

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PREPARACIÓN QUÍMICO-ENZIMÁTICA DE *P*-HIDROXICINAMATOS
DE TRITERPENOS ANÁLOGOS A LOS COMPUESTOS RESPONSABLES
DE LAS PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DEL ARÁNDANO”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ BRENDA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MÉXICO D.F 2005

m350899



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

Presidenta: SOTELO LÓPEZ ANGELA

Vocal: VALDIVIA LÓPEZ MARIA DE LOS ANGELES

Secretario: NAVARRO OCAÑA ARTURO

1^{er} suplente: LEON FELIX MARCO ANTONIO

2^{do} suplente: ARGOTE ESPINOSA ROSA MARIA

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Laboratorio 321, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM.

Asesor



Dr. NAVARRO OCAÑA ARTURO

Sustentante



GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ BRENDA

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Arturo Navarro Ocaña, por el apoyo, paciencia, orientación que durante cada una de las etapas de la realización de este trabajo me brindó, por su interés en la culminación de mi carrera y sobre todo por la confianza que me tuvo en todo momento.

Gracias.

A las profesoras Ángela Sotelo López y María de los Ángeles Valdivia López por sus sugerencias y aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Dr. Aníbal Bascuñan B., gracias por escucharme y por brindarme consejos durante toda mi carrera.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS.

DEDICATORIAS

A DIOS

Que ha sido la luz que ha alumbrado mi camino durante el transcurso de mi vida, por la fe, fuerza y sabiduría que me ha brindado por tomar cada una de las decisiones que han marcado las etapas de mi crecimiento como ser humano. Por la hermosa familia y amigos que me ha dado. Por permitirme alcanzar ésta meta.

A MI ABUELA IRENE GUTIÉRREZ

Que aunque no éstas aquí a mi lado, sabes que todo lo que he hecho ha sido por ti, que te quiero, te extraño y que quisiera que estés conmigo , pero se que donde quiera que estés me ves y me cuidas y que tengo mucho de tu cariño.

Te extraño abuela y te querré toda mi vida.

A MIS PADRES

Carmen Hernández Estrada y Mario Gutiérrez , por darme la vida, un hogar, una familia y ser mis primeros maestros, que me han llevado de la mano paso a paso en el transcurso de mi vida; por darme la vida, por inculcarme valores como la honestidad, el respeto y la responsabilidad, por enseñarme que las equivocaciones o errores también ayudan a crecer, madurar y ha ser más fuertes cada día; por sus consejos; porque me han impulsado y apoyado en cada una de las metas que me he fijado y que ha base de esfuerzo y sacrificio pudieron darme la herencia más grande que pude haber recibido, MI EDUCACIÓN.

Y sobre todo por ser las personas más nobles , buenas y maravillosas e importantes de mi vida, por su amor y confianza.

Gracias Mamá y papá

A MIS HERMANOS

Mariana y Mario Alberto, que con su cariño, apoyo y consejos, pude salir adelante de los obstáculos en mi camino, que nunca me han dejado sola y nos hemos mantenido unidos, por su motivación en las altas y bajas de mi vida, por ser grandes amigos y unas excelentes personas, por su fe y confianza en mi. Y por todos los momentos compartidos.

Y por que siempre seremos una gran familia.

Los quiero.

A OMAR DEL JESÚS GONZÁLEZ

Con quien he compartido los últimos años de mi vida académica y personal, de quien aprendí grandes lecciones, como el de que los tropiezos, golpes y caídas dolorosas siempre podremos salir adelante si tenemos la fuerza para hacerlo; que para alcanzar las metas fijadas no siempre es necesario sacrificar algo y que los momentos más importantes de nuestra vida son para compartirlos y sobre todo son irrepetibles.

Por lo que significas para mi, por tu apoyo, cariño, paciencia, comprensión y confianza.

Te quiero... Gracias.

A MIS GRANDES AMIGOS

Para ustedes que me han acompañado en el transcurso de mi carrera, que me han hecho ver la vida con optimismo, que me han ayudado y cuidado durante las tormentas más grandes, para ver la luz de un sol brillante en su compañía, con su cariño y sinceridad, por creer y confiar en mi en todo momento y enseñarme a valorar ese sentimiento tan hermoso que es la VERDADERA AMISTAD, por formar parte de esta meta y sobre todo por nuestra amistad que perdurará mientras estemos vivos. Los quiero.

MIL GRACIAS

Y finalmente a mi Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Química por haber sido mi segunda casa en los últimos años de mi vida, en la cual crecí como persona en todos los ámbitos, por darme unos buenos profesores y compañeros de quienes aprendí y que contribuyeron en mi formación académica, por todos los momentos vividos en tus instalaciones.

CON TODO MI AMOR, ADMIRACIÓN Y RESPETO

MUCHAS GRACIAS.

**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ANTECEDENTES	3
1. Nutracéuticos	3
1.1. Origen del concepto de alimento funcional	3
1.2. Términos relacionados	3
1.3. Compuestos funcionales	5
1.4. Estructuras de compuestos funcionales	6
2. Ácidos fenólicos	8
2.1. Ácidos hidroxicinámicos	8
2.2. Esteres de los ácidos hidroxicinámicos	9
3. Triterpenos	12
3.1. β -Amirina	12
3.2. Ácido ursólico	13
3.3. Ésteres de triterpenos	14
4. Biotransformación	22
4.1. Lipasas	23
4.1.1. Fuentes y aplicaciones de lipasas	23
5. Arándano	24
5.1. Valor nutricional	24
5.2. Acciones terapéuticas del arándano	25
5.3. Compuestos fenólicos identificados en el arándano	25
OBJETIVOS	27
1. Objetivo general	27
2. Objetivos particulares	28

MATERIAL Y METODOS	29
1. Material y métodos	29
1.1. Reactivos	29
1.2. Reveladores	29
1.3. Equipo	29
1.4. Análisis espectroscópico de los compuestos obtenidos	29
1.5. Procedimientos generales	30
 DESARROLLO EXPERIMENTAL	 31
1. Diagrama General de trabajo	32
2. Diagrama de obtención de los triterpenos	33
2.1. Primera etapa del desarrollo experimental (Obtención de la β -amirina)	34
2.1.1. Preparación de la muestra	34
2.1.2. Desengrasado	34
2.1.3. Extracción	34
2.1.4. Análisis de extractos	35
2.1.5. Cristalización de la β -amirina	35
2.2. Obtención del ácido ursólico	35
2.2.1. Preparación de la muestra	35
2.2.2. Desengrasado	35
2.2.3. Extracción	36
2.2.4. Análisis de extractos	36
2.2.5. Fraccionamiento por cromatografía en columna	36
3. Diagrama de obtención de los ésteres del ácido cumárico y del ferúlico acetilado	37
3.1. Segunda etapa del desarrollo experimental	37
3.1.1. Acetilación de los ácidos cumárico y ferúlico	37
3.1.2. Formación de cloruros de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados	38
3.1.3. Formación del cumarato y ferulato de β -amirina acetilados	38
4. Diagrama de desacetilación del cumarato y del ferulato de β -amirina	39
4.1. Tercera etapa del desarrollo experimental	39
4.1.1. Desacetilación del cumarato y del ferulato de β -amirina acetilados	39
4.1.2. Purificación de los compuestos finales	40

RESULTADOS	41
1. Obtención de Triterpenos	42
1.1. Obtención de la β -Amirina	42
1.2. Obtención del ácido ursólico	44
2. Obtención de los ésteres del ácido cumárico y ferúlico acetilados	46
2.1. Acetilación de los ácidos cumárico y ferúlico	47
2.2. Formación de los cloruros de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados	49
2.3. Ésterificación de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados	50
3. Obtención del cumarato β -amirina y ferulato de β -amirina	51
3.1. Desacetilación de los esteres de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados	51
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
1. Obtención de Triterpenos (Primera etapa)	54
1.1. β -Amirina	54
1.2. Ácido ursólico	55
2. Obtención de los ésteres del ácido cumárico acetilado y ferúlico acetilado (Segunda etapa)	55
2.1. Ácido cumárico	55
2.1.1. Ácido cumárico acetilado	56
2.1.2. Cloruro del ácido cumárico acetilado	56
2.1.3. Éster de ácido cumárico acetilado	57
2.2. Ácido ferúlico	57
2.2.1. Ácido ferúlico acetilado	58
2.2.2. Cloruro del ácido ferúlico acetilado	58
2.2.3. Éster de ácido ferúlico acetilado	58
3. Obtención del cumarato β -amirina y ferulato de β -amirina (Tercera etapa)	59
3.1. Desacetilación de éster del ácido cumárico acetilado	59
3.2. Desacetilación de éster del ácido ferúlico acetilado	59
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS.....	68



INTRODUCCIÓN

La nutrición actual está enfocada a la prevención de las enfermedades, donde la dieta y estilo de vida desempeñan roles muy importantes. Los consumidores están preocupándose cada vez más de su autocuidado y esperan a través de los alimentos consumidos alcanzar o mantener su salud y bienestar. La respuesta a esta demanda han sido los Alimentos funcionales, así como el desarrollo de nuevos productos, ya que es de vital importancia en el área de la industria alimentaria un incremento en la comercialización y producción de alimentos que tengan una funcionalidad en el organismo.

Algunos datos en la literatura resaltan la importancia de los ésteres de triterpenos, los cuales son destacables por varias funciones fisiológicas que presentan. Estos compuestos se han aislados de plantas, aunque los procesos de extracción dan rendimientos bajos. Al mismo tiempo es conocido que los ácidos hidroxicinámicos como son el ácido cumárico, caféico, ferúlico y sinápico, así como algunos triterpenos como la β -amirina y el ácido ursólico, se encuentran en fuentes naturales de manera abundante (g /Kg), lo que hace posible el desarrollo de metodologías o procedimientos para su preparación y permite su uso posterior para estudios biológicos y toxicológicos para así demostrar sus propiedades nutraceuticas, además de otras funciones como la actividad antioxidante.



RESUMEN

Los ésteres de ácidos *p*-hidroxicinámicos con triterpenos son compuestos ampliamente difundidos en la naturaleza, que han despertado un gran interés en el campo de los nutraceuticos. La importancia de los ésteres es destacable ya que poseen actividad antioxidante, así como se ha descrito que ayudan a prevenir infecciones urinarias provocadas por bacterias, envejecimiento celular, enfermedades cardiovasculares, además de poseer actividad anticancerígena. De ahí la motivación para desarrollar metodologías o procedimientos para su síntesis.

En esta investigación se desarrolló un procedimiento químico-enzimático para preparar los ésteres de ácidos hidroxicinámicos de triterpenos: ferulato y cumarato de β -amirina, éste último es análogo a uno de los compuestos responsables de la actividad nutraceutica atribuida al arándano (*Vaccinium macrocarpon*). La primera etapa consistió en el aislamiento de los triterpenos: β -amirina (**A**) a partir de la corteza del árbol del nanche (*Byrsonima crassifolia*) con un rendimiento del 0.40% en base seca (BS) y el ácido ursólico (**B**) de la planta de tomillo (*Thymus vulgaris* L) con un rendimiento del 0.14% BS. La siguiente etapa consistió en la formación de los cloruros de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados (**4a**, **4b**), a partir de los ácidos correspondientes cumárico (**1**) y ferúlico (**2**); mediante la siguiente secuencia de reacciones: acetilación y formación del cloruro, una vez obtenido los compuestos **4a** y **4b**, éstos se pusieron a reaccionar con la β -amirina (**A**), para formar los ésteres acetilados. Finalmente, en la tercera etapa, los ésteres acetilados (**5a**, **5b**) se desacetilaron con dos lipasas obtenidas de *Candida Antarctica* y *Lipozyme*. El rendimiento obtenido para la hidrólisis que dio como producto final el cumarato de β -amirina (**6a**), fue del 92% y para ferulato de β -amirina (**6b**) fue del 90%. Todos los productos fueron caracterizados por métodos fisicoquímicos (p.f., Rf, EM, IR y RMN¹H y de ¹³C). La metodología desarrollada en este trabajo, permite obtener de manera sencilla y con reactivos accesibles los hidroxicinamatos de β -amirina, además de que permite obtener cantidades adecuadas de estos ésteres para iniciar estudios en el campo de los alimentos y la salud.



ANTECEDENTES

1. Nutracéuticos.

En la actualidad la nutrición está experimentando un cambio veloz, acentuando el interés de los consumidores por ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Es por esto que se buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Esto ha creado el desarrollo de los Nutracéuticos, este termino fue propuesto en 1979 por DeFelice y fue definido como "cualquier sustancia que puede ser considerada como parte de un alimento y que otorga beneficios a la salud incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades" (Andlauer, 2002; Biesalski, 2002). Subsecuentemente otros términos como alimentos funcionales, alimentos diseñados, farmalimentos, fitoalimentos, fitonutrientes, alimentos inteligentes y alimentos terapéuticos fueron usados (Araya, 2003; Golberg, 1994; Dillard, 2000).

1.1. Origen del concepto de alimento funcional

El concepto de alimentos funcionales fue propuesto por primera vez en Japón durante la década de los 80's con la publicación de "Alimentos Para Uso Especifico de Salud " ("Foods for Specified Health Use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que ayudan a ciertas funciones específicas del organismo, además de ser nutritivos. Los alimentos de este tipo son reconocidos porque llevan un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno japonés (Chasquibol, 2003; Takayuk, 1998).

1.2. Términos relacionados

Actualmente, el término alimentos funcionales es generado por diferentes organismos, por lo cual es conveniente establecer un marco conceptual que permita estudiar los efectos del consumo de estos alimentos en el contexto de la situación actual. La Asociación Dietética Americana-The American Dietetic Association (ADA) los define como: "Todos los alimentos fortificados, enriquecidos, que tienen un efecto potencialmente benéfico en la salud cuando es consumido como parte de una dieta variada" (Araya, 2003).

Por otra parte, el Instituto Internacional de Ciencia en Europa (ILSE Europe) los define como: "Alimentos con componentes fisiológicamente activos, que poseen un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo y que mejora el estado de salud y de bienestar".

La ciencia de alimentos funcionales en Europa (Functional Food Science in Europe o FUFOSSE) los define como: "Los alimentos que constituyen habitualmente parte de una dieta y que son desarrollados para potenciar una función o reducir el riesgo de alguna enfermedad" (Verhagen, 2004;).

Finalmente, aunque el término de alimentos funcionales no es una categoría de alimento legalmente reconocida por la Administración de Alimentos y Drogas de E.U. (Food & Drugs Administration o FDA) los define como: "Las sustancias específicas de los alimentos que pueden favorecer la salud como parte de una dieta variada".

Con base en la información anterior, no existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son los alimentos funcionales. Muchos consideran que se trata de un concepto aún en desarrollo y que bien podría considerarse, a los alimentos funcionales como productos intermedios entre los tradicionales y las medicinas (Araya, 2003).

Actualmente, una de las propuestas de mayor aceptación para alimentos funcionales es: "Cualquier alimento o parte de un alimento, en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental, ayudando también a la prevención, reducción y tratamiento de enfermedades de una persona" (Chasquibol, 2003).

Un alimento puede ser considerado como funcional, si este ha demostrado satisfactoriamente uno o más beneficios en las funciones del cuerpo. Hay tres condiciones que debe cumplir:

- 1.- Es un alimento (no una cápsula, tableta o polvo) derivado de ingredientes naturales.
- 2.- Puede ser consumido como parte de una dieta diaria.
- 3.- Tiene funciones particulares cuando se ingiere, sirve para regular procesos específicos del cuerpo tales como: acrecentar mecanismos de defensa, prevención de enfermedades (Goldberg, 1994).

Finalmente, en México, aunque el término de alimentos funcionales se utiliza familiarmente entre la comunidad científica, a la fecha no hay leyes que reglamenten específicamente el uso de estos alimentos.

1.3. Compuestos funcionales

El interés en la relación entre alimentación y salud, se explica por el consumo de alimentos de origen vegetal, esencialmente frutas, verduras, cereales integrales y leguminosas. Es decir, alimentos naturales, sin necesidad de recurrir siempre a los alimentos enriquecidos o modificados; ya que sus efectos preventivos contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares son amplios

Estos alimentos son una excelente fuente de propiedades saludables, entre los cuales se encuentran los también llamados compuestos funcionales, si bien no ejercen un rol nutricional, su consumo supone una protección adicional contra la acción nociva de sustancias provenientes de la dieta y del entorno ambiental que afectan la salud de la población (Andlauer, 2002; Goldberg, 1994).

Este efecto de retardar y/o suprimir procesos dañinos es a través de los alimentos que contienen, carotenoides, compuestos fenólicos, fitoesteroles, flavonoides y tocoferoles así como otros compuestos funcionales, los cuales se muestran en la tabla 1.

Fitoquímico	Importancia	Fuentes	Met. de extracción	Propiedades biológicas	Usos
Carotenoides	Pigmentos: amarillo, naranja, rojo. Actividad antioxidante	Cítricos, jitomate, cilantro, espinaca, naranja y flores.	Extracción metanol	Efectos contra cáncer de próstata, pulmón y piel. Degeneración muscular	-Colorantes (margarina, helados, bebidas).
Compuestos fenólicos (AHC)	Actividad antioxidante	Arándano, uvas, fresas, granos y cebada.	Extracción en éter de petróleo.	Previene enfermedades cardiovasculares.	-Conservación de color de mariscos. -Desodorante alimenticio.
Fitoesteroles	Evita absorción del colesterol	Vegetales verdes y amarillos, semillas.	Extracción con éter de petróleo y acetato de etilo.	Act. Antiinflamatoria, reduce colesterol, tumores en colon y próstata.	-Producción de refrescos y dulces.
Flavonoides	Pigmentos Actividad antioxidante	Frutas cítricas, semillas, cereales, plantas aromáticas	Hidrólisis ácida y extracción con acetato de etilo.	Efectos contra células cancerosas, alergias, inflamaciones, úlceras.	-Agentes colorantes -Fortificación de alimentos.
Tocoferoles	Vit E Actividad antioxidante	Semillas, cereales, hojas y otras partes verdes de las plantas.	Extracción metanol	Efectos contra células cancerosas, como en glándulas mamarias.	-Aumenta estabilidad en alimentos grasos.

Tabla 1. Principales compuestos funcionales contenidos en alimentos (Chasquibol, 2003).

1.4. Estructuras de compuestos funcionales.

La figura 1, muestra las estructura básica de los **tocoferoles**, así como en la tabla 2 se muestran sus posibles sustituyentes.

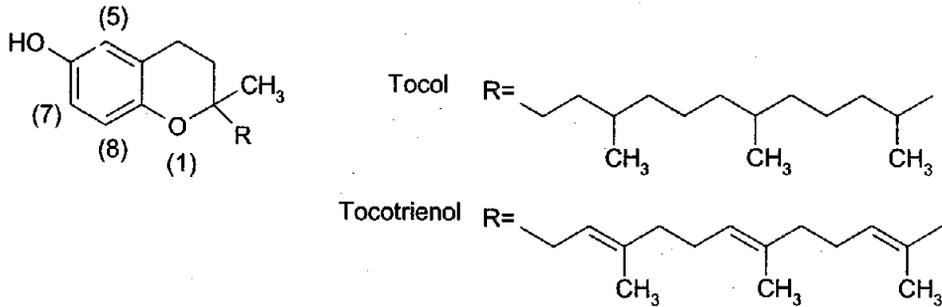
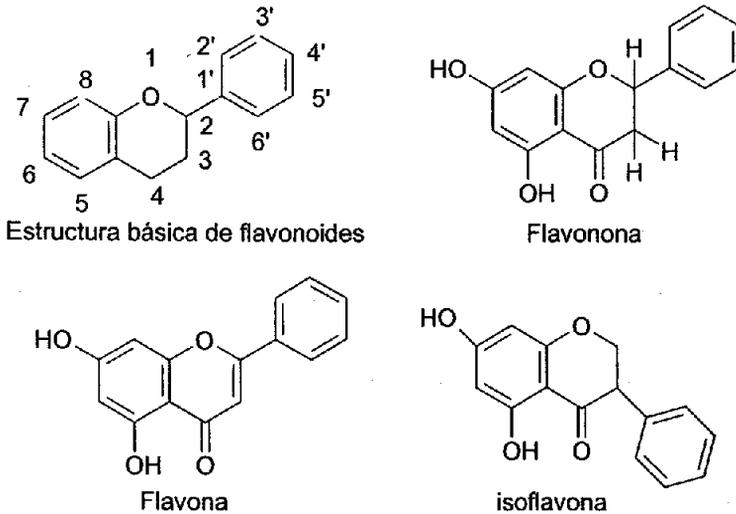


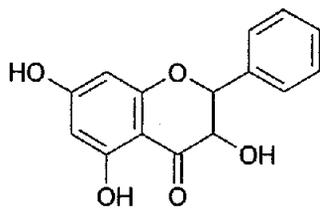
Figura 1. Estructuras de Tocoferoles

Sustitución	Tocoferol(T)	Tocotrienol(T-3)
5,7,8- Trimetil	α -T	α -T-3
5,8- Dimetil	β -T	β -T-3
7,8- Dimetil	γ -T	γ -T-3
8-Dimetil	δ -T	δ -T-3

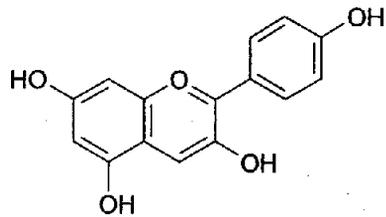
Tabla 2. Estructuras de tocoferoles y tocotrienoles

Las figuras 2, muestran las estructura básica de los **flavonoides**, así como algunos derivados.





Flavonol



Antocianidina

Figuras 2. Estructuras de Flavonoides.

La figura 3, muestra las estructura básica de los **carotenoides**.

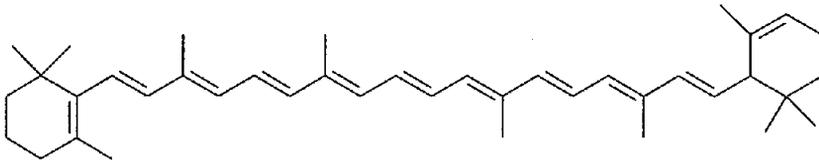


Figura 3. Estructura del β -caroteno.

La figura 4, muestra las estructura básica de los **fitoesteroles**.

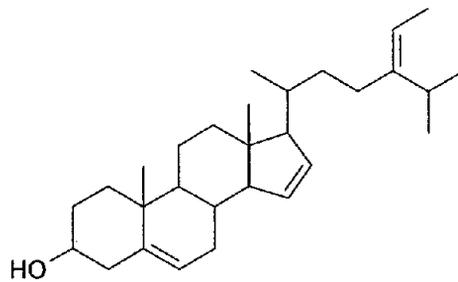
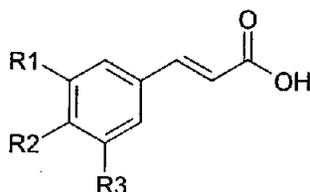


Figura 4. Estructura del esteroil.

La figura 5, muestra las estructura básica de los **ácidos fenólicos (AHC)**.



R1=H, R2=OH, R3=OMe	Ácido Ferúlico
R1=H R2=OH, R3= H	Ácido Cumárico
R1=H, R2=R3 =OH	Ácido Caféico
R1=OMe, R=2OH, R3=OMe	Ácido Sinápico

Figura 5. Estructura de los ácidos hidroxicinámicos.

2. Ácidos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta tanto humana como animal. Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8000 compuestos distintos.

Actualmente se ha despertado un reciente interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones benéficas en la salud humana, tales como en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedad cardiovascular y otras patologías de carácter inflamatorio (Belitz, 1997; Hong, 1997).

2.1. Ácidos hidroxicinámicos (AHC)

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos, son compuestos fenólicos que contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, los cuales le confieren la propiedad de ser antioxidantes naturales. Estos ácidos se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales, y comúnmente se les puede encontrar en el café, cereales (principalmente salvado de trigo, maíz, avena y cebada) y en algunas frutas (Gross, 1999).

Los ácidos *p*-hidroxicinámicos más importantes son ácido cumárico (1), ácido ferúlico (2), ácido caféico y ácido sinápico (ver figura 5). A estos compuestos, raramente se les puede encontrar de forma libre en las plantas o en los alimentos, usualmente se encuentran ésterificados con un azúcar o algunos ácidos orgánicos.

Ácido cumárico (1); Ácido 3-fenil-(4-hidroxi)-2-propenoico, comúnmente conocido como ácido *p*-cumárico, cuya estructura se muestra en la figura 5. Ligeramente soluble en agua caliente y en disolventes orgánicos como acetona, éter y acetato de etilo. Se le puede encontrar en frutas tales como manzana, ciruela, uva y arándano y en vegetales como: tomate, brócoli, zanahoria, espinaca y también en algunos granos. El ácido cumárico (1) otorga a los alimentos propiedades como: estabilidad, color y fragancia (Barolomé, 2002; Lam, 2001).

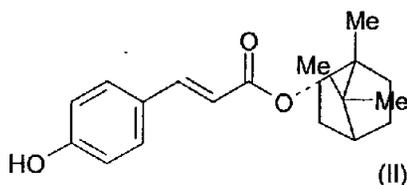
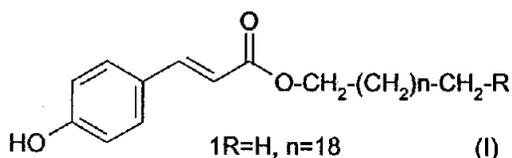
Ácido ferúlico (2); Ácido 3-fenil-(4hidroxi-3-metoxi)-2-propenoico. El nombre del ácido ferúlico, se deriva de la planta *Férula foetida* de la cual fue aislado y extraído (Mathew, 2004; Rosazza et al, 1995). Su estructura se muestra en la figura 5. Ligeramente soluble en agua fría, soluble en agua caliente y disolventes orgánicos como etanol y acetona. Es un compuesto que se encuentra en una amplia variedad de plantas y en mayor cantidad en la cascarilla de maíz, en granos de trigo, cebada, sorgo, avena. Pero también es posible encontrarlo en una gran variedad de frutas como; ciruela y manzana; en vinos, en café y en la cerveza, donde tiene una participación en el sabor de la misma (Graf, 1992). A nivel industrial, la importancia del ácido ferúlico (2) radica en su actividad antioxidante, además de que tiene la capacidad de funcionar como inhibidor de sabores amargos, es un ingrediente activo en lociones y cremas que protegen contra rayos UV (Saija,2000). Por otra parte ha sido reportado que el ácido ferúlico (2) presenta actividad antitumoral, hipocolesterolémica y anticancerígena (Gross, 1999; Craig,2000).

Ácido caféico; Ácido 3-fenil-(3,4-dihidroxi)-2-propenoico o mejor conocido como ácido caféico. Su estructura se muestra en la figura 5. Es poco soluble en agua fría, soluble en agua caliente y en disolventes orgánicos como éter y acetato de etilo. Este compuesto se encuentra en: café, cáscara de papa, zanahorias y en semillas de girasol, etc. Los principales usos del ácido caféico están dados por tener propiedades antioxidantes, muchos de sus derivados son empleados ampliamente en cremas fotoprotectoras, ya que este protege de manera muy eficiente de los daños causados por la luz UV (Saija, 2000).

2.2. Ésteres de ácidos hidroxicinámicos

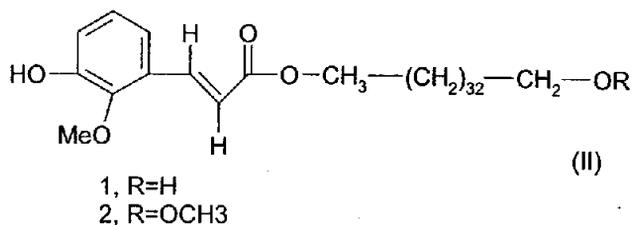
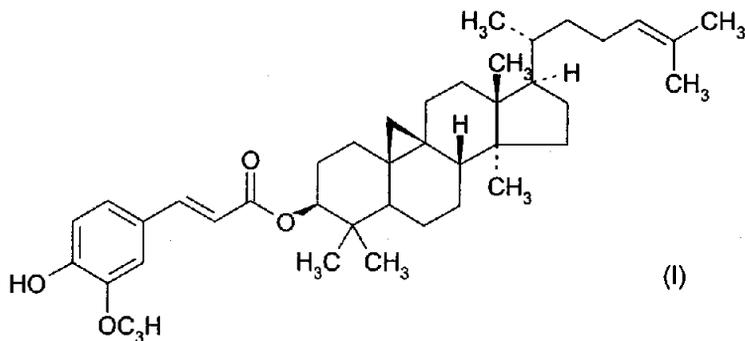
Por la actividad antioxidante de los AHC y sus ésteres son considerados como alimentos funcionales y por lo tanto agentes efectivos contra el tratamiento de enfermedades (Shopova, 2000). Recientemente han adquirido gran importancia debido a que son precursores de sabores, aromas y fragancias en las industrias de alimentos (Castelluccio, 1995; Hong, 1997).

El ácido cumárico, rara vez se encuentra de forma libre en la naturaleza, generalmente se encuentra unido mediante un enlace éster a ácidos orgánicos, lípidos, azúcares o unido a la pared celular de algunos cereales. Algunas fuentes importantes son: los residuos industriales procedentes de la elaboración de sidra de manzana, jugos y cerveza (Barolomé, 2002). En las siguientes figuras se muestran algunos derivados de origen natural de ésteres del ácido *p*-cumárico; la figura 6 (I) muestra, el *trans p*-cumarato eicosanilo; en la figura 6 (II) se muestra el *p*-cumarato de bornilo (Mahmood, 2003; Maldonado, 1998).



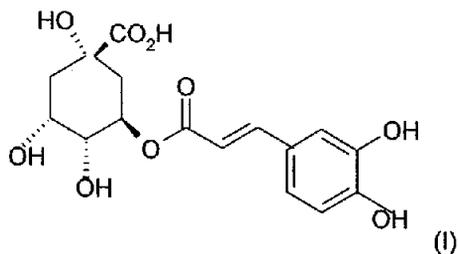
Figuras 6. Derivados de origen natural de ésteres del ácido cumárico.

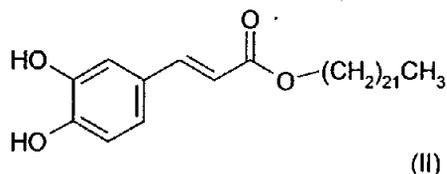
El ácido ferúlico, se encuentra como éster en muchas plantas, ya que está unido a disacáridos y glicoproteínas. La mayoría de estos ésteres presentan propiedades antioxidantes, pero también son empleados como anti-inflamatorios por lo que son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica. Las siguientes figuras muestran algunos derivados naturales del ácido ferúlico; en la figura 7 (I) se muestra, el γ -orizanol y en la figura 7 (II) se muestra el ferulato de 34-hidroxi tetratriacontanilo (Reichert, 2002; Dobhal, 1999). Pasar a la siguiente hoja.



Figuras 7. Derivados naturales del ácido ferúlico.

Algunos derivados naturales del ácido caféico principalmente ésteres se encuentran de forma natural en bebidas y vegetales, además de ser empleados ampliamente en cremas fotoprotectoras. La mayoría de estos ésteres presentan propiedades antioxidantes y se les ha atribuido actividad preventiva contra la arterioesclerosis. En las siguientes figuras se muestran algunos derivados naturales del ácido caféico; en la figura 8 (I) se muestra el ácido clorogénico y en la figura 8 (II) se muestra el cafeato de 3,4-dihidroxi (Sefkow, 2001; Gibbons, 1999). Pasar a la siguiente hoja.





Figuras 8. Derivados naturales del ácido caféico

3. Triterpenos

Los triterpenos, son un amplio y estructuralmente diverso grupo de productos naturales, derivados de C_{30} . Estos compuestos son aislados principalmente de plantas, productos de soya y granos (Xu, 2003). Se ha demostrado que los triterpenos poseen un amplio rango de actividades biológicas, por ejemplo: previenen el cáncer en pulmones, glándulas mamarias, colon, estómago y próstata además de tener propiedades anti-VIH, antibacterial y tratamiento contra la aterosclerosis, etc. Muchos de estos son usados como plantas medicinales en la medicina tradicional. Por lo que forman parte de los alimentos funcionales. Ejemplos de éstos son la β -amirina (A) y el ácido ursólico (B), los cuales son constituyentes de numerosas plantas. (Somova, 2004; Zhang, 2005).

3.1. β -Amirina

La β -Amirina (A) (3 β -Hidroxi-lean-13(18)-eno) es uno de los triterpenos más comunes así como importantes encontrados sobre todo en plantas. La estructura del compuesto se presenta en la figura 9. Algunos ejemplos de plantas donde se ha aislado son las siguientes: *Casuarina equisetifolia* (Takahashi, 1998), *Eucalytus globulus*, (Santos, 1996) y *Linaria aucheri* (Ercil, 2003).

A la β -Amirina (A), se le han hecho numerosos estudios de actividad biológica los más relevantes son: actividad anti-inflamatoria y antioxidante (Biesboer, 1981; Grandmougin, 1999). El compuesto A, evita la peroxidación de lípidos y el daño a membranas en el sistema biológico, que causan inflamaciones así como el cáncer, es por eso la importancia de buscar productos naturales que protejan a las membranas contra el daño oxidativo e inhiban la formación de radicales libres y especies reactivas. Numerosos estudios han demostrado que varias especies de este género han sido usados en la medicina tradicional como tónicos, laxantes, antidiabéticos y diuréticos o bien usados para el tratamiento de hemorroides y problemas vasculares (Takahashi, 1999).

Además de que a los derivados esterificados también se les ha encontrado otras aplicaciones, en la sección de ésteres de triterpenos se comentara más acerca de este punto.

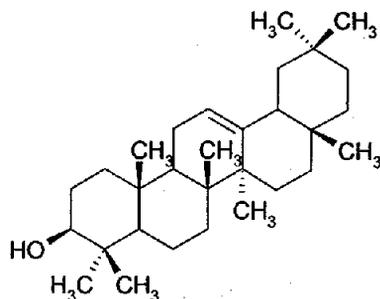


Figura 9. β -amirina (A).

3.2. Ácido ursólico

El ácido ursólico (B), es un triterpeno pentacíclico presente en una amplia variedad de plantas en forma de ácido libre o unido a otro compuesto. (La estructura del compuesto se presenta en la figura 10). Es también conocido como ácido 3 β -Hidroxiurson-12-en-28-oico, urson, prunol micromerol y malol. El cual se encuentra naturalmente en una gran cantidad de plantas medicinales; hojas de menta (*Mentha piperita* L), orégano (*Origanum vulgare* L), tomillo (*Thymus vulgaris* L), *Eucalyptus perriniana*, *Jacaranda caucana*, *Amaracus dictamnus*. (Piozzi, 1986).

En frutas se le ha encontrado en el arándano (*Vaccinium macrocarpon*), así como en las peras, manzanas, y ciruelas. Es usado como agente emulsificante en cosméticos en la industria farmacéutica, y en la preparación de alimentos. Además se ha demostrado que B tiene actividad antimicrobiana, antioxidante, antiviral incluyendo que tiene un efecto anti-VIH (Furuya, 1986; Somova, 2003).

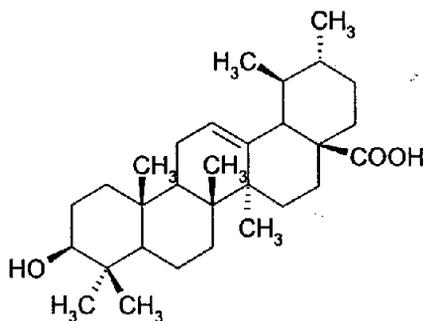


Figura 10. Ácido ursólico.(B)

3.3. Ésteres de triterpenos

Los triterpenos se pueden encontrar esterificados con un azúcar, ácidos grasos como: acético, laurico y oleico así como con ácidos hidroxicinámicos. Los ésteres de triterpenos, además de tener propiedades antioxidantes, antibacterianas y anti-inflamatorias; se les ha atribuido actividad preventiva contra el cáncer. A continuación se presentan algunos ésteres aislados de diversas fuentes.

En 1997 se aislaron dos derivados del lupano, 3-(*E*)-ferulato del ácido betulínico y 28-acetil-3-(*E*) cumarato del ácido betulínico (Ver figura 11), se aislaron del tronco de *Diospyros maritima*. Estas especies crecen en Taiwán y se pueden encontrar en frutas, hojas, ramas y en la corteza del árbol. Usualmente es usado en el tratamiento de enfermedades reumáticas por un régimen tradicional de Taiwán (Hsiung et al., 1997).

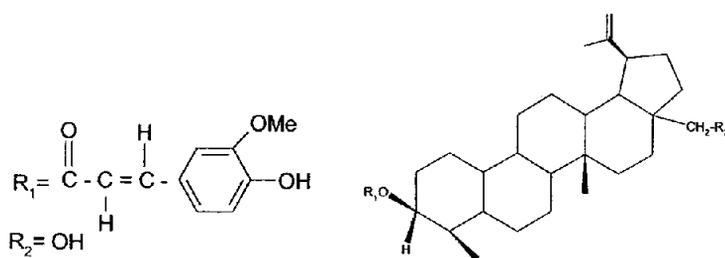


Figura 11. 28-acetil-3-(*E*) cumarato del ácido betulínico de *Diospyros maritima*.

En el mismo año, tres nuevos compuestos; dos hidroxicinamatos de amirina y lupeol fueron aislados de hojas y ramas de *Acacia linarioides* y *Acacia trineura*, flora nativa de Australia, estas dos especies pertenecen a la familia de las leguminosas. Se reporto el aislamiento del cis y trans de *p*-hidroxicinamato de amirina (Ver figura 12 en la siguiente pagina) y el trans-*p*-hidroxicinamato de lupeol (Ali et al,1997).

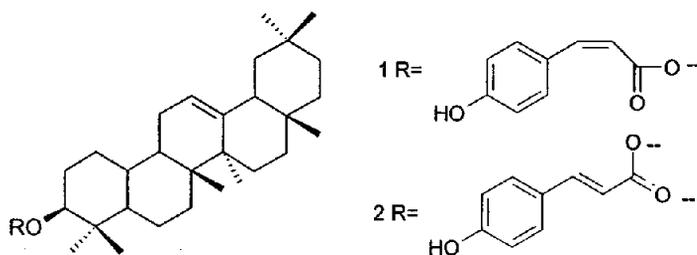


Figura 12. Cis y trans *p*-hidroxicinamato de amirina de *Acacia linarioides*.

En el año 1998, se aislaron otros ésteres de triterpenos llamados; cafeato-3 β -il-aldehído del ácido betulínico, cafeato 28-aldehído-3 β -il del ácido oleanólico, partir de ramas de *Celastrus stephanotifolius*, en Yamakawa Tokushima, Japón (Ver figura 13). Los cuales presentaron un rango de actividades biológicas demostradas por varios miembros de esta familia y usados en la medicina tradicional como estimulantes (Chen et al., 1998).

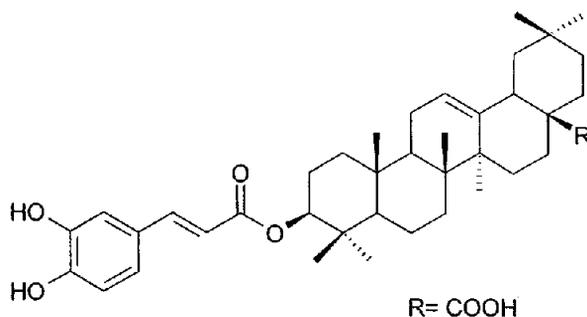


Figura 13. Cafeato 28-aldehído-3 β -il del ácido oleanólico de *Celastrus stephanotifolius*

En 1999, se aislaron varios derivados de β -amirina. Estos ésteres llamados 3-O-(*E*)-cumarato de β -amirina, 3-O-(*Z*)-cumarato de β -amirina y el 3-O-dihidrocumarato de β -amirina. (Ver figura 14), fueron aislados de hojas y ramas de *Casuarina equisetifolia* del Norte de Australia, ésta especie presenta actividad antioxidante y evita el daño a las membranas en sistema biológicos evitando así, una progresión de enfermedades como el cáncer (Takahashi et al., 1999).

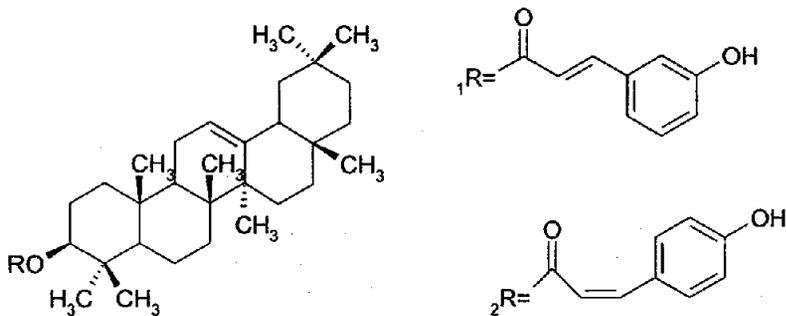


Figura 14. Cumaratos de triterpenos de *Casuarina equisetifolia*.

En el año 2002, se aisló a partir de la corteza del árbol de *Scaphopetalum thonneri*, dos nuevos compuestos llamados Scafopetalona y un nuevo éster del ácido ferúlico llamado Scafopetalumato (Ver figura 15), los cuales fueron aislados juntos con tres compuestos llamados, dos cumarinas (Scopoletina y Scopolina) y un triterpeno pentacíclico (ácido oleanólico). Esta corteza del árbol es ampliamente usada por la medicina para el tratamiento de enfermedades del riñón, heridas y para el dolor de estómago (Vardamides et al.,2003).

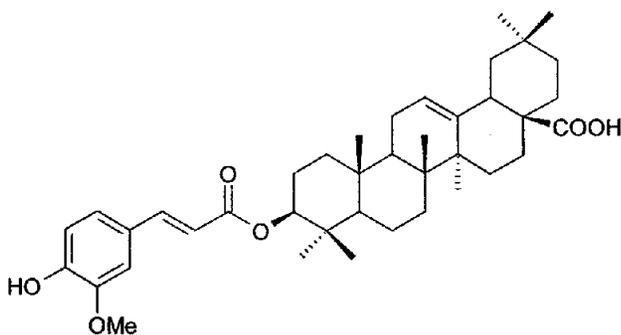


Figura 15. Scafopetalumato de *Scaphopetalum thonneri*.

En el 2003, se identificaron ésteres de triterpenos en el arándano *Vaccinium macrocarpon*, llamados cis (1) y trans (2) 3-O-*p*-hidroxicinamatos del ácido ursólico (Ver figura 16). El arándano, es una fruta que ha demostrado tener un alto potencial benéfico, como es la prevención de adhesión de bacterias en el tracto urinario, úlceras estomacales, además de poseer actividad antioxidante y anticancerígena (Murphy et al., 2003).

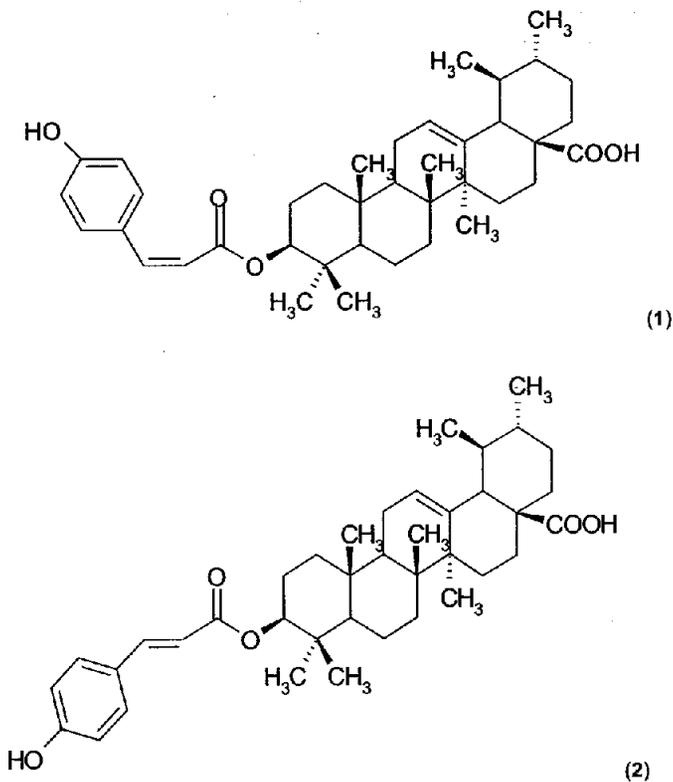


Figura 16. Cis (1) y trans (2) 3-O-*p*-hidroxicinamatos del ácido ursólico de *Vaccinium macrocarpon*.

En el 2004, el éster de la figura 17 *trans-p*-cumarato, ha sido aislado y probado contra *Staphylococcus capitis*, mientras que la figura 18 (I) reporta el derivado 11-etoxi oleanona de *Maytenus undata* y finalmente en la figura 18 (II) el triterpeno glicosilado (Gibbons, 2004).

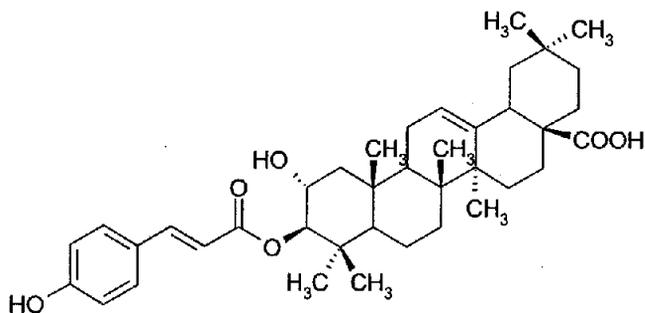
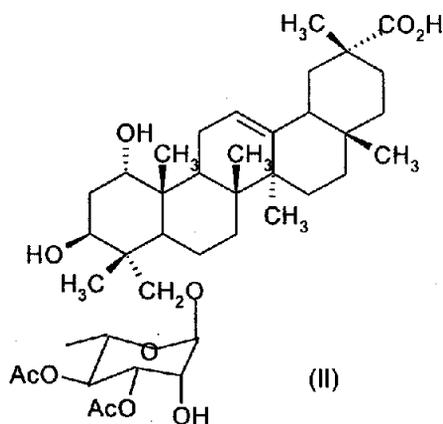
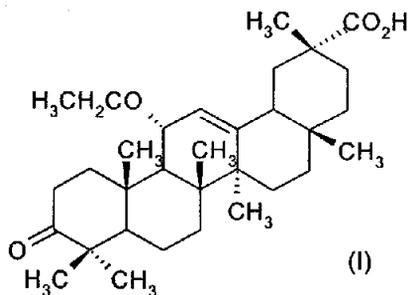
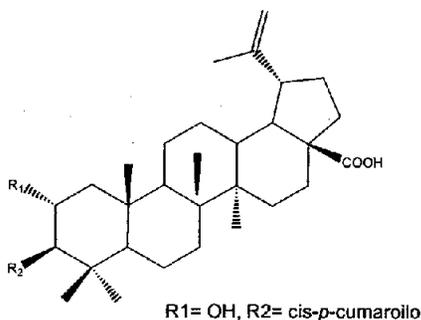


Figura 17. *Trans-p*-cumarato.



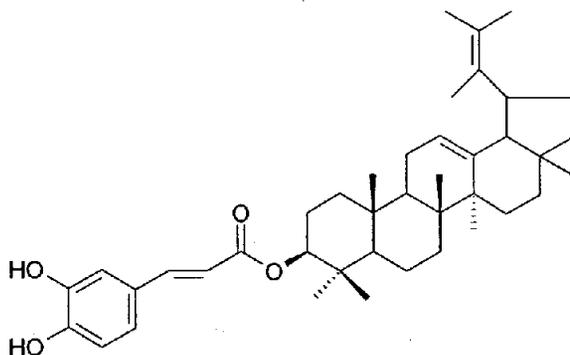
Figuras 18. Derivados naturales de triterpenos.

En el mismo año 2004, fueron aislados once triterpenos de la fruta de *Zizyphus jujuba*, como son ácido colubrinico, ácido ziziberenatico, ácido alfitolico y ácido 3-O-cis-p-cumarato del ácido alfitolico (Ver figura 19). Esta planta es ampliamente distribuida en Europa y en el sureste de Asia. La semilla, la cual es conocida como Suan Tsao Zen en china es usada para el tratamiento de insomnio, además de evitar artritis reumatoide, osteoartritis y lesiones artereoscleróticas (Myung et al., 2004).



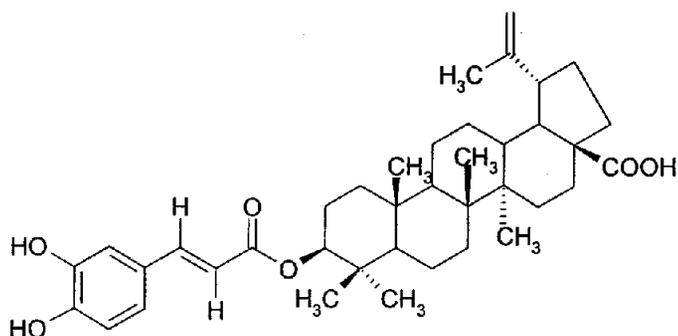
Figuras 19. Ácido 3-O-cis-p-cumarato del ácido alfitolico de *Zizyphus jujuba*.

En el año 2005, tres nuevos ésteres de triterpenos pentacíclicos fueron aislados de *Bruguiera cylindrica*, encontrado en Tailandia (Ver figura 20), estudios previos de estos fitoquímicos, permitieron el aislamiento e identificación de triterpenos de éste género, el cual tiene un gran interés en la medicina (Karalai et al., 2005).



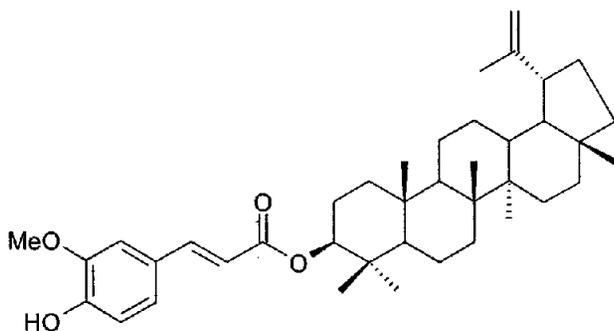
Figuras 20. 3 α -E-cafeoyltaraxerol de *Bruguiera cylindrica*.

En este mismo año 5-hidroxi-2-metoxi-xantona, 2-hidroxi-3-metoxi-xantona, 4-hidroxi-3-metoxi-fenil ferulato y el ácido 3 β -O-caffeato del ácido betulínico (Ver figura 21) fueron aislados a partir de *Hypericum hookerianum* (Clusiaceae), del área de la alta montaña del norte de Tailandia. Se ha reportado que esta planta contiene actividad antibacteriana, así como un alto efecto contra el crecimiento de células cancerígenas (Wilairat et al.,2005).



Figuras 21. 4-hidroxi-3-metoxi-fenil ferulato de *Hypericum hookerianum*.

En el 2005, dos nuevos ésteres de triterpeno llamados 3 β -Z-ferulloillupeol y 3 β -E-ferulloillupeol, fueron aislados de las hojas de *Cerriops decandra* (Ver figura 22), esta planta se encuentra en el este de África y Madagascar. Ésta corteza del árbol ha sido usada como medicina para el tratamiento de diarrea, vomito y úlceras (Ponglimanont et al.,2005).



Figuras 22. 3 β -Z-ferulloillupeol.

En la siguiente tabla 3 se muestra de manera cronológica la obtención de varios ésteres de triterpenos así como sus fuentes y propiedades biológicas.

Año	Nombre	Fuente	Rendimiento	Prop. biológicas
1997	28-acetil-3-(E) cumarato del ácido betulínico	<i>Diospyros maritima</i>	0.56mg / 1Kg	Tratamiento de enfermedades reumáticas
1997	cis y trans <i>p</i> -hidroxicinamato de amirina	Acacia linarioides <i>Acacia trineura</i>	20mg-41mg /1Kg	---
1998	Cafeato 28-aldehído-3 β -il del ácido oleanólico	<i>Celastrus stehantifolius</i>	1.19mg / 1Kg	Estimulantes
1999	3-O-(E)-cumarato de \square -amirina	<i>Casuarina equisetifolia</i>	21.8mg/ 1Kg	Actividad antioxidante
1999	3-O-(Z)-cumarato de \square -amirina	<i>Casuarina equisetifolia</i>	2.19mg / 1Kg	Actividad antioxidante
2002	Scafopetalumato	<i>Scaphopetalum thonneri</i>	1.66mg / 1Kg	Dolor de estomago
2003	cis (1) and trans (2) 3-O- <i>p</i> -hidroxicinamato del ácido ursólico.	<i>Vaccinium macrocarpon</i> ,	20mg / 1Kg	Actividad anticáncerígena
2004	trans- <i>p</i> -cumarato	---	---	---
2004	Ácido 3-O-cis- <i>p</i> -cumarato del ácido alifolico	<i>Zizyphus jujuba</i>	8mg / 1Kg	Tratamiento de insomnio
2005	3 α -e-cafeoiltaraxerol	<i>Bruguiera cylíndrica</i>	62.0 mg / 1Kg	Interés en la medicina
2005	4-hidroxi-3-methoxi-fenil ferulato.	<i>Hypericum hookerianum</i> (Clusiaceae)	6.36mg / 1kg	Actividad antibacteriana
2005	3 β -Z-feruloilupeol	<i>Ceriops decandra</i>	0.89mg /1Kg	Tratamiento de diarrea, vomito.

Tabla 3. Ésteres de triterpenos aislados de fuentes naturales.

Ésta información, resalta la importancia de los ésteres de triterpenos, los cuales son destacables por las propiedades biológicas que presentan.

Estos compuestos se han aislado de plantas, presentando un rendimiento muy bajo, en relación a 1Kg, el valor máximo fue de 62.0mg para el 3 α -e-cafeoiltaraxerol a partir de *Bruguiera cylíndrica*, mientras que el valor mínimo fue de 0.56mg para 28-acetil-3-(E) cumarato del ácido betulínico de *Diospyros maritima* como se muestra en la tabla 3.

Éstos compuestos están formados por ácidos hidroxycinámicos como son el ácido cumárico, ferúlico, que se encuentran en mayor cantidad en la cascarilla de maíz y el ácido caféico en el café verde, así como de tritepenos como el ácido betulínico, ácido ursólico, ácido alfitólico, lupeol y la β -amirina que se encuentran en una amplia variedad de plantas.

Estas dos unidades que conforman los éteres, se encuentran en fuentes naturales y en cantidades abundantes del orden de g/Kg, tal es el caso de la β -amirina con 4.03g / 1Kg a partir de la corteza del árbol del nanche (*Byrsonima crassifolia*) y ácido ursólico 1.4g / 1Kg de la planta de tomillo (*Thymus vulgaris*). Éstos datos abren la posibilidad de sintetizar los ésteres y de obtener material suficiente para realizar diferentes pruebas.

4. Biotransformación

Para el desarrollo de éste trabajo, se realizó en la tercera etapa una técnica enzimática utilizando lipasas obtenidas de *Candida antarctica* y *lipozyme*, las características que se destacan en el empleo de lipasas es el uso de medios orgánicos para realizar reacciones de ésterificación, así como para la síntesis de nuevos productos. Ya que el estudio de esto último, ha sido amplio en diversos campos de la química.

Las biotransformaciones o bioconversiones, son reacciones químicas catalizadas por enzimas o sistemas enzimáticos contenidos en las células, este proceso consiste en la modificación estructural de un sustrato en un bioproducto mediado por un biocatalizador, generalmente se lleva a cabo con altos niveles de especificidad y selectividad. Estos catalizadores de origen natural ofrecen algunas ventajas en la producción de sustancias tradicionales o nuevas (Faber,2000). Los biocatalizadores pueden ser enzimas puras o extractos de éstas, cultivos de microorganismos (hongos, bacterias y levaduras), complejos enzimáticos, enzimas artificiales, células vegetales completas o extractos de ellas, anticuerpos catalíticos (Navarro,1988; Mermelstein,1998). Algunas enzimas son sensibles y pueden tolerar un ambiente hostil, así como temperaturas mayores a 100°C y presiones altas, algunas enzimas aceptan una amplia variedad de sustratos, además del natural. Actúan a pHs alrededor de 5-8, generalmente en 7 y a temperaturas de 20- 40°C e inclusive a temperaturas más altas de 40-70 °C.

En la tabla 4, se muestra la clasificación de las enzimas y ejemplos de ellas.

Nº grupo	Clase	Tipo de reacción catalizada	Ejemplos
1	Oxidoreductasa	Transferencia de electrón Oxidaciones	Catalasa, Glucosa Oxidasa, Lipooxygenasa
2	Transferasas	Transferencia del grupo funcional como acil, glicosil y fosfato de un sustrato otro.	-----
3	Hidrolasas	Reacc. de hidrólisis. Sustrato incluye amida, ésteres, epóxidos, glicósidos y péptidos. Formación de ésteres.	Amilasas, Esterasas, Glucanasas, Pectinasas, Proteasas, Ureasas, Lipasas
4	Liasas	Adición de grupos de dobles enlaces o formación de dobles enlaces	Hidroperoxidasa, Liasas
5	Isomerasas	Transferencia de grupos a la producción de formas isoméricas.	Glucosa isomerasa
6	Ligasas	Formación de uniones C-C, C-S, C-O o C-N por reacciones de condensación por ATP.	-----

Tabla 4. Clasificación y ejemplos de enzimas (Santamaría, 2002).

4.1. Lipasas

Las lipasas (Hidrolasas de los triacilgliceroles), son enzimas ampliamente difundidas en la naturaleza, que poseen una considerable importancia fisiológica y un gran potencial industrial, es por mucho el grupo de enzimas más estudiado en aplicaciones biosintéticas (Faber, 2000). Además de participar en el proceso de digestión de grasas, catalizando la hidrólisis de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres, poseen una gran importancia biotecnológica ya que son empleadas en la industria alimenticia. Las lipasas pertenecen al grupo de enzimas de las hidrolasas, las cuales catalizan la hidrólisis de uniones éster de glicéridos, acil-lípidos emulsionados, se mantienen activas en la interfase agua / lípido. Además esta clase de enzimas, demuestran una amplia especificidad en el sustrato, y pueden hidrolizar péptidos, amidas y triglicéridos (Peter, 2000).

4.1.1. Fuentes y aplicaciones de Lipasas

Las lipasas se presentan, entre otros alimentos, en la leche, en semillas de oleaginosas (soja, cacahuate), cereales (avena, trigo), frutas, hortalizas y en el tracto intestinal.

De igual forma se presentan en numerosos microorganismos como *Aspergillus Niger*, *C. rugosa*, *C. Lipolytica*, *G. candidum*, *H. Lanuginosa*, *M. Javanicus*, *Penicillium sp.*, *P. Roquefortii*, *P. Delemar*, *R. Javanicus*, *R. Niveus*) liberan lipasas al medio de cultivo (Belitz, 1997; Hari, 2002).

5. Arándano

El Arándano (*Vaccinium macrocarpon*), perteneciente a la familia *Ericaceae*, fruta nativa del Norte de América principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo y junto a Canadá abarcan el 90% del área productiva total, seguida de Chile, Nueva Zelanda y Sudáfrica. Éste fruto a despertado gran interés en el público como un alimento funcional, por sus grandes beneficios a la salud, así como es importante desde el punto de vista ecológico, no solo por sus frutos sino porque además protege el suelo de los bosques de la erosión (Murphy, 2003).

5.1. Valor Nutricional.

Contenido por 100 gramos de sustancia comestible	
Agua (g)	87.4
Proteínas (g)	0.3
Fibras (g)	1.7
Calorías (kcal)	42
Vitamina A (UI)	30
Vitamina B1 (mg)	0.014
Vitamina B2 (mg)	0.0024
Vitamina B6 (mg)	0.012
Vitamina C (mg)	12
Ácido flavonoide (mg)	0.2
Ácido pantoténico (mg)	12
Sodio (mg)	2
Potasio (mg)	72
Calcio (mg)	14
Magnesio (mg)	6
Manganeso (mg)	0.5
Hierro (mg)	0.5
Cobre (mg)	0.26
Fósforo (mg)	10
Cloro (mg)	4

Tabla 5. Contenido de sustancias en el arándano

5.2. Acciones terapéuticas del arándano

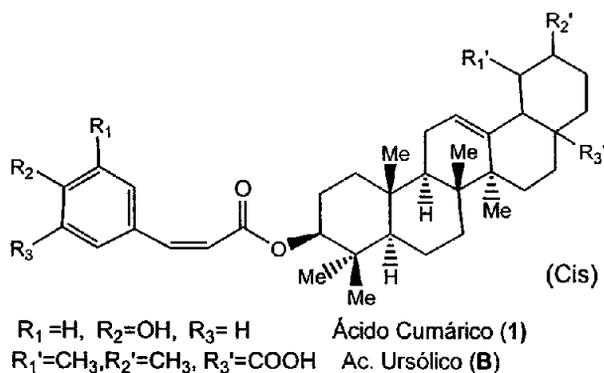
Se ha demostrado que el arándano presenta acciones terapéuticas frente a alteraciones circulatorias del sistema venoso, dado que los compuestos que contiene actúan protegiendo y reforzando la pared de los vasos capilares y venosos, además previene la degeneración de la retina y pérdida de la visión. (Murphy, 2003; Reed, 2002).

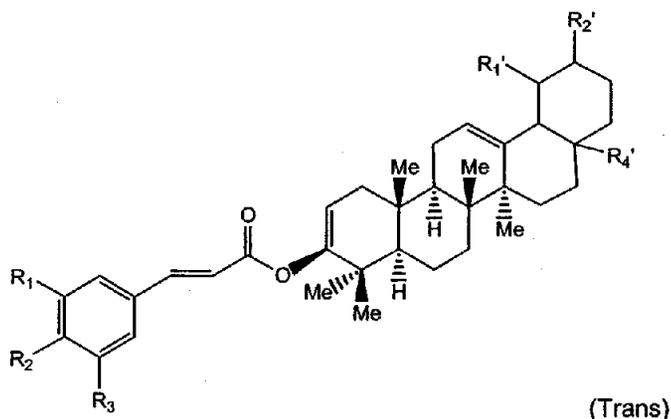
Frena el desarrollo de infección intestinal (*Escherichia coli*), normalizando el funcionamiento del intestino y ejerce prevención de infecciones urinarias, pues el jugo fresco o su extracto ejercen acción antiséptica sobre la vejiga y órganos urinarios (Xiaojun, 2002).

Algunos de sus compuestos como las antocianinas, actúan sobre los capilares de la retina mejorando la irrigación de las células fotosensibles resultando muy útil para recuperar la agudeza visual nocturna. Además posee taninos que le proporcionan una acción astringente (Yeap, 1999).

5.3. Compuestos fenólicos identificados en el arándano

Recientemente se ha reportado que muchos de los efectos biológicos, que presenta el arándano así como otras frutas, se debe a la presencia de una amplia variedad de compuestos fenólicos incluyendo los ácidos hidroxicinámicos y triterpenos, como se muestra en la siguiente figura 23, y que en muchos casos estos contribuyen al color y sabor de las mismas.





$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$ Ácido Cumárico (1)
 $R_1' = CH_3, R_2' = CH_3, R_3' = COOH$ Ac. Ursólico (B)

Figura 23. Compuestos aislados del arándano

Como se muestra en la tabla 6, el arándano tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos que otras frutas:

Fruta	Fenoles totales($\mu\text{mol/g}$) Peso seco	Fenoles totales($\mu\text{mol/g}$) Peso húmedo
Arándano	158.8+3.2	22.7+0.5
Uva(roja)	63.7+41.2	13.6+8.8
Ciruela	58.2+5.2	7.8+0.7
Platano	42.2+8.1	11.2+2.1
Manzana	34.1+4.8	6.4+0.9
Aguacate	12.7+4.7	3.5+1.3

Tabla 6. Contenido de fenoles totales en frutas (Vinson,2001).

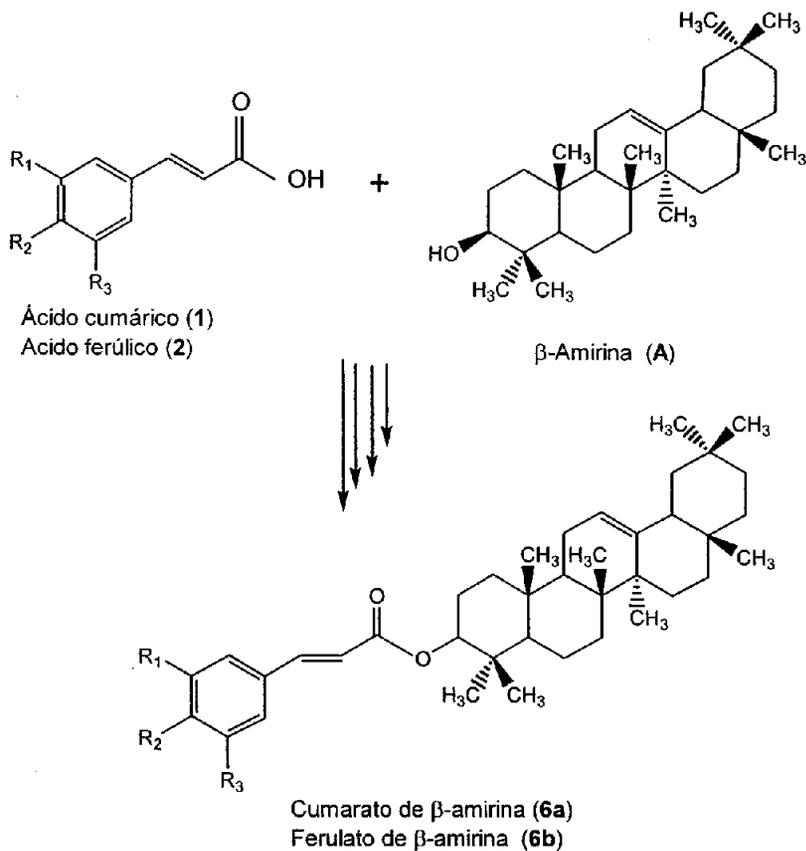
La revisión realizada, resalta la importancia de los ésteres de triterpenos, los cuales son destacables; por las varias funciones fisiológicas que presentan, de ahí la motivación en desarrollar metodologías o procedimientos para su síntesis y que permite su uso posterior como complemento o aditivos de alimentos. Para lo cual se han planteado los siguientes objetivos.



OBJETIVOS

1. Objetivo general

Obtener mediante una ruta que hace uso de reacciones químicas y una enzimática los hidroxicinamatos de β -amirina, los cuales son análogos a algunos de los compuestos responsables de la actividad nutracéutica atribuida al arándano.



2. Objetivos particulares:

- Obtención, purificación e identificación de β -amirina (**A**) a partir de la árbol del nanche (*Byrsonima crassifolia*) y el ácido ursólico (**B**); de la planta de tomillo (*Thymus vulgaris*) mediante una técnica de extracción utilizando acetato de etilo y ácido acético al 2%.
- Preparación de cumarato de β -amirina (**6a**) y ferulato de β -amirina (**6b**) mediante una ruta químico-enzimática.
- Obtención del acetilado del ácido cumárico (**1**) y ferulico (**2**).
- Obtención de los cloruros del ácido cumárico y ferúlico acetilados (**4a** y **4b**).
- Ésterificación de los cloruros del ácido cumárico y ferúlico acetilados (**5a** y **5b**).
- Desprotección del cumarato y ferulato de β -amirina acetilados (**5a** y **5b**) utilizando lipasas obtenidas de *Candida antarctica* y *Lipozyme*.
- Identificación de todos los compuestos preparados en esta investigación, utilizando técnicas fisicoquímicas (p.f., Rf, IR, EM, ^1H , ^{13}C , RMN).



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material y métodos

Para el desarrollo experimental de este trabajo, se utilizaron diferentes reactivos y métodos, los cuales se encuentran especificados a continuación.

1.1. Reactivos

Ácido cumárico ($C_9H_8O_3$), ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$), ácido caféico ($C_9H_8O_4$), β -sitoesterol ($C_{29}H_{50}O$), sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_3 anh.), hidróxido de sodio (NaOH), carbón activado, malla molecular, gel de sílice, acetato de etilo ($CH_3COOC_2H_5$), acetona ($CH_3)_2CO$), ácido acético glacial (CH_3COOH), ácido clorhídrico concentrado (HCl_{conc}), anhídrido acético (CH_3CO)₂, cloruro de oxalilo ($C_2Cl_2O_2$), cloroformo ($CHCl_3$), diclorometano (CH_2Cl_2), éter de petróleo ($C_{11}H_{26}$), hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$), metanol (CH_3OH), piridina (C_5H_5N) y tolueno (C_7H_8). Todos los reactivos empleados fueron de grado reactivo analítico. En todos los experimentos se empleó agua destilada.

Reactivos biológicos: Las lipasas obtenidas de *Candida antarctica* y *Lipozyme* ambas de Novozymes.

1.2. Reveladores, Cloruro férrico ($FeCl_3$) y Sulfato cérico ($Ce(SO_4)_2$).

1.3. Equipo

Incubadora-agitadora, modelo 3531 (THERMOLYNE); bomba de vacío, modelo WP-25 (OAKTON); balanza AP 110s (OHAUS); (MEL-TEMP) 1001D cámara con lámpara UV con longitudes de onda 254 y 366nm, (CAMAG); rotavapor R-200 (BUCHI), parrilla de calentamiento con agitación magnética, modelo SPA 1025P (THERMOLYNE); recirculador de agua con control digital de temperatura 9101 (POLY SCIENCE); baño de agua (OAKTON).

1.4. Análisis espectroscópico de los compuestos obtenidos

Los compuestos obtenidos, fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo (IR), espectroscopía de masa (EM), resonancia magnética nuclear protónica (RMN 1H), y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C).

Los espectros de IR, se determinaron en un espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer 1600, las determinaciones se realizaron en pastilla de bromuro de potasio (KBr), las unidades se expresan en cm^{-1} .

Los espectros de masas fueron registrados en un espectrómetro de masas JEOL modelo JMS-SX102A, MASS Spectrometer, mediante la técnica FAB (Bombardeo de átomos rápido) e impacto electrónico.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN^1H) y de carbono-13 (RMN^{13}C) se generaron en un aparato Varian Unity Innova VXR-3005m el cual se operó a una frecuencia de 75.5 y 300 MHz. Los espectros fueron determinados utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3), los desplazamientos químicos de las señales están dados en unidades δ (ppm).

Todos los análisis anteriormente mencionados se efectuaron en la USAI, Facultad de Química de la UNAM.

1.5. Procedimientos generales

Cromatografía en capa fina.

Para el seguimiento de los resultados durante cada proceso, así como la detección de las materias primas se utilizó CCF, empleando placas de aluminio de gel de sílice con un espesor de 0.2mm (Alugram SIL G/UV) y placas de celulosa microcristalina con un espesor de 0.1mm (Macherey-Nagel).

Antes de revelar las placas, se visualizaron en lámpara de UV (onda corta de 254nm y onda larga 365nm). Posteriormente para el desarrollo de color se utilizaron reveladores como sulfato cérico y cloruro férrico.

Cromatografía en columna

Para la purificación de los triterpenos (**A** y **B**), así como los ésteres acetilados (**5a** y **5b**), se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía en columna utilizando columnas de vidrio de diferentes tamaños y como adsorbente gel de sílice de Macherey-Nagel.

Cromatografía en capa fina preparativa

Las placas empleadas en cromatografía en capa fina preparativa DC-Fertigplatten SIL G-200 con un espesor de 0.25mm fueron de Macherey-Nagel.



DESARROLLO EXPERIMENTAL

La estrategia a seguir para este trabajo se dividió en tres etapas, las cuales se mencionan a continuación:

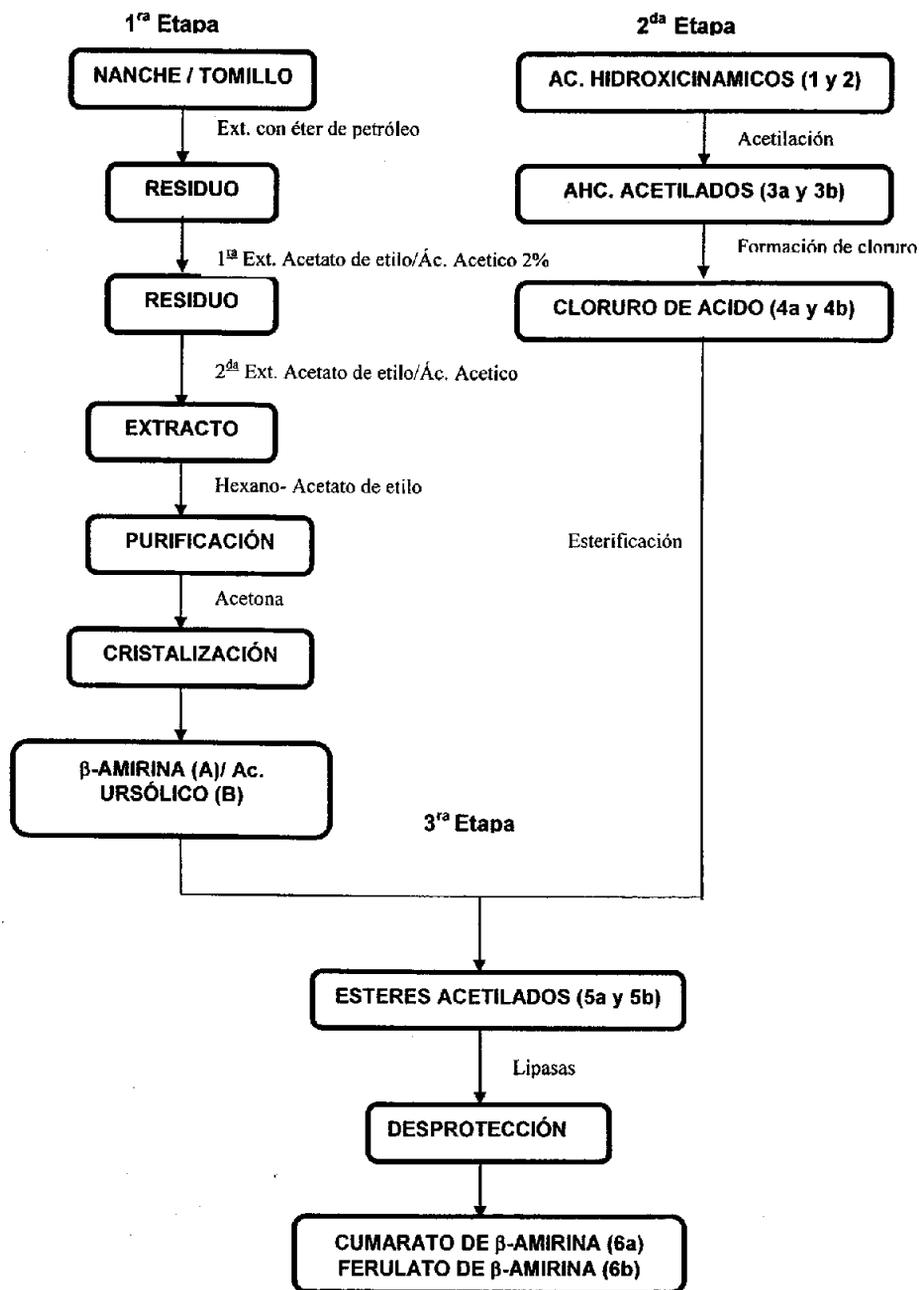
1.- Obtención de la β -amirina (**A**) de la corteza del árbol de nanche (*Byrsonima crassifolia*) y el ácido ursólico (**B**) de la planta de tomillo (*Thymus vulgaris*), mediante una técnica de extracción, preparación de la muestra, purificación haciendo uso de cromatografía en columna e identificación mediante técnicas fisicoquímicas como: pf, Rf, IR, EM, ^1H , ^{13}C RMN.

2.- Preparación de los ésteres acetilados (**5a** y **5b**) por métodos químicos, mediante reacciones de acetilación, formación de cloruro y esterificación.

3.- Desprotección del **5a** y **5b**, utilizando *Candida antarctica* y *Lipozyme*, así como identificación del cumarato y ferulato de β -amirina (**6a** y **6b**), utilizando técnicas fisicoquímicas como: pf, Rf, IR, EM, ^1H , ^{13}C , RMN.

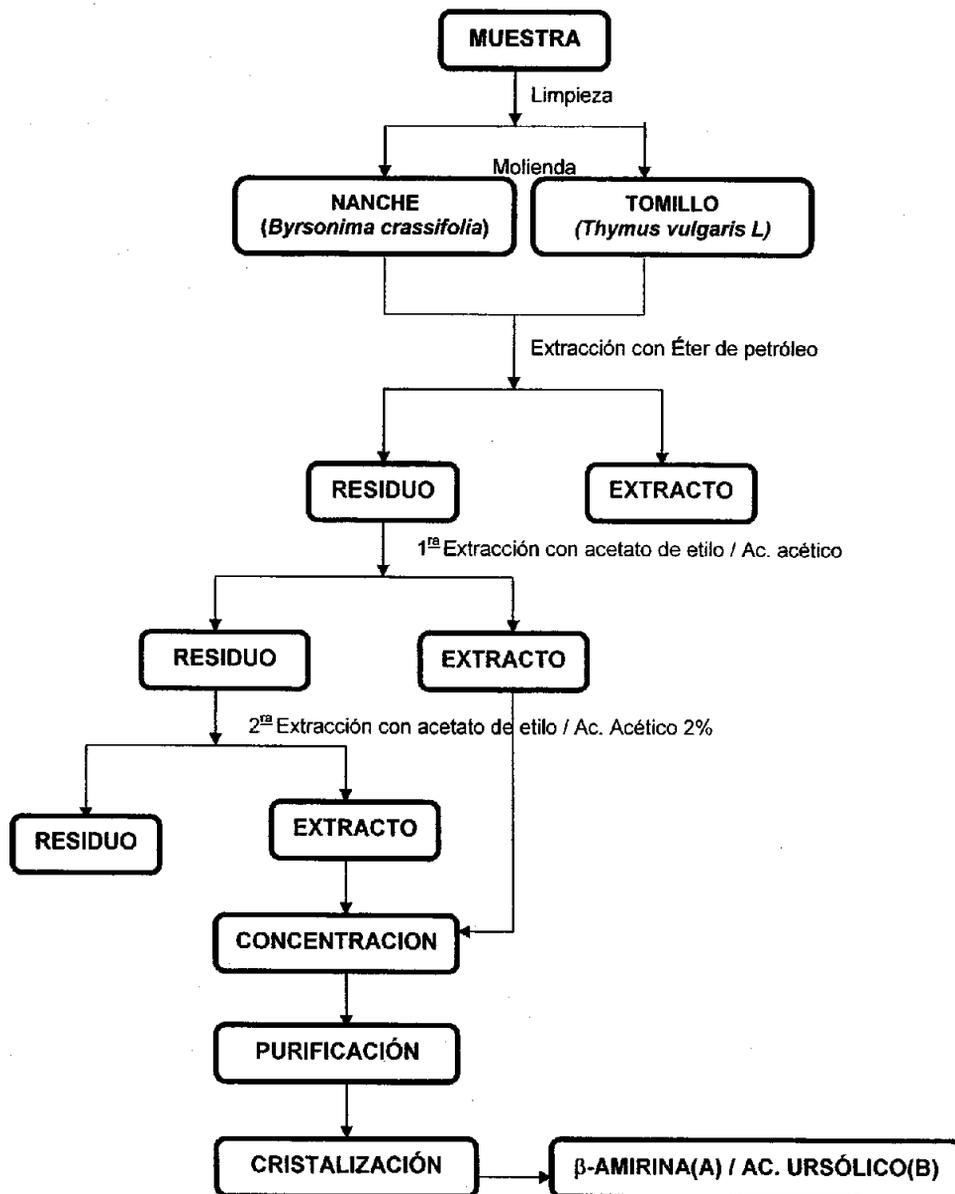
1. Diagrama General de Investigación

En el siguiente diagrama, se muestra de manera general la metodología seguida para la preparación químico-enzimática del cumarato de β -amirina (6a) y del ferulato de β -amirina (6b).



2. Diagrama de obtención de los triterpenos

El siguiente diagrama, muestra la metodología empleada para la obtención de β -amirina (A) y el ácido ursólico (B) a partir de fuentes abundantes mediante una técnica de extracción.



2.1. Primera parte del desarrollo experimental (Obtención de la β -amirina)

Para la obtención de la β -amirina (A) se utilizó la corteza fresca del árbol de nanche (*Byrsonima crassifolia*), realizando un secado de la corteza a temperatura ambiente, trituración manual; posteriormente se realizó un desengrasado, así como una serie de extracciones con disolventes de diferente polaridad, cristalización y finalmente se le realizó al producto final una serie de análisis fisicoquímicos como son: pf, Rf., IR, EM, ^1H , ^{13}C , RMN. A continuación se explica de manera más amplia cada uno de los pasos descritos anteriormente.

2.1.1. Preparación de la muestra

Para la obtención de la β -amirina (A), se trabajó aproximadamente con 3 Kg de la corteza fresca del árbol de nanche (*Byrsonima crassifolia*) traída de Campeche.

La preparación de la muestra consistió en secar la corteza fresca del nanche a temperatura ambiente (25-28 °C), colocándola sobre un papel absorbente durante 5 días; una vez seca, se hizo una reducción de tamaño mediante trituración manual para obtener un tamaño homogéneo, finalmente se obtuvo 2.05 Kg.

2.1.2. Desengrasado

Se colocaron los 2.05 kg de la muestra en dos matraces de 2 L, adicionando éter de petróleo a cada uno, hasta que el disolvente cubriera por completo la muestra (1.5 L), se dejaron en reposo por 24 horas a temperatura ambiente (25-28 °C). Posteriormente se filtraron y se concentraron por evaporación. Éste extracto se separó del resto de las muestras, para su posterior estudio (Rastrelli, 1996).

2.1.3. Extracción

Después del desengrasado, se realizaron 4 extracciones por matraz, adicionando a cada uno acetato de etilo-ácido acético al 2%, hasta que el disolvente cubriera por completo la muestra (1.5 L), se dejaron en reposo por 24 hrs a temperatura ambiente (25-28 °C). Finalmente se filtró cada extracción por separado a través de un embudo de tallo largo, el filtrado de cada extracto se concentró por evaporación (Murphy, 2003; Rastrelli, 1996).

2.1.4. Análisis de los extractos

Finalmente el producto aislado se analizó por pruebas cromatográficas de capa fina. Como fase móvil se utilizó una mezcla de hexano-acetato de etilo en una proporción 7:3. La coloración obtenida por el compuesto fue comparada con una referencia proporcionada por el Instituto de Química, para la identificación del triterpeno.

2.1.5. Cristalización

A cada extracto concentrado se le adicionó acetona fría y se mantuvo en un baño de hielo, aparte se mantuvo enfriando un matraz con acetona. Después de que el extracto estuvo en reposo y se observó la formación de cristales, éstos se filtraron a vacío en un embudo Büchner, el producto obtenido fue recuperado y lavado con acetona fría. Finalmente se obtuvo 8.264 g del compuesto **A**. Los cristales obtenidos fueron analizados por técnicas fisicoquímicas como pf, Rf., IR, EM, ^1H , ^{13}C , RMN (Rastrelli, 1996).

2.2. Obtención del ácido ursólico

En el caso de la obtención del ácido ursólico (**B**) se realizó de la planta de tomillo (*Thymus vulgaris* L) (Somova, 2003), para lo cual se siguió el mismo procedimiento como para la obtención de la β -amirina. El único paso que se agregó a este procedimiento fue la purificación por medio de cromatografía en columna.

2.2.1. Preparación de la muestra

Para la obtención del ácido ursólico (**B**) se trabajó con 5 Kg de la planta de tomillo. La preparación de la muestra consistió en secar la planta de tomillo (*Thymus vulgaris*) a temperatura ambiente (25-28°C), colocándola sobre un papel absorbente durante 5 días. Una vez seca la muestra se hizo una reducción de tamaño mediante trituración manual para obtener un tamaño homogéneo, finalmente se obtuvo 1 Kg.

2.2.2. Desengrasado

Con el fin de obtener el extracto de la planta de tomillo. Se colocaron 1 Kg de la muestra en dos matraces de 2 L (500 g en cada uno), adicionando éter de petróleo a cada uno, hasta que el disolvente (1.5 L) cubriera por completo la muestra, se dejaron en reposo por 24-48 hrs a temperatura ambiente (25-28 °C). Posteriormente se filtró cada extracto a través de un embudo de tallo largo. El filtrado se separó del residuo para concentrarlo por evaporación. El extracto se separó del resto de las muestras, para su posterior estudio (Murphy, 2003; Somova, 2003).

2.2.3. Extracción

Después del desengrasado, se adicionó acetato de etilo-ácido acético al 2% a cada matraz, hasta que el disolvente (1.5 L) cubriera por completo la muestra, se dejó en reposo por 24hrs a temperatura ambiente, se repitió la extracción 4 veces por matraz.

Posteriormente cada extracción se filtró por separado a través de un embudo de tallo largo. El filtrado de cada extracto se concentró por evaporación. Después de obtener el extracto concentrado se filtró a vacío en un embudo Büchner, con una cama de celita, otra de carbón activado para eliminar la clorofila. Para finalmente, concentrarlo por evaporación.

2.2.4. Análisis de los extractos

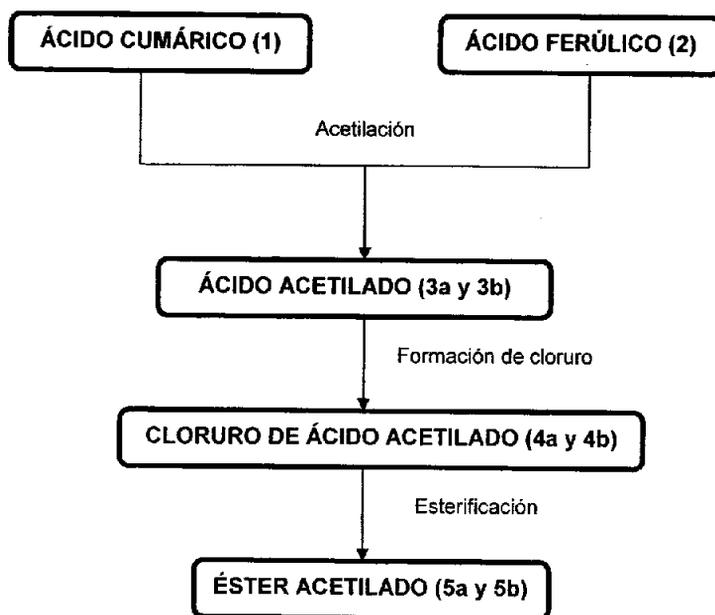
Los extractos obtenidos, fueron analizados por pruebas cromatográficas de capa fina. Como fase móvil se utilizó una mezcla de hexano-acetato de etilo en una proporción 95:5 (Murphy, 2003). La coloración obtenida por el compuesto fue comparada con una referencia proporcionada por el Instituto de Química, para la identificación del triterpeno.

2.2.5. Fraccionamiento por cromatografía en columna

Cada extracto (4), se purificó mediante cromatografía en columna, empleando gel de sílice y una columna de 10 cm de diámetro por 30 cm de alto, para la elusión se realizaron 10 extracciones de 200mL de hexano-acetato de etilo 95:5. 9:1, 8:2, 7:3. La purificación de este compuesto, se siguió por cromatografía en capa fina, a lo largo de todas las fracciones obtenidas. Finalmente se obtuvo 1.4 g. del compuesto **B**. Se identificó por técnicas fisicoquímicas como pf, Rf, IR, EM, ¹H, ¹³C, RMN (Hung, 2001).

3. Diagrama de obtención de los ésteres del ácido cumárico y ferúlico acetilados

El siguiente diagrama muestra la metodología empleada, para síntesis química del éster del ácido cumárico acetilado (5a) y el éster del ácido ferúlico acetilado (5b).



3.1. Segunda parte del desarrollo experimental

La segunda etapa de esta investigación consistió en la preparación de los ésteres del ácido cumárico y ferúlico acetilados (5a y 5b). El rendimiento obtenido para cada una de estas etapas se menciona en la sección de resultados.

3.1.1. Acetilación de los ácidos cumárico y ferúlico

La reacción de acetilación se realizó por un método sencillo, mediante el empleo del anhídrido acético y piridina. Para explicar el procedimiento se basará en la preparación del 5a.

Para la acetilación del compuesto **1**, en un matraz bola se pesó 2.05 g, se disolvió en 8 mL de anhídrido acético, en presencia de 5 mL de piridina como medio de reacción, esta mezcla se dejó en un baño de agua con agitación a una temperatura 35-40°C por 24 hrs. La mezcla de reacción del ácido, se trató con ácido clorhídrico al 5%, acetato de etilo y agua. El extracto obtenido se concentró utilizando la bomba de alto vacío. Todo el proceso de acetilación para los compuestos **1** y **2**, se siguió por medio de CCF, empleando como eluyente un par de disolventes Hexano-Acetato de etilo 7:3. Para el compuesto **3a** se obtuvo 2.58 g y para el **3b** 1.05 g.

3.1.2. Formación de cloruros de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados

El cloruro del ácido cumárico acetilado (**4a**) y del ácido ferúlico acetilado (**4b**) se prepararon a partir de 2 g de **3a** y de 1 g de **3b** respectivamente.

Para la formación del compuesto **4a**, en un matraz bola se pesó 2.0 g de **3a** se disolvió en 20 mL de diclorometano. A esta disolución se le adicionó lentamente 3 mL de cloruro de oxalilo. Se colocó a reflujo con agitación por 24 hrs.. Después se evaporó el disolvente para tener el compuestos en forma sólida. Debido a que los compuestos **4a** y **4b** son poco estables se prepararon in situ, por lo que de estos compuestos no se tienen referencias, solo se dio seguimiento a la reacción a través de CCF.

3.1.3. Formación del cumarato de β -amirina acetilado y ferulato de β -amirina acetilado.

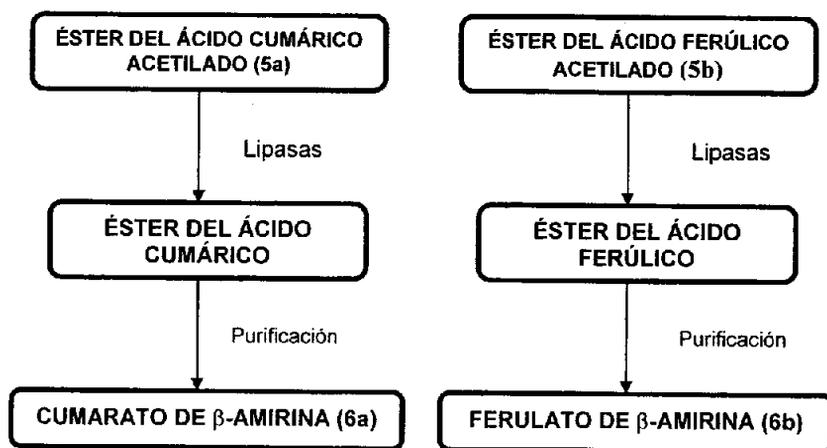
Al **4a** *in situ*, se disolvió en 5 mL de diclorometano, se le adicionó 2.7 g (0.006 mol) de **A**, en presencia de 5 mL de piridina, para obtener finalmente el cumarato de β -amirina acetilado (**5a**). La mezcla de reacción, se mantuvo a reflujo con agitación por 24 hrs. Para obtener el ferulato de β -amirina acetilado (**5b**) se siguió el mismo procedimiento explicado para la formación del **5a** (Mastihubová et al, 2001).

Una vez que por CCF se observó la formación de los productos se prosiguió a evaporar el disolvente. Para finalmente tratarlos con ácido clorhídrico al 5% y acetato de etilo. Los extractos obtenidos se concentraron a sequedad en el rotavapor.

Purificación de los productos: Ya concentrados los productos, estos se purificaron por cromatografía en columna, utilizando una columna de 6 cm de diámetro por 18 cm de alto, se empaco con gel de sílice y se eluyeron 15 fracciones de 100 mL de hexano-acetato de etilo 95:5, 9:1 y 1:1, las cuales se concentraron a sequedad en un rotavapor por separado y se analizaron por CCF, dando como producto 1.18g de cumarato de β -amirina acetilado (**5a**) y 0.63g de ferulato de β -amirina acetilado (**5b**).

4. Diagrama de desacetilación del cumarato y ferulato de β -amirina acetilados

El siguiente diagrama muestra la metodología empleada, para hidrólisis enzimática del **5a** y del **5b**, para obtener el cumarato de β -amirina (**6a**) y el ferulato de β -amirina (**6b**).



4.1. Tercera parte del desarrollo experimental

Para realizar la ruta de síntesis propuesta en este trabajo, con el fin de desproteger el grupo hidroxilo (-OH) de los ácidos **5a** y **5b**, se montó una técnica enzimática utilizando lipasas de *Candida antarctica* y *lipozyme* ambas de Novozymes, para obtener el cumarato de β -amirina (**6a**) y ferulato de β -amirina (**6b**) con las características deseadas.

El rendimiento obtenido para cada una de estas etapas se menciona en la sección de resultados.

4.1.1. Desacetilación del cumarato de β -amirina acetilado y ferulato de β -amirina acetilado

Para la reacción de desacetilación con lipasas, se colocó en diferentes viales 20 mg de las muestras **5a** y **5b** por separado con 0.1 mL de octanol y 10 mL de tolueno, adicionando posteriormente 10 mg de enzima ya sea de *Candida antarctica* o de *Lipozyme*. Los viales se colocaron en diferentes matraces, se mantuvieron en incubación a 45°C y en agitación a 250 rpm, alrededor de 4-5 hrs. Durante este proceso se dio seguimiento a la reacción por CCF.

4.1.2. Purificación de los compuestos finales

Después del tiempo de reacción y de analizar por medio de cromatografía en capa fina cada una de las muestras de los productos finales, la mezcla de reacción de cada ácido, se filtró y se lavó utilizando diclorometano. Finalmente se evaporó el disolvente, dando como producto el cumarato de β -amirina (**6a**) y el ferulato de β -amirina (**6b**) con las características deseadas (Cruz, 2004).

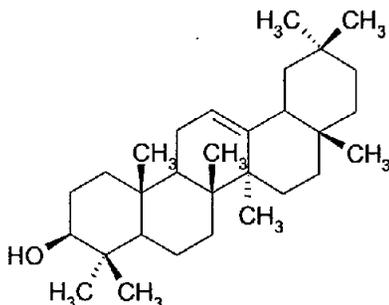
A continuación se presentan los resultados para la obtención de los triterpenos β -amirina **A**, ácido ursólico **B**, así como para la preparación del cumarato de β -amirina **6a** y ferulato de β -amirina **6b**) durante el desarrollo del presente trabajo.

Para cada uno de los compuestos los resultados se presentan en tablas diferentes, mencionando las características físicas, resultados espectroscópicos y resultados de resonancia magnética nuclear. En algunos casos, se reportan los datos teóricos que se conocen en la literatura.

1. Obtención de triterpenos

1.1. Obtención de la β -Amirina

Para la formación del cumarato de β -amirina (**6a**) y ferulato de β -amirina (**6b**), fue indispensable la obtención de un triterpeno. Para lo cual la primera parte de esta investigación consistió en la obtención de la β -amirina (**A**) de la corteza del árbol de nanche (*Byrsonima crassifolia*) de lo cual se obtuvo 8.246g con un rendimiento del 0.40%. En seguida se presentan su estructura así como los resultados obtenidos.



Estructura de la β -amirina (**A**)

El compuesto **A** se analizó por técnicas como son: pf, Rf, IR, EM, ^1H , ^{13}C RMN, los resultados se compararon con datos teóricos, los cuales concuerdan con los resultados obtenidos, como se observa en las siguientes tablas 1, 2 y 3.

Características	Experimental	Teórico
Tipo de cristal	Cristal blanco-Beige	Cristal blanco
Punto de fusión	195-198°C	193-195°C
P. Molecular	426g/mol	426g/mol
Rf.	0.8 (Hex-AcOEt 7:3)	---
Rendimiento	0.40%	---

Tabla 1. Características físicas de la β -amirina (**A**)

En el anexo para **A**, se muestra el espectro de masas con un valor 426, el cual concuerda con los datos reportados. En el espectro de IR, se observan bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales característicos de este triterpeno como es: en 3298 (OH). En la tabla 2, se muestran los resultados de los parámetros de IR, EM, esperando con esto tener una referencia más para dicho compuesto

Análisis	Experimental	Teórico
IR	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 3298(OH) 1712 y 1660	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 1790, 1708, 1663 y 1620
EM	m/z: 426 (M^+ , $C_{30}H_{50}O$), 412(2.1), 408(0.5), 218(100), 203(24), 189(5), 135(8), 133(4).	m/z: 426 (M^+ , $C_{30}H_{50}O$), 411(2.1), 393 (0.5), 218(100), 207(2), 203(24), 191(5), 189(5), 175(5), 161(4), 135(8), 133(4).

Tabla 2. Identificación espectroscópica de la β -amirina (**A**).

En los espectros de RMN¹H y RMN¹³C (Ver anexo para **A**), resulta fácil distinguir las señales que corresponden a las características de la β -amirina (**A**) como son; los ocho metilos en las siguiente posiciones en C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, los cuales muestran señales a un campo alto entre 0.6 y 1.8 ppm, de igual forma se confirma la obtención de este compuesto por la doble ligadura entre C-12 y C-13 el cual se presenta en 5.18 (1H, t, J=3.6Hz, H-12) lo cual se confirma con los desplazamientos reportados por Knight, 1974; Rahman, 1990, así como la posición del grupo-OH en el C-3 presentada con una señal en 3.23 (1H, m, J=5.1Hz., H-3). Los datos obtenidos de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C para la β -amirina (**A**), se muestran en la tabla 3.

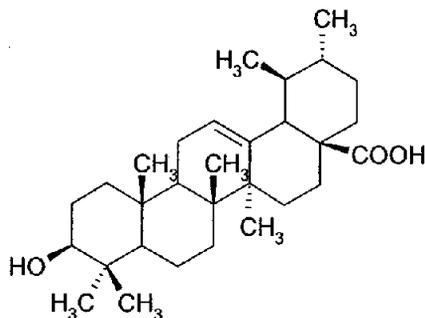
Análisis	Experimental	Teórico
RMN ¹ H	CDCl ₃ , TMS 299.7MHz. δ : 5.18(1H, t, J= 3.6Hz, H-12), 3.23(1H, m, J=5.1Hz., H-3) 1.13, 0.99, 0.96 y 0.93 (cada uno 3H, s, H-27, H-26, 23, y 25), 0.87 (6H, s, H-30, 29), 0.83 y 0.79 (cada uno 3H, s, H-28, 24)	CDCl ₃ , TMS 100MHz. δ : 5.18(1H, t, J= 4.0Hz, H-12), 3.22(1H, m, J=12Hz., H-3), 1.12, 0.99, 0.96 y 0.93 (cada uno 3H, s, H-27, H-26, 23, y 25), 0.86 (6H, s, H-30, 29), 0.82 y 0.78 (cada uno 3H, s, H-28, 24)
RMN ¹³ C	CDCl ₃ , TMS 75.3MHz. δ : 145.1(C-13), 121.7(C-12), 79.0(C-3), 55.1(C-5), 47.6(C-9), 47.2(C-18), 46.8(C-19), 41.7(C-14), 38.7(C-4,8), 38.6(C-8), 37.1(C-22), 34.7(C-21), 33.3(C-29), 32.6(C-7), 32.5(C-17), 31.1(C-20), 28.4(C-28), 28.1(C-23), 27.2(C-2), 26.9(C-16), 26.1(C-15), 25.9(C-27), 23.7(C-30), 23.5(C-11), 18.3(C-6), 16.8(C-26), 15.5(C-25), 15.5(C-24)	CDCl ₃ , TMS 22.63MHz. δ : 145.1(C-13), 121.18(C-12), 79.0(C-3), 55.3(C-5), 47.7(C-9), 47.3(C-18), 46.9(C-19), 41.8(C-14), 38.8(C-4,8), 38.7(C-8), 37.6(C-22), 34.8(C-21), 33.3(C-29), 32.8(C-7), 32.5(C-17), 31.1(C-20), 28.4(C-28), 28.2(C-23), 27.3(C-2), 27.0(C-16), 26.2(C-15), 26.0(C-27), 23.7(C-30), 23.6(C-11), 18.5(C-6), 16.9(C-26), 15.6(C-25), 15.5(C-24)

Tabla 3. Identificación por resonancia magnética nuclear de la β -amirina (**A**).

1.2. Obtención del ácido ursólico

Para la obtención del ácido ursólico (B) se trabajó con la planta de tomillo, (*Thymus vulgaris* L.) (Somova, 2003) se obtuvo 1.4 g, con un rendimiento 0.14%. Éste compuesto se analizó por técnicas: pf, Rf, IR, EM, ^1H , ^{13}C RMN, los resultados se analizaron con datos teóricos, los cuales concuerdan con los resultados obtenidos, como se observa en las tablas 4, 5 y 6.

Aunque la obtención del ácido ursólico (B) fue adecuada, se decidió utilizarse únicamente la β -amirina (A). Por lo que posteriormente se desarrollará la metodología empleando esta molécula; su estructura se muestra en la siguiente figura, y las características físicas de este compuesto se presentan en la tabla 4.



Estructura del ácido ursólico (B)

Características	Experimental	Teórico
Tipo de cristal	Cristal blanco	Polvo blanco
Punto de fusión	245-248°C	279-281°C
P. Molecular	456g/mol	456g/mol
Rf.	0.7 (Hex-AcOEt 9:1)	---
Rendimiento	0.14%	---

Tabla 4. Características físicas del ácido ursólico (B).

En el anexo para B, se muestra el espectro de masas con valor 456, el cual corresponde con el peso molecular por datos teóricos, de igual forma la presencia de los grupos funcionales en el espectro de IR; presentan bandas de absorción correspondientes al compuesto en 3437 (OH), 2926 y 1456 (CH₃) (Hung, 2001).

Los resultados obtenidos del análisis espectroscópico por IR y Masas del ácido ursólico (B) se reportan en la tabla 5, así como en anexo para B.

Análisis	Experimental	Teórico
IR	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 3437(OH), 2926, 1700-1690(COOH), 1456, 1387, 1043 y 996	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 3437.71(OH), 2926.36, 1700-1690(COOH), 1456.21, 1387.19, 1043.89 y 996.30
EM	m/z : 456 (M^+ , $C_{30}H_{48}O_3$), 439, 411(3), 248(100), 203(47)	m/z : 456 (M^+ , $C_{30}H_{48}O_3$), 410(3), 248(100), 203(47).

Tabla 5. Identificación espectroscópica del ácido ursólico (B).

En este caso, en el espectro de RMN¹H y RMN¹³C (Ver anexo para el ácido ursólico B), los desplazamientos C-23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 se encuentra en un campo alto entre 0.8 y 1.4 ppm, los cuales corresponden a los metilos de éste compuesto, así como la posición del grupo -OH en C-3, está señal se localiza en 3.19 (dd, J= 5.7HZ, H-3), todos éstos datos concuerda con las referencias teóricas (Rahman, 1990).

Los datos obtenidos de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C para el ácido ursólico (B), se muestran en la tabla 6.

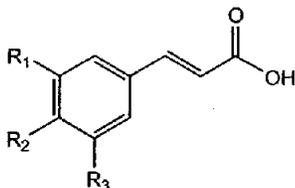
Análisis	Experimental	Teórico
RMN ¹ H	CDCl ₃ , TMS 300.2MHz. δ : 5.28(1H, t, J= 3.6Hz, H-12), 3.19(1H, dd, J= 5.7Hz, H-3), 2.20(1H, d, J= 11.4Hz, H-18), 1.25, 1.08, 0.98(3H, d, J= 10.8Hz, H-29), 0.92(3H, s, H-25), 0.86(3H, J= 3Hz), 0.82(3H, s), 0.77(3H, s)	CDCl ₃ , TMS 300Hz. δ : 5.28(1H, t, J= 3.6Hz, H-12), 3.12(1H, dd, J= 5.2Hz, H-3), 2.18(1H, d, J= 13.8Hz, H-18), 1.25 y 1.09(3H, s), 0.97(3H, d, J= 6.8Hz), 0.92(3H, s), 0.86(3H, J= 6.3Hz), 0.81(3H, s), 0.78(3H, s).
RMN ¹³ C	CDCl ₃ , TMS 75.5MHz. δ : 15.3, 15.5, 17.0, 18.2, 21.1, 23.1, 23.4, 24.1, 27.1, 28.0, 29.5, 30.6, 32.9, 36.6, 36.9, 38.7, 39.0, 39.4, 41.9, 47.4, 47.5, 52.6, 55.1, 78.8, 125.3, 138.1, 180.2.	CDCl ₃ , TMS 75.5MHz. δ : 15.5, 15.6, 17.0, 18.3, 21.2, 23.3, 23.6, 24.1, 27.2, 28.0, 29.7, 30.6, 32.9, 36.7, 37.0, 38.7, 39.0, 39.4, 42.0, 47.5, 47.9, 52.6, 55.2, 79.0, 125.8, 137.9, 181.2.

Tabla 6. Identificación por resonancia magnética nuclear del ácido ursólico (B).

2. Obtención de los ésteres del ácido cumárico y ferúlico acetilados

Como segunda etapa en la metodología empleada para este trabajo, fue la preparación de cumarato de β -amirina acetilado (**5a**) y ferulato de β -amirina acetilado (**5b**), mediante el uso de reacciones químicas.

Los ácidos hidroxicinámicos utilizados fueron el ácido cumárico (**1**) y el ácido ferúlico (**2**) este último fue extraído en el laboratorio (Tercero, 2001). Ambos compuestos se analizaron por las siguientes técnicas: pf, Rf, IR, EM, ^1H , ^{13}C RMN, los resultados obtenidos se analizaron con datos teóricos los cuales concuerdan como se observa en las siguientes tablas 7, 8 y 9.



$R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$ Ácido Cumárico (**1**)

$R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OMe}$ Ácido Ferúlico (**2**)

Estructura base de los ácidos hidroxicinámicos.

Características	Ácido Cumárico (1)	Ácido Ferúlico (2)
Formula	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$
P. Molecular	164.08g/mol	194.19g/mol
Tipo de cristal	Polvo blanco	Polvo amarillo
Punto de fusión	$^{\circ}196\text{-}200\text{ }^{\circ}\text{C}$	$162\text{-}167\text{ }^{\circ}\text{C}$
Rf.	0.57 (Hex-AcOEt 6:4)	0.54(Hex-AcOEt 8:2)

Tabla 7. Características físicas de los ácidos hidroxicinámicos.

Los resultados del análisis espectroscópico por IR y Masas de los ácidos hidroxicinámicos se reportan en las siguiente tabla 8.

Análisis	Ácido Cumárico (1)	Ácido Ferúlico (2)
IR	(KBr) $V_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3372(OH), 1671(C=O), 1627, 1511, 1448, 1213, 1171, 978, 832.41, 691.	(KBr) $V_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3434(aromático-OH), 2918(C-H), 1691(C=O), 1432(aromático-OH), 1275(aromático-O-C), 1034(C-O).
EM	m/z: 164 (M^+ , $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$), 147, 119, 91, 65.	m/z: 194 (M^+ , $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$), 194(7%), 177(100%), 136(28%), 107(24%), 89(21%), 77(52%), 39(7%).

Tabla 8. Identificación espectroscópica de los ácidos hidroxicinámicos

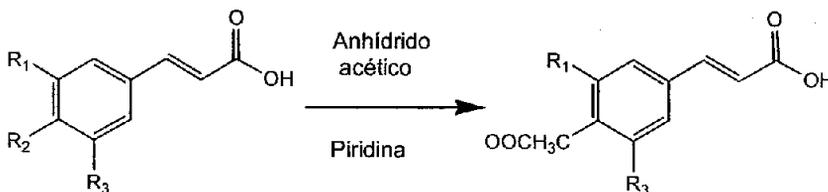
Los datos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C para los ácidos hidroxicinámicos se muestran en la tabla 9.

Análisis	Ácido Cumárico (1)	Ácido Ferúlico (2)
RMN ^1H	CDCl_3 , TMS 300.2MHz δ : 7.76(2H, <i>d</i> , J=16.2Hz, H-3), 7.57(2H, <i>d</i> , J=8.4Hz, H-5), 7.15(2H, <i>d</i> , J= 1.8Hz, H-6), 6.41(1H, <i>dd</i> , J=15.9Hz, H-2)	CDCl_3 , TMS 300.2MHz. δ : 7.71(1H, <i>t</i> , <i>d</i> , J=15.9MHz); 7.12(1H, <i>d</i> , J=8.1MHz); 7.07(1H, <i>dd</i> , J=4.3MHz); 6.93(1H, <i>d</i> , J=1.9MHz; 6.29(1H, <i>t</i> , <i>d</i> , J=15.8MHz; 3.94(3H, <i>s</i> , $\text{CH}_3\text{-O}$).
RMN ^{13}C	CDCl_3 , TMS 300.2MHz δ : 115.7, 116.45, 125.84, 130.76, 145.08, 160.05, 168.9.	CDCl_3 , TMS 75.5MHz δ : 56.2, 111.5, 115.9, 116.1, 123.3, 126.3, 145.3, 148.4, 149.5, 168.9.

Tabla 9. Identificación por resonancia magnética nuclear de los ácidos hidroxicinámicos.

2.1. Acetilación de los ácidos cumárico y ferúlico

Para llegar a la formación de los compuesto **3a** y **3b**, se tomó como materia de partida los ácidos cumárico (1) y el ferúlico (2), como se muestra en la siguiente reacción.



$\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OH}$, $\text{R}_3=\text{H}$ Ac. cumárico (1) $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{H}$ Ac. cumárico acetilado (3a)
 $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OH}$, $\text{R}_3=\text{OMe}$ Ac. ferúlico (2) $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{OMe}$ Ac. ferúlico acetilado (3b)

Los 2.58g de **3a** con un rendimiento del 94% y los 1.05 g de **3b** con un rendimiento del 96%, se les analizó por medio de técnicas fisicoquímicas. En las siguientes tablas 10, 11 y 12 se presentan los resultados..

Características	Ac. Cumárico Acetilado (3a)	Ac. Ferúlico Acetilado (3b)
Formula	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$
P. Molecular	207.1 g/mol	236.12 g/mol
Tipo de cristal	Polvo blanco-hueso	Cristal amarillo
Punto de fusión	$^{\circ}\text{154-159 }^{\circ}\text{C}$	$166-170 }^{\circ}\text{C}$
Rf:	0.62(Hex-AcOEt, 6:4)	0.60(Hex-AcOEt, 8:2)
Rendimiento	94%	96%

Tabla 10. Características físicas de los ácidos hidroxicinámicos acetilados.

En la tabla 11 se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por IR, EM para los compuestos **3a** y **3b**. Los resultados para el **3a** en el espectro de IR presenta bandas características en 2822 correspondientes al compuesto acetilado, así como en 1205 (COOH). Al ver el espectro de masas el valor 207 corresponde con el valor calculado para **3a**. De igual forma para el **3b**, el valor obtenido de M^+ 236 corresponde con el esperado para la estructura de este compuesto.

Análisis	Ac. Cumárico Acetilado (3a)	Ac. Ferúlico Acetilado (3b)
IR	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 2822(OCH ₃), 1677.90(C=O), 1507(OH), 1585, 1507, 1428, 1371, 1311, 1286, 1205, 993, 839, 683, 632.	(KBr) V_{max}/cm^{-1} ---
EM	m/z: 207 (M^+ , C ₁₁ H ₁₀ O ₄), 120, 89, 65	m/z: 236 (M^+ , C ₁₂ H ₁₂ O ₅), 194(10), 149(100), 132(40), 105(12), 89(5).

Tabla 11. Identificación espectroscópica de los ácidos hidroxicinámicos acetilados.

En base a la referencia de Mastihubova, 2001, los datos de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C para el **3a** y **3b**, que se muestran en la tabla 12 concuerdan, ya que para el **3a** el espectro de RMN¹H, se observa una señal en 2.32 (s, 3-H) correspondiente al ácido cumárico acetilado (**3a**). Mientras que para el **3b**, el espectro de RMN¹H, muestra la señal en 3.81 (s, 3-H, OCH₃) a pesar de que no se cuenta con los espectros de IR y RMN¹³C, para éste último, los resultados obtenidos de RMN¹H y EM son suficientes para decir que se trata del ácido ferúlico acetilado (**3b**).

Análisis	Ácido Cumárico Acetilado (3a)	Ácido Ferúlico Acetilado (3b)
RMN ¹ H	CDCl ₃ , TMS 300.2MHz. δ: 7.76(2H, d, J=16.2Hz, H-3), 7.57(2H, d, J=8.4Hz, H-5), 7.15(2H, d, J= 1.8Hz, H-6), 6.41(1H, dd, J=15.9Hz, H- 2), 2.32(3H, s, 7-H).	CDCl ₃ , TMS 300MHz. δ: 7.59(d, 1- H.), 7.09(dd, 1H, J=8.1Hz, H-6), 6.5(d, 1-H, J= 15.9Hz), 3.81(s, 3- H, OCH ₃).
RMN ¹³ C	CDCl ₃ , TMS 75.5MHz. δ: 117.2, 122.2, 129.5, 131.7, 145.8, 152.4, 169.1, 171.3	CDCl ₃ , TMS 300.2MHz. δ:

Tabla 12. Identificación por resonancia magnética nuclear de los ácidos hidroxicinámicos acetilados

2.2. Formación de los cloruros de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados

Los cloruros del ácido cumárico y ferúlico (**4a** y **4b**) se obtuvieron a partir del **3a** y **3b** respectivamente, a través de la reacción con cloruro de oxalilo en diclorometano, como se muestra en la siguiente reacción.



$R_1=H, R_3=H$ Ac. cumárico acetilado (**3a**)

$R_1=H, R_3=OMe$ Ac. ferúlico acetilado (**3b**)

$R_1=H, R_3=H$ Cloruro ác. cumárico acetilado (**4a**)

$R_1=H, R_3=OMe$ Cloruro ác. ferúlico acetilado (**4b**)

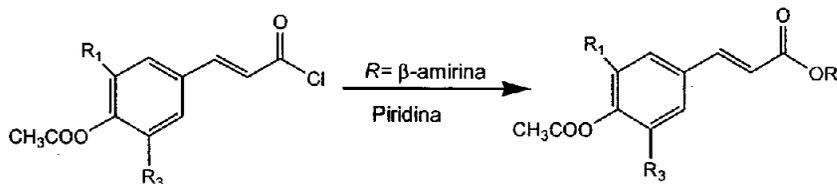
Los compuestos **4a** y **4b** presentaron un rendimiento del 92%. Éstos no se mandaron a analizar por ningún método espectroscópico para su identificación, por ser poco estables, además de que se prepararon *in situ* e inmediatamente se utilizaron para la obtención del **5a** y **5b** respectivamente. En la tabla 13, se presentan algunas características físicas que éstos presentaron.

Características	Cloruro del Ác. Cumárico (4a)	Cloruro del Ác. Ferúlico (4b)
Formula	$C_{11}H_9O_3Cl$	$C_{12}H_{11}O_4Cl$
P.molecular	224 g/mol	254 g/mol
Rf.	0.82(Hex-AcOEt, 6:4)	0.72(Hex-AcOEt, 8:2)
Rendimiento	92%	92%

Tabla 13. Características físicas del cloruro de los ácidos hidroxycinámicos.

2.3. Esterificación de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados.

La siguiente reacción muestra la formación de los ésteres de los ácidos cumárico y ferúlico acetilados (**5a** y **5b**), utilizando el **4a** y **4b** respectivamente y reaccionando con **A** en presencia de piridina.



$R_1=H, R_3=H$ Cloruro cumárico acetilado (**4a**) $R_1=H, R_3=H$ Cumarato de β -amirina acetilado (**5a**)

$R_1=H, R_3=OMe$ Cloruro ferúlico acetilado (**4b**) $R_1=H, R_3=OMe$ Ferulado de β -amirina acetilado (**5b**)

Los compuestos **5a** y **5b**, presentaron las características físicas que se indican en la tabla 14.

Características	Éster cumárico acetilado (5a)	Éster ferúlico acetilado (5b)
Formula	C ₄₁ H ₅₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₀ O ₅
P. Molecular	614.6g/mol	644.6g/mol
Tipo de cristal	Polvo blanco-hueso	Cristal amarillo
Pf.	238-243°C	150-155 °C
Rf.	0.92(Hex-AcOEt,8:2)	0.92(Hex-AcOEt, 7:3)
Rendimiento	34%	27%

Tabla 14. Características físicas de los ésteres de ácidos hidroxicinámicos acetilados

En la tabla 15 se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por IR, EM para los compuestos. En el espectro de IR el **5a**, presenta bandas características en 2851 (O-CH₃) y 1702 (C=O). Mientras que en el espectro de masas el valor 614, corresponde con el peso molecular para la estructura de este compuesto. En cuanto al **5b**, en el espectro de IR, podemos ver la presencia de bandas en 2917 (C-H), 1692 (C=O) mientras que en el espectro de masas el valor 644 corresponde con el peso molecular del compuesto.

Análisis	Éster cumárico acetilado (5a)	Éster ferúlico acetilado (5b)
IR	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 2851(O-CH ₃), 3429(OH), 1702 (C=O), 1601, 1506, 1462, 1207, 1167, 983, 836, 658	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 2917(C-H), 1692 (C=O), 1273, 1032.
EM	m/z: 614 (M ⁺ , C ₄₁ H ₅₈ O ₄), 147, 95, 69	m/z: 644 (M ⁺ , C ₄₂ H ₆₀ O ₅), 218, 177, 95.

Tabla 15. Identificación espectroscópica de los ésteres de ácidos hidroxicinámicos acetilados

En cuanto a los valores obtenidos de RMN¹H para el **5a**, resulta fácil distinguir las señales que le corresponden a los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24,25, 26,27, 28, 29, 30, los cuales muestran señales a un campo alto entre 0.6 y 1.8 ppm, y en 2.31 (s, 3-H).

De igual forma para el **6b**, se muestran los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, los cuales muestran señales a un campo alto entre 0.8 y 1.8 ppm, así como la señal del ácido ferúlico acetilado en 3.87 (s, 3-H, OCH₃). Estos Los datos se muestran en la tabla 16 (Maldonado, 1997; Masthubová, 2001).

Análisis	Éster cumárico acetilado (5a)	Éster ferúlico acetilado (5b)
RMN ¹ H	CDCl ₃ , TMS 300.2MHz. δ: 7.66(1H,d,J=15.9Hz,H-3), 4.53(2H,d,J=2.1,H-5,H-8), 6.3(1H,d,J=15.9Hz,H-2), 5.19(1H,dd,J=3.6Hz,H-12), 4.65((1H,dd,J=8Hz), 2.31(3H,s,7-H), 1.14, 0.98, 0.94, 0.91, 0.89, 0.87, 0.83(3H,s),	CDCl ₃ , TMS 300.2MHz. δ: 7.59(d,1H, H-13), 7.11(dd, 1H,H-6), 6.38(d,1H,J= 15.9Hz) 5.19(1H,t,t,J=3.6Hz), 3.87(s,3H,OCH ₃), 1.13, 0.99, 0.95, (3H,s,H-27,26,25 y 23), 0.87(s,6H,H- 29,30), 0.83 y 0.79 (3H,s,H-24, 28).
RMN ¹³ C	CDCl ₃ , TMS 75.5MHz. δ: 15.5, 16.7, 16.8, 18.2, 23.6, 25.9, 26.1, 26.7, 28.3, 31.0, 32.5, 33.3, 36.8, 37.9, 38.2, 39.8, 41.7, 47.2, 55.2, 81.0, 119.0, 122.0, 129.1, 143.1, 145.2, 151.9, 166.7, 169.15	CDCl ₃ , TMS 75.5MHz. δ: 15.5, 16.8, 18.2, 23.5, 23.6, 25.9, 26.1, 26.9, 27.8, 28.1, 28.4, 31.0, 32.4, 33.3, 34.7, 37.1, 38.2, 38.4, 41.7, 46.7, 47.2, 47.5, 55.2, 76.0, 111.1, 119.0, 123.1, 124.3, 143.5, 145.2, 168.7.

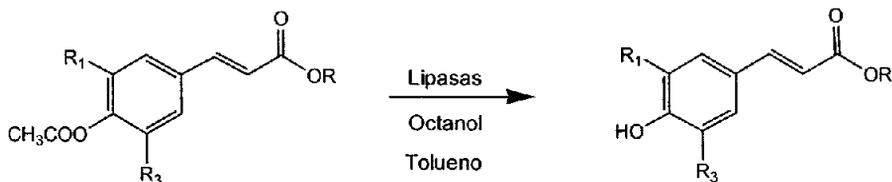
Tabla 16. Identificación por resonancia magnética nuclear de los ésteres de ácidos hidroxycinámicos acetilados.

3. Obtención del cumarato β-amirina y ferulato de β-amirina

Como tercera etapa en la metodología empleada para este trabajo, consistió en la obtención del **6a** con un rendimiento del 92% y del **6b** con un rendimiento del 90%, a partir del **5a** y del **5b** respectivamente, mediante el uso de una reacción enzimática. Los resultados obtenidos se observan en las siguientes tablas y los espectros se muestran en parte de anexos.

3.1. Desacetilación de los ésteres de ácidos cumárico y ferúlico acetilados

Para la desprotección del **5a** y **5b**, se montó una técnica enzimática utilizando lipasas de *Candida antarctica* y *lipozyme*. La siguiente reacción representa la ruta síntesis propuesta.



R₁=H, R₃= H Éster ác. cumárico acetilado (**5a**)

R₁=H, R₃= OMe Éster ác. ferúlico acetilado (**5b**)

R₁=H, R₃=H Cumarato de β-amirina (**6a**)

R₁=H, R₃= OMe Ferulato de β-amirina (**6b**)

El **6a** y **6b**, presentaron las siguientes características físicas, las cuales se indican en la siguiente tabla 17.

Características	Cumarato de β -amirina (6a)	Ferulato de β -amirina (6b)
Formula	$C_{39}H_{56}O_3$	$C_{40}H_{58}O_4$
P.Molecular	572.5g/mol	602.58 g/mol
Tipo de cristal	Polvo blanco-hueso	Cristal amarillo
Punto de fusión	180-187°C:	150-155 °C
Rf :	0.87(Hex-AcOEt, 8 :2)	0.62(Hex-AcOEt, 7 :3)
Rendimiento	92%	90%

Tabla 17. Características físicas de los hidroxicinámatos de triterpenos

Para el **6a**, en cuanto al espectro de IR se pudo observar bandas características del grupo –OH unido a un anillo aromático en 3368 mientras que en el espectro de masas el cumarato de β -amirina, presenta una M^+ de 572, el cual corresponde con el peso molecular para la estructura de este compuesto (Takahashi, 1999). En cuanto al **6b** en el espectro de IR se observaron bandas características del grupo –OH unido también a un anillo aromático en 3464 y en el espectro de masas, el valor 602 corresponde de igual forma con el esperado para el peso molecular de está molécula (Maldonado, 1997; Rahman, 1990).

En la tabla 18, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos por IR, y EM para estos compuestos.

Análisis	Cumarato de β -amirina (6a)	Ferulato de β -amirina (6b)
IR	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 3368(OH), 1679, 1605, 1514, 1462, 1203, 1167, 981, 830, 630.	(KBr) V_{max}/cm^{-1} : 3464(OH), 3019, 2975, 2927, 1338, 1423
EM	m/z: 572 (M^+ , $C_{39}H_{56}O_3$), 407, 218, 203, 189, 164, 147.	m/z: 602 (M^+ , $C_{40}H_{58}O_4$), 218, 177, 137, 109, 95.

Tabla 18. Identificación espectroscópica de los hidroxicinámatos de triterpenos

Para el **6a**, el espectro de RMN¹H, se distinguen las señales que le corresponden a los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, los cuales muestran señales a un campo alto entre 0.6 y 1.8 ppm, además se observa la unión con el ácido cumárico en 5.19 (1H, dd, J=3.6Hz, H-12) y la posición del doble enlace del anillo.

Mientras que para el **6b**, resulta fácil distinguir también las señales que le corresponden a los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24 25, 26, 27, 28 ,29, 30, los cuales muestran señales a un campo alto entre 0.8 y 1.8 ppm (Ver anexos).

Análisis	Cumarato de β -amirina (6a)	Ferulato de β -amirina (6b)
RMN ^1H	<p>CDCl_3, TMS 400MHz.</p> <p>δ: 7.63(1H, <i>dd</i>, J=16Hz, H-2, H-3), 7.43(2H, <i>d</i>, J=8.4Hz, H-5 y H-9), 6.85(2H, <i>d</i>, J=8.8Hz, H-6), 6.29(1H, <i>dd</i>, J=16Hz, H-2), 5.19(1H, <i>dd</i>, J=3.6Hz, H-12), 4.65(1H, <i>dd</i>, J=8Hz), 1.14 (3H, <i>s</i>), 0.98, 0.94, 0.91, 0.89, 0.87, 0.83.</p>	<p>CDCl_3, TMS 400MHz. δ:</p> <p>7.08(<i>dd</i>, 1-H, H-6) 7.03(<i>d</i>, 1H, J=1.6Hz, H-2), 6.92(<i>d</i>, 1H, J=8Hz, H-5), 6.29(<i>d</i>, 1H, J=15.6Hz), 5.82(<i>s</i>, 1-H, OH), 3.93(<i>s</i>, 3H, OCH_3),</p>
RMN ^{13}C	<p>CDCl_3, TMS 300.2MHz. δ: 15.5, 16.7, 16.8, 18.2, 23.6, 25.9, 26.1, 26.8, 28.3, 31.0, 32.5, 33.3, 35.4, 36.8, 37.9, 38.2, 39.7, 41.6, 47.1, 55.2, 80.8, 115.7, 116.4, 121.6, 127.5, 129.8, 143.8, 145.2, 157.3, 167.1, 168.9.</p>	<p>CDCl_3, TMS 300.2MHz. δ: 55.94, 60.59, 63.10, 109.20, 114.64, 123.19, 123.30, 125.60, 146.71, 147.78, 167.09.</p>

Tabla 19. Identificación por resonancia magnética nuclear del los hidroxicinámatos de triterpenos



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Obtención de Triterpenos

En la primera etapa de éste trabajo se obtuvieron dos triterpenos, la β -amirina (A) y el ácido ursólico (B). Debido a que el triterpeno era esencial para llevar a cabo la síntesis del cumarato de β -amirina (6a), y del ferúlate de β -amirina (6b), por lo que fue indispensable su obtención así como su análisis espectroscópico.

1.1. β -Amirina

La β -amirina (A), es uno de los triterpenos más comunes en las plantas, por lo que para su obtención se partió de la corteza del árbol del nanche (*Byrsonima crassifolia*), bajo las condiciones descritas anteriormente (Rastrelli, 1996), con un rendimiento de 0.40%, este resulta ser un rendimiento adecuado comparándolo con otras fuentes por ejemplo *Sorghum bicolor* el cual presentó un rendimiento de 0.052% y de *Linaria aucheri* con 0.0018% (Heupel, 1985; Ercil, 2003).

La β -amirina (A), presentó cristales de color blanco-beige con un rendimiento de 0.40% en base seca y un punto de fusión de 195-198 °C, el cual resultó muy similar al punto de fusión teórico 193-195 °C. Todos estos datos se pueden avalar con los resultados de las técnicas espectroscópicas, como son con el espectro de masas el cual presentó un valor de 426, así como los datos de los grupos funcionales del espectro de IR que presentó bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales característicos de este triterpeno en 3298 (OH), 1712 (éster) y en 1553 y 814 para compuestos aromáticos, finalmente con la técnica de RMN¹H y RMN¹³C se mostraron desplazamientos para los ocho metilos en las siguientes posiciones en C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, los cuales muestran las señales a un campo alto entre 0.6 y 1.8 ppm, de igual forma se confirma la obtención de este compuesto por la doble ligadura en C-12 y C-13 el cual se presenta en 5.18 (1H, t, J=3.6Hz, H-12), todos estos datos concuerdan con los desplazamientos teóricos reportados por Rahman, 1990 confirmando así la obtención del compuesto.

1.2. Ácido ursólico

El ácido ursólico (**B**), es otro de los triterpenos comunes en las plantas, éste se aisló de la planta de tomillo, (*Thymus vulgaris* L.), por las condiciones descritas por Somova, 2003. El compuesto **B** presentó cristales de color blanco con un rendimiento de 0.14% (BS) y un punto de fusión de 246-250 °C. El ácido ursólico se puede aislar también de *Amaracus dictamnus* aunque de esta fuente se obtenga un rendimiento menor de 0.003% en base seca (Piozzi, 1985).

Los resultados de las técnicas espectroscópicas confirmaron la adecuada obtención de **B**, ya que el espectro de masas presento un valor 456 el cual corresponde con su peso molecular. En el espectro de IR se presentaron bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales característicos de este triterpeno por ejemplo en 3298 (OH) y en 1553, 814 para compuestos aromáticos. Para confirmar la estructura de éste compuesto, se baso en los espectros de RMN¹³C y RMN¹H, ya que en éste último se muestran desplazamientos para C-23, 24, 25, 26, 27, 29 y C-30, éstos se encuentran en un campo alto entre 0.8 y 1.4 ppm, los cuales corresponden a los metilos del compuesto, así como la posición del grupo -OH en C-3, está señal se localiza en 3.19 (dd, J= 5.7HZ, H-3), todos éstos datos concuerdan con los desplazamientos reportados en la literatura (Rahman, 1990; Hung, 2001).

Aunque los resultados obtenidos para ambos triterpenos fueron adecuados, se decidió trabajar solamente con la β-amirina (**A**). Por lo que se propone trabajar posteriormente con el ácido ursólico (**B**) aplicando la misma metodología para la formación de este compuesto u otros compuestos similares.

2. Obtención de los ésteres del ácido cumárico y ferúlico acetilados

La segunda etapa consistió en la formación de **5a** y **5b**, mediante una ruta de reacciones químicas como son. acetilación, formación de los cloruros de los ácidos acetilados y esterificación.

2.1. Ácido cumárico

El ácido cumárico (C₉H₆O₃) empleado para este trabajo fue de Sigma Co; con un alto grado de pureza, con un PM:164.08 g/mol y presentó un punto de fusión 196-200 °C. En cuanto a los espectros de IR, EM, RMN¹H, RMN¹³C ,presento las bandas características del compuesto.

2.1.1. Ácido cumárico acetilado

La acetilación es una reacción sencilla, conocida y utilizada que tiene por objetivo proteger el grupo hidroxilo (-OH) presente en la estructura del ácido cumárico (**1**).

El ácido cumárico acetilado ($C_{11}H_{10}O_4$), presentó algunas diferencias con respecto a su precursor el ácido cumárico (**1**), ya que es un polvo blanco con un punto de fusión 154-159 °C. y un peso molecular de 207.1 g/mol. La reacción de formación de éste compuesto fue adecuada, ya que presentó un buen rendimiento del 94%, esto basándose en una referencia teórica (Mastihubova, 2001), en el cual la reacción de acetilación presentó un rendimiento del 89%, y menor si se compara con la obtención de **3b** el cual fue del 96%.

En cuanto al espectro de IR presentó bandas características en 2822 correspondientes al compuesto acetilado, así como en 1205 (COOH). En el espectro de masas, el valor de 207 correspondió con el esperado para el peso molecular de este compuesto, de igual forma esto se pudo comprobar con el espectro de RMN¹H, en el cual se observaron desplazamientos adecuados, mostrando señales en 7.76 (2H, *d*, *J*= 16.2Hz, H-3) y en 2.32 (s, 3-H) característicos de los compuestos acetilados.

2.1.2. Cloruro del ácido cumárico acetilado

A partir del **3a**, se obtuvo el cloruro del ácido cumárico (**4a**), bajo las condiciones descritas anteriormente. Se sabe que los cloruros de ácidos son los derivados más reactivos de los ácidos carboxílicos y en base a esto, se llevó a cabo la reacción entre el **4a** con **A** para obtener el éster del ácido cumárico acetilado (**5a**).

Para obtener el **4a** se utilizó cloruro de oxalilo ($C_2Cl_2O_2$) ya que este compuesto es más sencillo y práctico de manipular, además se obtienen los cloruros de manera más sencilla comparándolo con el cloruro de tionilo ($SOCl_2$), ya que este cloruro se descompone si hay presencia de agua en el medio.

El **4a**, presentó algunas diferencias de polaridad con respecto a su precursor. Sin embargo, este compuesto no se analizó por IR, EM, RMN¹H, RMN¹³C, debido a que se realizó *in situ*.

El rendimiento que se obtuvo para la formación del **4a** fue del 92%, el cual se considera adecuado comparándolo con una referencia teórica (Mastihubova, 2001) y argumentando que la técnica de formación de cloruros para este compuesto se desarrolló por un procedimiento más sencillo.

2.1.3. Éster del ácido cumárico acetilado

El éster del ácido cumárico acetilado ($C_{41}H_{58}O_4$) presentó un peso molecular de 614.6g/mol con un punto de fusión de 238-243°C y un rendimiento del 34%. Este rendimiento fue mayor comparándolo con el éster del ácido ferúlico acetilado el cual fue del 27%.

En cuanto al espectro de IR, se observó la presencia de bandas características en 1381 correspondientes a CH_3 , 2851 (O- CH_3) y 1702 (C=O). Mientras que en el espectro de masas, el valor de 614 correspondió con el peso molecular para la estructura del compuesto. Para confirmar la estructura del compuesto se analizó el espectro de RMN¹H, en el cual resultó fácil distinguir las señales que le corresponden a los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, los cuales mostraron señales a campo alto entre 0.6 y 1.8 ppm, así como la señal del ácido cumárico acetilado en 2.31 (s, 3-H) lo cual confirma que se realizó adecuadamente la formación del **5a**.

2.2. Ácido ferúlico

El ácido ferúlico (**2**), se obtuvo mediante la extracción, a partir de nejayote (Tercero, 2001). Se sabe que este ácido hidroxicinámico es el compuesto más abundante en la pared celular del maíz (Liyama *et al*, 1990). Cabe mencionar que esta metodología ya se tenía implementada en el laboratorio; por esta razón, resultó sencilla la obtención del mismo.

El ácido ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$) que se obtuvo presentó un PM: 194.19g/mol. con un punto de fusión 162-167 °C el cual resultó similar al Pf (168-171 °C) del ácido ferúlico comercial.

En cuanto al espectro de IR se observaron bandas características del grupo -OH unido a un anillo aromático en 3434 y en 1432, así como la presencia del grupo carbonilo en 1690 y la banda característica perteneciente al grupo metoxi (-O CH_3). Todas éstas bandas correspondieron con la estructura de este compuesto. En el espectro de masas, el valor 194 obtenido correspondió con el peso molecular esperado para la estructura de dicho ácido, esto se pudo confirmar en el espectro de RMN¹H, ya que se distinguieron claramente los protones correspondientes al anillo aromático y dos protones correspondientes al doble enlace desplazados a 3.94 ppm, correspondientes al grupo - CH_3 , presente en la estructura del compuesto **2**.

2.2.1. Ácido ferúlico acetilado

La obtención de este intermediario **3b**, se hizo con el fin de proteger el proteger hidroxilo (-OH) presente en la estructura del ácido ferúlico (**2**).

El derivado acetilado del ácido ferúlico ($C_{12}H_{12}O_5$), presentó un peso molecular de 236.12 g/mol, así como algunas diferencias con respecto a su precursor **2**, como fue el punto de fusión, ya que el ácido ferúlico acetilado (**3b**) presentó un punto de fusión de 166-170 °C, mayor que el **2**, el cual fue de 162-167 °C. En cuanto al espectro de masas, el valor 236 correspondió con el esperado para la estructura de este compuesto, de igual forma esto se comprobó con el espectro de RMN¹H, en el cual se observó claramente una señal en 3.81 (s, 3-H, OCH₃).

A pesar de que no se contó con los espectros de IR y RMN¹³C, los resultados obtenidos para RMN¹H y EM fueron suficientes para decidir que se trataba del compuesto **3b**. Además de que la formación de este compuesto fue adecuada, ya que presentó un rendimiento del 96%, el cual resulta mejor si lo comparamos con el rendimiento del **3a** el cual fue del 94% y de igual forma al compararlo con datos de una referencia teórica (Mastihubova, 2001), en el cual presentó un rendimiento del 89%.

2.2.2. Cloruro de ácido ferúlico

A partir del **3b**, se preparó, el cloruro del ácido ferúlico acetilado (**4b**), bajo las condiciones descritas en el desarrollo experimental. El **4b**, presentó algunas diferencias de polaridad con respecto a su precursor, además de que no fue analizado por IR, EM, RMN¹H, RMN¹³C, debido a que la reacción se realizó *in situ*.

Presentó un alto rendimiento del 92%, al igual que la formación del **4a**, lo cual demuestra la eficiencia de la reacción así como por el uso del cloruro de oxalilo. A diferencia de la formación del cloruro teórico (Mastihubova, 2001), el cual presentó un rendimiento del 91%.

2.2.3. Éster del ácido ferúlico acetilado

El éster del ácido ferúlico acetilado ($C_{42}H_{60}O_5$), presentó un peso molecular de 644.6 g/mol y un punto de fusión de 150-155 °C, con un rendimiento del 29%, el cual fue menor que **5a**. En cuanto al espectro de IR, se observó la presencia de bandas características en 2917 (C-H), 1692 (C=O) y en el espectro de masas el valor 644 obtenido correspondió con el esperado para el peso molecular de la estructura de éste compuesto.

De igual forma esto se pudo comprobar con el espectro de RMN¹H, en el cual resulta fácil distinguir las señales que le corresponden a los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y C-30, los cuales muestran señales a un campo alto entre 0.8 y 1.8 ppm, así como la señal del ácido ferúlico acetilado en 3.87 (s, 3-H, OCH₃), todo esto confirma que el procedimiento que se siguió fue adecuado para la formación de éste compuesto **5b**.

3. Obtención del cumarato β-amirina y ferulato de β-amirina.

La tercera etapa de esta investigación se basó en la obtención del cumarato de β-amirina y el ferulato de β-amirina, mediante el uso de una ruta enzimática usando lipasas de *Candida antarctica* y *lipozyme*.

3.1 Cumarato de β amirina

El cúmarato de β-amirina (C₃₉H₅₆O₃) se formó a partir del **5a**, el cual presentó un peso molecular de 572.5 g/mol, con un punto de fusión de 180-187 °C y un rendimiento del 92% siendo este rendimiento mayor al que presentó **6b** el cual fue de 90%.

En cuanto al espectro de IR se pudo observar bandas características del grupo -OH unido a un anillo aromático del ácido cumárico en 3366, por otro lado en el espectro de masas, el valor de 572 correspondió con el peso molecular para la estructura del cumarato de β-amirina y esto se comprobó al hacer las lecturas de los espectros de RMN ¹³C y RMN¹H, donde éste último presentó desplazamientos que le corresponden a los ocho metilos de β-amirina como son: C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y C-30, los cuales mostraron señales a un campo alto entre 0.6 y 1.8 ppm, así como 7.63 (1H, *dd*, J=16Hz, H-2, H-3), en el cual se observa la unión del ácido cumárico con la β-amirina (**A**) y finalmente en 5.19 (1H, *dd*, J=3.6Hz, H-12) el cual indica la posición del doble enlace, que se encuentra en la molécula de **A** (Takahashi, 1999).

3.2. Ferulato de β amirina

El ferulato de β-amirina (C₄₀H₅₈O₄) **6b**, presentó un peso molecular de 602.58 g/mol con un punto de fusión de 150-155 °C y un rendimiento del 90%, este rendimiento fue menor al compararlo con el de **6a** el cual fue del 92%. En cuanto al espectro de IR se pudo observar bandas características del grupo -OH unido a un anillo aromático en 3464.

En el espectro de masas del **6b**, el valor de 602 correspondió con el esperado para la estructura de este compuesto, todos estos datos se esto comprobaron con los espectros de RMN ^{13}C y RMN ^1H , en este ultimo, resultó fácil distinguir los desplazamiento de las señales que les corresponden a los ocho metilos de **A** como son: C-23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y C-30, los cuales mostraron señales a un campo alto entre 0.8 y 1.8 ppm, así como 7.03 (d,1H, J=1.6Hz, H-2), en el cual se observa la unión del ácido ferúlico con la β -amirina (**A**) (Maldonado, 1997; Rahman, 1990).

Una alternativa para obtener estos compuestos es aislarlos a partir de fuentes naturales, como son *Acacia linarioides* y *Casuarina equisetifolia* (Takahashi, 1999) aunque los rendimientos son bajos, ya que a partir de 700g en BS de la muestra, se obtuvo un rendimiento final del 0.04%, por lo que hace más eficiente y sencillo aplicar la metodología desarrollada en este trabajo para obtener cantidades adecuadas de los hidroxicinámatos de β -amirina, con el objetivo de iniciar estudios en el campo de los alimentos y la salud.



CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el experimento se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se comprobó que el procedimiento empleado en esta investigación, constituye una alternativa rápida, sencilla y eficiente para obtener compuestos análogos con características nutracéuticas del arándano.
- Los triterpenos que se aislaron a partir de plantas mexicanas fueron β -amirina (**A**) con un rendimiento de 0.40% y el ácido ursólico (**B**) con un rendimiento de 0.14%.
- Las lipasas demostraron tener utilidad para realizar la hidrólisis de los acetatos de los compuestos **5a** y **5b** con un 100% de conversión y rendimiento.
- El cumarato de β -amirina (**6a**) presentó mayor rendimiento comparándolo con el ferulato de β -amirina (**6b**), porque este presenta un mayor problema de oxidación por el OMe.



RECOMENDACIONES

- Se sugiere se realice la preparación químico-enzimática y por un método enzimático los otros ácidos hidroxicinámicos diferentes a los empleados en este trabajo.
- Se sugiere se realice la obtención de ésteres de ácidos hidroxicinámicos con el ácido ursólico.
- Indudablemente el cumarato y ferulato de β -amirina obtenidos en este trabajo, representan un papel importante e innovador, por lo que se requiere se les realicen pruebas de inocuidad, toxicidad científicamente legítimas y fiables.
- La evaluación de la inocuidad y toxicidad, es difícil realizarlas debido a su complejidad y al costo que significa realizar estudios de largo plazo en humanos. Por lo tanto, para una mayor evidencia se sugiere realizar estudios en animales de experimentación, que puedan evidenciar una respuesta a corto plazo.
- Las ideas expuestas en el presente trabajo deberían convertirse en una motivación para lograr que en el país exista una preocupación sobre los alimentos funcionales y puedan desarrollar una reflexión acerca del tema, para enfrentar problemas regulatorios y de información al consumidor que esta área exige de todos los sectores comprometidos con el área de alimentación y nutrición.



BIBLIOGRAFÍA

- Ali M., Heaton, A., Leach, D. 1997. Triterpenes esters from Australian *Acacia*. *J. Nat. Prod.*, 60, 1150-1151.
- Alvidrez, A., González, B., Jiménez, Z. 2002. Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos funcionales. *Rev. Chil. Nutr.*, 3(3), 1-6.
- Andlauer, W., Furst, P. 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research Int.*, 35, 171-176.
- Araya, H., Lutz, M. 2003. Alimentos funcionales y saludables. *Rev. Chil. Nutr.*, 30 (1), 1-10.
- Barolomé, B. 2002. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *J. of Cer. Sci.*, 36, 51-58.
- Biesalski, H. K. 2002. Nutraceuticals: The link between nutrition and medicine. *J. Toxicol. Cut. & Ocular Toxicol.*, 21, 9-21.
- Biesboer, D., Dámour, P., Wilson, S., Mahlberg, P. 1982. Sterols and triterpenols in latex and cultured tissues of *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry*, 21(5), 1115-1118.
- Belitz, H.D., Grosch W. 1997. Química de los alimentos. Acribia S. A, España, pp.250, 259, 817, 894.
- Castelluccio, C. Paganga, G., Melikian, N. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *Febs Lett.*, 368, 188-192.
- Chasquibol, N. Lengua, L. 2003. Alimentos funcionales o fitoquímicos clasificación e importancia. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.*, 5 (2), 9-20.
- Chen, B., Duan, H., Takaishi, Y. 1999. Triterpenes ceffeoyl esters and diterpenes form *Celastrus stephanotifolius*. *Phytochemistry*, 51, 683-687.
- Craig, F. 2000. Ferulic acid unearthed. *Chemistry in Britain.*, 48-50.
- Cruz, M., Riva, S., Sá, M. L. 2004. Highly selective lipase-mediated discrimination of diastereomeric 5,6-epoxysteroids. *Tetrahedron Asymmetry.*, 15, 1173-1179.
- Dillard, C. J., German, J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sc. Food & Agric.*, 80, 1744-1756.
- Dobhal, M. P., Hasan, A., Sharma, M.C., Joshi, B.C. Ferulic acid esters from *Plumeria bicolor*. *Phytochemistry*, 51, 319-321.

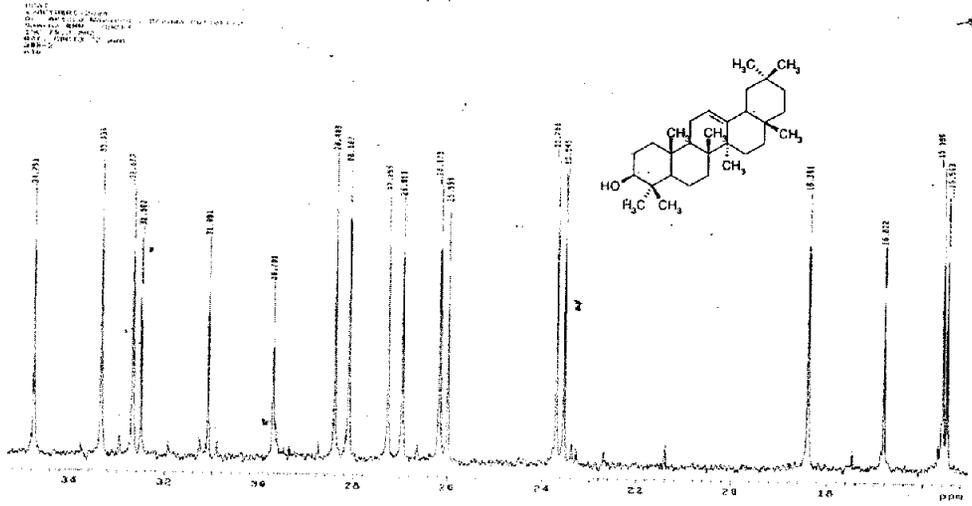
- Ercil, D., Koray, S. 2004. Chemical constituents of *Linaria aucheri* Turk. *J. Chem.*, 28, 133-139.
- Faber, Kurt. 2000. Biotransformations in Organic Chemistry. Fourth edition. Edit. Springer, Germany. pp. 47-65.
- Furuya, T., Orihara, Y., Hayashi, C. 1986. Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana* cultured cells. *Phytochemistry*, 26(3), 715-719.
- Gibbons, S. 1999. A caffeic acid ester from *Halocnemum strobilaceum*. *Phytochemistry*, 51, 465-467.
- Gibbons, S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *The royal society of chemistry*, 263-285.
- Goldberg, I. 1994. *Functional Food*. Chapman and Hall, New York. pp.3-18.
- Graf, E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Bio. & Medicine*, 13, 435-448.
- Grandmougin, A. 1999. Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi, *Phytochemistry*, 50, 1027-1031.
- Gross, G. 1999. Plant polyphenols 2. *Chem. Biology Pharmacology Ecology*, 2, 482-494.
- Hari, S. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Rev.*, 44 (4), 499-591.
- Hung, C. Y. 2001. Extraction and Identification of Antioxidative Components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Lebensm-Wiss u Technol.*, 34, 306-311.
- Hong, J., Tang, C. H. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2374-2378.
- Hsiung, Y. K., Chang, C., Haur, Y. 1997. Triterpenes from *Diospyros maritima*. *Phytochemistry*, 46(6), 1135-1137.
- Karalai, C., Laphookhieo, S. 2005. Triterpenoid ester from *Bruguiera cylindrica*. *Aust. J. Chem.*, 58, 556-559.
- Knight, S. A. 1974. Carbon-13 NMR Spectra of some Tetra- and Pentacyclic triterpenoids. *Phytochemistry*, 603-611.
- Lam, K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57, 987-992.
- Liyama, K., Tuyet T. B. 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internode. *Biochemistr*, 29, 733-737.

- Mahmood, U. 2003. *p*- Coumaric acid esters from *Tanacetum longifolium*. *Phytochemistry*, 64, 851-853.
- Maldonado, E., Ramírez, Ma., Pérez, A. 1998. Anti-inflammatory activity of phenyl propanoids from *Cereopsis mutica* var. *mutica*. *Planta Med.*, 64, 660-661.
- Mastihubová, M., Mastihubová, V., Kremnický, L. 2001. Chemoenzymatic preparation of novel substrates for feruloyl esterases. *Synlett*, 10, 1559-1560.
- Mathew, S. 2004. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *C. R. In Botech.*, 24 (2), 59-83.
- Mermelstein, N. H. 1998. Challenges to biocatalysis from flavor chemistry. *Foodtechnology*, 52, 42-46.
- Murphy, B. T., Shawna, L., Xizojun, Y., Hammond, G., Vaisberg, A., Neto, C. 2003. Identification of triterpene hydroxycinnamates with in Vitro Antitumor Activity from whole cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J.Agric.Food Chem.*, 51, 3541-3545.
- Myung, S., Park, J., Lee, Y., Min, B. 2004. Anti-complementary activity of triterpenoids from fruits of *Zyzyphus jujuba*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(11), 1883-1886.
- Navarro, O. A. 1988. Síntesis quimioenzimática de bloques de construcción con *Sacharomyces cerevisiae* a partir de nitroalquenos. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UNAM, Colegio de Ciencias y Humanidades, Unidad Académica de Ciclos profesionales y de Postgrado, Facultad de Química, México D.F.
- Peter, F. 2000. What distinguishes an esterase from lipasas: A novel structural approach. *Biochimie.*, 82,1033-1041.
- Piozzi, F., Paternostro, M., Passannanti, S. 1986. Triterpenes from *Amaracus dictamnus*. *Phytochemistry*, 25 (2), 539-541.
- Ponglimanont, C., Thongdeeying, P. 2005. Lupane-Triterpene esters from leaves of *Ceriops decandra* (Griff) Ding Hou. *Aust. J. Chem.*, 58, 615-618.
- Rahman, A. 1990. Handbook of natural products data, Elsevier, New York, USA, pp. 21-22, 770-772.
- Rastrelli, L. 1996. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, 45 (4), 647-650.
- Reed, J. 2002. Cranberry flavonoid, atherosclerosis and cardiovascular health. *C.R in Food Sc. Nut.*, 42, 301-316.
- Reichert, R. D. 2002. Oilseed medicinals: In natural drugs, dietary supplement and in new functional foods. *Trends in Food Technology*, 13, 353-360.

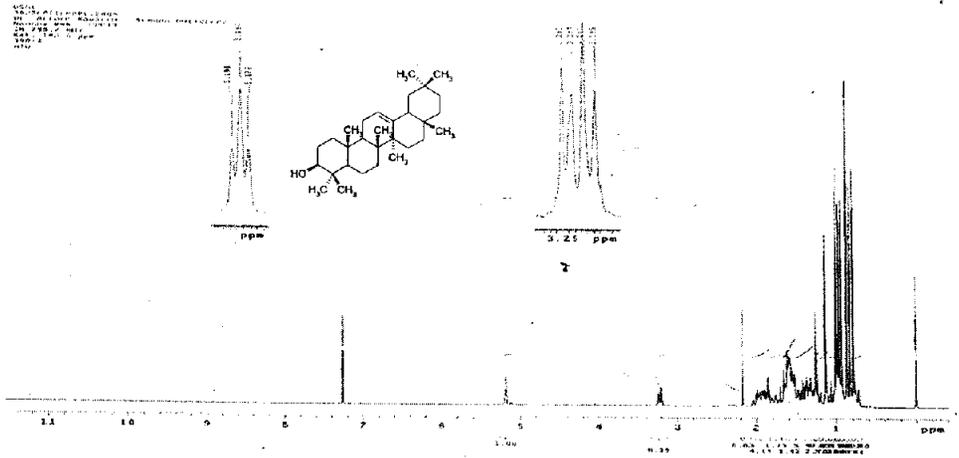
- Rosazza, J. N. 1995. Biocatalytic transformation of ferúlic acid: an abundant aromatic natural product. *J. Ind. Microbiol.*, 15, 457-471.
- Santamaría, A. 2002. Biotransformación del ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis licenciatura, Facultad de Química de la UNAM, México D.F.
- Santos, G., Alves, J., Rodilla, J., Duarte, A., Lithgow, A. 1997. Terpenoids and other constituents *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*, 44 (7), 1309-1312.
- Saija, A. 2000. In vitro and in vivo evaluation of caffeic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 39-47.
- Sefkow, M. 2001. First efficient synthesis of chlorogenic acid. *J. Org. Chem.*, 1137-1141.
- Shopova, N., Milkova, Ts. 2000. Thermal decomposition of cholesteryl esters of cinnamic acid derivatives and their effect on the α -tetralylhydroperoxyde free-radical-induced decomposition. *Thermochemica Acta*, 356, 101-107.
- Somova, L. I., Shode, F. O., Mipando, M. 2004. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine*, 11, 121-129.
- Somova, L. O., Nadar, A., Rammanan, P. 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 10, 115-121.
- Takahashi, H. Iuchi, M., Fujita, Y., Minami, H., Fukuyama, Y. 1999. Coumaroyl triterpenes from *Casuarina equisetifolia*. *Phytochemistry*, 51, 543-550.
- Takayuk, S., Terao, J. 1998. Functional foods for disease prevention. *Medical plants and other foods*; American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 2-9.
- Tercero, N. P. 2001. Recuperación y biotransformación del ácido ferúlico. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química, México D.F., pp. 26, 28-30.
- Vardamides J. C., Azebaze, A., Nkengfack, A., Heerden, F. Fomun, Z. 2003. Scaphopetalone and scaphopetalumate, a lignan and a triterpene ester from *Scaphopetalum thonneri*. *Phytochemistry*, 62, 647-650.
- Verhagen, H., Coolen, S. 2004. Assessment of the efficacy of functional foods ingredients-introducing the concept "kinetics of biomarkers". *Mutation Research.*, 551, 65-78.
- Vinson, J. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5315-5321.

- Wilairat, R., Manosroi, J., Kijjoa, A., Nascimento, M., Pinto, M. 2005. Cytotoxicities of xanthenes and cinnamate ester from *Hypericum hookerianum*. *Planta med.*, 71, 680-682.
- Xiaojun, Y. 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5844-5849.
- Xu, R. 2004. On the origins of triterpenoids skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291.
- Yeap, F. L. 2000. The structure of cranberry proanthocyanidins wich inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *E coli* in vitro. *Phytochemistry*, 54, 173-181.
- Zhang, J., Cheng, Z., Yang, B., Cordell, G., Qui, S. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron Letters*, 46, 2337-2340.

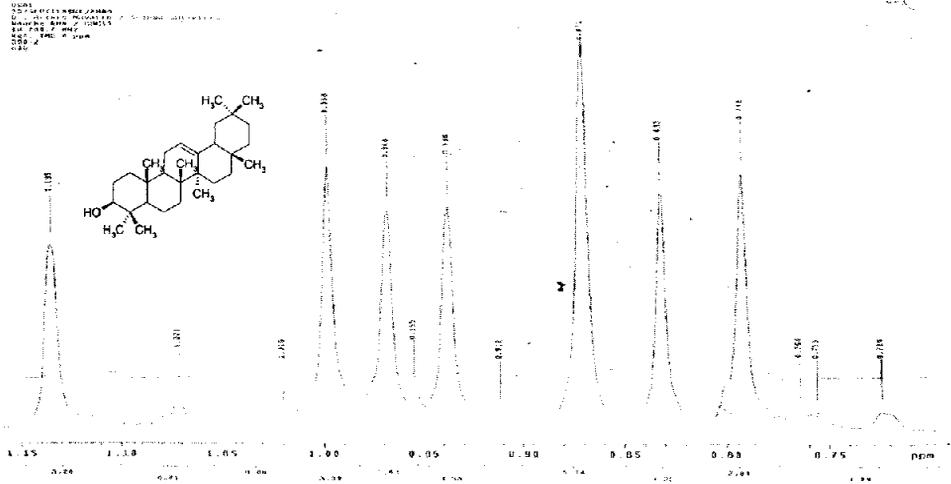
Espectro de RMN ¹³C de la β-amirina (A)



Espectro de RMN ¹H de la β-amirina (A)

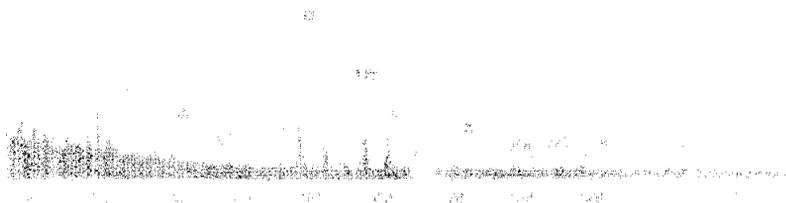
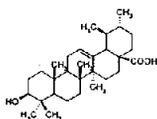


Espectro de RMN ¹H de la β-amirina (A)

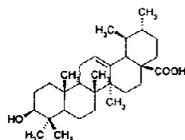


ÁCIDO URSÓLICO (B)

E.M. del ácido ursólico (B)

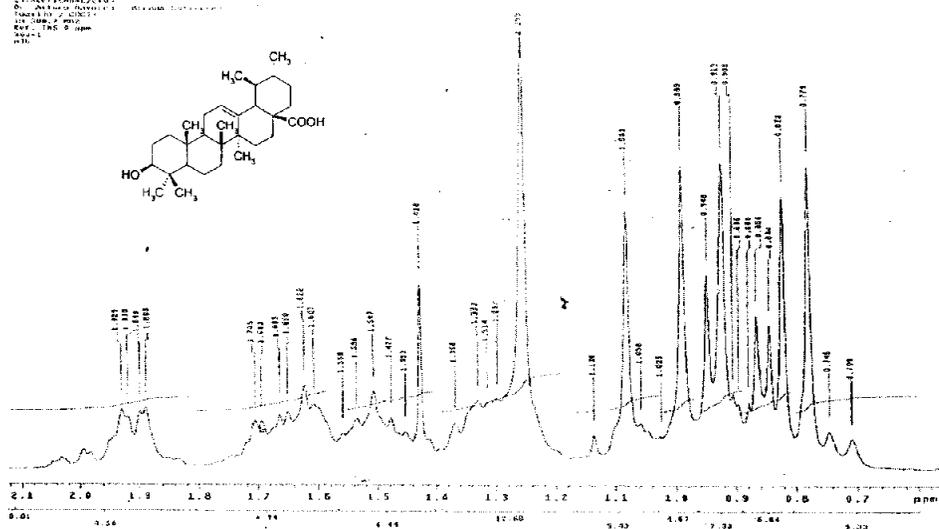
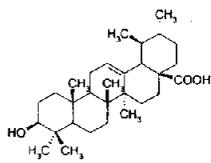


Espectro de RMN ¹H del ácido ursólico (B)

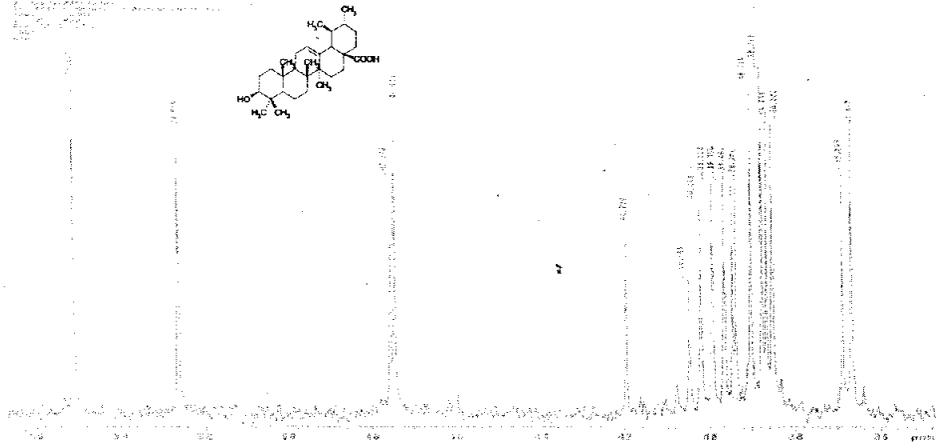


Espectro de RMN ¹H del ácido ursólico (B)

0548
 24. REPTILINAE, COLO
 B. Anolis...
 100 mg...
 200 MHz...
 400 K...
 270

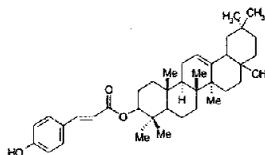


Espectro de RMN ¹³C del ácido ursólico (B)

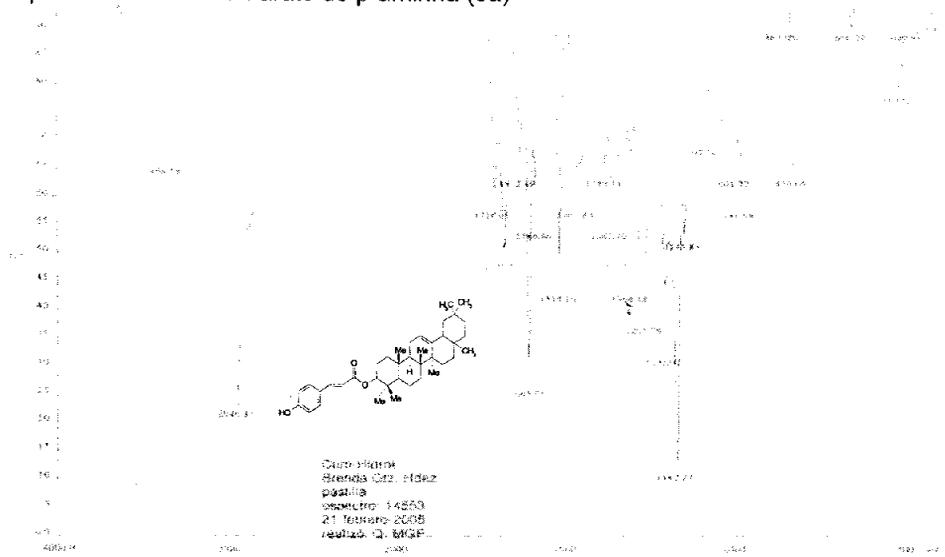


CUMARATO DE β -AMIRINA (6a)

E.M. del cumarato de β -amirina (6a)

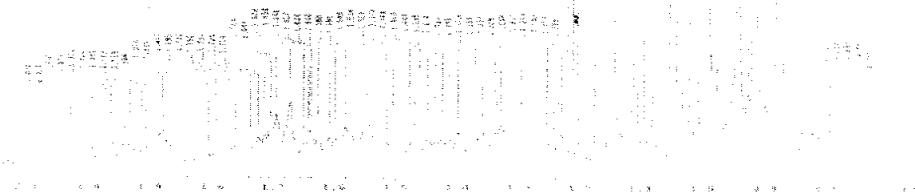
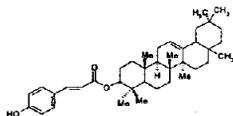


Espectro de IR del cumarato de β -amirina (6a)



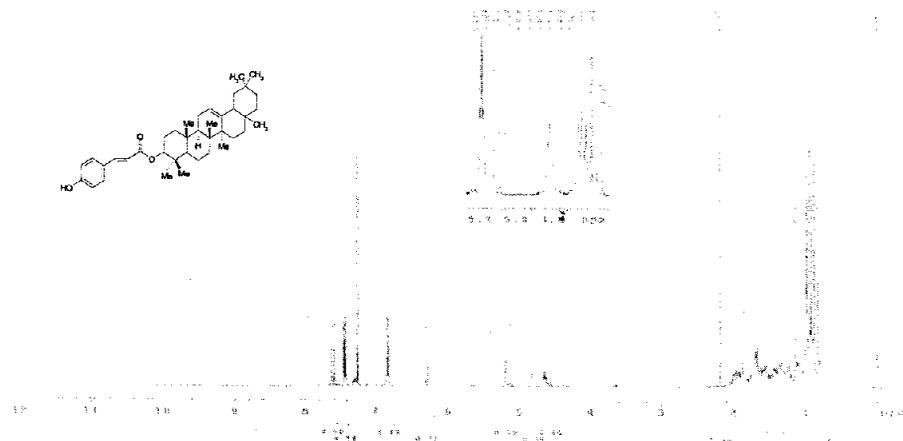
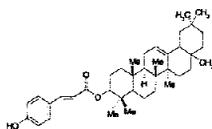
Espectro de RMN ¹H del cumarato de β-amirina (6a)

6a: C₃₀H₄₀O₄
 6a: C₃₀H₄₀O₄
 6a: C₃₀H₄₀O₄



Espectro de RMN ¹H del cumarato de β-amirina (6a)

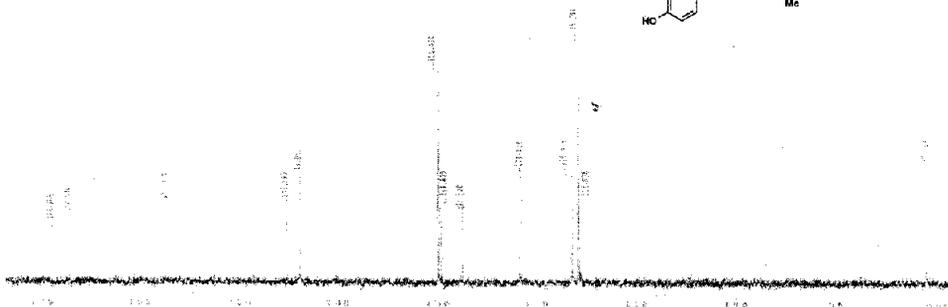
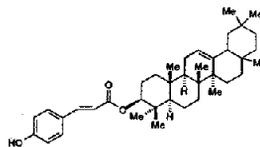
6a: C₃₀H₄₀O₄
 6a: C₃₀H₄₀O₄
 6a: C₃₀H₄₀O₄



Espectro de RMN ¹³C del cumarato de β-amirina (6a)

Experimento: 13C-CPMASCAN
 Fecha: 10/01/2007
 Hora: 10:00
 Nombre: 6a

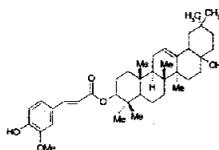
Solvente: CDCl3
 Temperatura: 300 K



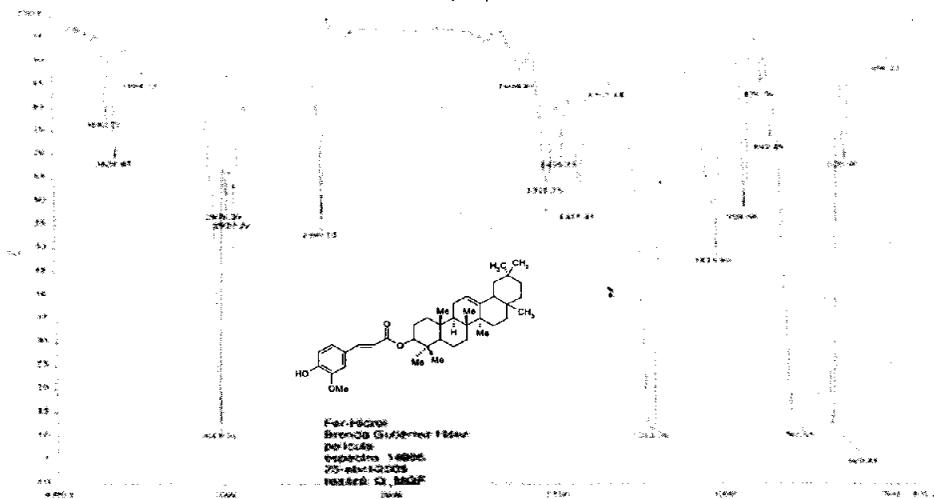
FERULATO DE β -AMIRINA (6b)

Espectro de EM del ferulato de β -amirina (6b)

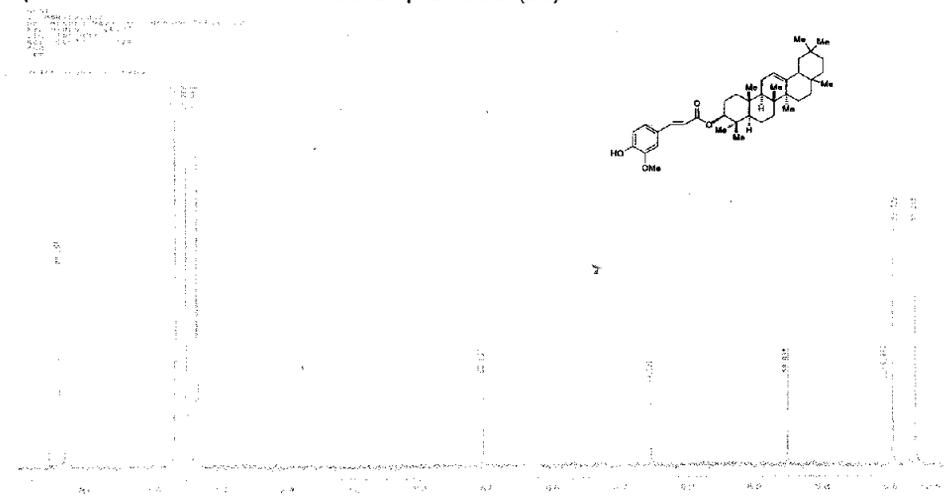
1.0000000000000000
 2.0000000000000000
 3.0000000000000000
 4.0000000000000000
 5.0000000000000000
 6.0000000000000000
 7.0000000000000000
 8.0000000000000000
 9.0000000000000000
 10.0000000000000000
 11.0000000000000000
 12.0000000000000000
 13.0000000000000000
 14.0000000000000000
 15.0000000000000000
 16.0000000000000000
 17.0000000000000000
 18.0000000000000000
 19.0000000000000000
 20.0000000000000000
 21.0000000000000000
 22.0000000000000000
 23.0000000000000000
 24.0000000000000000
 25.0000000000000000
 26.0000000000000000
 27.0000000000000000
 28.0000000000000000
 29.0000000000000000
 30.0000000000000000
 31.0000000000000000
 32.0000000000000000
 33.0000000000000000
 34.0000000000000000
 35.0000000000000000
 36.0000000000000000
 37.0000000000000000
 38.0000000000000000
 39.0000000000000000
 40.0000000000000000
 41.0000000000000000
 42.0000000000000000
 43.0000000000000000
 44.0000000000000000
 45.0000000000000000
 46.0000000000000000
 47.0000000000000000
 48.0000000000000000
 49.0000000000000000
 50.0000000000000000
 51.0000000000000000
 52.0000000000000000
 53.0000000000000000
 54.0000000000000000
 55.0000000000000000
 56.0000000000000000
 57.0000000000000000
 58.0000000000000000
 59.0000000000000000
 60.0000000000000000
 61.0000000000000000
 62.0000000000000000
 63.0000000000000000
 64.0000000000000000
 65.0000000000000000
 66.0000000000000000
 67.0000000000000000
 68.0000000000000000
 69.0000000000000000
 70.0000000000000000
 71.0000000000000000
 72.0000000000000000
 73.0000000000000000
 74.0000000000000000
 75.0000000000000000
 76.0000000000000000
 77.0000000000000000
 78.0000000000000000
 79.0000000000000000
 80.0000000000000000
 81.0000000000000000
 82.0000000000000000
 83.0000000000000000
 84.0000000000000000
 85.0000000000000000
 86.0000000000000000
 87.0000000000000000
 88.0000000000000000
 89.0000000000000000
 90.0000000000000000
 91.0000000000000000
 92.0000000000000000
 93.0000000000000000
 94.0000000000000000
 95.0000000000000000
 96.0000000000000000
 97.0000000000000000
 98.0000000000000000
 99.0000000000000000
 100.0000000000000000



Espectro de IR del ferulato de β -amirina (6b)



Espectro de RMN ¹³C del ferulato de β-amirina (6b)



Espectro de RMN ¹³C del ferulato de β-amirina (6b)

