las plantas propiedades biológicas las cuales pueden ser utilizadas como medicinales. El estudio de estas propiedades ha sido el punto de partida para la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Croteau et al., 2000; Heinrich et al., 2004). En los últimos años ha existido un enorme progreso en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de éstos presenta efectos secundarios, por lo que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y sobre todo seguros sigue siendo una parte importante de la investigación química y farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal continúa siendo una gran fuente de nuevos agentes con propiedades farmacológicas, ya que existen miles de plantas medicinales que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con diversas propiedades farmacológicas.

La medicina tradicional mexicana está asociada al uso de plantas medicinales y data del periodo prehispánico y ha ido evolucionando con el paso del tiempo, este tipo de recurso medicinal es muy común en todo el mundo especialmente en zonas marginadas en donde no se tiene fácil acceso a medicamentos.

Una de estas plantas es *Arctostaphylos pungens* mejor conocida como pingüica, cuyo uso tradicional es principalmente para infecciones ocasionadas por bacterias, malestares como fiebre, diarrea, dolor de estómago, tos, gonorrea, inflamación, afecciones renales y muy recientemente para tratar problemas derivados por la diabetes, todas estas afecciones son tratadas ocupando principalmente los frutos y hojas de la planta en infusión. La principal razón por la cual ha sido fuente de estudio es que no se conocen los compuestos presentes en la planta y se requiere la identificación de estos para saber cuáles son responsables de dichas acciones terapéuticas.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Aislar los compuestos mayoritarios del extracto de los frutos de la pingüica.

4.2 Objetivos particulares.

- Preparar el extracto de los frutos de la pingüica utilizando como disolvente etanol.
- Fraccionar el extracto etanólico utilizando el reparto entre hexano y metanol/agua.
- Separar los compuestos utilizando métodos cromatográficos.
- Caracterizar los compuestos aislados utilizando resonancia magnética nuclear.

5.MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Materia vegetal.

Los frutos de la pingüica fueron recolectados en Aculco de Espinoza Estado de México, México. Posteriormente, los frutos fueron secados a temperatura ambiente y fragmentados con un molino manual (**Figura 11**). Una muestra de referencia se conserva en el laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química.



Figura 11. Frutos molidos y secos para macerar.

5.2 Obtención del extracto.

La extracción del material vegetal (10 Kg) se realizó empleando el método de maceración a temperatura ambiente (**Figura 12A**) y etanol como disolvente (24 L \times 3 veces) durante un periodo de 3 semanas.

El disolvente se eliminó en un rotaevaporador para así obtener el extracto concentrado, dicho extracto resultante se colocó en un matraz Erlenmeyer para posteriormente fraccionarlo con hexano y metanol/agua y se filtró a presión reducida con un embudo büchner para llevarlo a sequedad y obtener una pasta seca del extracto (**Figura 12B**).



Figura 12. A) Frutos macerados. B) Pasta seca obtenida por presión reducida.

5.3 Procedimientos generales de análisis.

5.3.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 μm) en diversos tamaños y sistemas de elución. Se observaron bajo luz ultra violeta a $\lambda = 254 \text{ nm}$ y 315 nm , posteriormente se revelaron con anisaldehído sulfúrico.

5.3.2 Determinación de las constantes espectroscópicas.

Los espectros de RMN de ^1H y C^{13} se obtuvieron de un equipo Varian a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en piridina deuterada. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm).

5.3.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto.

Una porción del extracto (70.0 g) se adsorbió en gel de sílice 60 (Merck) y los constituyentes separados por cromatografía líquida al vacío (VLC) (**Figura 13A**). Para esta separación se utilizaron como eluyentes mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en gradiente de polaridad. En el fraccionamiento se recolectaron un total de 111 fracciones de 1 L, las cuales fueron concentradas con el rotaevaporador para eliminar el exceso de disolvente. Estas fracciones fueron

reagrupadas bajo el criterio de similitud cromatográfica utilizando la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) usando un sistema de elución hexano:cloroformo:MeOH (7:1.5:1.5) dando un total 24 fracciones combinadas (FP-A a FP-Z) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de *A. pungens*.

FRACCCION	DISOLVENTE	PROPORCIÓN	REAGRUPAMIENTO
FP-01 a FP-05	HEXANO	100	FP-A
FP-06 a FP-09	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	98:2	FP-B
FP-10 a FP-13	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	96:4	FP-C
FP-14	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	94:6	FP-D' (FP-D+E)
FP-15 a FP-17	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	92:8	FP-F
FP-18 a FP-20	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	90:10	FP-G
FP-21 a FP-32	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	85:15	FP-H' (FP-H+I+J)
FP-33 a FP-35	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	80:20	FP-K
FP-36 y FP-37	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	75:25	FP-L
FP-38 y FP-39	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	50:50	FP-M
FP-40 a FP-42	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	25:75	FP-N
FP-43 a FP-45	CH ₂ Cl ₂	100	FP-Ñ
FP-46 a FP-50	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	95:5	FP-O' (FP-O+P)
FP-51 a FP-56	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	90:10	FP-Q' (FP-Q+R)
FP-57 a FP-60	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	90:20	FP-S
FP-61 a FP-64	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	70:30	FP-T
FP-65 y FP-66	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	60:40	FP-U
FP-67 a FP-77	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	50:50	FP-V
FP-78 a FP-81	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	40:60	FP-W
FP-82 a FP-83	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	30:70	FP-W'
FP-84 a FP-89	AcOEt	100	FP-X
FP-90 a FP-101	AcOEt-MeOH	80:20	FP-X'
FP-102 a FP-108	AcOEt-MeOH	50:50	FP-Y
FP-109 a FP-111	MeOH	100	FP-Z

En las fracciones FP-Q - FP-U se observó un patrón cromatográfico similar, por lo cual estas fracciones fueron sometidas a un segundo fraccionamiento por cromatografía en columna abierta (**Figura 13B**). Este proceso cromatográfico se resume en las Tablas 2 y 3, de estas dos fracciones primarias se obtuvieron un total de total de 44 y 74 fracciones de 50 mL, respectivamente. Estas fracciones fueron concentradas y agrupadas utilizando una estrategia similar a la descrita previamente. El proceso descrito permitió la obtención de 13 y 10 fracciones combinadas. Las fracciones resultantes fueron renombradas como FQ-1 a FQ-10 y FU-1 FU-14 (**Tabla 4**).

Tabla 2 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FP-Q.

FRACCION	DISOLVENTE	PROPORCION
1-5	HEXANO	100
6-21	HEXANO-AcOEt-CHCl ₃	70:15:15
22-44	HEXANO-AcOEt-CHCl ₃ - MeOH	70:15:15:2.5

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FP-U.

FRACCION	DISOLVENTE	PROPORCION
1-9	HEXANO-CH ₂ Cl ₂	70:15
10-15	HEXANO-CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	70:15:5
16-26	HEXANO-CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	70:15:15
27-72	HEXANO-CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	70:15:20
73-74	ACETONA	100

Tabla 4. Agrupación de las fracciones FP-Q y FP-U.

FRACCIÓN	FRACCION REAGRUPADA FP-Q	FRACCIÓN	FRACCION REAGRUPADA FP-U
1-4	FQ-1	1-8	FU-1'(FU-1+2)
5-9	FQ-2	9-18	FU-3
10-11	FQ-3	19-21	FU-4
12-13	FQ-4	22-31	FU-5'(FU-5+6)
14-17	FQ-5	32-35	FU-7
18-19	FQ-6	36-43	FU-8
20-25	FQ-7	44-48	FU-10
26-29	FQ-8	49-60	FU-11
30-32	FQ-9	61-73	FU-13
33-36	FQ-10	74	FU-14
37-40	FQ-11		
41-43	FQ-12		
44	FQ-13		



A)



B)

Figura 13. A) Cromatografía en columna líquida al vacío del extracto con EtOH. B) Cromatografía en columna abierta de los extractos FP-Q y FP-U.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Obtención del extracto.

El proceso de extracción de los frutos de *A. pungens* utilizando la técnica de maceración con etanol por un período de 9 semanas resultó en la obtención de 161.1 g de un sólido de apariencia cerosa de color amarillo (**Figura14**).



Figura 14. Extracto seco obtenido de *A. pungens*.

6.2 Obtención y rendimiento de las fracciones.

A partir de las fracciones FP-V, FP-W, FQ-7, FU-8 y FU-11 (**Figura 15**) precipitó espontáneamente un sólido de color blanco. Estas fracciones al ser analizadas por TLC denotaban la presencia de compuestos de interés. En las Tablas 5 y 6 se indica el peso total y sus rendimientos de los sólidos en las fracciones. En la fracción FP-Ñ se obtuvo un aceite de color naranja translucido (**Figura 16**).



Figura 15. Fracciones FP-V, FP-W, FU-7, FU-8 y FU- 11 precipitadas.



Figura 16. Fracción FP-Ñ.

Tabla 5. Peso total de las fracciones del extracto de *A. pungens*.

FRACCIÓN	PESO (mg)
FP-A	218.8
FP-B	21.1
FP-D'	3.9
FP-F	979.9
FP-G	46.5
FP-H'	139.9
FP-K	19.2
FP-L	82.5
FP-M	85.6
FP-N	29.8
FP-Ñ	3102.6
FP-O'	2386.9
FP-Q'	976.1
FP-S	559.0
FP-T	1651.4
FP-U	1721.7
FP-V	21563.9
FP-W	2315.3
FP- W'	369.9
FP-X	336.0
FP-Y	68.4
FP-Z	14975.7
Rendimiento total	73.8 %

Tabla 6. Peso total de las fracciones FQ y FU.

FRACCIÓN	PESO (mg)	FRACCIÓN	PESO (mg)
FQ-1	11.6	FU-1'	4.9
FQ-2	1.2	FU-3	1.6
FQ-3	34.2	FU-4	5.9
FQ-4	36	FU-5'	1
FQ-5	7.8	FU-7	31.3
FQ-6	5	FU-8	361.7
FQ-7	165.4	FU-10	104.3
FQ-8	20	FU-11	98.7
FQ-9	5	FU-13	146.7
FQ-10	5.7	FU-14	147.2
FQ-11	15	Rendimiento total	52.5 %
FQ-12	52.2		
FQ-13	260.3		
Rendimiento total	63.5 %		

6.3 Caracterización estructural de los compuestos aislados.

6.3.1 Ácido oleanólico (APC001).

El compuesto AO el cual fue etiquetado como **APC001 para su estudio**, se aisló como un sólido de color blanco ligeramente soluble en MeOH en caliente. Los espectros de RMN-¹H (**Figura 17**) y RMN ¹³C (**Figura 18**) mostraron el perfil típico para un triterpenoide. A continuación, se describen las señales más relevantes encontradas en los espectros de RMN:

1. En el espectro de RMN-¹H, en δ_H 5.53 se observó un triplete con una constante de acoplamiento de 4.0 Hz asignable a un metino olefínico H-12.
2. En δ_H 3.48 se observó un multiplete que integró para un protón, asignable a un metino oxigenado H-3.

3. En δ_H 3.34 se observó un doble de dobles ($J= 4.0$) que integró para un protón, asignable al metino H-18.

4. En δ_H 1.32 (H-27), δ_H 1.27 (H-23), 1.06 (H-26), 1.05 (H-24), 1.04 (H-25), 0.99 (H-29), 0.92 (H-30) se observaron siete señales asignables a siete metilos alifáticos.

La estructura del ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico para el AO (**APC001**) se confirmó utilizando los espectros COSY, HMBC y HMQC (Anexo Figuras 1a, 1b y 1c) y por comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Seebacher et al., 2003).

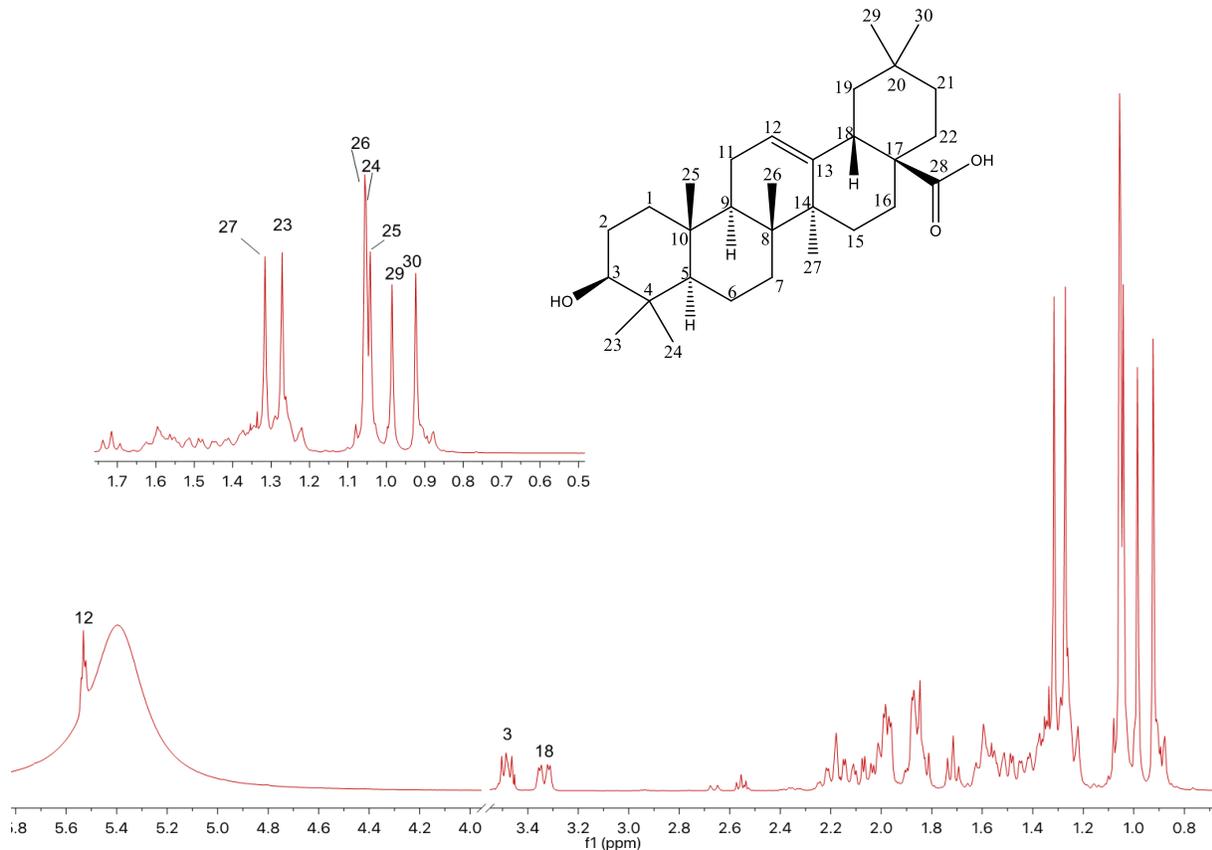


Figura 17. Espectro de RMN- 1H del ácido oleanólico.

El espectro de RMN- ^{13}C , (**Figura 18**), mostró la presencia de 30 señales y es consistente con un compuesto de naturaleza triterpénica. Las señales más relevantes corresponden a un grupo carbonilo

de ácido en δ_c 180.6 (C-28) un carbono cuaternario olefínico en δ_c 145.1 (C-13), un metino olefínico en δ_c 122.8 (C-12), un metino oxigenado en δ_c 78.4 (C-3), y siete metilos (δ_c 15.7, 16.8, 17.7, 26.4, 29.1, 33.5). Estas señales son congruentes con la presencia del ácido oleanólico (Seebacher et al., 2003).

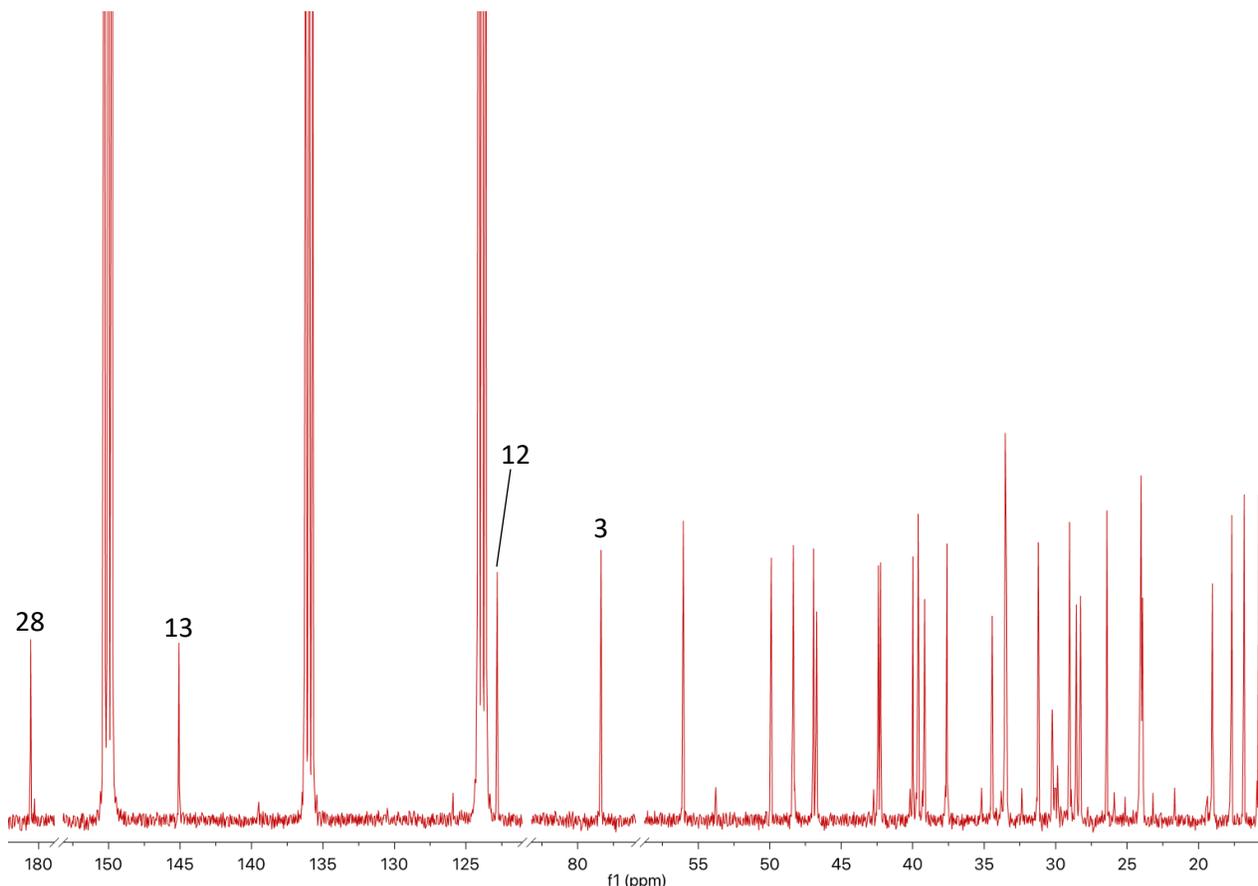


Figura 18. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido oleanólico.

Con base en las evidencias descritas se concluyó que el compuesto **APCOO1** es un triterpenoide pentacíclico de tipo oleanano y se identificó como ácido oleanólico a partir de la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura (Seebacher et al., 2003). **RMN- ^1H** (400 MHz, piridina- d_5): δ_H 5.53 (1H, s, H-12), 3.48 (1H, dd, $J= 4.0, 10.0$ Hz, H-3), 3.33 (1H, dd, $J= 4.6, 14.0$ Hz, H-18), 1.32 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-24), 1.05 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-25). **RMN- ^{13}C** (100 MHz, piridina- d_5): δ_c 180.6 (C-28), 145.1 (C-13), 122.9 (C-12), 78.4 (C-3), 56.1 (C-5), 49.9 (C-9), 48.4 (C-17), 47.0 (C-19), 42.4 (C-

14), 42.3 (C-18), 40.0 (C-8), 39.7 (C-4), 39.2 (C-1), 37.7 (C-10), 34.5 (C-21), 33.6 (C-7), 33.6 (C-29), 33.5 (C-22), 31.3 (C-20), 29.1 (C-23), 28.6 (C-15), 28.3 (C-2), 26.5 (C-27), 24.1 (C-11), 24.1 (C-16), 24.1 (C-30), 19.1 (C-6), 17.7 (C-26), 16.9 (C-24), 15.8 (C-25). Por último, es importante mencionar que se observaron señales congruentes con la presencia del ácido ursólico como un segundo compuesto (proporción). Para verificar la identidad de este compuesto se compararon los espectros de RMN con los de una muestra auténtica aislada en el grupo de investigación a partir de las hojas de la pingüica (**Figuras 19 y 20**). Las constantes espectroscópicas fueron idénticas a las descritas por Seebacher y colaboradores (2003).

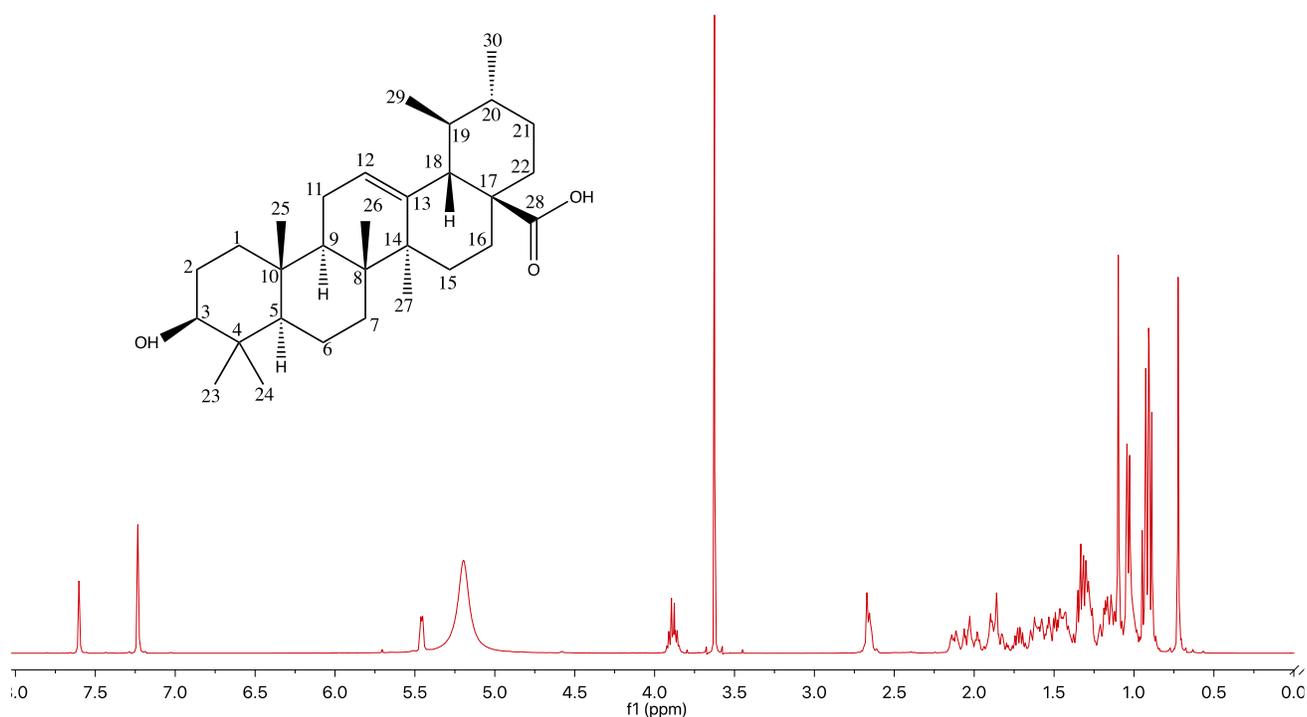


Figura 19. Espectro de RMN-¹H del ácido ursólico.

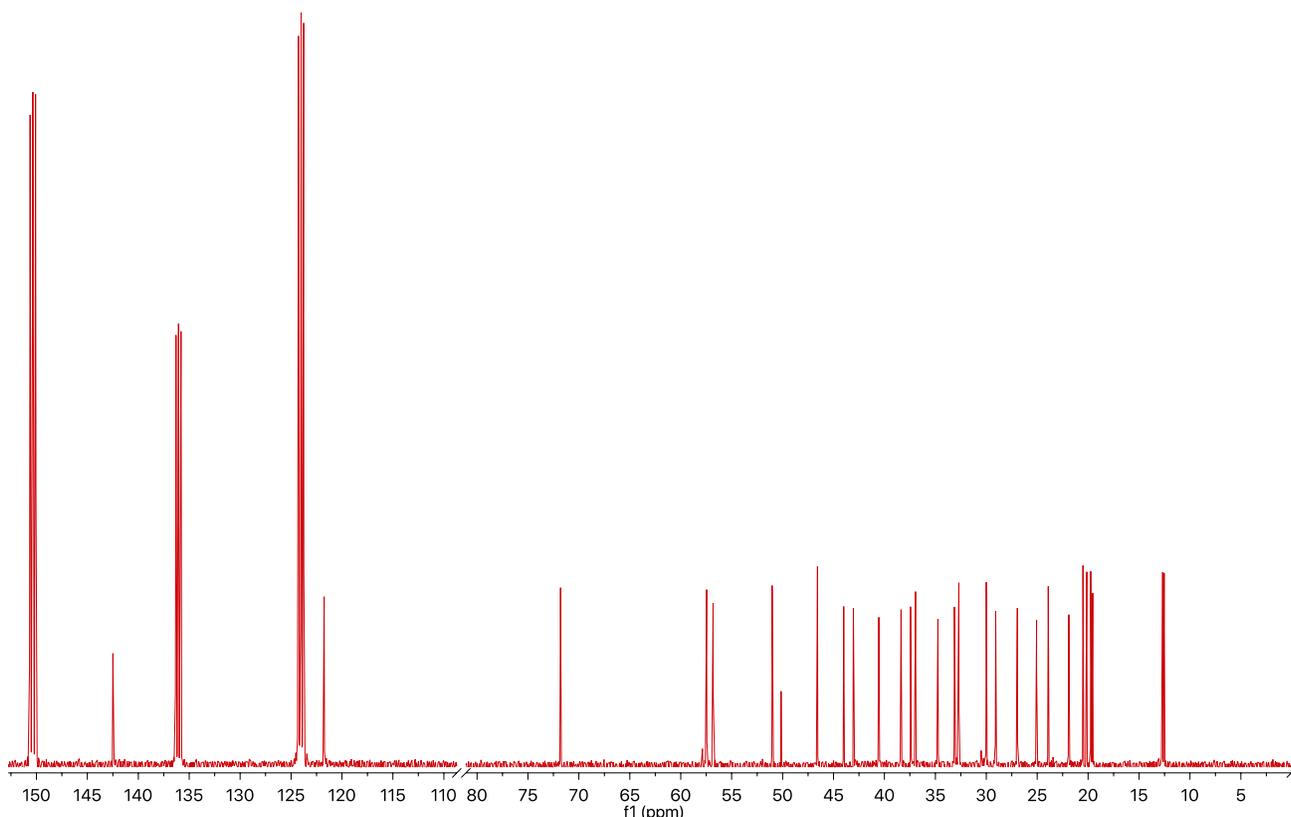


Figura 20. Espectro de RMN-¹³C del ácido ursólico.

6.3.2 Ácido maslínico (APC002).

El espectro de RMN-¹H de **APC002** fue muy similar a los espectros obtenidos para el ácido oleanólico (**1**). En δ_H 5.49 se observó una señal ancha correspondiente al protón olefínico H-12; en δ_H 3.42 se localizó un doblete que integra para el protón H-3; en δ_H 3.32 se situó un doble de doble ($J= 4.12$), integra para un protón y se atribuyó al protón alílico H-18; así mismo, se observaron siete singuletes asignables a los metilos cuaternarios (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29 y H-30). La principal diferencia encontrada fue la presencia de un doble de doble de dobles que integró para un protón en δ_H 4.11 ($J= 4.0, 8.0, 12.0$ Hz, H-2) (**Figura 21**). RMN-¹H (400 MHz, piridina-*d*₅): δ_H 5.49 (1H, *t*, $J= 3.4$ Hz, H-12), 4.11 (1H, *ddd*, $J= 4.0, 8.0, 12.0$ Hz, H-2), 3.42 (1H, *d*, $J= 8.0$, Hz, H-3), 3.32 (1H, *dd*, $J= 4.0, 14.0$ Hz, H-18), 1.29 (3H, *s*, H-23), 1.29 (3H, *s*, H-27), 1.10 (3H, *s*, H-24), 1.04 (3H, *s*, H-30), 1.02 (3H, *s*, H-25), 1.01 (3H, *s*, H-26), 0.97 (3H, *s*, H-29). El espectro de RMN-¹³C fue de nueva cuenta similar al del ácido oleanólico (**APC001**), excepto por ausencia del metileno C-2 (δ_C 28.2) y la aparición la señal

correspondiente a un metino base de oxígeno en δ_c 68.8 asignable C-2 (**Figura 22**). **RMN- ^{13}C** (100 MHz, piridina- d_5): δ_c 180.4 (C-28), 145.1 (C-13), 122.7 (C-12), 84.0 (C-3), 68.8 (C-2), 56.1 (C-5), 48.4 (C-9), 48.0 (C-1), 46.9 (C-17), 46.6 (C-19), 42.4 (C-14), 42.2 (C-18), 40.0 (C-4), 38.7 (C-10), 34.4 (C-21), 33.5 (C-22,C-29), 33.4 (C-7), 31.2 (C-20), 29.6 (C-23), 28.5 (C-15), 26.4 (C-27), 24.1 (C-11), 24.0 (C-30), 23.9 (C-16), 19.1 (C-6), 17.9 (C-26), 17.7 (C-25), 17.1 (C-24). La estructura del ácido $2\alpha,3\beta$ -2,3-dihidroolean-12-en-28-oico o ácido maslínico (**APC002**) se confirmó utilizando los espectros COSY, HMBC y HMQC (Anexo Figuras 2a, 2b y 2c) y por comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Woo et al., 2014).

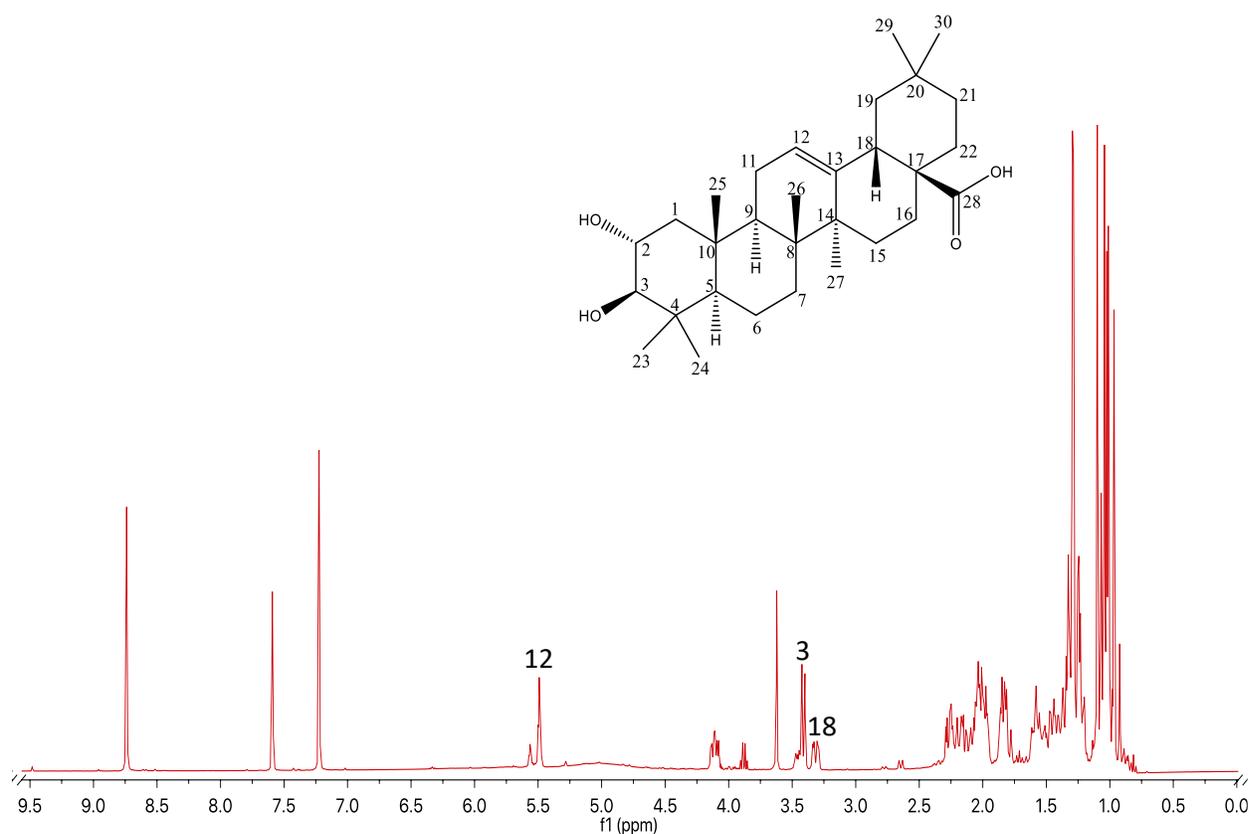


Figura 21. Espectro de RMN- 1H del ácido maslínico.

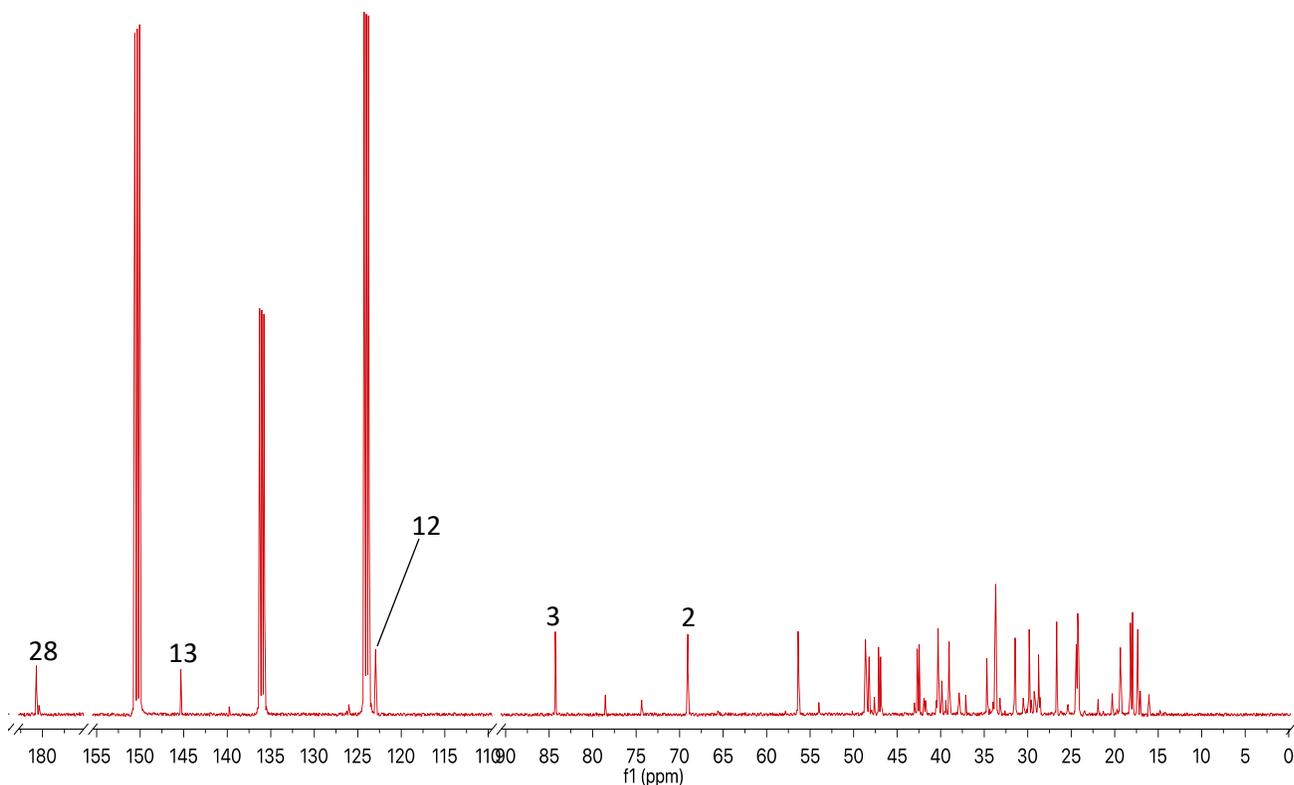


Figura 22. Espectro de RMN-¹³C del ácido maslínico.

6.3.3 Uvaol (APC003).

El espectro de RMN-¹H de **APC003** fue similar a los espectros obtenidos para el ácido oleanólico (**APC001**), la principal diferencia en el espectro fue la presencia de dos dobletes en δ_H 3.90 y 3.49 asignables a los protones del metileno H-28. **RMN-¹H** (400 MHz, piridina-*d*₅): δ_H 5.24 (1H, *t*, *J*= 3.5 Hz, H-12), 3.90 (1H, *d*, *J*= 8.0 Hz, H-28a), 3.49 (1H, *d*, *J*= 8.0 Hz, H-28b), 3.48 (1H, *m*, H-3), 1.26 (3H, *s*, H-23), 1.23 (3H, *s*, H-27), 1.06 (3H, *s*, H-24), 1.04 (3H, *s*, H-30), 0.98 (3H, *s*, H-25), 0.98 (3H, *s*, H-26), 0.95 (3H, *s*, H-29) (**Figura 23**). El espectro de RMN-¹³C fue similar al del ácido oleanólico (**APC001**), excepto por la presencia del metileno C-28 (δ_C 68.93) y la ausencia de la señal para el carbonilo de ácido (**Figura 24**). **RMN-¹³C** (400 MHz, piridina-*d*₅): δ_C 139.42 (C-13), 124.81 (C-12), 77.88 (C-3), 68.9 (C-28), 55.1 (C-5), 47.9 (C-9), 39.0 (C-1), 38.5 (C-17), 39.56 (C-19), 42.2 (C-14), 54.4 (C-18), 39.17 (C-4), 36.92 (C-10), 31.0 (C-21), 36.9 (C-22), 17.57 (C-29), 33.05 (C-7), 39.64 (C-20), 28.56 (C-23), 26.31 (C-15), 23.38 (C-27), 23.45 (C-11), 21.40 (C-30), 23.45 (C-16), 18.53 (C-6), 16.76 (C-26), 15.69 (C-25), 16.34 (C-24)

(Figura 24) . La identidad del compuesto **APC003** se confirmó por comparación directa de los datos de RMN y cromatográficos de una referencia comercial de uvaol.

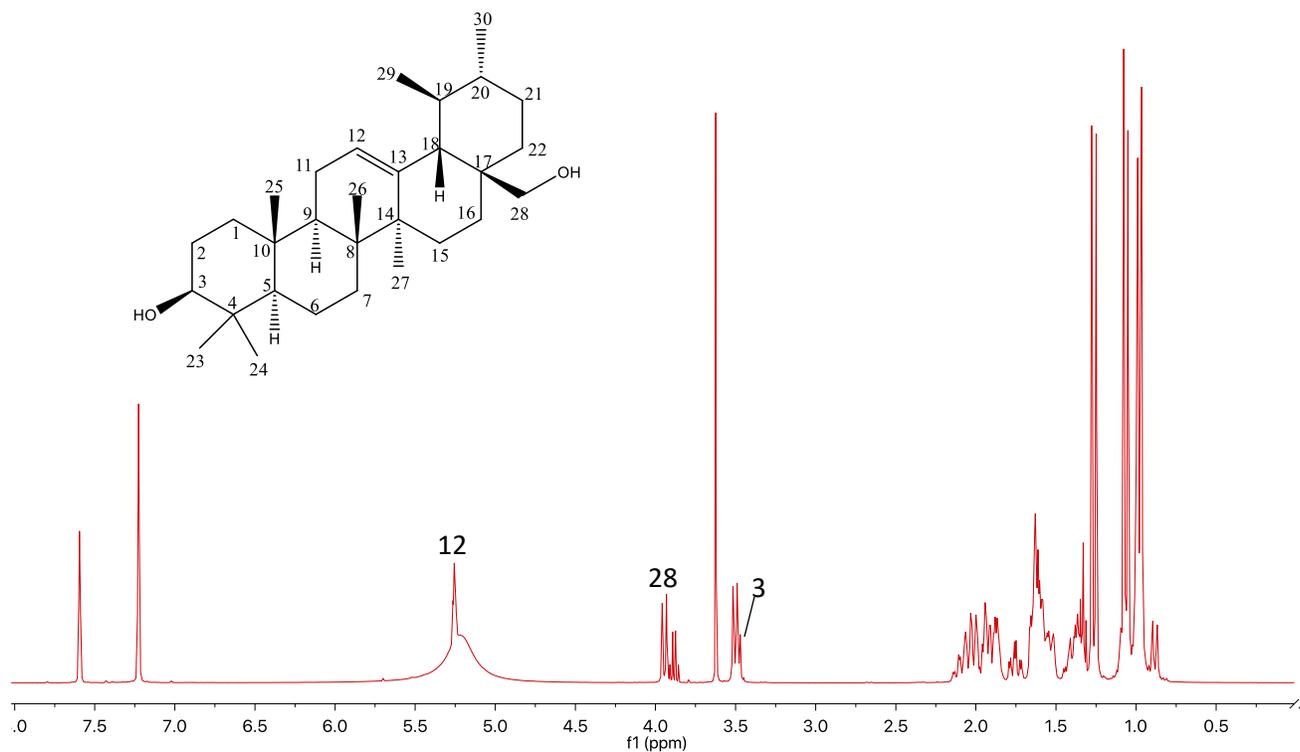


Figura 23. Espectro de RMN-¹H del uvaol.

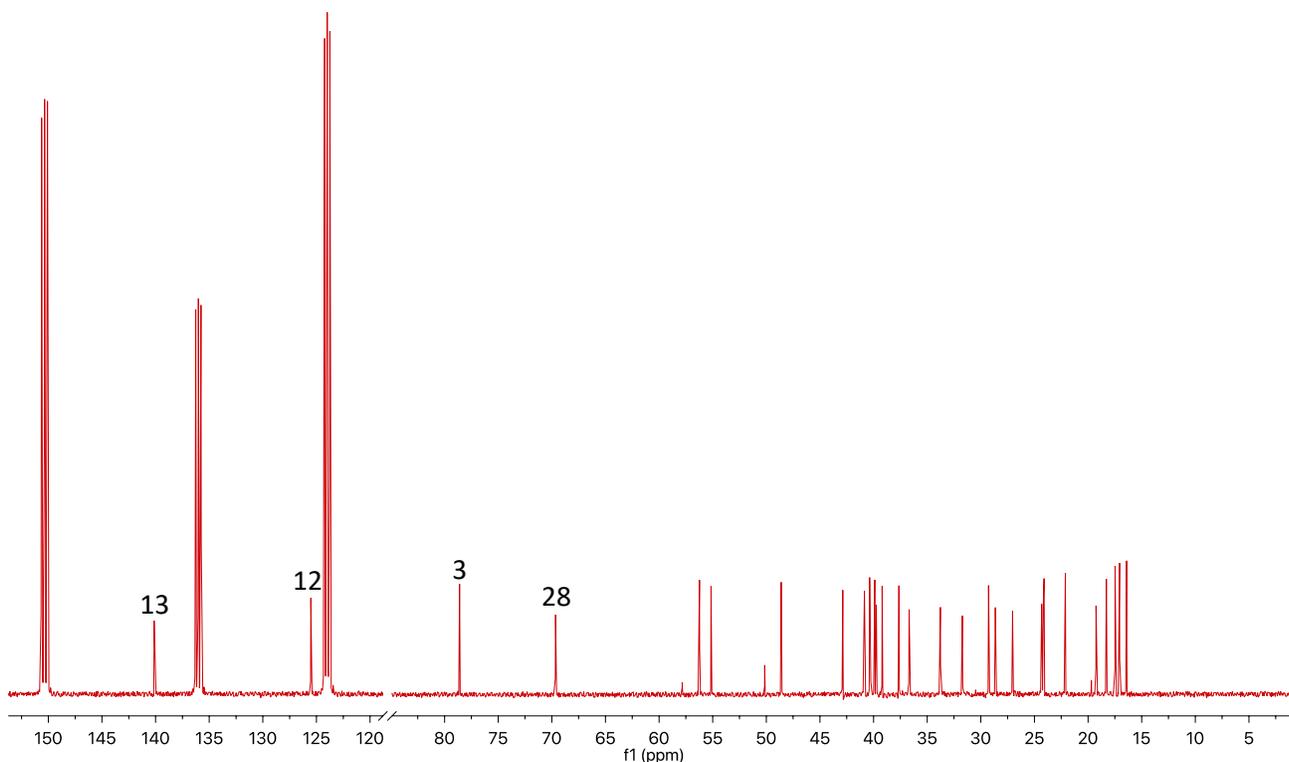


Figura 24. Espectro de RMN-¹³C del uvaol.

6.3.4 1,3-Dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol (APC004).

El compuesto **APC004** se aisló como un aceite de color amarillo soluble en hexano y diclorometano. La comparación cuidadosa de los espectros de RMN-¹H (**Figura 25**) y RMN-¹³C (**Figura 26**) revelaron la presencia de un triglicérido con dos ácidos oleicos unidos a las posiciones C-1 y C-3 y un linoleico unido en la posición C-2 (Chandra y Nair., 1993; Zhao et al., 2013; Vlahov et al., 2002).

En δ_H 5.26 (1H, m, H-2), 4.24 (2H, dd, H-3a y H-3b) y 4.10 (2H, dd, H-1a y H-1b) las señales características para el glicerol. Estas correlacionaron en el espectro de HSQC con las señales en δ_C 68.94 y 62.13, fueron asignadas a los carbonos C-2, C-1 y C-3, respectivamente. Estas evidencias sugirieron la presencia de un glicerol trisustituido (Chandra y Nair., 1993). Otras características importantes fueron la presencia de ocho carbonos olefínicos en δ_H 5.36 - 5.25 (8H, m, H-9, H-10' × 2, H-9'', H-10'', H-12'' y H-13'') y las señales para tres grupos metileno unidos a los carbonos del carbonilo del éster en 2.26 (6H, t, $J= 7.5$, H-2' × 2, H-2'') y en δ_C 34.1 [(C-2') × 2] y 34.2 [(C-1') × 2],

respectivamente. Las evidencias presentadas anteriormente soportan la conclusión que en los carbonos C-1 y C-3 se encontraban unidos dos ácidos oleicos y en el C-2 un ácido linoleico. Basados en la comparación de estos datos con los reportados previamente en la literatura por Chandra y Nair (1993), el compuesto **APC004** fue identificado como 1,3-di[(*cis*)-9-octadecenoil]-2-[(*cis, cis*)-9, 12-octadecadienoil]glicerol o 1,3-dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol. **RMN-¹H** (400 MHz, CDCl₃): En δ_H 5.36 - 5.25 (8H, m, H-9, H-10' × 2, H-9'', H-10'', H-12'' y H-13''), 5.26 (1H, m, H-2), 4.24 (2H, dd, H-3a y H-3b), 4.10 (2H, dd, H-1a y H-1b), 2.75 (2H, dd, H-11''), 2.26 (6H, t, *J* = 7.5, H-2' × 2, H-2''), 2.02 (12H, m, H-8', H-11' × 2, H-8'', H-14''), 1.55 (6H, m, H-3' × 2, H-3''), 1.20 (54H, m, H-12'-17' × 2, H-4'-7' × 2, H-4''-7'', H-15''-17'') y 0.85 (9H, t, *J* = 6.5, H-18'-18''). **RMN-¹³C** (400 MHz, CDCl₃): δ_C 14.1 [C-18''], 14.12 [C-18' × 2], 22.58, 22.69, 29.71-31.44, 31.92, 31.94 [C-4'-7', (12'-17') × 2, 4''-7'', 15''-17''], 25.23, 25.54, 25.64 [(C-3') × 2, 3''], 26.17 [C-11''], 27.18, 27.21, 27.23 [(C-8', 11') × 2, 8'', 14''], 34.1 [C-(2') × 2], 34.2 [C-(1') × 2], 62.13 [C-1, 3], 68.94 [C-2], 129.68, 129.7, 131.91 [C-9'', 10'', 12'', 13''], 130.0, 130.18 [C-(9',10') × 2], 172.86 [C-2''], 173.3 [C-1'' y C-3'']. La estructura del 1,3-dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol (**APC004**) se confirmó comparando estos datos con los reportados en la literatura (Chandra y Nair., 1993).

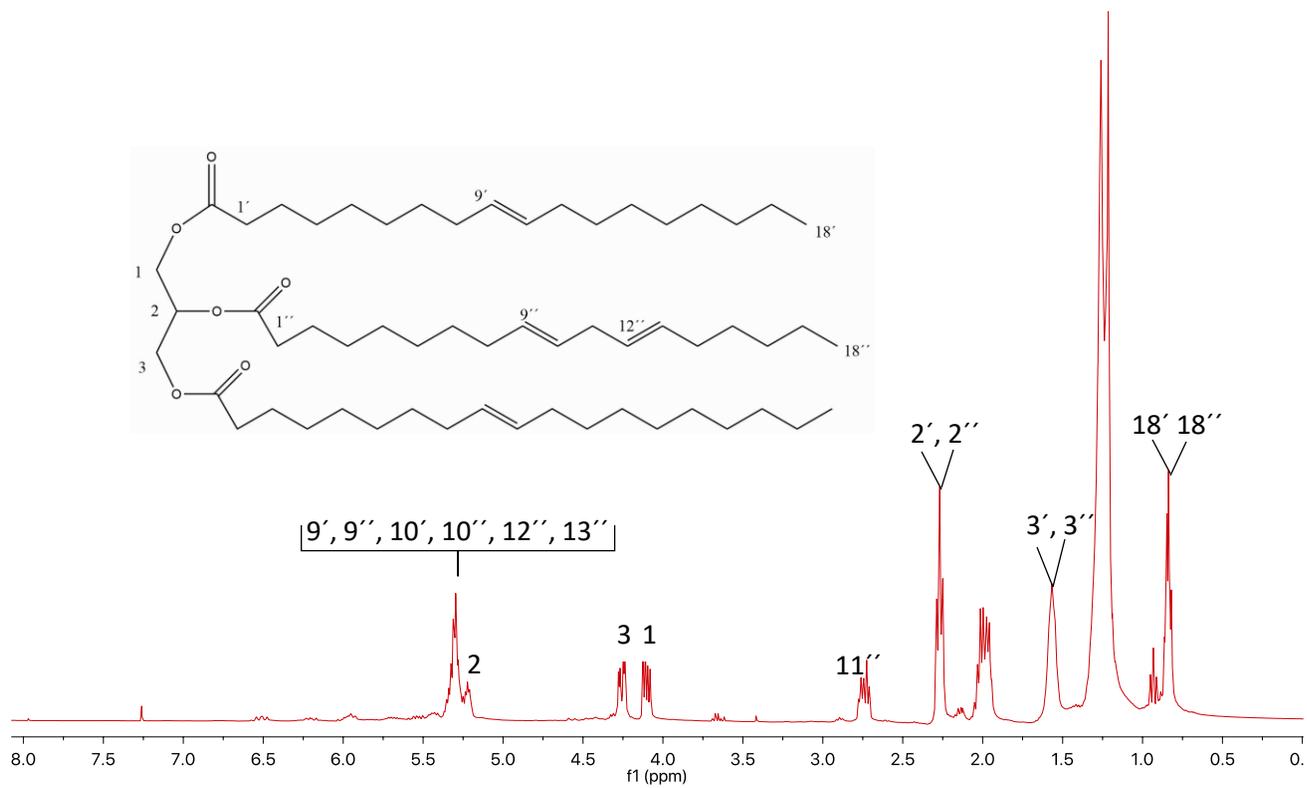


Figura 25. Espectro de RMN-¹H del 1,3-dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol.

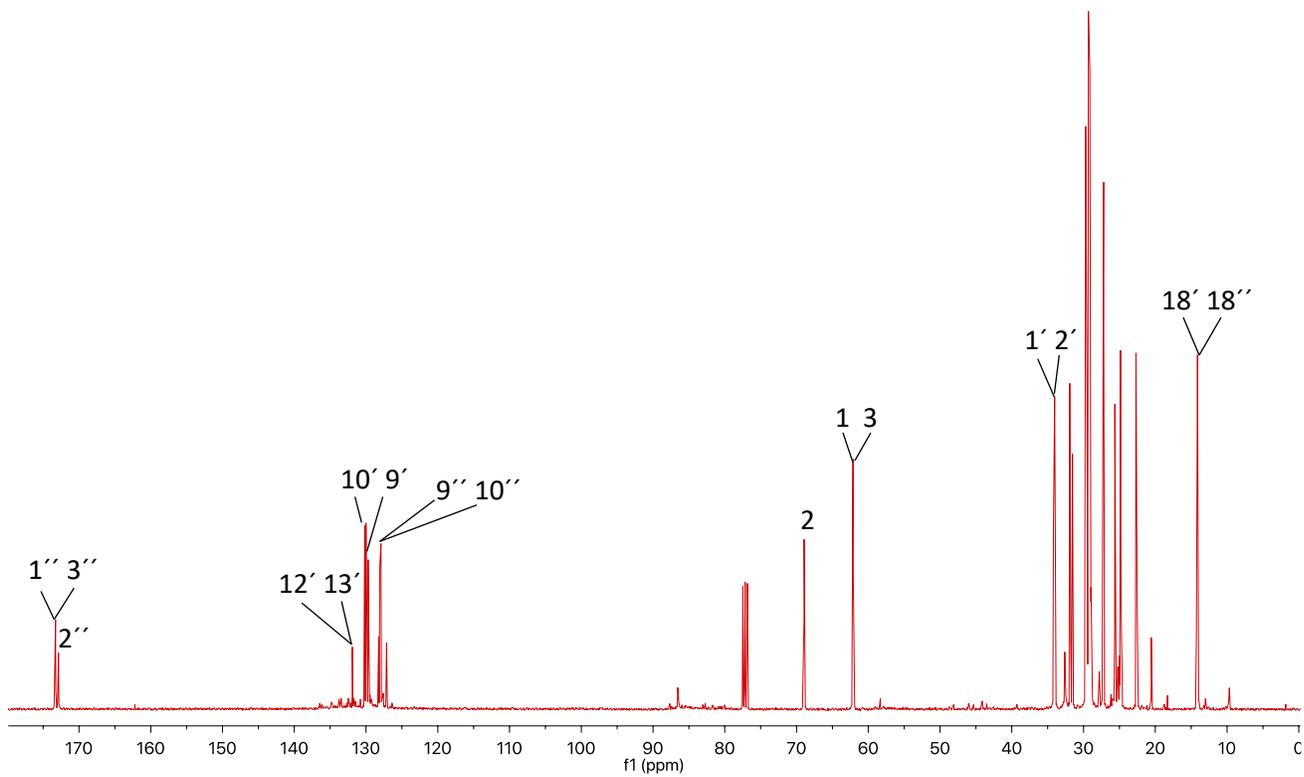


Figura 26. Espectro de RMN-¹³C del 1,3-dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol.

7 CONCLUSION

El estudio químico de los frutos de *Arctostaphylos pungens*, contribuye al conocimiento referente a su contenido metabólico, mediante el aislamiento y caracterización de cuatro compuestos: los ácidos oleanólico (**APC001**) y maslínico (**APC002**), el uvaol (**APC003**) y el 1,3-dioleoil-2-linoleoil-rac-glicerol (**APC004**) y la detección del ácido ursólico (**APC005**). El uvaol (**APC003**) y el ácido ursólico (**APC005**), aislados de este estudio han sido reportados previamente en las hojas de *Arctostaphylos pungens* por Domínguez y colaboradores. (1983).

8. PERSPECTIVAS.

Continuar con el aislamiento y la caracterización de los compuestos minoritarios contenidos en el extracto.

Evaluar la actividad de los compuestos aislados sobre la enzima proteína fosfatasa de tirosina (PTP1B).

.

9. LITERATURA CITADA.

Abrahamson W. G. (1989). Plant-animal interactions. USA. Ed. McGraw-Hill.

Agra, L. C., Lins, M. P., da Silva Marques, P., Smaniotto, S., Bandeira de Melo, C., Lagente, V., and Barreto, E. (2016). Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *European Journal of Pharmacology*. 780. Pp.232-242.

Amelio, M., R. Rizzo and F. Varazini (1992). "Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques." *Journal of Chromatography A*. 606(2). pp. 179-185.

Anaya, A., Espinosa, J., Cruz O. R. (2001). *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. 1ª ed. México. Ed. Plaza y Valdés S.A de C.V. pp. 165-166.

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (APMTM).(2009).BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana,Mexico, Universidad nacional autonoma de Mexico

Disponible en:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ping%C3%BCica&id=7917>.

Fecha de consulta: 30/11/2018, 5:34:32 p.m

Bianchi, G., Vlahow G. and Pozzi N (1994). The lipids of *Olea europea*: pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry*. 37(1), pp.205-207.

Castillo G. y Martínez S. (2007). *Manual de Fitoterapia*. Barcelona España. Ed. Elsevier massen. pp.25,34.

Chandra A. and Nair M. G. (1993). Characterization of pit oil from Montmorency cherry (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.41(6). pp.879-881.

Chen, J., J. Liu, L. Zhang, G. Wu, W. Hua, X. Wu, and H. Sun. (2006). Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(11). pp.2915-9.

- Choi, J. K., H.-M. Oh, S. Lee, J.-W. Park, D. Khang, S. W. Lee, W. S. Lee, M.-C. Rho and S.-H. Kim (2013). Oleanolic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 269. pp.72–80.
- Croteau R., Kutchan, T.M. and Lewis N.G. (2000) *Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* 24. pp.1250-1319.
- da Silva Ferreira D., Esperandim V. R., Toldo M. P., Kuehn C. C., do Prado Júnior J. C., Cunha W. R., Andrade e Silva M. L., de Albuquerque S. (2013). *In vivo* activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 134(4). pp.455–459.
- Domínguez, X. A., Franco, R., Cano, G., García, S., López Dellamar, F., & López, L. (1983). Plantas medicinales de México, parte XLVII terpenoides del fruto y hojas de la "pingüica" *Arctostaphylos pungens* H.B.K. *Revista Latinoamericana Química*, 37-39.
- Fahy E., S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum and E. A. Dennis (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46(5). pp.839-861.
- Fernandes, J., R. O. Castilho, M. R. da Costa, K. Wagner-Souza, M. A. Coelho Kaplan and C. R. Gattass (2003). "Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines." *Cancer Letters* 190(2). pp.165-169.
- Gupta, M. B., R. Nath, G. P. Gupta and K. P. Bhargava (1981). Antiulcer activity of some plant triterpenoids. *Indian J Med Res.* 73. pp.649-652.
- Harborne, J. B. (1997). Recent advances in chemical ecology. *Natural Product Reports.* 14(2). pp83-98.
- Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1276374>
Fecha de actualización: 27/11/2013, 11:48:27 a.m.
Fecha de consulta: 26/04/2019, 1:57:27 p.m
- Hou, W., Y. Li, Q. Zhang, X. Wei, A. Peng, L. Chen and Y. Wei (2009). Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. *Phytother Res.* 23(5). pp.614-618.

- Joy Hoskeri, H., V. Krishna, B. Vinay Kumar, A. H. Shridar, K. Ramesh Babu and M. S. Sudarshana (2012). "In vivo prophylactic effects of oleanolic acid isolated from chloroform extract of *Flaveria trinervia* against ethanol induced liver toxicity in rats." *Arch Pharm Res.* 35(10). pp. 1803-1810.
- Kemboi, D., J. Kiplimo and K. Denis (2016). "Phytochemistry and antibacterial activity of extracts from medicinal plant *Olea africana*." *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 10. pp. 330-336.
- Kong, L., S. Li, Q. Liao, Y. Zhang, R. Sun, X. Zhu, Q. Zhang, J. Wang, X. Wu, X. Fang and Y. Zhu (2013). "Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity." *Antiviral Res.* 98(1). pp. 44-53.
- Lee, H.-Y., H.-Y. Chung, K.-H. Kim, J.-J. Lee and K.-W. Kim (1994). "Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 120(9). pp. 513-518.
- Li, J., W. J. Guo and Q. Y. Yang (2002). "Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15." *World J Gastroenterol.* 8(3). pp. 493-495.
- Liu, J., Q. Wu, Y.-F. Lu and J. Pi (2008). "New insights into generalized hepatoprotective effects of oleanolic acid: Key roles of metallothionein and Nrf2 induction." *Biochemical Pharmacology.* 76(7). pp. 922-928.
- Liu, J., Y. Liu and C. D. Klaassen (1994). "The effect of Chinese hepatoprotective medicines on experimental liver injury in mice." *J Ethnopharmacol.* 42(3). pp. 183-191.
- Liu, Q., Siloto, R.M., Lehner, R., Stone, S.J., & Weselake, R.J. (2012). *Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology.* *Progress in lipid research.* 51 (4). pp.350-77.
- Lok, C. M., J. P. Ward and D. A. van Dorp (1976). The synthesis of chiral glycerides starting from D- and L-serine. *Chem Phys Lipids.* 16(2). pp.115-122.
- Ludeña, M. (2018). "Método preparativo para la obtención de ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*." *Revista Colombiana de Química.* 47. pp. 10-15.
- Marcano D. y Hasegawa M. (2002). *Fitoquímica orgánica.* 2ª ed. Venezuela. Ed. Torino. pp.29-30.

- Marquez Martin, A., R. de la Puerta Vazquez, A. Fernandez-Arche and V. Ruiz-Gutierrez (2006). "Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages." *Free Radic Res.* 40(3). pp. 295-302.
- Marquina, S., N. Maldonado, M. L. Garduno-Ramirez, E. Aranda, M. L. Villarreal, V. Navarro, R. Bye, G. Delgado and L. Alvarez (2001). "Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*." *Phytochemistry.* 56(1). pp. 93-97.
- Martins, A., A. Vasas, M. Viveiros, J. Molnar, J. Hohmann and L. Amaral (2011). "Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*." *Int J Antimicrob Agents.* 37(5). pp. 438-444.
- Montilla M.P., Agil A, Navarro M.C., Jiménez M.I., García-Granados A., Parra A., Cabo M.M (2003). Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 69(5). pp. 472-474.
- Morocho, V., A. Valle, J. Garcia, G. Gilardoni, L. Cartuche and A. I. Suarez (2018). "alpha-Glucosidase Inhibition and Antibacterial Activity of Secondary Metabolites from the Ecuadorian Species *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts." *Molecules.* 23(1).
- Nelson D. L. and Cox M. M. (2012). *Lehninger, Principles of Biochemistry.* 6th ed. W.H. Freeman and Company. pp. 345-346.
- Nudelman, N. (2004). *Química Sustentable.* Argentina. Ed. UNL pp.15.
- Oldfield, E. and F. Y. Lin (2012). "Terpene biosynthesis: modularity rules." *Angew Chem Int Ed Engl.* 51(5). pp. 1124-1137.
- Organización Mundial de la Salud (2013), *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023.* Organización mundial de la salud. Ginebra. Pag 16-17.
- Pastorello, M., C. Ciangherotti, T. Colman, Á. Amesty, D. Buitrago and Y. Anita (2007). "ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL ÁCIDO 3-EPI-URSÓLICO Y DOCKING A LA FOSFOLIPASA A Actividad antiinflamatoria del ácido 3-epi-ursólico y docking a la fosfolipasa A 2 Anti-inflammatory Activity of 3-epi-Ursolic Acid and Docking to PLA 2." *Revista Facultad de Farmacia.* 70. pp. 47-52.
- Piñol M. y Palazón J. (1993). *Metabolismo secundario. En: Fisiología vegetal y bioquímica vegetal.* España. Ed. Interamericana Mc Graw Hill.

- Pollier J. and A. Goossens (2012). Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 77. pp. 10-15.
- Qin Liu, Rodrigo M.P. Siloto, Richard Lehner, Scot J. Stone, Randall J. Weselake (2012). Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Progress in Lipid Research*. 51. pp.350-377.
- Sánchez R. E. y Mesa D. M. (2018). Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina*. Vol. XII - Número 2. pp. 80-94.
- Sanchez-Gonzalez, M., G. Lozano-Mena, M. E. Juan, A. Garcia-Granados and J. M. Planas (2013). "Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L." *Mol Nutr Food Res*. 57(2). pp.339-346.
- Seebacher, W., N. Simic, R. Weis, R. Saf and O. Kunert (2003). "Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives." *Magnetic Resonance in Chemistry*. 41(8). pp. 636-638.
- Serra, C., G. Lampis, R. Pompei and M. Pinza (1994). "Antiviral activity of new triterpenic derivatives." *Pharmacological Research*. 29(4). pp. 359-366.
- Shanmugam, M. K., X. Dai, A. P. Kumar, B. K. Tan, G. Sethi and A. Bishayee (2014). "Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence." *Cancer Lett*. 346(2). pp. 206-216.
- Sohn, K. H., H. Y. Lee, H. Y. Chung, H. S. Young, S. Y. Yi and K. W. Kim (1995). "Anti-angiogenic activity of triterpene acids." *Cancer Lett*. 94(2). pp. 213-218.
- Somova, L. I., F. O. Shode and M. Mipando (2004). "Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol." *Phytomedicine*. 11(2). pp. 121-129.
- Somova, L. O., A. Nadar, P. Rammanan and F. O. Shode (2003). "Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension." *Phytomedicine*. 10(2-3). pp. 115-121.
- Taiz L. y Zeiger E. (2006). *Fisiología Vegetal I*. 3^a ed. Publicaciones de la Universidad Jaume I. pp. 529,533-534,536.
- Taniguchi, S., Y. Imayoshi, E. Kobayashi, Y. Takamatsu, H. Ito, T. Hatano, H. Sakagami, H. Tokuda, H. Nishino, D. Sugita, S. Shimura and T. Yoshida (2002). "Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli." *Phytochemistry*. 59(3). pp. 315-323.

- Tsai, S. J. and M. C. Yin (2012). "Anti-oxidative, anti-glycative and anti-apoptotic effects of oleanolic acid in brain of mice treated by D-galactose." *Eur J Pharmacol.* 689(1-3). pp.81-88.
- Ukiya, M., T. Akihisa, H. Tokuda, H. Suzuki, T. Mukainaka, E. Ichiishi, K. Yasukawa, Y. Kasahara and H. Nishino (2002). "Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers." *Cancer Lett.* 177(1). pp. 7-12.
- Vincken, J., Heng, L., Groot, A.D., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* 68 3. pp. 275-297.
- Vlahov, G., P. K. Chepkwony and P. K. Ndalut (2002). ¹³C NMR Characterization of Triacylglycerols of Moringa oleifera Seed Oil: An "Oleic-Vaccenic Acid" Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50(5). pp.970-975.
- Wang, X., R. Liu, W. Zhang, X. Zhang, N. Liao, Z. Wang, W. Li, X. Qin and C. Hai (2013). "Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects." *Mol Cell Endocrinol.* 376(1-2). pp. 70-80.
- Wang, Z. H., C. C. Hsu, C. N. Huang and M. C. Yin (2010). "Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice." *Eur J Pharmacol.* 628(1-3). pp. 255-260.
- Woo, K. W. , Han, J. Y. , Choi, S. U. , Kim, K. H. , & Lee, K. R. (2014). Triterpenes from *Perilla frutescens* var. *acuta* and Their Cytotoxic Activity. *Natural Product Sciences.* 20 (2). The Korean Society of Pharmacognosy. pp. 71-75.
- Zhang LR, Ma TX (1995). *Antagonistic effect of oleanolic acid on anaphylactic shock.*, *Zhongguo Yao Li Xue Bao.*, 16(6). pp. 527-530.
- Zhang, H., Y. Zhang, Y.-P. Jiang, L.-K. Zhang, C. Peng, K. He, K. Rahman and L.-P. Qin (2012). "Curative Effects of Oleanolic Acid on Formed Hypertrophic Scars in the Rabbit Ear Model J Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine." 2012 10.
- Zhao, Y., H. Wang, T. Liu and Z. Xin (2014). "The individual lipid compositions produced by *Cunninghamella* sp. *Salicorn* 5, an endophytic oleaginous fungus from *Salicornia bigelovii* Torr." *European Food Research and Technology.* 238(4). pp. 621-633.

Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., & Formelli, F. (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 175(1). pp. 17-2.

ANEXO.

Tabla7. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de los compuestos identificados.

C	AO	AM	UV
1	39.2	48.0	39.0
2	28.3	68.2	
3	78.4	84.0	77.9
4	39.7	40.0	39.2
5	56.1	56.1	
6	19.0	19.1	18.5
7	33.5	33.4	33.1
8	40.0		
9	48.4	48.4	47.9
10	37.6	38.7	36.9
11	24.0	24.1	23.5
12	122.8	122.7	124.8
13	145.1	145.1	139.4
14	42.4	42.4	42.2
15	28.6	28.5	26.3
16	24.1	23.9	23.5
17	47.7	46.9	38.5
18	42.2	42.2	54.4
19	46.9	46.6	39.6
20	31.2	31.2	39.7
21	34.4	34.4	31
22	33.5	33.5	36.9
23	29.0	29.6	28.6
24	16.9	17.1	16.3
25	15.8	17.7	15.7
26	17.7	17.9	16.8
27	26.5	26.4	23.4
28	180.6	180.4	68.9
29	33.6		17.6
30	24.1	24	21.4

Continuación Tabla7. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de los compuestos identificados.

TG					
C		C'		C''	
1	62.13	1	34.2	1	173.3
2	68.94	2	34.1	2	172.86
3	62.13	3	25.23	3	173.3
		4	22.58	4	22.69
		5		5	
		6		6	
		7		7	
		8	27.18	8	27.21
		9	130.0	9	129.68
		10	130.18	10	129.7
		11	27.18	11	26.17
		12		12	131.91
		13		13	131.91
		14		14	27.23
		15		15	
		16		16	
		17		17	
		18	14.2	18	14.1

Figura 1a. COSY del ácido oleanólico.

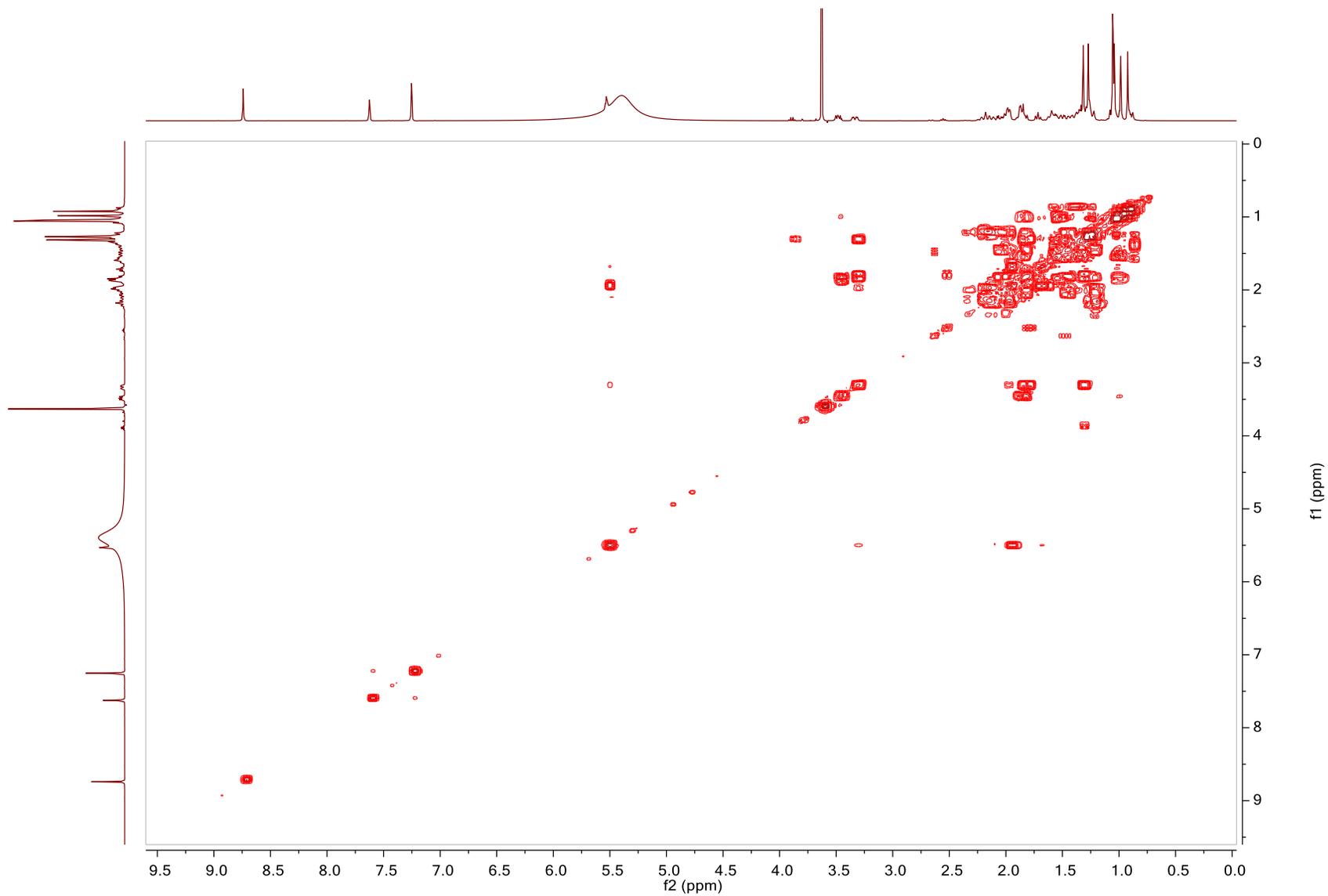


Figura 1b. HMBC del ácido oleanólico

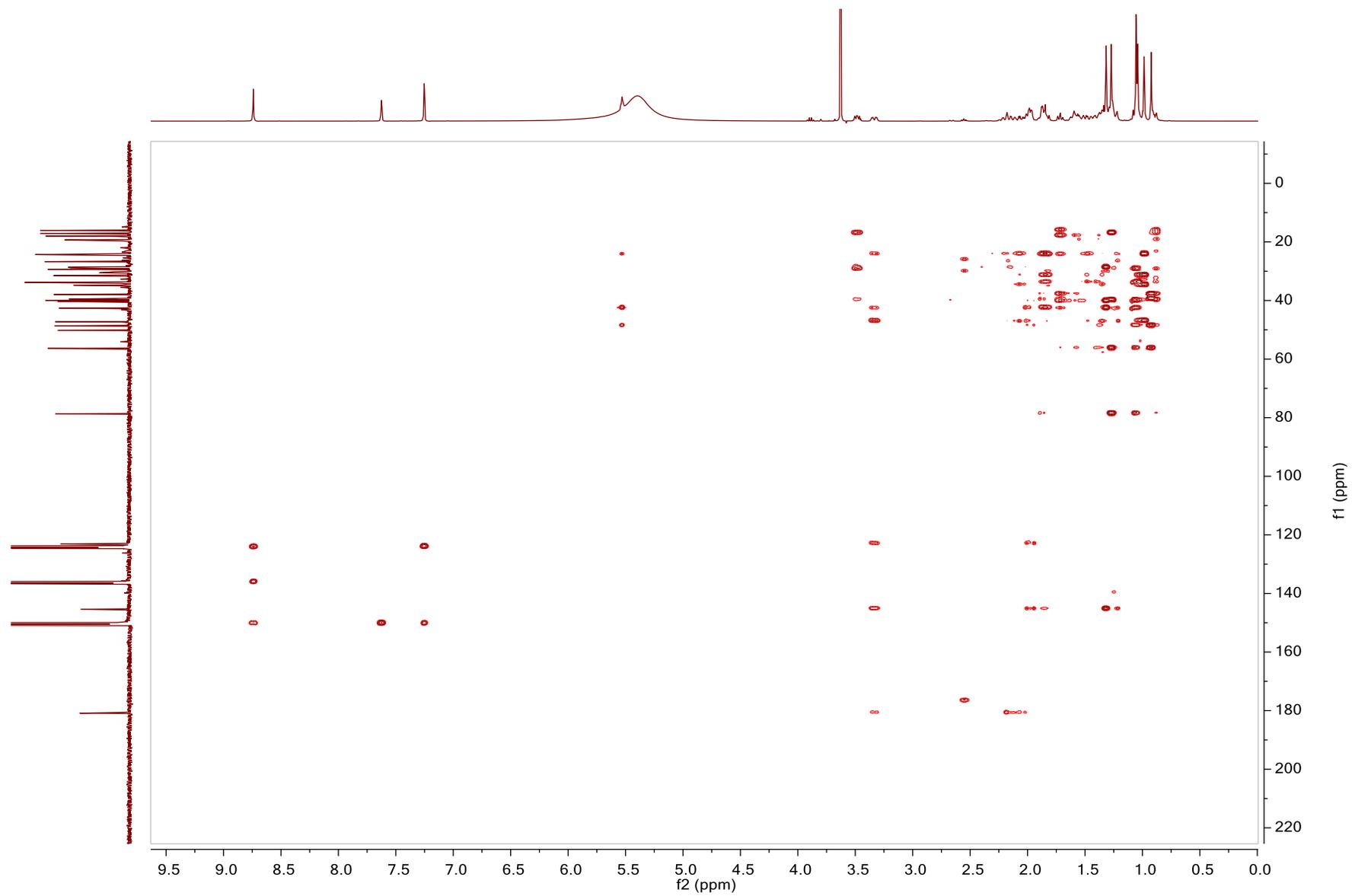


Figura 1c. HSQC del ácido oleanólico.

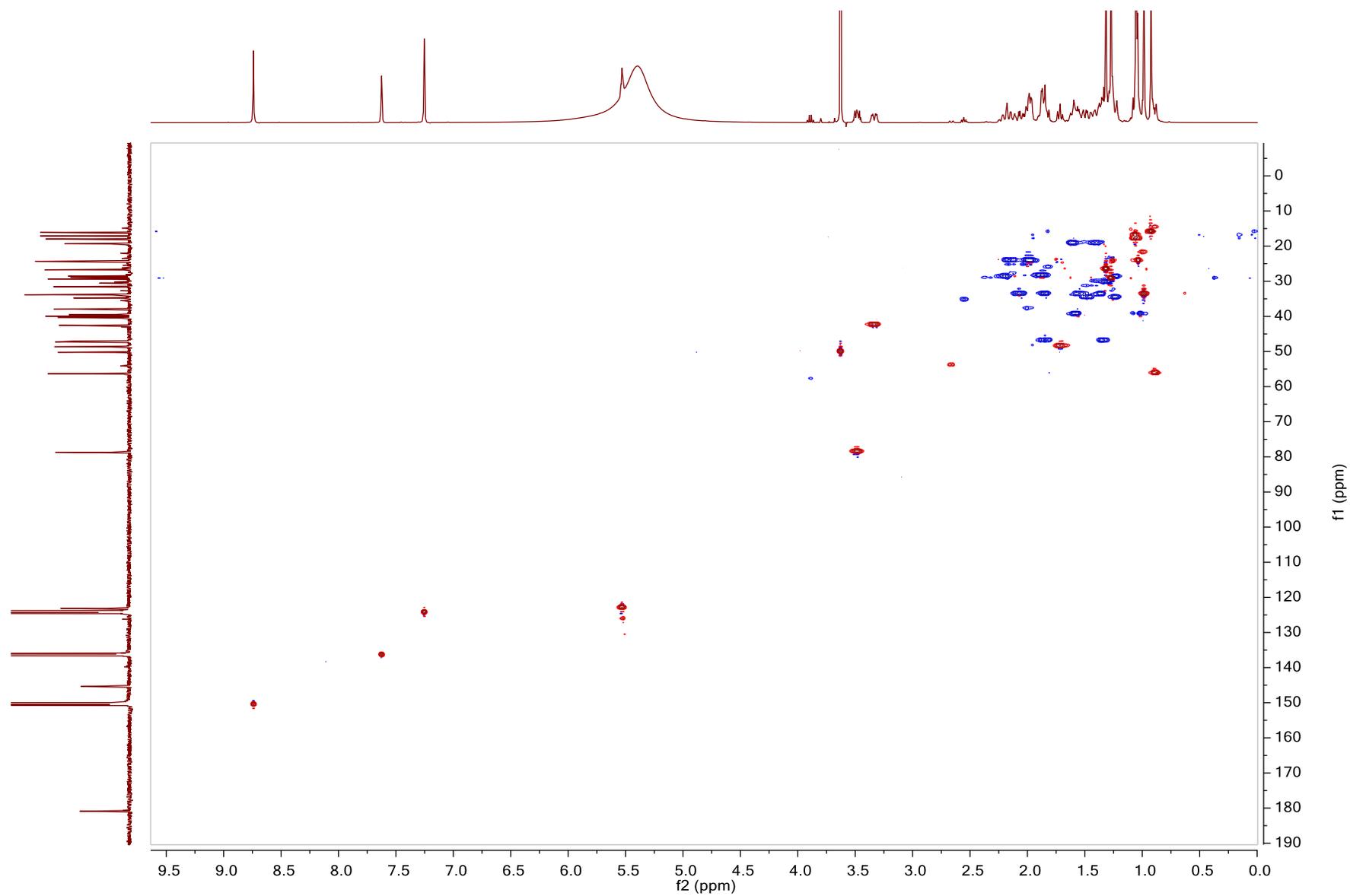


Figura 2a. COSY del ácido maslínico.

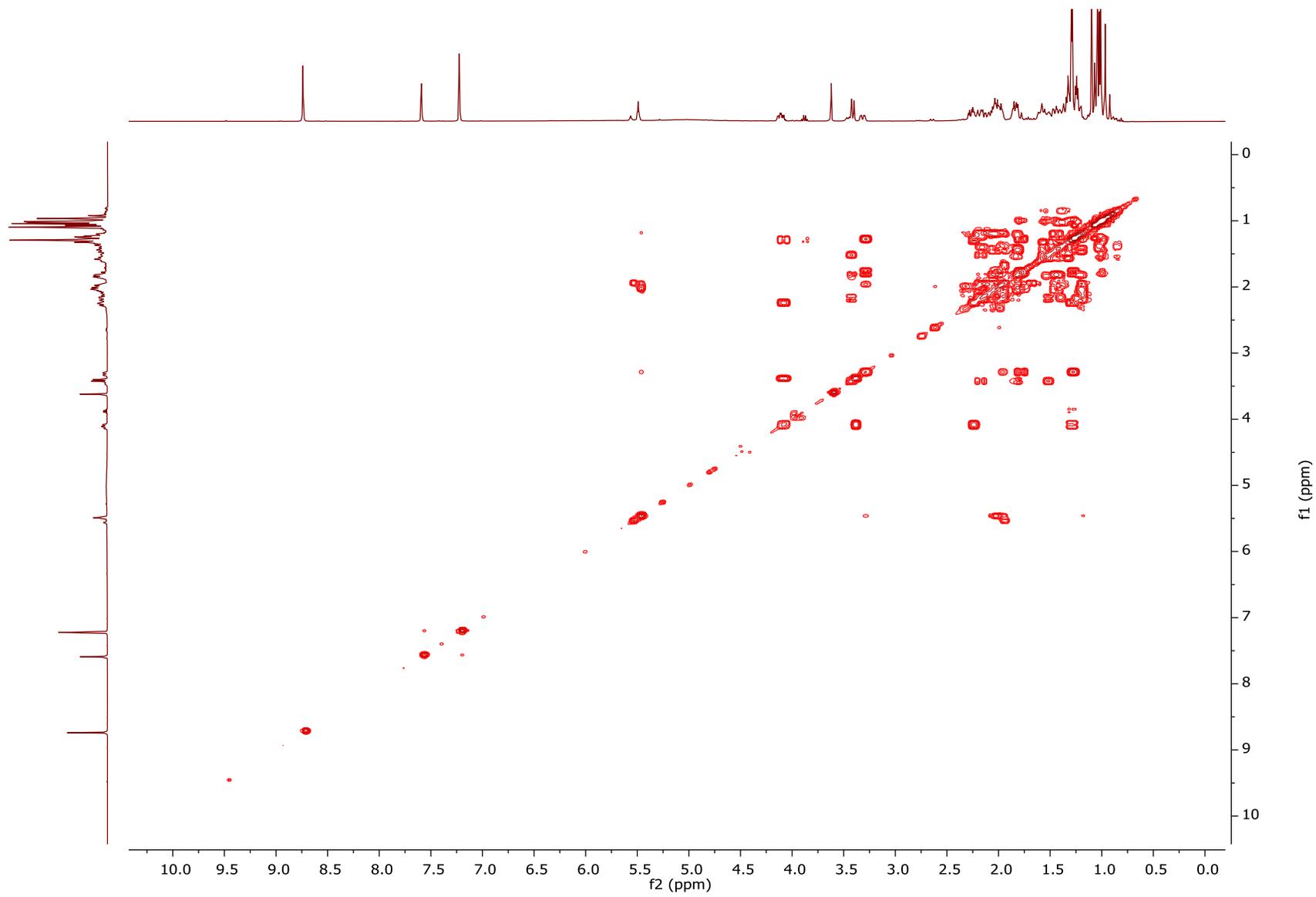


Figura 2b. HMBC del ácido maslínico

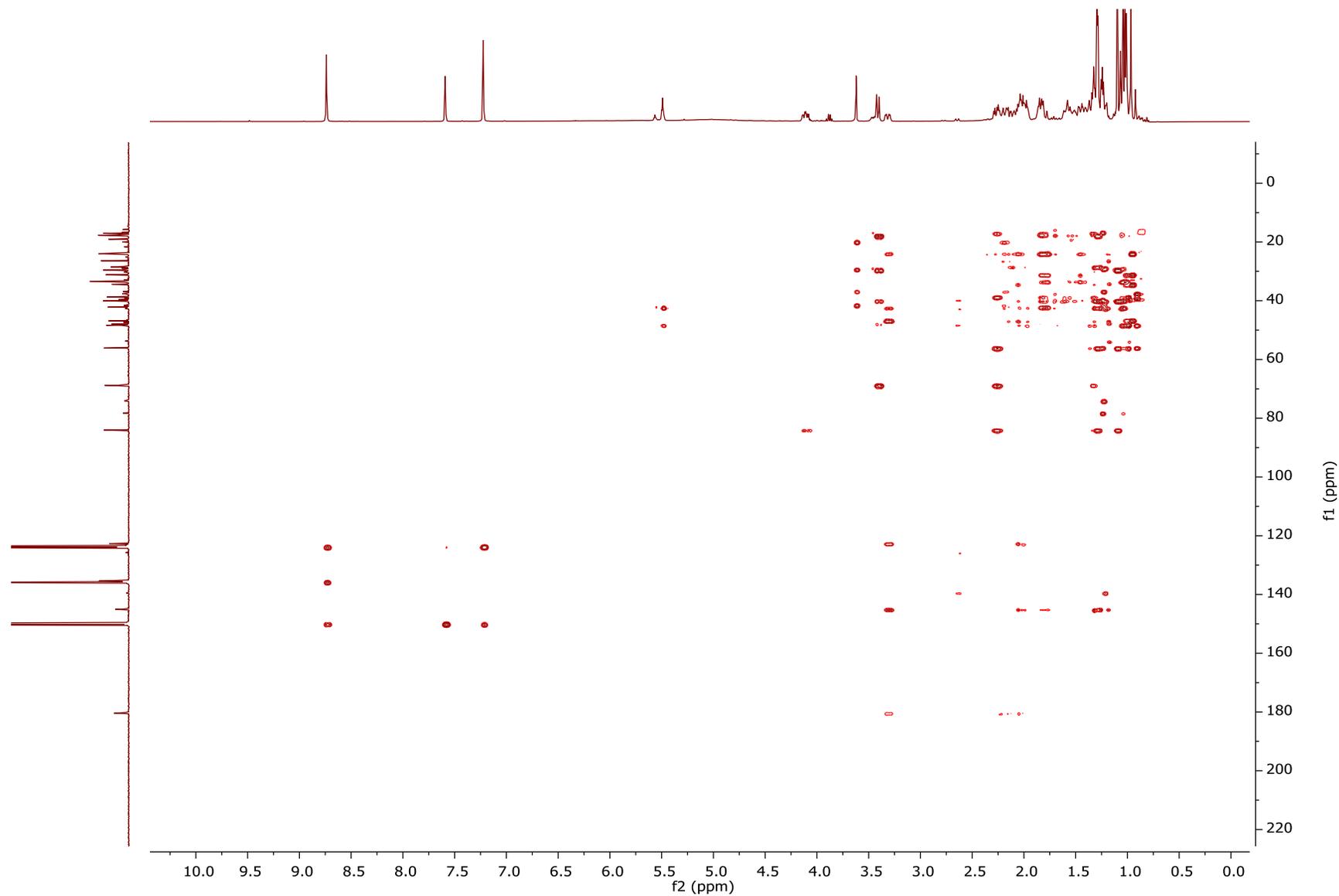


Figura 2c. HSQC del ácido maslínico

