



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio químico de las hojas de *Arctostaphylos pungens* (pingüica)

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Daniela Monserrat Barredo Escalona



Ciudad Universitaria, CDMX, 2019



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:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal:	Dra. Gloria Díaz Ruiz
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2er. suplente:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, EDIFICIO E

FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Fausto Rivero Cruz

SUSTENTANTE:

Daniela Monserrat Barredo Escalona



Índice

Tabla de abreviaturas:	5
Lista de cuadros:.....	6
Lista de figuras:.....	7
INTRODUCCIÓN:	8
1. ANTECEDENTES:	10
1.1. <i>Arctostaphylos pungens</i>	10
1.1.1. Taxonomía	10
1.1.2. Características botánicas	11
1.1.3. Distribución geográfica	13
1.1.4. Marco histórico	13
1.1.5. Usos de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades	15
1.1.6. Estudios químicos previos realizados en hojas y frutos de <i>A. pungen</i>	16
1.2. <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	19
1.3. Generalidades de los terpenos.....	19
1.3.1. Triterpenos	20
1.3.1.1. Uvaol.....	20
1.3.1.2. Eritrodiol.....	24
1.3.1.3. Ácido ursólico.....	25
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo general.....	37
3.2 Objetivos particulares	37
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38



4.1.	Obtención de muestra vegetal de hojas de <i>A. pungens</i>	38
4.2.	Tratamiento del material vegetal	38
4.3.	Métodos generales de análisis	38
4.3.1.	Análisis cromatográficos	38
4.3.2.	Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas	38
4.4.	Estudio químico de las hojas de <i>A. pungens</i>	39
4.4.1.	Preparación del extracto etanólico.....	39
4.4.2.	Fraccionamiento primario	39
4.4.3.	Fraccionamiento secundario a partir de las fracciones FH-U, FH-V y FH-W	42
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1.	Caracterización estructural del ácido ursólico (APH-C003b).	45
5.2.	Caracterización estructural de una mezcla de uvaol y eritrodiol (APH- C001) como compuestos mayoritarios	48
6.	CONCLUSIONES.....	54
7.	PERSPECTIVAS	55
8.	Referencias Bibliográficas	56

Tabla de abreviaturas:

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
<i>A. pungens</i>	<i>Arctostaphylos pungens</i>
AU	Ácido ursólico
<i>A. uva-ursi</i>	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>
°C	Grados celsius
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COSY	Espectroscopía por correlación
EM	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
g	Gramos
h	Hora
Hex	Hexano
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
kg	Kilogramo
L	Litro
LC-ESI-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ionización por electroespray

Abreviatura	Significado
m	Metro
MeOH	Metanol
MHz	Megahercio
mm	Milímetros
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
OMS	Organización mundial de la salud
p/p	Peso/peso
ppm	Partes por millón
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS	Ultra-High Performance Liquid Chromatography (PDA) Photodiode-Electrospray ionization-Time of Flight- Mass Spectrometry
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
CLV (VLC)	Cromatografía al vacío



Lista de cuadros:

Cuadro 1. Lista de compuestos identificados en <i>A. pungens</i> por UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS (modificado de Panusa et al., 2015).....	17
Cuadro 2. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el uvaol, posible mecanismo de acción, dosis y modelos experimentales.	22
Cuadro 3. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el eritrodiol, posible mecanismo de acción, dosis y modelos experimentales.	25
Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental (modificado de Kashyap et al., 2016).	27
Cuadro 5. Resumen de actividades antimicrobianas medidas por el ácido ursólico (modificado de Kashyap et al., 2016).	34
Cuadro 6. Fracciones obtenidas de la primera columna de cromatografía líquida al vacío con proporción de disolventes, fracciones agrupadas y peso total de la fracción.	41
Cuadro 7. Fracciones obtenidas de la segunda columna de cromatografía líquida al vacío con proporción de disolventes y peso total de la fracción.	43



Lista de figuras:

Figura 1. Taxonomía de <i>Arctostaphylos pungens</i> (iNaturalist Org, 2019).	11
Figura 2. a) Frutos de pingüica b) Flores de pingüica (iNaturalist Org, 2019).	12
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Arctostaphylos pungens</i> (iNaturalist Org, 2019).....	13
Figura 4. a) Ilustración del Códice de De la Cruz-Badiano de la pingüica (Linares <i>et al.</i> , 1988) b) Esquema de pingüica (Martínez, 1996).	15
Figura 5. Estructura uvaol o Urs-12-en-3,28-diol (UV).....	21
Figura 6. Estructura eritrodiol o 3 β -olean-12-en-3 β ,28-diol (ER).....	24
Figura 7. Estructura ácido ursólico o ácido (3 β)-3-hidroxi-urs-12-en-28-oico (AU).26	
Figura 8. Resumen del procesamiento de muestra vegetal de hojas de <i>A. pungens</i>	39
Figura 9. Esquema de columna de cromatografía líquida al vacío, montada con muestra vegetal de hojas de pingüica.	40
Figura 10. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada de <i>A. pungens</i>	44
Figura 11. Espectro RMN- ¹ H del ácido ursólico (400 MHz, piridina-d ₅).	46
Figura 12. Espectro RMN- ¹³ C del ácido ursólico (100 MHz, piridina-d ₅).	47
Figura 13. Espectro RMN- ¹ H de la mezcla de uvaol y eritrodiol (400 MHz, piridina-d ₅).	49
Figura 14. Espectro RMN- ¹³ C de la mezcla de uvaol y eritrodiol (100 MHz, piridina-d ₅).....	50
Figura 15. Espectro RMN- ¹ H de estándar comercial de uvaol (400 MHz, piridina-d ₅).	52
Figura 16. Espectro RMN- ¹³ C de estándar comercial de uvaol (100 MHz, piridina-d ₅).	53



INTRODUCCIÓN:

Arctostaphylos pungens conocida popularmente como pingüica, madre selva, madroño, manzanilla, manzanita, tepesquite, entre otros, es un arbusto ramificado desde la base, de altura de 0.5 a 3.5 m y con corteza lisa color café rojizo, perteneciente a la familia *Ericaceae*. Se encuentra presente en climas semicálidos, semisecos y templados, a altitudes de 1750 a 3900 msnm y es originaria de la región geográfica que abarca el sur de Estados Unidos hasta los estados de Veracruz y Oaxaca en México. Las hojas se identifican por tener la punta redondeada, ser rígidas, de color verde pálido y tener un soporte corto (UNAM, 2009; Márquez y González, 2006).

En la medicina tradicional de México se emplean las infusiones ya sea de hojas, frutos, raíz o toda la planta para afecciones renales, afecciones gastrointestinales, gonorrea, leucorrea, prostatitis, reumatismo, hidropesía e inflamación. A lo largo de la historia se han descrito diversos usos y la Sociedad Farmacéutica de México la señala como diurética (UNAM, 2009).

A pesar de que su uso es extenso, son pocos los trabajos de investigación en los que se han descrito los compuestos presentes en esta planta. La mayoría de estos trabajos surgieron con la intención de encontrar las diferencias metabólicas con *Arctostaphylos uva-ursi*, especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional y comercialmente. Por otra parte, es importante mencionar que *A. pungens* es comercializada erróneamente por *A. uva-ursi* dado a la similitud en su morfología.

En trabajos previos se ha descrito que los perfiles metabólicos de ambas especies son distintos y que la principal diferencia es en el contenido de arbutina, que es la sustancia activa característica de *A. uva-ursi*. Las hojas secas de *A. pungens* tiene un contenido considerablemente bajo de arbutina 1-2% (p/p) en comparación con *A. uva-ursi* que como mínimo debe tener un contenido de 7% según la Farmacopea Europea (Panusa *et al.*, 2015).

Entre los compuestos descritos previamente en *A. pungens* se encuentran dos triterpenos identificados en las hojas y frutos, el uvaol y el ácido ursólico (Domínguez *et al.*, 1983). En estudios posteriores se detectaron e identificaron



cerca de 60 compuestos mediante un análisis del extracto de las hojas por UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS (Panusa *et al.*, 2015). En el presente trabajo de investigación se analizó el extracto etanólico de una muestra de hojas de pingüica recolectadas en el Estado de México, México.



1. ANTECEDENTES:

1.1. *Arctostaphylos pungens*

1.1.1. Taxonomía

Arctostaphylos pungens es el nombre científico de esta planta, sin embargo, es conocida por múltiples nombres comunes en las diferentes regiones donde crece. Su nombre científico obedece a una nomenclatura de dos elementos que hace referencia a su clasificación taxonómica. Perteneciente al reino *Plantae*, del filo *Tracheophyta* de plantas vasculares, de la clase *Magnoliopsida* donde se encuentran magnolias, margaritas y sus parientes (Dicotiledóneas), del orden *Ericales* con representantes como ébanos, madroños y ocotillos; de la familia *Ericaceae* donde se clasifican madroños, azaleas, arándanos y otros parientes, de la subfamilia *Arbutoideae* donde se encuentran especímenes como madroños, manzanitas, narices de lobo y parientes, del género *Arctostaphylos* donde se clasifican las manzanitas y de la especie *pungens* correspondiente a la pingüica (Figura 1) (iNaturalist Org, 2019).

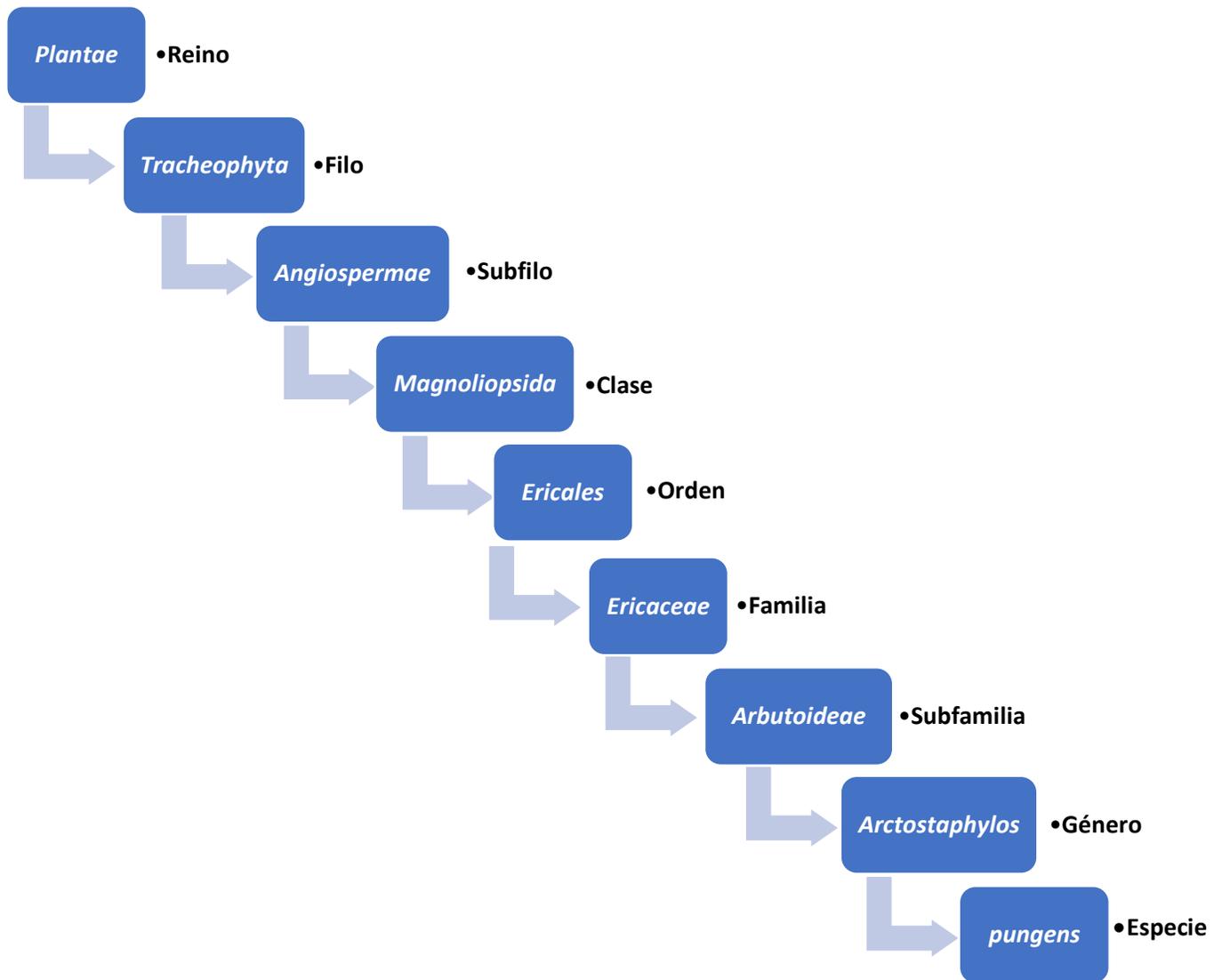


Figura 1. Taxonomía de *Arctostaphylos pungens* (iNaturalist Org, 2019).

1.1.2. Características botánicas

A. pungens es un arbusto ramificado desde la base, leñoso, perenne, de altura de 0.5 a 3.5 m y con corteza lisa color café rojizo, exfoliante (la corteza externa se abre y se desprende). Las hojas se identifican por ser elípticas a oblongas u ovoideas, rígidas, coriáceas, de 1 a 3.3 cm de largo, de color verde pálido, cortamente pecioladas y tienen un soporte corto. Los frutos son de forma globosa,



lisos, de 5 a 8 mm de diámetro y de coloración amarillento rojizo; son comestibles, contienen una pulpa seca y dulce y generalmente no se abren (Figura 2a). Las semillas se encuentran en número de 4 a 7 por fruto, tienen los tegumentos endurecidos, forma de gajo y miden 3.2 mm de largo y 2.6 mm de ancho. La producción de frutos es abundante al final de la primavera. Las flores son bisexuales, de corola urceolada de 5 a 7 mm de largo, de color blanco o rosado, cáliz con cinco lóbulos de 3 mm de largo, con 10 estambres insertos en la base de la corola, de filamentos peludos; se distribuyen en racimos densos de cinco a ocho flores, pueden florecer durante todo el año, pero lo hace de forma masiva al final del invierno (Figura 2b) (UNAM, 2009; Márquez *et al.*, 2006; Martínez, 1996; Linares *et al.*, 1988; Instituto Nacional Indigenista, 1994).

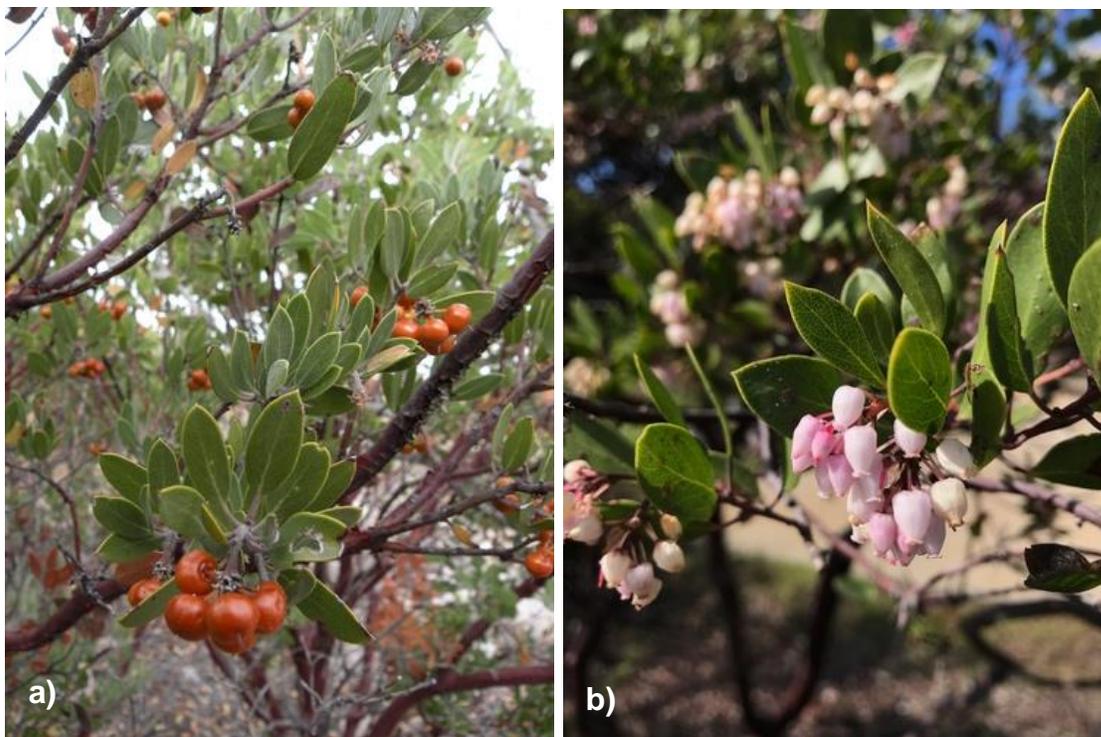


Figura 2. a) Frutos de pingüica b) Flores de pingüica (iNaturalist Org, 2019).



1.1.3. Distribución geográfica

La pingüica se encuentra presente en climas semicálidos, semisecos y templados, en muchos tipos de vegetación, a altitudes de 1750 a 3900 msnm y es originaria de la región geográfica que abarca el sur de Estados Unidos hasta los estados de Veracruz y Oaxaca en México (Figura 3) (UNAM, 2009; Márquez *et al.*, 2006).

A. pungens es una planta que prospera en lugares que con frecuencia han sido arrasados por incendios recurrentes, es una especie asociada al fuego y de relevancia en el proceso de sucesión de bosques de pino-encino (Márquez *et al.*, 2006).

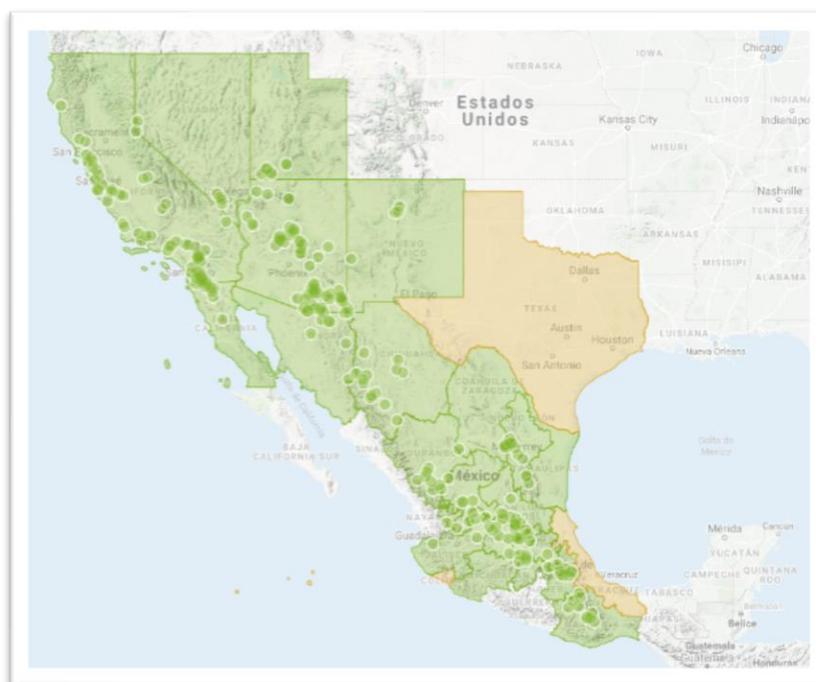


Figura 3. Distribución geográfica de *Arctostaphylos pungens* (iNaturalist Org, 2019).

1.1.4. Marco histórico

Arctostaphylos pungens es conocida popularmente en México como pingüica, madre selva, madroño, manzanilla, manzanita, tepesquite, entre otros (UNAM, 2009). En el estado de México se conoce como: *tepeosquilitl* del náhuatl, *pendicua* y *pendiqua*. En el estado de Hidalgo como *tengüeta* y *tengüita*. En el estado de



Chihuahua como *uitzara* del rarámuri y en el estado de Sonora como *i'yoli* del pima (Instituto Nacional Indigenista, 1994). El Códice De la Cruz-Badiano menciona el nombre *tomazquitl* de origen náhuatl para esta planta (Figura 4a). Martínez (1969) indica que también se le conoce como tepezquite, tepezquitl y manzanitas. Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina herbolaria tradicional de México desde épocas prehispánicas, sin embargo, es escasa la información disponible sobre esta especie.

Algunos de los autores que describieron propiedades medicinales de *A. pungens* son: De la Cruz-Badiano (1552) indica que en mezcla con otras plantas se utiliza en un preparado para la fatiga. Martínez (1969) reporta el uso de la pingüica para combatir afecciones catarrales, para provocar la orina y curar los riñones. Francisco Hernández en el siglo XVI describe que el cocimiento de las raíces se usaba para el tratamiento de pacientes asmáticos. Alfonso Herrera, en el siglo XX, menciona su uso como diurético en las afecciones crónicas de las mucosas de la vejiga; cicatrizante en diversas lesiones de las vías urinarias; en la cistitis, pielitis y metritis. Posteriormente, Maximino Martínez (1996) indica sus usos como albuminaria, antiblenorrágica, anticatarral, antidiarreica, diurético, enfermedades genitourinarias, gravela, ingurgitación de la próstata y enfermedades de la vejiga (Figura 4b). Luis Cabrera, la indica como tratamiento para la albuminuria y como antiinflamatoria. Según el Dr. Manuel Toussaint las hojas están indicadas como diuréticas y para combatir las afecciones catarrales, sobre todo de los bronquios y de la vejiga. En el Mercado de Sonora se recomienda para los riñones tomar un té de las hojas o un licuado de los frutos y para la inflamación un té de la raíz. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la señala como diurética (UNAM, 2009).

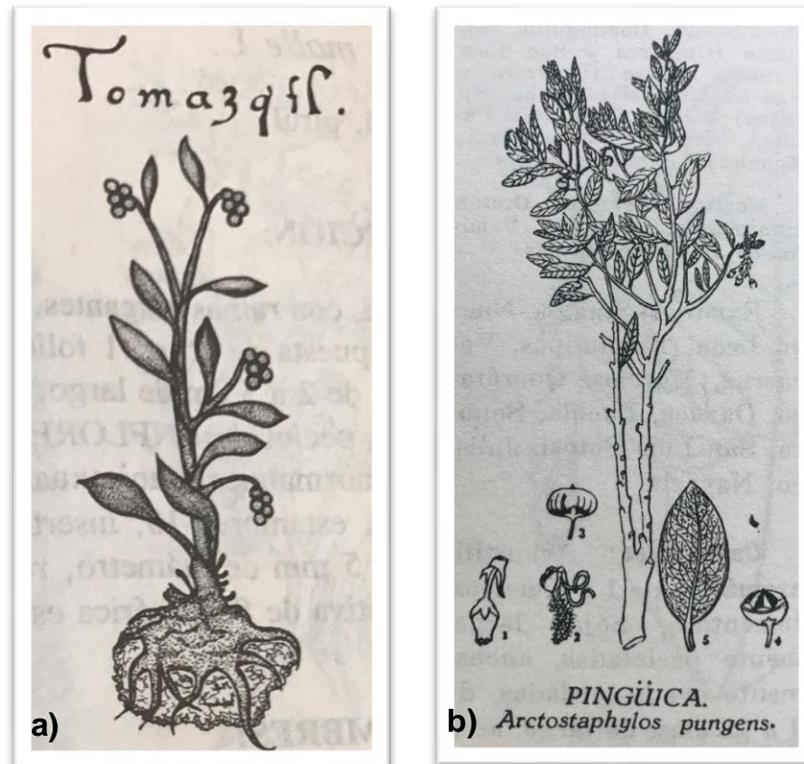


Figura 4. a) Ilustración del Códice de De la Cruz-Badiano de la pingüica (Linares *et al.*, 1988) b) Esquema de pingüica (Martínez, 1996).

1.1.5. Usos de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades.

Según la OMS el concepto de medicamentos herbolarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbolarias y productos herbolarios terminados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos. El uso tradicional de medicamentos herbarios se entiende como el empleo prolongado a lo largo de la historia. Su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz y puede ser aceptado por las autoridades nacionales (Zhang, 2019).

El conocimiento del empleo de plantas con propiedades medicinales es una actividad milenaria que se ha conservado en las diferentes culturas alrededor del mundo transmitiéndose a través de las generaciones y particularmente en México tiene una presencia importante.



En la medicina tradicional Mexicana de hoy en día se emplean las infusiones ya sea de hojas, frutos, raíz o toda la planta para afecciones renales, afecciones gastrointestinales, gonorrea, leucorrea, prostatitis, reumatismo, hidropesía e inflamación; a lo largo de la historia se han descrito diversos usos (UNAM, 2009). Sin embargo, son necesarios estudios enfocados a elucidar el perfil metabólico y estudios para determinar la actividad de sus compuestos aislados.

1.1.6. Estudios químicos previos realizados en hojas y frutos de *A. pungens*

Existen pocos trabajos que se hayan enfocado en el estudio fitoquímico de *A. pungens*, la mayoría de las investigaciones que existen la estudian de forma comparativa con *A. uva-ursi*.

En 1983 Domínguez realizó un análisis de los compuestos terpenoides presentes en los frutos y las hojas de la planta e identificó el uvaol y el ácido ursólico, esperaba también poder encontrar arbutina glucosilada, sin embargo, no le fue posible detectarla.

En 2013, un grupo de investigación en Italia adquirió 15 muestras de material vegetal de distintos orígenes identificado como bearberry, nombre asociado a *A. uva-ursi*; al analizar el extracto metanólico de las hojas por diferentes técnicas analíticas (HPTLC, NMR, HPLC-DAD y LC-ESI-MS) concluyó que 6 de esas muestras, la mayoría originarias de México, no correspondieron al perfil metabólico de *A. uva-ursi*, y se identificaron como *A. pungens*, publicando por primera vez una aproximación del perfil metabólico de esta especie. Los resultados de *A. pungens* indicaron un contenido considerablemente bajo de arbutina 1-2% (p/p) en comparación con *A. uva-ursi* que como mínimo debe tener un contenido de 7% según la Farmacopea Europea (Romana *et al.*, 2013). En 2015 el mismo grupo publica un análisis de las dos especies con la técnica UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS obteniendo una lista de 88 compuestos presentes ya sea en *A. uva-ursi*, en *A. pungens* o en ambas, en el Cuadro 1, se puede observar la lista de los compuestos presentes únicamente en *A. pungens* excluyendo aquellos marcados como desconocidos (Panusa *et al.*, 2015).



Cuadro 1. Lista de compuestos identificados en *A. pungens* por UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS (modificado de Panusa *et al.*, 2015).

No	Compuestos	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ m/z	[M+H] ⁺ m/z
1	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0556	193.0712
2	Ácido siquímico	C ₇ H ₁₀ O ₅	173.0450	175.0606
3	Arbutina	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	317.0873[M+HCOO] ⁻	295.0794[M+Na] ⁺
4	Glucogalina 1	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0665	-
5	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0137	171.0293
6	Glucogalina 2	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0665	-
7	Ácido galoilquinico	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343.0665	345.0822
8	Glucogalina 3	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0665	-
9	Glucogalina 4	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.0665	-
10	Ácido galoil siquímico 1	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	325.0560	327.0716
11	Digaloilglucosa 1	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.0775	-
12	Ácido galoil siquímico 2	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	325.0560	327.0716
13	Digaloilglucosa 2	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.0775	-
14	Hexósido de metilgalato	C ₁₄ H ₁₈ O ₁₀	345.0818	-
15	Digaloilglucosa 3	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.0775	-
16	Piceína	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	343.1230[M+HCOO] ⁻	299.1131
17	Galato de metilo	C ₈ H ₈ O ₅	183.0293	185.0450
18	Digaloilglucosa 4	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.0775	-
19	Galoilarbutina 2	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₁	423.0927	425.1084
20	Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0712	291.0869
21	Trigaloilglucosa 1	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0884	-
22	Trigaloilglucosa 2	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0884	-
23	Ácido digaloilsiquímico 3	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477.0669	479.0826
24	Ácido digaloilsiquímico 4	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477.0669	479.0826
25	Corilagina	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈	633.0728	635.0884
26	Trigaloilglucosa 3	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0884	-
27	Miricetin galoilhexósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	631.0935	633.1092
28	Ácido cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	163.0395	165.0552
29	1,3,6-trigaloilglucosa	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0884	-
30	Trigaloilglucosa 5	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0884	-
31	Trigaloilglucosa 6	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0884	-
32	Miricetin glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0826	481.0982
33	Miricetin pentósido 1	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449.0720	451.0877



Cuadro 1. Lista de compuestos identificados en *A. pungens* por UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS [modificado de Panusa *et al.*, 2015 (continuación)].

No	Compuestos	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ m/z	[M+H] ⁺ m/z
34	Quercetina galoilhexósido	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	615.0986	617.1143
35	Tetragaloilglucosa 1	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.0994	-
36	Miricetina pentósido 2	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449.0720	451.0877
37	Tetragaloilglucosa 2	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.0994	-
38	Miricetina ramnósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0877	465.1033
39	Rutinósido de quercetina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1456	611.1612
40	Quercetina 3-galactósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0877	465.1033
41	Tetragaloilglucosa 3	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.0994	-
42	Quercetina 3-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0877	465.1033
43	Miricetina acetilhexósido 1	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₄	521.0931	523.1028
44	Pentosido de quercetina	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0771	435.0927
45	Kaempferol hexósido 1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	449.1084
46	Pentagaloilglucosa 1	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.1104	-
47	Avicularina	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.0771	435.0927
48	Pentagaloilglucosa 2	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.1104	-
49	Kaempferol hexósido 2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	449.1084
50	Quercetina 3-ramnósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	449.1084
51	Miricetina acetilhexósido 2	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₄	521.0931	523.1028
52	Pentagaloilglucosa 3	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.1104	-
53	Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317.0297	319.0454
54	Miricetina acetilpentósido	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491.0826	493.0982
55	Kaempferol pentósido 2	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.0822	419.0978
56	Kaempferol ramnósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0978	433.1135
57	Quercetina acetilhexósido	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505.0982	507.1139
58	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0348	303.0505
59	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0399	287.0556



1.2. *Arctostaphylos uva-ursi*

Arctostaphylos uva-ursi comúnmente conocida como bearberry o uva ursi es una planta utilizada en la medicina herbolaria tradicional para el tratamiento de infecciones del tracto urogenital. Este vegetal crece y se emplea en países de Norte de América, Siberia, la Península Ibérica y Asia, particularmente la zona de los Himalayas donde se encuentran las condiciones adecuadas de clima y suelo para su crecimiento. Es morfológicamente parecida a *A. punges* y esta última es comúnmente comercializada erróneamente como bearberry. Por esta razón, se han realizado algunos trabajos para generar los perfiles fitoquímicos de ambas plantas y poder diferenciarlas químicamente (Panusa *et al.*, 2015; Romana *et al.*, 2013).

La 4-hidroxifenil- β -D-glucopiranososa (arbutina) es la sustancia activa identificada en las hojas de *A. uva-ursi* y según la monografía de la Farmacopea Europea el contenido mínimo de arbutina en las hojas secas debe ser del 7% (p/p) y los productos con un contenido menor son considerados suplementos alimenticios. Por último, es importante mencionar que la arbutina es un compuesto fenólico ampliamente distribuido en especies vegetales (Panusa *et al.*, 2015; Romana *et al.*, 2013).

1.3. Generalidades de los terpenos

Los metabolitos de las plantas se clasifican básicamente en dos grandes grupos, primarios y secundarios. Los primarios son aquellos que son indispensables para el crecimiento y desarrollo de la planta. Los secundarios se distribuyen de forma diferencial entre los grupos taxonómicos y son aquellos que permiten interacciones ecológicas de la planta con su entorno, aportan al organismo que los produce una ventaja para responder a estímulos del entorno (Rivas *et al.*, 2016).

Se sabe que las plantas producen una gran variedad de metabolitos biológicamente activos que son empleados en el tratamiento de diversos padecimientos (Kashyap *et al.*, 2016).



Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios en plantas. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Estos compuestos suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (Ávalos y Pérez, 2009).

1.3.1. Triterpenos

Los triterpenos son compuestos que están constituidos por 30 carbonos agrupados en cinco ciclos de seis carbonos con distintos sustituyentes, se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos de plantas en forma de ácidos o agliconas de saponinas y han sido objeto de investigación por varias décadas. Recientemente han atraído bastante atención por sus efectos en la salud humana y prevención de enfermedades, actuando como antiinflamatorios, antidiabéticos, antibacteriales, antivirales, antifúngicos, hepatoprotectores, antiaterogénicos, gastroprotectores, hiperlipidémicos, reguladores inmunológicos, reguladores de azúcar en sangre, su efecto en la disminución de la presión sanguínea, en la inflamación de la piel y actividad antitumoral. Entre los ácidos triterpénicos libres más abundantes en tejidos de plantas encontramos al ácido oleanólico, el ácido betulínico, el ácido ursólico, el ácido maslínico, eritrodiool y uvaol (Martínez García *et al.*, 2018; Seebacher *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Uvaol

El uvaol o urs-12-en-3,28-diol (UV) (Figura 5) es un compuesto triterpenoide pentacíclico tipo ursano, con fórmula molecular de $C_{30}H_{50}O_2$ y peso molecular 442.71 g/mol. Este metabolito ha sido reportado en *Arctostaphylos punges*, *Olea africana*, *Carpobrotus edulis*, *Clinopodium taxifolium* y del género *Eugenia* existen reportes de uvaol en las especies *E. pisiformis*, *E. umbelliflora*, *E. uniflora* y *E. catharinae*. La diferencia estructural que presenta este compuesto con compuestos como el ácido oleanólico y la β -amirina es un grupo metilo en la posición C-29 el cual parece tener un rol importante en la actividad presentada por



este compuesto. Es una molécula biológicamente activa presente en múltiples alimentos y plantas empleados en la medicina tradicional. Algunos de los efectos terapéuticos que se han estudiado son la citotoxicidad, la supervivencia celular y la proliferación celular, el efecto sobre ciclo celular, el decremento de especies reactivas de oxígeno y la protección contra daño oxidativo del DNA en células de cáncer de mama (MCF-7). La observación de estos efectos orientó el estudio del uvaol como agente anticancerígeno en líneas celulares de linfoma de ratón MDR y células transfectadas MDR1. Por otra parte, se ha estudiado su efecto antiinflamatorio en ratones suizos machos observando un decremento en los leucocitos totales.

Se ha observado que el uvaol posee efectos antibacterianos contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, bacterias ácido-alcohol resistentes como *Mycobacterium tuberculosis* y esporas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*. En el Cuadro 2 se resumen los efectos terapéuticos descritos para el uvaol (NIST, 2019; Costa *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017; Douglas, 2016; Morocho *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2010; Allouche *et al.*, 2010).

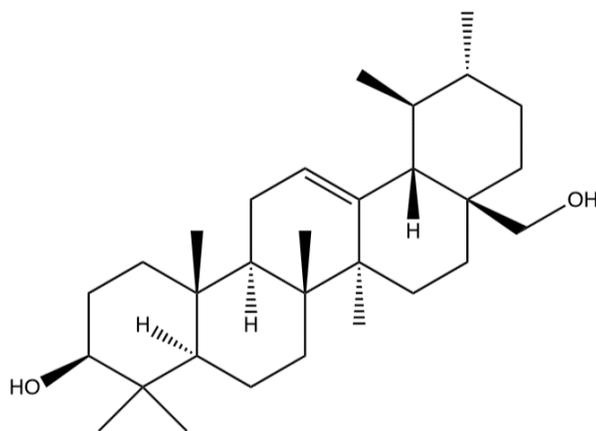


Figura 5. Estrutura uvaol o Urs-12-en-3,28-diol (UV).



Cuadro 2. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el uvaol, posible mecanismo de acción, dosis y modelos experimentales.

Efecto terapéutico	Mecanismo / Resultados reportados	Dosis	Modelo experimental
Citotóxico (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•64% de las células aún son viables	100 μ M dosis dependiente de tiempo	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Proliferación celular (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Aumento en la proliferación celular •Inhibición en la proliferación celular por arresto en el ciclo celular	12.5 μ M dosis dependiente de tiempo 25 μ M dosis dependiente de tiempo con una exposición de 24, 48 y 120 horas	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Supervivencia celular (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Disminución del porcentaje de células viables	50 μ M dosis dependiente del tiempo	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Ciclo celular (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Incremento de células en fase G0/G1 (8%) •Decremento de células en fase S (41%)	100 μ M	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Reduciendo niveles intracelulares de ROS •Previniendo daño oxidativo inducido por H ₂ O ₂ .	10 y 100 μ M a las 24 horas	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Daño oxidativo del DNA (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Protección contra daño oxidativo al DNA	10 μ M	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Anticancerígeno (Martins <i>et al.</i> , 2010) (Martins <i>et al.</i> , 2011)	•Modulador del flujo de salida de la bomba de eflujo de sustrato de la rodamina 123 y el bromuro de etidio por células cancerígenas •Efecto de sinergismo con doxorubicina, agente anticancerígeno para el que inicialmente las células mostraron resistencia		Línea celular de linfoma de ratón MDR MDR1 células transfectadas
Antiinflamatorio (Costa <i>et al.</i> , 2016)	•Decremento en los leucocitos totales	100, 200 o 500 μ mol/kg	Ratones suizos machos



Cuadro 2. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el uvaol, posible mecanismo de acción, dosis y modelos experimentales (continuación).

Efecto terapéutico	Mecanismo / Resultados reportados	Dosis	Modelo experimental
Antibacteriano (Douglas, 2016) (Morocho <i>et al.</i> , 2018) (Martins <i>et al.</i> , 2011)	•Posible interferencia con las membranas celulares, daño a enzimas, componentes estructurales y al DNA	Zona de inhibición de 5.0 mm	Actividad contra bacterias Gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i>
	•Actividad contra α -glucosidasa	IC ₅₀ = 521.0 \pm 2.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	•Actividad antimicobacteriano		Cepa resistente y susceptible de <i>M. tuberculosis</i>
	•Decremento de la resistencia a la tetraciclina de la cepa <i>E. coli</i> AG100 _{TET8}	Decremento del MIC de la tetraciclina de 25 mg/L a 6.25 mg/L	Cepa <i>E. coli</i> AG100 _{TET8}
	•Reducción del MIC de la ciprofloxacina contra cepa de salmonella resistente a ciprofloxacina		<i>S. enteritidis</i> 5408 _{CIP}
	•Reducción del MIC de la oxacilina en <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	Concentración de 100 mg/L	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)
	•Aumento de la acumulación de bromuro de etidio por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA CO _{Loxa}) en forma dependiente glucosa.		<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA CO _{Loxa})



1.3.1.2. Eritrodiol

El eritrodiol o 3 β -olean-12-en-3 β ,28-diol (ER) (Figura 6) es un triterpenoide pentacíclico tipo oleanano que es una β -amirina en el que uno de los hidrógenos del grupo metilo en la posición 28 ha sido reemplazado por un grupo hidroxilo. Tiene una fórmula molecular de C₃₀H₅₀O₂ y una masa molecular de 442.71 g/mol. Es un metabolito de *Clinopodium taxifolium*, *Olea europaea*, *Olea africana*, *Rhododendron ferrugineum* y otras especies de *Rhododendron*, así como también existen reportes en el género *Eugenia* en las especies *E. pisiformis*, *E. umbelliflora*, *E. uniflora* y *E. catharinae*. (ChEBI, 2019; Oliveira *et al.*, 2017; Douglas, 2016; Morocho *et al.*, 2018).

En estudios farmacológicos previos realizados con esta molécula se reporta que el eritrodiol presenta efecto citotóxico, inhibición en la proliferación celular, disminución en la supervivencia celular, efecto sobre ciclo celular, protección contra daño oxidativo del DNA y nivel de especies reactivas de oxígeno en células de cáncer de mama (MCF-7). Además, se ha observado inducción de la apoptosis en células MDA-MB-231 y U937 y efecto antibacteriano en bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*. En el Cuadro 3 se resumen los efectos terapéuticos descritos para el eritrodiol (Unidad de Informática del Instituto de Química, 2019; Douglas, 2016; Allouche *et al.*, 2010).

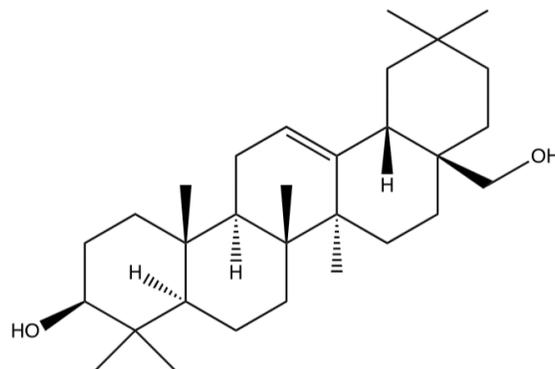


Figura 6. Estructura eritrodiol o 3 β -olean-12-en-3 β ,28-diol (ER).



Cuadro 3. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el eritrodiol, posible mecanismo de acción, dosis y modelos experimentales.

Efecto terapéutico	Mecanismo / Resultados reportados	Dosis	Modelo experimental
Citotóxico (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•12 % de las células aún son viables	100 µM dosis dependiente de tiempo	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Proliferación celular (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Inhibición de la proliferación celular por apoptosis con importante producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño al DNA	50 µM dosis dependiente de tiempo con una exposición de 24 horas	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Daño oxidativo del DNA (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Protección contra daño oxidativo al DNA •Daño significativo al DNA	10 µM 100 µM	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Supervivencia celular (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Disminución del porcentaje de células viables	25 µM dosis dependiente del tiempo	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Ciclo celular (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Incremento significativo de población en fase G0/G1 (8%) •Causa un marcado decremento en el porcentaje de células en fase G0/G1 (33%) y un incremento en el porcentaje de células en la fase sub G1, asociada con apoptosis	10 µM 100 µM	Línea de células de cáncer de mama (MCF-7)
Apoptosis (Allouche <i>et al.</i> , 2010)	•Induce apoptosis	100 µM	Células MDA-MB-231 y U937
Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)	•Incremento de las especies reactivas de hidrógeno (ROS) intracelular	100 µM	Línea de células de cáncer de pecho MCF-7
Antibacterial (Douglas, 2016)	•Actividad contra bacteria Gram positiva	Zona de inhibición de 5.2 mm	<i>Staphylococcus aureus</i>

1.3.1.3. Ácido ursólico

La presencia del ácido ursólico se ha confirmado en numerosas plantas medicinales como *Arctostaphylos pungens*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Eriobotrya japonica*, *Rosmarinus officinalis*, *Hedyotis difusa*, *Ligustrum lucidum*, *Glechoma hederacea*, *Vaccinium macrocarpon*, *Rhododendron hymenanthes*, *Calluna vulgaris*, *Ocimum sanctum* y *Eugenia jambolana* se puede encontrar como ácido libre y como aglicona de saponinas (Kashyap *et al.*, 2016).

El ácido ursólico o ácido (3β)-3-hidroxi-urs-12-en-28-oico (AU) (Figura 7) es un compuesto triterpenoide pentacíclico, con fórmula molecular de C₃₀H₄₈O₃, peso



molecular de 456.70 g/mol, ácido, sólido cristalino tipo agujas, con punto de fusión entre 283 °C a 285 °C y con un máximo de absorción a una longitud de onda de 450 nm. El AU tiene una solubilidad baja en agua, pero es soluble en ácido acético glacial caliente y NaOH etílica. La biosíntesis del AU se logra por el plegamiento y ciclación del escualeno en damarenilo que posteriormente continua con la expansión del anillo y una ciclación extra para formar el quinto anillo del AU. La estructura del AU está compuesta por 30 carbonos isoprenoides en forma de triterpeno pentacíclico (Kashyap *et al.*, 2016).

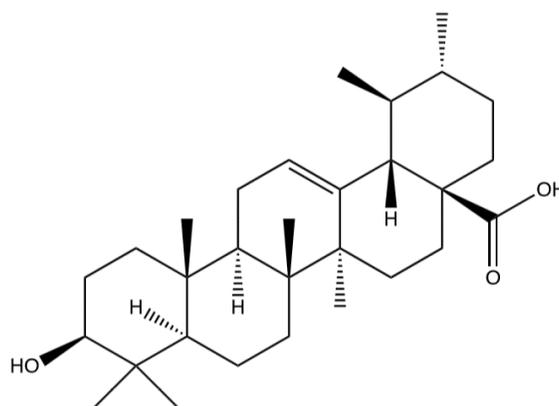


Figura 7. Estructura ácido ursólico o ácido (3 β)-3-hidroxi-urs-12-en-28-oico (AU).

En trabajos previos se ha reportado que el AU actúa a nivel de múltiples blancos intracelulares y extracelulares modulando rutas de señalización asociadas con procesos de apoptosis, metástasis, angiogénesis y procesos inflamatorios, que a su vez son de relevancia en problemas de salud actuales como lo es la supervivencia y progresión de cáncer, problemas cardio vasculares y daños neuronales (Cuadro 4). También las propiedades antimicrobianas del AU han sido ampliamente estudiadas contra patógenos como lo son bacterias del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Enterococcus* y *Mycobacterium*; virus como citomegalovirus, virus del papiloma humano, virus de influenza, virus de hepatitis y virus de inmunodeficiencia humana; levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y parásitos como *Setaria cervi*, *Wushereira bancrofti*,



Tripanosoma y *Plasmodium*. En el Cuadro 5 se resumen las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) del ácido ursólico sobre diferentes bacterias (Kashyap *et al.*, 2016).

Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental (modificado de Kashyap *et al.*, 2016).

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Enfermedad de Alzheimer	<ul style="list-style-type: none">•Bloquea interacciones con la Aβ-CD36•Disminuye producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	64 μ M	Células de ovario de hamster chino (CHO)
Antidepresivo/tipo antiansiolítico	<ul style="list-style-type: none">•Interacción con el sistema dopaminérgico, mediante la activación de los receptores de dopamina D1 y D2.	0.01–0.1 mg/kg, y 10 mg/kg	Ratones suizos machos
	<ul style="list-style-type: none">•Sistemas serotoninérgico y noradrérgico	-	-
Antidiabético	<ul style="list-style-type: none">•Inhibidor de la actividad de la sorbitol deshidrogenasa (SDH) y aldosa reductasa•Aumento de la actividad de glucocinasa, β-oxidación de los ácidos grasos hepáticos y carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1)•Modifica la actividad de la ácido graso sintasa (FAS)•Disminución de actividad de la glucosa-6-fosfato (G6P)	0.05% p/p	Ratones diabéticos machos
	<ul style="list-style-type: none">•Inhibidor de la proteína tirosin fosfatasa 1B (PTP1B)	-	-
	<ul style="list-style-type: none">•Disminución de azúcar en sangre, coeficiente de órgano de riñón, nitrógeno uréico sérico (BUN) y creatinina niveles de malondialdehído (MDA) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) y actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	2.0 μ M 35 mg/kg	Células de ovario de hamster chino (CHO)/HIR y L6 Myotube
	<ul style="list-style-type: none">•Disminución de glucosa-6-fosfato (G6P) hepática, actividad de glucocinasa•Aumento de la proporción de glucocinasa/ glucosa-6-fosfato (G6P), niveles de ARNm de transportador de glucosa 2 (GLUT2), contenido de glucógeno y de la actividad de la reductasa•Disminución de actividad de la sorbitol deshidrogenasa (SDH)	0.01-0.05%	Ratones Kunming machos



Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Antihiperlipidemia	<ul style="list-style-type: none"> •Normalización de las enzimas marcadoras séricas como la creatina cinasa, la creatina quinasa-MB y lactato deshidrogenasa (LDH), expresión de las isoenzimas LDH 1 y LDH 2 •Disminución de los niveles de colesterol total (TC) en plasma, lipoproteínas-colesterol de muy baja densidad (LDL), triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (FFA), fosfolípidos (PL) e índice aterogénico •Aumento de nivel de lipoproteínas-colesterol de alta densidad (HDL) •Disminución de daño al ADN e intensidad de infarto al miocardio. 	40 mg/kg	Ratón macho albino
	<ul style="list-style-type: none"> •Inactivación de la acetil/malonil transferasa mediante nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) y el dominio KR 	-	-
	<ul style="list-style-type: none"> •Reducción de la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), regula a la baja la proteína de unión al elemento regulador del estero 1c (SREBP-1c), ácido graso sintasa (FAS) y la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) y receptores alfa activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR-α) 	6.0 μ g/mL	Rata Wistar macho
	<ul style="list-style-type: none"> •Expresión reducida de proteínas de unión al potenciador CCAAT beta (C/EBPβ), receptores c activados por proliferadores peroxisómicos (PPARc), proteínas de unión al potenciador CCAAT a (C/EBPα) y proteína de unión al elemento regulador del estero 1c (SREBP-1c). •Aumento de la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) •Disminución de la expresión de proteínas de ácido graso sintasa (FAS) y proteína de unión a ácido graso 4 (FABP4) •Aumento en la fosforilación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y expresión de proteínas de sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (Sirt1) 	5 mg/kg 25 mg/kg	Ratón C57BL/6J Conejo
Actividad antilipasa lipolítica	<ul style="list-style-type: none"> •Inhibe la lipasa pancreática y mejora la lipólisis en las células grasas. 	100mg/kg, 51.21 μ M	Rata Wistar macho



Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Cardioprotector	•Actividad antagonista β -adrenérgica	40 mg/kg	Rata
	•Atenuar la secreción del péptido natriurético atrial (ANP) inducida por β -adrenérgicos •Aumento de niveles de cAMP y dinámica atrial •Aumento inducido por acetilcolina en la secreción de péptido natriurético atrial (ANP) •Disminución de presión del pulso	30 μ M	Conejo
	•Vía de transducción de la señal del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE)-nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) oxidasa-factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)	50 mg/kg	Rata diabética
	•Regula hacia abajo miR-21 y p-ERK/quinasa reguladoras de señales extracelulares (ERK)	-	-
	•Inhibir la disfunción de monocitos, mejorar la función renal	- 0.3-10 μ M	Ratón Ratón LDL-R - / - hermbra
Nefroprotector	•Disminuye la elevación del nivel de urea sérica, ácido úrico sérico, creatinina sérica y nitrógeno de ureico en sangre	2, 5, 10 mg/kg	Rata Wistar albina
	•Disminución de la excreción de albúmina en orina, nivel de estrés oxidativo renal, actividad de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y de expresión de la P-selectina	0.2%	Células estrelladas hepáticas (HSC)
Gastroprotector	•Interacciona con canales de Ca^{2+} de tipo L y reduce el flujo de Ca^{2+}	1×10^{-7} mol/L 5×10^{-5} mol/L	-
Antiasmático	•Reduce las citocinas de las células T cooperadoras 1 (Th2) (IL-5 e IL-13), la producción de inmunoglobulina E (IgE) específica de ovoalbúmina y la infiltración de eosinófilos a través de la vía Th2-GATA-3, transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) e IL-17 β , factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)	-	Ratón BALB/c



Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Hepatoprotector	•Apoptosis, disminuye nivel de fosforilación de proteína quinasa B (Akt), e inhibe la localización nuclear de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kβ)	40 μM	Rata hembra Sprague-Dawley (SD)
	•Inhibe la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) plasmáticas •Disminuye creatinina plasmática y nivel de nitrógeno ureico en sangre •Aumenta estado redox glutatión (GHS) y mejora la función mitocondrial	0.35-0.7 mg/kg	Rata de Long Evan's
	•Disminuye nivel de enzimas séricas, transaminasa glutámico pirúvica sérica (SGPT), transaminasa glutámico-oxalacética serica (SGOT), fosfatasa alcalina sérica (SAKP) y bilirrubina sérica (SBIL)	-	-
	•Disminuye peso del hígado, nivel sérico de alanina aminotransferasa (ALT)/aspartato aminotransferasa (AST) y esteatosis hepática •Aumento de la β-oxidación de lípidos e inhibe el estrés del retículo endoplásmico (ER) hepático	-	db / db Ratón/L02 células
	•Aumenta ciclina D1, ciclina E y nivel de expresión de la proteína C/EBPβ	0.14% p/p 10-30 μg/mL	-
	•Aumento de Nrf2, HO-1, NQO1 y glutatión S-transferasa (GST), disminución de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), prostaglandina E2 (PGE2), sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)	-	Ratón
	•Autofagia a través de vía proteína cinasa activada por AMP (AMPK)/mTOR	-	-
	•Disminución de la actividad CYP2E1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina 1b (IL-1β), ciclooxigenasa 2 (COX-2) y activación de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK)	-	-
	•p38 MAPK, quinasas reguladoras de señales extracelulares (ERK), Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kβ)	25, 50 mg/kg 0, 10, 20, 40 μm 25, 50 mg/kg	Ratones imprinting control region (ICR) Células HepG2 Ratón macho imprinting control region (ICR)



Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Neuroprotector	•Activación receptor ácido γ -aminobutírico a (GABA-A)	0.3 mg/kg	Ratón imprinting control region (ICR) masculino
	•Atenúa el edema cerebral, la ruptura de la barrera hematoencefálica, la apoptosis de las células neuronales y la deficiencia neurológica, incrementa el nivel de antioxidantes	25-50 mg/kg	Rata Sprague-Dawley (SD) macho
	•Inhibir la prolil-endopeptidasa (PEP)	-	-
	•Aumenta la expresión S100 mRNA y proteínas	IC ₅₀ 17.2	-
	•Disminuye la expresión de ICAM-1, TLR4, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), P65, interleucina 1b (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y MMP-9	10, 5, 2.5 mg/kg	Ratón BALB/c Rata Sprague-Dawley (SD)
	•Disminuye nivel de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17), ciclooxigenasa 2 (COX-2) •Modula a STAT3 y vías de señalización de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B).	50 mg/kg 25, 50 mg/kg	Macho imprinting control region (ICR)
Antihormonal	•Disminución del nivel de ARNm del gen regulador del crecimiento por estrógeno de cáncer de pecho 1 (GREB1), proteína sensible al estrógeno, nivel de ARNm y proteína de ER α , actividad mejorada del promotor de antígeno prostático específico	-	-
	•Apoptosis inducida, activación de la vía quinasa c-Jun N-terminal (JNK)	10, 20, 40 μ M	Células T20
Sepsis	•Reducir la infiltración de leucocitos y proteínas, actividad de la mieloperoxidasa y el contenido de malondialdehído, disminuir nivel sérico de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1b (IL-1 β), inhibir expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2)	10 mg/kg	Rata
Enfermedades autoinmunes	•Aumento de la expresión de la ácido graso sintasa (FAS), apoptosis, IL-10, aumento CD4 + Foxp3 + y CD25 + Foxp3 + células T, disminución IL17 α , IgG2b anti-AchR	20-100 mg/kg	Rata (MG) Miastenia gravis



Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Antiartritico	•Suprimir la migración de leucocitos y la producción de prostaglandina E ₂ (PGE ₂), hiperalgesia y expresión de Fos espinal.	50 mg/kg	Rata
Osteoprotector	•Inhibe las vías de señalización relacionadas con factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κβ) y cinasa c-Jun N-terminal (JNK), el mRNA y la expresión de proteínas del factor nuclear de células T activadas, citoplasmico, dependiente de calcineurina 1 (NFATc1) •Disminución de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) + osteoclastos •Atenúa la pérdida de hueso de calvario de ratón inducida por partículas de titanio (Ti).	5 mM	Macho C57BL/6
	•Objetivo triptofano hidroxilasa 1 (Tph-1) y suprimir la biosíntesis de serotonina.	10-20 mg/kg	Rata ovariectomizadas (OVX)
Fenotipo del envejecimiento metabólico	•Aumento de biomarcadores antienvjecimiento como sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) y coactivador 1α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC-1α) •Disminución de cargas de energía celular como adenosín trifosfato (ATP) y adenosín difosfato (ADP) •Mejora la neomogénesis •Aumento de expresión de mioglobina	200 mg/kg	Ratón C57BL
Choque por Trauma hemorrágico	•Atenuar el nivel de malondialdehído hepático y reducir el nivel de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en plasma después de un choque por traumatismo-hemorrágico •Inhibir la generación de aniones superóxido y la liberación de elastasa en neutrófilos humanos	1, 3, 10 mM	Rata Sprague-Dawley (SD) macho
Dermoprotector	•Aumenta contenido de ceramida y colágeno, disminuye las queratinas 1, 10 y la involucrina.	1.00%	Queratinocitos epidérmicos normales de seres humanos (NHEK), fibroblastos epidérmicos normales de seres humanos (NHDF)



Cuadro 4. Resumen de efectos terapéuticos mediados por el ácido ursólico, posible mecanismo de acción, dosis y modelo experimental [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto terapéutico	Mecanismo	Dosis	Modelo experimental
Aumento de permeabilidad de barrera epidermal	<ul style="list-style-type: none">•Aumenta la expresión proteica de receptores alfa activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR-α), involucrina, loricrina y filagrina•Induce la diferenciación epidérmica de queratinocitos a través de PPAR-α	0.1 mg/mL, 10 μ mol/L	Células HaCaT
Metabolismo	<ul style="list-style-type: none">•Aumentar la captación de ácidos grasos libres (FFA) y β-oxidación a través de una vía dependiente de la proteína desacopladora 3 (UCP3)/AMPK, proteína cinasa activada por AMP (AMPK)•Mantener la resistencia inducida por el ejercicio de la actividad del complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamíferom (mTORC1)	0.5% 25 mg/ml	Rata Rata macho Sprague-Dawley (SD)
Antimutagénico	<ul style="list-style-type: none">•Probablemente por efecto antioxidante.	80 mg/kg	Ratón BALB/c
Objetivo CSC	<ul style="list-style-type: none">•Inhibe la Oct4, Tert, Bmi1, β-catenina, ABCG2 y gen Ep300•Disminuye células CK19+•Aumenta células CK8/18+	50 μ M	PLC/PRF/5, células Huh7 HCC
Colitis	<ul style="list-style-type: none">•Inhibe las citocinas proinflamatorias, fosforilación/degradación de IκBα y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB)	200 mg/kg	C57BL/6
Modificación epigenética	<ul style="list-style-type: none">•Inhibe DNMT1	20 μ M	Linea celular HCC



Cuadro 5. Resumen de actividades antimicrobianas medidas por el ácido ursólico (modificado de Kashyap *et al.*, 2016).

Efecto	Organismo	MIC
Antibacteriano	• <i>Escherichia coli</i>	3 a 4 × 10 ⁻⁴ M
	• <i>Escherichia coli</i> (UPEC)	10 µg/mL
	• <i>Escherichia coli</i> (ATCC 700336)	256 µg/mL
	• <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	64 µg/mL
	• <i>Escherichia coli</i> (ATCC 27)	512 µg/mL
	• <i>Escherichia coli</i> (MDREC-KG4)	1000 µg/mL
	• <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018)	1024 µg/mL
	• <i>Bacillus subtilis</i>	25 µg/mL
	• <i>Bacillus sphaericus</i>	50 µg/mL
	• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	512 µg/mL
	• <i>Pseudomonas syringae</i>	25 µg/mL
	• <i>Aeromonas cavae</i> (ATCC 15468)	1024 µg/mL
	• <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	64 µg/mL
	• <i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	64 µg/mL
	• <i>Vibrio colorize</i> (ATCC 15748)	1024 µg/mL
	• <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19117)	≥1024 µg/mL
	• <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12692)	1024 µg/mL
	• <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12624)	≥1024 µg/mL
	• <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	≥32 µg/mL
	• <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8325)	6 mg/mL
	• <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA	30 mg/mL
	• <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175T)	4 µg/mL
	• <i>Streptococcus mutans</i>	0.1, 0.2, 0.5 p%
	• <i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 33478 T)	8 µg/mL
	• <i>Streptococcus pneumoniae</i>	4 µg/mL
	• <i>Salmonella typhi</i>	50 µg/mL
	• <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504)	50 µg/mL
	• <i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina	3 µg/mL
	• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	10 µg/mL
	• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (27294)	6.25 & 25 µg/mL
	• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (RMP _r) resistente a rifampicina	25 µg/mL
	• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> INH _r (35822)	6.25 y 25 µg/mL
	• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> RIF-R (35838)	25 µg/mL
• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EMB-R (35837)	25 µg/mL	
• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> STR-R (35820)	12.5 µg/mL	
• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MMDO	25 µg/mL	



Cuadro 5. Resumen de actividades antimicrobianas medidas por el ácido ursólico [modificado de Kashyap *et al.*, 2016 (continuación)].

Efecto	Organismo	MIC
Antiviral	• Citomegalovirus de cerdo (GPCMV)	6.8 µg/mL
	• Virus del papiloma humano tipo 11	12.41 µg/mL
	• Virus de la influenza tipo A (H1N1)	>200 µg/mL
	• Virus de la influenza tipo A (H5N1)	6.00-9.25 mM
	• Virus de hepatitis C (HCV)	58.4 l µg/mL
	• Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)	0.3 µM
Antiparasitario	• <i>Setaria cervi</i>	5 µg/mL
	• <i>Wuchereria bancrofti</i>	5 µg/mL
	• <i>Trypanosoma cruzi</i> (Y strain)	25 mg/kg
	• <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	1.5 µg/mL
	• <i>Plasmodium falciparum</i> K1	49 µg/mL
	• <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	12.7 µg/mL
Antifúngico	• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.84 µg/mL



2. JUSTIFICACIÓN

México es un país que mantiene apego importante a sus tradiciones ancestrales. La medicina herbolaria tradicional se ha utilizado desde la época prehispánica para el tratamiento de diversos padecimientos por los pueblos nativos. La pingüica es uno de los vegetales que se ha reconocido desde esta época por sus propiedades medicinales y su utilidad para el tratamiento de diversos padecimientos en distintas regiones del país.

A pesar de que la pingüica es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana, es escasa la información disponible sobre su composición química. Con base en estos antecedentes se hace evidente la necesidad de estudios conducentes a determinar el contenido metabólico de las hojas de la especie.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar los componentes químicos mayoritarios presentes en el extracto etanólico derivado de las hojas de *A. pungens*.

3.2 Objetivos particulares

- Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva de las diferentes publicaciones relacionadas con *A. pungens*.
- Preparar un extracto etanólico a partir de las hojas desecadas de *A. pungens* (pingüica).
- Fraccionar el extracto etanólico utilizando cromatografía en columna al vacío.
- Realizar la separación, aislamiento y purificación de los componentes mayoritarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de la pingüica.
- Establecer la estructura química de los compuestos aislados mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Obtención de muestra vegetal de hojas de *A. pungens*

Las hojas de *A. pungens* se obtuvieron en el municipio de Aculco de Espinoza, Estado de México, México. Las hojas se recolectaron íntegras y se secaron al aire libre. La obtención estuvo a cargo del Dr. José Fausto Rivero Cruz y una muestra de referencia se conserva en el Laboratorio 111 del Conjunto E del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

4.2. Tratamiento del material vegetal

Las hojas secas se trituraron empleando un molino manual y se pesaron en una balanza granataria obteniendo 3.54 kg de material triturado.

4.3. Métodos generales de análisis

4.3.1. Análisis cromatográficos

La cromatografía líquida al vacío (CLV) se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck) en diversos sistemas de elución.

Para los análisis cromatográficos en capa fina se emplearon placas de aluminio cubiertas en gel de sílice (60) F₂₅₄ Merck, en diversos tamaños y sistemas de elución. Las placas se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ nm y 365 nm, posteriormente se revelaron con anhisaldehído sulfúrico seguido de calentamiento hasta la visualización de marcas.

4.3.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los espectros de masas se generaron en un equipo Agilent 6890L por impacto electrónico a 70 EV y el analizador másico de tiempo de vuelo.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron de un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se



disolvieron en piridina- d_5 y los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al tetrametilsilano.

4.4. Estudio químico de las hojas de *A. pungens*

4.4.1. Preparación del extracto etanólico

Para la obtención del extracto de pingüica se utilizó el método de maceración en alcohol etílico 96° calidad USP. Se colocaron los 3.54 kg de hojas secas trituradas en un frasco, se adicionaron 9 L de etanol y se dejaron macerar durante un período de siete días. Este proceso se repitió tres ocasiones utilizando las mismas condiciones. Posteriormente el extracto etanólico se separó del material vegetal por filtración. El etanol se recuperó a presión reducida con el auxilio de un rotaevaporador. El proceso global permitió la obtención de 698.74 g de un extracto de consistencia pegajosa y de color verde oscuro. En la Figura 8 se puede observar un resumen del procesamiento de la muestra vegetal de hojas de *A. pungens*.

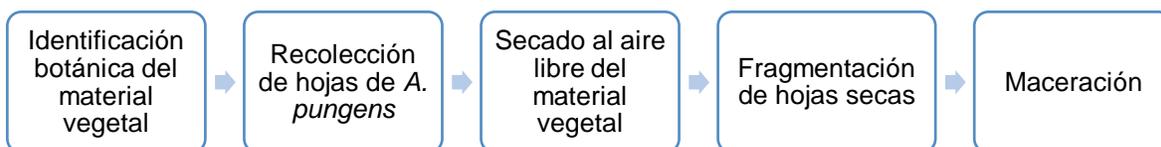


Figura 8. Resumen del procesamiento de muestra vegetal de hojas de *A. pungens*.

4.4.2. Fraccionamiento primario

Para la columna de cromatografía líquida al vacío se utilizó una porción del extracto (199.64 g), la cual se resuspendió en 300 mL de una mezcla de CH_2Cl_2 :acetona (20:80). Este extracto se adsorbió en 300 g de gel de sílice y se montó en una columna de 800 g de gel de sílice como se muestra en el esquema



de la Figura 9. La elución de la columna se realizó utilizando un gradiente de polaridad y como disolventes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt y metanol.



Figura 9. Esquema de columna de cromatografía líquida al vacío, montada con muestra vegetal de hojas de pingüica.

De este primer fraccionamiento se obtuvieron 101 fracciones de 1 L cada una. El disolvente se evaporó a presión reducida con el auxilio de un rotaevaporador y cada fracción se monitoreó por placa de cromatografía en capa fina. Se agruparon las fracciones que presentaron similitudes cromatográficas al observar las placas bajo luz UV y reveladas utilizando como agente cromógeno el anisaldehído sulfúrico. El proceso global permitió la obtención de 32 fracciones combinadas. En el Cuadro 6 se resume el fraccionamiento primario.



Cuadro 6. Fracciones obtenidas de la primera columna de cromatografía líquida al vacío con proporción de disolventes, fracciones agrupadas y peso total de la fracción.

Fracciones	Disolventes y proporción (%)	Fracciones agrupadas	Peso total (g)
1-6	Hex (100)	(1-2) A	0.0378
		(3-6) B	0.0107
7-12	Hex-CH ₂ Cl ₂ (98:2)	(7-8) C	0.0028
		(9-12) D	0.0473
13-24	Hex-CH ₂ Cl ₂ (96:4)	(13-14) E	0.0061
		(15-18) F	0.0102
		(19-24) G	0.8937
25-30	Hex-CH ₂ Cl ₂ (94:6)	(25-30) H	0.294
31-38	Hex-CH ₂ Cl ₂ (92:8)	(31-33) I	0.0418
		(34-36) J	0.082
		(37-38) K	0.0141
39-44	Hex-CH ₂ Cl ₂ (90:10)	(39-41) L	0.022
		(42-44) M	0.0334
45-47	Hex-CH ₂ Cl ₂ (85:15)	(45-47) N	0.0222
48-53	Hex-CH ₂ Cl ₂ (80:20)	(48-50) O	0.0162
		(51-53) P	0.2095
54-57	Hex-CH ₂ Cl ₂ (70:30)	(54-57) Q	0.5835
58-63	Hex-CH ₂ Cl ₂ (50:50)	(58-63) R	1.2095
64-68	Hex-CH ₂ Cl ₂ (40:60)	(64-66) S	0.1337
		(67-68) T	1.5453



Cuadro 6. Fracciones obtenidas de la primera columna de cromatografía líquida al vacío con proporción de disolventes, fracciones agrupadas y peso total de la fracción (continuación).

Fracciones	Disolventes y proporción (%)	Fracciones agrupadas	Peso total (g)
69-84	AcOEt-CH ₂ Cl ₂ (40:60)	(69) U	26.6828
		(70-72) V	132.7513
		(73-75) W	9.4968
		(76) X	0.8608
		(77) Y	0.9493
		(78-81) Z	6.799
		(82-84) A1	1.7322
85-87	AcOEt-CH ₂ Cl ₂ (50:50)	(85-87) B1	2.2731
88-94	AcOEt (100)	(88-90) C1	5.1394
		(91-94) D1	8.0814
95-98	AcOEt-MeOH (50:50)	(95-98) E1	78.7887
99-101	MeOH (100)	(99-101) F1	24.4697

4.4.3. Fraccionamiento secundario a partir de las fracciones FH-U, FH-V y FH-W.

Las fracciones FH-U, FH-V y FH-W derivadas del fraccionamiento primario se combinaron, obteniendo un peso de 168.93 g. La fracción combinada resultante se resuspendió en 300 mL de una mezcla de AcOEt:CH₂Cl₂ (40:60) y se adsorbió en gel de sílice. Esta mezcla se empacó en una columna de cromatografía líquida al vacío y se realizó la elución utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad con hexano y acetona como se resume en el Cuadro 6.

En este proceso se obtuvieron 67 fracciones de 1 L y a cada una se le evaporó el disolvente a presión reducida con el auxilio de un rotaevaporador. El monitoreo de las fracciones y su agrupamiento se realizó como se describió previamente para el



fraccionamiento primario. Las fracciones se agruparon para obtener finalmente 22 fracciones combinadas. En el Cuadro 7, se resume el fraccionamiento secundario.

Cuadro 7. Fracciones obtenidas de la segunda columna de cromatografía líquida al vacío con proporción de disolventes y peso total de la fracción.

Fracciones	Proporción Hexano:Acetona	Fracciones agrupadas	Peso total (g)
1-2	100	(1-4) A2.0	0.003
3-5	98:2	(5) A2.1	0.2293
6-28	96:4	(6-7) A2.2	0.0413
		(8) A2.3	0.0672
		(9-11) A2.4	0.1386
		(12-15) A2	0.515
		(16-21) B2	0.2853
		(22-28) C2	0.0722
		29-39	94:6
(35-39) E2	0.0496		
40-42	92:8	(40-45) F2	0.1795
43-44	90:10		
45-46	88:12		
47-48	86:14	(46-47) F2.0	0.1515
		(48) G2	0.3072
49	84:16	(49-50) H2	1.3
50-53	80:20	(51-52) I2	6.4
		(53-55) J2	35.9
54	75:25	(56) K2	2.4
55	70:30		
56	65:35		
57-60	60:40	(57-58) L2	12.9
		(59-60) M2	3.2143
61	55-45	(61-62) N2	2.5643
62-64	50:50	(63-64) O2	1.066
		(65-67) P2	5.2327
65-66	30-70		
67	100		

En la Figura 10 se resume en forma esquemática el estudio fitoquímico realizado con el extracto etanólico de la muestra de hojas de pingüica el cual permitió el aislamiento de tres compuestos triterpenoides: ácido ursólico y una mezcla de uvaol y eritrodiol.

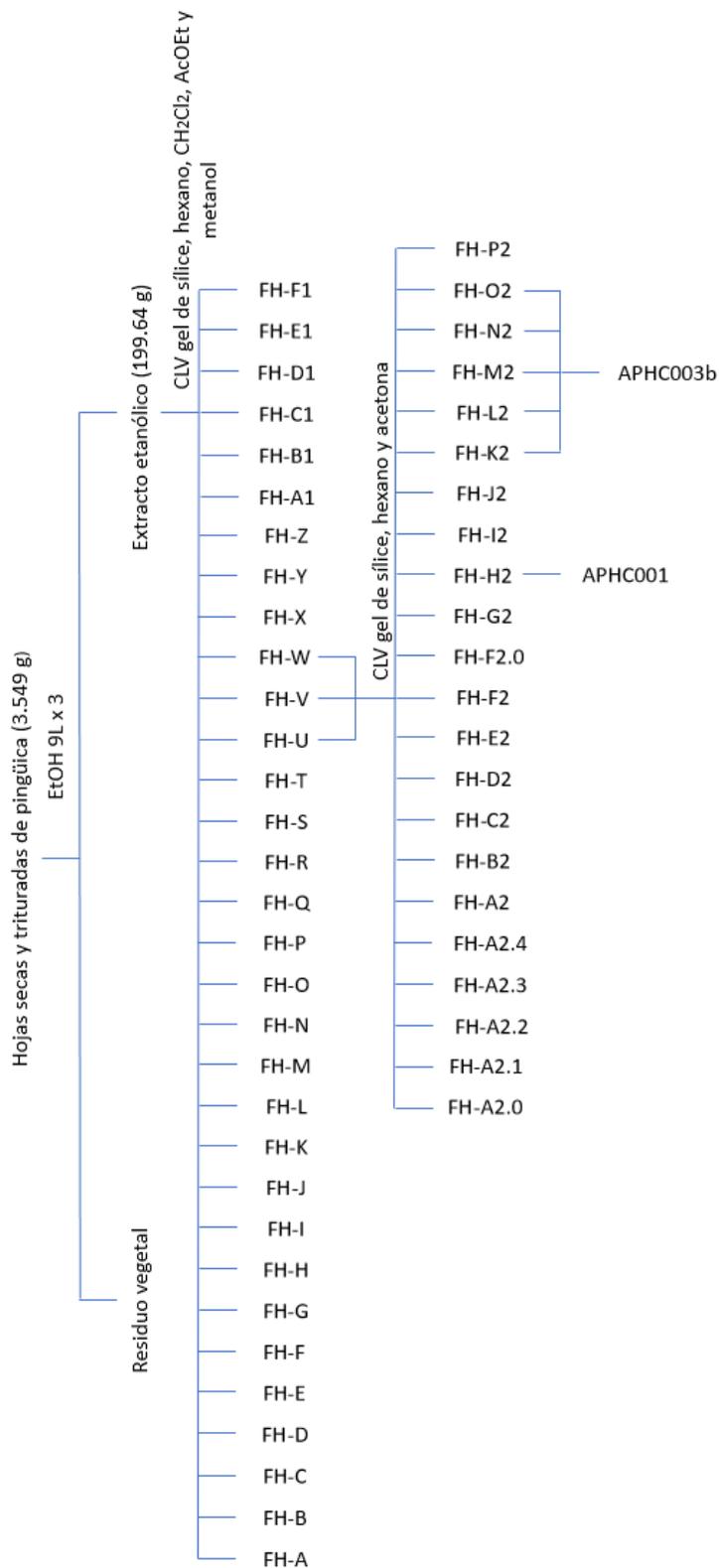


Figura 10. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada de *A. pungens*.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los diferentes procesos cromatográficos realizados al extracto etanólico de la muestra de hojas de *Arctostaphylos pungens* (pingüica), se aislaron el ácido ursólico y una mezcla de uvaol y eritrodiol como compuestos mayoritarios. A continuación, se expondrán las evidencias espectroscópicas y espectrométricas que permitieron la determinación de las estructuras moleculares de cada una de las sustancias aisladas.

5.1. Caracterización estructural del ácido ursólico (APH-C003b).

De las fracciones FH-K2, FH-L2, FH-M2, FH-N2 y FH-O2, del fraccionamiento secundario, se obtuvo un precipitado (21.07 g) que fue identificado como ácido ursólico por comparación con las constantes espectroscópicas y espectrométricas reportadas previamente en la literatura (Seebacher *et al.*, 2003).

El compuesto APH-C003b se aisló como un sólido de color blanco ligeramente soluble en MeOH caliente. A continuación, se describen las señales más relevantes encontradas en los espectros de RMN:

En el espectro de RMN-¹H (Figura 11) se observó la presencia de: (a) una señal ancha en δ_H 5.80 asignable a un metino olefínico (H-12), (b) en δ_H 3.75 (dd, $J= 9.6, 6.0$ Hz, H-3) un doble de dobles que integra para un protón asignable a un metino oxigenado (H-3), (c) δ_H 1.32 ($J= 6.4$ Hz, H-29) y δ_H 1.27 ($J= 6.4$ Hz, H-30) se observaron dos dobletes que integraban para tres protones cada uno, asignables a dos metilos alifáticos y (d) cinco señales simples en δ_H 1.57 (H-23), 1.56 (H-27), 1.37 (H-24), 1.20 (H-25), 1.24 (H-26) asignables a los metilos cuaternarios.

El espectro de RMN-¹³C (Figura 12) mostró la presencia de 30 señales consistentes con un compuesto de naturaleza triterpénica. Las señales más relevantes corresponden a un grupo carbonilo de ácido en δ_C 180.4 (C-28), un carbono cuaternario olefínico en δ_C 139.8 (C-13), un metino olefínico en δ_C 126.0 (C-12), un metino oxigenado en δ_C 78.6 (C-3) y siete metilos (δ_C 28.6, 25.7, 24.1, 18.0, 17.1, 16.2, 17.9).



Con base en las evidencias descritas se concluyó que el compuesto APHC003b es un triterpenoide pentacíclico de tipo ursano y se identificó como ácido ursólico a partir de la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura (Houghton *et al.*, 1986; Dong-Hyun *et al.*, 2005).

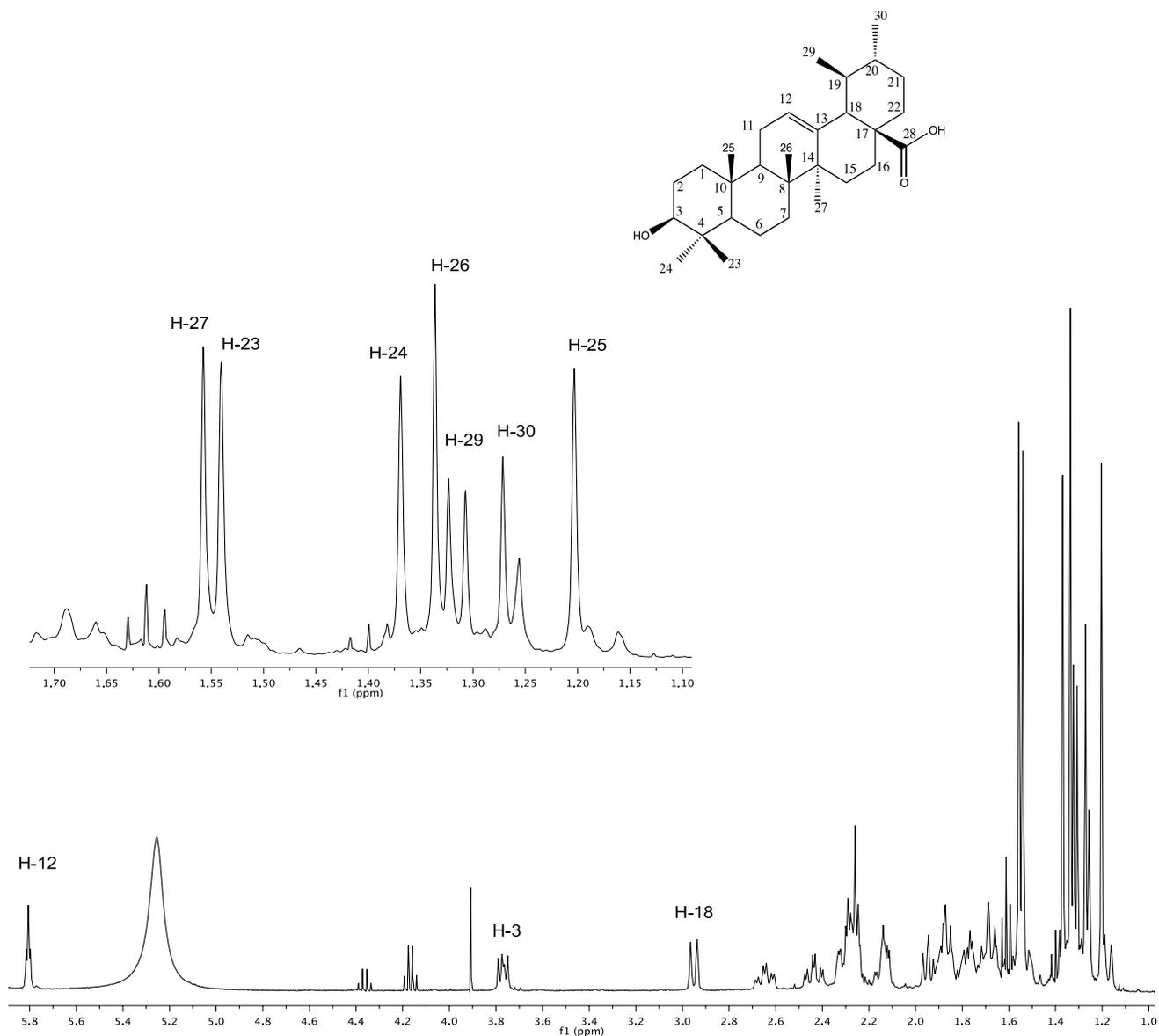


Figura 11. Espectro RMN-¹H del ácido ursólico (400 MHz, piridina-*d*₅).

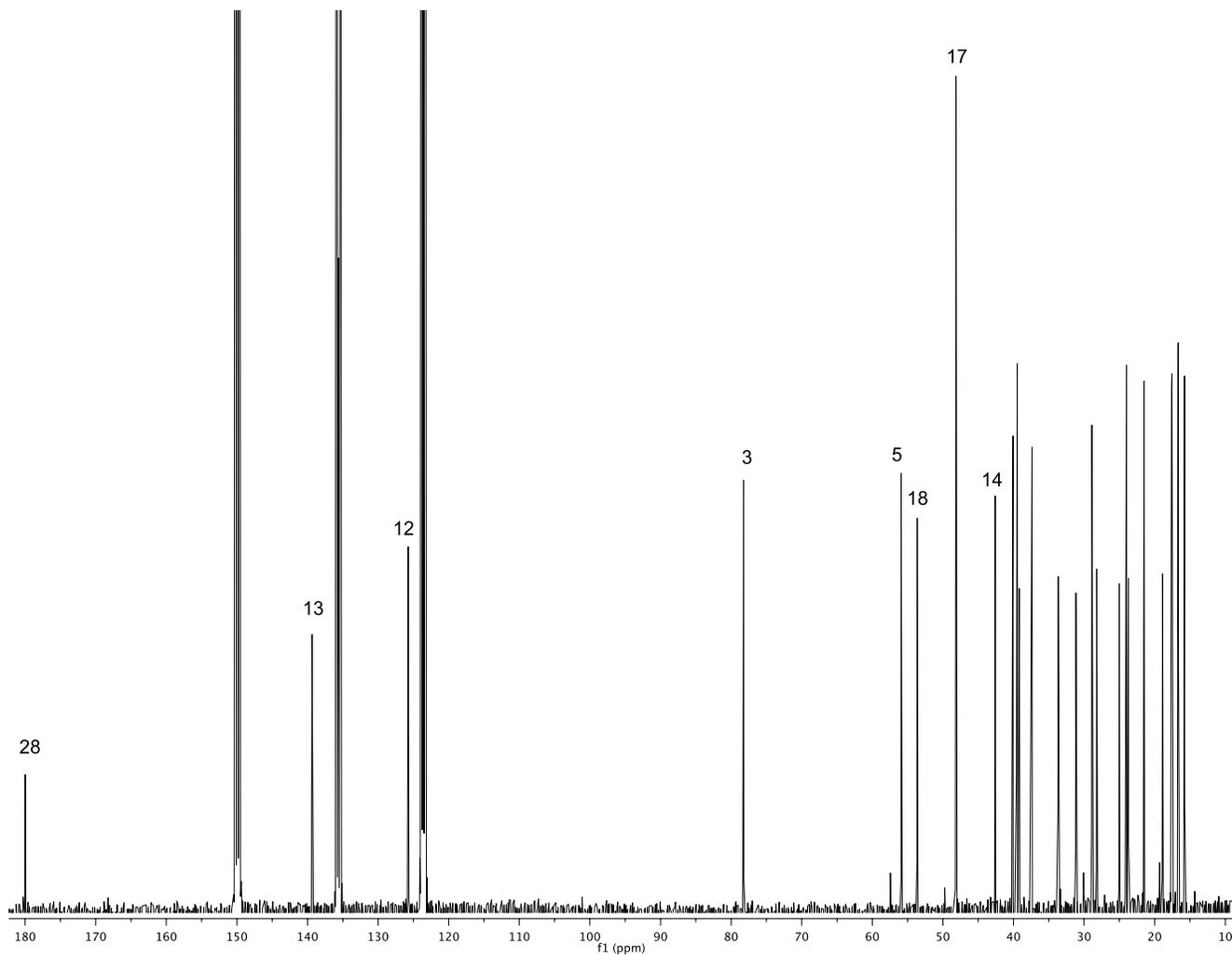
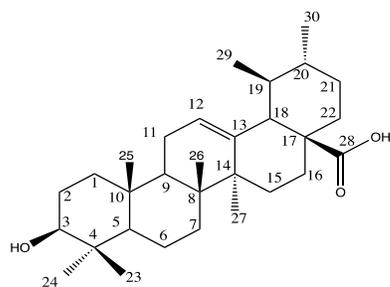


Figura 12. Espectro RMN-¹³C del ácido ursólico (100 MHz, piridina-*d*₅).



5.2. Caracterización estructural de una mezcla de uvaol y eritrodiool (APH-C001) como compuestos mayoritarios

De la fracción FH-H2, del fraccionamiento secundario, se obtuvo un precipitado (1.3 g) de color blanco ligeramente soluble en MeOH caliente. Los espectros de -RMN-¹H (Figura 13) y RMN-¹³C (Figura 14) mostraron el perfil típico para un triterpeno. A continuación, se describen las señales más relevantes encontradas en los espectros de RMN:

En el espectro de RMN-¹H, en δ_H 5.26 se observó un triplete con una constante de acoplamiento de 3.5 Hz asignable a un metino olefínico H-12. En δ_H 3.89 se observó un doblete asignable a un metileno oxigenado H-28b y en δ_H 3.48 se observaron sobrepuestos H-28a con H-3. En δ_H 1.28 (H-23), δ_H 1.25 (H-27), δ_H 1.08 (H-26), 1.05 (H-24), 0.99 (H-30), 0.97 (H-29), 0.97, 0.97 (H-25) se observaron siete señales asignables a siete metilos alifáticos. **RMN ¹H** (400 MHz, piridina-*d*₅): δ_H 5.26 (1H, *t*, H-12), 3.89 (1H, *d*, H-28b), 3.48 (1H, *sobrepuesto*, H-28a, H-3), 1.28 (3H, *s*, H-23), 1.25 (3H, *s*, H-27), 1.08 (3H, *s*, H-26), 1.05 (3H, *s*, H-24), 0.99 (3H, *s*, H-30), 0.97 (3H, *s*, H-29), 0.97 (3H, *s*, H-25) (Figura 13).

El espectro de RMN-¹³C mostró la presencia de las 30 señales principales correspondientes a uvaol y otras correspondientes a un segundo compuesto (eritrodiool). Las señales más relevantes para el uvaol corresponden a un carbono cuaternario olefínico en δ_C 140.05 (C-13), un metino olefínico en δ_C 125.44 (C-12), un metino oxigenado en δ_C 78.45 (C-3), un metileno oxigenado en δ_C 68.45 (C-28), y siete metilos (δ_C 29.16, 24.02, 22.04, 17.36, 19.98, 16.36, 16.15). Estas señales son consistentes con la presencia del uvaol (El-shiekh *et al.*, 2017). **RMN ¹³C** (100 MHz, piridina-*d*₅): δ_C 140.05 (C-13), 125.44 (C-12), 78.45 (C-3), 68.45 (C-28), 56.14 (C-5), 55.05 (C-18), 48.44 (C-9), 42.42 (C-14), 39.81 (C-19), 39.81 (C-20), 39.69 (C-4), 36.66 (C-1), 39.52 (C-17), 37.59 (C-10), 37.59 (C-22), 33.85 (C-7), 31.64 (C-21), 29.16 (C-23), 26.95 (C-15), 24.24 (C-11), 24.24 (C-16), 24.02 (C-27), 22.04 (C-30), 19.17 (C-6), 17.36 (C-29), 19.98 (C-26), 16.36 (C-24) 16.15 (C-25) (Figura 14).



Por otra parte, es importante mencionar que adicionalmente se observaron señales asignables al eritrodíol en δ_C 145.50 correspondiente al carbono cuaternario olefínico (C-13) y en δ_C 122.86 correspondiente al metino olefínico (C-12); también en el espectro de RMN- 1H se observa dos dobletes localizados en δ_H 3.49 y 3.89 asignables a H-28a y H-28b los cuales concuerdan con las señales en δ_C 69.07 y δ_C 69.55 en el espectro de RMN- ^{13}C asignable al C-28 de ambas sustancias (Olivera *et al.*, 2012).

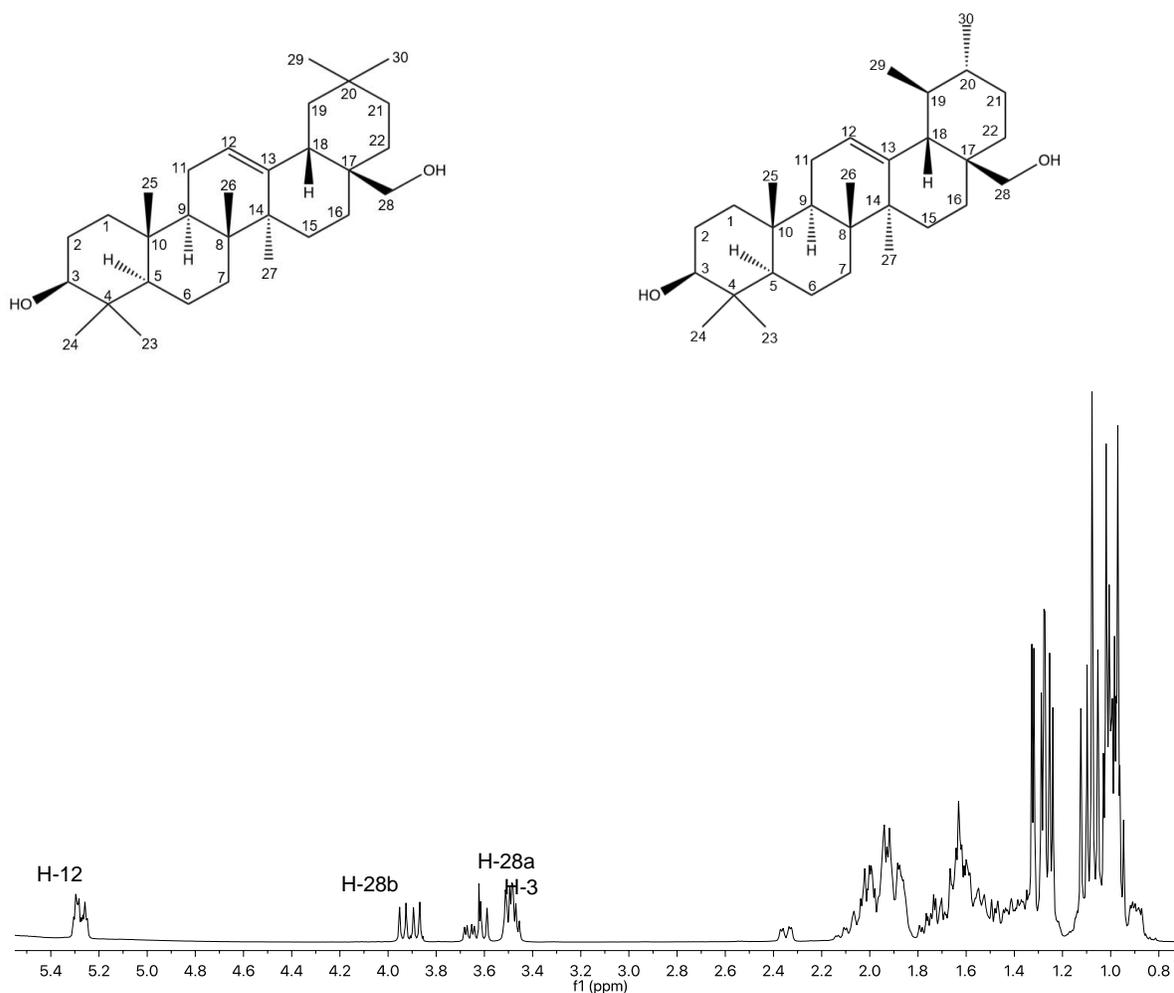


Figura 13. Espectro RMN- 1H de la mezcla de uvaol y eritrodíol (400 MHz, piridina-*ds*).

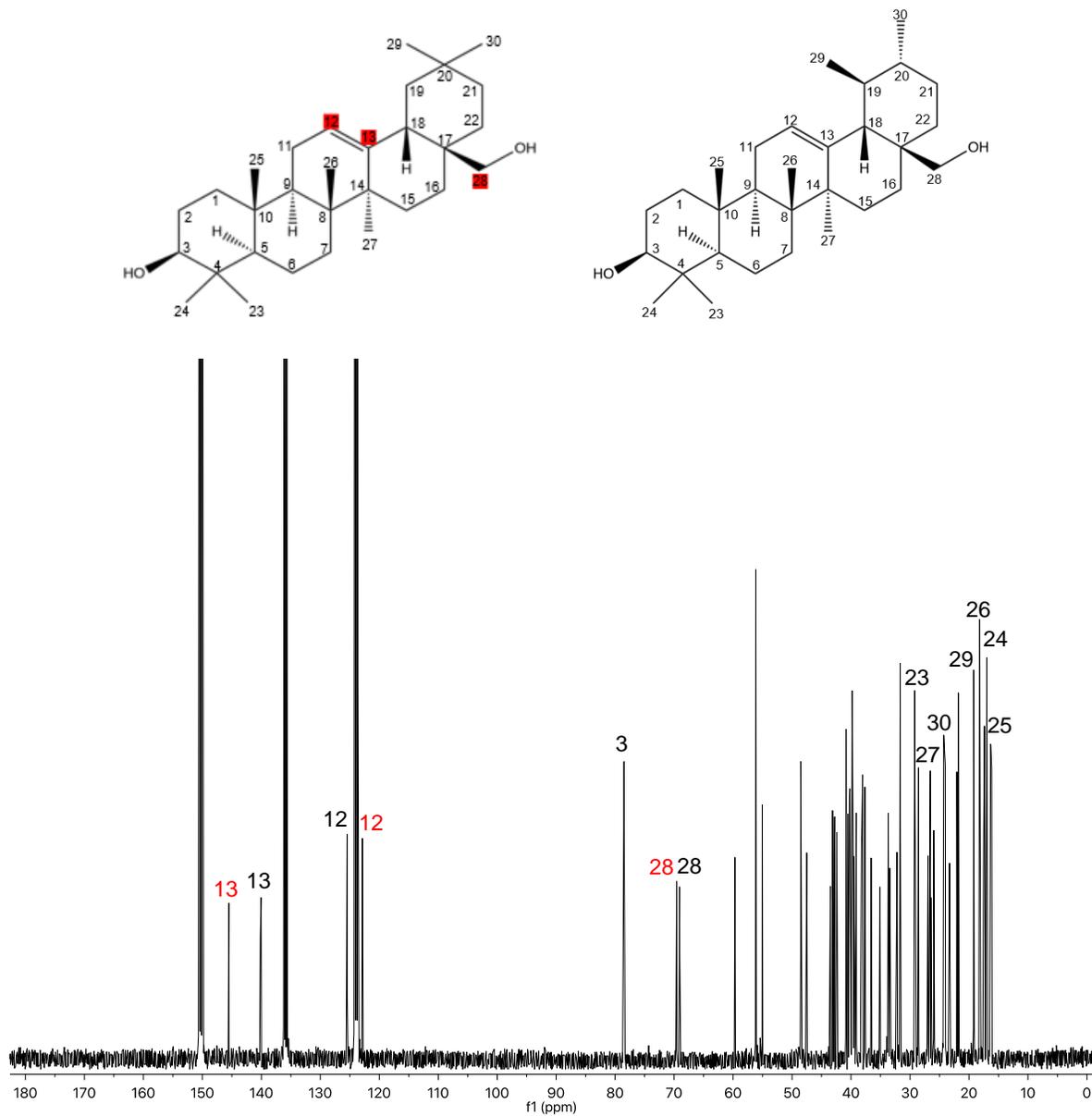


Figura 14. Espectro RMN- ^{13}C de la mezcla de uvaol y eritriol (100 MHz, piridina- d_5).



La estructura del uvaol se confirmó utilizando los espectros COSY, HMBC y HMQC, por comparación con los datos reportados en la literatura y con los espectros de una muestra comercial de uvaol (Figuras 15 y 16) (Seebacher *et al.*, 2003; El-shiekh *et al.*, 2017). **RMN ¹H uvaol comercial** (400 MHz, piridina-d₅): δ_H 5.26 (1H, *t*, H-12), 3.89 (1H, *d*, H-28b), 3.48 (1H, *sobrepuesto*, H-28a, H-3), 1.28 (3H, *s*, H-23), 1.25 (3H, *s*, H-27), 1.08 (3H, *s*, H-26), 1.05 (3H, *s*, H-24), 0.99 (3H, *s*, H-30), 0.97 (3H, *s*, H-29), 0.97 (3H, *s*, H-25) (Figura 15). **RMN ¹³C uvaol comercial** (100 MHz, piridina-d₅): δ_C 139.4 (C-13), 124.8 (C-12), 77.9 (C-3), 68.9 (C-28), 55.1 (C-5), 54.4 (C-18), 47.9 (C-9), 42.2 (C-14), 39.6 (C-20), 39.56 (C-19), 39.2 (C-4), 39.0 (C-1), 38.5 (C-17), 36.9 (C-10), 36.9 (C-22), 33.0 (C-7), 31.0 (C-21), 28.6 (C-23), 26.3 (C-15), 23.4 (C-11), 23.4 (C-16), 23.4 (C-27), 21.4 (C-30), 18.5 (C-6), 17.6 (C-29), 16.7 (C-26), 16.3 (C-24), 15.7 (C-25) (Figura 16). Con base en las evidencias descritas se concluyó que la mezcla APH-C001 contiene uvaol y eritrodiol. La identificación de estos triterpenos es consistente con lo reportado por Dominguez (1983) quien del extracto metanólico de hojas y frutos de pingüica aisló ácido ursólico y uvaol, los cuales identifico mediante sus reacciones, puntos de fusión y datos espectroscópicos. Con este trabajo es la primera vez que se describe la presencia de eritrodiol en las hojas de *A. pungens*.

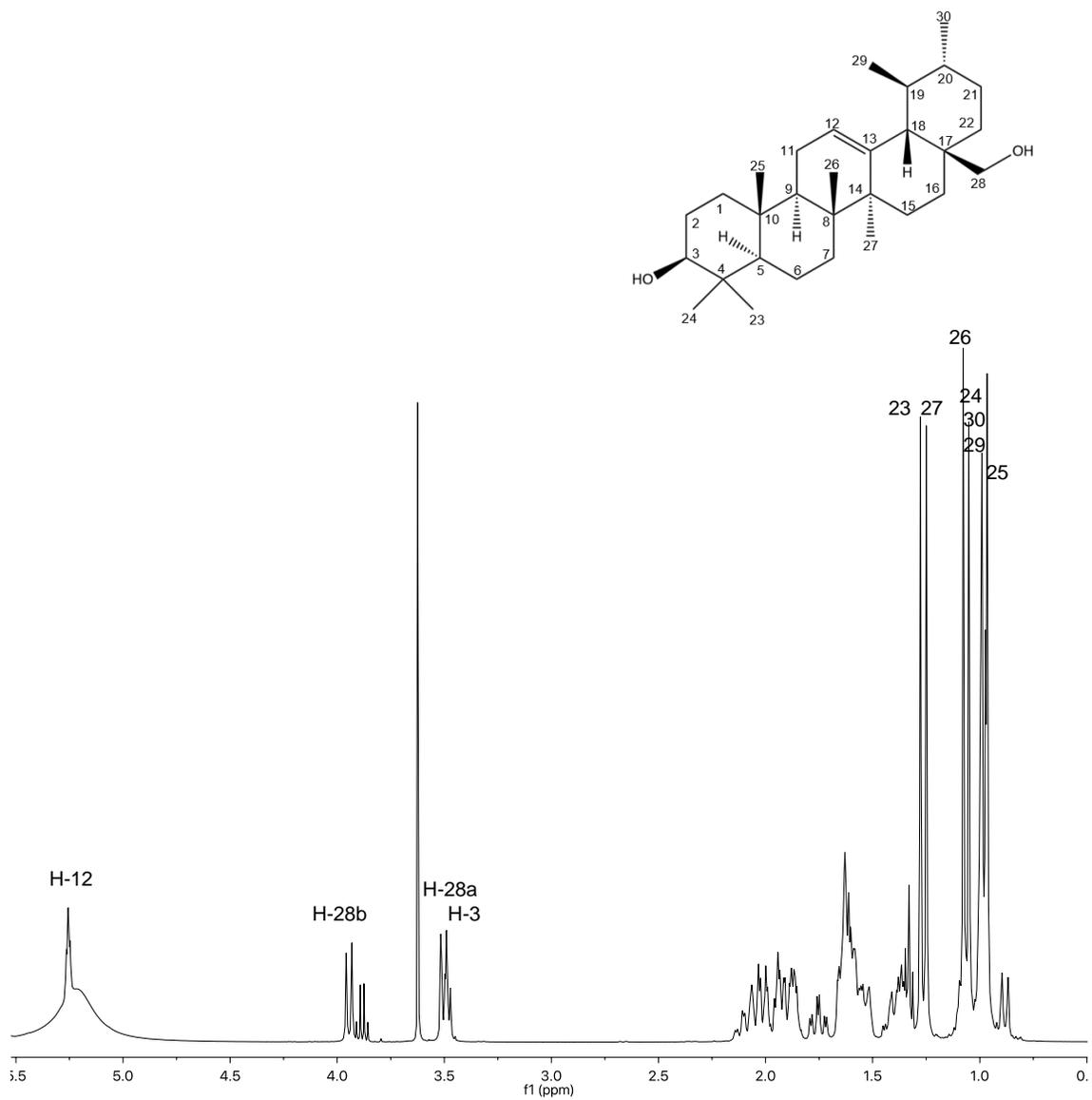


Figura 15. Espectro RMN-¹H de estándar comercial de uvaol (400 MHz, piridina-*d*₅).

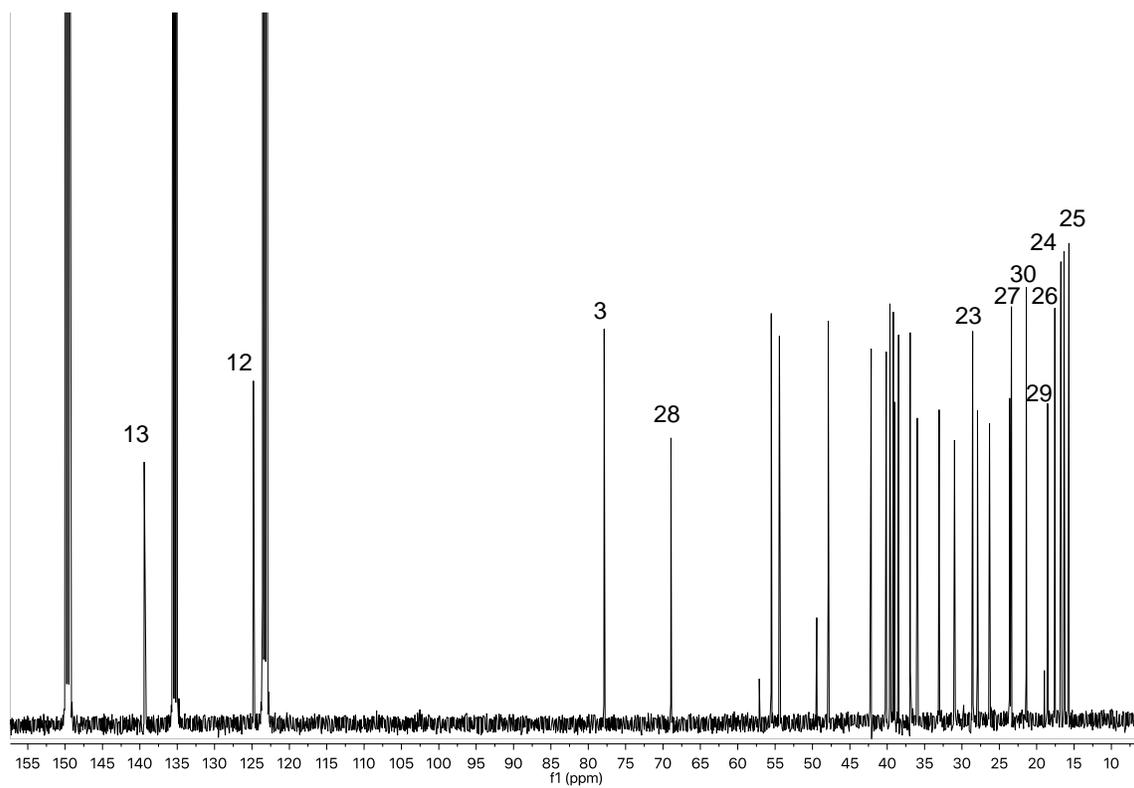
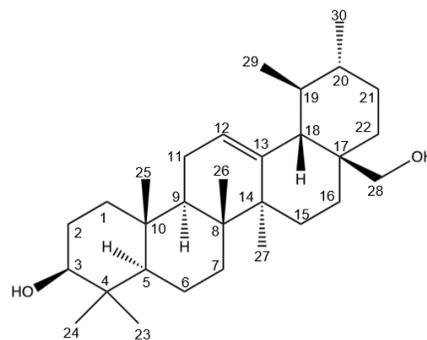


Figura 16. Espectro RMN- ^{13}C de estándar comercial de uvaol (100 MHz, piridina- d_5).



6. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico de las hojas de *Arctostaphylos pungens*, contribuyó al conocimiento de su contenido metabólico, mediante el aislamiento y caracterización del ácido ursólico como compuesto principal y una mezcla de uvaol y eritrodiol los cuales se identificaron mediante la comparación con sus constantes espectroscópicas y espectrométricas reportadas previamente en la literatura.



7. PERSPECTIVAS

Continuar con el estudio fitoquímico de las fracciones restantes de los fraccionamientos del extracto etanólico de la muestra de hojas secas de *Arctostaphylos pungens*.

Estudiar muestras de hojas de pingüica provenientes de distintas regiones para analizar la influencia de la región geográfica sobre el contenido metabólico de triterpenos.

Evaluar actividades biológicas de los compuestos aislados y elucidar su mecanismo de acción.



8. Referencias Bibliográficas

- Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez Quesada, C., Uceda, M., Beltrán, G., & Gaforio, J. (2010). Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cell and Their Effects on DNA Damage. *J. Agric. Food Chem*, 121-130. doi:<http://doi.org/10.1021/jf102319y>
- Ávalos, A. G., & Pérez Urria, E. C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, 119-145.
- Batisra de Freitas Tostes, J., Jun Nakamura, M., Gomes Franca de Saboya, C., Mazzei, J. L., & Siani, A. C. (2016). Efficient and selective method to separate triterpene acids by direct treatment of apple peels with alkaline ethanol. *Separation Science and Technology*, 51:12, 1986-1993. doi:10.1080/01496395.2016.1200088
- ChEBI*. (2019). Obtenido de <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:67939>
- Costa Agra, L., Lins, M. P., da Silva Marques, P., Smaniotto, S., Bandeira de Melo, C., Lagente, V., & Barreto, E. (2016). Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *European Journal of Pharmacology*, 232-242. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.056>
- 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.
- Dong-Hyun, K., Kyung-Min, H., in-Sik, C., Dae-Keun, K., Sung-Hoon, K., Byoung-Mog, K., . . . Nam-In, B. (2005). Triterpenoids from the Flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. as Human Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase Inhibitors. *Archives of Pharmacal Research*, 28(5), 550-556.



- Douglas, K. (2016). Phytochemistry and Antimicrobial Activity of Extracts from Medicinal Plant *Olea africana* and *Olea europea*. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 1-7. doi:10.9734/IJBCRR/2016/25863
- El-shiekh, R. A., Al-Mahdy, D. A., Hifnawy, M. S., Tzanova, T., Evain-Bana, E., Philippot, S., . . . Abdelsattar, E. A. (2017). Chemical and Biological Investigation of *Ochrosia elliptica* Labill. Cultivated in Egypt. *Re. Nat. Prod.*, 10-11.
- González Elizondo, S. (22 de Noviembre de 2012). *Naturalista*. Obtenido de <https://www.naturalista.mx/photos/4614663>
- Houghton, P., & Lian, L. (1986). Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*. *Pergamon Journal Ltd., Phytochemistry*, 25(8), 1939-1944.
- iNaturalist Org. (2019). *iNaturalista Org.* (R. iNaturalist Org, Productor, & Iniciativa conjunta por la California Academy of Sciences y la National Geographic Society.) Recuperado el 02 de 04 de 2019, de Conabio: <https://www.naturalista.mx/taxa/58892-Arctostaphylos-pungens>
- Instituto Nacional Indigenista. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. D. F., México: Instituto Nacional Indigenista.
- Kashyap, D., Shama, A. K., & Tuli, H. S. (2016). Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *ELSERVIER*, 201-210. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>
- Linares Mazari, E., Flores Peñafiel, B., & Bye, R. (1988). Selección de plantas medicinales de México. En *Selección de plantas medicinales de México* (págs. 70-71). D.F., México: Sistemas Editoriales Técnicos, S.A. de C.V. . Recuperado el 04 de 2019
- Márquez Linares, M. A., Jurado, E., & González Elizondo, S. (Enero-Marzo de 2006). Algunos aspectos de la biología de la manzanita (*Arctostaphylos pungens* HBK) y su papel en el desplazamiento de bosques templados por chaparrales. *Ciencia UANL*, IX(1), 57-64. Obtenido de http://eprints.uanl.mx/1741/1/art_manzanita.pdf



- Martínez García, B., Verardo, V., León, L., De la Rosa, R., Arráez Roman, D., Segura Carretero, A., & Gómez Caravaca, A. M. (2018). GC-QTOF-MS as valuable tool to evaluate the influence of cultivar and sample time on olive leaves triterpenic components. *Food Research International*, 219-226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.085>
- Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales de México*. D.F., México: Ediciones botas. Recuperado el 2019
- Martins, A., Vasas, A., Schelz, Z., Viveiros, M., Molnár, J., Hohmann, J., & Amaral, L. (2010). Constituents of *Carpobrotus edulis* Inhibit P-Glycoprotein of MDR1-transfected Mouse lymphoma cells. *Anticancer Research*, 829-836.
- Martins, A., Vasas, A., Viveiros, M., Molnár, J., Hohmann, J., & Amaral, L. (2011). Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 438-444. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.016
- Morocho, V., Valle, A., García, J., Gilardoni, G., Cartuche, L., & Suárez, A. I. (2018). α -Glucosidase Inhibition and Antibacterial Activity of Secondary Metabolites from the Ecuadorian Species *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts. *Molecules MDPI*, www.mdpi.com/journal/molecules. doi:10.3390/molecules23010146
- NIST. (2019). Obtenido de Libro del Web de Química del NIST, SRD 69: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C545460&Mask=2000>
- Oliveira, C. A., Viana, C. B., & Martins, C. C. (2017). Biologically active triterpenes from *Eugenia pisiformis* Cambess (Myrtaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 98-99. doi:10.25004/IJPSDR.2017.090211
- Olivera, J., Ferreira, É., Chaves, M., Militao, G., Júnior, G., Costa, A., . . . Costa-Lotufo, L. (2012). Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.



- Panusa, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Multari, G., & Gallo, F. R. (2015). UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*. A comparative study of phenolic compounds from leaf methanolic extracts. *Elsevier*, 79-88. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.01.002>
- Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M. A., & Verde Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Nuevo León, Universidad Autónoma de Nuevo León, México: Omniascience.
- Romana Gallo, F., Multari, G., Pagliuca, G., Panusa, A., Palazzino, G., Giambenedetti, M., . . . Nicoletti, M. (2013). Bearberry identification by multidisciplinary study on commercial raw materials. *Taylor & Francis, Natural Product Research*, 27(8), 735-742. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.696253>
- Romero, C., García, A., Medina, E., Ruíz Méndez, M. V., de Castro, A., & Brenes, M. (2009). triterpenic acids in table olives. *Elsevier Food Chemistry*, 670-674. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.037
- Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., & Kunert, O. (2003). Spectral Assignments and Reference Data. *Wiley InterScience*. doi:10.1002/mrc.1214
- UNAM. (2009). *BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 11 de 2018, de Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ping%C3%BCica&id=7917>
- Unidad de Informática del Instituto de Química. (2019). Obtenido de <https://uniiquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/eritrodiol-1654/>
- Zhang, X. (2019). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 03 de 04 de 2019, de https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/