



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AGENTES QUIMIOPREVENTIVOS: CUANTIFICACIÓN Y OBTENCIÓN
A ESCALA PREPARATIVA DE LUPEOL DE VARIAS PLANTAS POR
TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

TALAMANTES GÓMEZ JOSÉ MOISÉS



MÉXICO, D. F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: FRANCISCA AÍDA ITURBE CHIÑAS
VOCAL: Profesor: ARTURO NAVARRO OCAÑA
SECRETARIO: Profesor: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
1er. SUPLENTE: Profesor: JUAN CARLOS RAMÍREZ OREJEL
2° SUPLENTE: Profesor: HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA LAB. 321 CONJUNTO "E"

FACULTAD DE QUÍMICA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

SUSTENTANTE:

JOSÉ MOISÉS TALAMANTES GÓMEZ



Este trabajo se realizó formando parte del proyecto

“Química preparativa sustentable: Obtención de fitocompuestos de subproductos agrícolas urbanos y de plantas medicinales y su modificación enzimática a especialidades químicas”

Financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal
(ICyTDF, PICS08-40).



AGRADECIMIENTOS

A mi Tita (Zeferina Gómez de Bermejo) por haberme inculcado la responsabilidad y valores y por brindarme siempre su amor. Q.E.D.A.

A mi madre por darme todo el apoyo, regaños y consejos que hicieron de mí una mejor persona, gracias por darme tu amor.

A mi tía Pina (Josefina Mújica Arana) por estar siempre conmigo dándome consejos y ayudándome para salir adelante en la vida y en mis estudios.

A mi padrino, Jesús Talamantes y a Jorge Talamantes por estar siempre al pendiente de mis estudios y alentándome a salir adelante en las peores situaciones.

A mi tío José Adolfo por compartir momentos agradables y estar al pendiente de mí.

A Jocelyn por estar siempre apoyándome en las buenas y malas circunstancias, por darme aliento para terminar mi carrera, por amarme a pesar de mi carácter y por compartir tantos años llenos de experiencias que han sido maravillosos.

A la familia Cedillo Saldaña (José Luis, Marcelina, Edith, Rubén, Juan, Ángela y Beto) por brindarme un espacio en su corazón y por compartir momentos de alegría.

A Julieta Sandoval, profesora y amiga: por transmitir sus conocimientos y la ayuda para la realización de esta tesis y por la gran amistad que me ha brindado. De igual manera para su esposo Carlos Hernández.

A Patricia Severiano, por la ayuda para el análisis estadístico de los resultados, por el tiempo brindado y enseñanzas.



A Juan Carlos R., profesor y amigo, por la ayuda y experiencias transmitidas.

A mis demás profesores y amigos que transmitieron sus conocimientos y que me dieron apoyo y aliento para terminar la carrera y siempre estuvieron disponibles para aclararme mis dudas y dar consejos.

Pedro Villanueva, Arturo Navarro, Hilda Calderón, Fausto Rivero, Mauro Morales, Gloria Ruíz, Francisco Ruíz, Francisca Iturbe, Cecilio Álvarez, José Guadalupe, Cesar, Pandiyan, entre otros que fueron parte de mi formación académica.

A mis amigos: Norma, Evelyn, Cinthya, Ana, Ángel, Nadia y a los del laboratorio 321, Raúl, Emilio, Gustavo, Hipócrates, Chava, Romina, Cindy y Erika y a los de laboratorio 114 F, Charly y Liliana, por compartir días de trabajo y buenos momentos.

A mis entrenadores: Juan M. Calderón, Sergio Morales, Juan Hernández y Daniel Gómez por inculcar la disciplina, responsabilidad y formar el carácter de seguir luchando por lo que uno desea.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella y por darme tantos valores y logros que me formaron profesional y humanamente.

Con gratitud a la Facultad de Química, ya que me ha dado la satisfacción más grande de mi vida y sé que con las herramientas que aprendí, podré consolidarme en el ámbito profesional.

Al ICyTDF por la beca otorgada y el financiamiento para la realización de este proyecto.



ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	3
CAPITULO I: ANTECEDENTES	4
I.1 TERPENOS	4
I.2 NOMENCLATURA	4
I.3 TRITERPENOS.....	6
<i>I.3.1 Triterpenos pentacíclicos</i>	9
<i>I.3.2 Actividad biológica de los triterpenos</i>	11
I.4 LUPEOL.....	12
<i>I.4.1 Lupeol en alimentos</i>	13
<i>I.4.2 Extracción de Lupeol</i>	15
<i>I.4.3 Obtención y Caracterización de Lupeol</i>	16
I.5 QUIMIOPREVENCIÓN.....	18
I.6 ¿QUÉ ES EL CÁNCER?	20
<i>I.6.1 Tratamiento del cáncer</i>	23
I.7 SUSTENTABILIDAD.....	25
I.8 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN	27
<i>I.8.1 Método de Soxhlet</i>	28
<i>I.8.2 Extracción por sonicación</i>	28
<i>I.8.3 Maceración a Temperatura Ambiente</i>	30
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	31
II.1 EQUIPOS Y REACTIVOS	31
II.2 DIAGRAMA EXPERIMENTAL DE TRABAJO.....	32
<i>II.2.I Análisis Cualitativo</i>	33
II.2.I.1 Revisión de las posibles fuentes de lupeol (screening)	33
<i>II.2.II Selección de plantas de estudio</i>	33
<i>II.2.III Purificación parcial de lupeol</i>	34
II.2.III.1 Preparación de las muestras	36
<i>II.2.IV Preparación del extracto</i>	36
<i>II.2.V Análisis cuantitativo</i>	37
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
III.1.I REVISIÓN DE POSIBLES FUENTES DE LUPEOL (SCREENING).	38
III.2.II SELECCIÓN DE PLANTAS DE ESTUDIO	42



III.3.III PURIFICACIÓN PARCIAL DE LUPEOL	44
III.4.IV OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	44
III.5.IV. ANÁLISIS CUANTITATIVO: CUANTIFICACIÓN DE LUPEOL	47
CONCLUSIONES	52
APÉNDICE A. PLANTAS DE ESTUDIO.	53
APÉNDICE B. ESPECTROS DE RMN, DE LA CARACTERIZACIÓN DE LUPEOL OBTENIDO DE LA CORTEZA DE TAMARINDO.....	63
APÉNDICE C. ESPECTROS DE RMN, DE LA CARACTERIZACIÓN DE LUPEOL OBTENIDO DE <i>ZIZIPHUS AMOLE</i> O LIMONCILLO.	66
APÉNDICE D. CURVA PATRÓN DE LUPEOL (SIGMA-ALDRICH CAS: 545-47-1)67	
BIBLIOGRAFÍA	68



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de unidades de isopreno	5
Figura 2. Ejemplos de compuestos terpénicos	5
Figura 3. Estructura del escualeno	6
Figura 4. Esqueletos de triterpenos más comunes	7
Figura 5. Estructura de anillos terpénicos	9
Figura 6. Grupos representativos de triterpenos pentacíclicos	10
Figura 7. Estructura de lupeol	12
Figura 8. Fases de aparición del cáncer	22
Figura 9. Equipo de extracción Soxhlet	28
Figura 10. Cromatografía en capa fina de gel de sílice	38
Figura 10a. Cromatografía en capa fina de gel de sílice impregnada con nitrato de plata	39
Figura 11. Estructura de lupeol, α y β -amirina	40
Figura 12. Influencia de la fase estacionaria	41
Figura 13. Placa de fase reversa de lupeol, α y β -amirina	42
Figura 14. Cromatografía en capa fina. Presencia de lupeol de plantas seleccionadas con tres disolventes	43
Figura 15. Placa de gel de sílice impregnada de nitrato de plata de las plantas seleccionadas	43
Figura 16. Árbol de tamarindo	53
Figura 17. Árbol de nanche	54
Figura 18. Hoja de romero	56
Figura 19. Palo mulato	58
Figura 20. Acoque	60



ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Clasificación de terpenos	6
Tabla 2. Tipo de triterpenos, compuesto activo y fuente vegetal	10
Tabla 3. Alimentos que contienen lupeol	14
Tabla 4. Puntos de fusión de lupeol, α y β -amirina	18
Tabla 5. Cantidad de lupeol obtenida de los estándares	44
Tabla 6. Porcentaje de extracción con tres tratamientos y tres disolventes	45
Tabla 7. Cantidad de lupeol mg/100 g de planta seca	48
Tabla 8. Análisis estadístico de la cantidad de lupeol mg/100 g de planta seca	49
Gráfica 1. Curva patrón de lupeol	67



RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una búsqueda de las principales fuentes de lupeol, un triterpeno pentacíclico que se encuentra en la naturaleza distribuido principalmente en las plantas.

Se ha reportado en la literatura que el lupeol posee una serie de actividades biológicas de gran importancia, tales como: anti-inflamatorias, anti-artríticas, anti-mutagénicas y anti-malaria.

Dada la importancia biológica que posee el lupeol es necesario hallar una fuente rica en este compuesto y desarrollar un procedimiento de extracción eficiente con la mínima producción de residuos, es decir, un proceso amigable con el ambiente.

Se realizó un rastreo de las principales fuentes de lupeol y se seleccionaron cinco plantas, las cuales mostraron tener una mayor concentración de este triterpeno.

Las plantas que se trabajaron fueron: hojas de *Pseudobombax ellipticum* o acoque, las hojas de *Byrsomina crassifolia* L o nanche, la corteza de *Tamarindus indica* L o tamarindo, las hojas de *Bursera simaruba* o palo mulato y las hojas de *Rosmarinus officinalis* o romero, para realizar la extracción del lupeol se trabajaron tres métodos: maceración a temperatura ambiente, Soxhlet y sonicación. Además se utilizaron tres disolventes para cada método los cuales fueron: hexano, acetona y etanol.

La concentración de lupeol se cuantificó por cromatografía de gases y se observó que las hojas de nanche (*Byrsomina crassifolia*) contenían la mayor cantidad de lupeol con 12.71 mg/100 g planta seca, utilizando el método de extracción por Soxhlet y etanol como disolvente.

Se puede concluir que el lupeol se encuentra en diferentes concentraciones en las distintas plantas que se estudiaron y además que su concentración puede variar dependiendo del tratamiento y disolvente que se utilice.



INTRODUCCIÓN

Los terpenos son moléculas formadas a partir de las unidades de isopreno y en su mayor parte proceden de plantas y frutas. Uno de los grupos más numerosos son los triterpenos pentacíclicos, de los cuales existen por lo menos 5000 triterpenos conocidos y este grupo sigue en aumento. Los triterpenos pentacíclicos pueden encontrarse libres o como glucósidos.

Los triterpenos son conocidos por el amplio espectro de actividades biológicas benéficas para la salud y algunos de ellos pueden ser útiles en la medicina o como alimentos funcionales. Las propiedades que se les describen son: anti-virales, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas y también proporcionan protección a diferentes tejidos, actuando como agentes quimiopreventivos, hasta el momento existen reportes que le atribuyen al lupeol propiedades farmacológicas como: gastroprotector, hepatoprotector, antiinflamatorio, antitumoral y antimicrobial.

Dichas propiedades también son proporcionadas por diversos grupos de alimentos como: los vegetales, algunos ejemplos que contienen estas moléculas son: mango (*Mangifera indica*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), manzana (*Malus domestica*), brócoli (*Brassica oleracea L.*) y zanahoria (*Daucus carota L.*), entre otros. También está reportado en plantas como: limoncillo (*Ziziphus amole*), cenefa (*Euphorbia xanti*), acoque (*Pseudobombax ellipticum*), encontrándose principalmente en la corteza y hojas.

El presente trabajo de investigación, tiene como objetivo primordial aportar información, respecto al uso de tecnologías sustentables para la extracción eficiente del lupeol.



OBJETIVOS

General

Seleccionar el procedimiento más eficiente para extraer el lupeol, mediante el uso de tecnologías sustentables a partir de diferentes plantas de uso medicinal en México.

Particulares

- Realizar una búsqueda de las plantas reportadas en la literatura que contienen lupeol con la finalidad de seleccionar aquellas que lo contienen en mayor rendimiento.
- Determinar la concentración de lupeol en las diferentes partes de cada una de las especies seleccionadas (acoque, nanche, tamarindo, palo mulato y romero) mediante cromatografía en capa fina.
- Aislar el lupeol de la especie que lo contenga en mayor proporción con la finalidad de utilizarlo como estándar.
- Cuantificar la concentración de lupeol en los extractos obtenidos por tecnologías sustentables, mediante cromatografía de gases.
- Determinar las condiciones óptimas de extracción por tecnologías limpias, para este triterpeno pentacíclico.



CAPITULO I: ANTECEDENTES

I.1 Terpenos

Los terpenos, son una abundante y variada clase de compuestos hidrocarbonados, que son producidos principalmente por una gran diversidad de plantas. Además de sus funciones como metabolitos secundarios, estas moléculas, derivadas del isopreno, son el grupo más grande de productos naturales y todavía sigue en aumento. La mayoría de los terpenos son metabolitos secundarios de plantas, en menor grado son producidos por algunas especies de hongos, bacterias e insectos. Los terpenos, constituyen la mayor parte de la fracción no volátil de las oleorresinas; las cuales son extraídas con éter de los tejidos de plantas resinosas. Las oleorresinas de varias verduras y frutas son valiosos concentrados de sabores. Químicamente los terpenos se consideran como productos de la condensación de moléculas de isopreno.

I.2 Nomenclatura

La potencialidad de la biosíntesis de las plantas está muy bien ilustrada en el grupo de metabolitos secundarios conocidos como “terpenoides”. En general los terpenos están formados por unidades de 5 átomos de carbono y es uno de los grupos de compuestos más distribuido en la naturaleza junto con los alcaloides y los compuestos fenólicos.

En un comienzo se aislaron de las fracciones más volátiles de muchos aceites esenciales, hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$ a los que se denominó terpenos (del alemán terpentín=trementina). Posteriormente, se aislaron compuestos oxigenados que también se incluyeron dentro de esta clasificación general, por lo que la



terminación “eno” (correspondía al hidrocarburo) resultó inadecuada y se les llamó “terpenoides” (Silva, *et al.*, 1992). Estos compuestos que se encuentran principalmente en el reino vegetal están formados por la unión virtual de unidades de isopreno o isopentano. Como se muestra en Fig. 1.



Figura 1. Estructuras de las unidades de isopreno e isopentano (Silva, *et al.*, 1992)

La relación de isopreno con los terpenoides es absolutamente formal, ya que por lo que se sabe del camino biogénico de estos compuestos, los vegetales no lo sintetizan a partir del isopreno, el cual nunca ha sido aislado como producto natural. Sin embargo el conocimiento de la unión de dos o más unidades isoprénicas y del isopreno como un componente de la estructura ha sido de gran ayuda en la elucidación de las estructuras.

La formulación de la “regla del isopreno” fue enunciada por Ruzcka: un terpenoide debe ser divisible en unidades de isopreno. En dicha regla, se basa la definición de estos compuestos: “son aquellos compuestos que tienen una arquitectura *sui generis* químicamente relacionada con la molécula simple C_5H_{10} (isopreno). Ejemplos de ellos se muestran en la Fig. 2.

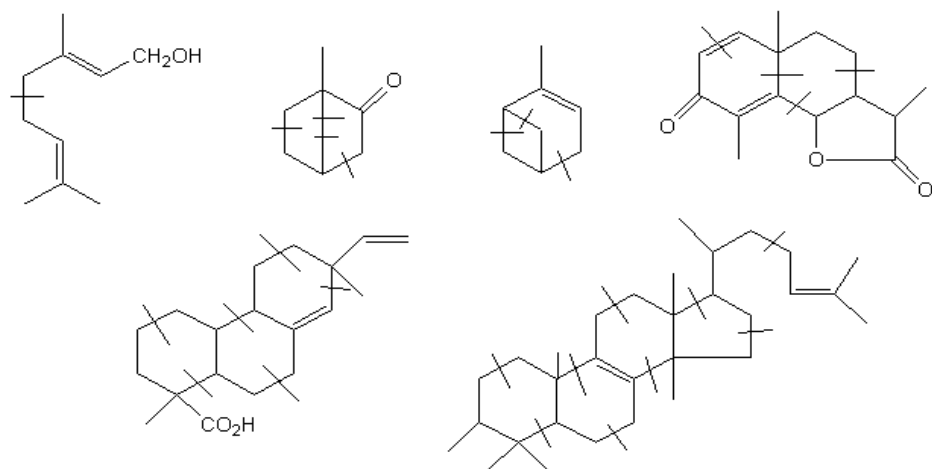


Figura 2. Ejemplos de compuestos terpénicos con sus unidades isoprénicas. (Silva, *et al.*, 1992).



De acuerdo a la “regla del isopreno”, los terpenos se clasifican como en la Tabla 1, conforme a un acomodo de la multiplicidad de este grupo.

Tabla 1. Clasificación de terpenos. (Silva, *et al.*, 1992)

Nombre	No. de unidades	Fórmula molecular
Hemiterpenos	1	C ₅ H ₈
Monoterpenos	2	C ₁₀ H ₁₆
Sesquiterpenos	3	C ₁₅ H ₂₄
Diterpenos	4	C ₂₀ H ₃₂
Sesterpenos	5	C ₂₅ H ₄₀
Triterpenos	6	C ₃₀ H ₄₈
Tetraterpenos	8	C ₄₀ H ₆₄
Politerpenos	N	(C ₅ H ₈) _n
	N	(n 7.5x10 ³ a 3x10 ⁵)

Dentro de este grupo de los terpenos, están los triterpenos, compuestos ampliamente difundidos en el reino vegetal como: glicósidos, esterés o de forma libre.

I.3 Triterpenos

Por definición se consideran “productos naturales que tienen un esqueleto de 30 átomos de carbono y que derivan del escualeno (6 unidades de isopreno) como se muestra en la Fig. 3, por ciclaciones y/ o modificaciones de este”.

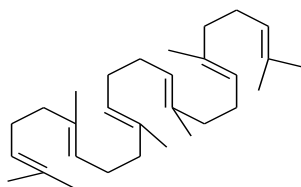


Figura 3. Escualeno. (Silva, *et al.*, 1992)



El estudio de los triterpenos comenzó prácticamente en 1949 con la determinación estructural del ácido oleanólico. En un comienzo la clasificación de los triterpenos se basaba en los pocos compuestos conocidos, sin embargo, la gran variedad de compuestos aislados posteriormente hizo necesario ampliar su clasificación e incluir toda una serie de esqueletos carbonados identificados como triterpenos naturales. Según el criterio más común de ellos son divididos en: acíclicos, bicíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. En la Figura 4 se presentan ejemplos representativos de los diferentes esqueletos encontrados dentro de cada serie.

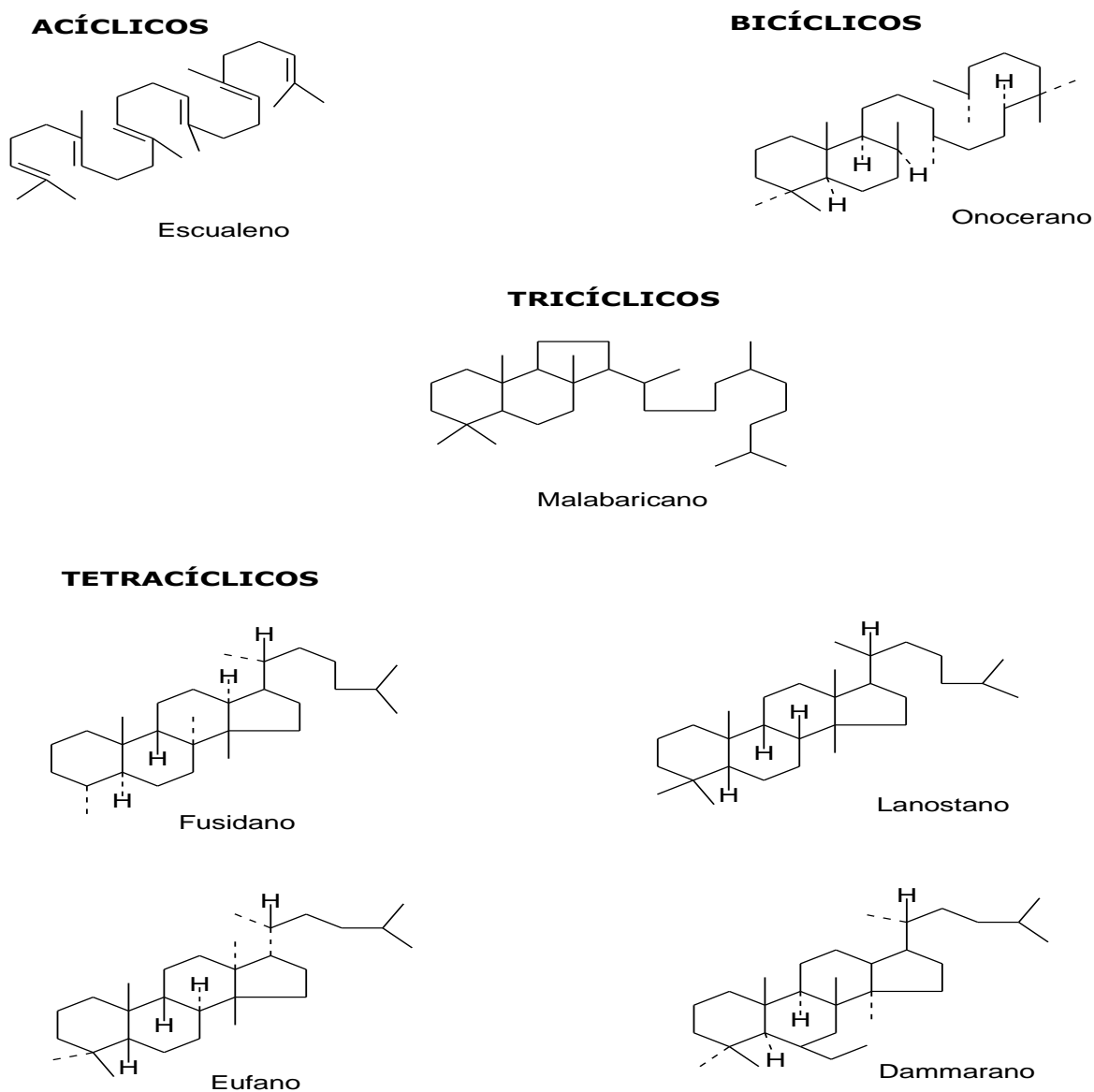
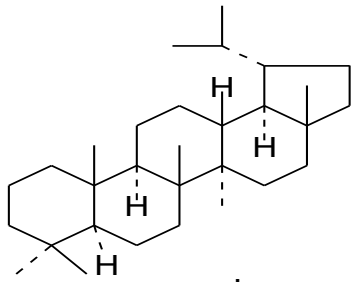


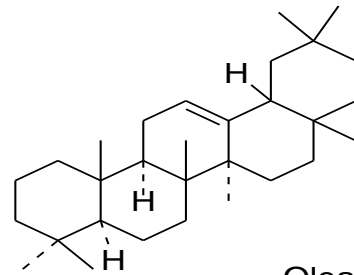
Figura 4a. Esqueleto de triterpenos más comunes (Silva, *et al.*, 1992).



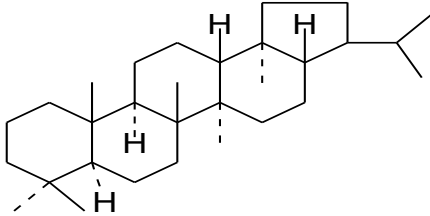
PENTACÍCLICOS



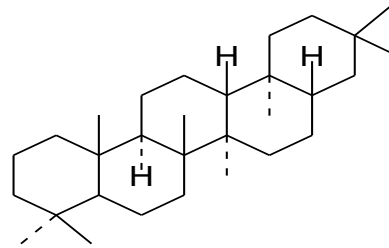
Lupano



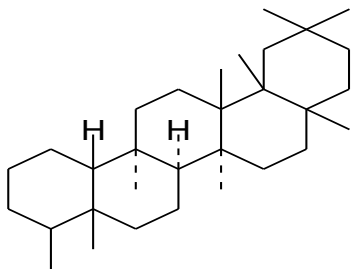
Oleanano



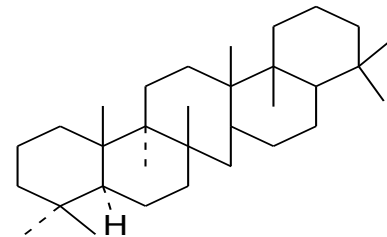
Hopano



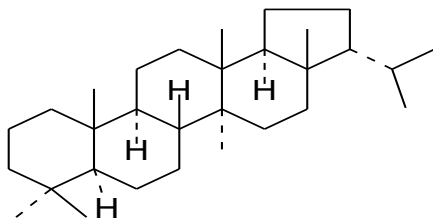
Stictano



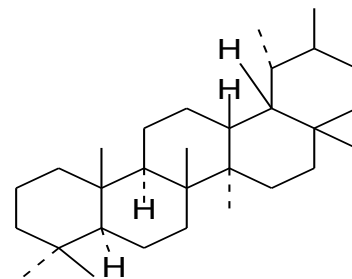
Friedelano



Serratano



Fernano



Taraxastano

Figura 4b. Esqueleto de triterpenos más comunes (Silva, *et al.*, 1992).



Es posible que algunos de estos triterpenos sean esenciales para el organismo que los produce, por lo que se sospecha que deben poseer alguna función, específica y es por ello que se consideran productos naturales con importantes funciones biológicas. Se sabe que forman parte de la membrana de la célula vegetal.

I.3.1 Triterpenos pentacíclicos

Estos compuestos son constituidos por un esqueleto de 30 átomos de carbono originados desde el escualeno, se encuentran de forma libre o como ésteres y/o glicósidos previamente mencionado. Es posible distinguir dos sistemas de anillos ver Fig. 5.

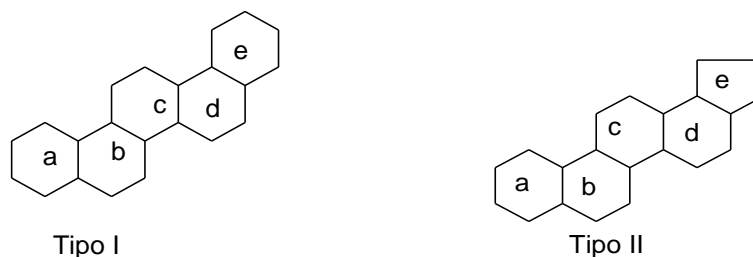


Figura 5. Estructura de anillos terpenícos (Silva, *et al.*, 1992).

Los triterpenos de tipo I se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, específicamente en las dicotiledóneas, la posición C_3 del anillo A, se encuentra generalmente sustituida por un grupo hidroxilo o acetilo. El tipo II se encuentra en bacterias, helechos, líquenes y plantas superiores, generalmente presenta una cadena isopropílica en el átomo C_{19} o el C_{21} . Los triterpenos pentacíclicos están agrupados, como se muestra en la Fig. 6, siendo los principales el ácido betulínico, la betulina y el lupeol entre otros grupos de distribución restringida a ciertas especies de vegetales.

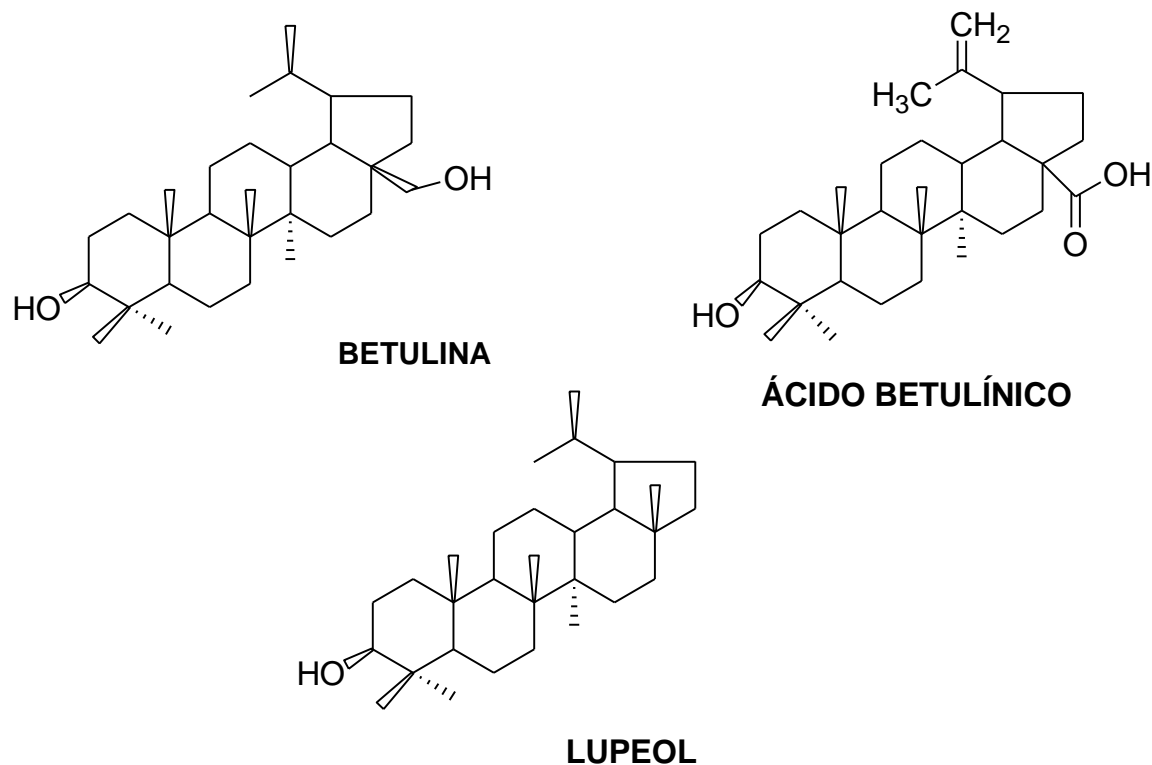


Figura 6. Grupos representativos de triterpenos pentacíclicos (Patocka, 2003).

Existen diferentes tipos de triterpenos pentacíclicos, encontrados en vegetales. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Tipo de triterpenos, compuesto activo y fuente vegetal (Silva, *et al.*, 1992)

Anillo básico	Nombre del compuesto	Fuente de origen
Ursano	Ácido ursólico	Hojas, pericarpio de manzanas y peras
Oleanano	β -amirina	Semillas y resinas de uvas y alfalfa, embrión del arroz
Lupano	Lupeol	<i>Lupinus luteus</i> (Leguminosaceae)
Hopano	Hidroxihopanona	Resina de árboles f. Dipterocarpaceae
Stitano	Retigeradiol	<i>Lobaria retigera</i> (liquen)
Serratano	Licianinol	<i>Lycopodium clavatum</i> (Pteridophyta)



I.3.2 Actividad biológica de los triterpenos

Desde el punto de vista de los productos naturales, la química orgánica comienza al término del metabolismo. Aquí aflora una rica diversidad de compuestos, principalmente los productos metabólicos de plantas y microorganismos. La síntesis de los terpenos es una de las vías más versátiles y ricas en compuestos, es decir, ofrece un reservorio de variedades químicas para determinadas funciones biológicas dentro del vegetal y para el humano. Los triterpenos pentacíclicos son producidos por disposición del epóxido de escualeno. Estos compuestos son muy comunes y se encuentran en la mayoría de las plantas. La actividad biológica de los triterpenos más características son: antimicrobiana, antiinflamatoria y citotóxica, los estudios que se han realizado han sido *in vitro* con propósitos farmacológicos principalmente (Patocka, 2003).

Los triterpenos funcionan como antioxidantes, protegiendo a los lípidos, a la sangre y a otros fluidos corporales contra el ataque de radicales libres, algunas especies de oxígeno reactivo, grupos hidroxilos, peróxidos y radicales superóxidos. Los terpenos más estudiados son los carotenoides y el escualeno. (Dillar y German, 2000).

Los triterpenos expresan su actividad antitumoral a través de una variada serie de mecanismos. La importancia en estos, es su inhibición de la proliferación de células malignas por decremento de la actividad de las proteínas oncogénicas denominadas Ras, estas proteínas son miembros de la familia de las proteínas intracelulares pertenecientes a las GTPasas, que permiten el cambio entre ellas o el encendido y apagado de ciertas señales que activan proteínas específicas para el control de crecimiento y la diferenciación celular. (Lodish, *et al.*, 1995).

En estudios experimentales se ha demostrado, que los triterpenos previenen la ocurrencia del cáncer en muchos sitios, incluyendo los pulmones, las glándulas mamarias, el colon, el estómago, la próstata, el páncreas, el hígado y la piel



(American Institute for Cancer Research, 1996). El potencial terapéutico de tres triterpenos Lupeol, Betulina y ácido betulinico son los más conocidos.

Gauthier en 2006 investigó que estas sustancias, la mayoría de las veces se encuentran en el reino vegetal. Ya se han aislado de la corteza externa de la abedul blanco, pero en las de abedul amarillo es en donde son más abundantes (0.6-1.1%). La estructura del lupeol se ilustra en la Fig. 7.

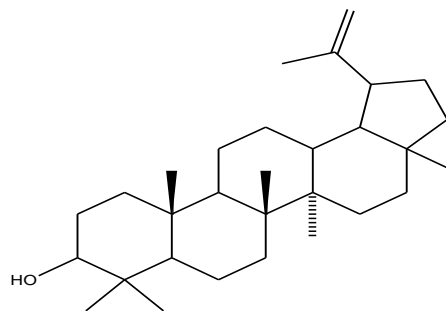


Figura 7. Estructura del Lupeol (Shehla, *et al.*, 2007).

I.4 Lupeol

El lupeol, (C₃₀H₅₀O) compuesto sólido, cristales blancos con punto de fusión 215-216 °C y [α]_D +26.4 (CHCl₃), UV (CHCl₃): λ_{max}= 228 nm, IR (KBr): ν_{max}= 3354 (OH), 2940 (C-H) cm⁻¹ (Kosmulalage, 2007). Tiene un peso molecular de 426.7174 g/mol (Saleem, 2009)

El lupeol posee una serie de actividades biológicas como: anti-inflamatorio, anti-artrítico, anti-mutagénica y anti-malaria, tanto en la actividad *in vitro* como *in vivo* en los sistemas, sin embargo, una amplia exploración en lo que respecta a su función de establecerlo como compuesto quimioprotector está justificada.

Las principales actividades descritas de este compuesto son:

- Anti- inflamatorio
- Anti-cancerígeno
- Apoptosis de cáncer pancreático
- Apoptosis de cáncer de próstata
- Prevención del cáncer de piel
- Como agente hepato-protector



El lupeol presenta actividades biológicas importantes demostrándose que posee un potente efecto inhibitorio de las proteínas cinasas, serin proteasas y de ADN las topoisomerasas II, otra de sus funciones es para inducir la diferenciación e inhibir el crecimiento de células de melanoma y leucemia. Recientemente se ha demostrado que inhibe la promoción tumoral en etapas de carcinogénesis (Saleem, *et al.*, 2005).

Patocka, 2003 en un modelo de ratón afectado por la artritis, encontró que el lupeol posee una potente actividad anti-inflamatoria. En este experimento, el efecto observado es comparable a la del ácido acetilsalicílico a dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

Así mismo, se reporta que la toxicidad de lupeol en modelos de animales es muy baja. La administración por vía oral de 2 g/kg de peso corporal no afectó la salud de un grupo ratas y ratones, y después de 96 horas, no se registró mortalidad.

INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso complejo fisiopatológico, el mecanismo de acción del lupeol también se examinó. Los resultados de la investigación demostraron que la actividad antiinflamatoria se debe a una acción inmunosupresora, la inhibición de las células migrantes en el lugar de la inflamación para reducir la secreción de factores pro-inflamatorios. Recientemente se demostró que el lupeol podría inducir apoptosis de las células de leucemia humana (HL-60) (Gauthier, 2006).

I.4.1 Lupeol en alimentos

En 2008 Pranav y colaboradores publicaron que la percepción de quimioprevención se encuentra todavía en desarrollo lento para detener o revertir el proceso de carcinogénesis, por tanto se ha propuesto el uso de sustancias naturales o sintéticas individualmente o en combinación con la terapia se ha convertido en un prometedor y pragmático enfoque médico para reducir el riesgo de cáncer.



En 2009 Saleem, afirma que el lupeol se encuentra principalmente en el sector de las frutas y verduras, como de olivo, mango, higo, col blanca, pimienta, fresas y uvas rojas.

El papel protector de frutas y verduras contra el cáncer que ocurre en diferentes sitios anatómicos, está bien soportado; Wattenberg, (1966) propuso por primera vez que el consumo regular de ciertos componentes en las frutas, verduras, cereales, especias y condimentos pueden proporcionar protección contra el cáncer (Preetha, *et al.*, 2008). Ver Tabla 3.

Tabla 3. Algunos de los vegetales, cereales, especias, condimento y frutas, que presentan compuestos para la prevención del cáncer (Preetha, *et al.*, 2008).

Frutas	Vegetables	Cereales	Especias y condimentos
Manzana	Aguacate	Arroz	Cilantro
Plátanos	Col	Trigo	Pimienta negra
Moras	Brócoli	Avena	Clavo
Cerezas	Coliflor	Centeno	Mostaza
Uvas	Zanahoria	Maíz	Regaliz
Guayaba	Cebolla	Mijo	Alcanfor
Piña	calabaza	Frijol negro	Perejil

En 2007 Shehla y colaboradores, aislaron dos triterpenos de las hojas del tamarindo, identificados como: lupenona y lupeol. Posteriormente Stefan y colaboradores en 2004 identificaron lupeol en cascara de jitomates (*Lycopersicon esculentum*).

Por otra parte, se reporta que algunas plantas que contienen lupeol son: *Teclea nobilis* (Al-Rehaily, *et al.*, 2001), *Brosimum rubescens* conocido como “palo sangre del rojo” (Alba y Cuca, 2007), *Crataeva Bentharii* (Aynilian, *et al.*, 1972) *Ziziphus attopensis* (Maneekaew, *et al.*) *Tamarindus indica* Linn o tamarindo (Shehla, *et al.*,



2007), *Bombax ceiba* (Young-Jae, *et al.*, 2003), *Clusia minor* (Mangas-Marin, *et al.*, 2008), *Acacia mellifera* (Mutai, *et al.*, 2007), *Byrsonima basiloba* o nanche (Moraes, *et al.*, 2008).

I.4.2 Extracción de Lupeol

Para la obtención de este compuesto triterpénico se han utilizado diferentes métodos, ya que no existe un procedimiento de extracción general.

El procedimiento descrito por Shehla y colaboradores en 2007 consistió en sumergir la planta en metanol durante un mes. El extracto se evaporó obteniendo residuos gomosos. El extracto fue particionado entre hexano y agua, posteriormente cloroformo y agua y, por último, entre acetato de etilo y agua. La parte soluble en los solventes orgánicos, se concentró a vacío y se sometieron a una cromatografía líquida.

La elución se llevó a cabo utilizando un 5%, 10% y 15% en cloroformo: hexano como fase móvil. De la fracción eluída con 5% de cloroformo, por cromatografía líquida utilizando fase móvil hexano se obtuvo el compuesto identificado como lupenona. La fracción que eluye con 20% de cloroformo en hexano dio un compuesto en forma pura e identificada como Lupeol. La conclusión de este experimento fue que el cloroformo es el disolvente ideal para el aislamiento de estas sustancias.

Otra forma de extracción propuesta por Al-Rehaily y colaboradores en 2001, investigadores de la Universidad de Farmacia de Arabia Saudita, fue partiendo de la planta seca se extrajo con hexano y Soxhlet por 72 h, posteriormente se evaporó el extracto y finalmente se purificó por cromatografía en columna con hexano-acetonitrilo usando SiO_2 y eluída con hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones.

Empleando etanol como disolvente de extracción también se obtiene lupeol, con eluciones de un gradiente de tolueno:acetato de isopropilo en polaridad creciente, se



purifica por CC (cromatografía en columna) repetitiva y cromatografía en capa fina (TLC), por su siglas en inglés y finalmente se hace una re-cristalización con mezcla de acetona/metanol (Alba y Cuca, 2007).

Otros disolventes utilizados para la extracción son: éter de petróleo y la posterior re-cristalización de acetona/etanol; acetato de etilo y CC eluída con hexano:acetato de etilo a diferentes polaridades y finalmente otra metodología usada es extracciones sucesivas de metanol y diclorometano, posteriormente purificadas por CC eluída con hexano:acetato de etilo.

I.4.3 Obtención y Caracterización de Lupeol

Los disolventes más utilizados para separar este tipo de triterpenos son: benceno, cloroformo, éter diisopropílico y diclorometano. Solo los triterpenos poco polares como el escualeno y la β -amirina migran en TLC de sílice usando como disolvente n-hexano. La separación de compuestos de igual polaridad es difícil. Sin embargo Ikan y colaboradores, separaron epi- β -amirina y β -amirina así como lupeol de epi-lupeol usando n-heptano:benceno:etanol (50:50:5); el epímero migra primero que el compuesto normal.

Ocasionalmente Tscheche pudo separar α -amirina de β -amirina por cromatografía de partición usando una solución de n-butanol e hidróxido de amonio 2N. Si el número y la posición de los dobles enlaces varían es más efectivo usar placas con nitrato de plata que permiten una mejor separación y estabilidad del compuesto de estudio.

Como disolvente se recomienda usar cloroformo o tetra cloruro de carbono. En la cromatografía gas-líquida se ha descrito métodos para la separación de productos oxidados con SeO_2 de alcoholes triterpénicos pentacíclicos como α -amirina, lupeol y dioles triterpénicos en relación con sus acetatos y productos de oxidación, el tiempo de retención se determinó usando una columna OV-17 y colesterol como patrón (Silva, *et al.*, 1992).



Para los terpenos no volátiles como son los triterpenos se usa la TLC de sílice con diferentes sistemas de disolventes dependiendo de su polaridad.

Los triterpenos han sido separados por cromatografía líquida en columna (CC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cromatografía en columna es apropiada como técnica semi-preparativa, para la separación de diversos compuestos. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (EM) y/o Detector de ionización de flama (FID) o por otro lado, la detección con HPLC son las técnicas más comúnmente utilizadas para la localización y la determinación de triterpenoides. Sin embargo, la técnica por HPLC, también se ha utilizado en combinación con la EM mediante la ionización química de una interfase de haz de partículas (APCI).

La cromatografía en capa fina es una herramienta poderosa, especialmente para la detección de triterpenoides de extractos de plantas, el análisis es rápido y sencillo porque no se necesita pre-tratamiento de la muestra y gran número de muestras pueden ser analizadas de forma simultánea, la TLC de gel de sílice se ha utilizado para análisis cualitativos, así como para cuantitativos en la determinación de α -amirina y lupeol (Martelanc, *et al.*, 2008).

Existen informes acerca de la separación de algunos triterpenoides, primeramente es impregnada una TLC de gel de sílice con nitrato de plata y posteriormente eluída con cloroformo-éter etílico (19:1), observándose la separación de lupeol, α -Amirina, taraxasterol y ψ -taraxasterol, los compuestos α -amirina junto con β -amirina han sido separados de lupeol utilizando diclorometano-acetato de etilo (24:1), mientras que el acetato de lupeol y acetato de β -amirina han sido separados utilizando cloroformo-éter etílico (97:3).

La separación del ácido oleanólico, β -amirina y acetato de β -amirina en placas de gel de sílice de fase reversa, por su siglas en ingles RP-TLC, se logró utilizando



hexano-diclorometano-metanol-agua en proporciones (4:5:0.9:0.1). Sin embargo, la determinación de triterpenos en los extractos de plantas con compuestos triterpénicos que tengan estructuras y polaridades similares es difícil separarlos, además de que algunos de ellos son isómeros y hace la separación aún más difícil. Por tanto, una combinación de técnicas cromatográficas como son TLC y CC complementadas con otros equipos como: EM, CG y HPLC con detección UV, conviene emplearse para la determinación de triterpenos, en los extractos de plantas (Martelanc, *et al.*, 2009).

Otro método utilizado para la caracterización es: índice del punto de fusión. Es una constante importante que debe tomarse en cuenta para confirmar la pureza de los compuestos. Sin embargo, es muy frecuente en los triterpenos, la retención del disolvente de cristalización, así como el fenómeno del doble punto de fusión ya que muchos de ellos tienden a sublimar. Ver Tabla 4.

Tabla 4. Intervalos de los puntos de fusión de algunos triterpenos.

Punto de fusión (°C)	Compuesto
183-187	α -amirina
194-200	β -amirina
212-216	Lupeol

I.5 Quimiopreención

Muchos alimentos contienen compuestos con propiedades biológicas, que actúan evitando la formación de tumores, compensando así los efectos carcinogénicos de los posibles agentes presentes en la dieta. Consecuentemente, el consumo de alimentos que contienen sustancias con propiedades biológicas, constituirá uno de los principales elementos de prevención natural contra el cáncer.



Actualmente el concepto de estas sustancias con propiedades benéficas en la salud, recibe el nombre de agente quimiopreventivo, que se define como *“sustancias o componentes en la dieta que pueden aportar un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica y que ofrecen la posibilidad de prevenir ciertas enfermedades incluyendo la carcinogénesis celular”*.

El interés en la relación entre alimentación y salud, va más allá de la acción preventiva de los nutrientes, esto se explica por las asociaciones que se han evidenciado entre el consumo de alimentos de origen vegetal, esencialmente frutas, verduras, cereales integrales y leguminosas y sus efectos preventivos sobre el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

Estos alimentos son excelentes fuentes de antioxidantes, tales como las vitaminas C, E y A y beta caroteno, que tienen propiedades saludables y también se encuentra el grupo de los fitoquímicos, compuestos que en su gran mayoría son antioxidantes y que incluso pueden tener efectos sinérgicos con algunos nutrientes.

Si bien no ejercen un rol nutricional, este grupo de fitoquímicos, puesto que no se trata de sustancias indispensables para el organismo humano, su consumo supone una protección adicional contra la acción nociva de sustancias provenientes de la dieta y del entorno ambiental y que afectan la salud de la población. A este efecto de retardar y/o suprimir procesos dañinos como la carcinogénesis, se le denomina en conjunto quimioprevención a través de los alimentos que contienen carotenoides, polifenoles, vitaminas antioxidantes y otros fitoquímicos de efectos bioquímicos comprobados (Araya y Lutz; 2003).

Por otra parte, es importante el uso de estas sustancias para la preparación de alimentos balanceados o funcionales para la prevención del cáncer.



Los fitoquímicos, es decir, algunos metabolitos secundarios de plantas, poseen componentes con bioactividad en el metabolismo y se han examinado ampliamente por su capacidad de proporcionar beneficios a la salud, su justificación para el uso en los alimentos se basa en compuestos que aumenten la absorción y estabilidad de nutrientes esenciales y de inhibidores selectivos de enzimas que participan en enfermedades carcinogénicas (Pranav, *et al.*, 2008).

Varios estudios han abordado el cáncer con componentes quimioprotectores derivados de las frutas y verduras. Se han identificado más de 25,000 diferentes fitoquímicos que pueden tener potencial contra diversos tipos de cáncer, estos compuestos son seguros y por lo general tienen múltiples vías de señalización celular; entre ellos se incluyen los carotenoides, vitaminas, el resveratrol entre otros (Preetha, *et al.*, 2008).

I.6 ¿Qué es el cáncer?

Desde 1997, algunos investigadores clasifican el cáncer como un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de las células que invaden o dañan los tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo.

En la actualidad, es la causa más común de muerte relacionada entre hombres y mujeres en algunos países. Y por eso, se ha convertido en una importante preocupación de salud pública.

El nombre de cáncer proviene del griego *karkinoma* dado por Hipócrates cuatro siglos antes de Cristo y del equivalente latino que significa “cangrejo” dando a entender la capacidad tentacular de invasión de que disponen las células tumorales y que en algunos casos recuerda a la forma de este animal. (Muñoz, 1997)



Una vez que se establecen en un nuevo tejido, las células tumorales originan un segundo núcleo proliferativo o metástasis, denominado así a diferencia del primer núcleo o tumor primario, también es llamado neoplasma.

El crecimiento de los tumores son de dos tipos benigno y maligno y existen claras diferencias entre ellos. En primer lugar los tumores malignos, son invasivos y destruyen el tejido adyacente normal, presentan tipos celulares muy poco diferenciados (pierden las funciones y características de las células del tejido normal), suelen crecer más rápido; contrariamente los tumores benignos crecen tan sólo por expansión, no invadiendo el tejido vecino al estar normalmente encapsulados, mantienen las características celulares originales y crecen lentamente.

Desde que empieza la anómala multiplicación celular, se puede apreciar diferentes fases.

En la primera fase, durante la cual no existe todavía un “bulto” o tumor primario se pueden ya detectar cambios en la disposición y formas celulares utilizando las técnicas microscópicas adecuadas, la detección de esta fase no suele efectuarse excepto en aquellas pruebas clínicas con determinados grupos de riesgo.

Posteriormente, el tumor empieza a hacerse visible y/o palpable a medida que crece y puede ser detectado por las consecuencias fisiológicas derivadas de su presencia, producirá problemas de estreñimiento, problemas de deglución, dificultades urinarias, etc. Posteriormente las células tumorales empezaran a viajar fuera del tejido donde surgieron alejándose del tumor primario, para ello utilizan primeramente los vasos linfáticos, que sirve para drenar el tejido por medio de los llamados nódulos linfáticos. En casos de invasión tumoral se produce un agrandamiento de estos nódulos en la región proximal del tumor primario, extendiéndose por otros nódulos e invadiendo otros tejidos.



Finalmente las células tumorales son capaces de invadir capilares sanguíneos por los que viajan muy rápido y pueden establecerse por desbordamiento en otros tejidos, apareciendo la metástasis, (Araya y Lutz, 2003). como se muestra en la Figura 8:

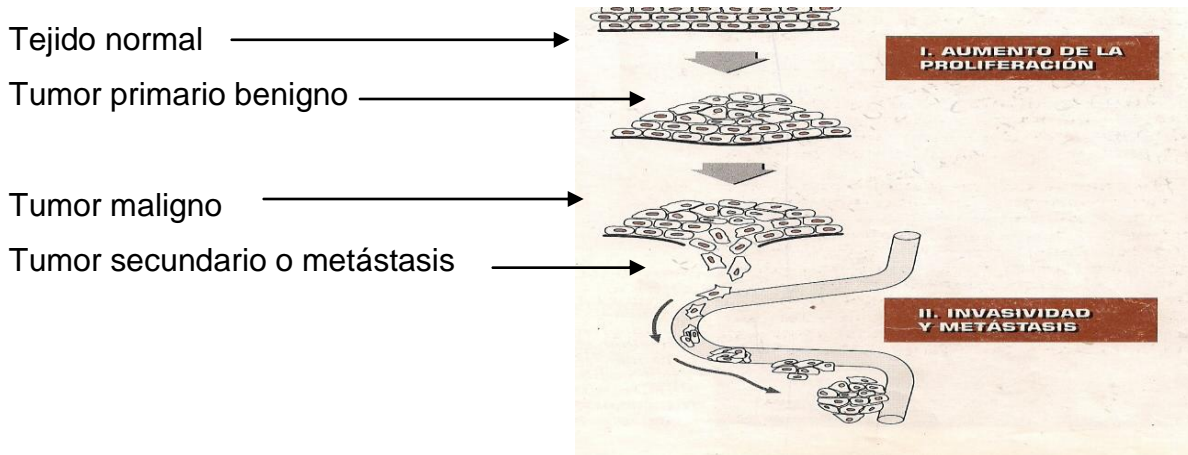


Figura 8: Fases de la aparición de cáncer. I) Formación de un tumor primario benigno debido al aumento de la proliferación, II) Malignización de éste con formación de tumores secundarios en sitios distantes como consecuencia de la adquisición de invasividad y de capacidad metastásica. (Muñoz, 1997).

El activo e incontrolado crecimiento coloca al huésped en una situación de caquexia o pérdida de peso, como consecuencia no tan solo de la mala absorción de nutrientes, produce anorexia o pérdida de apetito, lo que conduce a la muerte del paciente canceroso.

Los cánceres se clasifican en categorías según el órgano o tejido en el que se originan, con subdivisiones de acuerdo con el tipo específico de célula, su localización en el organismo y la estructura del tumor. Una de la nomenclatura usada en este tipo de cánceres es, para un tumor benigno epitelial es llamado *adenoma*, mientras que para un tumor maligno se denomina *adenocarcinoma*. Los cánceres más comunes son los de pulmón, estómago, mama, colorrectal y cuello uterino. (Muñoz, 1997)



Solo el 5-10% de las causas de cáncer es atribuible a defectos genéticos, mientras que el restante 90-95% tiene una causa fundamental en el medio ambiente y estilo de vida. (Preetha, *et al.*, 2008).

Los factores en el estilo de vida incluyen fumar, dieta (comida frita, carne roja), alcohol, exposición al sol, contaminación ambiental, infecciones, estrés, obesidad e inactividad física.

Existe evidencia que demuestra que la muerte por cáncer provocada por tabaco, es alrededor del 25-30%, ligada a la dieta es el 30-35%, por infecciones cerca del 15-20% y el porcentaje restante son producidos por otros tipos de factores como la radiación, factores ambientales y agentes químicos.

I.6.1 Tratamiento del cáncer

No en vano, el cáncer, junto con las enfermedades cardiovasculares, se haya situado a la cabeza en cuanto a tasas de mortalidad en las sociedades industrializadas. La lucha contra esta enfermedad durante mucho tiempo se centró en la búsqueda milagrosa de una droga que curara esta patología tumoral, pero de entrada se sabe que no hay un único agente causal, ni siquiera considerando todos los agentes carcinogénicos.

El cáncer no solo tiene innumerables causas, entre las cuales destacan la proliferación celular y las alteraciones mutagénicas del DNA celular, sino que también influyen diferentes etapas como la iniciación, promoción y progresión, las cuales se hayan influenciadas por un gran número de factores protectores. Los factores protectores incluyen los genes supresores de tumores, la inmunidad tumoral y también muchos de los componentes alimentarios tienen estos supresores (Muñoz, 1997).

Dicha prevención del cáncer requiere dejar de fumar, incrementar la ingestión de frutas y verduras, moderar el uso de bebidas alcohólicas, restricción de calorías,



ejercicio, no exponerse al sol, minimizar el consumo de carne roja, consumir granos enteros y vacunarse. La enfermedad del cáncer es prevenible, pero requiere mayores cambios en el estilo de vida.

El hecho de que sólo del 5-10% de los casos de cáncer se deben a defectos genéticos, y que el restante 90-95% se deben al ambiente y estilo de vida proporciona grandes oportunidades para la prevención del cáncer.

En 2008 Preetha y colaboradores, reportaron que la FDA aprobó por primera vez el agente quimiopreventivo tamoxifen. Este agente puede reducir la incidencia de cáncer de mama en un 50%, en las mujeres hay un mayor riesgo de efectos secundarios graves como el cáncer uterino, coágulos de sangre, perturbaciones oculares, la hipercalcemia y alteraciones cerebrovasculares. Recientemente, se ha demostrado que un medicamento para la osteoporosis, raloxifen, es tan eficaz como la tamoxifen y con menos efectos secundarios. Los efectos secundarios del raloxifen incluyen sofocación, calambres en las piernas, hinchazón de la piernas y pies, síntomas como gripe, dolor de articulaciones y sudoración.

El segundo agente quimiopreventivo fue el finasteride, para el cáncer de próstata, reduce la incidencia en un 25% en los hombres con alto riesgo. Los efectos de este agente incluyen la disfunción eréctil, la disminución el deseo sexual, la impotencia y la ginecomastia.

Celecoxib, un inhibidor COX-2 es otro agente aprobado para la prevención de adenomatosa familiar, sin embargo, causa daños cardiovasculares graves.

Los efectos secundarios graves de los quimiopreventivos aprobados por la FDA son tema de especial preocupación teniendo en cuenta la administración a largo plazo de un fármaco para personas sanas que pueden o no desarrollar cáncer. Esto claramente indica la necesidad de agentes, que sean seguros y eficaces en la prevención del cáncer. Los productos derivados de la dieta natural son posibles candidatos para este propósito.



Numerosas investigaciones han revelado que una dieta que consta de frutas, verduras, especias y cereales tiene el potencial de prevenir el cáncer. Las sustancias específicas en estos alimentos son responsables de la prevención.

Sin embargo, hoy en día se dispone de elementos suficientes para establecer bases sólidas para la prevención del cáncer, una de ellas es la alimentación. (Argilés y Lopez-Soriano; 1998).

I.7 Sustentabilidad

Los principios de la Conferencia de Río (Metzger y Eissen; 2004) frente a los problemas apremiantes de hoy, tienen por objeto la preparación del mundo para los desafíos que se avecinan, en cuanto a la conservación y la gestión de los recursos para el desarrollo de la sustentabilidad, y en la que la química tendrá que hacer una contribución considerable. Dado que los productos químicos básicos son producidos en grandes cantidades y algunos productos importantes son sintetizados a partir de ellos, sus recursos y la producción de ahorro es especialmente un tema muy importante para un mundo sostenible.

Los nuevos procesos se basan en materias primas renovables. Para el diseño de los productos químicos, dicha materia debe lograr transformarse y reciclarse lo más posible, y evitar su bioacumulación.

Actualmente la seguridad de los productos químicos, se ha mejorado significativamente por acuerdos internacionales o normas e incluso la iniciativa voluntaria en todo el mundo a la que llaman "Responsible Care" de la industria química, algunos países como: Japón y EE.UU. han aceptado contribuir con este concepto de la química sostenible para un desarrollo considerable.



En general, hay que decir que las sociedades, empresas e instituciones pueden hacer importantes contribuciones a la conservación de los recursos y hacer más:

- Eficiente y ambientalmente procesos químicos más benignos;
- Productos químicos que se basan en fuentes renovables; y
- Diseño de productos que encajen en un concepto de reciclaje. (Metzger y Eissen; 2004).

En mayo de 2007 en Bundespresseamt (Oficina de Prensa Federal), Berlín, Alemania, se enfatizó nuevamente el concepto de Química sustentable o sostenible que representa un área de la innovación, que no sólo conserva los recursos, sino que también, representa un proceso de desarrollo en la industria química.

El impulso de estos conceptos y acciones en Química Sustentable fomentará tanto la transmisión de la información y el diálogo entre la política, la ciencia y la industria y el aumento de la sensibilización del público.

En septiembre (2009) en el XVIII Congreso de Mendeleev General and Applied Chemistry, que contó con el apoyo financiero de la Academia Rusa de Ciencias, IUPAC, la OPAQ, la Comisión Europea (a través del Centro Regional de Medio Ambiente de Rusia) y el Instituto de Química y los Problemas de Desarrollo Sostenible, Mendeleev University. Se plantearon los siguientes objetivos:

- La difusión de los nuevos materiales educativos relacionados con la administración responsable y la necesidad de introducir los principios de la química "verde" en la educación;
- Hacer hincapié en la responsabilidad social de los científicos en la promoción del desarrollo sostenible, tanto en países desarrollados y países en desarrollo;
- La promoción de todos los aspectos de la química, no sólo entre los miembros de la profesión, sino también, a la comunidad mundial y a contribuir a la comprensión del público de la química.



La química juega un papel fundamental en el desarrollo sostenible, porque es el progreso de las nuevas tecnologías y está problemáticamente ligado al progreso de la civilización moderna.

El principal objetivo es enfocarse en la sustentabilidad de elementos importantes en diferentes áreas como medio ambiente, evitar las emisiones y el consumo excesivo de recursos como la energía y los materiales, mantener un equilibrio económico y la conciencia de la sociedad. Así como la seguridad intrínseca de los productos, incluyendo su producción, transformación, utilización y eliminación. Y que a su vez estos productos químicos se caractericen por su baja toxicidad para el medio ambiente y la salud humana y de baja persistencia o potencial de acumulación. De esta manera el medio ambiente y la salud humana están protegidos.

I.8 Procedimientos de extracción

Las plantas contienen una amplia gama de compuestos bioactivos, los extractos obtenidos de las plantas son ampliamente utilizados en alimentos, farmacia y cosmética. Estas técnicas de extracción han sido ampliamente investigadas para obtener compuestos naturales para su comercialización.

Wang y Weller (2006) mostraron que diversas técnicas como: la extracción con ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos y la extracción acelerada con disolventes, se han desarrollado para la extracción de nutraceuticos, a partir de plantas con el fin de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de disolvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad de los extractos. Estas técnicas deben ser rápidas y eficientes, teniendo la posibilidad de trabajar a temperaturas elevadas y/o presiones disminuyendo considerablemente el tiempo de extracción.



I.8.1 Método de Soxhlet

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente como se muestra en la Fig. 9, posteriormente el disolvente con los compuestos extraídos es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de extracto se cuantifica por diferencia de peso entre el matraz conteniendo el extracto y el matraz a peso constante (Nielsen, 1998).

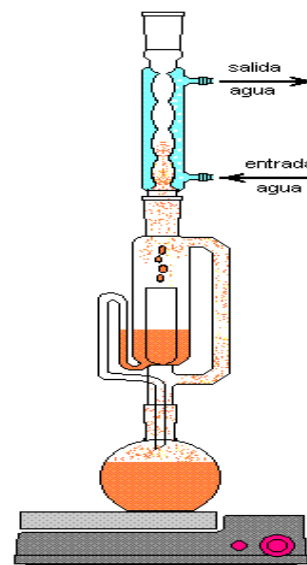


Figura 9 Equipo de extracción Soxhlet.

I.8.2 Extracción por sonicación

(Univ. De Toronto, Variclean Ultrasonics).

El ultrasonido en procesos analíticos se ha empleado generalmente usando un baño limpiador ultrasónico, en procesos pre-analíticos (limpiando botellas, producción de mezclas y emulsiones) y en preparación de muestras (extracción y disolución de sólidos), puesto que las ondas acústicas aumentan la interacción del disolvente con las superficies del sólido por un fenómeno mecánico.

En la sonicación la muestra es mezclada con un pequeño volumen de disolvente y es expuesta a ondas de sonido de alta frecuencia (18 a 20 KHz.) por un breve periodo de tiempo.

El mecanismo fundamental de este proceso es cuando las burbujas microscópicas en el medio líquido se colapsan bajo la presión de la agitación para producir ondas de choque, las cuales afectan a la superficie de la muestra y por rozamiento desplazan o desprenden partículas de materia desde la superficie.

El proceso por el cual estas burbujas colapsan es conocido como cativación.



La intensidad de cativación en un campo sónico es en gran parte determinado por tres factores:

- a) La frecuencia y la amplitud de la onda de radiación.
- b) Las propiedades coligativas del medio, incluyendo la presión de vapor, tensión superficial, densidad y viscosidad.
- c) Las propiedades reológicas del líquido, incluyendo las condiciones estáticas, flujo turbulento y flujo laminar.

La frecuencia de onda de radiación más comúnmente usadas en ultrasonido es de 18-20 KHz, que está situada justo sobre la gama de frecuencias audibles. En cualquier sistema, la armonía de la frecuencia fundamental, junto con las vibraciones originadas en las paredes del tanque y en la superficie del líquido hace que se produzca un sonido audible.

La amplitud de la onda de radiación es directamente proporcional a la energía eléctrica que se aplica al transductor. La amplitud de la onda de radiación debe tener un cierto valor mínimo, el cual es usualmente clasificado en términos de poder eléctrico de entrada al transductor. La cativación no puede ocurrir por debajo del valor del umbral y el uso de corriente eléctrica por encima del nivel mínimo no produce una mayor actividad de cativación. El mínimo poder requerido para la producción de cativación varía enormemente con las propiedades coligativas, la temperatura del líquido, con la naturaleza y concentración de las sustancias disueltas.

Esta técnica se ha aplicado en bioquímica y medicina, el ultrasonido no solo eleva la temperatura del disolvente (acelera la velocidad de transferencia e incrementa la solubilidad del analito), pero además rompe muestras de tejido y membranas celulares, aumentando considerablemente la eficiencia de extracción. La técnica es muy fácil de usar y emplea volúmenes pequeños de disolvente.



I.8.3 Maceración a Temperatura Ambiente

El proceso de maceración descrita por Sharapin (2000) consiste en poner en contacto la planta y el disolvente, durante varios días. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre el analito y el disolvente y depende de factores que están unidos a la planta de estudio, por ejemplo: su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y factores que están relacionados con el disolvente, como: la selectividad y la cantidad.

El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación planta/disolvente aumenta. El hinchamiento de la planta es factor importante porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del disolvente. La velocidad con que se obtiene el equilibrio, está en función del tamaño de partícula de la planta molida, así como el grado de hinchamiento de las células y de las propiedades del disolvente como son viscosidad y polaridad.

La desventaja de este proceso de maceración son la lentitud del proceso y el hecho de no alcanzar la extracción completa del compuesto. Para disminuir las pérdidas de extracto en el residuo de extracción, la operación de maceración puede repetirse dos a tres veces.

Este procedimiento disminuye la cantidad de extracto retenido en el residuo, pero aumenta la cantidad de disolvente a ser recuperado.

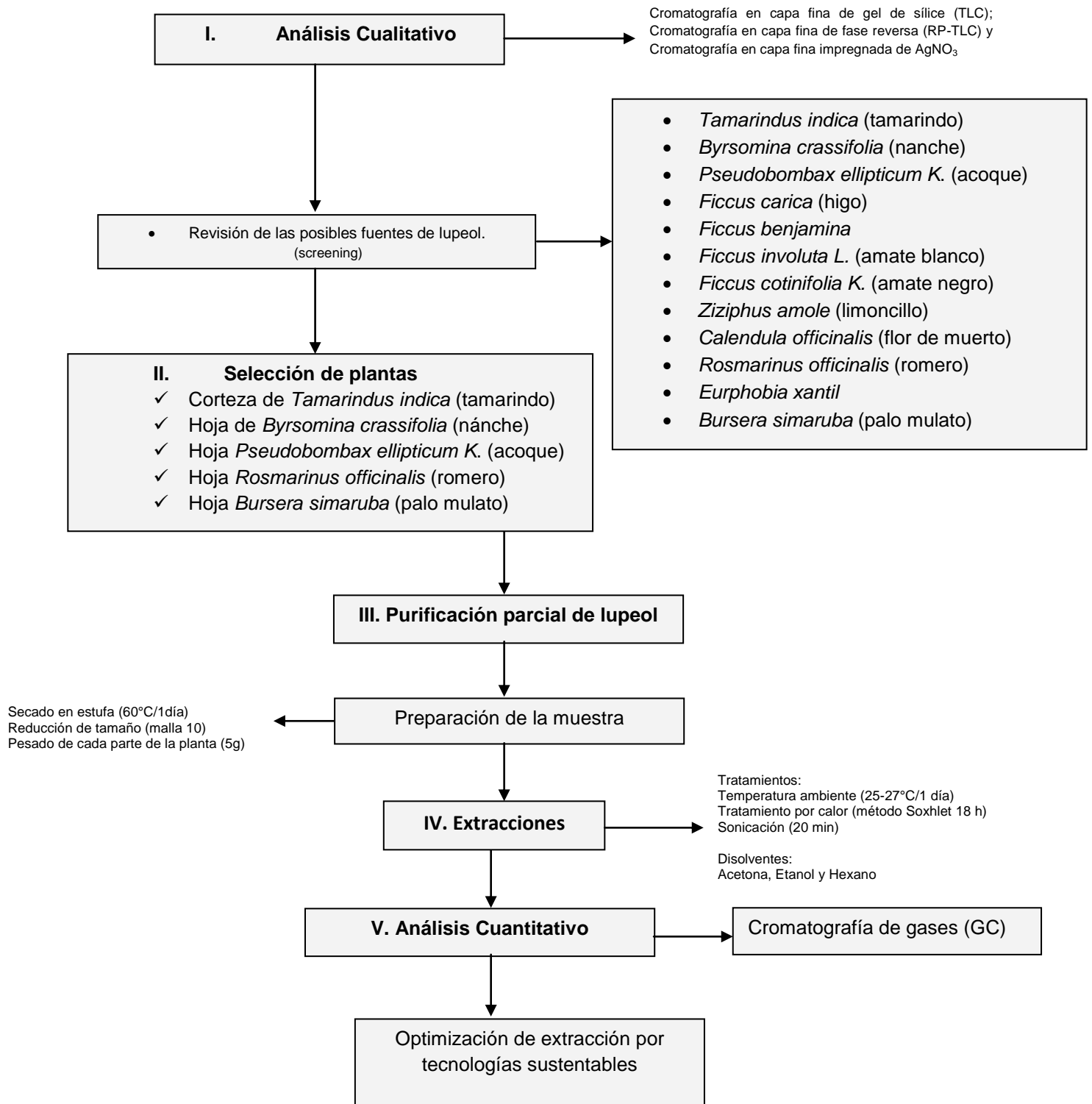


II.1 Equipos y Reactivos

- Microbalanza AG245 Máx. 41g-410g / d=0.01mg-0.1mg Mettler Toledo.
- Sonicador Branson 1510R-MTH Branson[®] Ultrasonic cleaner 70W 42KHz +/- 6%
- Agitador Orbital Lab-line Modelo 4629.
- Rotavapor R-205 Büchi; Büchi Helating Bath B490.
- Cromatógrafo de Gases y Detector FID, Agilent Technologies 6890N Network GC System Versión N.04.10. Inyector Agilent Technologies 7883 Series (10µL). Columna 122-5532 DB-5MS Length (meters) 30; ID (mm) 0.25 Narrowbore; Film (µm) 0.25; límite de temperatura -60°C a 325°C (350°C) J & W Scientific Columns Agilent Technologies.
Rampa Temperatura inicial 200°C por un minute, incrementa a 15°C/minuto hasta 260°C y permanece por 5 minutos, vuelve a incrementar a 5°C/minuto hasta los 300°C y permanece 17 minutos; tiempo total de corrida 35 minutos. Software Chemstations.
- Balanza OHAUS CT-600-S capacidad 600x0.1g; opera a 0°C a 40°C y una humedad relativa de 10% - 65%.
- Placas MACHEREY-NAGEL HPTLC-Fertiglatten Nano-SIL C₁₈-100/UV₂₅₄.
- Acetona Q.P. (CH₃)₂CO, Ensayo 99% humedad 0.5%, PM: 58.08 Distribuidora Alvi CAS:67-64-1
- Hexano Q.P. (C₆H₁₄), Ensayo 98%, Rango de destilación: 30-60°C, residuos de evaporación: 0.001% PM: 86.18 Distribuidora Química Alvi CAS: 110-54-3
- Alcohol Etílico calidad 96% Farandelh S.A de C.V.
- Lupeol L5632-25mg ≥95%, store at 2-8°C, SIGMA-ALDRICH CAS: 545-47-1 C₃₀H₅₀O PM: 426.7; EC: 208-889-9.
- MN Kieselgel 60 0.04-0.063mm/230-400 mesh ASTM.
- Programa estadístico STATGRAPHICS Plus para Windows 4.0 (1994-1999) STATGRAPHICS Corp.



II.2 Diagrama Experimental de Trabajo.





II.2.I Análisis Cualitativo

II.2.I.1 Revisión de las posibles fuentes de lupeol (screening)

La recolecta de las plantas seleccionadas se realizó en los Estados de: Morelos, Veracruz, Sinaloa y el Distrito Federal.

Se realizó una investigación bibliográfica de las plantas en las que se reporta el contenido de lupeol, (*Pseudobombax ellipticum* o acoque, *Byrsomina crassifolia* o nanche, *Bursera simaruba* o palo mulato, *Rosmarinus officinalis* o romero y *Tamarindus indica* L. o tamarindo, *Ficus carica* (higo), *Ficus benjamina*, *Ficus involuta* L. (amate blanco), *Ficus cotinifolia* K. (amate negro), *Ziziphus amole* (limoncillo), *Caléndula officinalis* (flor de muerto), *Eurphobia xantil* (cenefa).

La identificación de lupeol se realizó colocando 1 g de cada una de las partes de las plantas mencionadas (corteza, hoja, fruto y raíz), en matraces con 10 mL con diclorometano, se extrajo y se tomó una placa de sílica gel, para la identificación de triterpenos, como referencia se aplicó (α -amirina, β -amirina y lupeol), eluída con hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1) y se reveló con anisaldehído, como se muestra en la Figura 10, para seleccionar cinco plantas.

II.2.II Selección de plantas de estudio

Finalmente se seleccionaron cinco plantas, las hojas para cuatro de ellas (*Pseudobombax ellipticum*, *Byrsomina crassifolia* o Nánche, *Bursera simaruba* o Palo mulato, y *Rosmarinus officinalis* o Romero) y la corteza de *Tamarindus indica* L. o tamarindo. (Ver apéndice A. Plantas de estudio que presentan lupeol).



Se realizó una placa, para diferenciar cada Rf (factor de retención) de las referencias, se utilizaron placas C₁₈, de fase reversa para la identificación de los triterpenos α -amirina, β -amirina y lupeol, revelando con anisaldehído, (revelador para triterpenos). Nuevamente se utilizaron placas Kieselgel 60, impregnadas con una solución de nitrato de plata al 10%, cuya función es realizar la misma distinción de los triterpenos α -amirina, β -amirina y lupeol, como se haría con una placa de fase reversa.

II.2.III Purificación parcial de lupeol

Se partió de tres plantas diferentes, para obtener un extracto de alta pureza al que se denominará sustancia de referencia.

A) Corteza de tamarindo, se molió hasta obtener un polvo fino, se pesaron 978 g, el cual se extrajo con 2 L de hexano, durante 3 días, posteriormente se añadió carbón activado para la eliminación de la clorofila, finalmente se filtró obteniéndose 6.4 g de extracto crudo.

Se empacó una columna cromatográfica con 60 g de gel de sílice Kieselgel 60, posteriormente se tomó 4 g del extracto crudo y se adsorbieron con 4 g de celita, posteriormente se adicionaron a la columna cromatográfica y se eluyó primeramente con hexano, finalmente se eluyó la columna con fracciones de hexano: acetato de etilo (95:5), se colectaron 25 fracciones de 100 mL cada una, a cada una de las fracciones se les realizó una prueba en placa identificando como positivas (presencia de lupeol) las fracciones 19 a la 22.

Se colectaron las fracciones 19–22, se concentraron en un rotavapor y se preparó una segunda columna cromatográfica empacada con 60 g de gel de sílice, 2 g, del compuesto de las fracciones 19-22 el cual fue soportado con 2 g de celita y se eluyó primeramente con hexano y posteriormente con hexano: acetato de etilo (95:5) obteniéndose 15 fracciones, de 80 mL cada una. Al realizar un análisis en placa, se observan positivas las fracciones 9 a 11.



Para obtener la sustancia de referencia, se realizó una placa preparativa impregnada con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) al 10%, se dejó secar por 2 h en una estufa a 30°C , se seleccionó la fracción 10 previamente concentrada y se aplicó a la placa preparativa, posteriormente fue eluída 3 veces con hexano:acetato de etilo (9:1), se reveló parte de la placa mostrando la separación de dicho compuesto (dos zonas), se procedió a raspar la segunda zona (parte de abajo) para recuperarlo y extraerlo con acetato de etilo. Del extracto recuperado con acetato de etilo, se concentró obteniéndose 23.5 mg, de dicho extracto se pesaron 10.9 mg y se disolvieron en 1 mL de diclorometano (DCM).

Finalmente se realizó nuevamente una placa preparativa de 10 X 10 cm impregnada con nitrato de plata (AgNO_3) se aplicaron los 10.9 mg y después se eluyó con diclorometano (CH_2Cl_2) se reveló y se raspó la zona donde se observó el lupeol, finalmente se recuperaron 9.2 mg de lupeol. Mostrándose los espectros, en el apéndice B.

B) Lupeol obtenido de *limoncillo*, se utilizaron de 96.7 g de hoja de limoncillo previamente secados y molidos suspendidos en 600 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), dejándose extraer por un día a temperatura ambiente y con agitación constante, finalmente se obtuvieron 0.8 g de extracto crudo. Enseguida se empacó en una columna de sílica gel (60 g) MN Kieselgel 60, el extracto crudo se soportó con 1 g de celita y se eluyó con hexano:acetato de etilo (95:5) obteniendo 17 fracciones, de 100 mL cada una, de las cuales las fracciones más puras son las fracciones 13 y 14.

Las fracciones 9-12 muestran una ligera impureza, se colectaron y nuevamente se realizó una columna cromatográfica con el mismo procedimiento descrito anteriormente, obteniéndose 0.2 g de lupeol con un 27% de pureza, mezclado con amirinas. Los espectros se muestran en el Apéndice C.



C) Lupeol obtenido de la hoja de nanche verde se parte de 763.6 g y se extrae por tres días con 3 L de hexano y se concentra obteniéndose 8.4 g de extracto crudo, se resuspende en 100 mL de diclorometano y se le añade 0.5 g de carbón activado para eliminar la clorofila, se filtra al vacío recuperándose 6.4 g de extracto crudo, los 6.4 g son adsorbidos con (6 g) de celita.

Se empaca una columna con (120 g) de gel de sílice y se añade los 6.4 g soportados con celita, se eluyó las primeras cinco fracciones con hexano, posteriormente con hexano:acetato de etilo:diclorometano (8:1:1) de la fracción 6-16, con de esta polaridad se muestra que las fracciones 9-13 presentan lupeol.

Posteriormente, las fracciones que presentan lupeol se recristalizan con acetona fría, finalmente se realiza una placa de fase reversa (C_{18} -100/ UV_{254} .) observándose la presencia de lupeol y β -amirina, por último se juntaron las fracciones para obtener (0.274 g) de cristales de lupeol mezclado con β -amirina.

II.2.III.1 Preparación de las muestras

Las plantas seleccionadas fueron secadas a temperatura ambiente por 5 días, posteriormente fueron separadas las hojas y la corteza, seguido de otro secado en una estufa a 60°C por un día.

La reducción de tamaño se realizó con una licuadora, hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo y finalmente, de cada una de las partes previamente seleccionadas (hojas y corteza), se pesaron en una balanza analítica alrededor de 5 g por triplicado para cada método de extracción.

II.2.IV Preparación del extracto

A) Extracción a temperatura ambiente

Se pesó 5 g de cada planta de estudio seca y molida con 250 mL por triplicado, se dejó por 1 día con agitación constante a 180 rpp en un agitador orbital.



Posteriormente se filtró a gravedad y el sobrenadante se concentró en un rotavapor, para obtener un extracto crudo.

B) Tratamiento por el método de Soxhlet

Se pesó 5 g de muestra seca y molida, se añadieron 250 mL de disolvente, por triplicado y se dejó extraer por 18 h, posteriormente se filtró y concentró en un rotavapor, para obtener el extracto crudo.

C) Tratamiento por sonicación

Se pesó 5 g de planta seca y molida con 250 mL de disolvente por triplicado, se sometió a un sonicado, utilizando un sonicador, se efectuó por 20 minutos, se filtro a gravedad y se concentró en un rotavapor, para obtener el extracto crudo.

Los extractos obtenidos de cada método y de cada disolvente empleado fueron pesados en una microbalanza, para determinar la cantidad exacta de extracto crudo obtenido.

II.2.V Análisis cuantitativo

Se utilizó un cromatógrafo de gases y detector FID, con el siguiente gradiente de temperatura.

Rampa: Temperatura inicial 200°C permanece por un minuto, e incrementa temperatura a 15°C/minuto hasta 260°C, permanece por 5 minutos, vuelve a incrementar a razón de 5°C/minuto hasta los 300°C en el cual permanece 17 minutos; tiempo total de corrida 35 minutos, Software Chemstations.

Para la identificación del lupeol se parte aproximadamente de 20 mg del extracto por triplicado; cada triplicado mostró una señal con un intervalo de tiempo de retención de [28.093 a 28.737] para todas las muestras, donde aparece el lupeol, observado en previos reportes en la literatura que apoya la estructura propuesta.



Para la cuantificación se realizó una curva patrón con un estándar de lupeol $\geq 95\%$, en diferentes concentraciones con un intervalo de [0.0049 a 0.16 mg/mL]. Ver anexo D. Curva patrón de lupeol.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1.1 Revisión de posibles fuentes de lupeol (screening).

Se realizó una revisión de doce plantas: tamarindo, nanche, acoque, higo, *F. benjamina*, amate blanco, amate negro, limoncillo, flor de muerto, romero, cenefa y palo mulato. Para comprobar la presencia de lupeol en cada una de ellas, se realizó una cromatografía de capa fina, se aplicaron diez plantas y tres referencias, como se observa en la Fig. 10.

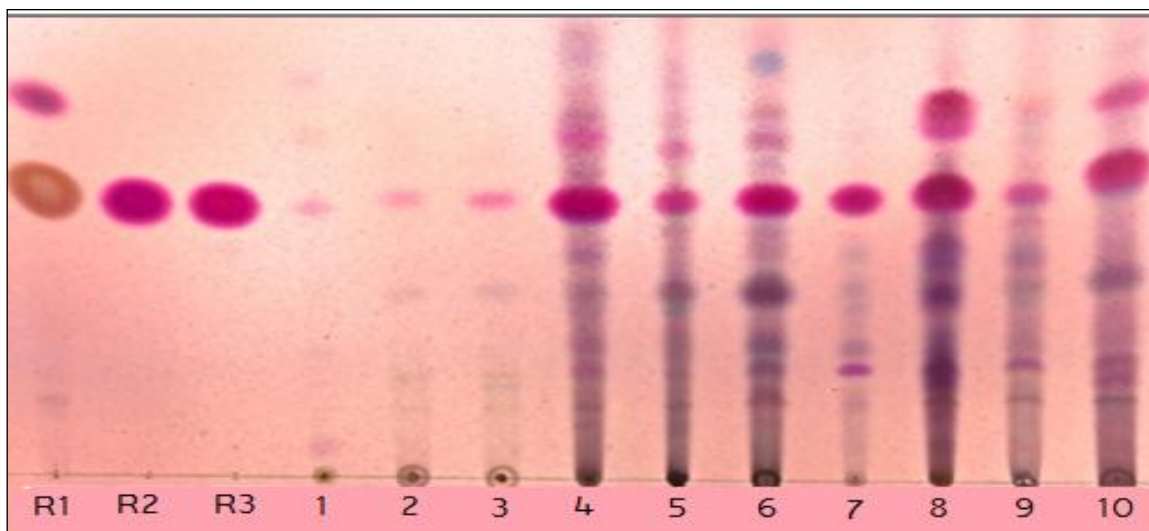


Figura 10. Cromatografía en capa fina de gel de sílice. R1: α -amirina, R2: β -amirina, R3: lupeol, 1. *Calendula officinalis* (flor de muerto), 2. *Ficcus involuta*, 3. *Ficcus cotinifolia*, 4. *Ziziphus amole* (limoncilo), 5. *Pseudobombax ellipticum* (acoque), 6. *Tamarindus indica* (corteza), 7. *Byrsomina crassifolia* (hoja de nanche), 8. *Bursera simaruba* (palo mulato), 9. *Rosmarinus officinalis* (hoja romero), 10. *Eurphobia xantil*. Eluida con hexano:acetato de etilo:diclorometano en proporción (8:1:1) revelada con anisaldehído.



Se sabe que todas las plantas mencionadas anteriormente presentan lupeol sin reportar que cantidad tienen, en algunos casos, se ha encontrado que: el olivo contiene 0.3 mg/ 100 g de fruta, el mango 18 mg/ 100 g de pulpa, la hoja de aloe 28 mg/ 100 g de hoja seca, planta de olmo 88 mg/ 100 g de corteza, pera japonesa 17.5 mg/ 100 g de corteza y aceite de ginseng 15.2 mg/ 100 g de aceite (Saleem, 2009). Sin embargo, también se reporta el contenido de los isómeros α y β amirina que son difíciles de separar, porque eluyen con el mismo RF que el lupeol, como se muestra en la Figura 10, por tanto no se puede afirmar que en cada una de las muestras existe únicamente la presencia de lupeol o la mezcla de ambos isómeros, por ende esta placa no puede dar evidencia de la cantidad de lupeol, solo indica la presencia, más no en su totalidad o sus isómeros.

Para separar los isómeros α -amirina y β -amirina e identificar la presencia de lupeol, se realizó una cromatografía en capa fina impregnada con nitrato de plata al 10%. En la Fig. 10a se ilustra la TLC obtenida durante el análisis de las especies de estudio.

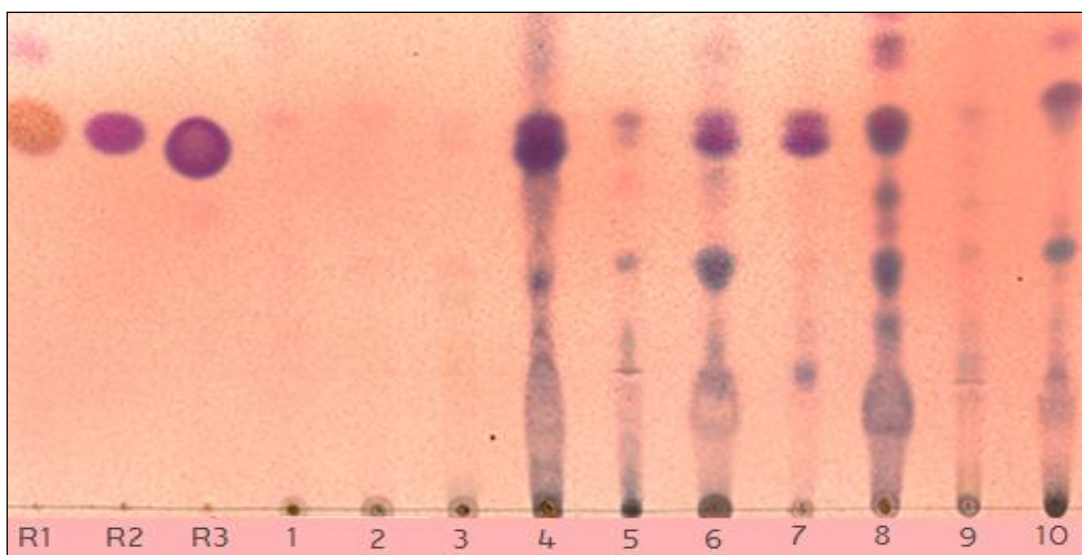


Figura 10a. Cromatografía en capa fina de gel de sílice previamente impregnada de nitrato de plata (AgNO_3) al 10%; R1: α -amirina, R2: β -amirina, R3: lupeol, 1. *Calendula officinalis* (flor de muerto), 2. *Ficus involuta*, 3. *Ficus cotinifolia*, 4. *Ziziphus amole* (limoncillo), 5. *Pseudobombax ellipticum* (acoque), 6. *Tamarindus indica* (corteza), 7. *Byrsomina crassifolia* (hoja de nanche), 8. *Bursera simaruba* (hoja de palo mulato), 9. *Rosmarinus officinalis* (hoja romero), 10. *Eurphobia xantil*. Eluída con hexano:acetato de etilo:diclorometano en proporción (8:1:1) revelada con anisaldehído.



En la Fig. 10a, se observa que el lupeol tiene un menor Rf con respecto a las amirinas y por tanto en las muestras se puede apreciar cuales presentan lupeol en mayor proporción que las amirinas.

Como se mencionó, el primer problema que se presentó fue separar los isómeros α , β -amirina del lupeol. En la figura 11, se ilustran las estructuras de los tres compuestos antes mencionados.

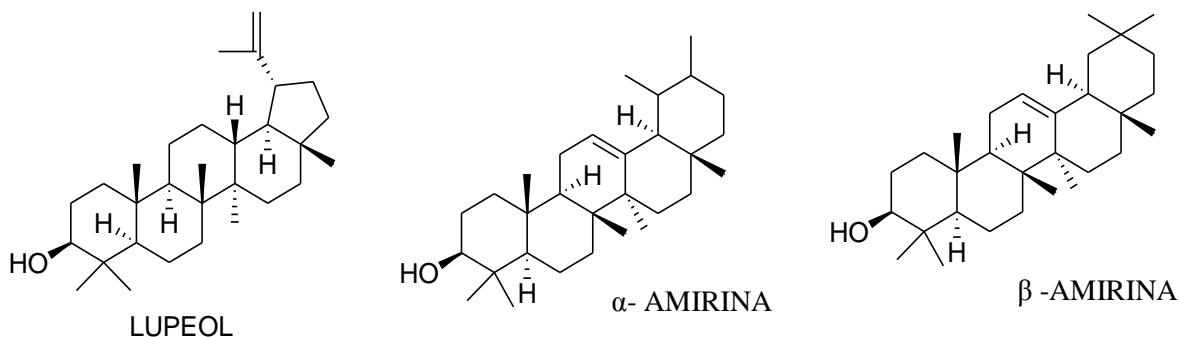


Figura 11. Estructuras de lupeol y α , β - amirina (Martelanc *et al.*, 2009).

El problema se resolvió mediante la utilización de una cromatografía en capa fina impregnada de nitrato de plata la cual permite diferenciar la presencia de lupeol y α , β -amirina. Otra forma de comprobar la presencia de cada uno de los triterpenos, es utilizando placas de fase reversa (C18), eluidas con acetona:acetonitrilo (5:1) en las cuales se ha reportado la separación de lupeol con respecto a α -amirina y β -amirina.

Otro sistema de elución utilizado para separar estos compuestos es utilizando diclorometano-acetato de etilo (24:1), mientras que el acetato de lupeol y acetato de β -amirina han sido separados utilizando cloroformo-éter etílico (97:3). Sin embargo, la determinación de triterpenos en los extractos de plantas con compuestos triterpénicos que posean estructuras y polaridades similares es difícil separarlos, ya que algunos de ellos son isómeros de posición, lo cual hace la separación aún más difícil.



En la Fig. 12. Se ilustra la placa de TLC obtenida de una referencia bibliográfica para el análisis de las muestras e identificar cada isómero. En éste método es importante la coloración que presenta cada mancha, el disolvente empleado para la elución y el tipo de placa.

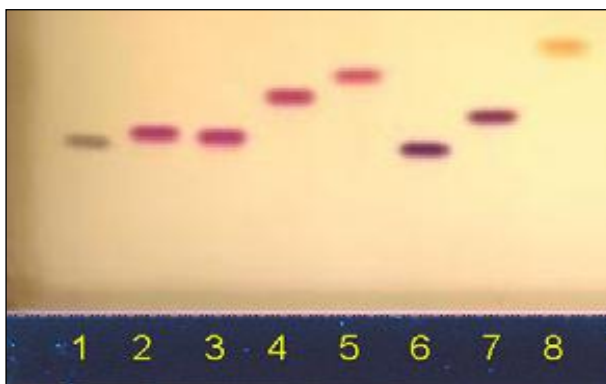


Figura 12. Influencia de la fase estacionaria y el disolvente de desarrollo en la separación de triterpenoides y esteroides. (Placa) Gel de sílice RP-HPTLC en lámpara de UV, eluída con acetona:acetonitrilo (5:1); 1 α -AM, 2 β -AM, 3 δ -AM, 4 = lupeol, 5= acetato de lupeol , 6 = cicloartenol; 7 = acetato de cicloartenol; 8 = Lupenona. (J. Chroma. 2009).

En la Figura 12 se puede observar que el compuesto 1 identificado como α -amirina presenta una coloración café y con un Rf menor al de la β -amirina (2), el lupeol (4), acetato de Lupeol (5) y lupenona (8) que presentan diferente Rf. Sin embargo la coloración de la mancha de Lupeol y β -amirina es igual (rosa), pero con distinto RF, lo que permite distinguir claramente cada compuesto.

Para reproducir esta metodología se realizó una placa de fase reversa aplicando el estándar de α - amirina, β -amirina (Fluka) y Lupeol (Sigma Aldrich). En la Fig. 13a se observa que poseen un Rf y coloración al de la α -amirina, permitiendo de esta forma identificar claramente la presencia de lupeol en cada una de las plantas estudiadas.

La coloración de la α -amirina en una placa impregnada de nitrato de plata y en una placa de fase reversa (C18) es muy similar, presenta una coloración amarillenta-café. El color que desarrolla el lupeol es un rosa claro o pálido en comparación con la β -amirina que permanece rosa fuerte o fucsia.

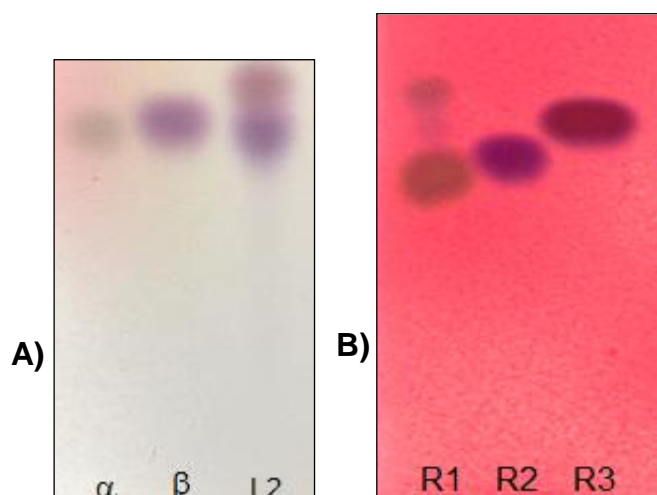


Figura 13. A) Placa de fase reversa HPTLC-Fertiglatten Nano-SIL C₁₈-100/UV₂₅₄ para diferenciación de α -amirina, β -amirina y lupeol (impuro obtenido de hoja de nanche). B) R1: α -amirina, R2: β -amirina, R3: estándar de lupeol. L2: lupeol obtenido de la hoja de nánche.

III.2.II Selección de plantas de estudio

Finalmente, se seleccionaron cinco plantas del tamizado (screening) realizado, tomando como criterio la disponibilidad de las plantas y la intensidad de la mancha mostrada en las placas de TLC impregnadas de nitrato de plata, que se identificó como lupeol, las cuales fueron: corteza de tamarindo, hoja de nanche, acoque, hoja de romero y hoja de palo mulato. De nueva cuenta se realizó una cromatografía en capa fina de gel de sílice de las plantas seleccionadas con las que se realizarán las extracciones, con los tres disolventes y con tratamiento a temperatura ambiente como se muestra en la Fig. 14. Se utilizó como estándar, β -amirina (Fluka) y lupeol (Sigma Aldrich) la placa fue eluida con, hexano:diclorometano:acetato de etilo en proporción (8:1:1) y revelada con anisaldehído (revelador para triterpenos).

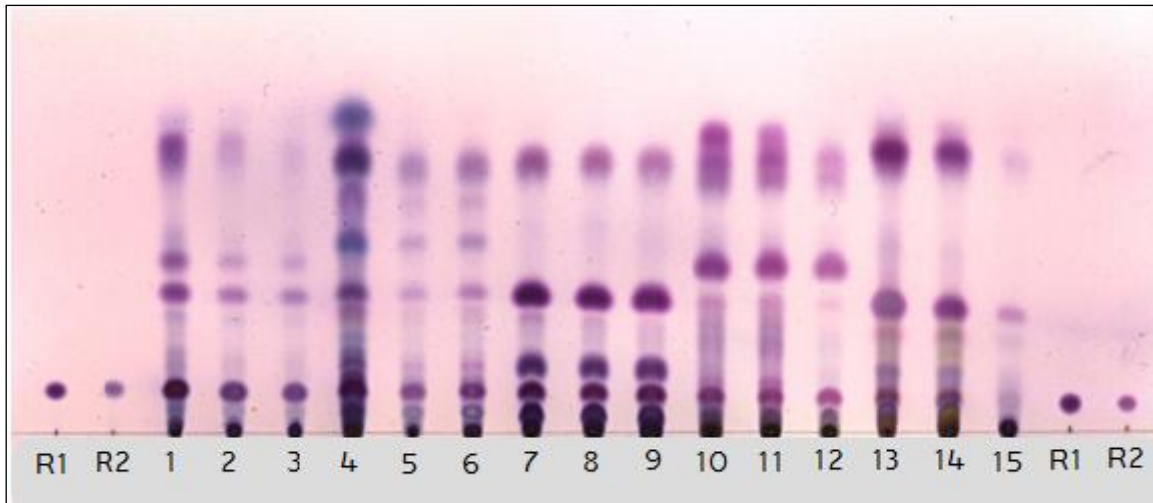


Figura 14. Cromatografía en capa fina de gel de sílice, presencia de lupeol, tratamiento a temperatura ambiente. R1: β -amirina, R2: Lupeol, 1-3: hoja de nánche, 4-6: corteza de tamarindo, 7-9: palo mulato, 10-12: Acoque, 13-15: romero, con diferente disolvente hexano, acetona y etanol en ese orden respectivamente.

En el cromatofolio que se ilustra en la Figura 14 se puede apreciar que las referencias β -amirina y lupeol tienen el mismo Rf. Posteriormente, para comprobar la presencia de los isómeros de α y β -amirina, se realizó una cromatografía en capa fina impregnada de nitrato de plata, la cual permite diferenciar la presencia de lupeol y β -amirina, de la misma manera que si se utilizara una placa fase reversa (C18). Como se muestra en la Fig. 15.

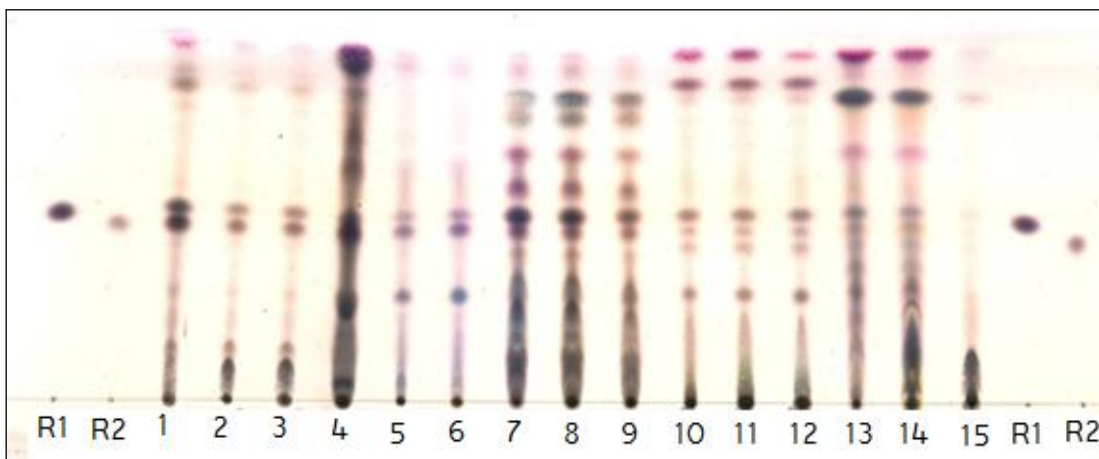


Figura 15. Placa de capa fina impregnada de nitrato de plata y eluída con Hexano:DCM:Acetato de etilo (8:1:1) a temperatura ambiente. R1: β -amirina, R2: Lupeol, 1-3: hoja de nánche, 4-6: corteza de tamarindo, 7-9: palo mulato, 10-12: acoque, 13-15: romero, con diferente disolvente hexano, acetona y etanol en ese orden respectivamente.



En la Fig. 15 se observa la presencia de β -amirina y de lupeol en diferentes proporciones, es decir, la intensidad de la mancha nos indicó en forma empírica en que concentración se encontraba. Finalmente, se procedió a cuantificar el lupeol por cromatografía de gases, para saber la concentración real que está presente en cada planta de estudio.

III.3.III Purificación parcial de lupeol

La obtención de las sustancias de referencia de corteza de tamarindo, limoncillo y hoja de nanche, fueron analizados por RMN para comprobar la existencia de lupeol y determinar su pureza, sin embargo, no cumplen con las características de un estándar debido a que la pureza es menor al 90%, obteniéndose las siguientes cantidades mostradas en la tabla 5. Por lo tanto se empleó un estándar comercial de lupeol (Sigma Aldrich con pureza del 95%) como referencia.

Tabla 5. Concentración de lupeol obtenida de la corteza de tamarindo, limoncillo y hoja de nanche.

Planta de estudio	Lupeol [mg]	% Pureza
Corteza de Tamarindo	9.2	50
Limoncillo	200	27
Hoja de nanche	274	SD

SD= sin determinar

Ver espectros en el anexo B y C.

III.4.IV Obtención de Extractos

El procedimiento para la obtención de los extractos que se describieron anteriormente en la metodología y después de haber realizado las extracciones con los tres diferentes disolventes (Acetona, Etanol y Hexano) y cada parte seleccionada



de las cinco plantas de estudio, los extractos obtenidos, expresados en porcentaje se muestran en la tabla 6, para cada uno de los tratamientos aplicados con su disolvente empleado.

Tabla 6. Porcentaje en peso de los extractos crudos, obtenidos de los tratamientos a temperatura ambiente, Soxhlet y sonicación con tres disolventes. Los valores mostrados son promedio de los triplicados. C.V \leq 10%

Disolvente Planta	Temperatura Ambiente			Soxhlet			Sonicación		
	Hexano	Acetona	Etanol	Hexano	Acetona	Etanol	Hexano	Acetona	Etanol
Hoja Acoque	3.51	3.84	3.51	5.49	7.35	5.86	2.92	3.87	4.75
Hoja Nanche	0.84	1.97	0.48	2.40	6.81	23.30	0.68	1.94	8.04
C. Tamarindo	1.80	3.44	5.74	2.39	11.15	16.16	1.65	5.12	5.73
Hoja Palo Mulato	2.90	3.27	5.08	4.54	5.06	3.62	3.57	4.17	7.15
Hoja Romero	0.97	6.17	3.83	6.52	14.22	35.62	3.15	8.24	5.00

El extracto crudo, contiene todos los compuestos presentes en cada planta sin llevarse a cabo un proceso de purificación para el aislamiento de un metabolito en específico, de tal forma que el disolvente y el tratamiento influyen en la presencia del compuesto buscado, la interacción del disolvente dependerá de la naturaleza de la muestra, en el caso del hexano (C_6H_{14}) es un disolvente apolar, inmisible en agua, por tanto arrastrará los compuestos que sean afines a él como: esteroides y aceites.

La acetona (CH_3COCH_3) es miscible en aceites, éteres, alcoholes y agua, por tanto en ésta se pueden disolver grasas, aceites y ceras, incluyendo los compuestos polares ya que este disolvente es polar aprótico, es decir, no contienen enlaces O-H o N-H; en comparación con el etanol (CH_3CH_2OH) que es un disolvente polar prótico, que se caracteriza por tener enlaces O-H, lo común en estos dos últimos disolventes es su nube de distribución electrónica la cual es asimétrica, esto es, presenta un dipolo positivo y uno negativo separados por una cierta distancia y eso es lo que favorecerá la extracción de los compuestos, la capacidad de interactuar con los dipolos o para formar ciertos tipos de enlaces.



El lupeol es un compuesto que por su naturaleza apolar, tiene gran cantidad de enlaces C-C y C-H, la naturaleza de estos enlaces es covalente y su momento dipolar es mínimo, lo que lo hace soluble en disolventes no polares.

Con respecto a los métodos de extracción también influyen en la extracción del lupeol. Los disolventes apolares realizarán una mejor extracción que uno polar, el disolvente no polar es más selectivo para moléculas como los esteroides y los disolventes polares fijan menor a la molécula por no tener grupos polares, sin embargo debe tomarse en cuenta el tratamiento que se da.

A temperatura ambiente (25°C) con agitación por 1 día, con base a los resultados obtenidos, no es lo suficientemente exhaustiva para extraer en su totalidad al lupeol. Por tanto, no permite la extracción completa y solo lo hará parcialmente dependiendo del disolvente empleado y el tipo de planta, es decir, para el disolvente hexano la planta que presentó mayor extracción fue acoque con un 3.51%, seguido de la hoja de palo mulato con un 2.90%, mientras que el mínimo fue de 0.97% por parte de la hoja de romero. El porcentaje extraído con acetona aumenta considerablemente para la hoja de romero con un 6.17% debido a que puede haber más compuestos que sean polares y la planta que presentó un porcentaje menor fue la hoja de nanche con un 1.97%, pensándose que existen compuestos no afines a la acetona, finalmente en la extracción realizada con etanol las plantas que presentaron un porcentaje mayor de extracción son: la corteza de tamarindo y la hoja de palo mulato con un 5.74 y 5.08% respectivamente, el menor porcentaje lo obtuvo de nuevo la hoja de nanche con 0.48%.

Con el método de Soxhlet se observa una mayor cantidad de extracto, esto se explica porque durante la extracción, lo único que se calienta es el disolvente y durante la condensación del disolvente al caer en la muestra, este cae frío, por tanto hay una mayor eficiencia debido a que el número de extracciones es mayor que a temperatura ambiente, también es tomando en cuenta el tiempo, a pesar de que fue



tratado durante 18 h, se puede comparar con un menor tiempo respecto a temperatura ambiente.

La planta que presentó mayor porcentaje de extracción en este tratamiento fue la hoja de romero con un 35.62% con el disolvente etanol, eso habla de la cantidad de compuestos polares que tiene dicha planta y la planta con menor porcentaje, fue de 2.39% correspondiente a la corteza de tamarindo, sin embargo, como se muestra en la tabla 6, el tratamiento con este sistema facilita la extracción haciendo que el rendimiento aumente.

Con el tratamiento por sonicación, la muestra suspendida en el disolvente y expuesta a ondas de sonido de alta frecuencia (18 a 20 KHz.) por un tiempo (20 minutos). En términos generales la extracción fue baja comparado con los otros dos métodos y con los disolventes hexano y acetona para tres plantas (acoque, hoja de nánche y corteza de tamarindo), sin embargo para hoja de palo mulato y hoja de romero la extracción con estos disolventes fue más efectiva, por otro lado el etanol fue el que mayor porcentaje de extracción tuvo con respecto a la acetona y hexano para este método de extracción, obteniéndose un intervalo de 4.75-7.15% alto en comparación con el método de temperatura ambiente con el mismo disolvente.

III.5.IV. Análisis cuantitativo: Cuantificación de lupeol

La combinación de técnicas cromatográficas como TLC y CG complementadas con detección EM y HPLC con detección UV y EM debe ser empleada para la determinación de triterpenos en los extractos de plantas. (Martelanc, 2009).

La cuantificación de lupeol se realizó por cromatografía de gases (las características del método, se encuentran descritas en la metodología), obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 7.



Tabla 7. Concentración de lupeol en mg/100g de planta seca. Los datos representan los promedios de los duplicados, C.V \leq 10%

Planta de estudio	Disolvente	Temperatura ambiente	Soxhlet	Sonicación
Hoja acoque	Hexano	10.83 \pm 1.56	4.45 \pm 0.25	2.31 \pm 0.17
Hoja Palo Mulato		7.47 \pm 0.42	0.72 \pm 0.17	0.47 \pm 0.06
Hoja de Nánche		5.76 \pm 0.86	8.92 \pm 1.24	2.66 \pm 0.26
C. de Tamarindo		0.26 \pm 0.02	1.77 \pm 0.23	0.88 \pm 0.03
Hoja acoque	Acetona	5.40 \pm 0.33	3.56 \pm 0.11	5.54 \pm 0.06
Hoja Palo Mulato		0.57 \pm 0.03	0.63 \pm 0.00	0.71 \pm 0.01
Hoja de Nánche		5.62 \pm 1.15	7.79 \pm 0.05	8.70 \pm 0.05
C. de Tamarindo		0.40 \pm 0.00	2.30 \pm 0.19	1.10 \pm 0.01
Hoja acoque	Etanol	3.62 \pm 0.13	4.70 \pm 0.25	4.64 \pm 1.06
Hoja Palo Mulato		1.15 \pm 0.07	5.43 \pm 0.01	1.41 \pm 0.04
Hoja de Nánche		6.48 \pm 0.38	12.71 \pm 0.05	10.50 \pm 2.36
C. de Tamarindo		2.45 \pm 0.25	8.83 \pm 1.16	ND

ND = no detectable o menor al límite de detección del equipo.

La cantidad de lupeol obtenida de cada tratamiento fue variable. Los resultados mostrados en la tabla 6 no muestran relación alguna con la tabla 7, debido a que, en la tabla 6 los extractos son crudos, es decir, contienen todos los compuestos presentes en esa planta, en la tabla 7 solo se muestra la concentración que refiere al lupeol que existe en cada planta, descartando los demás compuestos.

Para determinar las condiciones óptimas de extracción por tecnologías limpias, para éste triterpeno pentacíclico, se realizó un estudio estadístico, para concluir si existe diferencia significativa entre los tratamientos usados y los disolventes empleados de cada una de las plantas para la obtención de lupeol.

En la Tabla 8, se muestra el análisis estadístico realizado con un programa (STATGRAPHICS Plus) en el cual se hicieron las ANOVAS correspondientes para determinar cuál es el mejor método de extracción y disolvente.



Tabla 8. Concentración de lupeol en mg/100g de planta seca. Los datos representan los promedios de los duplicados, C.V \leq 10%. Las letras a, b, c indican diferencia significativa entre las muestras de un bloque y x, y, z indican diferencia significativa entre los resultados de cada fila.

Muestras	Disolvente	Tratamiento		
		Temperatura ambiente	Soxhlet	Sonicación
		mg de lupeol/100g planta seca		
Hoja Acoque	Hexano	b 10.83 \pm 1.56 y	b 4.45 \pm 0.25 x	a 2.31 \pm 0.17 x
	Acetona	a 5.40 \pm 0.33 y	a 3.56 \pm 0.11 x	b 5.54 \pm 0.06 y
	Etanol	a 3.62 \pm 0.13 x	b 4.70 \pm 0.25 x	b 4.64 \pm 1.06 x
Hoja Palo Mulato	Hexano	b 7.47 \pm 0.42 y	a 0.72 \pm 0.17 x	a 0.47 \pm 0.06 x
	Acetona	a 0.57 \pm 0.03 x	a 0.63 \pm 0.00 x	b 0.71 \pm 0.01 y
	Etanol	a 1.15 \pm 0.07 x	b 5.43 \pm 0.01 z	c 1.41 \pm 0.04 y
Hoja de Nánche	Hexano	a 5.76 \pm 0.86 y	a 8.92 \pm 1.24 z	a 2.66 \pm 0.26 x
	Acetona	a 5.62 \pm 1.15 x	a 7.79 \pm 0.05 y	b 8.70 \pm 0.05 y
	Etanol	a 6.48 \pm 0.38 x	b 12.71 \pm 0.05 y	b 10.50 \pm 2.36 x,y
Corteza de Tamarindo	Hexano	a 0.26 \pm 0.02 x	a 1.77 \pm 0.23 z	b 0.88 \pm 0.03 y
	Acetona	a 0.40 \pm 0.00 x	a 2.30 \pm 0.19 z	c 1.10 \pm 0.01 y
	Etanol	b 2.45 \pm 0.25 y	b 8.83 \pm 1.16 z	α = 0.01

El análisis estadístico permitió diferenciar significativamente la cantidad de lupeol para cada muestra, dependiente del tratamiento y del disolvente empleado.

A continuación se analizan los datos para cada uno de los bloques (letras a, b, c.) y para cada fila (x, y, z). Para la planta de acoque, con el tratamiento a temperatura ambiente se aprecia que no existe diferencia significativa en la extracción con acetona y etanol y claramente se observa que el hexano extrajo mejor el lupeol en una cantidad promedio de 10.83 mg por cada 100 g de planta seca, en cambio el tratamiento por Soxhlet no diferenció entre la extracción con hexano y etanol, pero sí con acetona, a pesar de obtenerse cantidades pequeñas en un orden no mayor a 5 mg; para el tratamiento con sonicación tampoco se logró obtener un disolvente que extrajera al lupeol, puesto que para acetona y etanol no existe tal diferencia, sin embargo el hexano obtuvo un 2.31 mg de lupeol por cada 100 g de esta planta, por tanto para este bloque el mejor tratamiento fue temperatura ambiente con hexano.



Las hojas de palo mulato sometidas a temperatura ambiente muestran que el hexano sigue siendo el disolvente ideal para la extracción de lupeol, sin mostrar diferencia entre los disolventes acetona y etanol. Respecto a la extracción por Soxhlet el etanol mostró un mejor rendimiento de extracción siendo de 5.43% en comparación con los extractos de hexano y acetona que no superaron el 8%. El método de sonicación para esta planta fue totalmente diferente, es decir, se encontró diferencia significativa para cada uno de los disolventes, sin embargo no se puede concluir cual es el mejor disolvente de extracción para este método a pesar de haber obtenido 1.41 mg de lupeol por cada 100 g de esta planta. Por tanto para esta planta las condiciones de extracción son iguales que la planta de acoque.

En las hojas de nanche se obtuvieron rendimientos del 5% cuando fue tratado por temperatura ambiente sin mostrar diferencia en los disolventes de extracción, por tanto puede decirse que puede usarse cualquiera de los tres disolventes para este tratamiento, sin embargo, cuando se sometió a calor por el método de Soxhlet las cantidades de lupeol aumentaron considerablemente sin mostrar diferencia entre el hexano y la acetona, pero si con el disolvente etanol con el cual se obtuvieron un 12.71 mg de lupeol por cada 100 g de esta planta.

El uso de la sonicación para esta planta indicó que el hexano no extrajo suficiente lupeol y que los disolventes acetona y etanol pueden ser utilizados con este método de extracción obteniendo una buena cantidad de lupeol. Los mg obtenidos para esta planta son de mayoritariamente de 5.62 a 12.72. En el estudio realizado se perfila para ser una de las plantas con mayor contenido de lupeol, hasta el momento. El disolvente con el que se obtienen mejores rendimientos es el etanol y el mejor método es Soxhlet.

La corteza de tamarindo fue la planta que presentó menor cantidad de lupeol respecto a los tratamientos de temperatura ambiente y Soxhlet, sin mostrar diferencia entre los disolventes hexano y acetona, en cambio, el etanol extrajo 8.83 mg de lupeol por 100 g de planta seca, con el método de Soxhlet en comparación con



temperatura ambiente y sonicación. Por ende el mejor tratamiento y disolvente fue Soxhlet y etanol respectivamente.

La planta de romero presentó una menor cantidad de lupeol, lo cual se reportara como menor al límite de detección del cromatógrafo de gases. Al momento de ser analizada por el cromatógrafo ésta planta indicó la presencia de β -amirina, ya que la señal y el área que mostró estaba bien definida en un tiempo de retención de 27.44 - 27.72 min. Al ser comparada con un estándar de β -amirina.



CONCLUSIONES

- Se identificó que en las hojas de acoque, nanche, palo mulato y en la corteza de tamarindo, se presenta lupeol en diferentes concentraciones.
- Se identificó lupeol y α , β -amirina en las plantas estudiadas, de forma cualitativa utilizando TLC impregnada con nitrato de plata y la utilización de placas de fase reversa (C18).
- Se logró obtener el estándar de tres plantas, utilizando técnicas cromatográficas, los resultados son los siguientes: 9.2 mg obtenidos de la corteza de tamarindo, con un 50% de pureza; 200 mg de la planta limoncillo con un 27% de pureza y 274 mg de la hoja de nanche, sin determinar la pureza.
- Con los procedimientos de extracción utilizados se obtuvo lupeol en diferentes concentraciones, lo cual también estará en función de la planta que se estudie; para la hoja de acoque y palo mulato, el mejor tratamiento y disolvente fue temperatura ambiente y hexano respectivamente;
- Para la hoja de nanche el mejor método fue: Soxhlet y etanol, sin embargo, no se descarta el uso de hexano.
- La corteza de tamarindo presentó 8.84 mg lupeol/100 g planta seca, el mejor tratamiento fue Soxhlet y el disolvente etanol.
- La hoja de nanche presenta mayor contenido de Lupeol 12.72 mg/100 g planta seca, seguido de la hoja de acoque con 10.83 mg/100 g de planta seca, posteriormente corteza de tamarindo 8.84 mg/100 g de planta seca y finalmente palo mulato con 7.50 mg/100 g de planta seca, cada una en las condiciones óptimas correspondientes.
- Todas las plantas de estudio presentan β -amirina y en la hoja de romero la concentración es mayor que la concentración de lupeol.



Apéndice A. Plantas de estudio.

***Tamarindus indica* o tamarindo.**

El tamarindo es un árbol de crecimiento lento y larga vida que, en condiciones favorables, puede alcanzar los 30 m de altura. El árbol es nativo de África. Las hojas, siempre verdes, son pinadas, de 7.5 a 15 cm, compuestas por 10 a 20 pares de hojuelas oblongas. Las flores, de color amarillo con tonalidades naranjas forman pequeños racimos. Los frutos son vainas de color canela que contienen cada uno entre 5 y 8 semillas, llenas de una pulpa rojiza más o menos ácida y dulce.

Tamarindus indica es un miembro importante de los Leguminosae o familia de las leguminosas y de Caesalpinioideae subfamilia de las casias, tiene una sinonimia como *Tamarindus occidentalis* Gaerth, *Tamarindus officinalis* Hook y *Tamarindus umbrosa* Salisb. (Ocampo, 1995).

Descripción

Forma. Árbol de tamaño mediano a grande, vulnerable, perennifolio bajo óptimas condiciones o subcaducifolio, de 10 a 25 m (hasta 30 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 1 m o más.

Copa / Hojas. Copa redondeada, grande, extendida y abierta, con una cobertura de 6 a 10 m.

Follaje denso o disperso, plumoso en apariencia y ofreciendo una sombra atractiva. Hojas alternas, paripinnadas, corto pecioladas, de 5 a 15 cm de largo; con 10 a 20 pares de pinnas enteras, oblongas, con la base oblicua y el ápice redondeado, casi sésiles, con longitud fluctuante de 0.3 a 2.5 cm y un ancho de 2 a 8 mm, de color verde pálido.

Tronco / Ramas. Tronco corto, derecho y grueso. Ramas ampliamente extendidas, con las ramillas en forma de zigzag (pubescentes cuando jóvenes).



Figura 16. Árbol de Tamarindo



Corteza. *Externa* con tonalidades que van desde grises hasta pardo oscuros (tostado o café).

Composición química del tamarindo

Contiene minerales y vitaminas que son indispensables para el desarrollo del humano, entre ellas la vitamina B3 (niacina).

Diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallo, semillas y fruto han sido ampliamente utilizadas como medicamentos en la India y África. La planta es de gran importancia por su contenido de metabolitos secundarios y fitoquímicos entre los que destacan:

Acido tartárico, palmítico, oleico, linoleico y eicosanoico, β -amirina, campesterol, β -sitosterol, Lupeol, lupenona. (Shehla, *et al*; 2007)

***Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth o nanche**

Nombres comunes en México. Changunga, Changungo, Chengua (Mich.); Chi (l. maya, Yuc.); Huizaa (l.zapoteca, Oax.); Mami-hña (l. chinanteca,Oax.); Nance, Nanche, Nanchi, Nanantze (Gro.); Nance agrio (Gro.,Tab.); Nancis; Nanche amarillo(Pue.); Nanche dulce (Oax.); Nandzin (l. zoque, Chis.); Nantzincuéhuil, Nanzinxócotl (l. náhuatl).

Descripción

Forma. Árbol pequeño y torcido o arbusto perennifolio (caducifolio en bosques secos), de 3 a 7 m (hasta 15m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 30 cm.

Copa / Hojas. Copa amplia y abierta o irregular.

Hojas alargadas, decusadas, simples; láminas de 5 a 15 cm de largo por 2 a 7.5 de ancho, elípticas



Figura 17. Árbol de Nánche



con el margen entero; verde oscuras y casi lisas en el haz y verde amarillentas grisáceas pubescentes en el envés.

Tronco / Ramas. Tronco tortuoso. Ramas ascendentes y frecuentemente ramificadas desde el suelo.

Corteza. *Externa* escamosa desprendiéndose en pedazos rectangulares, gris parda a moreno clara. *Interna* de color crema rosado, cambiando a pardo-rosado, fibrosa, amarga. Grosor total: 12 a 25 mm.

Flor(es). En racimos o panículas estrechas terminales de 5 a 15 cm de largo, pubescentes; flores actinomorfas, de color amarillo-rojizo, de 1.5 cm de diámetro; cáliz verde, con 6 a 10 glándulas sésiles; pétalos 5, redondeados.

Fruto(s). En infrutescencias péndulas de 10 a 15 cm de largo; drupas globosas, de 1.7 a 2 cm de diámetro, amarillentas a ligeramente anaranjadas, con una abundante carne agrídulce rodeando a un hueso grande y duro. Una semilla por fruto.

Usos

Colorantes [fruto]. La cáscara del fruto produce un tinte de color castaño claro que se usa para pigmentar tejidos de algodón (Guatemala).

Combustible [madera]. Leña y carbón. Buenas características energéticas.

Comestible (fruta, bebidas, dulces) [fruto]. Los frutos frescos son muy apreciados. Se consumen crudos, pero también son materia prima de bebidas refrescantes, licores, jaleas, dulces, nieves, conservas.

Rico en vitamina C (90-240 mg/100 g).

Construcción [madera]. Su madera dura y flexible, fuerte y pesada se utiliza en la construcción rural y elementos estructurales. La madera es de color amarillo, sin olor ni sabor de textura fina, lustre mediano e hilo recto. Se emplea en muebles, gabinetes, pisos, torneados, puertas, marcos para puertas y ventanas, molduras, marcos de cuadros.

Curtiente [corteza]. Corteza rica en taninos (28.6 %), se emplea en la curtiduría.

Medicinal [corteza, fruto]. La parte que más se usa en la medicina popular es la corteza, ya que por sus propiedades astringentes se emplea en cocimiento como antidiarréico (se toma como agua de uso); también se utiliza para infecciones en la



matriz e inflamación en los ovarios y otros tipos de desórdenes digestivos como disentería y dolor de estómago. Son muy conocidas las propiedades del nanche para curar afecciones de la piel como sarna, salpullido y heridas, mediante el uso de la cocción hecha con éste y trozos de corteza de cedro; además ha resultado eficaz para afianzar las encías, aliviar el dolor de cintura, resfriado y para las mordeduras de víbora. Corteza, fruto (jugo): astringente. Toda la planta: asma, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, desinflamante, disentería, diarrea, antifebrifuga. Tallo, raíz (hervidos): tienen actividad sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermis*, *S. Pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*. (CONABIO, 1822).

***Rosmarinus officinalis* o romero**

Descripción

El romero es un arbusto leñoso de hojas perennes muy ramificado, puede llegar a medir 2 metros de altura.

Lo encontramos de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos (aunque la borra se pierde al crecer) y tallos añosos de color rojizo y con la corteza resquebrajada.

Las hojas, pequeñas y muy abundantes, presentan forma lineal. Son opuestas, sésiles, enteras, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vello. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos.

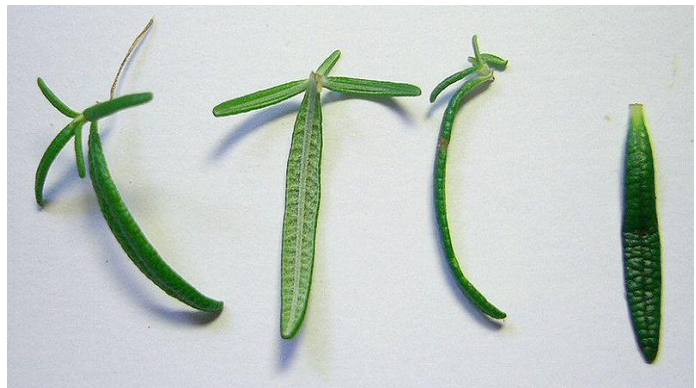


Figura 18. Hojas de romero



Las flores son de unos 5 mm de largo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente.

El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco.

Composición química

Ácidos fenólicos (caféico, clorogénico, rosmarínico)

Flavonoides (derivados del luteol y del epigenol)

Aceite esencial (pineno, canfeno, borneol, cineol, alcanfor, limoneno) 1.2 a 2%

Diterpenos (carnosol, rosmanol, rosmadial)

Ácidos triterpénicos (ácido ursólico) 2 a 4%

Alcoholes triterpénicos (alfa y beta-amirina, betulósido)

Usos

Del romero se utilizan sobre todo las hojas y a veces, las flores. Es una planta rica en principios activos. Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de romero, que se utiliza para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias. Se utiliza en fricciones como estimulante del cuero cabelludo (alopecia).

La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el hígado y para atajar los espasmos intestinales. Debe tomarse antes o después de las comidas. El humo de romero sirve como tratamiento para el asma. El alcanfor de romero tiene efecto hipertensor (sube la tensión) y tonifica la circulación sanguínea. Por sus propiedades antisépticas, se puede aplicar por decocción sobre llagas y heridas como cicatrizante. Además es una excelente planta de interior debido al agradable aroma que desprende.



***Bursera simaruba* (L.) Sarg o palo mulato.**

Nombres comunes en México. Cohuite (Ver.); Copalillo (Pue.); Chaca (Tamps., Ver., Yuc.); Chachah, chakah, Hukúp (l. maya, Yuc.); Chacaj (l. tojolabal, Chis.); Lonsha-la-ec (l. chontal, Oax.); Tzaca (l. huasteca, S.L.P.); Tusun, Ta'sun (l. totonaca, Pue.); Yala-guito (l. zapoteca, Oax.); Chicohuiste, Chocohuite, Chocogüite, Chohuite (Chis.); Jiote, Jiote colorado, Quiote (Sin.); Piocha Tamps.); Tzaca (l. huasteca, S.L.P.); Mulato, Songolica, Zongolica (Oax.); Palo colorado (Sin.); Palo jiote (Ver., Tab., Oax.); Palo mulato (Nay., Chis., Tab., Oax.); Palo retino, Suchicopal (Tab.).

Descripción

Forma. Árbol resinoso, caducifolio de 5 a 20 m (hasta 35 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 40 a 80 cm (hasta 1 m).

Copa / Hojas. Copa irregular y dispersa (follaje ralo). Cuando el árbol crece en terrenos abiertos, sus ramas se extienden y forman una copa ancha y abierta. Hojas compuestas,



Figura 19. Palo mulato

alternas, con 3 a 13 folíolos lanceolados u oblongos a obovados o elípticos, de 4 a 9 cm de largo por 1.8 a 3.5 cm de ancho, margen entero, membranáceos a cartáceos de color verde oscuro y a menudo brillantes en el haz.

Tronco / Ramas. Tronco con una ligera y característica torcedura en forma de "S" en su parte media o superior, con pocas ramas gruesas y torcidas. El tronco es fornido y con frecuencia se bifurca a 2 m del suelo.

Contrafuertes insinuados en la base, 3 a 6 por tronco.

Corteza. Corteza lisa, rojiza y se despega en jirones (exfoliante). Durante la época de sequía el árbol continúa su actividad fotosintética mediante los cloroplastos localizados en la corteza expuestos a la luz una vez desprendida la corteza.



Usos

Adhesivo [exudado (resina)]. La resina se usa como sustituto de la cola y como cemento para pegar piezas rotas de loza, vidrio y porcelana.

Aromatizante [exudado (resina)]. Exudado y frutos aromáticos. La resina aromática es conocida como “chibou”, resina de “cachibou” o resina “gomart”.

Hervida en agua y endurecida se usa a manera de copal como incienso.

Artesanal [madera]. La madera es blanda y ligera por lo que es muy apreciada para la elaboración de artesanías, juguetes y artículos torneados.

Combustible [madera]. Leña y carbón. La madera tiene un alto contenido de humedad pero cuando está bien seca se usa como leña de ignición por su alta flamabilidad. El peso específico de la leña es de 0.30 a 0.40. Construcción rural (viviendas). Construcciones interiores. No es apropiada para uso externo. Especie maderable con posibilidades comerciales. Nombre común: Chacán mulato. Madera suave, su gravedad específica es de 0.32 g/cm³. Se puede trabajar con facilidad y se le puede dar un fino acabado. Uso potencial: cocinas integrales, acabados de interiores, suelas de zapatos, muebles rústicos, cajas y embalajes, postes, cercas, chapa, triplay, cerillos, construcción de canoas, centros para madera terciada, abatelenguas, tableros aglomerados, palillos, guacales, tablas, toneles, carpintería, ebanistería en genera y patrones debido a que su estabilidad dimensional es excelente.

La madera contiene mucha agua, almidones y azúcares por lo que se mancha y se pudre enseguida si no se cierra y seca rápidamente. Es poco durable expuesta a la intemperie.

Industrializable [madera, exudado (resina)]. Pulpa para papel y fabricación de barnices y lacas.

Insecticida [exudado (resina)]. La resina aromática exudada de la corteza se usa para repeler insectos.

Medicinal [fruto, flor, hoja, corteza]. La infusión del cocimiento de la madera se utiliza para bajar de peso.

Fruto, flor: antidiarréico, mordedura de serpiente.



Planta: resfriado, disentería, diarrea, fiebre, hongos en la piel, mal de viento, antimicótica, purgante y sudorífica.

Hoja: tosferina y sarampión, antiasmático, acelerador de parto, encías infectadas, evacuaciones con sangre, diurética, amigdalitis, comezón, úlceras (enfermedades venéreas), antiinflamatorio (rodillas), para fiebre intestinal, analgésico (dolor de cabeza, estómago y muelas).

Corteza: antipirético (calentura), hemorragia nasal, dolor muscular, remedio para el hipo, limpieza de heridas, inflamación de ovarios, picadura de araña hemorragia nasal, dolor muscular.

Melífera [flor]. Apicultura. Proporcionan propóleos para la colmena. (CONABIO, 1890).

***Pseudobombax ellipticum* o acoque.**

Es nativa del sur de México, El Salvador, Guatemala y Honduras, y se ha introducido en el Caribe y las islas de Hawai y el sur de la Florida. Es un árbol que puede alcanzar 18 m de altura y 1.3 m de diámetro. Sus ramas están cerca de la base de la madre. Es un árbol de hoja caduca, con tallos suculentos y hojas de que son palmeadas compuestas de cinco folíolos. Las especies crecen bien en hábitats secos y rocosos o suelos pobres y es la sombra intolerante. La madera de *P. ellipticum* se utiliza para leña y en el de artesanía de tallado de platos. Las semillas contienen hidratos de carbono y puede ser consumida si tostado. En El Salvador, el té de la las flores se utiliza para enfermedades gastrointestinales y el té de la corteza fresca se utiliza para tratar la diabetes. Las fibras finas de los frutos de



Figura 20. *Pseudobombax Ellipticum*



varias especies de la familia Bombacaceae, incluyendo *P. ellipticum* se utilizan para rellenar almohadas y colchones. (Navarrete y Orellana, 1982).

Nombres comunes para México. Ceiba, Ceibo (Oax.); Pochote; Cuypishtin (l. popoluca, Ver.); Li-misgash- pupi (l. chontal (Oax.); Pimm, Yaaxché (l. maya, Yuc.); Pishtin, Pochotillo (Chis.); Póchotl (l. náhuatl); Púchuti (l. totonaca, Ver.); Tunuum (l. mixteca, Oax.); Yaga-xeni (l. zapoteca, Oax.); Unup (l. huasteca, S.L.P.).

Usos

Artesanal [madera]. Se emplea en la elaboración de artículos torneados, instrumentos musicales y juguetes.

Combustible [semilla, madera]. Leña, carbón. El aceite no secante se utiliza localmente con fines de iluminación.

Comestible (verdura, aceite) [semilla, hoja, fruto, flor]. La semilla contiene de 30 a 40 % de un aceite que se utiliza industrialmente para fabricar margarinas. La semilla es comestible cocida o tostada. Las hojas, flores y frutos tiernos suelen comerse cocidos.

Cosmético / Higiene [semilla (aceite)]. El aceite se usa para fabricar jabones.

Fibras [fruto]. La fibra algodonosa que rodea las semillas (kapok) se utiliza en la industria como aislante térmico y acústico en cámaras frigoríficas y aviones. Se emplea para rellenar colchones, almohadas, salvavidas, chamarras, bolsas de dormir, flotadores. El kapok es quebradizo e inflamable y no se presta para hilado ni tejido. Cada fibrilla mide de 0.8 a 3 cm de largo, forman pequeño tubos de aire revestidos de cera, haciéndola resistente, elástica, ligera y repelente al agua. Tiene un poder de flotación 5 veces mayor que el corcho y 8 veces más ligera que el algodón.

Forrajero [hoja, vástago, fruto, semilla]. La pasta residual que queda después de extraer el aceite a las semillas, se utiliza como alimento para el ganado; es muy semejante a la lanolina, pero inferior a la pasta de algodón.

Industrializable [semilla]. El aceite se usa como lubricante. Uso potencial: pulpa para papel, papel secante.



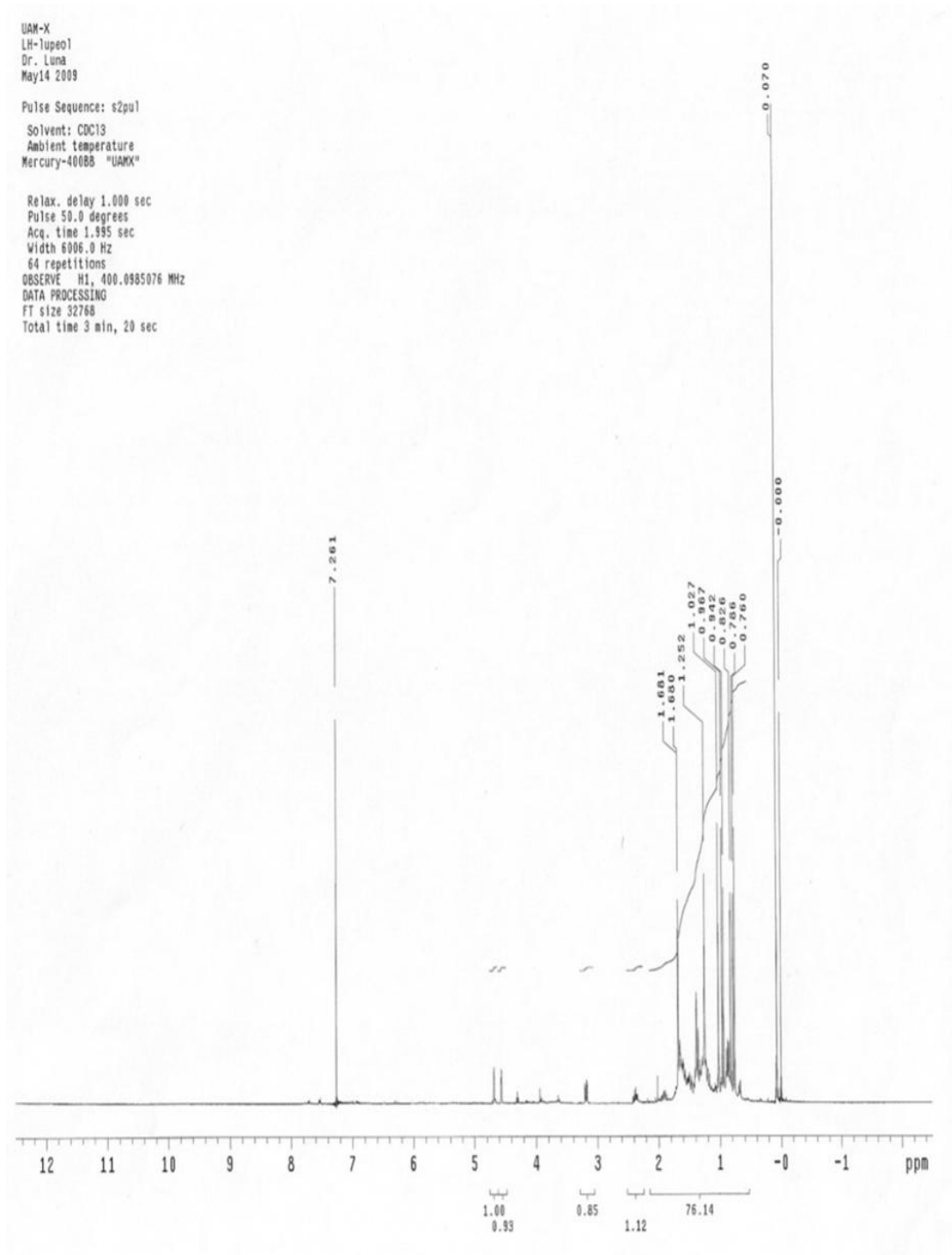
Maderable [madera]. Especie maderable con posibilidades comerciales. Nombre común: Ceiba. La madera suave y liviana se utiliza para fabricar canoas, balsas, salvavidas, acuaplanos, aeromodelos, flotadores, centros para madera terciada, cajas de empaque, acabados de interiores, lápices, chapa, boyas, madera rústica, cabos para cerillos, maquetas, aisladores de sonidos y vibraciones. Madera ligera no duradera.

Medicinal [corteza, exudado, hoja, tallo]. Corteza: heridas, hidropesía, granos, reumatismo, antiespasmódico, emético y diurético. Exudado (tronco): enfermedades intestinales. Hojas: contienen alcanfor. Tallo: antiinflamatorio de postemas y tumores, dolor de muelas. Flor (cocción): emoliente. Planta: quemaduras, salpullido.

Melífera [flor]. Apicultura. Clasificado como planta melífera de gran valor. (CONABIO, 1791)

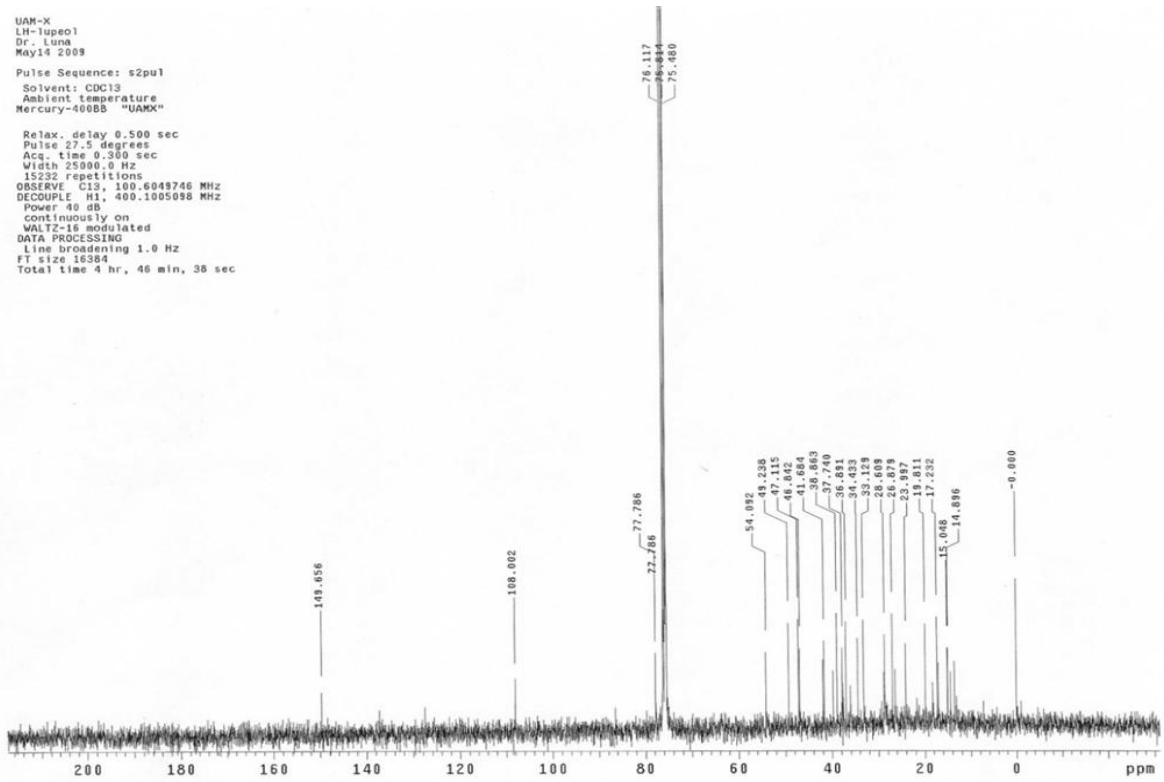


Apéndice B. Espectros de RMN, de la caracterización de lupeol obtenido de la corteza de Tamarindo.

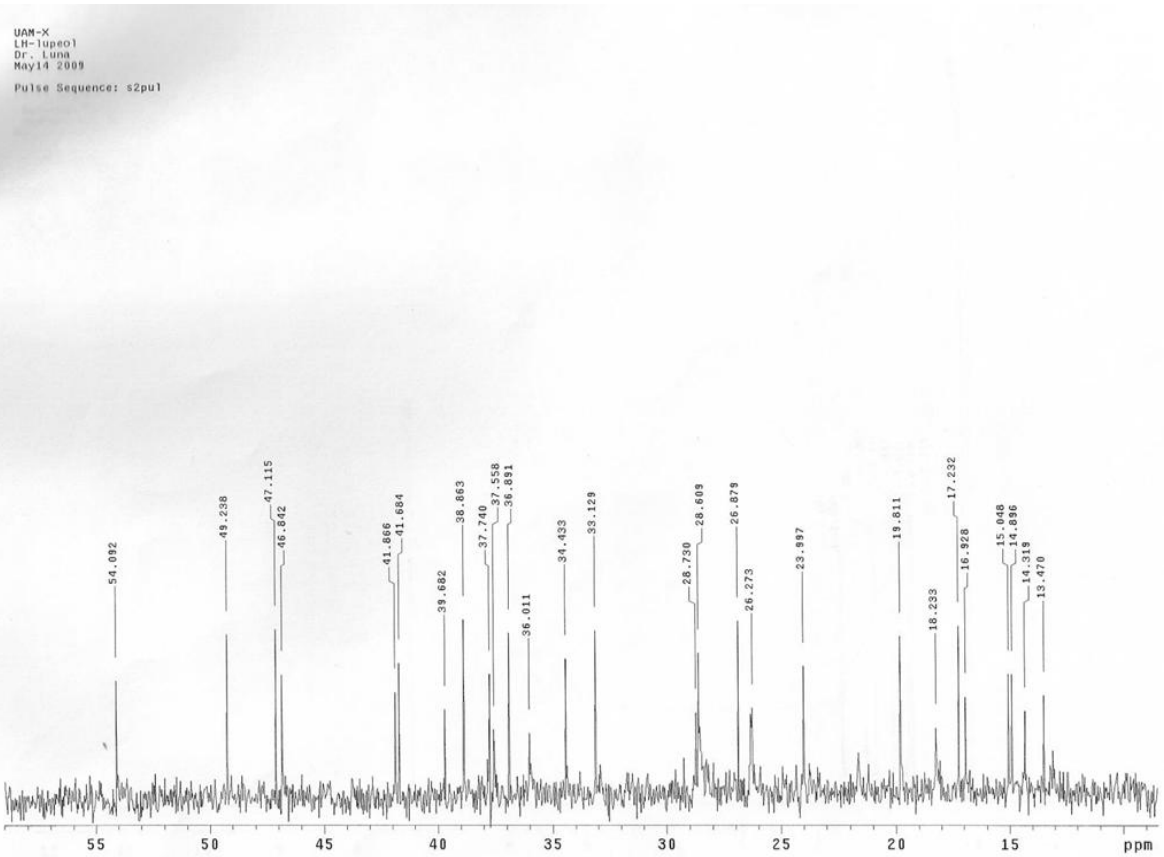


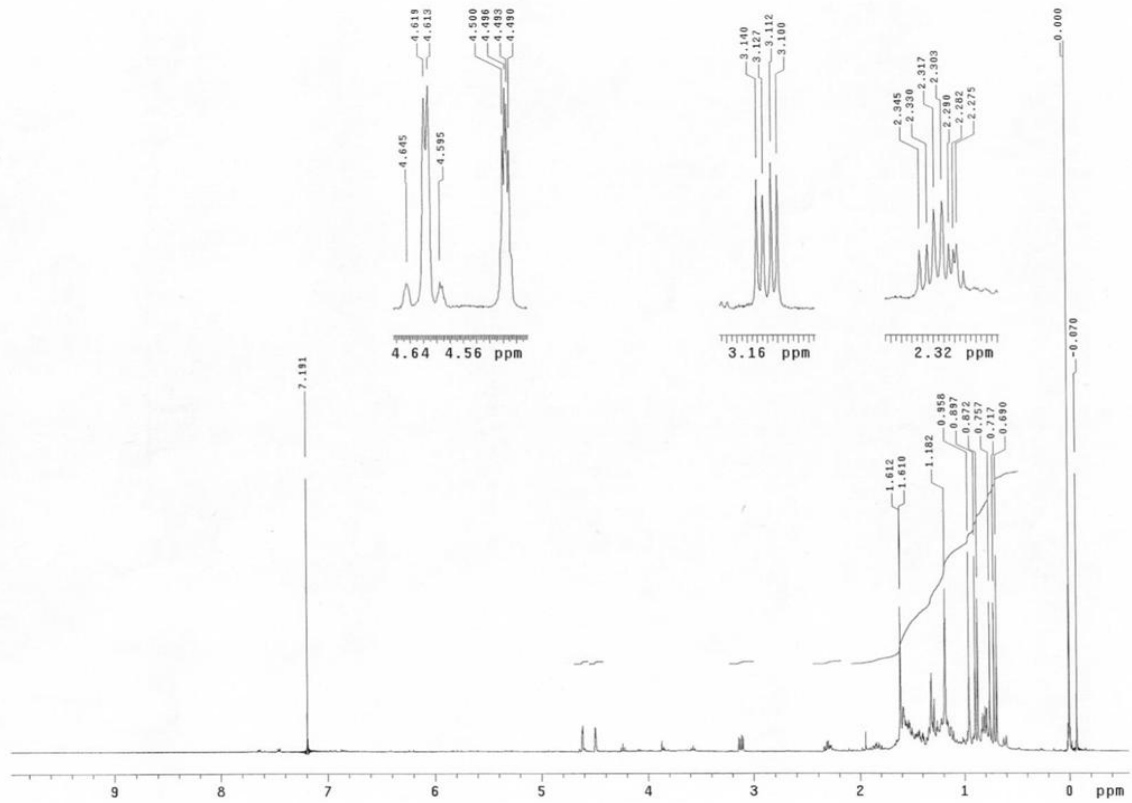


UAM-X
LH-lupeol
Dr. Luna
May15 2009
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-400BB "UAMX"
Relax. delay 0.500 sec
Pulse 27.5 degrees
Acq. time 0.300 sec
Width 25900.0 Hz
15232 repetitions
OBSERVE C13, 100.6049746 MHz
DECOUPLE H1, 400.1005098 MHz
Power 40 dB
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 16384
Total time 4 hr, 46 min, 38 sec

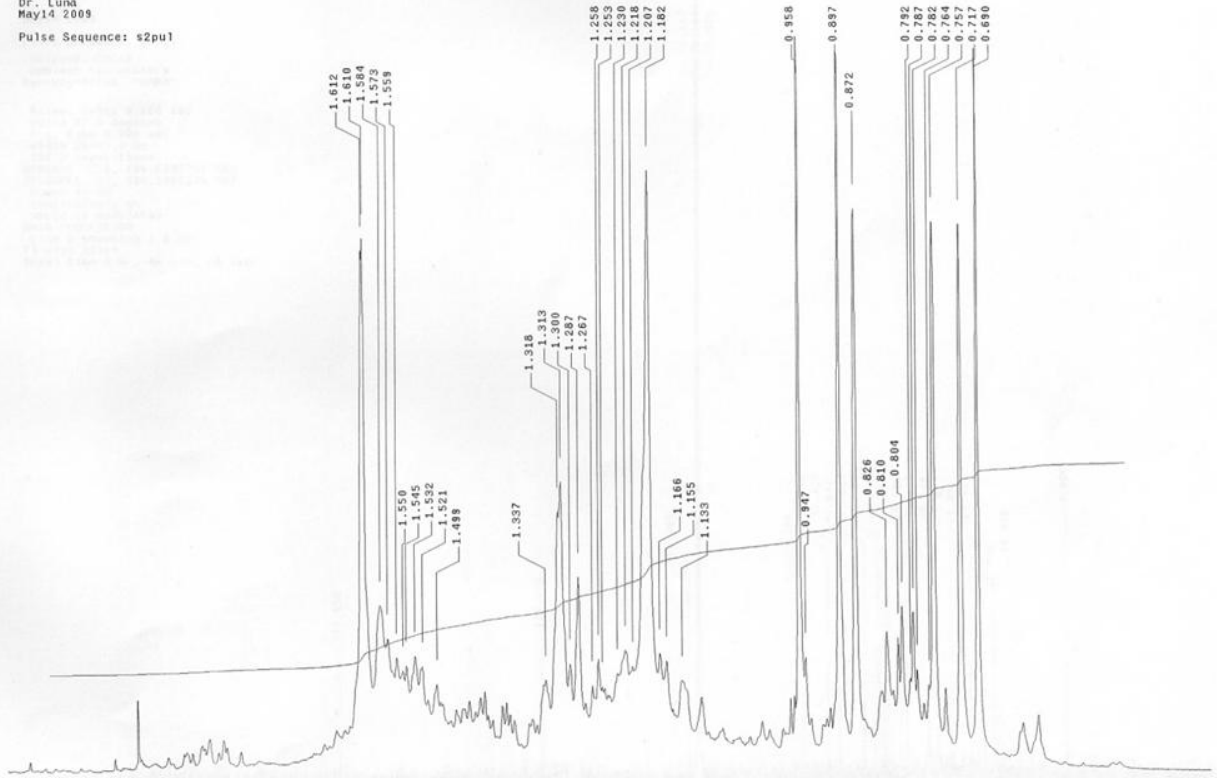


UAM-X
LH-lupeol
Dr. Luna
May14 2009
Pulse Sequence: s2pul



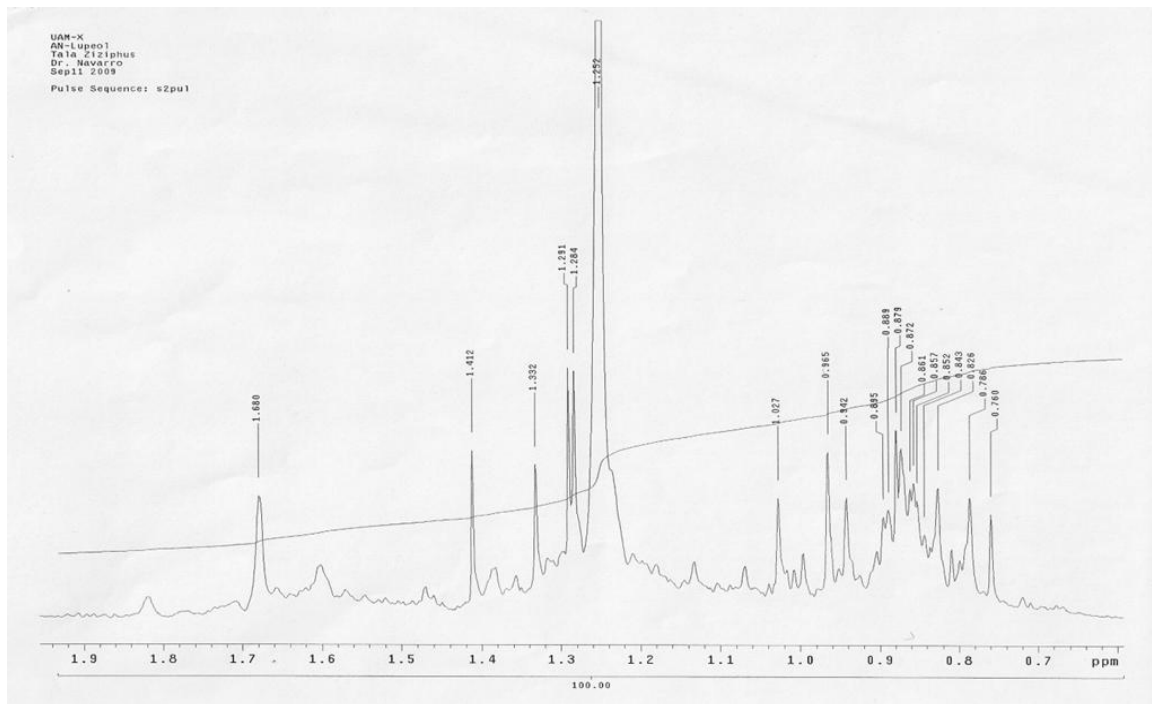
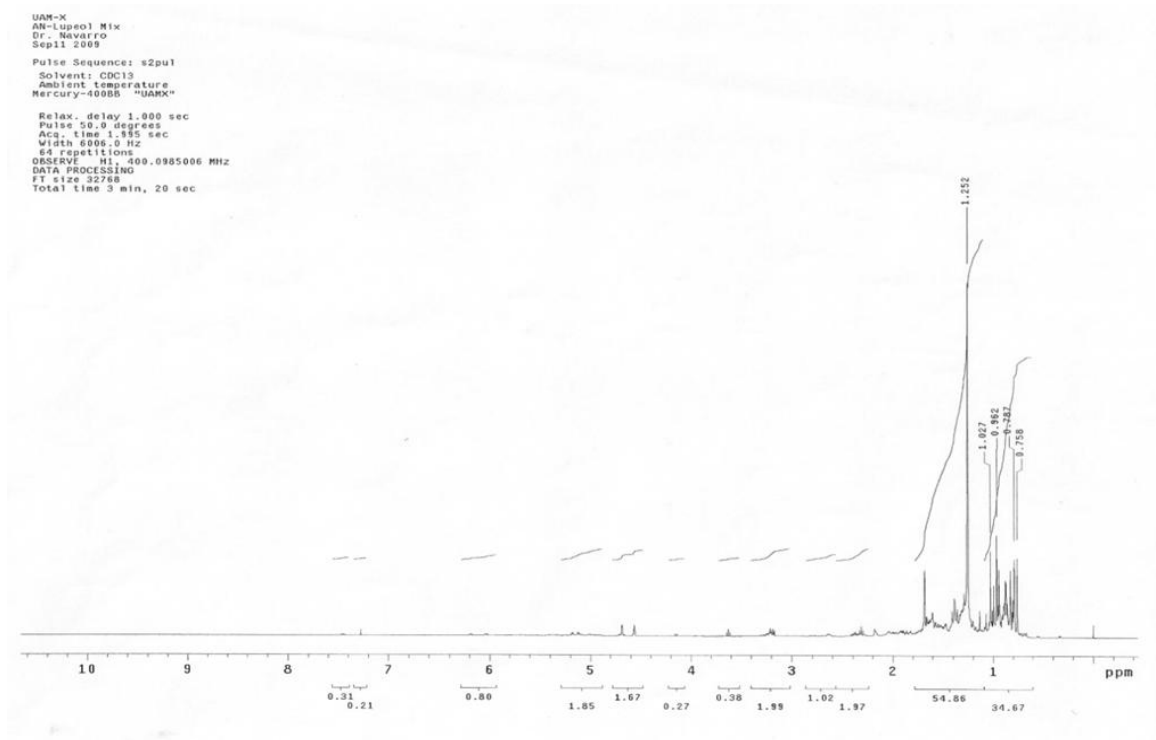


UAM-X
LH-tupeol
Dr. Luna
May14 2009
Pulse Sequence: s2pu1





Apéndice C. Espectros de RMN, de la caracterización de lupeol obtenido de *Ziziphus amole* o limoncillo.

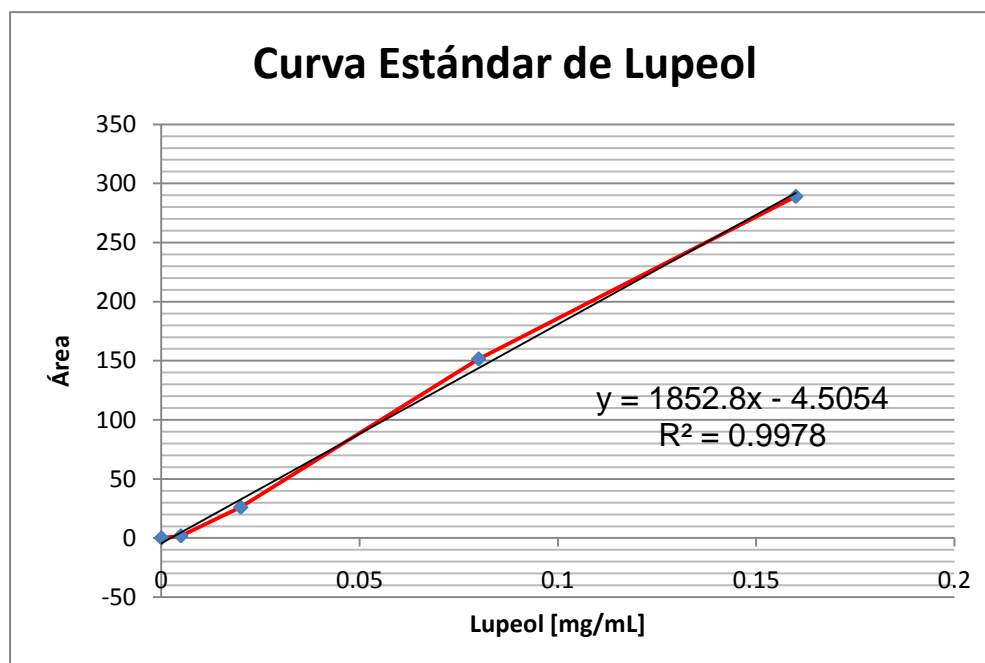




Apéndice D. Curva Patrón de Lupeol (SIGMA-ALDRICH CAS: 545-47-1)

Concentración [mg/mL]	Área **
0	0
0.0049	1.8382
0.0200	25.9873
0.0800	151.5014
0.1600	288.9640

** Los datos representan los promedios de los duplicados.



Condiciones:

- Columna 122-5532 DB-5MS Length (meters) 30; ID (mm) 0.25 Narrowbore; Film (μm) 0.25; límite de temperatura -60°C a 325°C (350°C) J & W Scientific Columns Agilent Technologies. Rampa Temperatura inicial 200°C por un minute, incrementa a $15^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta 260°C y permanece por 5 minutos, vuelve a incrementar a $5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los 300°C y permanece 17 minutos; tiempo total de corrida 35 minutos. Software Chemstations.
Volumen de inyección: $1\ \mu\text{L}$
Tiempo de Retención del lupeol [28.093-28.737]



BIBLIOGRAFÍA

- Alba-Sandoval M. P. y Cuca-Suarez L. E. (2007) Identificación de metabolitos secundarios de *Brosimum rubescens* (moraceae), determinación de actividad antimalárica, *Scientia et Technica*, 33, 128-131.
- Al-Rehaily, A. J., El-Tahir, K., Mossa, J. S., and Rafatullah, S. (2001) Pharmacological Studies of Various Extracts and the Major Constituent, Lupeol, obtained from Hexane Extract of *Teclea nobilis* in Rodents, *Natural Product Sciences*, 7, 76-82.
- American Institute for Cancer Research. (1996) Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment. In Proceedings of the American Institute for Cancer Research's Sixth Annual Research Conference. Washington D.C.
- Araya I. H. and Lutz R. M. (2003) Functional and Healthy Foods, *Revista Chilena de Nutrición*, 30, 8-14.
- Argilés J. M. y López-Soriano F. J. (1988) El cáncer y su prevención. La importancia de la alimentación. Editorial Universitat Barcelona, Barcelona, España. Pp. 13-100
- Aynillan, G. H., Farnsworth N. R. and Persinos, G. J. (1972) Isolation of lupeol from *Crataeva Bentharii*, *Phytochemistry*, 11, 2885-2886.
- CONABIO (1791) publicado en *De Fructibus et Seminibus Plantarum* 2: 244. 1791.
- CONABIO. (1822) publicado en *Nova Genera et Species Plantarum* 5: 149. 1822.
- CONABIO. (1890) publicado en *Garden & Forest* 3: 260. 1890.
- Dillar, C. J. and German B. (2000) Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health Journal, *Science and Food Agriculture*, 1744-1756.
- Gauthier C., (2006) Glycosidation de triterpenes pentacycliques type Lupene et evaluación *in Vitro* de Leur Potentiel anticarcereux, *Tesis Licenciatura*, Universidad de Quebec, 9-10.



- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P. and Darnell J. (1995) Molecular cell Biology. Editorial Scientific American Books, New York, USA, pp 876.
- Mangas-Marin,R., Montes de la Oca-Porto, R., Bello-Alarcón, A. y Nival-Vázquez-Lavin, A. (2008) Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor L.*, *Latin American Journal of Pharmacy*, 27, 747-751.
- Martelanc, M., Vovk, I. and Simonovska. B. (2009) Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1216, 6662-6670.
- Metzger, J. O. and Eissen, M. (2004) Concept son the contribution of chemistry to a sustainable development. Renewable raw materials, *Compters Rendus Chimie*, 7, 569-581.
- Moraes-Lira, W., Vieira dos Santos, F., Sannomiya, M., Martins-Rodrigues, C., Vilegas, W. and Aparecida-Varanda, E. (2008) Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* Assays, *Journal of Medicinal Food*, 11, 111-119.
- Muñoz A. (1997) Cáncer. Genes y Nuevas Terapias. Editorial Helice, Madrid, España, pp. 6-34.
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis C. and Roussis, V. (2007) Lupene tritepenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity, *Molecules*, 12, 1035-1044.
- Navarrete-Tindal N. y Orellana Nómez M. A. (1982) USDA Forest Service, *Species Descriptions*, pp. 664.
- Nielsen S. (1998) Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Ocampo R. A, (1995). *Tamarindus indica L*, *Species Plantarum*, 34, 1756
- Parrotta J. A. (1990) *Tamarindus indica*, LA: U. S. Department of Agriculture 30, 519-521.



- Patocka. J. (2003) Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification, *Journal of Applied Biomedicine* 12,1 -6.
- Pranav K. C., Kulpreet B., and Yogeshwer S. (2008) Lupeol: Connotations for chemoprevention, *Cancer letters*, 263, 1-13.
- Preetha, A., Ajai Kumar B. K., Sundaram, C., Kuzhuvelil B., Harikumar, S. T., Oiki, S. Lai, Bokyoung, S. and Bharat, B. A. (2008) Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes, *Pharmaceutical Research* 25, 2097.
- Romo de Vivar-Romo, A. (2006) Química de la Flora Mexicana, Investigaciones en el Instituto de Química UNAM, Editorial talleres de S y G editores, México, pp. 39, 89, 133.
- Saleem, M. (2009) Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpeno, *Cancer letters*, 4, 33.
- Saleem. M., Kaur, S., Kweon, M., Mustafa-Adhami. V., Afaq, F. and Mukhtar, H. (2005) Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cell via inhibition of Ras signaling pathway, *Carcinogenesis*, 26, 1956.
- Sharapin, N. (2000), Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos, Ed. CAB, Colombia.
- Shehla, I., Iqbal, A., Mohtasheemul, H., Ali, M. S. and Waseemuddin, A. S. (2007) Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tamarindus indica linn*, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 125-127.
- Silva, B. M., Hoeneisen, M., Becerra, J. (1992) Química de los Triterpenos, Editorial Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D.C, pp 34, 207.
- Stefan, B., Schulte, E. and Hans-Peter T. (2004) Composition of the surface wax from tomatoes, *European Food Research and Technology*, 219, 223-228.
- Wang, L. and Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.



- Young-Jae, Y., Nguyen-Hai, N., Yong, K., Ki-Hwan, B. and Byung-Zun, A. (2003) Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*, *Phytotherapy Research*, 17, 341-344.