



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA: OBTENCIÓN DE  
LUPEOL DE RESINAS, PLANTAS COMESTIBLES Y MEDICINALES**

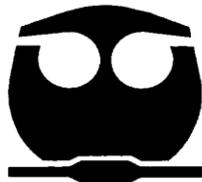
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

**RUTH ARMENTA VILLAVICENCIO**



MÉXICO, D. F. 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Profesor: ARTURO NAVARRO OCAÑA  
**VOCAL:** Profesor: BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN  
**SECRETARIO:** Profesor: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL  
**2° SUPLENTE:** Profesor: HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGOMEZ

**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:**

---

RUTH ARMENTA VILLAVICENCIO

## AGRADECIMIENTOS

A la maravillosa **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** por haberme abierto las puertas de su casa de estudios.

A la **FACULTAD DE QUÍMICA** que sin lugar a dudas es la mejor institución en el país para estudiar la carrera. Me llevo una maravillosa experiencia de los muchos años que pase aquí.

A mi asesor de tema el **Dr. Arturo Navarro** haberme dado la oportunidad de trabajar con él desde la Estancia Estudiantil y conocer el maravilloso trabajo que realiza con las plantas y frutos de nuestro bello México enfocado a fines de la industria alimentaria. Gracias por su paciencia y consejos. Gracias por no abandonarme con mi proyecto de titulación.

A mi supervisora técnica la **Dra. Hilda Calderón Villagómez** por todo lo que me enseñó durante mi trabajo experimental en el laboratorio 321. Gracias por todos sus consejos, por motivarme en esta difícil carrera. Gracias por todo el tiempo y la paciencia que me tuvo.

A mis sinodales, la maestra **Julieta Sandoval** por todos los consejos que me dio a lo largo de la última etapa de la carrera, por su confianza y tiempo dedicado. Es una gran mujer y excelente persona. Al **Dr. Fausto Rivero** por su apoyo y por su valioso tiempo empleado en la revisión de mi tesis.

Al **Dr. Francisco Ruiz Terán** por su apoyo, tiempo, consejos, por haber confiado en mi y por todos los momentos agradables.

Al **profesor José Landeros Valdepeña** por enseñarme tantas cosas de la magnífica Estadística, por confiar siempre en mí y demostrarme todo el potencial que puedo tener cuando me lo propongo.

A la maestra **Xochiquetzal González Rodríguez** por todo el tiempo y paciencia invertido en las asesorías de Química Analítica dadas ya que seguramente sin ella no habría podido concluir mi carrera.

Al maestro **Hiram Fernando Ramírez Cahero** por las enseñanzas a lo largo de la carrera.

A la maestra **Lorena de Anda Aguilar** por confiar en mí y apoyarme en mi etapa profesional.

A los maestros **José Ignacio Páramo Ramírez, Blas Flores Pérez, Agustín Reyo Herrera, Armando Conca Torres, Alejandro Iñiguez, Juan Manuel Álvarez, Plinio Sosa, Federico Galdeano (q.e.p.d)** por su calidez humana, sus consejos y por demostrarme su gran pasión por la Ciencia y la Química.

A las maestras **Aleida Mina Cetina, Esmeralda Paz Lemus y Patricia Severiano** por la prodigiosa experiencia de haber tomado clases con ellas, sin duda son excelentes profesoras con una gran conocimiento en su rama.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo económico del proyecto:

PAPIIT-IN223611

## DEDICATORIAS

Primeramente, a la persona que me dio la vida, a mi compañera, a una grandiosa mujer que a lo largo de su vida me ha demostrado que con trabajo, perseverancia y optimismo se puede lograr todo. Gracias al ser que más admiro en mi vida. A esa persona que me ha ayudado en las buenas y en las malas, esa persona que nunca me ha dejado sola y siempre ha confiado en mí, mi mamá: **Rosario Villavicencio Alonso**. Una mujer admirable, luchadora incansable y una excelente madre. Gracias mami, te amo, sin ti jamás lo hubiera logrado. Por eso te dedicó este trabajo.

A mi hermano, **Miguel Isaac Armenta Villavicencio** el cual nunca ha dejado de confiar en mí, me apoyado incondicionalmente y me ha dado tanto consejos. ¡Te adoro hermanito!

A mi padre, **Álvaro Armenta Gutiérrez** que me dio la vida y me dio valiosos consejos.

A mis tías, **Silvia, Mago y Lety** por apoyarme incondicionalmente y darme tantos consejos. Las quiero!

A mi hermanita, **Natalia** porque ya te considero parte de mi familia, gracias por abrirme las puertas de tu corazón, por estar conmigo cuando más lo he necesitado, por, cuidarme, defenderme y apoyarme. Gracias por confiar en mí, hermani y quererme tanto. Gracias por todos esos momentos inolvidables que hemos pasado en estos últimos años.

A mis amigas, **Emma**, eres un ángel y tengo la oportunidad de conocerte desde hace muchos años, gracias por tu amistad y por tu apoyo, a **Roxy**, porque a pesar de los problemas que hemos tenido seguimos unidas y me sigues apoyando en todo lo que hago, gracias por tu cariño, a **Sofi**, por sus consejos y por acompañarme en momentos buenos y malos de mi vida, a mis amigas de la primaria que aún sigo viendo y me siguen motivando y apoyando, **Itzel y Paty**. A **Marianna** por su amistad durante la carrera, su compañía y por todos los buenos momentos que pasamos juntas. Gracias mi amiga **Edith** que también estimo mucho.

Gracias a mis amigos, mi maridín **Fernando Téllez**, mi pupilo **Levi**, mi alma gemela **Robertito, Tony** y mi consen **Bruno** por su amistad y por todos los momentos inolvidables, divertidos e intensos juntos. ¡Los quiero mil!

Gracias a un compañero de la carrera que después se convirtió en un amigo muy especial, **Marky**, gracias por dejarme conocerte. Gracias por todos los momentos tan insuperables que pasamos dentro y fuera de la Facultad sabes que siempre ocuparás un lugar importante en mi corazón. Creo que cambiaste mi vida.

A mis compañeros de la carrera, **Kenia, Vicky, Alicia, Luis, Óscar, Selene, Stefany** y **Guille**. Gracias por todo lo que aprendí con ustedes y por los momentos agradables compartidos.

Gracias a mis compañeras del laboratorio 321, **Jazmín** por el tiempo tan agradable que pasamos juntas, por tu ayuda a lo largo de mi trabajo experimental, a la Dra. **Anabel** por sus consejos y terapias.

Gracias a **Pepe Talamantes** por su apoyo brindado para la continuación de su tesis.

Gracias a todos los que formaron parte de este proyecto tan importante en mi etapa académica y profesional, sin duda, ¡sin todo su apoyo no lo habría logrado!

Pero gracias principalmente a Dios que me permitió concluir mis estudios y darme vida para poder lograr todo mis sueños.

¡Sé que esto será el principio de algo grande!

**Ruthy**

Agosto 2012



## ÍNDICE TEMÁTICO

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	5
<b>CAPÍTULO I: ANTECEDENTES</b> .....	6
1.1 Terpenos.....	6
1.1.2 Clasificación.....	7
1.1.3 Función.....	8
1.1.4 Aplicaciones.....	8
1.1.5 Propiedades farmacológicas.....	8
1.1.6 Propiedades biológicas.....	9
1.2 Triterpenos.....	9
1.2.1 Clasificación.....	10
1.2.2 Función.....	11
1.2.3 Propiedades farmacológicas.....	11
1.2.4 Propiedades biológicas.....	11
1.2.5 Aplicaciones.....	12
1.2.6 Detección.....	12
1.2.7 Técnicas analíticas.....	12
1.3 Lupeol.....	12
1.3.1 Fuentes de lupeol.....	13
1.3.2 Propiedades farmacológicas.....	14
1.3.3 Procedimientos de extracción de lupeol.....	19
1.3.3.1 Maceración a temperatura ambiente.....	19
1.3.3.2 Sonicación.....	20
1.3.3.3 Extracción por microondas.....	21
1.3.3.4 Extracción de fluidos supercríticos.....	22
1.4 Sustancias quimiopreventivas.....	23
1.5 Nutracéuticos.....	24
<b>CAPÍTULO II: <math>\alpha</math> y <math>\beta</math> amirina</b> .....	26
2.1 Propiedades físico-químicas.....	26
2.2 Detección y análisis.....	27
2.3 Fuentes.....	27
2.4 Extracción.....	27
2.5 Propiedades farmacológicas.....	28
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b> .....	30
3.1 Equipos.....	30
3.2 Reactivos.....	30
3.3 Estándares empleados.....	30
3.4 Preparación de revelador para triterpenos.....	30
3.5 Diagrama experimental de trabajo.....	31

*PRIMERA PARTE: SCREENING PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE LUPEOL EN PLANTAS Y RESINAS*

3.6 Muestreo y selección .....	32
3.7 Preparación de muestras para la extracción: .....	33
3.8 Determinación del contenido de humedad .....	33
3.9 Obtención de extractos .....	34
3.10 Implementación de ensayos de CCF para la determinación de lupeol .....	34
3.10.1 Preparación de muestras .....	34
3.10.2 Cromatografía en Capa Fina en gel de sílice: .....	35
3.10.3 Cromatografía en Capa Fina impregnada con AgNO <sub>3</sub> : .....	35

*SEGUNDA PARTE: Análisis Cuantitativo*

3.11 Implementación del método por HPLC.....	35
3.12 Preparación de muestras para HPLC.....	36
3.13 Análisis de muestras .....	36

*TERCERA PARTE: Obtención de lupeol a escala preparativa*

3.14 Obtención de materia prima .....	37
3.15 Obtención de extractos: .....	37
3.16 Cuantificación de lupeol por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) .....	38
3.16.1 Preparación de muestras .....	38
3.16.2 Análisis cuantitativo .....	38

**CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 39**

*PRIMERA PARTE: SCREENING PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE LUPEOL EN PLANTAS Y RESINAS*

4.1 Muestreo y selección .....	38
4.2 Implementación de ensayos de CCF para la determinación de lupeol .....	38

*SEGUNDA PARTE: Análisis Cuantitativo*

4.3 Determinación del contenido de humedad .....	41
4.4 Implementación del método por HPLC.....	42
4.5 Análisis de muestras.....	42

4.5.1 Muestras (lupeol, $\alpha$ - amirina y $\beta$ - amirina) .....	41
4.5.2 Cromatograma: Lupeol, $\beta$ amirina y $\alpha$ amirina.....	44

*TERCERA PARTE: Obtención de lupeol a escala preparativa*

4.6 Obtención de materia prima .....	43
4.7 Obtención de extractos .....	45
4.8 Análisis de muestras .....	45

<b>CONCLUSIONES</b> .....	47
---------------------------	----

<b>ANEXOS</b> .....	47
---------------------	----

Apéndice A. Plantas de estudio .....	48
--------------------------------------	----

Apéndice B. Curva patrón de lupeol, $\alpha$ - amirina y $\beta$ - amirina.....	55
---	----

Apéndice C. Datos HPLC (muestras lupeol) .....	58
--	----

Apéndice D. Datos HPLC (muestras $\alpha$ - amirina) .....	59
--	----

Apéndice E .Datos HPLC (muestras $\beta$ - amirina) .....	60
---	----

Apéndice F .Datos HPLC (muestras lupeol, $\alpha$ - amirina y $\beta$ - amirina a escala preparativa) .....	61
--	----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63
---------------------------	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de terpenos .....	7
Figura 2. Estructura del escualeno .....	10
Figura 3. Estructura del lupeol .....	14
Figura 4. Estructura de $\alpha$ -amirina .....	26
Figura 5. Estructura de la $\beta$ -amirina .....	26
Figura 6. Cromatografía en capa fina de gel de sílice .....	40
Figura 7. Cromatografía en capa fina de gel de sílice. impregnada con $\text{AgNO}_3$ .....	41
Figura 8. Corona de Cristo .....	48
Figura 9. <i>Ziziphus amole</i> o limoncillo .....	49
Figura 10. nanche .....	50
Figura 11. guamúchil .....	51
Figura 12. <i>Calendula officinalis</i> o flor de muerto .....	52
Figura 13. <i>Ficus elastica</i> Roxb. o árbol del caucho .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lugar de recolección de muestras.....	33
Tabla 2: Datos experimentales de curvas de calibración para lupeol, $\alpha$ y $\beta$ - amirina .....	36
Tabla 3: Porcentaje de humedad de muestras.....	42
Tabla 4: Porcentajes de lupeol, $\alpha$ -amirina y $\beta$ - amirina .....	43
Tabla 5 Porcentaje de lupeol, $\alpha$ - amirina y $\beta$ - amirina en muestras a escala preparativa .....	46

## RESUMEN

---

---

El lupeol es un triterpeno que tiene particular interés debido al amplio espectro de propiedades farmacológicas exhibidas: antiprotozoico, antimicrobiano, anti-diabético, agente protector de la piel, agente nefroprotector, anti-cancerígeno y agente cardioprotector. El Lupeol se encuentra en alimentos como: zanahoria (*Daucus carota*), col blanca (*Brassica oleracea viridis*), pepino (*Cucumis sativus*), soya (*Glycine max*), pimienta (*Capsicum annum annum*) y tomate (*Lycopersicum esculentum*). Es importante mencionar que este triterpeno ha sido cuantificado en especies como el olivo (*Olea europaea L.*) (0.003 mg/g), la pulpa de mango (*Mangifera indica*) (0.18 mg/g pulpa de mango), semillas de melón (*Cucumis melo*), fresa (*Fragaria vesca*), gayuba o uva de oso (*Arctostaphylos uva-ursi L.*) y en plantas medicinales como el ginseng americano (*Panax quinquefolium L.*) (15.2 mg/100 g) o la sábila (*Aloe vera*) (0.28 mg/g hoja seca) (*Aloe vera*). Sin embargo, estos rendimientos no son significativos, por lo que la búsqueda de materias primas que tengan concentraciones apreciables de lupeol continúa.

El objetivo principal de esta investigación radicó en obtener lupeol de plantas medicinales, comestibles y en resinas de México. El proceso desarrollado para la obtención de lupeol consistió en tres etapas; la primera, en la detección de lupeol de los materiales seleccionados; la segunda, en la determinación cuantitativa por HPLC de la molécula objetivo y la tercera, en la obtención del triterpeno a escala preparativa en miligramos (mg).

La primera etapa consistió en la detección de lupeol por cromatografía en capa fina (normal y argentación) de los siguientes materiales, plantas medicinales: *Byrsomina crassifolia* o Nanche, *Acacia paniculata* Willd. o cubata, *Ficus benjamina* o amate, *Pseudobombax ellipticum* o cabello de ángel, *Calendula officinalis* o flor de muerto, *Euphorbia xantii*; plantas comestibles: *Pithecellobium dulce* (ROXB.) o guamúchil; *Ziziphus amole* o limoncillo y resinas: de *Ficus elástica* o árbol del caucho, *Euphorbia splendens* Bojer o corona de Cristo y propoleos. En todos los materiales analizados se detectó la presencia de lupeol.

En la segunda parte se realizó el análisis cuantitativo por HPLC de lupeol en los materiales en los que se demostró, a través del ensayo por CCF que contenían el triterpeno. Se encontró que la planta medicinal de limoncillo tiene un 0.24% de lupeol; en tallos de la Corona de Cristo 0.07% de lupeol; de la corteza de guamúchil nueva 0.05%; de flor de *Euphorbia xantii* 2.01% y finalmente de la resina de *Ficus elástica* Roxb. se obtuvo 5.5%. A lo largo de esta investigación se encontraron cantidades significativas de otros dos triterpenos pentacíclicos; la  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina. Obteniéndose para  $\alpha$ -amirina los siguientes porcentajes: *Ficus benjamina* 9.2% (w/w), Corona de Cristo 9.4%, corteza nueva de guamúchil 11.7% y resina de Corona de Cristo 4.3%. Los mayores porcentajes de  $\beta$ -amirina son los siguientes: 5% en hojas de guamúchil, 8.2% en el tallo de Corona de Cristo, 4.9% en flor de flor de *Euphorbia xantii* y 6.3% en resina de *Ficus elastica* Roxb.

Por último, en la tercera etapa se unificó el método de extracción (caracterización cualitativa y cuantitativa) para obtener lupeol en miligramos (mg) a escala preparativa a partir de la resina de *Ficus elastica*, empezando con la obtención de la muestra (resina), su posterior extracción con cloruro de metileno y finalmente una purificación por cristalización con hexano.

## INTRODUCCIÓN

---

Los terpenos están formados por subunidades llamadas isoprenos. Dentro de ellos se encuentra a uno de los grupos más grandes: los triterpenos, los cuales pueden encontrarse en su forma libre o como glucósidos.

Los terpenos han sido reportados útiles para la permeabilidad de las plantas. Son considerados como no tóxicos, con poca irritación y reconocidos como seguros (GRAS) por los E.U.A (FDA).

Los terpenos se clasifican en: hemiterpenos ( $C_5H_8$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) y politerpenos ( $(C_5H_8)_n$ ). Los mono y sesquiterpenos se encuentran principalmente en aceites esenciales de la materia prima de la planta. Mientras que los triterpenos se encuentran principalmente en bálsamos y resinas.

Los triterpenos muestran una amplia variedad de propiedades biológicas. El Lupeol es un triterpeno pentacíclico que tiene particular interés debido al amplio espectro de propiedades biológicas exhibidas por él.

El Lupeol se encuentra en alimentos como: la col blanca, el pepino, la pimienta y el tomate. Por otra parte, es importante mencionar que este triterpeno ha sido cuantificado en otras especies como el olivo, la pulpa de mango y en plantas medicinales como el ginseng americano o sábila. También se encuentra en la manteca de cacao, en la raíz de zanahoria y en semillas de melón, fresa, gayuba o uva de oso y soya. También se encuentra normalmente en frutos como: *Tamarindus indica*, cortezas de *Crataeva nurvala*, *Gossampinus malabárica* y *Acacia mellifera*, en el látex de *Leptadenia hasta* raíces de *Anemone raddeana*.

Asimismo, se ha reportado su presencia en resinas, propóleo y en plantas medicinales como la *Calendula officinalis*, *Euphorbia pulcherrima* Willd., *Euphorbia xantii*, *Acacia paniculata* Willd., *Byrsonima crassifolia*, *Ficus benjamina* L. y en frutos como el guamúchil.

Las propiedades farmacológicas del lupeol incluyen: antiprotozoico, antimicrobiano, anti-diabético, agente hepatoprotector, agente protector de la piel, agente nefroprotector, anti-cancerígeno y agente cardioprotector.

Por otra parte, existen triterpenos otros triterpenos similares: la  $\alpha$ - amirina y  $\beta$ - amirina. Éstas muestran tener propiedades farmacológicas de tipo antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias, analgésicas y efecto gastroprotector.

El objetivo principal de este trabajo era encontrar las fuentes donde se pudiera obtener la mayor cantidad de lupeol, entre frutos, plantas medicinales, comestibles y resinas de México.

Estas muestras se seleccionaron por disponibilidad de temporada, son fáciles de obtener en gran cantidad y además se encontraban en el D.F y estados aledaños a él.

## **OBJETIVOS**

---

### **General**

- Seleccionar la fuente que contenga la mayor cantidad de lupeol en plantas medicinales, comestibles y resinas de México para emplearse como posible alternativa de este quimiopreventivo.

### **Particulares**

- Realizar el muestreo y la selección en alternativas de fuentes vegetales con base en el contenido de lupeol para posteriormente ser determinado cualitativa y cuantitativamente.
- Identificar la presencia de lupeol mediante CCF y CCF/AgNO<sub>3</sub> en: doce plantas medicinales, dos diferentes resinas y dos tipos de propóleos para poder diferenciarlo de  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina
- Obtener extractos enriquecidos en lupeol para poder ser cuantificados por HPLC.
- Obtener lupeol a escala preparativa en miligramos (mg) para utilizarlo como estándar de referencia.

## CAPITULO I: ANTECEDENTES

---

### 1.1 Terpenos

Los terpenos no sólo forman el grupo más grande de productos químicos naturales sino que también tienen una amplia variedad de estructuras.

Los terpenos son los principales constituyentes de los aceites esenciales de las plantas, los cuales han sido reportados útiles para la permeabilidad de las mismas. Son considerados como no tóxicos, con poca irritación y reconocidos como seguros (GRAS) por los E.U.A (FDA).

Los terpenos pertenecen a varios compuestos químicos, entre ellos: hidrocarburos, alcoholes y óxidos.

Los terpenos alcohólicos son capaces de formar puentes de hidrógeno con los lípidos, los cuales aumentan la permeabilidad de varias drogas polares y no polares, según se ha reportado (Degenhardt, *et al.*, 2009, Vaddi, *et al.*, 2002).

#### 1.1.2 Clasificación

La clasificación de los terpenos es la siguiente: hemiterpenos ( $C_5H_8$ ), monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) y politerpenos  $(C_5H_8)_n$ . Los mono y sesquiterpenos se encuentran principalmente en aceites esenciales de la planta. Mientras que los triterpenos se encuentran principalmente en bálsamos y resinas (Silva, *et al.*, 1992).

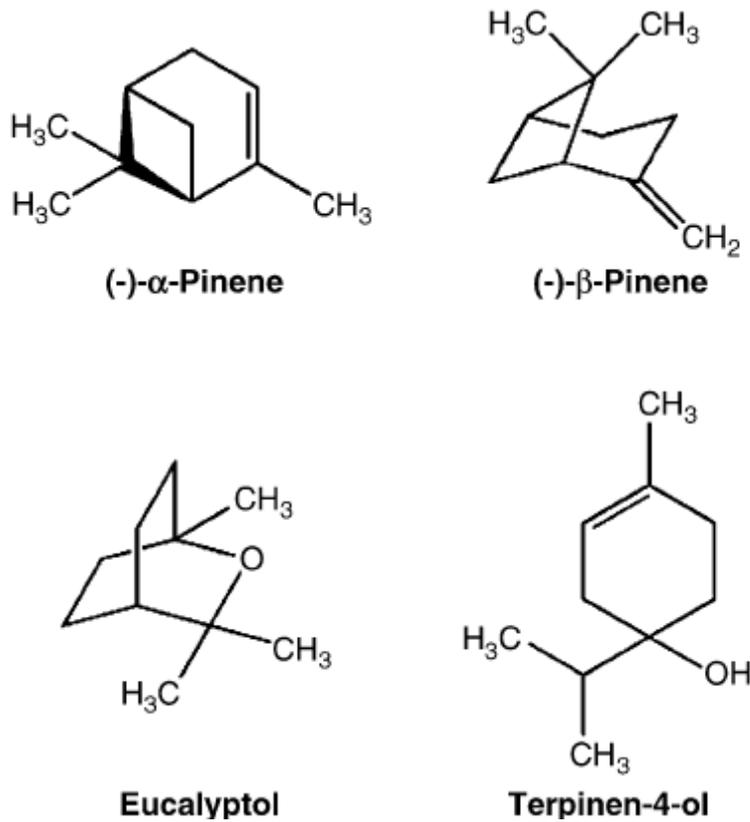


Figura 1: Ejemplos de terpenos (Cal, *et al.*, 2006)

### 1.1.3 Función

Los terpenos son una clase muy versátil de hidrocarburos producidos por una gran variedad de plantas y animales. Es sabido que en plantas tienen funciones ecológicas, mientras que para los mamíferos los terpenos están involucrados en el proceso de estabilización de las membranas celulares. En vías metabólicas actúan como reguladores de reacciones enzimáticas. Las propiedades más comunes de los terpenos son su volatilidad (Catanzaro, *et al.*, 2011).

#### 1.1.4 Aplicaciones

Los terpenos actualmente son utilizados en la industria alimenticia como aditivos de alimentos; en medicina tradicional o alternativa, en la cosmetología para obtener fragancias y en el hogar como agentes antibacteriales o analgésicos (Cal, *et al.*, 2006).

#### 1.1.5 Propiedades farmacológicas

Un ejemplo es el extracto comercial de las hojas de *Ginkgo biloba*, el cual contiene al menos 6% de ginkgolidos (un único grupo de diterpenos) y bilobalido (un sesquiterpeno) y el 24% de los flavonoides (compuesto principalmente de quercetina, kaempferol y glicósidos). Los extractos de las hojas de *Ginkgo biloba* tienen propiedades antioxidantes, atribuidas principalmente a la presencia de glucósidos flavonoides en el extracto.

La eficacia clínica de Ginkgo es debida principalmente a las lactonas de terpenos, que tienen diferentes actividades farmacológicas, tales como vasoregulatoras, factor de activación de las plaquetas, prevención de daños en la membrana causados por los radicales libres y propiedades neuroprotectoras. La administración oral del extracto de *Ginkgo biloba* puede prevenir la disminución de densidad de receptores muscarínicos en el hipocampo de ratas y podría tener capacidad para inhibir la degradación de la acetilcolina en la acetilcolinesterasa (Mauri, *et al.*, 2006).

Por otra parte, se han encontrado datos sobre la composición química y la actividad biológica de propóleos de regiones subtropicales, en particular cerca del Noroeste, en regiones mediterráneas, los cuales indican actividad antimicrobiana de cinco nuevos compuestos, tres diterpenos y dos cicloartano triterpenos, junto con diecisiete conocidos diterpenos y un glucósido flavonoide de un propóleo cretense (Popova, *et al.*, 2009).

### **1.1.6 Propiedades biológicas**

Los terpenos son una familia de hidrocarburos presentes en los aceites esenciales de una gran variedad de plantas a las que dan un particular aroma. Llevan a cabo importantes funciones dentro de las plantas relacionadas con su crecimiento y además funcionan como un lenguaje de comunicación con el medio ambiente. De hecho gran parte de los terpenos volátiles y no volátiles (metabolitos secundarios producidos a partir de carbón fotosintético a través de una ruta bioquímica) están implicados en la atracción de los polinizadores y en la defensa contra los insectos depredadores, herbívoros, microbios y para protección contra el estrés oxidativo. Cuando las plantas están dañadas por insectos herbívoros, dos clases de terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos, son los principales componentes de las mezclas de compuestos volátiles liberados. Los terpenos detectados por los herbívoros son otros compuestos volátiles, los cuales se han evidenciado con frecuencia como moléculas de señalización para atraer enemigos naturales (depredadores y parasitoides) de plantas consumidas por los herbívoros (Danner, *et al.*, 2011).

## **1.2 Triterpenos**

Los triterpenos están compuestos de subunidades llamadas isoprenos, los cuales consisten de aproximadamente 30000 compuestos identificados. Los triterpenos muestran una amplia variedad de propiedades biológicas. Estos compuestos se encuentran normalmente en frutas, vegetales y ciertas partes de plantas medicinales.

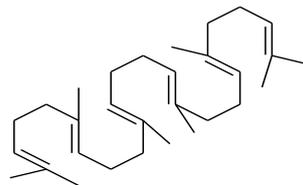
Existen al menos 4000 triterpenos conocidos, muchos de los cuales ocurren libremente pero otros ocurren como glucósidos (saponinas) o en formas combinadas.

Los triterpenos pentacíclicos están basados en esqueletos de 30 carbonos, formando entre cinco y seis anillos como el ursano o entre cuatro y seis anillos

como el lupano. Los triterpenos pentacíclicos están formados por el arreglo del epoxi escualeno.

El escualeno fue el primer triterpeno que fue aislado del hígado de pescado, pero también se encuentra presente en los aceites esenciales de las plantas y en las grasas de los mamíferos. Este compuesto presenta puentes saturados, además de que se considera reactivo y termolábil.

El escualeno es el precursor de un diverso grupo de triterpenos policíclicos. A pesar de que la ciclización ocurre con enzimas específicas denominadas ciclasas, los productos de esta ciclización dependen del doblamiento del escualeno. (Figura 2) (Muffler, *et al.*, 2010)



**Figura 2:** Estructura del escualeno (Silva, *et al.*, 1992)

### 1.2.1 Clasificación

Desde el punto de vista biológico: las estructuras más importantes de triterpenos son: oleano, ursano, dammarano y eufano. Estas estructuras policíclicas ocurren como triterpenos libres o como triterpenos glucosidados, así como sus precursores.

### **1.2.2 Función**

Los triterpenos son componentes importantes de las membranas de las plantas. Los triterpenos libres sirven para estabilizar las capas fosfolípicas en la membrana de las plantas como lo hace el colesterol en la membrana animal. También forman parte de las dietas humanas. La mayoría de los triterpenos contienen de 28 a 29 carbonos y uno o dos dobles enlaces.

Los triterpenos representan un enorme grupo de metabolitos secundarios presente en la flora y fauna acuática y terrestre. La presencia en el reino vegetal ha ocasionado gran interés en cuanto a la perspectiva evolutiva y funcional (Martelanc, *et al.*, 2007).

### **1.2.3 Propiedades farmacológicas**

Algunos estudios han reportado que estos compuestos tienen efectos antiinflamatorios, hepatoprotector, analgésicos, antimicrobiano, antimicótico, virostático y con efectos tónicos. Lo que sugiere que son potentes agentes para prevenir enfermedades (Muffler, *et al.*, 2010).

### **1.2.4 Propiedades biológicas**

Los metabolitos secundarios de las plantas son conocidos por tener varias actividades biológicas contra diferentes especies de insectos. La importancia ecológica de los terpenoides en defensa de la planta está bien establecida: entre ellos algunos diterpenos y los triterpenos han demostrado actividad antialimentaria hacia varias especies de insectos. Además, estas propiedades insecticidas han sido reportadas para otros triterpenos naturales y sus derivados químicos (Pungitore, *et al.*, 2005).

### **1.2.5 Aplicaciones**

Los triterpenos han sido utilizados como saborizantes, colorantes, polímeros, fibras, pegamentos o ceras. (Mei-Chin Yin, 2012). Como las plantas producen una variedad de antioxidantes contra el daño molecular de especies reactivas produciendo productos naturales pueden desempeñar una función preventiva. Por lo tanto, los triterpenos bioactivos (ácido oleanoico y ursólico) son utilizados para preparaciones farmacéuticas y cosméticos (Assimopoulou, *et al.*, 2005).

### **1.2.6 Detección**

Se ha reportado mucho sobre la detección y separación de los triterpenos. Algunos métodos incluyen la derivatización previa seguida de cromatografía con placas de sílica gel impregnadas con nitrato de plata, cromatografía en capa fina (CCF) o Cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (Martelanc, *et al.*, 2007).

### **1.2.7 Técnicas analíticas**

Los triterpenos han sido investigados por diversas técnicas: cromatografía líquida, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAER).

La cromatografía en capa fina es la técnica más fácil para detectar triterpenos. Normalmente se utilizan placas de sílica gel. Los extractos son separados en diferentes sistemas de elución, por ejemplo: diclorometano, metanol-ácido acético o cloroformo-etanol. La detección se da tratando las placas con anisaldehído, anhídrido acético o ácido sulfanílico al 10% en etanol, seguido de calentamiento. Este procedimiento colorea al analito correspondiente.

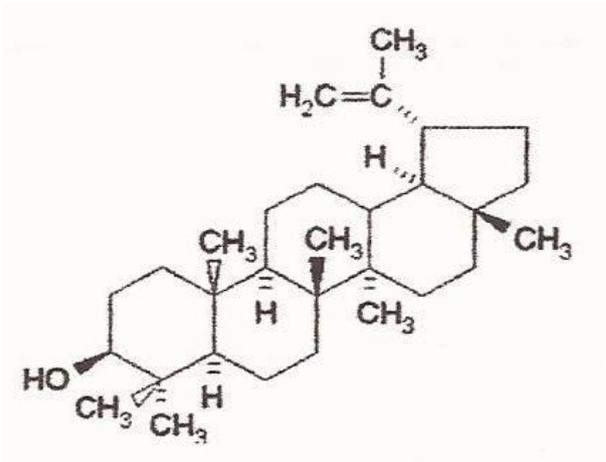
La cromatografía de gases puede ser utilizada para determinar la concentración de los blancos de los triterpenos. Esta técnica requiere una derivatización en la reacción como acilación o alquilación para hacer los analitos volátiles.

El CLAER es un método muy utilizado como análisis de biotransformación. Antes de hacer el análisis, el residuo es normalmente disuelto en metanol y filtrado a través de una jeringa para remover las partículas suspendidas que pudieran destruir la columna. La fase reversa y los métodos isocráticos con detección UV también son normalmente utilizados para analizar muestras.

Si el CLAER se une a un espectrofotómetro de masas se puede obtener información más detallada sobre la masa y la estructura de la fracción correspondiente obtenida, pero requerirá de una fase móvil volátil. Los triterpenos neutrales, los cuales sólo poseen un grupo hidroxilo en su molécula, no pueden ser fácilmente ionizados por espectrofotometría de masa en electrospray; sin embargo, la fotoionización con presión atmosférica es adecuada para la ionización de triterpenos (Muffler, *et al.*, 2010).

### 1.3 Lupeol

La fórmula química del lupeol es  $C_{30}H_{50}O$  y su estructura química se muestra en la *figura 4*. El punto de fusión del lupeol está entre 215-216°C. También es conocido como clerodol, fargasterol o lupenol. Su peso molecular es de 426.38 (Saleem, 2009). Este triterpeno tiene particular interés debido al amplio espectro de propiedades biológicas exhibidas por él.



**Figura 3:** Estructura del Lupeol (Saleem, 2009)

### 1.3.1 Fuentes de Lupeol

El lupeol se encuentra en alimentos como: zanahoria (*Daucus carota*), col blanca (*Brassica oleracea viridis*), pepino (*Cucumis sativus*), soya (*Glycine max*), pimienta (*Capsicum annum annum*) y tomate (*Lycopersicum esculentum*). Por otra parte, es importante mencionar que este triterpeno ha sido cuantificado en especies como el olivo (*Olea europaea* L. ) (0.003 mg/g), la pulpa de mango (*Mangifera indica*) (0.18 mg/g pulpa de mango), semillas de melón (*Cucumis melo*), fresa (*Fragaria vesca*), gayuba o uva de oso (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) y en plantas medicinales como el ginseng americano (*Panax quinquefolium* L.) (15.2 mg/100 g) o la sábila (*Aloe vera*) (0.28 mg/g hoja seca) (*Aloe vera*), *Tamarindus indica*, *Hieracum pilosela*, *Betula platyphylla*, latex de *Leptadenia hastate*, raíces de *Anemone raddeana*, cortezas de *Gossampinus malabárica*, *Acacia mellifera* y *Crataeva nurvala*. También se ha encontrado en resinas y el propóleo (Bracho, *et al.*, 2009, Saleem, *et al.*, 2009 y Laghari, *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Propiedades farmacológicas del lupeol

#### a) Antiprotozoico

Se ha reportado que el lupeol es efectivo contra diversos tipos de protozoos patógenos. Estos incluyen aquellos que causan la malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis. El lupeol inhibe la proliferación del parásito de la malaria, por ejemplo *Plasmodium falciparum*, que es resistente a la cloroquina (Siddique y Saleem, 2010).

b) Anti-microbiano

El lupeol inhibe el crecimiento de diversos tipos de bacteria, hongos y especies virales. Se ha encontrado que el lupeol es un agente antibacterial contra bacterias Gram positivas y negativas. Estas especies incluyen: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. lutea*, *S. paratyphi*, *S. typhi*, *S. boydi*, *S. dysenteriae*, *V. mimicus*, *V. parahemolyticus*, *E. coli*, *D. spinosa*, *K. pneumoniae*, *S. aviatum*, *P. aeruginosa* y *M. flavus*. La mayoría de estas bacterias causan enfermedades como neumonía, infecciones urinarias, tifoidea y fiebre paratifoidea (*S. typhi* y *S. paratyphi*), Shigellosis (*S. dysenteriae*), meningitis, endocarditis y síndrome tóxico de shock (*S. aureus*). (Siddique y Saleem, M., 2010).

c) Anti-diabético

Diversos estudios han demostrado que el lupel exhibe actividad anti-hiperglicémica y su administración disminuye el riesgo de desarrollar diabetes. Además, se ha reportado que el lupeol inhibe la  $\alpha$  amilasa, una enzima que contribuye al desarrollo de la diabetes. (Siddique y Saleem, 2010)

d) Agente hepatoprotector

La suplementación del lupeol inhibe el estrés oxidativo y restaura tejidos del hígado. Uno de los descubrimientos más importantes mostró que el lupeol podría mejorar la salud de ratas con hipercolesterolemia. El tratamiento con lupeol aliviaba significativamente las anomalías del hígado y aumentaba la excreción fecal de colesterol en ratas con hipercolesterolemia. Sumado a esto, el lupeol aliviaba los niveles de vitamina C y E en animales con hipercolesterolemia. En general, se ha observado que el lupeol alivia

significativamente las funciones alteradas del hígado. (Siddique y Saleem, 2010)

e) Anti-artrítico

La artritis es una enfermedad sistémica y provoca alteración en la integridad lisosomal y el metabolismo del tejido conectivo. Esta alteración produce un aumento en la destrucción del tejido conectivo y el cartílago provocado por enzimas lisosomales. (Siddique y Saleem, 2010)

En relación con la artritis, se ha encontrado que el lupeol tiene efecto anti-inflamatorio y citoprotector. En un modelo para ratas el éster derivado del lupeol, lupeol linolato, exhibió mejores propiedades antiartríticas y efecto citoprotector que el mismo lupeol, por medio de lo cual se puede observar que la esterificación aumenta la biodisponibilidad y el efecto terapéutico potencial. (Sudhahar, *et al.*, 2006)

f) Anti-inflamatorio

Los estudios de propóleos han demostrado que tanto su composición como su actividad biológica se encuentran directamente relacionadas con las especies vegetales, fuentes de resinas y bálsamos, que colectan las abejas propolizadoras. En este sentido se han identificado diversos metabolitos secundarios como los flavonoides, ésteres del ácido caféico, diterpenos, benzofenonas y constituyentes volátiles, entre los que se encuentran los sesquiterpenos. Asimismo, han quedado establecidas sus propiedades antibiótica, fungicida, antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena (Bracho, *et al.*, 2009).

Al mismo tiempo, se ha encontrado que el lupeol y el lupeol linolato también poseen una gran capacidad anti-inflamatoria. (Varatharajan, *et al.*, 2007). En varios estudios con ratones de laboratorio con inflamación, se estableció el potencial antiinflamatorio del Lupeol. Por consiguiente, el tratamiento de lupeol ha mostrado reducir la inflamación en modelo de ratones con artritis y asma bronquial.

El producto de la hidrólisis del lupeol acetato tiene efectos antiinflamatorios, evita la formación de cálculos urinarios y produce un efecto inhibitorio de una planta sobre otra por medio de la liberación de sustancias tóxicas. (Argay, *et al.*, 1997)

g) Agente protector de la piel

El efecto protector de la piel del lupeol se asoció con su potencial para incrementar el sistema antioxidante de la piel. Cabe señalar que la inflamación crónica es conocida por retardar la cicatrización de los tejidos desgastados o dañados por la ulceración o el crecimiento irregular de tejido.

Enfatizando, el efecto antiinflamatorio y sedante del aloe se ha asociado con la presencia de dos compuestos principales: ácido salicílico y lupeol. La manteca de karité y sus derivados son conocidos porque han sido usados en la industria de los cosméticos por un largo tiempo; son excelentes emolientes para la piel y sirven para el cuidado del cabello. Es de remarcar que la manteca de karité contiene una cantidad de Lupeol de 20%. Desde que se ha encontrado que el lupeol es útil para el mantenimiento de la piel y la integridad, se han desarrollado diversas cremas anti-envejecimiento. Estos estudios sugieren el uso de lupeol en cremas anti-envejecimiento, lociones, geles y bálsamo para los labios con el nivel de 0.2% a 0.3% w/w en su formulación. (Siddique y Saleem, 2010)

h) Agente nefroprotector

Las propiedades biológicas del lupeol también incluyen actividades contra los cálculos urinarios y la presencia del calcio en las vías urinarias. (Srinivasan, *et al.*, 2002)

Por eso, el lupeol ha sido probado en diversos estudios por su poder protector contra dolencias renales. Muchos reportes han establecido el rol protector del lupeol en modelo de animales con cálculos en las vías urinarias, pues el tratamiento con lupeol restaura los niveles alterados de las funciones renales

de las enzimas en estos animales. Por otra parte, se observó que el tratamiento de lupeol disminuyó la deposición de piedras que forman los constituyentes en el riñón de los animales con cálculos en las vías urinarias.

Ahora bien, la toxicidad de los metales se manifiesta en forma de insuficiencia renal. Un estudio realizado mostró que el lupeol tiene el potencial de ofrecer protección contra la nefratotoxicidad inducida por metales en ratas. La administración oral del Lupeol disminuía la concentración de nitrógeno ureico en sangre, creatinina y la peroxidación lipídica. (Siddique, y Saleem, 2010)

i) Anti-cancerígeno

El lupeol exhibe una fuerte actividad antimutagénica. Por lo tanto, el lupeol y sus derivados son citotóxicos contra las leucemias en humanos.

Se tiene, en consecuencia, que la elucidación de eventos críticos asociados con la carcinogénesis le da oportunidad a los compuestos bioactivos como el lupeol y sus derivados para impedir el desarrollo de cáncer. (Siddique, y Saleem, 2010)

j) Agente cardioprotector

La hipertensión es conocida por causar infartos, desórdenes cardíacos y fallas renales. Un estudio realizado en ratones de laboratorio por Saleem *et. al.* (2003), mostró que el tratamiento (15 mg/kg) restablece la presión de la sangre a niveles normales en estos animales. Este estudio significa que el lupeol tiene el potencial de ser desarrollado como un agente para tratar la hipertensión.

Al mismo tiempo, la hiperlipidemia es un gran riesgo para el desarrollo prematuro de enfermedades cardíacas coronarias. Según se ha reportado, esta condición también aumenta la incidencia de isquemias del miocardio y paros cardíacos. Sudhahar *et al.* (2007) reportaron la eficiencia terapéutica del lupeol contra las disfunciones cardíacas de hiperlipidemia inducida en los animales y

restauró la arquitectura ultraestructural en tejidos cardiacos de animales con hiperlipidemia.

El colesterol alto es un factor importante para el desarrollo de hiperlipidemia, arteriosclerosis y las enfermedades isquémicas del corazón. Las enfermedades cardiovasculares son la primeras causas de muerte en los Estados Unidos, Europa y en muchas partes de Asia (Braunwald, *et al.* 1997).

Ciertamente, el lupeol y su éster de ácido graso ( $\omega$ -6), el cual es un derivado del lupeol linolato, aminoran las anomalías de la oxidación lípida en las primeras etapas de aterosclerosis hipercolesterolemia.

### **1.3.3 Procedimientos de Extracción de lupeol**

#### 1.3.3.1 Maceración a temperatura ambiente

Sharapin (2000) dice que este proceso consiste en poner en contacto la planta con el disolvente, durante varios días. El objetivo es que haya un equilibrio de concentración entre el analito y el disolvente, pero esto depende de ciertos factores relacionados con la planta como: naturaleza, tamaño de partícula y contenido de humedad; y factores relacionados con el disolvente, entre ellos selectividad y cantidad.

Cuando la relación entre planta-disolvente aumenta, el rendimiento del extracto disminuye. Si hay hinchamiento de la planta, aumentará la permeabilidad de la pared celular y la difusión del disolvente. El grado de hinchamiento de las células, las propiedades del disolvente y la velocidad con la que se obtiene el equilibrio están en función del tamaño de partícula de la planta molida.

La posibilidad de descomposición térmica de los componentes no puede ser ignorada, ya que la extracción ocurre en el punto de ebullición del disolvente por mucho tiempo.

Algunas ventajas que presenta este método:

- Desplazamiento continuo de equilibrio.
- Se mantiene una temperatura relativamente alta con extracción de calor al matraz de destilación
- Es un método simple y barato
- No se requiere filtración

Este procedimiento también presenta desventajas, entre ellas la lentitud del proceso, no se puede hacer uso de agitación en este método para acelerar el proceso y la extracción incompleta del compuesto, es por ello que esta operación puede repetirse dos o tres veces para disminuir las pérdidas de extracto. Por otra parte, en este procedimiento disminuye la cantidad de extracto retenido en el residuo, pero aumenta la cantidad de disolvente al ser recuperado requiriendo de procedimientos de extracción y evaporación. (Sharapin,2000)

#### 1.3.3.2 Sonicación

Las ondas sonoras que tienen frecuencias más altas que 20 kHz son vibraciones mecánicas en sólidos, líquidos y gases. A diferencia de las ondas electromagnéticas, las ondas acústicas deben viajar de modo que involucren ciclos de expansión y compresión durante el viaje en el medio. La expansión destroza las moléculas y la compresión las junta. La expansión crea burbujas en el líquido y produce presión negativa. Las burbujas formadas crecen y finalmente se colapsan. Cerca de una sólida línea divisoria, la cavidad se colapsa de manera asimétrica y produce alta velocidad de chorros líquidos. Los chorros líquidos tienen un fuerte impacto en la superficie sólida.

Normalmente, la agitación es utilizada para evitar las ondas estacionarias o la formación de regiones de sólidos libres por el paso preferencial de las ondas ultrasónicas. Sin embargo, el ultrasonido genera calor, por eso es importante controlar la temperatura de extracción.

Por otra parte, el exceso de sonicación puede dañar la calidad de los extractos.

Son muchos factores los que deben ser tomados en cuenta durante este proceso:

- Contenido de humedad
- Tamaño de partícula
- Disolvente utilizado para la extracción

Estos factores son los que intervienen en la frecuencia, presión, temperatura y tiempo de sonicación.

Las ventajas de este método incluyen:

- ✓ Barato
- ✓ Simple
- ✓ Alternativa eficiente a técnicas convencionales de extracción
- ✓ Aumento de la extracción y cinética más rápida (estos factores pueden estar ligados a la naturaleza de la planta matriz)
- ✓ Puede reducir la temperatura a la cual se está operando, permitiendo la extracción de compuestos termolábiles
- ✓ Mejorar la calidad de los extractos
- ✓ El ultrasonido puede aumentar el rendimiento de extracción

Esta técnica se utiliza para extraer los nutraceuticos de las plantas. (Wang y Weller, 2006)

### 1.3.3.3 Extracción por microondas

Las microondas son transmitidas como ondas que penetran biomateriales que pueden generar calor. Como resultado, las microondas calientan en su totalidad a la materia prima a profundidad por medio de penetración simultánea.

Este tipo de extracción ofrece una rápida entrega de energía a un volumen total de disolvente y materia prima que se calienta con el solvente de manera eficiente y homogénea. El supercalentamiento facilita la desorción de compuestos químicos desde la matriz, mejorando la recuperación de nutraceuticos. Por otra parte, la extracción por microondas depende de la susceptibilidad dialéctrica de la matriz y el solvente. Los mejores resultados se

han obtenido al humectar las muestras que poseen una constante dieléctrica relativamente alta, como la del agua.

Este tipo de extracción ha sido considerada como una alternativa a los métodos tradicionales del tipo sólido-líquido para la extracción de metabolitos de plantas.

Las razones son las siguientes:

- Se reduce el tiempo de extracción
- Se reduce la cantidad de disolvente utilizada
- Aumenta el rendimiento de extracción
- Es simple
- Es barato
- Es un método relativamente nuevo

Sin embargo, la eficiencia de las microondas puede ser pobre cuando los compuestos de interés o los disolventes son no-polares o volátiles. (Wang y Weller, 2006)

#### 1.3.3.4 Extracción de fluidos supercríticos

El estado supercrítico se logra cuando la temperatura y la presión de una sustancia se elevan por arriba de su valor crítico. El fluido supercrítico tiene características tanto de gases como de líquidos. Comparado con otros solventes líquidos, los fluidos supercríticos muestran más ventajas:

- 1) El poder de disolución de un fluido supercrítico depende de la densidad, la cual es ajustable al cambiar la presión o la temperatura.
- 2) Los fluidos supercríticos tienen un coeficiente de difusión mayor, menor viscosidad y tensión superficial mayor a la de un solvente líquido permitiendo una transferencia de masa más favorable.

El CO<sub>2</sub> supercrítico es un buen solvente para extraer compuestos no-polares como los hidrocarburos. A pesar de que el “agua supercrítica” y “supercalentada” tiene ciertas ventajas como una mejor capacidad de extraer compuestos polares, no es adecuada para compuestos termolábiles.

Muchos nutraceuticos como los fenoles, alcaloides y compuestos glicosidicos son poco solubles en CO<sub>2</sub> y por lo tanto no son extraibles. Por ello, el etanol puede ser una mejor alternativa en esta extracción para los nutraceuticos, debido a su poca toxicidad.

Este método representa una alternativa a los métodos tradicionales de extracción, utilizando disolventes orgánicos para extraer compuestos biológicamente activos de las plantas. Por ejemplo, ha sido usado para extraer material de plantas, específicamente para la oxidación de lípidos, aceites esenciales y sabores. (Wang y Weller, 2006)

#### **1.4 Sustancias quimiopreventivas**

La Quimiopreención se define como la intervención farmacológica con compuestos naturales o sintéticos que pueden prevenir, inhibir o revertir la carcinogénesis. También puede prevenir el desarrollo del cáncer invasivo. (Gullet, *et al.*, 2010)

Actualmente hay un gran interés por el uso de plantas medicinales en el tratamiento contra el cáncer; son utilizadas como terapia y como remedio para prevenir enfermedades. Incluso son utilizadas como parte de la medicina, ya que los componentes activos tienen beneficios terapéuticos. Además son baratas y, a diferencia de otros tratamientos contra el cáncer, no tienen efectos secundarios.

Primero se deben identificar los agentes carcinogénicos: aditivos alimentarios, aflatoxinas, hidrocarburos policíclicos, sustancias tóxicas vegetales, nitrosaminas y otros constituyentes normales de la comida.

Los micronutrientes presentes en plantas comestibles son la clase más deseada en los agentes quimiopreventivos. Es por eso que se recomienda la dieta rica en frutas frescas y verduras amarillo-verdosas ya que reducen la incidencia de mortalidad debido al cáncer de estómago, colon, pecho, pulmón, esófago, vejiga, próstata y otros tipos.

Se han realizado muchos estudios epidemiológicos que indican que los hombres que regularmente consumen té tienen bajo riesgo de tener cáncer de próstata.

Además, el consumo de la fruta granada derivada del árbol *Punica granatum* ha demostrado tener fuertes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. La actividad antioxidante de la granada ha demostrado ser incluso mayor que la del vino rojo o el té verde, otras dos sustancias potencialmente prometedoras para prevenir el cáncer de próstata.

Sumando, la vitamina E es un suplemento muy utilizado. Alimentos como el aguacate, nueces, huevo, y soya son fuente de esta vitamina. Se han realizado muchos estudios *in vitro* que muestran el impacto que tienen en la carcinogénesis. Se ha encontrado que la vitamina E es un antioxidante, pues ataca los radicales libres que interfieren en los mecanismos celulares importantes en el crecimiento celular. Otras funciones de la vitamina E incluyen la de anti-prostaglandina, que, según se cree, participa en la carcinogénesis de la próstata. Esta vitamina también ha demostrado que induce la detención del ciclo celular y lo regula.

Por otra parte, el selenio es un oligoelemento que se encuentra en los alimentos de origen marino, carne y granos. El exceso de selenio produce disminución de actividad de las células asesinas naturales y altera la modulación en la síntesis de hormonas tiroideas, lo cual afecta las uñas, puede causar pérdida de cabello y provocar dermatitis. Por otra parte, el selenio es conocido por ser un antioxidante y también afecta la inducción de apoptosis. (Siddiqui, *et al* 2008)

## **1.5 Nutracéuticos**

El término “nutracéutico” fue formado de dos conceptos “nutrición” y “farmacéutico”. Este término fue acuñado por el Dr. Stephen DeFelice en 1989, Presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina (Foundation

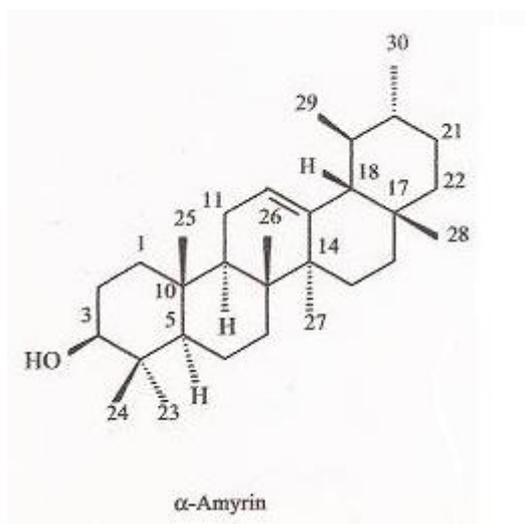
for Innovation in Medicine, FIM), en Estados Unidos. el Dr. DeFelice definió a la Nutracéutica como “cualquier alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades” .

Los componentes involucrados en los problemas de salud: lípidos, vitaminas, oligoelementos, fibra, flavonoides, pequeños compuestos orgánicos y menos frecuente las proteínas. Muchos de estos componentes activos provienen del reino vegetal, al cual se le han asociado atributos seguros y saludables. Sin embargo, en muchos casos las enfermedades se previenen con las propiedades de estos compuestos: antioxidantes, anti-inflamatorios .anti-envejecimiento o desintoxicantes. (Scarafoni, *et al* 2007)

## CAPÍTULO II. $\alpha$ y $\beta$ amirina

### 2.1 Propiedades físico-químicas

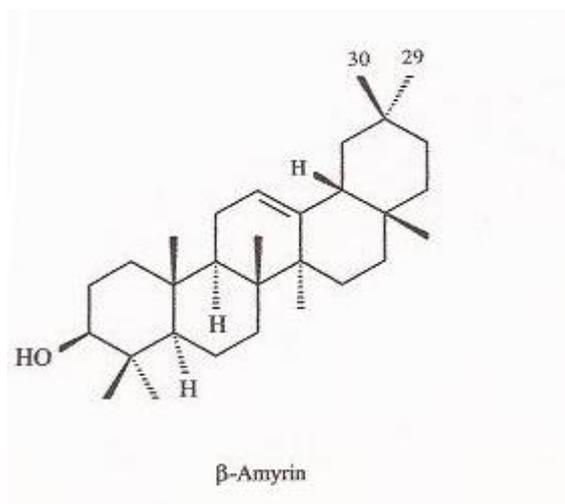
La fórmula química de la  $\alpha$ - amirina es  $C_{30}H_{50}O$ . Su estructura química se muestra en la figura 4.



**Figura 4** : Estructura de  $\alpha$ -amirina (Oliveira, *et al.*, 2004)

Su punto de fusión está entre 184-186 °C.

La estructura química de  $\beta$ - amirina es  $C_{30}H_{50}O$ . Su estructura química se muestra en la figura 5.



**Figura 5** Estructura de la  $\beta$ -amirina (Oliveira, *et al.*, 2004)

Su punto de fusión está entre 189-191 °C. (Hernández Vázquez, *et al.* 2009)

## 2.2 Detección y análisis

Las amirinas se encuentran en muchas partes de plantas: hojas, corteza, madera y resinas. Estas partes han sido tratadas previamente antes de extraerlas. Primero, cada parte de la planta es secada, molida y tamizada. Después, se procede a realizar extracciones con diclorometano, cloroformo, hexano o metanol. Estas muestras pueden ser sujetas a hidrólisis alcalina, derivatización o separación por cromatografía en capa fina (CCF) para por último someterla a un análisis. La cromatografía de gases o cromatografía en capa fina de alta eficiencia son las técnicas más comunes para cuantificar la concentración  $\alpha$ -amirina y  $\beta$  amirina en plantas. (Hernández Vázquez, *et al.* 2009)

## 2.3 Fuentes de $\alpha$ -amirina, y $\beta$ - amirina

$\alpha$ -amirina es un triterpeno que originalmente se extrae de extrae de varias fuentes, principalmente de las resinas de las plantas. Cantidades considerables de triterpenos se encuentran disponibles en las resinas de *Bursera* y *Protium*. Otras fuentes conocidas de  $\alpha$ -amirina incluyen al copal mexicano (5g/kg).

Las fuentes más importantes de  $\beta$ - amirina: flor de loto (*Nelumbo nucifera*), polen de abejas (3 g/kg), corteza de “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*) (2.4 g/kg) y látex de higo (*Ficus carica*) (1.2/kg).

Mezclas de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$  amirina han sido obtenidas de la corteza del Nanche (*Byrsonima crassifolia*) (9 g/kg) (Hernández Vázquez, *et al.* 2009).

## 2.4 Extracción

Gran cantidad de extracciones y esquemas de separación han sido utilizados para  $\alpha$ -amirina,  $\beta$  amirina y sus mezclas. Normalmente, las partes secas

(resinas, hojas y cortezas) se extraen con hexano o algún otro disolvente no-polar. Mientras que el extracto resultante pasa a través de una columna o por cromatografía de capa fina. Un procedimiento alternativo es el fraccionamiento secuencial en columnas de silica gel a través de varios disolventes (Hernández Vázquez, *et al.* 2009).

## 2.5 Propiedades farmacológicas de $\alpha$ -amirina, $\beta$ amirina

Estos triterpenos han mostrado exhibir varias propiedades farmacológicas: antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias, analgésicas y efecto gastroprotector (Martelanc, *et al.*, 2009).

Para comenzar, en algunos ensayos la  $\alpha$ -amirina se ha propuesto como posible protección contra los hongos de las hojas de la vid. (Batovska *et al.*, 2008)

En estudios recientes sobre las hojas de *Siraitia grosvenorii*,  $\beta$ - amirina y otros componentes fueron obtenidas y su actividad contra bacterias bucales: *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Fisubacterium nucleatum* y la levadura *C. albicans* fueron evaluadas *in vitro*. Únicamente  $\beta$ -amirina exhibió una pequeña inhibición al *Streptococcus mutans* y *Fisubacterium nucleatum*. (Zheng *et al.*, 2011)

Po otro lado, los extractos de hexano de las hojas *Bursera simaruba* mostraron efecto antiinflamatorio en ratas con algún tipo de inflamación. Esteroles y  $\alpha$ -amirina fueron aislados y caracterizados de fracciones, sugiriendo que estos componentes pueden jugar un papel muy importante en los efectos antiinflamatorios de *B. simaruba* (Carretero *et al.*, 2008).

Por otra parte, *Ligustrum* son especies de plantas utilizadas por físicos chinos para prevenir la hepatitis y la bronquitis crónica. Tres especies diferentes de *Ligustrum* fueron colectadas para evaluar los efectos analgésico/antiinflamatorio en roedores. Se midió el contenido de triterpeno:  $\beta$ -amirina, ácido betulínico y lupeol en CLAER. Los resultados demostraron que

los 3 triterpenos son responsables del efecto antiinflamatorio de *Ligustrum* (Wu *et al*, 2011).

Por último, el efecto anti-úlceras de *Cytocarpa procera* y *Amphipterygium adstringens* fueron evaluados en experimentos gástricos en ratas. El análisis fitoquímico permitió identificar  $\beta$ -amirina y  $\beta$ -sistosterol (Rosas-Acevedo *et al*, 2011).

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

---

### 3.1 Equipos:

- Microbalanza AG245 Máx. 41g-410g/d= 0.01 mg-0.1 mg Mettler Toledo.
- Campana de flujo laminar
- Rotavapor R-205 Buchi, Buchi Helating Bath B490
- Liofilizadora Freezone 4.5
- HPLC Waters con doble bomba, Waters 2847 Autosampler y Waters 2487 Dual ( $\lambda$ ) Absorbance Detector con doble longitud de onda, Controlador con una computadora Dell cuyo software es Breeze 3.0

### 3.2 Reactivos:

Disolventes orgánicos grado Q.P: acetona, acetato de etilo, hexano diclorometano, el cual fue utilizado debido a su buena solubilidad y los buenos porcentajes de recuperación descrita en trabajos anteriores.

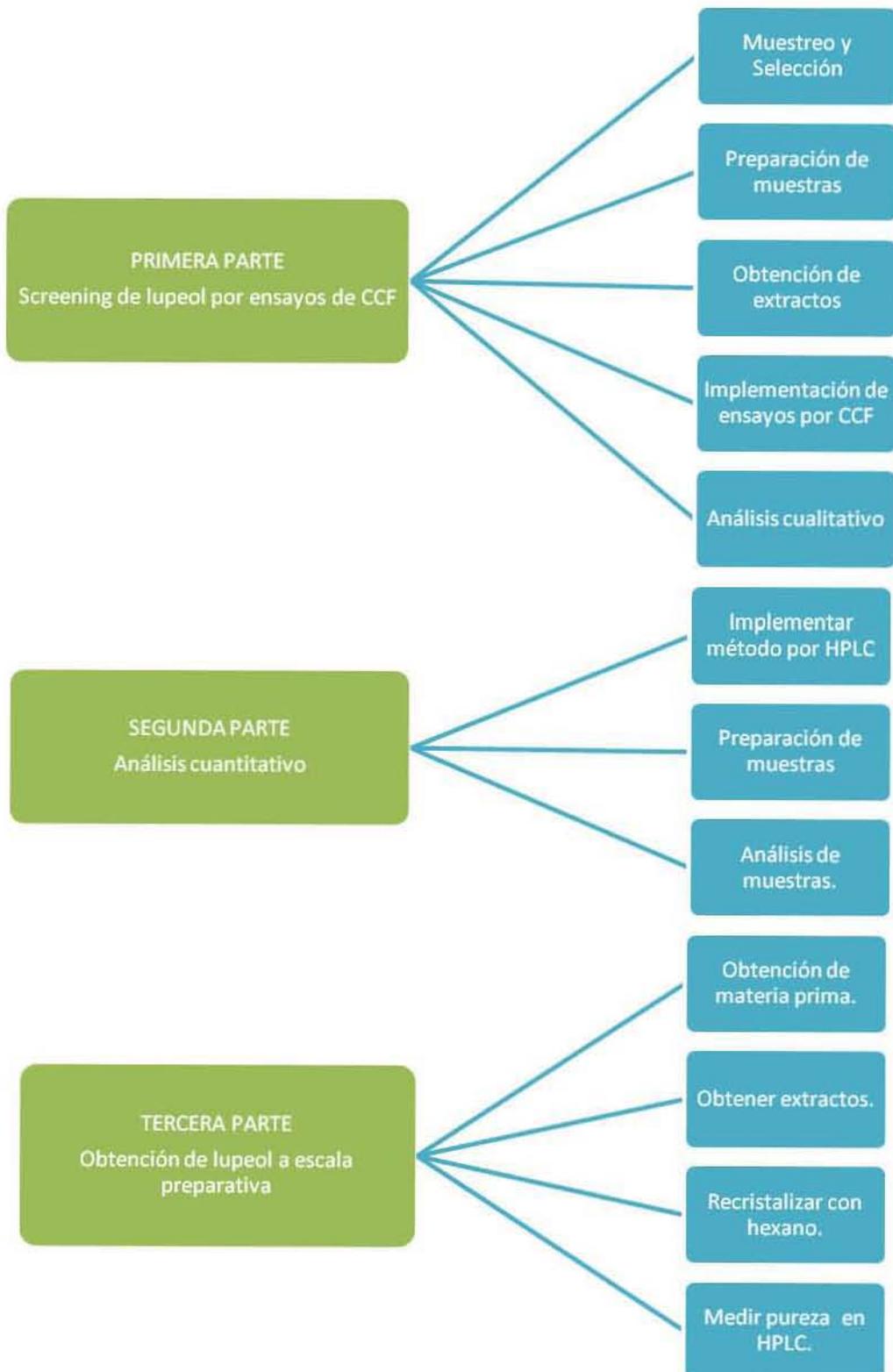
### 3.3 Estándares empleados:

- $\alpha$ -amirina
  - $\beta$ -amirina
  - lupeol (Sigma Aldrich L5632-25MG)
- } preparados en el laboratorio 321

### 3.4 Preparación de revelador para triterpenos:

Reactivo de Anisaldehído: solución de 100 mL (85 mL de MetOH + 10 mL de ácido acético glacial + 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.5 mL de anisaldehído en baño de hielo)

### 3.5 Diagrama experimental de trabajo:



## I. PRIMERA PARTE:

### SCREENING PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE LUPEOL EN PLANTAS Y RESINAS

#### 3.6 Muestreo y selección:

La materia prima consistió en plantas medicinales, comestibles, resinas y propóleos (Ver Tabla 1). Se hizo una revisión bibliográfica actualizada de las fuentes que se han descrito contienen lupeol: *Byrsonima crassifolia* o Nanche; *Acacia paniculata* Willd o cubata; *Pithecellobium dulce* (ROXB.) o guamúchil; *Ficus benjamina*, *Pseudobombax ellipticum* o cabello de ángel; *Calendula officinalis* o flor de muerto; *Euphorbia splendens* bojer o corona de Cristo; *Euphorbia xantii*, *Ziziphus amole* o limoncillo, *Ficus elastica* y dos propóleos.

#### a) Recolección de muestras

**Tabla 1: Lugar de recolección de muestras**

Muestra	Lugar de recolección
Hojas de <i>Ficus benjamina</i> (amate).	Jardines de Ciudad Universitaria, D.F
Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (nanche).	Mérida, Yucatán
Hojas de <i>Pithecellobium dulce</i> (ROXB.) (guamúchil)	Jiutepec, Morelos.
Hojas de <i>Acacia paniculata</i> Willd (cubata)	Estado de Hidalgo
Hojas de <i>Pseudobombax ellipticum</i> (cabello de ángel)	Jardín local, D.F
<i>Euphorbia splendens</i> Bojer (Corona de Cristo)	Mercado de Los Viveros, D.F
<i>Calendula officinalis</i> (flor de muerto)	Mercado de Las Flores, D.F
<i>Ziziphus amole</i> (limoncillo)	Guadalajara, Jalisco
<i>Euphorbia xantii</i>	La Paz, Baja California
Corteza de <i>Pithecellobium dulce</i> (ROXB.) (guamúchil nueva)	Jiutepec, Morelos.
Corteza de <i>Pithecellobium dulce</i> (ROXB.) (guamúchil vieja)	Jiutepec, Morelos
Propóleo Ecosur FO (CHCl <sub>2</sub> )	Laboratorio 111 del Dr. Rivero traído de Tlaxcala

Propóleo Ecosur (CHCl <sub>2</sub> )	Laboratorio 111 del Dr. Rivero traído de Chiapas.
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb. (árbol del caucho)	Calles de la Ciudad de México.
Resina de <i>Euphorbia splendens</i> Bojer (Corona de Cristo)	Mercado de los Viveros, D.F

### 3.7 Preparación de muestras para la extracción:

Las hojas, tallos y cortezas se prepararon de la siguiente manera:

En un vidrio de reloj, se colocó 1 g de cada una de las muestras. Se secaron en un horno a 60°C por 24 hrs., posteriormente se molieron en una licuadora y se tamizaron. Finalmente se almacenaron en un recipiente herméticamente cerrado hasta su uso.

Las resinas se trataron de la siguiente manera:

- Hojas de Caucho: Se colectaron aproximadamente 1 kg. Se le hicieron incisiones al tejido central de la hoja para permitir fluir al látex, que posteriormente se colectó en un vidrio de reloj y se secó a temperatura ambiente.
- Corona de Cristo: El látex se obtuvo cortando los tallos. Este último se colectó en un vidrio de reloj y se dejó secar a temperatura ambiente.

La muestra de propóleos se trato de la siguiente manera:

La muestra proporcionada consistió en un extracto enriquecido en el contenido de lupeol que pesó aproximadamente 1 g.

### 3.8 Determinación del contenido de humedad

Se pesó aproximadamente 1 gr. de las siguientes muestras:

- Hoja de amate
- Hojas de nanche
- Hojas de guamúchil
- Hojas de cabello de ángel
- Hojas de cubata

- Corteza de guamúchil (nueva)
- Corteza de guamúchil (vieja)
- Tallo de corona de Cristo

Posteriormente se colocaron en pesafiltros<sup>1</sup> en el horno hasta peso constante (60°C).

### **3.9 Obtención de extractos:**

a) Se colocaron 10 g de muestra de hojas, tallos, corteza y flor en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de diclorometano, previamente molidas y secadas en el horno a 60°C.

b) En el caso de las resinas, se colocó aproximadamente 1 g. de muestra en un vidrio de reloj en su fase líquida. Posteriormente, una vez seca se transfirió a un matraz Erlenmeyer resuspendiendo esta última en diclorometano, llevándola a un volumen final de 100 mL.

Las soluciones de los incisos a) y b) se maceraron por un periodo de 24 h. Posteriormente se filtraron y concentraron en un rotavapor hasta llevar la muestra a sequedad para finalmente resuspenderla en diclorometano.

Los extractos enriquecidos en lupeol se almacenaron en viales sin exposición a la luz.

### **3.10 Implementación de ensayos de CCF para la determinación de Lupeol:**

#### **3.10.1 Preparación de muestras:**

Se colocaron aproximadamente 1 g. de cada una de las muestras de la sección 3.6 en matraces Erlenmeyer con 50 mL de diclorometano. Se maceraron por 24 h. a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtraron y concentraron a sequedad en un rotavapor con un matraz bola de 250 mL para finalmente resuspender cada una de las muestras en diclorometano y almacenarlas en viales a temperatura ambiente sin exposición a la luz.

---

1-Los pesafiltros deben estar a peso constante.

### 3.10.2 Cromatografía en Capa Fina en gel de sílice:

Se tomó una placa de sílica gel para la identificación cualitativa de triterpenos. Como fase estacionaria se ocupó gel de sílice y como fase móvil hexano: diclorometano: acetato de etilo (8:1:1 v/v). Se tomó una placa de sílica gel con los extractos de la sección 3.7. para la identificación cualitativa de triterpenos. Como referencia se aplicó ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol) revelando así con anisaldehído.

### 3.10.3 Cromatografía en Capa Fina impregnada con $\text{AgNO}_3$ :

Se utilizaron placas de sílica gel, impregnadas previamente con una solución de nitrato de plata preparada para permitir la separación de triterpenos. Se preparó una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) al 10%, eluyéndola y dejándola secar en la estufa a 30°C durante 1 hora. Se tomó una placa de sílica gel con los extractos de la sección 3.7. para la identificación cualitativa de triterpenos utilizando el mismo sistema de elución para la cromatografía en capa fina normal.

Para ambos ensayos se aplicó como referencia ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol) revelando así con anisaldehído.

## **II. SEGUNDA PARTE:**

### **ANÁLISIS CUANTITATIVO**

#### **3.11 Implementación del método por HPLC**

Este método está basado en el descrito por Bonfill *et al.* (2006) con algunas modificaciones.

- **Equipo:** Waters 1525 con bomba binaria y desgasificador externo con lector UV Waters 2847 Dual Controlados con una computadora Dell
- **Software:** Breeze 3.0
- **Peso:** isocrático
- **Fases móviles del disolvente:** Fase A y B:Metanol
- **Flujo :**0.9 mL/min
- **Temperatura:** ambiente
- **Longitud:** 210 nm
- **Columna analítica empleada:** ODS Hypersil Dim (mm) = (250 \* 4.6 mm)

Para la cuantificación se realizaron las curvas patrón de lupeol,  $\alpha$  y  $\beta$  para poder interpolar datos dentro de la gráfica (ver Tabla 2).

**Tabla 2: Datos experimentales de curvas de calibración para lupeol,  $\alpha$  y  $\beta$**

MUESTRA	CONCENTRACIONES	INTERVALOS	R <sup>2</sup>	DESVIACIÓN
lupeol	[0.4 mg/mL-0.8 mg/mL)	[12.038-12.814]	0.9858	0.27416
$\alpha$ - amirina	[0.74 mg/mL-6.82 mg/mL]	[14.195-14.45]	0.9962	0.07128
$\beta$ - amirina	[0.7 mg/mL-9.18 mg/mL)	[13.578-13.771]	0.9837	0.06664

### 3.12 Preparación de muestras para HPLC

Los extractos fueron disueltos con 1 mL de diclorometano para posteriormente ser tomadas con una pipeta Pasteur y colocadas dentro de un vial para HPLC de 1 mL.

### 3.13 Análisis de muestras

Las muestras fueron analizadas y cuantificadas en HPLC a una longitud de onda de 210 nm interpolando los resultados de las muestras con la curva de calibración de los estándares  $\alpha$ - amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol. La columna analítica empleada fue una ODS Hypersil Dim (mm) = (250 \* 4.6 mm) con un flujo metanol 0.9 mL/min. ISOCRATICO. Los experimentos fueron repetidos por duplicado.

### III. TERCERA PARTE:

#### Obtención de lupeol a escala preparativa

##### 3.14 Obtención de materia prima:

Para esta última parte se trabajó con las siguientes muestras:

- ❖ Resina de árbol del caucho (*Ficus elastica* Roxb).
- ❖ Muestra comercial de mango deshidratado (*Mangifera indica*).
- ❖ Guamúchil blanco (*Pithecellobium dulce* ROXB.).
- ❖ Frutilla de nanche (*Byrsonima crassifolia*).

##### 3.15 Obtención de extractos:

A continuación se describe el tratamiento realizado para la obtención de los extractos de las muestras<sup>2</sup>:

- Resina de *Ficus elastica* Roxb:

Se colectaron aproximadamente 1 kg de hojas de caucho, a las cuales se les realizó una incisión en el tejido central de las hojas para obtener el látex que se colectó en un vidrio de reloj y se secó a temperatura ambiente.

- Guamúchil blanco y Frutilla de nanche

Únicamente la pulpa del fruto, se molió en un mortero para reducir el tamaño de partícula y se sometió a un proceso de liofilización a una temperatura de -42 °C por un periodo de 3 horas.

Cada una de las muestras se maceró a temperatura ambiente por 24 h. para posteriormente ser filtradas. La solución resultante se concentró en un matraz bola de 250 mL en un rotavapor hasta llevar a sequedad.

El extracto resultante se disolvió en diclorometano y se almacenó en viales sin exposición a la luz dejándolos evaporar a temperatura ambiente.

---

<sup>2</sup> La muestra de Mango comercial deshidratado fue de 10.4514 g.

### **3.16 Cuantificación de lupeol por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)**

La cuantificación de lupeol por HPLC se realizó de los extractos de la sección 3.14.

#### **3.16.1 Preparación de muestras**

Los extractos de la sección 3.14 fueron disueltos en diclorometano.

Posteriormente, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L aforando a 1 mL para la Frutilla de nanche y 1 mL de las muestras de resina de *Ficus elastica Roxb* y la muestra comercial de mango deshidratado, esta ultima aforándola a un volumen final de 10 mL.

#### **3.16.2 Análisis cuantitativo**

Se tomó 1 mL de los extractos de la sección 3.15.1 y se inyectaron en el equipo HPLC. Se utilizaron las curvas patrón de los estándares  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y lupeol.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

### I. PRIMERA PARTE:

#### SCREENING PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE LUPEOL EN PLANTAS Y RESINAS

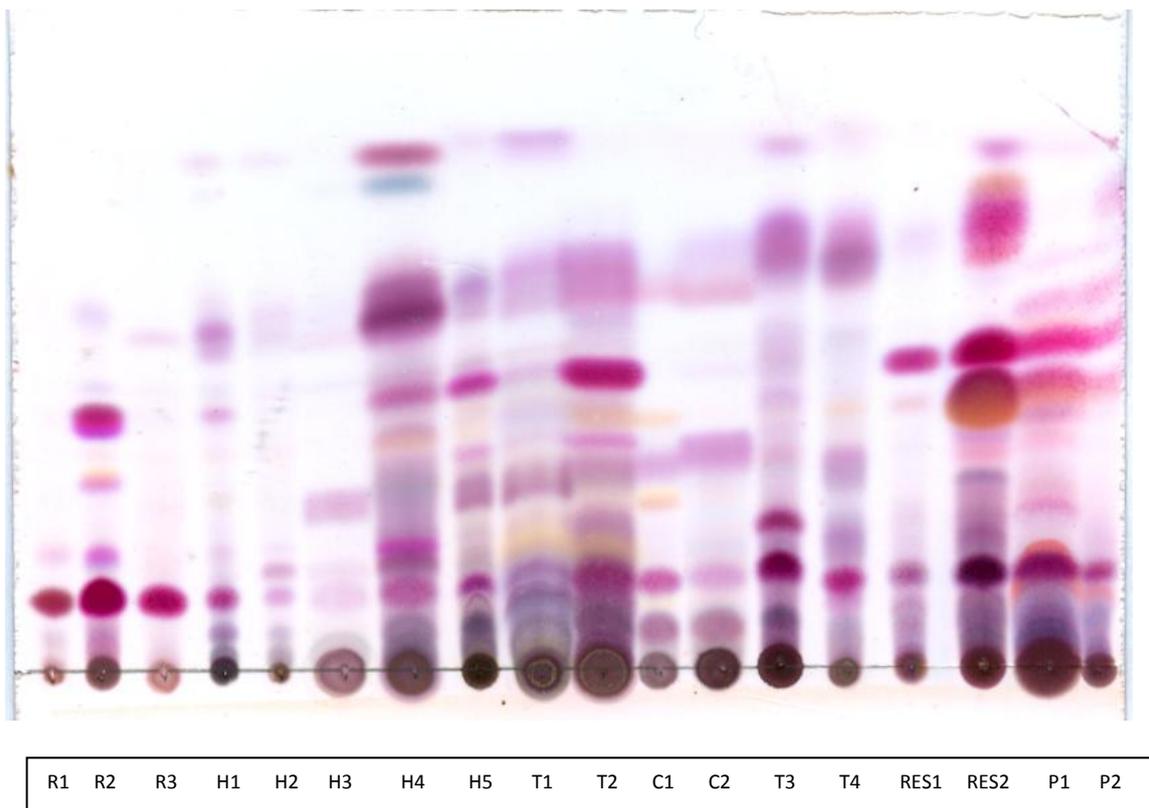
##### 4.1 Muestreo y Selección

Se recolectaron diferentes variedades de plantas medicinales, comestibles y resinas de diferentes partes del país.

Se seleccionaron las muestras de: hoja de *Byrsonima crassifolia*; hoja de *Acacia paniculata Willd*; hoja de *Pithecellobium dulce* (ROXB.); hoja de *Ficus benjamina*, hoja de *Pseudobombax ellipticum*, tallo de *Calendula officinalis*; tallo de *Euphorbia splendens Bojer*, corteza de *Pithecellobium dulce* (ROXB.); tallo de *Euphorbia xantii*; tallo de *Ziziphus amole*; resina de *Euphorbia splendens Bojer*; resina de *Ficus elástica* Roxb.; Propóleo Ecosur FO (CHCl<sub>2</sub>), Propóleo Ecosur (CHCl<sub>2</sub>); debido a que son muestras disponibles, baratas y están reportadas recientemente en la literatura con alguna cantidad apreciable de lupeol.

##### 4.2 Implementación de ensayos de CCF para la determinación de lupeol

Para comprobar la presencia de lupeol en cada una de las muestras seleccionadas de la sección 4.1, se realizó una cromatografía en Capa Fina con gel de sílice, aplicando doce muestras y tres referencias, como se observa en la Fig. 6, con el sistema de elución (hexano/acetato de etilo/diclorometano) en proporción (8:1:1) revelada con anisaldehído.

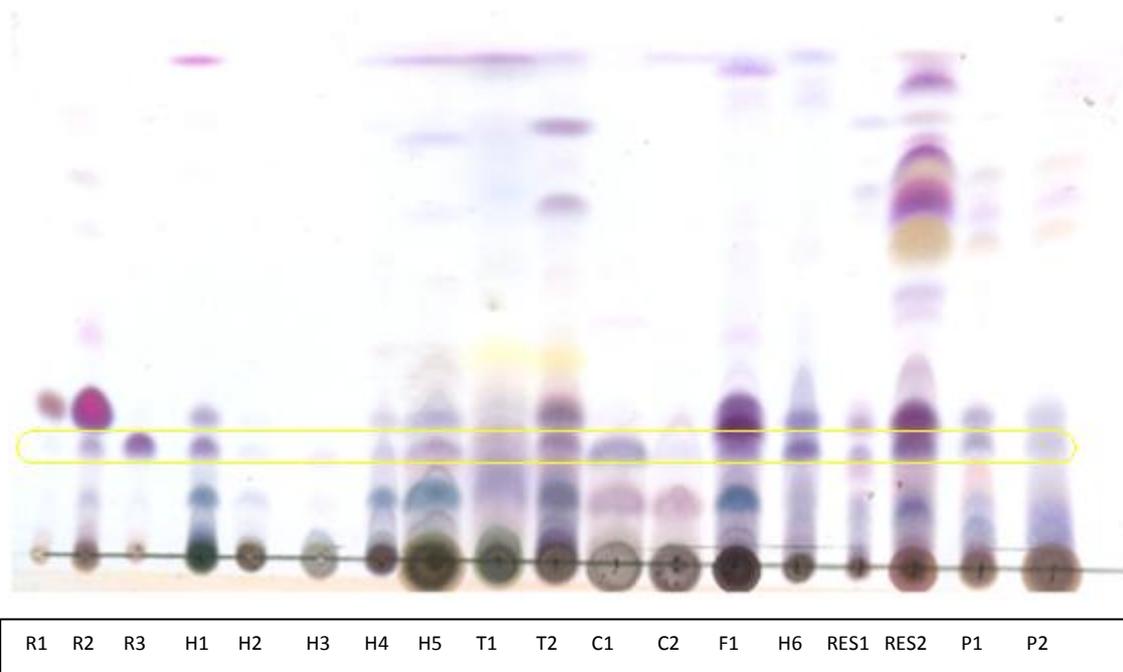


**Figura 6.** Cromatografía en capa fina de gel de sílice. R1:  $\alpha$ -amirina, R2:  $\beta$ -amirina, R3: lupeol, H1. hoja de *Byrsonima crassifolia* H2. hoja de *Acacia paniculata* Willd H3. hoja de *Pithecellobium dulce* (ROXB.) H4. hoja de *Ficus benjamina*, H5. hoja de *Pseudobombax ellipticum*, T1. tallo de *Calendula officinalis*, T2 tallo de *Euphorbia splendens* Bojer C1 Corteza vieja de *Pithecellobium dulce* (ROXB.) C2 Corteza nueva de *Pithecellobium dulce* (ROXB.) T3 tallo de *Euphorbia xantii*, T4 tallo de *Ziziphus amole* RES1 Resina de *Euphorbia splendens* Bojer RES2 Resina de *Ficus elastica* Roxb. P1 Propóleo Ecosur FO ( $\text{CHCl}_2$ ), P2 Propóleo Ecosur ( $\text{CHCl}_2$ ).

Los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina (R1 y R2) eluyen con el mismo RF que el lupeol (R3), como se muestra en la Figura 6, por tanto no se puede afirmar que en cada una de las muestras existe únicamente la presencia de lupeol, sino que también podría tener la mezcla de ambos isómeros.

Para diferenciar los isómeros  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina e identificar la presencia de Lupeol, se realizó una cromatografía en capa fina impregnada con nitrato de plata al 10%.

En la Fig. 7, se observa que el lupeol tiene un menor Rf con respecto a las amirinas y por lo tanto se puede apreciar las muestras que presentan lupeol. Otra forma en la que se puede diferenciar este tipo de isómeros es por medio de la coloración que presentan cuando se revela la cromatopla. El lupeol presentó un color rosa pálido, la  $\alpha$ - amirina presentó un color amarillento pardo y la  $\beta$ - amirina un color fucsia.



**Figura 7.** Cromatografía en capa fina de gel de sílice. impregnada con  $\text{AgNO}_3$  R1:  $\alpha$ -amirina, R2:  $\beta$ -amirina, R3: lupeol, H1.hoja de *Byrsonima crassifolia* H2.hoja de *Acacia paniculata* Willd H3. hoja de *Pithecellobium dulce* (ROXB.) H4.hoja de *Ficus benjamina*, H5.hoja de *Pseudobombax ellipticum*, T1.tallo de *Calendula officinalis* , T2 tallo de *Euphorbia splendens* Bojer C1 Corteza vieja de *Pithecellobium dulce* (ROXB.) C2 Corteza nueva de *Pithecellobium dulce* (ROXB.) T3tallo de *Euphorbia xantii*, T4 tallo de *Ziziphus amole* RES1 Resina de *Euphorbia splendens* Bojer RES2 Resina de *Ficus elastica* Roxb.. P1 Propóleo Ecosur FO ( $\text{CHCl}_2$ ), P2 Propóleo Ecosur ( $\text{CHCl}_2$ ).

En la figura 7 se puede observar las muestras que presentan Lupeol: hoja de *Byrsonima crassifolia*, hoja de *Pseudobombax ellipticum*, tallo de *Euphorbia splendens* Bojer, tallo de *Euphorbia xantii*, tallo de *Ziziphus amole* y resina de *Ficus elastica*.

Mientras que las muestras que presentan  $\alpha$ - amirina,  $\beta$ - amirina o una mezcla de ellas: hoja de *Byrsonima crassifolia*, hoja de *Ficus benjamina* , hoja de *Pseudobombax ellipticum*, tallo de *Euphorbia xantii*, tallo de *Ziziphus amole*, resina de *Euphorbia splendens* Bojer, propóleo Ecosur FO ( $\text{CHCl}_2$ ) y tallo de *Calendula officinalis*.

## SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS CUANTITATIVO

### 4.3 Determinación del contenido de humedad

Se seleccionaron cinco muestras de hojas y dos muestras de corteza para determinar el contenido de humedad. El procedimiento para preparar las muestras se describe en la sección 3.7. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 3: Porcentaje de humedad de muestras**

<b>Muestra</b>	<b>Humedad (%)</b>
Hojas de amate	12.08
Hojas de nanche	17.28
Hojas de guamúchil	9.70
Hojas de cabello de ángel	0.83
Hojas de cubata	1.43
Corteza guamúchil (nueva)	12.77
Corteza de guamúchil (vieja)	9.95
Tallo corona de Cristo	1.14

Los resultados son variables debido al origen de la muestra. El contenido de humedad oscila entre 0.83% con valor mínimo y un 92.5% como valor máximo de humedad, es decir, las muestras no presentaron gran contenido de humedad. Se realizó este proceso debido a que era necesario trabajar con las muestras en base seca.

Del mismo modo, en las muestras de corteza lo que más influye es la madurez fisiológica ya que cuando las frutas llegan al estado de senescencia pierden agua.

#### **4.4 Implementación del método por HPLC**

La cuantificación de lupeol se realizó por cromatografía de alta eficiencia (CLAER) (las características del método son descritas en la metodología).

#### **4.5 Análisis de muestras**

Después de haber preparado las muestras como se indica en la sección 3.6 sólo cambiando el peso de las muestras de hojas, tallos y cortezas por 10g. Se obtuvieron los extractos como se describe en la sección 3.8 y finalmente se prepararon las muestras para HPLC como se explica en la sección 3.11. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

##### 4.5.1 Muestras

Los valores de lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ - amirina obtenidos para hojas, tallos, cortezas y resinas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Porcentajes de lupeol,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ - amirina

Muestras	% lupeol (base seca)(g/100g)	% $\alpha$ amirina (base seca)(g/100 g)	$\beta$ -amirina (base seca)(g/100 g)
Hojas de amate	0.01	0.19	0.09
Hojas de nanche	0.16	0.05	0.04
Hojas de guamúchil	ND	ND	<b>3.7</b>
Hojas de cubata	0.02	0.03	0.31
Hojas de cabello de ángel	0.012	ND	ND
Tallo de limoncillo	0.24	ND	ND
Tallo de flor de muerto	0.04	0.17	0.14
Tallo de Corona de Cristo	0.07	0.13	0.07
Tallo de <i>Euphorbia xantii</i>	<b>2.01</b>	<b>1.13</b>	1.22
Corteza de guamúchil (vieja)	0.01	0.03	ND
Corteza de guamúchil (nueva)	0.09	0.04	ND
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	<b>5.5</b>	<b>2.9</b>	<b>5.4</b>
Resina de corona de Cristo	0.14	0.5	ND

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

Primeramente, se sabe de la literatura que el género *Acacia* presenta lupeol aunque no se describe la cantidad, las hojas de cubata son de este género *Acacia paniculata* Willd, sin embargo no se observó una cantidad apreciable de lupeol.

El tallo de *Euphorbia xantii* resultó ser el que tiene mayor concentración de lupeol.

Con respecto a las cortezas: la corteza de guamúchil nueva tiene mayor contenido de lupeol que la vieja y las hojas de guamúchil en las cuales no fue detectado coincide con lo que se reporta en la literatura ya que describen que en la corteza del tallo se encuentran los triterpenos lupeol y lupenona. (UNAM, 2007)

Los valores de estas muestras son realmente significativas. En la literatura no mencionan que en la resina de *Ficus elastica* Roxb. haya presencia de lupeol, pero si en las hojas de *Ficus religiosa* la cual pertenece a la misma especie (Singh, *et. al.*, 2011) o en el látex de *Ficus carica* (Houda, *et. al.*, 2011) por lo que se puede deducir que en muchas de las especies de este género seguramente encontraremos lupeol.

Análogamente las únicas muestras que representan buena fuente por contener mayor al 1% de lupeol: tallo de *Euphorbia xantii* y resina de *Ficus elastica*.

La diferencia entre las cortezas de guamúchil no fue muy evidente como en el caso del lupeol.

Ambas resinas presentaron cantidades apreciables de  $\alpha$ - amirina.

Las muestras que presentaron mayor concentración de  $\alpha$ - amirina fueron las siguientes: tallo de *Euphorbia xantii* (1.13%) y resina de *Ficus elastica* Roxb. (2.9%).

Los resultados entre tallos y hojas fueron muy variables.

La corteza del guamúchil no presentó  $\beta$ - amirina: a pesar de que se reporta en la literatura (UNAM, 2007).

Las muestras que presentaron mayor cantidad de  $\beta$ - amirina: hojas de guamúchil (3.7%), tallo de *Euphorbia xantii* (1.22%) y la resina de *Ficus elastica* Roxb. (5.4%).

#### 4.5.2 Cromatograma : lupeol, $\beta$ - amirina y $\alpha$ -amirina

El tiempo de retención de epi-lupeol reportado en la literatura es de 12.4 min, es decir, un compuesto menos polar que la  $\beta$ -amirina, la cual tiene un tiempo de retención de 15.3 min y para la  $\alpha$ -amirina el tiempo de retención descrito es de 16.6 min. (Hernández-Vázquez, *et. al.*, 2010).

## **TERCERA PARTE: Obtención de lupeol a escala preparativa**

### **4.6 Obtención de materia prima**

Se seleccionaron las muestras debido a su disponibilidad y costo, además de que la presencia de lupeol se ha descrito en la literatura (Saleem, *et al*, 2009 y Laghari, *et al*, 2011)

### **4.7 Obtención de extractos**

Se trabajó con guamúchil y nanche liofilizado para conservar mejor las muestras. Cuando se liofilizan las muestras se detiene el crecimiento de microorganismos, inhibiendo el deterioro de sabor y color por reacciones químicas y pérdida de propiedades fisiológicas. Asimismo, facilita el almacenamiento de las muestras al reducir su tamaño de partícula.

Por otra parte no fue necesario realizarle ningún tipo de procedimiento de conservación al mango deshidratado comercial ni a la resina de *Ficus elastica* ROXB.

### **4.8 Análisis de muestras**

Primero se obtuvieron los extractos como se describe en el apartado 3.14 y posteriormente se prepararon las muestras como se indica en la sección 3.15.1 y 3.15.2

Los resultados obtenidos en HPLC se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5. Porcentaje de lupeol,  $\alpha$ - amirina y  $\beta$ - amirina en muestras a escala preparativa**

Muestras	% lupeol (base seca)(g/100g)	% $\alpha$ amirina (base seca)(g/100 g)	$\beta$ -amirina (base seca)(g/100 g)
Frutilla de nanche	0.1	ND	ND
Fruto de guamúchil blanco	0.04	ND	<b>0.82</b>
Mango deshidratado comercial	0.004 ó 0.04mg/g	0.03	0.03
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	<b>0.27</b>	<b>0.49</b>	0.41

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

Se reporta la presencia de pulpa de mango 0.18 mg/g (Mohammad, 2010) la cual no coincide con la obtenida, la cual pudo haber sido por no se utiliza el mango en su forma deshidratada.

La forma procesada del alimento influirá en la cantidad de lupeol obtenida. Como se puede ver el caso de la resina de *Ficus elastica*, la cual fue una muestra fresca mostró siendo una cantidad apreciable. El problema de las resinas es el costo y desperdicio ya que para obtener 0.27 % de lupeol se ocuparon poco más de 1 kg de hojas. Podría ser utilizada como alternativa para obtenerse lupeol a nivel industrial, sólo que las hojas deberían ser reutilizadas en otra forma. Esta fue la muestra con mayor cantidad de lupeol.

La muestra de resina de *Ficus elástica* vuelve a presentar una cantidad significativa de este  $\alpha$ - amirina.

En la literatura reportada por Hernández-Vázquez *et al*, 2010 obtuvieron 0.09 g/100g<sub>muestra</sub> de mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina de la corteza del nanche. En este caso no se obtuvo ninguna cantidad de  $\alpha$ -amirina observándose que de la corteza del nanche se obtiene cantidades apreciables de  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina mientras que del fruto no existe presencia de estos triterpenos, pero sí de lupeol.

La resina de *Ficus elastica* sugiere utilizarla para obtener no sólo lupeol sino también  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina a nivel industrial. Además de que las resinas de *Ficus elástica* no necesitan de ningún proceso de purificación ahorrándose el costo que involucra.

El guamúchil blanco presentó la cantidad más apreciable de  $\beta$ - amirina.

## CONCLUSIONES

---

- ❖ La técnica cualitativa de cromatografía en capa fina impregnada con nitrato de plata al 10% permitió diferenciar las muestras de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina de lupeol. Además de ayudar a seleccionar las muestras que se utilizarían para medir en el análisis cuantitativo.
- ❖ Las muestras que presentaron mayores cantidades de lupeol: tallo de *Euphorbia xantii* (2.01%) y resina de *Ficus elastica* Roxb. (5.5%).
- ❖ Las muestras más abundantes en  $\alpha$ -amirina: tallo de *Euphorbia xantii* (1.13%) y resina de *Ficus elastica* Roxb (2.9%).
- ❖ Las muestras con mayor cantidad de  $\beta$ -amirina: hojas de guamúchil (3.7%) tallo de *Euphorbia xantii* (1.22%) y resina de *Ficus elastica* Roxb.(5.4%).
- ❖ La muestra más sobresaliente a escala preparativa fue la resina de *Ficus elástica* Roxb. (árbol del caucho) ya que se obtuvieron los tres triterpenos en concentraciones apreciables : lupeol (0.27%),  $\alpha$  amirina (0.49%) y  $\beta$  amirina (0.41%).

## **Apéndice A. Plantas de estudio.**

### ***Euphorbia splendens*. Bojer o corona de Cristo**

#### **Descripción**

Planta de jugo lechoso, con tallos delgados y espinosos. Hojas caedizas, brácteas del involucreo de color rojo intenso.

Familia: *Euforbacias*.

Origen: Planta originaria de Madagascar y cultivada como ornamental. (Martínez, 1979)



**Figura 8.** Corona de Cristo

### ***Ziziphus amole* o limoncillo**

#### **Descripción**

Árbol (palo) que mide 3 m de alto, de cáscara café. Hojas redondeadas de 3 cm de largo. Las flores son chiquitas de color amarillo. Su fruto es redondo, de color verde cuando está tierno y amarillo a café cuando madura (sazona) en octubre, tiene 1 semilla dura de color café. Florece en tiempo de lluvias por el mes de agosto y se le caen las hojas en septiembre. Se encuentra en el monte, a la orilla del río y en las casas.

### Origen

Santa Cruz, Las Huertitas, La Palma, El Segundo Paso, El Carrizal, Santiago, La Guerrilla, San Francisco y San Pedro Ixcatán.

### Uso medicinal

Para tratar las cortaduras (mochadas): se utiliza el cocimiento de las hojas o de la cáscara del tallo para lavar la parte afectada. El cocimiento de la cáscara se emplea en baños para quitar la sarna el baño se hace diariamente durante cinco días, antes de aplicar el cocimiento se da un baño normal con agua y jabón. (Martínez, 1979)



**Figura 9.** *Ziziphus amole* o limoncillo

### ***Byrsonima crassifolia* o nanche**

#### Descripción

Arbusto hasta de 15 m, hojas opuestas ovadas a elípticas de 4-5 cm, amarillento-tomentosas abajo, flores amarillas primero y rojizas después, fruto globoso amarillo de 1 cm; comestible con una semilla.

Familia: *Malpigiaceas*.

Origen: Sinaloa a Chiapas, Veracruz y Tabasco, etc. (Martínez, 1979)



**Figura 10.** Nanche

***Pithecollobium dulce* (Roxb) Benth o guamúchil.**

Descripción

Árbol espinoso, de 15 a 20 m de altura, tiene el tronco grueso, con madera blanca, corteza delgada y ramas espinosas. Sus hojas están divididas, agrupadas en 4 hojitas. Las flores son bolitas amarillentas, verdosas o rosadas y están reunidas en racimos. Los frutos son vainas verdes y rojizas cuando maduran, están retorcidas y presentan angostamientos a todo lo largo del fruto; las semillas son redondas, negras y brillosas, están rodeadas por una franja blanca rojiza (arilo).

Sinonimia: gumúchil amargo, gumúchil dulce, guamúchil dulce, guamúchil hogadizo, guamuchilo, huamúchil, palo de guamucho, pinzan. En Guerrero: tichi coo bíchí, tíchí, coo yatu (mixteco); Hidalgo: humu, umu; en Oaxaca: pili (huave), íson te cho (amuzgo); en Quintana Roo: chucum blanco (maya-español), pillil, sakchucwm, tsiuche, ts'itsínche, ts'uyche (maya); en San Potosí: jumo, jumu (tenek).

Etnobotánica: El *Pithecollobium dulce* es recomendado en el tratamiento de trastornos digestivos como dolor estomacal, disentería, estreñimiento, indigestión y molestias estomacales en general, así como para proteger el estómago e intestinos. Sin embargo, se utiliza principalmente contra la diarrea, administrando una decoración de la corteza que se toma tres veces al día. A este cocimiento se le puede agregar raíz de tepehuaje (*Lysiloma acapulcensis*),

cogullo de ahuilote (*Vitex mollis*), más quebralato (*Solanum nigrum*) en mayor cantidad, y se toma el té, también tres veces al día.

Con frecuencia es utilizado en casos de empacho, causado por ingerir alimentos descompuestos, caracterizado por la presencia de dolor de estómago, diarrea muy fuerte y calentura. También se utiliza para evitar el aborto, en golpes, llagas y sinusitis. Y se le reporta como astringente y antiinflamatorio.

Familia: *Leguminosae*.

Origen: común en todo el país, en climas cálidos. (Martínez, 1979)



**Figura 11.** guamúchil

### ***Acacia paniculata* Willd o cubata**

#### Descripción

Arbusto o arbolillo espinoso con las espinas encorvadas, hojas bipinadas, con hojuelas linear-oblongas muy numerosas de 3-5 mm, con flores blancas de estambres muy numerosos, dispuestos en cabezuelas y una vaina de 8-15 cm de largo por 2-2.5 cm de ancho.

Familia: *Leguminosae*.

Origen: Michoacán. (Martínez, 1979)

### ***Calendula officinalis* o flor de muerto**

#### Descripción

Arbustito de 30-60 cm o más. Hojas lineares u ovadas, aseradas o dentadas; flores aromáticas, blancas, amarillas o rosadas; fruto capsular de 6mm.

Familia: *Turnaráceas*.

Origen: Sinaloa a Tamaulipas, Yucatán. (Martínez,1979)



**Figura 12.** *Calendula officinalis* o flor de muerto

### ***Ficus elastica* Roxb. o árbol del caucho**

#### Descripción

-Nombre común o vulgar: Ficus de hoja grande, Árbol del caucho, Ficus decora, Árbol de la goma, Gomero, Higuera del caucho.

- Familia: *Moraceae*.

- Origen: Archipiélago malayo; introducida en Europa en 1815.

- El Árbol del caucho es, probablemente, la más conocida de las plantas de interior.

- El género *Ficus* incluye unas seiscientas especies, incluida la higuera común, y se extiende por todas las regiones cálidas del mundo.

- Árbol perennifolio y de robusto desarrollo. En estado silvestre alcanza 30 m o más.

- Tallo erecto provisto de hojas persistentes, coriáceas, alternas, pecioladas, enteras y de forma aovada alargada, puntiagudas en el extremo y de color verde oscuro brillante.
- En sus ramificaciones surgen raíces que pueden arraigar y formar nuevos especímenes.
- Las hojas (grandes, hasta 30 cm), durante un cierto período (cuando la planta es joven) se disponen horizontalmente; después son pendientes. Las nuevas hojas aparecen recubiertas por una bráctea de color rojo vivo.
- Flores: unisexuales (monoicas), raramente dioicas, apétalas. Sin interés ornamental.
- Los frutos, no muy corrientes fuera del ambiente original, son esféricos, rojizos, de 1 cm. de diámetro o poco más, y una superficie lisa, verdosa y punteada.
- Aunque la planta crece con rapidez, cultivada en maceteros se desarrolla más lentamente y nunca llega a alcanzar los tamaños que logra en espacios abiertos.
- Fue cultivado y explotado por su látex que durante mucho tiempo se usó para la fabricación del caucho. La ingestión de esta sustancia o el contacto con la piel puede provocar alergia.
- El látex contiene goma, hidrocarburos, otros compuestos de tipo inorgánico y alcaloides, aceites y enzimas. Su función es sanar las heridas de la planta y defenderla del ataque de sus depredadores.
- Sensible a las heladas, sólo aguanta las de baja intensidad.
- En interiores y exteriores debe recibir abundante luz.
- El suelo tiene que ser poroso, rico en turba, humus y materia orgánica.
- Substrato con 70% tierra negra, 20% resaca de río y 10% turba, con más de 20 cm de profundidad.
- Se debe regar de forma moderada, esperando que el sustrato se seque al menos 1 o 2 dedos.
- Riego abundante cada 3-4 días en verano y semanal en invierno.
- Añadir fertilizante líquido en el agua de riego, cada 15 días en verano.
- En interior tolera calefacción; rociar las hojas cada tres o cuatro días. Agradece las vaporizaciones frecuentes, sobre todo durante el invierno para contrarrestar el efecto de la calefacción.

- Al podar el *Ficus elástica*, se recomienda aplicar sobre el corte polvo de carbón o ceniza, para que la herida cicatrice más rápidamente. Si el látex no coagula con prontitud la planta puede dañarse.
- Cambie de macetero en primavera, sólo si la planta ha crecido demasiado o si la tierra no retiene el agua del riego.
- Es importante mantener sus hojas libres de polvo. Pasar una esponja suave por las hojas todos los meses o cuando observa polvo sobre ellas.
- Los ejemplares jóvenes, con tutor. Clavar con cuidado la caña en el sustrato, a algunos centímetros del tallo, hasta 2/3 de la profundidad del macetero.
- Poda muy ligera de formación y de renovación de ramas dañadas.
- Se podan, sobre todo en ambientes de interior, para ralentizar el crecimiento de la planta, modificar su forma o rejuvenecerla.
- Para inducir la brotación en la parte inferior de la planta se deben podar las ramas superiores (con las que se pueden hacer plantas nuevas). La altura en la que aparecerán los nuevos brotes dependerá de cuánto sea el rebaje. Si se corta muy poco, volverán a salir en la parte superior.
- La especie tipo es muy sensible al amarilleo y caída invernal de hojas.
- Si llegara a perder más hojas que lo normal, puede deberse a un exceso de riego. Plántela nuevamente con nueva tierra y riegue con moderación cuando aparezcan los nuevos brotes.
- Bastante sensible a hongos que producen manchas en hojas.



**Figura 13.** *Ficus elástica* Roxb. o árbol del caucho

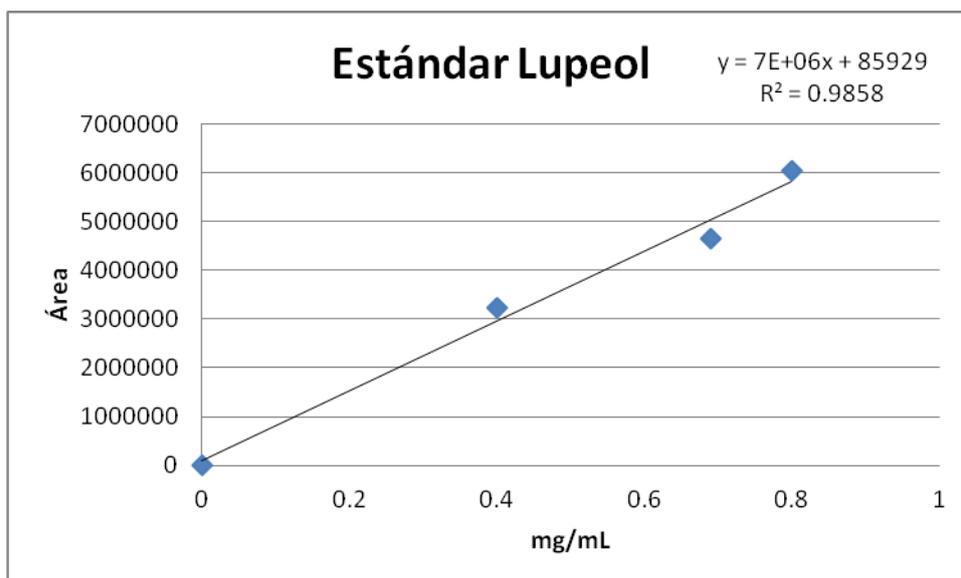
## Apéndice B. Curva Patrón de lupeol, $\alpha$ - amirina y $\beta$ - amirina

### Curva patrón lupeol

Concentración [mg/mL]	Área
0	0
0.4	3239451
0.69	4643526
0.8	6032853

PROMEDIO Tr: 12.4432

DESVIACIÓN: 0.27416

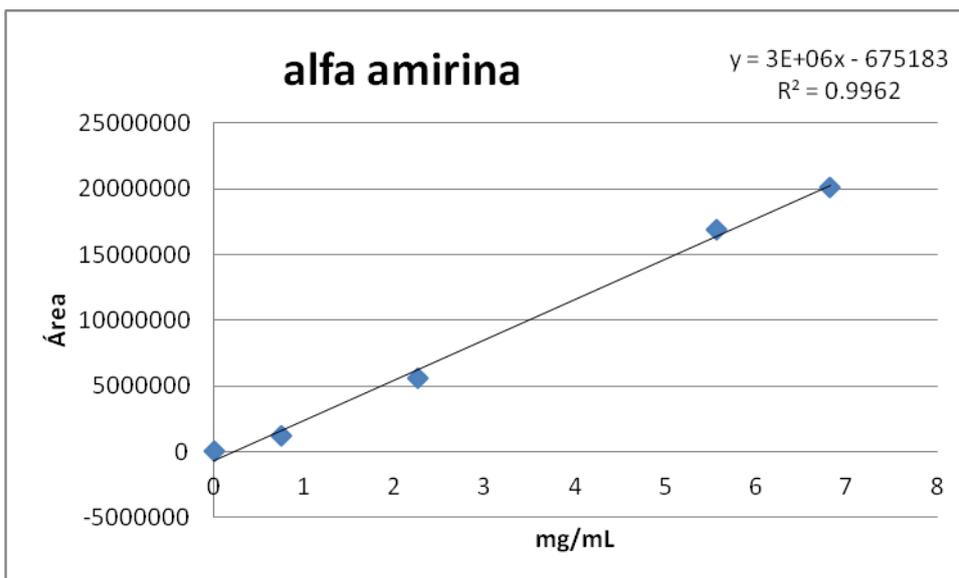


### Curva patrón $\alpha$ - amirina

Concentración [mg/mL]	Área
0	0
0.74	1207757
2.26	5636945
5.56	16900914
6.82	20112191

PROMEDIO: 14.3106

DESVIACIÓN: 0.07128

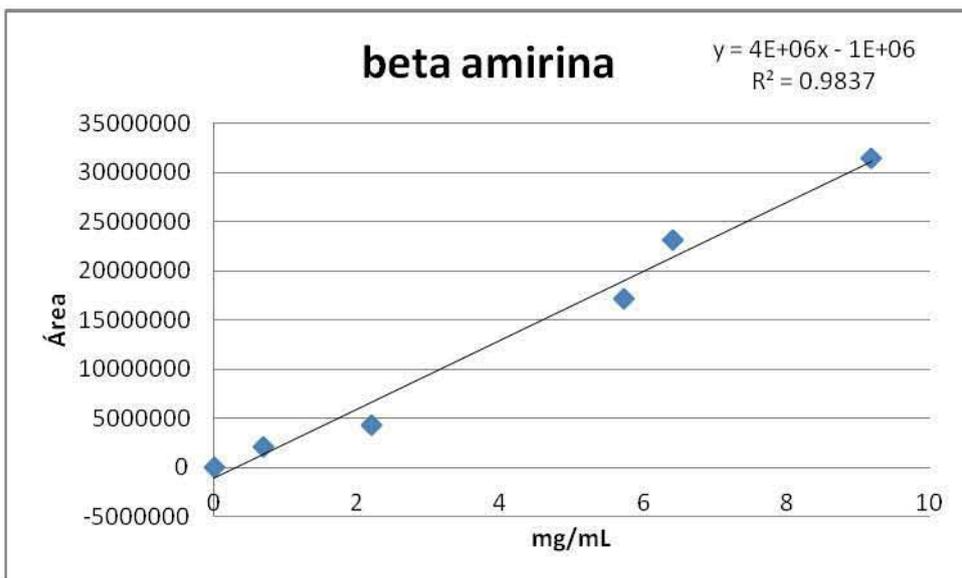


### Curva patrón $\beta$ - amirina

Concentración [mg/mL]	Área
0	0
0.7	2086895
2.2	4361516
5.72	17216514
6.4	23205788
9.18	31411374

**PROMEDIO Tr:** 13.6512

**DESVIACIÓN:** 0.06664



### Apéndice C. Datos HPLC (muestras lupeol)

muestra	mg/mL	Tr	área	%área	Peso extracto (g)	mg lupeol/g planta	Peso muestra seca (g)
Hojas de amate	6.2	12.813	145182	0.27	0.2073	0.005325	10
Hojas de nanche	6.9	12.167	561271	0.87	9.3655	0.0134	763.6
Hojas de guamúchil	9.4					ND	
Hojas de cubata	5.9	11.354	42636	0.13	0.6751	0.003113	10
Hojas de cabello de ángel	5.9	11.03	1110655	15.7	0.415	0.028973	10
Tallo de limoncillo	6	12.224	916463	1.83	0.5109	0.023866	5
Tallo de flor de muerto	6.2	12.567	524556	0.66	0.3209	0.014066	10
Tallo de Corona de Cristo	6.7	12.813	1513797	2.49	0.2102	0.034109	10
Corteza de guamúchil (vieja)	5.5	12.489	754710	1.19	0.0595	0.021835	10
Corteza de guamúchil (nueva)	6.5	12.137	388397	0.59	0.0975	0.010425	10
Tallo de <i>Euphorbia xantii</i>	6.4	12.607	3560535	5.7	1.2395	0.081394	5
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	7.4	12.79	4032242	8	0.06182	0.079501	0.5
Resina de corona de Cristo	10.8	12.25	781036	1.1	0.0627	0.0627	0.5

**Apéndice D. Datos HPLC (muestras  $\alpha$ - amirina)**

muestra	mg/mL	Tr	área	%área	Peso extracto (g)	mg $\alpha$ /g planta	Peso muestra seca (g)
Hojas de amate	6.2	15.682	1036973	1.92	0.2073	ND	10
Hojas de nanche	6.9	16.802	113141	0.18	9.3655	ND	763.6
Hojas de guamúchil	9.4	16.649	180811	0.31		ND	10
Hojas de cubata	5.9	13.967	67783	0.21	0.6751	ND	10
Hojas de cabello de ángel	5.9	11.03	1110655	15.7	0.415	ND	10
Hojas de limoncillo	6	12.224	916463	1.83	0.5109	ND	5
Tallo de flor de muerto	6.2	12.567	524556	0.66	0.3209	ND	10
Tallo de Corona de Cristo	6.7	15.736	599627	0.99	0.2102	0.000836	10
Corteza de guamúchil (vieja)	5.5	16.819	242887	0.38	0.0595	ND	10
Corteza de guamúchil (nueva)	6.5	16.821	194518	0.29	0.0975	0.012571	10
Flor de <i>Euphorbia xantii</i>	6.4	15.626	202271	0.32	1.2395	ND	5
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	7.4	15.657	1206671	2.39	0.6182	0.00896	0.5
Resina de corona de Cristo	10.8	12.25	781036	1.1	0.0627	0.001736	0.5

### Apéndice E Datos HPLC (muestras $\beta$ - amirina)

muestra	mg/mL	Tr	área	%área	Peso extracto (g)	mg $\beta$ /g planta	Peso muestra seca (g)
Hojas de amate	6.2	12.813	145182	0.27	0.2073	0.006747	10
Hojas de nanche	6.9	15.183	249682	0.39	9.3655	0.007812	763.6
Hojas de guamúchil	9.4	15.953	411528	0.69		0.007887	10
Hojas de cubata	5.9	12.573	96718	0.3	0.6751	0.005895	10
Hojas de cabello de ángel	5.9				0.415	ND	10
Hojas de limoncillo	6				0.5109	ND	5
Tallo de flor de muerto	6.2	16.033	139868	0.18	0.3209	0.00648	10
Tallo de Corona de Cristo	6.7	14.764	1219180	2.01	0.2102	0.026133	10
Corteza de guamúchil (vieja)	5.5				0.0595	ND	10
Corteza de guamúchil (nueva)	5.4				0.0975	ND	10
Flor de <i>Euphorbia xantii</i>	6.4	14.991	267756	0.43	1.2395	0.003546	5
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	7.4	14.722	872557	1.73	0.6182	0.017806	0.5
Resina de corona de Cristo	10.8				0.0627	ND	0.5

**Apéndice F Datos HPLC (muestras lupeol,  $\alpha$ - amirina y  $\beta$ - amirina  
escala preparativa)**

muestra	mg/mL	Tr	área	%área	Peso extracto (g)	mg lupeol/g planta	Peso muestra seca (g)
Frutilla de nanche	100 ( $\mu$ l/mL)	11.348	1762919	1.52	2.6007	0.002641	33.4
Fruto de guamúchil blanco	6.5	11.365	10450	0.05	9.1717	0.002118	43.3
Mango deshidratado comercial	1 (mL)	12.125	241172	0.62	0.384	0.046729	10.4515
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	5.6	12.41	2167895	4.66	1.9293	0.321975	1

muestra	mg/mL	Tr	área	%área	Peso extracto (g)	mg $\alpha$ /g planta	Peso muestra seca (g)
Frutilla de nanche	100 ( $\mu$ l/mL)				2.6007	ND	33.4
Fruto de guamúchil blanco	6.5				9.1717	ND	43.3
Mango deshidratado comercial	1 (mL)	14.931	356419	0.92	0.384	0.018719	10.4515
Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.	8.6	15.141	1085360	2.33	1.9293	0.054175	1

muestra	mg/mL	Tr	área	%área	Peso extracto (g)	mg β/g planta	Peso muestra seca (g)
<b>Frutilla de nanche</b>	100 (μl/mL)				2.6007	ND	33.4
<b>Fruto de guamúchil blanco</b>	6.5	13.303	11253	0.05	9.1717	0.003708	43.3
<b>Mango deshidratado comercial</b>	1 (mL)	13.879	253629	0.65	0.384	0.054397	10.4515
<b>Resina de <i>Ficus elastica</i> Roxb.</b>	8.6	14.298	946516	2.03	1.9293	0.141007	1

## Bibliografía

- ⊙ Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.A., Luis A. Salazar-Olivo, Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., , (2011) Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies, *Journal of Ethnopharmacology*, 133:945-972
- ⊙ Al-Rehaily, A.J., El-Tahir, K., Mossa, J., 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, 3:76-82.
- ⊙ Aref, H.L., Gaaliche, B., Fekih, A., Mars, M., Aoni, M., Chaumon, J.P., Said, K. (2011) In vitro cytotoxic and antiviral activities of *Ficus carica* latex extracts, *Natural Product Research*, 25, 3:310-319.
- ⊙ Assimopoulou, A.N., Zlatanov, S.N., Papageorgiou, V.P (2005) “Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates”, *Food Chemistry*, 92:721-727.
- ⊙ Badui, S. (2006) *Química de Alimentos*, Pearson Addison Wesley (México)
- ⊙ Boguslaw, W. (1987), Intracellular Localization of Metabolism of Lupeol and its Palmitate in *Calendula Officinalis* Flowers, *Phytochemistry*, 6:26
- ⊙ Bracho Pérez, J, Rodríguez Best, C., Llanes, F. (2009) Triterpenos Pentacíclicos en Propóleo, *Rev. Soc. Quím. Perú*, 75: 4, 439-452
- ⊙ Cal, K., Kupiec, K., Sznitowska, M. (2006) Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics, *Journal of Dermatological Science*, 41:137-142.
- ⊙ Cañizares Macías, M.P., Duarte Lisci, G.A. (2009) *Fundamentos de Química analítica, teoría y ejercicios*, Departamento de Química Analítica, UNAM, México, 285-287.
- ⊙ Catanzaro, I., Avellone, J., Marci, G., Saverini, M., Scalici, L., Sciandrello, G., Palmisano, L. (2011) “Biological effects and photodegradation by TiO<sub>2</sub> of terpenes present in industrial wastewater”, *Journal of Hazardous Materials*, 185:591-597.
- ⊙ Chaturvedi, P.K., Bhui, K., Shukla, Y. (2008) Lupeol: Connotations for chemoprevention *Cancer Letters*, 263:1–13.

- ⊙ Danner, H., Boeckler, A., Irmisch, S., Yuan, S.B., Chen, F., Gershenzon, J., Unsicker, S.B., Köllner, T.G (2011) "Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*", *Phytochemistry*, 72:897-908.
- ⊙ Deeba, N. Afaq, F., Mukhtar, H. (2008) Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer, *Cancer Letters*, 265:167-176.
- ⊙ Degenhardt, J., Köllner, T.G., Gershenzon, J. (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants, *Phytochemistry*, 70:1621-1637.
- ⊙ Geetha, T., Varalakshmi, P. (1999) Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats, *General Pharmacology*, 32:495-497.
- ⊙ Green, L., (2004). Targets for molecular therapy of skin cancer, *Seminars in Cancer Biology*, 14, 1:63-69.
- ⊙ Gullet, N.P., Amin, R., Bayraktar, S., Pezzuto, J.M., Shin, D.M., Khuri, F.R., Aggarwal, B. B., Surh, Y., Kucuk, O. (2010) Cancer Prevention with Natural Compounds, *Semin. Oncol.*, 37:258-281
- ⊙ Guo, S., Tang, Y., Qian, T., Zhao, J., Qian, D., Su, Shang, S., Shang, E. (2011) Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC–PDA–MS/ELSD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45: 403-417
- ⊙ Hernández-Vazquez, L., Mangas, S., Palazón, J., Navarro-Ocaña, A. (2010) Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with active properties, *Industrial Crops and Products*, 31:476-480.
- ⊙ Hidalgo y Mondragón (1969) Farmacia Química, Alhambra (Madrid), 1-13
- ⊙ J., A.R (2006) Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran, *Phytochemistry*, 67:1977-1984.
- ⊙ Jain, P.S., Bari, S.B. (2010) Isolation of Lupel, Stigmasterol and Campesterol from Petroleum Ether Extract of Woody Stem of *Wrightia tinctoria*, *Asian Journal of Plant Sciences* 9 (3):163-167
- ⊙ Laghari, A.H., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K.M (2011) *Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol, *Industrial Crops and Products*, 34:1141-1145.
- ⊙ Lansky, E.P., Paavilainen, H.M., Pawlus, A.D., Newman, R.A (2008) *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents *Journal of Ethnopharmacology* 119:195-213

- Maldini M., Montoro, P., Pizza, C., (2011) Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56:1-6.
  
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro,P., Giangaspero,A., Balick, M.J., C. Pizza, Della Loggia, L.(2009) Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock *Journal of Ethnopharmacology*, 122:430-433.
  
- Martelanc, M, Vovk, I., Simonovska, B. (2009) Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 1216:6662-6670.
  
- Martelanc, M., Vovk, I., Simonovska, B. (2007) Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography*, 1164:145-152
  
- Martínez, M., (1979) Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de plantas mexicanas, Fondo de Cultura Económica (México) 137, 222,384, 610.
  
- Mauri, P., De Palma, A., Pozzi,F., Basilio,F., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Rossoni, G. (2006) "LC-MS characterization of terpene lactones in plasma of experimental animals treated with *Ginkgo biloba* extracts Correlation with pharmacological activity", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40:763-768.
  
- Mei-Chi Yin (2012) Anti-glycative potential of triterpenes: A mini review, *Biomedicine*, 30:1-8
  
- Megala, J., Geetha, A. (2010) Free radical-scavenging and H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase inhibition activities of *Pithecellobium dulce*, *Food Chemistry*, 121:1120-1128.
  
- Monroy, R., Colín, H., (2004) El guamúchil *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth, un ejemplo de uso múltiple, *Madera y Bosques*, 1, 35-53
  
- Muffler,K., Leipold, D., Scheller, M., Haas, Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus , H.E.,Mirata, M.A., Schrader,J., Ulber, R., (2010) "Biotransformation of triterpenes", *Process Biochemistry*, 523-532
  
- Mutai, C., Bii, C., Vagias,C., Abatis, D., Roussis, V. (2009) Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes, *Journal of Ethnopharmacology*, 123:143-148

- ◎ Nigam, N., Prasad, S., George, J., Shukla, Y. (2009) Lupeol induces p53 and cyclin-B-mediated G2/M arrest and targets apoptosis through activation of caspase in mouse skin”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381:253-258.
  
- ◎ Oliveira, A., Silva, L.R., Andrade, P.B., Valentao, P., Silva, B.M., Goncalves, R.F., Pereira, J.A., Pinho, P.G. (2010) Further Insight into the Metabolite Profile of *Ficus carica*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:10855-10863.
  
- ◎ Oliveira, F., Lima-Junior, R., Cordeiro, W.M., Vieira-Ju´nior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R.C, Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S.N (2004) Pentacyclic triterpenoids, a,h-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78:719-725.
  
- ◎ Parveen, M., Ghalib, R.M., Mehdi, S.H., Hasan Mattu, R.U., Ali, M. (2009) A novel antimicrobial triterpenic acid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. comosa), *Journal of Saudi Chemical Society*, 13:287-290.
  
- ◎ Popova, M.P., Chinou, I.B., Marekov, I.N., Bankova, V. S. (2009) Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis, *Phytochemistry*, 70:1262-1271.
  
- ◎ Preetha, S. P., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, Varalakshmi, P. (2006) Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 143:333-339.
  
- ◎ Pungitore, C.R., García, M., Gianello, J.C., Sosa, M.E., Tonn, C.E. (2005) Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), *Journal of Stored Products Research*, 4:433-443.
  
- ◎ Rosane, M., Aguiar, A., Juceni, P., David, B., Jorge, M., David A. (2005) Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*, *Phytochemistry*, 66: 2388-2392.
  
- ◎ Saleem, M., Alam, A., Arifin, S., Shah, S., Ahmed, A., Sultana, S. (2001), Lupeol, a Triterpene, Inhibits Early Responses of Tumor Promotion Induced by Benzoyl Peroxide in Murine Skin, *Pharmacological Research*, 2:43
  
- ◎ Saleem, R. Ahmad Si, Ahmed M, Faizi Z, Zikr-ur-Rehman S., Ali M (2003) Hypotensive activity and toxicology of constituents from *Bombax ceiba* stem bark, *Biological Pharmacology*, 26:41-6

- Saleem, M., (2009) Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene, *Cancer Letters*, 285:109-11
- Saleem, M. (2010). Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies, *Life Sciences*, 1-9.
- Scarafoni, A. (2007) Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health, *Trends in Food Science & Technology*, 18:454
- Sharapin, N. (2000), *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos*, Ed. CAB, Colombia.
- Siddiqui, I.A, Farrukh A., Adhami V.M., Mukhtar, H. (2008) Prevention of prostate cancer through custom tailoring of chemopreventive regimen *Chemico-Biological Interactions* 171 :122–132
- Siddique, H.R., Saleem, M., (2010) Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies, *Life Sciences*, 3: 1-7
- 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.
- Singh, D., Singh, B., Goel, R.K (2011) Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus religiosa*: A review” *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 565–583
- Sudhahar, V, Kumar, S.A., Varalakshmi, P. (2006) Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic–oxidative stress in experimental hypercholesterolemia, *Life Sciences*, 78:1329-1335.
- Sudhahar, V.,Kumar, S.A., Mythili, Y., Varalakshmi, P. (2007) Remedial effect of lupeol and its ester derivative on hypercholesterolemia-induced oxidative and inflammatory stresses, *Nutrition Research*, 27:778-787.
- Srinivasan,T., Srivastava, G.K., Pathak, A., Batra, S., Singh, K. (2002) “Solid-Phase Synthesis and Bioevaluation of Lupeol-Based Libraries as Antimalarial Agents”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12:2803-2806.
- UNAM, Programa Universitario México, Nación Multicultural, Atlas de las Plantas de medicina tradicional mexicana. BDMTM, México disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>  
Consultado 21/04/12

- ◎ Vaddi, H.K., Ho, P.C., Chan, Y.W., Chan, S. Y. (2002) “Terpenes in ethanol: haloperidol permeation and partition through human skin and stratum corneum changes”, *Journal of Controlled Release*, 81:121-133.
- ◎ Vasconcelos, J.F, Teixeira, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Lúcio, A.S.S.C., Almeida, J.R.G.S., de Queiroz, L.P., Ribeiro-dos-Santos, R., Soares, M.B.P (2008) “The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model”, *International Immunopharmacology* , 8, 1216–1221
- ◎ Wang, L., Weller, C.L.,(2006) “Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants”, *Trends in Food Science & Technology*, 17:300-312
- ◎ INFO JARDÍN en línea: <http://fichas.infojardin.com/arboles/ficus-elastica-arbol-del-caucho.htm> Consultado 20/05/12