



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LUPEOL EN RESIDUOS DE
LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS TROPICALES**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ÁLVAREZ NÁJERA ZELTZIN



MÉXICO, D.F. 2014



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: JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO**

SECRETARIO: **Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

1er. SUPLENTE: **Profesor: PAOLA MALINALLI HERNANDEZ HERNANDEZ**

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.**

ASESOR DEL TEMA:

Arturo Navarro Ocaña

SUPERVISOR TÉCNICO:

Hilda Elizabeth Calderón Villagómez

SUSTENTANTE:

Zeltzin Álvarez Nájera

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México así como a la Facultad de Química por haberme dado esta maravillosa oportunidad de formarme en una de las mejores instituciones a nivel mundial, ha sido todo un reto y una aventura.

A mi mamá Graciela Nájera por su apoyo, amor, formación, recursos y educación otorgada a lo largo de estos 24 años.

A mi asesor de tema Dr. Arturo Navarro por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación y confiar en mí con el desarrollo de este proyecto.

A mi supervisora técnica Dra. Hilda Calderón por su apoyo y orientación con la parte del análisis de lupeol.

A mis sinodales Jose Guillermo de Jesus Aguilar y Jorge Arturo Aburto por el tiempo invertido, buena disposición y retroalimentación brindada en la revisión de mi trabajo escrito.

A mi estimado maestro y amigo Jorge Alejandro Santiago por el apoyo en el laboratorio, ayuda con el CLAE, revisión de este trabajo, comentarios, presión y sugerencias.

De nuevo a Graciela Nájera y Alfredo Betanzos por su tiempo, motivación, consejos, confianza y ayuda con el trámite de titulación.

A todos y cada uno de los profesores de cada asignatura cursada durante toda mi carrera y educación desde preescolar hasta la última asignatura de la carrera, sin duda mi conocimiento y formación se debe al esfuerzo, conocimiento, apoyo y valores transmitidos por cada uno de ustedes a lo largo de este camino. Gracias.

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo económico del proyecto: CONACYT 2012-CB180128 y PAPIIT-IN223611.

Dedicatorias

Para mi mamá por todo su amor, apoyo, cariño y protección que me has dado. Te amo con todo mi corazón. ¡Gracias!. Haber terminado mi carrera es el más valioso obsequio que alguien me pudo dar.

Para mi familia con todo mi amor y gratitud. Y por el granito o montón de arena que han puesto y ayudado para mi educación, crianza, y formación.

Para mi abuelita con todo mi amor para usted, aunque no tuvo la oportunidad de verme terminar, ¡lo logramos!.

Para mi novio precioso.

Para mis amigos de la facultad de química, de Ori, de jazz, de trabajo, inglés y del laboratorio gracias por todo su apoyo en este tiempo y hacer ¡más divertida mi estancia y recorrido en este proyecto!, sin duda hubiese sido muy pesado sin ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS.....	4
CAPITULO I. ANTECEDENTES.....	5
1. Lípidos, isoprenoides y terpenos	5
1.1.Lípidos	5
1.2. Isoprenoides	5
1.3. Terpenos	6
1.4. Triterpenos.....	7
2. Lupeol	8
2.1. Definición	9
2.2. Fuentes de lupeol.....	9
2.3. Biosíntesis de lupeol	11
2.4. Propiedades biológicas del lupeol.....	14
2.5. Métodos de extracción de lupeol	17
2.6. Métodos convencionales de extracción.....	18
2.6.1. Maceración (Frio).....	19
2.6.2. Reflujo o maceración en caliente	20
2.7. Métodos emergentes de extracción	21
2.7.1. Sonicación	21
2.7.2. Extracción asistida por microondas	22
2.8. Métodos de análisis de lupeol	24
2.8.1. Cromatografía en capa fina.....	27
2.8.2. HPLC o CLAE	28
2.8.3. Cromatografía de gases.....	29

2.9. Nutraceúticos	29
--------------------------	----

CAPITULO II.METODOLOGÍA

3.1. Equipos	31
3.2. Reactivos	31
3.3. Estándares empleados	31
3.4. Preparación de revelador para triterpenos	32
3.5. Diagrama general del trabajo experimental	33
3.6. Primera etapa del estudio (análisis cualitativo)	34
3.7. Segunda etapa del estudio (análisis cuantitativo)	36
3.8 Tercera etapa. Evaluación de lupeol en árboles tropicales (hoja, fruto y/o tallo) látex.....	39

CAPITULO III. RESULTADOS

4.1. Primera etapa del estudio (análisis cualitativo)	41
4.1.1. Revisión de las posibles fuentes de lupeol.....	41
4.1.2. Determinación cualitativa de lupeol.....	41
4.2. Segunda etapa del estudio (análisis cuantitativo)	46
4.3. Tercera etapa. Evaluación de lupeol en árboles tropicales (hojas, fruto y/o tallo) y látex.....	50

CONCLUSIONES	56
---------------------------	----

APENDICE A Plantas de estudio	58
--	----

APENDICE B Curva patrón del lupeol	65
---	----

APENDICE C. Cuantificación α y β -amirina mediante HPLC en diversas fuentes	68
---	----

BIBLIOGRAFÍA	70
---------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura del isopentil pirofosfato	5
Figura 1.2. Estructura del isopreno.	5
Figura 1.3. Esquema general de la síntesis de isoprenoides	8
Figura 1.4. Estructura molecular del lupeol	9
Figura 1.5. Síntesis de lupeol a partir del Acetil CoA.	13
Figura 1.6. Equipo utilizado para la extracción por reflujo.	20
Figura 1.7. Estructura química de los triterpenos pentacíclicos: α y β -amirina.	28
Figura 1.8. Esquema de un cromatografo de líquidos de alta eficiencia	28
Figura 4.1 Cromatoplaça en capa fina gel sílice	43
Figura 4.2. Cromatoplaça en capa fina gel sílice impregnada con nitrato de plata	44
Figura 4.3. Cromatoplaça en capa fina gel sílice impregnada con nitrato de plata	45
Figura 4.4. Análisis de CLAE. A=Extracto de hojas de mango secadas al natural mediante reflujo. B= Extracto de hojas de mango secadas por microondas mediante reflujo.	50
Figura 4.5. Cromatograma obtenido del lupeol, α - amirina, uva de mar y resina de Jaca mediante el CLAE	54
Figura 5.1. Fruto de la Jaca	59
Figura 5.2. Fotografía del árbol uva de mar	60
Figura 5.3 Fotografía corona de cristo	61
Figura 5.4. Fotografía flor de mayo	62
Figura 5.5. Árbol y fruto de Nanche.	64
Figura 6.1. Curva patrón del lupeol CLAE.	65
Figura 6.2. Curva patrón de la α -amirina CLAE.	66
Figura 6.3. Curva patrón de la β -amirina CLAE	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Fuentes vegetales en las cuales se ha extraído y/o cuantificado lupeol bajo diferentes métodos de extracción y análisis	10
Tabla 1.2. Fuentes vegetales en las cuales se ha identificado lupeol.....	11
Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de la maceración como método de extracción	19
Tabla 1.4. Ventajas y desventajas del reflujo como método de extracción	20
Tabla 1.5. Ventajas y desventajas de la sonicación como método de extracción.....	22
Tabla 1.6. Ventajas y desventajas de MAE como método de extracción.....	23
Tabla 3.1. Recolección de las diferentes fuentes utilizadas.....	35
Tabla 3.2. Tiempos de secado de diferentes muestras mediante horno de microondas en hule, higuera de hojas chicas y mango	37
Tabla 4.1. Cuantificación de lupeol en diferentes fuentes sometidas a tres diferentes métodos (sonicación, maceración y reflujo) mediante CLAE.....	46
Tabla 4.2. Cuantificación de lupeol en Uva de mar (hoja y tallo), Jaca (pericarpio y pulpa), mango variedad Tomy (pericarpio) y nanche (hoja y fruto) utilizando tres métodos de extracción (sonicación, maceración y reflujo) mediante CLAE.....	51
Tabla 4.3. Cuantificación (valores promedio y desviaciones estándar) de lupeol en diferentes látex mediante CLAE.....	55

RESUMEN

El lupeol, es un triterpeno pentacíclico distribuido en diversas especies del reino vegetal. Ha sido aislado de diferentes fuentes como: el olivo (*Olea Euiope*), pulpa de mango (*Mangifera indica*), aloe (*Aloe vera*) y aceite de ginseng (*Panax quinquefolium*) e identificado en una variedad de plantas medicinales tal como: tamarindo (*Tamarindus indica*), planta del aceite negro (*Celastrus paniculatus*), cabo de hacha (*Zanthoxylum riedelianum*), semul (*Bombax ceiba*), chechén blanco (*Sebastiania adenophora*), membrillo de bengala (*Aegle marmelos*) y amalaka (*Embllica officinalis*) (Hifzur et al., 2011).

En los últimos tiempos, el lupeol ha sido ampliamente estudiado debido a las propiedades farmacológicas que exhibe, tal como función antioxidante, inducción de la apoptosis celular de células tumorales, antiproliferativa, anti-mutagénicas y anti-inflamatorias, así como su eficacia en la inhibición de ensayos *in vitro* e *in vivo* del crecimiento del cáncer. Estudios más recientes muestran inhibición del daño químico del ADN bajo condiciones *in vitro*. El tratamiento con lupeol 1mg en ratones por 7 días previo a la administración de benzopireno (agente mutagénico genotóxico en ratones) muestran una inhibición significativa de este agente mutagénico (Saleem, 2009).

Dada la importancia del compuesto, el objetivo de este estudio fue encontrar nuevas fuentes potenciales de lupeol. Para lograr lo anterior se planteó hacer un estudio que consistió en tres etapas.

En la primera se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer en cuales especies vegetales se ha reportado lupeol. Adicional a esto, se procedió a la identificación cualitativa mediante ensayos de cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas normales e impregnadas con nitrato de plata con la finalidad de corroborar la existencia de lupeol.

Con los resultados obtenidos en la primera etapa, se seleccionaron tres especies vegetales: hojas de hule (*Ficus elástica*), de mango (*Manguifera indica*) y de higuera de hojas chicas (*Ficus oblicua*), las cuales fueron empleadas en la segunda etapa del proyecto que consistió en evaluar la eficiencia de la extracción de lupeol empleando tres

tratamientos diferentes, (sonicación, maceración y reflujo). Las muestras empleadas en esta etapa se secaron mediante dos métodos diferentes; secado a temperatura ambiente- estufa y por microondas, la cuantificación se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Los resultados mostraron que el método de extracción mediante el cual se extrajo una mayor cantidad del compuesto fue diferente para cada especie vegetal debido a las condiciones de cada método, diferencias en la composición y estructura de la pared celular. Con respecto al tiempo de secado, pese a que por microondas se reduce el tiempo, no es un método viable, ya que destruye el lupeol, probablemente debido al efecto corona el cual es causado por la ionización del aire circundante al conductor debido a los altos niveles de tensión causando el deterioro de los materiales ocasionado por el sobrecalentamiento de la muestra.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las etapas previas, en la última etapa se evaluó la concentración de lupeol extraído por maceración, sonicación y reflujo en frutos tropicales y látex. La cuantificación de lupeol se realizó en las especies vegetales: hule (hojas y látex), nanche (hojas), mango (hojas y cáscara), corona de cristo (látex), uva de mar (hoja y tallo), flor de mayo (látex), jaca (cáscara y látex), y en higuera de hojas chicas (hojas).

Los resultados de la cromatoplaqueta en capa fina impregnada con nitrato de plata y los tiempos de retención en la CLAE indican que las hojas de uva de mar (*Coccoloba acrostichoides*) así como la cáscara y látex de jaca (*Artocarpus heterophyllus*) son fuentes potenciales de lupeol debido a que existe en una alta concentración. En cuanto a la jaca se determinaron 1.435 mg/g y 58.48 mg/g de lupeol en cáscara y látex respectivamente, se recomienda utilizar la sonicación y el reflujo como método de extracción. Respecto a la uva de mar se cuantificaron 1.094mg/g de lupeol siendo la maceración el método más eficiente.

INTRODUCCIÓN

El lupeol, ($C_{30}H_{50}O$) compuesto sólido de cristales blancos, es un triterpeno pentacíclico que se encuentra en diversas especies vegetales y se reporta en varias frutas tal como uva, fresa y mango. Dicho triterpeno se ha aislado de un gran número de plantas y látex, como en exudados de higo en donde se ha encontrado en altas concentraciones (Camacho-Madelaine, 2012), así como en col blanca, pepino, tomate, zanahoria, guisantes, soya, calabaza, té negro, higo, moras y guayaba, también se encuentra en abundantes plantas medicinales (Hifzur *et al.*, 2011).

Se han realizado diversos estudios en los cuales se demuestra que este compuesto posee una variedad de propiedades biológicas: antiinflamatorio, hepatoprotector, anti-lipidémico y, principalmente antioxidante. (Hafezz *et al.*, 2011).

Actualmente el lupeol se obtiene como subproducto de la industria de la semilla de altramuz (*Lupinus agustifolius*) y el árbol de Abeto (*HSBD and Pubchem substance*), en donde los principales países productores de estas especies son Australia (altramuz), el continente Europeo, Asiático y Norteamérica respectivamente. Al encontrarse presente en muy bajas cantidades en algunas especies vegetales y al no ser muchas de estas fuentes biodisponibles para la producción industrial sostenible de este compuesto, aunado a la dificultad para sintetizarlo, hace que el costo de este compuesto sea elevado (la presentación de 25mg de lupeol oscila de 3 mil a 4 mil pesos). Por lo anterior y la importancia de las propiedades farmacológicas que exhibe, así como su uso en la industria de fármacos y cosméticos (*Medical Subject Headings*) el objetivo de este trabajo pretende encontrar una fuente nacional con un gran potencial para la producción de lupeol.

OBJETIVO

General

Encontrar fuentes alternativas de lupeol y analizar su potencial mediante tecnologías de extracción y análisis, para la producción nacional sustentable.

Particulares

- Evaluar cualitativamente el contenido de lupeol en hojas, tallos, frutos y/o látex de las posibles fuentes potenciales mediante cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas de gel de sílice así como cromatoplasmas impregnadas con nitrato de plata con la finalidad de diferenciar la α y β amirina del lupeol.
- Evaluar el rendimiento de extracción empleando dos métodos diferentes de secado; 1) temperatura ambiente-estufa, 2) las microondas, y al utilizar tres métodos diferentes: sonicación, maceración y reflujo.
- Implementar un método de CLAE para la cuantificación de lupeol.
- Evaluar cuantitativamente mediante CLAE el contenido de lupeol en frutos tropicales y evaluar que órgano es el más potencial para extraer este compuesto.
- Establecer cuáles son las fuentes potenciales para la extracción de lupeol y bajo que método.

CÁPITULO I. ANTECEDENTES

1. Lípidos, isoprenoides y terpenos.

1.1. Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de biomoléculas. Debido a esta diversidad, el término de lípidos se acuña a aquellas sustancias de un organismo vivo que son solubles en disolventes no polares como cloroformo, éter y acetona pero no solubles en agua (Ikan R. *et al.*, 2008). De acuerdo a su composición y función, los lípidos pueden ser clasificados de diferentes maneras, tal como: ácidos grasos, triacilgliceroles, ceras, fosfolípidos, esfingolípidos e isoprenoides.

1.2. Isoprenoides

Los isoprenoides son una amplia gama de biomoléculas, las cuales contienen cadenas repetidas de cinco carbonos conocidas como unidades de isopreno como se muestra en la Figura 1.2. Los isoprenoides no se sintetizan a partir del isopreno (metil butadieno), ya que su biosíntesis comienza con la formación del isopentil pirofosfato (Figura 1.1) formado a partir del acetyl CoA (McKee *et al.*, 2012).

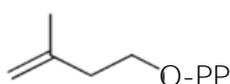


Figura 1.1. Estructura del isopentil pirofosfato.

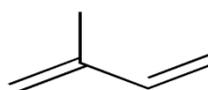


Figura 1.2. Estructura del isopreno.

Los isoprenoides, están presentes en una amplia variedad de organismos vivos, aunque con una notable diversidad en las plantas. Más de 40, 000 isoprenoides diferentes se han identificado y nuevos compuestos se reconocen constantemente (Hans *et al.*, 2011). Éstas biomoléculas funcionan como constituyentes de membranas, pigmentos fotosintéticos, transportadores de electrones, factores de crecimiento y como hormonas (McKee *et al.*, 2012).

Dentro de los isoprenoides se encuentran los terpenos y esteroides. Los terpenos son enormes grupos de moléculas que se encuentran en los aceites esenciales de las plantas, mientras que los esteroides se derivan de sistemas de anillos hidrocarbonados de colesterol.

Los isoprenoides de las plantas (mejor conocidos como terpenoides) son comercializados como sustancias aromáticas empleadas en alimentos, bebidas, cosméticos, vitaminas, insecticidas naturales, etc.

1.3. Terpenos

Los terpenos son metabolitos secundarios muchos de ellos conocidos por realizar funciones biológicas específicas en plantas y animales. Este grupo de compuestos se encuentra ampliamente distribuido en plantas y otros organismos. La palabra deriva de “turpentina” (trementina) que es la fracción volátil obtenida de la oleorresina que exuda de la superficie de un corte del pino resinero (Santos-Hernandez, 2008). Muchos de estos aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad como perfumes, medicinas, narcóticos, pigmentos, conservadores, etc.

Un ejemplo de las funciones que cumplen los terpenos se presenta en la muña (*Mintostachys mollis*) un arbusto del Perú: al ser consumidas las hojas de esta planta por los insectos, se incrementa considerablemente la emisión de pulegona y mentona en las hojas. Estos dos terpenos son considerados como insecticidas naturales pues son tóxicos para algunos insectos que parasitan dicha planta, inclusive en la misma hoja el efecto insecticida de ambos terpenos impide la gestación de parásitos. En este caso ambos terpenos funcionan como agentes de defensa de la planta. (Santos-Hernandez, 2008).

Respecto a su biosíntesis, los terpenos muestran un similar origen biogénico, en donde el isopentil pirofosfato y el dimetil pirofosfato se unen para dar lugar al monoterpeno, en el caso de los triterpenos se forman a partir de dos equivalentes de farnesil pirofosfato (Kaufman *et al.*, 1999). Esta variedad de combinaciones y oxidaciones dan

lugar a una amplia gama de terpenos los cuales pueden ser clasificados de acuerdo a las unidades de cinco carbonos que contienen, como se muestra a continuación:

Hemiterpeno: C₅

Monoterpeno: C₁₀

Sesquiterpeno: C₁₅

Diterpeno: C₂₀

Sesterpeno: C₂₅

Triterpeno: C₃₀

Tetraterpeno: C₄₀

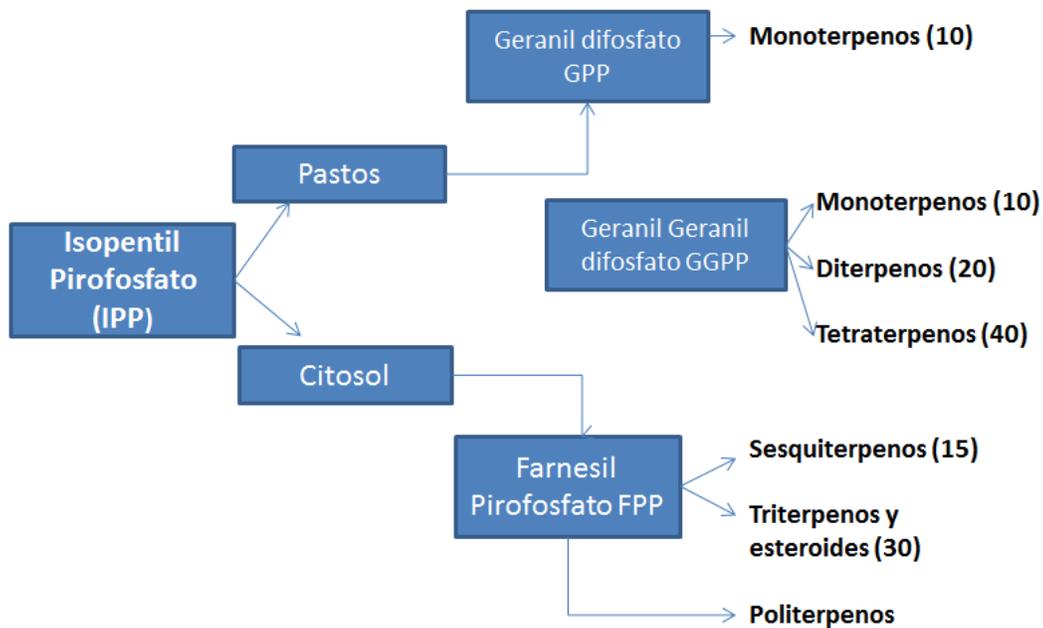
1.4. Triterpenos: C₃₀

Los triterpenos son compuestos derivados de 30 carbonos, con una amplia distribución, se encuentran en el hombre, plantas, hongos, bacterias, algunos corales y en anfibios. (Gúzman-Juarez, 2011). Diferentes triterpenos, aislados de productos naturales, se han estudiado y se les atribuye diversas propiedades terapéuticas como: antiinflamatorios, antibióticos, con actividad antituberculosis, antimetastásicos, antiviral, antifúngicos, antitumorales, antidiabéticos, antiulcerosos y anticarcinogénicos (Gúzman-Juarez, 2011).

Los triterpenos proceden de la ciclación del 3S-2,3-epóxido-2,3-dihidroescualeno o, más raramente del mismo escualeno. Casi siempre hidroxilados en tres (debido a la apertura del epóxido), presentan una gran unidad estructural: las principales diferencias se deben a su configuración y van unidas a la conformación adoptada por el epoxiescualeno (o el escualeno) antes de la ciclación; el catión que se produce en esta ciclación puede sufrir a continuación una serie de desplazamientos 1,2 de protones y de metilos que justifican la existencia de los diferentes esqueletos tetra y pentacíclicos que caracterizan este grupo (Guzmán-Juarez, 2011). El esquema general de la síntesis se muestra en la Figura 1.3.

Los triterpenos se pueden encontrar ya sea en su estado libre o bien acompañados de azúcares (glicósidos). Respecto a la clasificación se proponen diversos métodos; dentro de los principales se encuentra la división por familias la cual toma en cuenta el nú-

mero de anillos que los conforma (aciclicos, tetraciclicos y pentaciclicos) los cuales a su vez se encuentran subclasificados por grupos (α -amirina, β -amirina, lupeol, etc). Los triterpenos han sido investigados por diversas técnicas tales como: cromatografía líquida, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).



(Roberts, 2007)

Figura 1.3. Esquema general de la síntesis de isoprenoides.

2. Lupeol

Como se mencionó anteriormente, la importancia del lupeol radica en las propiedades farmacológicas que presenta, por ejemplo función antioxidante, inducción de la apoptosis celular de células tumorales, antiproliferativa, anti-mutagénica y anti-inflamatoria, así como su eficacia en la inhibición de ensayos *in vitro* e *in vivo* del crecimiento del cáncer. Estudios más recientes muestran inhibición del daño químico del ADN bajo condiciones *in vitro*. El tratamiento con lupeol 1mg en ratones por 7 días previo a la administración de benzopireno (agente mutagénico genotóxico en ratones) muestran una inhibición significativa de este agente mutagénico (Saleem, 2009).

2.1. Definición

El lupeol $C_{30}H_{50}O$ es un compuesto sólido, en forma de cristales blancos, con punto de fusión de 215 a 216 °C y $[\alpha]_D + 26.4$ ($CHCl_3$), UV ($CHCl_3$): $\lambda_{max} = 228$ nm, IR (KBr): Máx= 3354 (OH), 2940 (C-H) cm^{-1} , peso molecular: 426.7174 g/mol. Debido a la gran cantidad de enlaces C-C y C-H, la naturaleza de estos enlaces es covalente y su momento dipolar es mínimo, lo que lo hace soluble en disolventes no polares (Talamantes-Gomez, 2011).

Debido a la gran actividad biológica ha sido ampliamente estudiado, una variedad de trabajos demuestran que el lupeol posee propiedades farmacológicas tales como, antiinflamatorio, hepatoprotector, antilipidémico y, principalmente antioxidante. (Hafezz *et al.*, 2011).

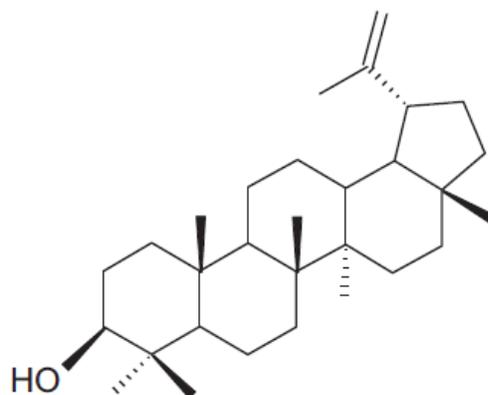


Figura 1.4. Estructura molecular del lupeol (Hafeez, 2011).

2.2. Fuentes de lupeol

El lupeol, tal como se muestra en la Figura 1.4, es un triterpeno que se encuentra presente en diversas especies vegetales. Este triterpeno pentacíclico se ha aislado de un gran número de plantas y látex; en exudados de *Ficus carica* (Camacho-Madelaine, 2012); en vegetales como la col blanca, pepino, tomate, zanahoria, guisantes, soya,

calabaza, té negro; frutos como el higo, fresas, uvas, moras y guayaba; incluso en abundantes plantas medicinales tales como *Tamarindus indica*, *Celastrus paniculatus*, *Zanthoxylum riedelianum*, *Bombax ceiba*, *Sebastiania adenophora*, *Aegle marmelos* y *Embllica officinalis* (Hifzur, 2011). En varias especies se ha extraído, analizado y reportado la concentración de lupeol; en aceituna (3µg/g); fruta de mango (1.80 µg/g); hoja de aloe (280 mg/g de hoja seca) y aceite de ginseng (15.2 mg/100g de aceite) (Hafezz *et al.*, 2011). En la Tabla 1.1 y Tabla 1.2, se muestran las fuentes en las cuales se ha reportado lupeol bajo diferentes métodos de extracción e identificación.

Tabla 1.1. Fuentes vegetales en las cuales se ha extraído y/o cuantificado lupeol bajo diferentes métodos de extracción y análisis.

Fuente	Cantidad (%)	Método de extracción	Método de identificación	Referencia
Pimiento (<i>Capsicum annum L.</i>)		Ultrasonificación utilizando como disolvente terbutilmetil eter	Cromatografía de gases-espectrómetro de masas	Szakiel A. <i>et al.</i> , 2012
Berenjena (<i>S. melongena L.</i>)	0.74% de lupeol en extracto	Ultrasonificación utilizando como disolvente terbutilmetil eter	Cromatografía de gases-espectrómetro de masas	Szakiel A. <i>et al.</i> , 2012
Tomato (<i>L. esculentum L.</i>)		Ultrasonificación utilizando como disolvente terbutilmetil eter/metanol (9:1)	Cromatografía de gases-espectrómetro de masas	Szakiel A. <i>et al.</i> , 2012
Hojas de Amate (<i>Ficus benjamina</i>)	0.01	Maceración 24 horas. Utilizando como disolvente cloruro de metileno	Cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía en capa fina.	Villavicencio-Armenta, 2012
Hojas de Nanche (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	0.16			
Látex corona de cristo (<i>Euphorbia splendens</i>)	0.14			
Látex de hule o caucho (<i>Ficus elastica</i>)	5.5			
Mango (<i>Manguiferina indica</i>)	0.04			
Guamuchill (<i>Pithecellobium dulce</i>)	0.04			
Hoja de acoque (<i>Pseudobombax ellipticum K.</i>)	4.7	Soxhlet 18 horas. Utilizando como disolvente etanol	Cromatografía de gases-detector de ionización de fama y cromatografía en capa fina.	Talamantes-Gómez, 2011
Hoja Palo mulato (<i>Bursera simaruba</i>)	5.43			
Hoja de nanche (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	12.71			
Corteza de tamarindo (<i>Tamarindus indica</i>)	8.83			
<i>Ficus racemosa</i>	1.8	Extracción asistida por microondas. Disolvente: metanol	Cromatografía líquida de alta eficiencia	Kumar <i>et al.</i> , 2013
<i>Ficus racemosa</i>	1.15	Soxhlet 8 horas. Utilizando metanol como disolvente		
<i>Alhagi maurorum</i>		Maceración 48 horas. Utilizando como disolvente metanol	Cromatografía de gases-espectrómetro de masas	Hafezz <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1.2. Fuentes vegetales en las cuales se ha identificado lupeol.

Fuente	Referencia
Morera (<i>Morus alba</i>)	Saleem, 2009
Aloe (<i>Aloe vera</i>)	
Higo (<i>Ficus carica</i>)	
Olivo (<i>Olea europe</i>)	
Soya (<i>Soya bean</i>)	
Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	
<i>F. involuta</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2013
<i>F. cotnifolia</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2010

2.3. Biosíntesis de Lupeol

La biosíntesis de este compuesto es análoga a la formación de cualquier triterpeno pentacíclico, la cual comienza con la biosíntesis del isopentil pirofosfato Figura 1.1. Esta síntesis en plantas superiores y algunos tipos de algas puede llevarse a cabo mediante dos vías diferentes: una localizada en el citosol, y la otra en los plástidos. En el caso del lupeol la biosíntesis del isopentil pirofosfato se realiza en el citosol.

2.3.1. Síntesis del isopentil pirofosfato en el citosol

La síntesis del precursor isopentil pirofosfato comienza con la reacción de dos moléculas de acetil CoA para producir acetoacetil CoA, el cual reacciona con otra molécula de acetil CoA para generar el β -hidroxi- β metilglutaril CoA (HMG CoA). En plantas esta reacción es catalizada por la enzima HMG CoA sintasa. La esterificación del grupo carboxilo del HMG CoA es reducido por dos moléculas de NADPH acompañado por la hidrólisis de un enlace tioéster. Así el mevalonato es sintetizado a partir de una reacción irreversible para después llevarse a cabo dos fosforilaciones sucesivas; catalizadas por dos diferentes cinasas. Posteriormente se genera un doble enlace mediante una descarboxilación y el consumo de tres moléculas de ATP (Figura 1.5). La síntesis del isopentil pirofosfato, el cual es un elemento básico de las cadenas de isoprenoides,

se lleva a cabo en el citosol al igual que la síntesis de sesquiterpenos y triterpenos (Hans *et al.*, 2011).

El lupeol se forman a partir de dos equivalentes de farnesil pirofosfato (Kaufman *et al.*, 1999), para después proceder a la ciclación, el esquema general de esta síntesis se muestra en la Figura 1.5.

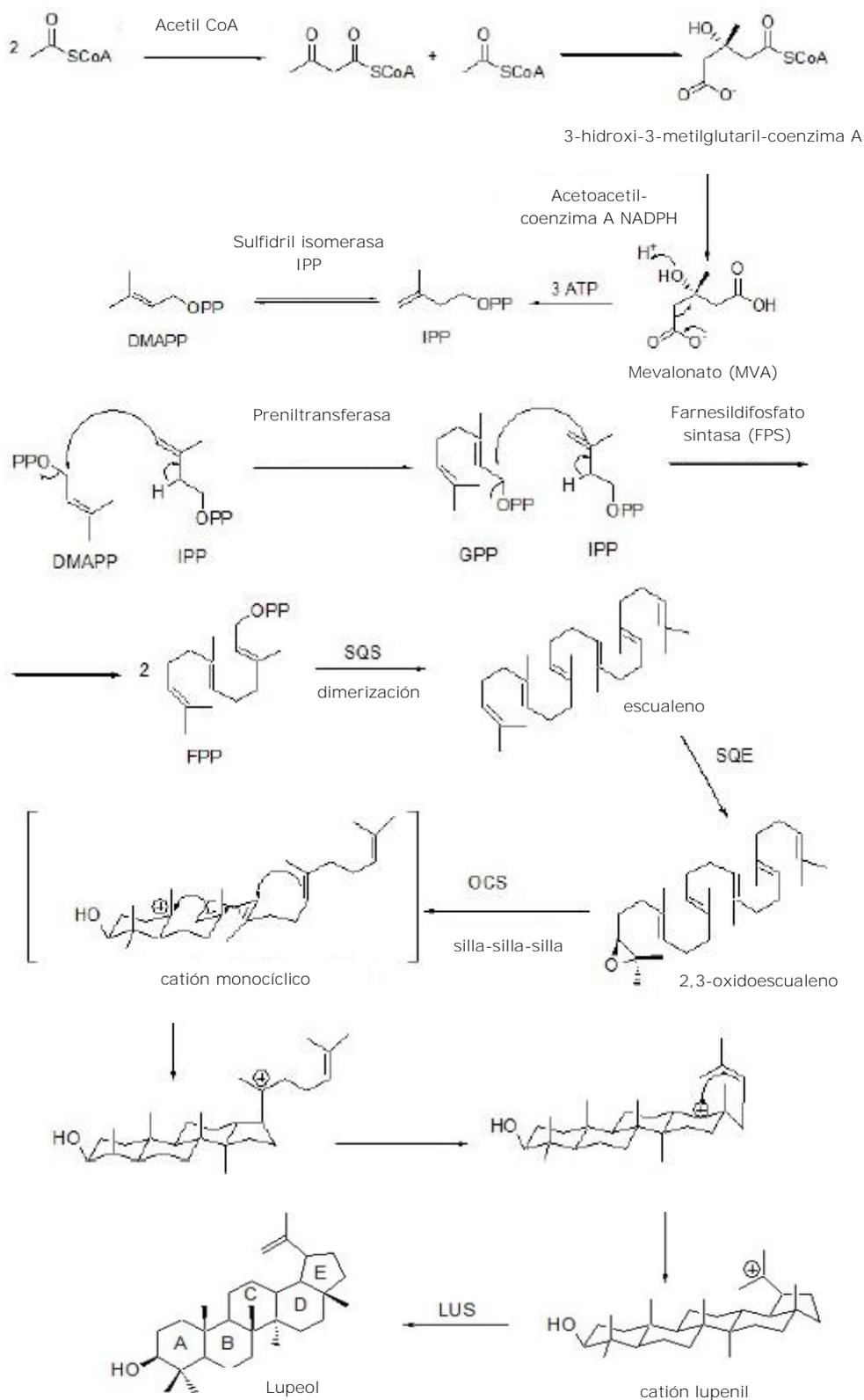


Figura 1.5. Síntesis de lupeol a partir del Acetil CoA. IPP= Isopentil Pirofosfato; DMAPP=Dimetilalil pirofosfato; GGP= Geranyl pirofosfato; FPP=Farnesil pirofosfato;

SQS= Escualeno sintasa; SQE= Escualeno epoxidasa; OSC= Oxidoescualeno ciclasa; LUS=Lupeol sintasa. (Gallo- Margareth *et al.*, 2009).

2.4. Propiedades biológicas del lupeol

Este compuesto exhibe una gran variedad de propiedades biológicas como: actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, efectos protectores contra la inflamación, artritis, diabetes, problemas de corazón, problemas renales y hepáticos.

Además ha mostrado actividad supresora sobre células T, inhibición de la producción de interleucina 2 (IL-2), disminución de la secreción del factor de necrosis tumoral e interferón gamma y reducción de la fagocitosis, además se describe que posee un débil efecto inmunoestimulador sobre la producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos (Dupuy L *et al.*, 2013). También presenta actividad antiprotozoaria, antifúngica y anticancerígena las cuales se describe en los siguientes párrafos.

2.4.1. Actividad antiprotozoaria.

Una gran variedad de las enfermedades más severas en el mundo han sido causadas por protozoarios tal como la malaria y leishmania. En bioensayos realizados *in vitro* e *in vivo* se utilizó lupeol contra ciertas variedades de Leishmania y Trypanosoma, los resultados demostraron que el lupeol produce cambios irreversibles en la pared celular de los eritrocitos de la célula hospedera (Gallo- Margareth *et al.*, 2009).

El lupeol y algunos compuestos relacionados han sido utilizados en varios estudios, contra diferentes especies de protozoarios. Ziegler *et al.* (2004) explican el modelo de acción del lupeol antimalaria.

2.4.2. Actividad Antiinflamatoria

La inflamación es una cascada de eventos bioquímicos, la cual involucra el sistema vascular, y el sistema inmune, se caracteriza por cinco síntomas básicos: rubor, calor, dolor, hinchamiento y pérdida de alguna función (Gallo-Margareth *et al.*, 2009). Esto

puede ocurrir como una respuesta a agentes dañinos externos como químicos irritantes, toxinas, patógenos, etc.

Se ha demostrado que diversas plantas medicinales empleadas como tratamiento contra la inflamación, contienen lupeol como compuesto activo. En función de corroborar lo anterior Bani *et al.* (2006) realizaron una serie de experimentos mediante los cuales se redujo la actividad antiinflamatoria en vías respiratorias.

De igual manera Gallo-Margareth y colaboradores en el 2009 observaron la reducción de la inflamación de un tejido, mediante la aplicación tópica de lupeol.

2.4.3. Actividad Anticancerígena:

El cáncer es una enfermedad la cual se caracteriza por: el anormal e ilimitado crecimiento de las células, la insensibilidad de los inhibidores de crecimiento, la eventual invasión de tejidos y metástasis (Gallo-Margareth *et al.*, 2009).

Estudios recientes muestran que el lupeol inhibe el daño químico del ADN bajo condiciones *in vitro* (Saleem, 2009).

Se ha demostrado que el lupeol no afecta la viabilidad de las células epiteliales, aunque si muestra acción contra células cancerígenas de la próstata. Bioensayos *in vivo* corroboran que la aplicación de 1.8 μ M de lupeol actúa en contra de las células cancerígenas sin afectar la viabilidad de las células epiteliales de la próstata.

El modelo *in vivo* de ratón usando implantes de células corroboró la actividad anticancerígena del lupeol al reducir significativamente el tamaño del tumor, después del tratamiento con 1 mg tres veces a la semana (Rajendran *et al.*, 2008).

La aplicación tópica de lupeol (40 mg / kg / tres veces a la semana) durante 28 semanas ha demostrado reducir significativamente la carga tumoral, el número de tumores y aumentar el período de latencia del tumor en los modelos de ratón (Palanimuthu, 2012).

Manoharan y colaboradores en el 2012 reportaron que la administración oral de lupeol a una dosis de 50 mg/kg previene la formación de tumores bucales debido a que inhibe

la carcinogenesis en células orales de hámster debido al 7,12-dimetilbenz(a) anthracene (DMBA).

2.4.4. Actividad antiartritis

La potente actividad del lupeol como agente antiartrítico se ha demostrado en diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. La artritis es una enfermedad sistémica, causada por la alteración lisosomal y metabolismo del tejido conectivo (Hifzur *et al.*, 2011). Hifzur *et al.*, (2011) reportan que existen una variedad de estudios en los cuales se utilizan modelos de ratón, y demuestran que el tratamiento con lupeol reduce los niveles de enzimas lisosomales aumentando los niveles de colágeno. Mejorando las condiciones de los animales artríticos.

2.4.5. Actividad antimicrobiana

Gallo-Margaret y colaboradores (2009), reportan estudios en los cuales se demuestra que el lupeol presenta significativas zonas de inhibición en cultivos de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumonia* a una concentración de 30 µg/100 µL.

Además de las principales propiedades biológicas: antiinflamatoria, antitumoral y quimiopreventiva que exhibe el lupeol, también posee otras funciones, por ejemplo ha sido usado como uno de los principales componentes en la formulación anti alérgica patentada por Kovalenki en el 2008, así como también reduce la actividad de la α -amilasa e inhibe la actividad de la tirosina fosfatasa 1B enzimas consideradas blanco en el tratamiento contra la diabetes mellitus, además de utilizarse como compuesto en cremas anti edad, lociones, geles y labiales a una concentración del 0.2-3% debido a la capacidad de mantener la textura de la piel, la integridad y promover la regeneración de las células epidérmicas (Gallo-Margaret *et al.*, 2009).

2.4.6. Toxicidad del Lupeol

Se ha reportado, que la administración oral de lupeol en dosis de 2g/Kg no produce efectos adversos en ratas y ratones, después de 96 horas de observación, no se repor-

tó mortalidad. Así mismo en aplicaciones tópicas de 80mg lupeol/Kg tres veces por semana durante 28 semanas no produjo algún efecto toxico en ratones (Geetha *et al.*, 1998, Saleem *et al.*, 2004, Patocka, 2003) citado en Saleem, 2009.

2.5. Métodos de extracción de lupeol.

A continuación se muestran algunos ejemplos en los cuales se ilustran la obtención de lupeol en diferentes fuentes vegetales. Hafeez *et al.* (2011) realizaron dos maceraciones sucesivas utilizando metanol como disolvente durante 48 horas, el extracto fue concentrado a presión reducida mediante el empleo de un rotavapor.

Por otro lado, el lupeol ha sido extraído mediante reflujos sucesivos empleando un equipo soxhlet, y cuantificado usando cromatografía de gases (Kpoviéssi, 2008).

Villavicencio-Armenta en el 2012 trabajó en la extracción de lupeol en flor de muerto, corona de cristo, nanche, cubata y guamúchil, utilizando 1 g de muestra en un matraz de Erlenmeyer con 50mL de diclorometano lo macero durante 24 horas a temperatura ambiente y concentró a presión reducida con el empleo de un rotavapor.

Talamantes-Gómez (2011) empleó tres tratamientos para la extracción de lupeol de las hojas de nanche: maceración en frío durante 24 horas, sonicación durante 20 minutos y soxhlet por 18 horas, utilizando hexano, acetona y etanol como disolventes.

Para la extracción de lupeol se han propuesto una gran variedad de condiciones y solventes empleados en las técnicas de extracción convencionales, por ejemplo Kumar y colaboradores (2013) extrajeron lupeol en hojas de *Ficus racemosa*. Colocaron 1g de hojas secas con 100mL de metanol en un equipo soxhlet durante 8 horas. También utilizaron la maceración como método de extracción colocando 1g de planta seca con 100 mL de metanol durante 24horas.

Hernández-Vázquez *et al.* (2010) extrajeron amirinas y epi-lupeol utilizando soxhlet durante 12 horas con n-hexano, el extracto se filtró y evaporo a presión reducida a 40°C, para después ser analizadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Ruiz-Montañez *et al.* (2014) extrajeron lupeol mediante extracción asistida por microondas la muestra fue liofilizada y se colocaron 10g en un frasco con hexano expuestos a la radiación en una cámara de microondas (SHARP R-320BG), operando a 600 W. La extracción se llevó a cabo mediante ciclos de radiación de 1.5 minutos y 10 min de enfriamiento para mantener una temperatura de 25°C.

Kumar *et al.*, (2013) extrajeron 18 µg de lupeol /g en hojas secas de *Ficus racemosa* utilizando como método extracción asistida por microondas. Colocaron 1 g de la muestra seca en un frasco de 250 mL emplearon metanol como disolvente a diferentes concentraciones (20-50 ml) usando diferentes rangos de microondas (20-50% de 700W) de 1 a 3 minutos.

Las técnicas de extracción como: el ultrasonido, las microondas, fluidos supercríticos y la extracción acelerada con disolventes se han utilizado recientemente para la extracción de nutraceuticos a partir de plantas, con la finalidad de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de disolvente, aumentar el rendimiento y mejorar la calidad de los extractos (Talamantes-Gómez, 2011).

A continuación se hablará más a detalle de los métodos de extracción generales de fitocompuestos.

2.6. Métodos convencionales de extracción.

Los métodos convencionales de extracción incluye la separación de compuestos activos de tejidos animales o de plantas, compuestos bioactivos como lípidos, fitoquímicos, sabores, olores y pigmentos usando solventes selectivos y procesos estandarizados. En los siguientes párrafos se habla del fundamento de los principales métodos convencionales de extracción.

2.6.1. Maceración (Frío)

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el solvente. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción. El método consiste en sumergir el producto con una cantidad suficiente de solvente durante un lapso de tiempo largo (Pasto, 1992). Las ventajas y desventajas de este método se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de la maceración como método de extracción.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none">-Requiere equipos muy simples-Se requieren mínimas cantidades de energía-Económico-Se extrae prácticamente la totalidad del producto sin sufrir alguna alteración	<ul style="list-style-type: none">-Se requieren periodos de tiempo extensos para lograr una extracción adecuada

Esta técnica de extracción presenta una variedad de usos: Cejudo-Bastante y colaboradores en el 2013 utilizaron esta técnica para estudiar compuestos volátiles de los frutos como la naranja, limón, lima, toronja y fresa. Asimismo, debido a que este método es ampliamente empleado para la extracción de compuestos vegetales no volátiles utilizados en los productos farmacéuticos Siqueira y colaboradores en el 2011 lo emplearon como método para la obtención de compuestos fenólicos de *S. paludosum*.

2.6.2. Reflujo o maceración en caliente

Método directo en el cual se coloca el sólido, junto con el disolvente en un matraz y se coloca un refrigerante en posición vertical para que se condense el disolvente que está hirviendo y no se pierda, tal como se muestra en la Figura 1.6, hasta que el producto deseado se encuentre disuelto en dicho disolvente (Pasto, 1992). Las ventajas y desventajas de este método se muestran en la Tabla 1.4.

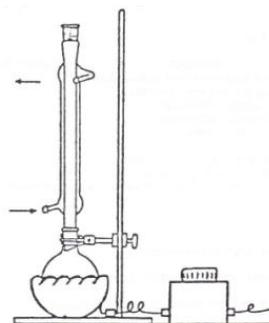


Figura 1.6. Equipo utilizado para la extracción por reflujo.

Tabla 1.4. Ventajas y desventajas del reflujo como método de extracción.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none">- Al utilizarse temperaturas elevadas, se favorece la extracción del analito.- Gran capacidad de recuperación- Instrumentación simple	<ul style="list-style-type: none">-Es un proceso lento-No aplicable a analitos termolábiles, que se descompongan o reaccionen con calor

El uso de esta técnica es bastante amplio, se ha utilizado para la extracción de compuestos fenólicos en vegetales, Aguirre (2013) utilizó esta técnica para la extracción de compuestos fenólicos del nopal. Adicional a esto, se ha utilizado para la extracción de aditivos antioxidantes de polímeros; Arias y colaboradores en el 2009 extrajeron aditivos como el Irganox 1076 e Irgafos 168 a partir de polietileno de alta y baja densidad empleando reflujo.

2.7. Métodos emergentes de extracción.

Una gran variedad de métodos se han evaluado para la extracción y comercialización de compuestos activos de las plantas. Por lo que existe una demanda creciente por encontrar nuevas técnicas mediante las cuales se reduzca el tiempo de extracción, el consumo de disolvente, así como reducir la contaminación. Estas nuevas técnicas incluyen: la ultrasonificación, la extracción por microondas y la extracción acelerada por disolvente. Como principales ventajas de estas técnicas es la posibilidad de trabajar a elevadas temperaturas y/o presiones, disminuyendo el tiempo de extracción y el costo por la disminución del consumo de solvente.

2.7.1. Sonicación

Este procedimiento incluye el uso de ondas ultrasónicas, las cuales tienen una frecuencia mayor a 20 kHz, presentan buenos efectos en el rendimiento y la cinética de la extracción. A diferencia de las ondas electromagnéticas, las ondas sonoras, viajan a través de la matriz produciendo ciclos de compresión y expansión en el medio. La expansión puede crear burbujas en el medio líquido y originar una presión negativa. Las burbujas formadas crecen y finalmente colapsan. Bajo la acción del ultrasonido, las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran debido a la rápida difusión del sólido al solvente (Shah M., 2013). Las ventajas y desventajas de este método se muestran en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Ventajas y desventajas de la sonicación como método de extracción.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Es una técnica económica simple y eficiente, alternativa a la extracción convencional - Rápida - Se puede operar a temperaturas bajas, para los compuestos termolábiles - Comparado con las nuevas técnicas como la extracción por microondas asistido es más económico y fácil de operar - Se puede utilizar cualquier solvente y una amplia variedad de compuestos 	<ul style="list-style-type: none"> - Los compuestos activos pueden sufrir un deterioro, generándose radicales libres los cuales pueden causar cambios indeseables en el compuesto de interés

El uso de esta técnica es bastante amplio; se ha utilizado como método para extraer saponinas del ginseng observando que el rendimiento de extracción aumenta desde 15 a 30%, se ha extraído limoneno aumentando la velocidad de extracción de 1.3 a 2 veces comparando con los métodos tradicionales así como extraído una variedad de compuestos bioactivos a partir de *Salvia officinalis* y *Hibiscus tiliaceus*, antioxidantes de *Rosmarinus officinalis* y algunos esteroides y terpenoides de *Chresta spp* (Shah M., 2013).

2.7.2. Extracción asistida por microondas

El campo de ondas electromagnéticas se encuentra dentro del rango de 300 MHz a 300 GHz con longitudes de onda de 1 cm a 1m. En este método de extracción las mi-

microondas calientan toda la muestra al mismo tiempo. En el caso de extracción, la ventaja del calentamiento por microondas es que los puentes de hidrogeno promueven la rotación del dipolo. El efecto de las microondas es completamente dependiente de la naturaleza del solvente y la matriz sólida. Los disolventes usados generalmente tienen un amplio rango de polaridades desde heptano hasta agua. Algunas veces la matriz puede interactuar con las microondas, así una baja constante dieléctrica del disolvente sería una ventaja para materiales termosensibles (Shah M., 2013).

La extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) ofrece una rápida liberación de energía lo que provoca el calentamiento eficiente y homogéneo del solvente y la matriz.

Los componentes de la muestra absorben la energía de acuerdo a la constante dieléctrica del medio. El calor provoca la evaporación de humedad y crea una alta presión de vapor lo cual rompe la pared celular del sustrato y libera el contenido en el solvente. La extracción puede ser modulada empleando una mezcla de solventes (Shah M., 2013).

Las principales ventajas y desventajas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1.6. Ventajas y desventajas de MAE como método de extracción.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Calentamiento eficiente y homogéneo del solvente y la matriz. - Se reduce el consumo de solvente. - Es bastante reproducible - Comparado con otras técnicas como la extracción por fluido supercrítico es más simple y de un menor costo. 	<ul style="list-style-type: none"> - La eficiencia de la extracción puede ser pobre cuando el compuesto a extraer o los solventes son no polares o volátiles.

La extracción asistida por microondas puede utilizarse para la extracción de nutraceuticos en plantas debido a que es más rápido comparado con los métodos convencionales de extracción. Entre las aplicaciones se tiene la extracción de puerarina de *Radix puerariae*, además de reducir drásticamente el tiempo de extracción de saponinas del ginsen de 12 horas (mediante un método convencional) a segundos. Así mismo una gran cantidad de compuestos activos han sido obtenidos mediante esta técnica, entre los cuales se encuentran: taxanos de *Taxus brevifolia*, limonoides de *Azadirachta indica* y ácido glicirrónico de raíces de *Glycyrrhiza glabra* (Shah M., 2013).

2.8. Métodos de análisis de lupeol

La identificación y cuantificación de lupeol se ha realizado mediante diversos métodos dentro de ellos se encuentra el empleo de cromatoplasmas de gel de sílice eluidas con una variedad de sistemas de solventes tal como tolueno/metanol (9:1), *n* hexano /acetato de etilo (5:1), tolueno/acetato de etilo/ metanol (7.5:1.5:0.7) o tolueno/ cloroforno/acetato de etilo/ácido acético glacial (10:2:1:0.03), el lupeol es detectado y cuantificado por densitometría después de reaccionar con una solución ácida de anisaldehído (Gallo-Margaret *et al.*,2009).

Debido a la gran similitud en la estructura entre la α y β -amirina y lupeol (Figura 1.4 y 1.7) al correr una cromatoplasma en capa fina los tres compuestos son eluidos a la misma distancia, por lo que utilizando este método de identificación de lupeol, se podría confundir con la presencia de la α y/o β -amirina. Por esta razón, existen trabajos en los cuales se utilizan cromatoplasmas de gel de sílice impregnadas con nitrato de plata y posteriormente eluidas con hexano/diclorometano/ acetato de etilo (8:1:1) observándose la separación del lupeol, el cual presenta un menor R_f (distancia que recorre el compuesto de interés en la cromatoplasma) con respecto a las amirinas.

Talamantes-Gómez (2011) menciona que la cromatografía en capa fina (TLC) es una herramienta poderosa, especialmente para la detección de triterpenoides de extractos de plantas, el análisis es rápido y sencillo ya que no se necesita pre-tratamiento de la

muestra y un gran número de muestras pueden ser analizadas de forma simultánea, la TLC de gel de sílice se ha utilizado para análisis cualitativos, así como para cuantitativos en la determinación de α -amirina y lupeol. Este autor utilizó cromatografía en capa fina impregnada con nitrato de plata al 10% como una técnica para diferenciar la α y β -amirina del lupeol. Observó que el Rf del lupeol fue menor comparado con el de las amirinas permitiendo diferenciarlas. Esta cromatoplaque fue impregnada con una solución de nitrato de plata al 10% y secada en estufa durante 2h a 30°C, la muestra fue aplicada y posteriormente se eluyó con hexano:acetato de etilo (9:1) y reveló con una solución de anisaldehído.

Para la identificación cualitativa de α , β -amirina y 3-epilupeol Hernández-Vázquez *et al.* (2010) disolvieron el extracto crudo de lupeol en cloruro de metileno para aplicar la muestra sobre una cromatoplaque de gel de sílice (Merck Darmstadt, Germany), la cromatoplaque fue eludida empleando una solución de hexano-diclorometano-metanol (10:10:1). Los tripterpenos se detectaron revelando la cromatoplaque con una solución de anisaldehído-ácido sulfúrico y calentando la cromatoplaque a una temperatura de 80-100°C por 5 minutos. La identificación se realizó comparando el color y Rf de la banda contra el estándar. Para el análisis de 3-epilupeol la cromatoplaque se eluyó previamente con una solución de nitrato de plata al 10% y fue secada en estufa a 100°C durante 1 hora.

Una de las técnicas recientemente usadas para la detección y cuantificación de lupeol, es la cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa (FR-CLAE), en la cual Gallo-Margaret y colaboradores (2009) mencionan que se ha empleado agua y acetonitrilo con un contenido de ácido fosfórico como fase móvil y un detector de UV a 210 nm con la finalidad de determinar lupeol y otros catorce triterpenos pentacíclicos en resinas comerciales

Hernández-Vázquez *et al.* (2010) identificaron α -amirina, β -amirina y 3-epilupeol mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, utilizando la columna Hypersil_m ODS (250*4.6mm) mediante un sistema isocrático utilizando metanol como fase móvil durante 25 min. El flujo utilizado fue de 0.9ml/min y el volumen de inyección de 20 μ L a tem-

peratura ambiente. Los compuestos se identificaron y compararon mediante la comparación del tiempo de retención y la concentración del estándar respectivo en la curva de patrón.

Ruiz-Montañez y colaboradores en el 2014 identificaron lupeol usando un sistema de CLAE equipado con doble bomba y un detector de UV. La separación se realizó en una columna C-18 Thermo Scientific (250*4,6mm). Utilizando una velocidad de flujo de 1 ml/min. La fase móvil utilizada para lupeol fue metanol a una velocidad de 90 ml / min durante 15 min, con detección a 210 nm.

Villavicencio-Armenta en el 2012 analizó y cuantificó lupeol en extractos de flor de muerto, corona de cristo, nanche, cubata y guamúchil mediante CLAE, las muestras se analizaron a una longitud de onda de 210nm interpolando los resultados de las muestras con la curva de calibración de los estándares α -amirina, β -amirina y lupeol. La columna empleada fue ODS Hypersil Dim (250*4.6mm) con un flujo metanol 0.9mL/min, Isocrático.

Kumar *et al.* (2013) realizaron un diseño de experimentos para probar diferentes condiciones de extracción empleando como técnica la extracción asistida por microondas en hojas de *Ficus racemosa*, disolvieron el extracto en metanol y lo filtraron por una membrana de 0.45 mm para cuantificarlo mediante CLAE.

Hafeez *et al.* (2011) cuantificó lupeol en el extracto de *Alhagi maurorum* mediante el método LC-MS (Cromatografía Líquida- Espectrometría de Masas). La fase móvil estuvo compuesta por metanol (A) y ácido fórmico (B) con un flujo isocrático de 1mL/min durante 6 minutos. El tiempo de retención de lupeol fue de 4 minutos. La curva de calibración fue de 0.3-5 mg/L. El compuesto se identificó y cuantifico mediante la comparación del tiempo de retención contra el estándar y la curva de calibración.

La cromatografía de gases es una técnica que Talamantes-Gómez (2011) utilizó para la cuantificación de lupeol en distintos vegetales. Utilizó un cromatógrafo de gases (Software Chemstations) y un detector de ionización de flama con el siguiente gradiente de

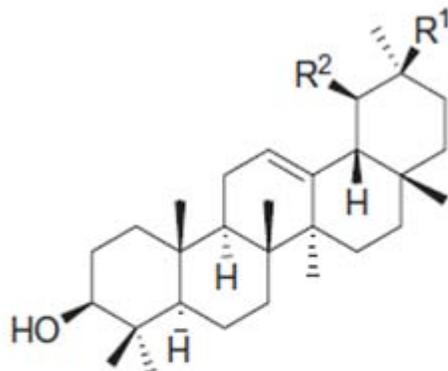
temperatura: inicial de 200°C/1min se incrementó hasta 260° C permaneciendo por 5 minutos, se volvió a incrementar a 300°C/17min; tiempo total de corrida de 35 minutos.

En los siguientes párrafos se habla de manera más detallada los métodos de análisis generales utilizados para la detección de fitoquímicos.

2.8.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía es una técnica sencilla, rápida y de bajo costo, en la cual se identifican, separan y/o cuantifican por densitometría dos o más compuestos orgánicos presentes en una mezcla. La metodología consiste en emplear una placa de vidrio o una lámina metálica, que se cubre con una película de unos 250 µm de espesor de un adsorbente (gel de sílice u óxido de aluminio, entre otros). Esta separación se lleva a cabo en un recipiente, que contiene un agente eluyente hasta una altura de 0.5 cm; las sustancias que se separan se detectan posteriormente de forma apropiada. Por variación y preparación adecuada de la capa de adsorción se consigue el análisis de mezclas de sustancias tanto hidrófilas como lipófilas. La mayor ventaja de este método, junto con su gran capacidad de separación, es la rapidez del proceso, que en general, requiere solamente de 10-30 minutos (Beyer, 1987).

Esta técnica resulta adecuada tanto para la separación de vitaminas, terpenos, esteroides y pigmentos como para la de aminoácidos, azúcares, nucleótidos, ácidos nucleicos, alcaloides, medicamentos e incluso para la de aniones y cationes inorgánicos (Beyer, 1987).



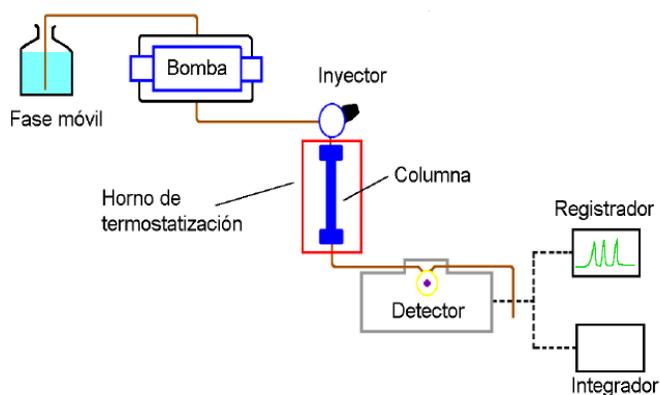
$R^1=H, R^2=Me$; α - amirina
 $R^1=Me, R^2= H$; β - amirina

(Haldar *et al.*, 2014).

Figura 1.7. Estructura química de los triterpenos pentaciclicos: α y β -amirina.

2.8.2. HPLC o CLAE (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)

En la cromatografía líquida de alta eficiencia, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria) tal como se muestra en la Figura 1.8 al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir estarán separadas (MNCN, 2014).



(MNCN, 2014)

Figura 1.8. Esquema de un cromatografo de líquidos de alta eficiencia .

2.8.3. Cromatografía de Gases

La cromatografía es un método físico de separación en el cual la fase móvil es un gas, los gases comúnmente usados en esta técnica son el helio, hidrógeno y nitrógeno. La elección del gas acarreador depende principalmente de las características del detector. Las muestras pueden ser gases o líquidos volátiles las cuales se introducen a través de un septum de plástico por medio de una jeringa, fase móvil en esta método de separación es continua hasta que los solutos recorren toda la columna y salen uno tras otro para entrar al detector. El tiempo de retención de un analito sobre su columna depende de su relación de partición el cual a su vez está relacionado con la naturaleza química de la fase estacionaria.

Este método resulta especialmente adecuado en la técnica de control continuo de determinados procesos; en el análisis cuantitativo de C, H y N ha desplazado a todos los demás métodos (Beyer, 1987).

2.9. Nutraceuticos

Debido a la gran cantidad de funciones biológicas que exhibe el lupeol tal como antioxidante, inducción de la apoptosis celular de células tumorales, antiproliferativa, antimutagénicas y anti-inflamatorias, al ser un compuesto bioactivo que se encuentra en una gran variedad de alimentos y ser utilizado como compuesto en fármacos es considerado un nutraceutico.

En los últimos 20 años el número de compuestos nutraceuticos disponibles como medicamentos para la venta en farmacias, supermercados y tiendas de comida saludable ha tenido un enorme crecimiento. El aumento de consumo de estos compuestos, se debe a que es una alternativa al tratamiento de enfermedades cuando los medicamentos no muestran efectividad, o bien como una alternativa a los efectos secundarios de estos fármacos (Lockwood, 2007).

Nutraceutico, es un término utilizado para describir componentes medicinales, o nutrientes, incluyendo alimentos plantas o materiales naturales, que pueden ser concen-

trados o purificados, y son usados para el mantenimiento y mejoramiento de la salud, así como para tratar o prevenir enfermedades (Lockwood, 2007). Cabe mencionar que existe una controversia en la definición y esto dependerá del autor.

A continuación se muestran diferentes definiciones con matices diferentes:

1. La doctora Maureen Mackey de la Monsanto Company, define como alimentos nutraceúticos o funcionales a “los alimentos que proveen beneficio para la salud más allá de la nutrición básica” (Boucher, 2000).
2. Nutraceútico es un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades (Sociedad española de la nutraceútica médica)
3. Suplemento dietético que contiene formas concentradas o agentes bioactivos de los alimentos, presentes en una matriz no alimenticia, y es usado para potenciar la salud, en dosis mucho mayores a las que podrían encontrarse de manera natural en los alimentos (Lockwood, 2007).

Un estudio de mercado llevado a cabo por Mintel sobre vitaminas, minerales y suplementos (incluyendo algunos nutraceúticos) en el Reino unido, reportó que el 25 % de todos los adultos estaban convencidos de los efectos benéficos de estos compuestos, además el 86% de personas mayores de 55 años, así como el 65% de jóvenes entre 20 y 24 años de edad dijeron que consumían suplementos por lo menos una vez al día. De acuerdo con estas encuestas el consumo de estos productos continúa incrementándose (Lockwood, 2007).

Los consumidores ingieren suplementos nutraceúticos por muchas razones: debido a que requieren suplementación pues tiene una dieta pobre, para mejorar la salud (en general), prevenir o retrasar enfermedades que se presentan en la vejez, después de una enfermedad, estrés y/o mejorar el rendimiento deportivo (Lockwood, 2007).

CAPITULO II. METODOLOGÍA

3.1. Equipos:

- Microbalanza AG245 Máx. 41g- 410/d= 0.01 mg-0.1 mg Mettler Toledo.
- Campana de extracción.
- Rotavapor R-205 Buchi, Buchi Helating Bath B490
- HPLC Water con doble bomba, Automuestreador Waters 2847 y Detector UV con doble longitud de onda waters 2487, controlador con una computadora Dell cuyo software es Breeze 3.0
- Sonicator Branson 1510R-MTH Bransonic ® Ultrasonic cleaner 70W 42KHz \pm 6%
- Equipo de Reflujo
- Agitador Orbital Lab-line Modelo 4629
- Balanza OHAUS CT-600-S capacidad 600x0.1g; opera de 0 a 40°C y a una humedad relativa de 10- 65%
- Horno de microondas

3.2. Reactivos:

- Placas Gel de Silice
- Acetona Q.P. (CH₃)₂CO, Ensayo 99%, humedad 0.5%, PM: 58.08
- Acetato de etilo
- Hexano Q.P (C₆H₁₄), Ensayo 98%, Rango de destilación: 30-60°C, PM: 86.18+
- Cloruro de metileno

3.3 Estándares Empleados:

- α - Amirina (Preparados en el laboratorio 321)
- Lupeol L5632-25MG \geq 95%, STORE AT 2-8°C, SIGMA-ALDRICH CAS: 545-47-1 C₃₀H₅₀O PM:426.7

3.4. Preparación de revelador para Triterpenos

Reactivo de Anisaldehído: solución de 100 mL (84.8% MetOH+ 9.9% ácido acético glacial+ 4.9% H₂SO₄ + 0.48 % de anisaldehído en baño de hielo).

Cromatoplaça impregnada con nitrato de plata: La cromatoplaça de gel de sílice fue eludida con una solución al 10 % de nitrato de plata utilizando agua desionizada, después se metió a la estufa a secar por 30 minutos a 30° C.

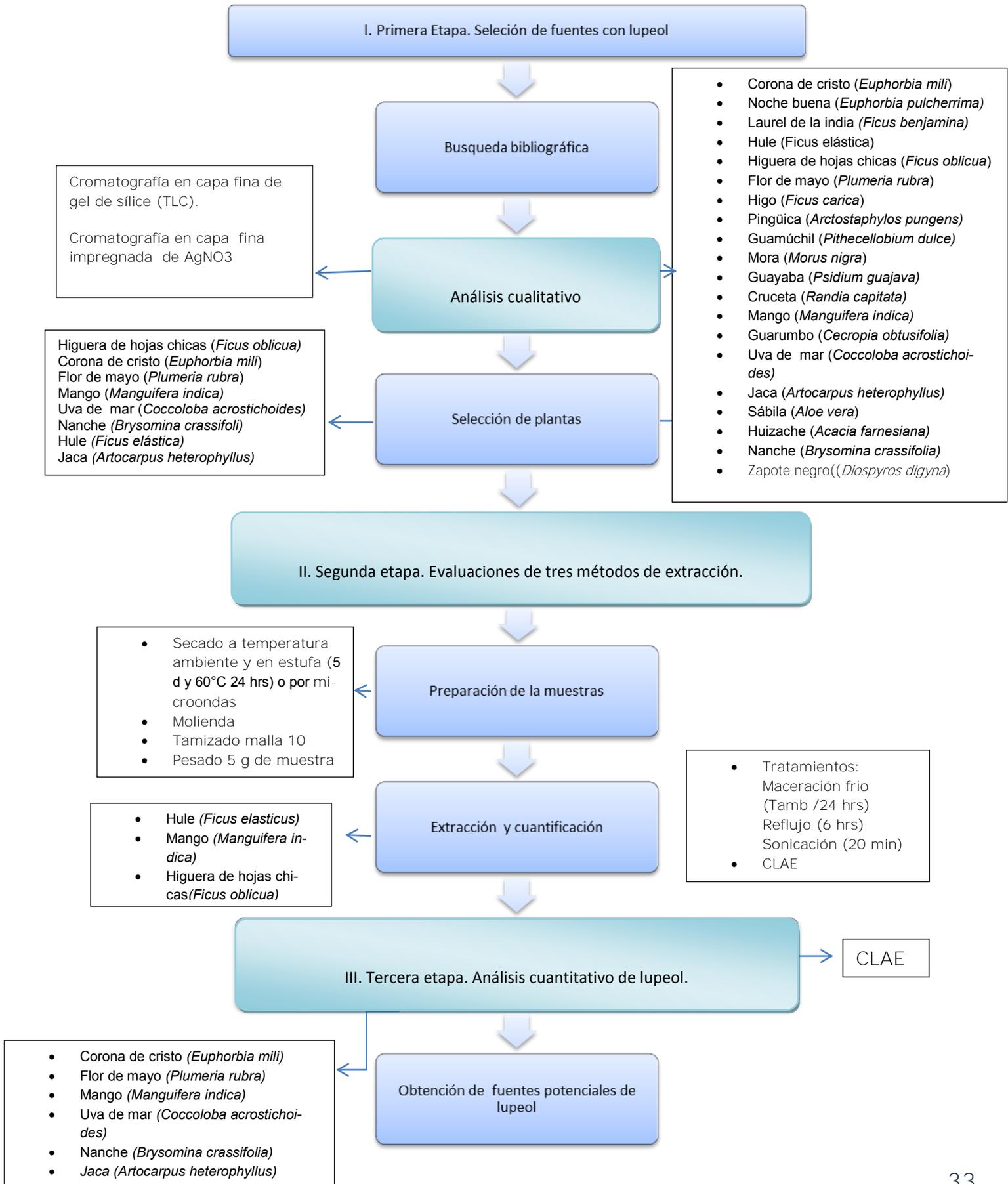
Disolvente: como disolvente para la extracción se utilizó cloruro de metileno, el cual es un disolvente orgánico, con una alta capacidad de solvatación hacia el lupeol y bajo punto de ebullición (39° C) para su eliminación.

En la siguiente página, se presenta el diagrama general del trabajo experimental el cual se dividió en tres etapas. En la primera se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer en cuales especies vegetales se ha descrito el contenido de lupeol. Adicional a esto, se procedió a la identificación cualitativa mediante ensayos de cromatografía en capa fina utilizando cromatoplaças normales e impregnadas con nitrato de plata con la finalidad de corroborar la existencia de lupeol.

Con los resultados obtenidos en la primera etapa, se seleccionaron las hojas de tres especies vegetales: hule, mango e higuera de hojas chicas, las cuales fueron empleadas en la segunda etapa del proyecto que consistió en evaluar la eficiencia de la extracción de lupeol empleando tres tratamientos diferentes, (sonicación, maceración y reflujo). Las muestras empleadas en esta etapa se secaron mediante dos métodos diferentes; secado a temperatura ambiente-estufa y por microondas, la cuantificación se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

En la tercera etapa del estudio se evaluó la concentración de lupeol extraído por maceración, sonicación y reflujo en frutos tropicales y látex. El lupeol se cuantificó en las especies vegetales hule (hojas y látex), nanche (hojas), mango (hojas y cáscara), corona de cristo (látex), uva de mar (hoja y tallo), flor de mayo (látex), jaca (cáscara y látex), y en higuera de hojas chicas (hojas).

3.5 Diagrama general del trabajo experimental



3.6. Primera Etapa del estudio (análisis cualitativo)

El criterio de búsqueda y selección de la especie vegetal (dado que el lupeol se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal) se realizó en base a su abundancia, costo y ubicación geográfica; el área delimitada establecida fue dentro de los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco, Nayarit y Distrito Federal. Además de lo anterior también se tomó en cuenta su grupo taxonómico; para este estudio en particular la búsqueda se acotó a las especies vegetales de *Ficus* (dado que existe literatura en donde se reporta lupeol en varias especies de *Ficus*) además de especies que producen algún tipo de látex; como es el caso de la flor de mayo, incluyendo algunos tipos de frutos y/o árboles tropicales: como la jaca, uva de mar, nanche, zapote, guarumbo, huizache, mango e higo. La presencia de lupeol se evaluó en diferentes órganos de la planta (hojas, tallo fruto y/o látex) debido a que en trabajos relacionados se ha reportado que el lupeol se puede concentrar más en ciertos órganos.

3.6.1. Revisión de las posibles fuentes de lupeol

Se realizó una revisión bibliográfica actualizada de diferentes especies vegetales en las cuales se ha reportado la presencia de lupeol y después de una selección basada en la disponibilidad del material vegetal se decidió trabajar con las siguientes: corona de cristo (*Euphorbia mili*), noche buena (*Euphorbia pulcherrima*), laurel de la india (*Ficus benjamina*), hule (*Ficus elástica*), higuera de hojas chicas (*Ficus oblicua*), flor de mayo (*Plumeria rubra*), higo (*Ficus carica*), pingüica (*Arctostaphylos pungens*), guamúchil (*Pithecellobium dulce*), mora (*Morus nigra*), guayaba (*Psidium guajava*), cruceta (*Randia capitata*), mango (*Mangifera indica*), guarumbo (*Cecropia obtusifolia*) uva de mar (*Coccoloba acrostichoides*), jaca (*Artocarpus heterophyllus*), sábila (*Aloe vera*), huizache (*Acacia farnesiana*), nanche (*Brysonia crassifolia*) y zapote negro (*Diospyros digyna*).

3.6.2. Recolección de las muestras

Las muestras de hojas, tallos, látex y cáscara de diferentes especies vegetales fueron colectadas de sus diferentes fuentes naturales en los meses de enero y marzo del 2013, en el estado de Veracruz, Nayarit, Tabasco, Chiapas y Distrito Federal (Tabla 3.1).

Los extractos de pingüica (fruto), guamúchil (hoja y fruto), guarumbo (hojas), sábila (hojas), huizache (hojas) y guayaba (hojas) fueron tomados del laboratorio 321 del conjunto E de la Facultad de Química para llevar a cabo la cromatoplaque de gel de sílice.

El látex de hule fue recolectado en la ciudad de México (marzo 2013). La resina de la flor de mayo se colectó del árbol de flor de mayo en el mes de marzo en el estado de Chiapas.

Tabla 3.1. Recolección de las diferentes fuentes utilizadas.

Muestra	Lugar/ Fecha
Hule (<i>Ficus elastica</i>) (hoja y látex)	México D.F, Enero 2013
Flor de mayo (<i>Plumeria rubra</i>) (resina y tallo)	Chiapas , Marzo 2013
Mango (<i>Manguifera indica</i>) (hojas)	México D.F, Enero 2013
Uva de mar (<i>Coccoloba acrostichoides</i>) (hojas)	Tabasco, Marzo 2013
Higuera de hojas chicas (<i>Ficus obliqua</i>) (hojas)	México D.F, Enero 2013
Nanche (<i>Brysonia crassifolia</i>) (hojas y flor)	Veracruz, Marzo 2013
Corona de cristo (<i>Euphorbia mili</i>) (tallos y látex)	México D.F, Enero 2013
Noche buena (<i>Euphorbia pulcherrima</i>) (hoja y látex)	México D.F, Enero 2013
Mango (<i>Manguifera indica</i>) variedad Tomy (pericarpio)	Chiapas , Marzo 2013
Cruceta (<i>Randia capitata</i>) (hojas)	México D.F, Enero 2013
Laurel de la india (<i>Ficus benjamina</i>) (hojas)	México D.F, Enero 2013
Mora (<i>Morus nigra</i>) (hojas)	México D.F, Enero 2013
Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) (pericarpio y mesocarpio)	Nayarit , Marzo 2013
Higo (<i>Ficus carica</i>) (hojas)	México D.F, Enero 2013

3.6.3. Identificación de lupeol mediante cromatoplaça gel de Sílice.

La identificación de lupeol se realizó empleando 1 g de cada una de las partes de las plantas (corteza, hoja, fruto y raíz), las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, durante 5 días, adicional a esto se secaron en estufa a 60 °C durante 24 horas. Las muestras se molieron en una licuadora, y se colocaron en matraces conteniendo 10 mL de diclorometano, se sonicaron por 20 minutos, se filtraron y se tomaron placas de sílica gel, para la identificación de triterpenos, empleando como referencia (α -amirina y lupeol), las placas fueron eluidas con una solución de hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1) y se revelaron con una la solución de anisaldehído.

3.6.4. Selección de las especies vegetales

La selección de las especies vegetales para la segunda etapa del estudio fueron aquellas que cualitativamente presentaron mayor abundancia de lupeol.

Debido a que tanto el lupeol como la α y β amirina presentan el mismo factor de retención (R_f) se utilizaron placas de sílica gel impregnadas con una solución de nitrato de plata al 10%, para lograr que el factor de retención de lupeol fuese diferente respecto a los otros dos triterpenos. Estas placas fueron eluidas con la misma solución de hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1). (Figura 4.1)

3.7. Segunda etapa del estudio (análisis cuantitativo)

En esta etapa se evaluó la eficiencia de la extracción de lupeol empleando tres métodos diferentes: maceración, sonicación y reflujo.

3.7.1. Preparación de la muestra

La muestra fue secada por dos métodos:

- Secado medio ambiente-estufa: secadas a temperatura ambiente, durante 5 días, después se separaron los tallos de las hojas y cortezas, posteriormente, se secaron en estufa a 60 °C durante 24 horas.

- Secado en microondas: las muestras fueron secadas en un horno de microondas bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Tiempos de secado de diferentes muestras mediante horno de microondas en hule, higuera de hojas chicas y mango.

Muestra	Tiempo (min)
Hule	5
Higuera de hojas chicas	2
Mango	2

Después del secado, las muestras se molieron con la ayuda de una licuadora hasta obtener un tamaño de partícula de malla número 10. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas selladas de polipropileno de alta densidad.

El látex de hule, corona de cristo y jaca se colocaron en viales de 2.5 mL, se secaron y almacenaron a temperatura ambiente.

Debido al alto contenido de agua en la resina de flor de mayo, se realizó un tratamiento previo al secado, el cual se describe a continuación:

- 202.1 g de resina de flor de mayo se colocaron en un matraz de 1L se adicionaron 750 mL de cloruro de metileno y se macero con agitación continua durante 48 horas, se decantó y filtro. El precipitado se eliminó y la parte soluble se concentró en el rotavapor.

3.7.2. Preparación del extracto

3.7.2.1. *Tratamiento por maceración a temperatura ambiente*

La maceración se realizó colocando *5 g de muestra* en un matraz Erlenmeyer de 125 mL adicionado con 50 mL de cloruro de metileno, los matraces fueron agitados a 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente, las muestras fueron filtradas por gravedad y el sobrenadante obtenido se concentró en un rotavapor, para obtener un extracto crudo. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.7.2.2. *Tratamiento por Reflujo*

El reflujo se realizó colocando 5 g de muestra en un matraz bola de 100 mL adicionado con 50 mL de cloruro de metileno, los matraces se colocaron a reflujo durante 6 horas. Posteriormente, las muestras fueron filtradas por gravedad y el sobrenadante obtenido se concentró en un rotavapor, para obtener un extracto crudo. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.7.2.3. *Tratamiento por Sonicación*

La sonicación se realizó colocando 5 g de muestra *en* un matraz Erlenmeyer de 125 mL adicionado con 50 mL de cloruro de metileno, los matraces se colocaron en el sonicador durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron filtradas por gravedad y el sobrenadante obtenido se concentró en un rotavapor, para obtener un extracto crudo. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.7.3. *Análisis cuantitativo mediante CLAE*

El método que se utilizó se describe en el trabajo realizado por Villavicencio-Armenta en el 2012 el cual es el siguiente:

- Equipo: Waters 1525 con bobina 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: 0.9mL/min
- Temperatura: ambiente
- Longitud: 210nm
- Columna analítica empleada: ODS Hypersil Dim (mm)= (250* 4.6 mm)

Las muestras fueron analizadas y cuantificadas por CLAE a una longitud de onda de 210 nm interpolando los resultados de las muestras con la curva de calibración de los estándares α - amirina, β -amirina y lupeol. (Apéndice B)

El extracto seco se llevó al aforo 10 o 5 mL, se tomó una alícuota de 1mL en un vial y se cuantifico mediante CLAE.

Las muestras fueron analizadas por triplicado y los valores de las medias \pm desviación estándar fueron reportados. Para evaluar la significancia estadística ($P \leq 0.05$) de las diferencias entre los tratamientos evaluados y comparar las medias de la concentración de lupeol extraído, se realizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher mediante el uso del software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc. USA.).

3.8. Tercera etapa. Evaluación de lupeol en frutos tropicales.

Las muestras de uva de mar (tallo y hojas), jaca (cáscara y pulpa), mango (cáscara), nanche (hojas y fruto), y látex de hule, flor de mayo, corona de cristo y jaca utilizadas, se seleccionaron, prepararon y cuantificaron de la misma manera mediante la cual se llevó a cabo la segunda etapa.

El secado de las muestras se efectuó solo a temperatura ambiente-estufa.

Para las resinas se colocó una cantidad determinada del extracto seco, se aforo en un matraz de 5 mL y se tomó una alícuota de 1mL para realizar la cuantificación de Lupeol mediante CLAE.

Las muestras fueron analizadas por triplicado y los valores de las medias \pm desviación estándar fueron reportados. Para evaluar la significancia estadística ($P \leq 0.05$) de las diferencias entre los tratamientos evaluados y comparar las medias de la concentración

de lupeol extraído, se realizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher mediante el uso del software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc. USA.).

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Primera Etapa del estudio (análisis cualitativo)

4.1.1 Revisión de las posibles fuentes de lupeol

Se realizó una búsqueda bibliográfica en diversos buscadores como Scopus, Science direct, Scielo, bibliotecas y bancos de tesis con la finalidad de encontrar fuentes en las cuales se presenta este triterpeno. Así a través de esta búsqueda se seleccionaron 20 fuentes potenciales de lupeol para emplearse en la primera etapa de acuerdo a los siguientes criterios de búsqueda mencionados previamente: su abundancia (disponibilidad), costo y ubicación geográfica; el área delimitada establecida fue dentro de los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco, Nayarit y Distrito Federal. Además de lo anterior también se tomó en cuenta su grupo taxonómico y en las especies evaluadas anteriormente; la concentración de lupeol que se ha reportado.

El guamuchill (hojas), nanche (hojas), corona de cristo (látex), mango (hojas) y hule (hojas y látex) se utilizaron debido a que son fuentes en las que Villavicencio-Armenta (2012) reportó la presencia de lupeol. Los géneros de *Ficus* como la higuera de hojas chicas, laurel de la india e higo se eligieron debido a que Rathee *et al.* (2011), Kumar *et al.* (2013), Oliveira *et al.* (2010) y Talamantes-Gomez (2011) han reportado lupeol en plantas de este género tal como *Ficus religiosa* [18.5 2 µg/g], *F. racemosa*, *F. involuta*, *F. cotnifolia* y *F. carica* [2.8 g/kg] respectivamente. Se sabe que las plantas siguen rutas metabólicas que llevan a la formación de metabolitos secundarios usualmente peculiares de un grupo taxonómico determinado (especie, género, familia, o grupo estrechamente relacionado de familias (Azcon-Bieto *et al.*, 1993).

Saleem en 2009 determinó lupeol en hojas de mango (180 µg/g) y sábila (280 µg/g). La flor de mayo, uva de mar, jaca, zapote negro, mora, guarumbo y huizache se seleccionaron con la finalidad de encontrar nuevas fuentes tropicales potenciales de lupeol.

4.1.2 Determinación cualitativa de lupeol

En esta sección se presentan los resultados de la cromatografía en capa fina y la cromatoplaca impregnada con nitrato de plata mediante las cuales se identificó la presencia de lupeol en las fuentes descritas de la sección anterior, se empleó como referen-

cia α -amirina y lupeol, las placas fueron eluidas con una solución de hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1) y se revelaron con una solución de anisaldehído.

En la Figura 4.1, se presenta la cromatoplaca de silica gel de las muestras de corona de cristo, noche buena, laurel de la india, hule, higuera de hojas chicas, flor de mayo, mango, uva de mar y nanche, donde se observa una banda con un valor de Rf de 0.3 igual al obtenido por la muestra de copal R1, el cual fue empleado como referencia de lupeol debido a que contiene alfa y beta amirina compuestos que presentan un valor de Rf idéntico al lupeol en cromatografía en capa fina (Hernández-Vázquez et al., 2010). Debido a que la alfa y beta amirina así como el lupeol presentan igual valor de Rf 0.3 (Figura 4.1) fue necesario realizar una CCF empleando una cromatoplaca de silica gel impregnada con nitrato de plata, la cual modifica el Rf del lupeol logrando diferenciar este compuesto de la alfa y beta amirina. Esta resolución en la cromatoplaca impregnada con nitrato de plata se atribuye a atracciones electrostáticas entre el doble enlace tanto del lupeol como de la amirina con el catión Ag^+ . Así al estar el doble enlace del lupeol fuera del anillo interacciona con mayor facilidad con el lupeol logrando una mayor retención de este compuesto en la cromatoplaca, disminuyendo así su Rf lo que hace posible diferenciar mediante esta técnica la α y β amirina del lupeol.

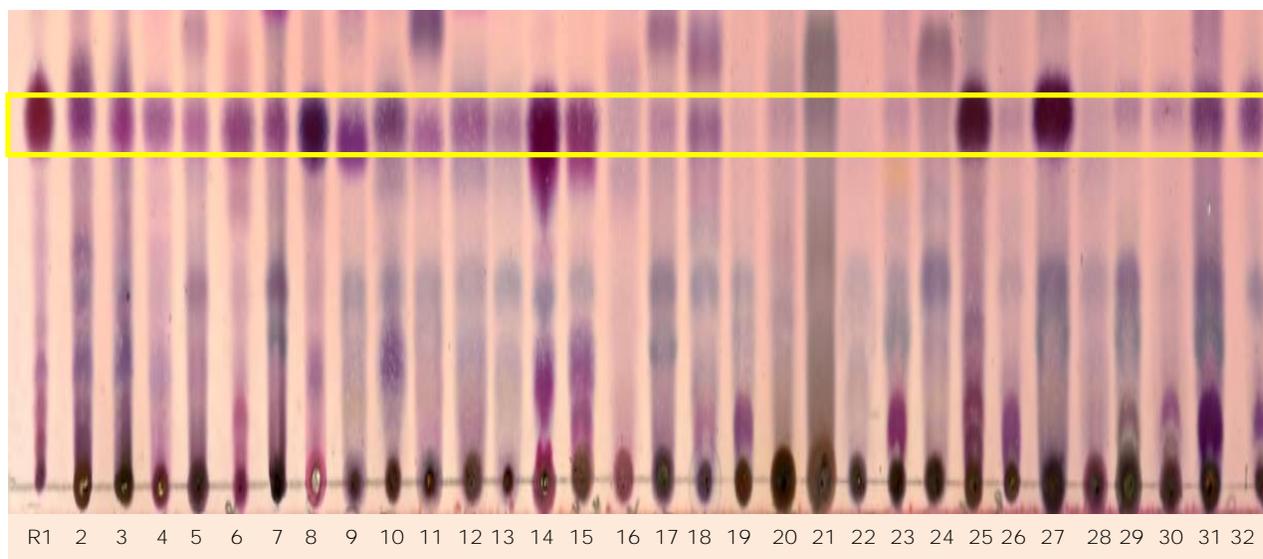


Figura 4.1 Cromatoplaqueta en capa fina gel de sílice. Eluída con una solución de hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1) y revelada con una la solución de anisaldehído. Carril: 1) referencia (Copal, el cual tiene un alto contenido de lupeol), 2) resina de corona de Cristo, 3) tallo de corona de Cristo, 4) resina de noche buena, 5) hojas de noche buena, 6) resina de laurel de la India, 7) hojas de laurel de la India, 8) resina de hule, 9) hojas de hule, 10) tallo de hule, 11) hojas de higuera de hojas chicas, 12) tallos de higuera de hojas chicas, 13) frutos de higuera de hojas chicas, 14) resina de flor de mayo, 15) tallos de flor de mayo, 16) resina de higo, 17) hojas de higo, 18) hojas de pingüica, 19) frutos de pingüica, 20) hojas de guamúchil, 21) frutos de guamúchil, 22) hojas de mora, 23) hojas de guayaba, 24) hojas cruceta, 25) hojas de mango, 26) hojas de guarumbo, 27) hojas de uva de mar, 28) Jaca, 29) sábila, 30) huizache hojas, 31) nanche hojas, 32) tallo nanche.

La Figura 4.2 y 4.3 se presenta la cromatoplaqueta de sílica gel impregnada con nitrato de plata en donde se observa que el estándar de lupeol (carril 2) presenta un menor R_f que la alfa amirina (carril 1), y en la mezcla (carril 3) se observa la separación de ambos compuestos. Por lo anterior los vegetales como el hule (carriles 12, 13 y 14), nanche (carriles 30 y 31) y flor de mayo (carril 18) presentan lupeol tal como lo reportado por Villavicencio-Armenta (2012), Hernández-Vázquez *et al.* (2010) y Berdonces (2004), respectivamente.

Se sabe que las intensidades de color y el área de las bandas son proporcionales a la cantidad del compuesto presente, por lo anterior la baja área e intensidad de la banda del tallo de flor de mayo (carril 19), hojas de noche buena (carril 8) y tallo de la corona de Cristo (carril 6) se debe a la baja abundancia de lupeol en estas fuentes (Figura 4.2).

Las muestras de hojas de mango (carril 24) (Figura 4.2), resina de la corona de cristo (carril 5) (Figura 4.2) y hojas de higuera de hojas chicas (carril 6) (Figura 4.3) también presentaron lupeol, tal cual como lo reportado por Villavicencio-Armenta (2012) y Berdonces (2004), respectivamente.

Con respecto a la uva de mar (carril 26) y la jaca (carril 27) probablemente, debido al R_f, color y al tamaño de la banda, presenten una alta concentración de lupeol tal como se muestra en la Figura 4.2, aunque no se han encontrado trabajos previos donde se reporte la presencia de dicho compuesto.

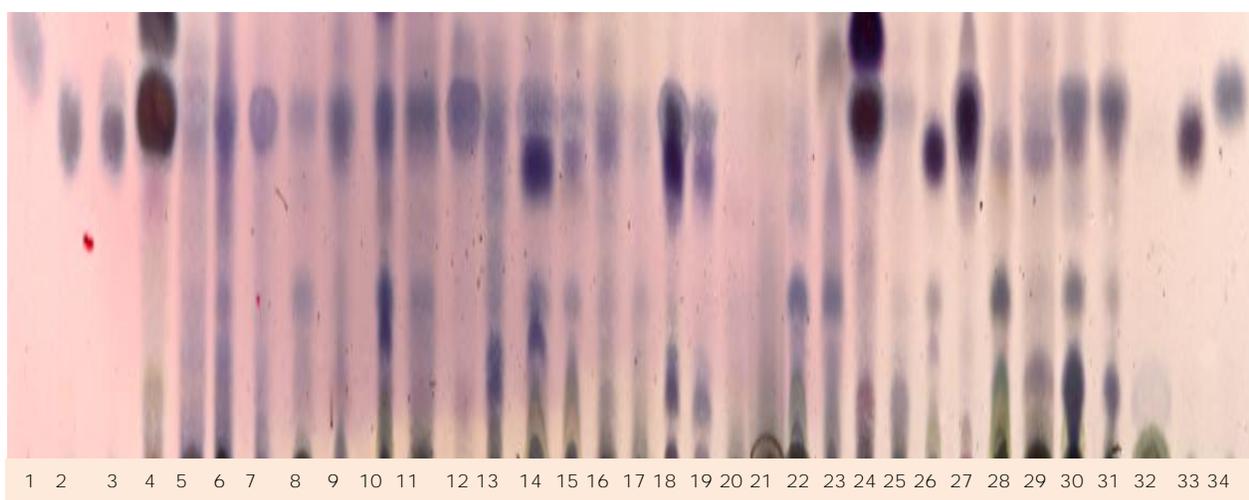


Figura 4.2. Cromatopla en capa fina gel sílice impregnada con nitrato de plata. Eluída con una solución de hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1) y revelada con una la solución de anisaldehído. Carril: 1) α -amirina, 2) lupeol, 3) mezcla (amirina y lupeol), 4) copal, 5) corona de cristo látex 6) tallo corona de cristo, 7) noche buena látex, 8) noche buena hoja, 9) látex de laurel de la India, 10) hojas de laurel de la India, 11) tallo de laurel de la India, 12) hule látex 13) hule tallo, 14) hule hojas, 15) higuera de hojas chicas hoja, 16) higuera de hojas chicas tallo, 17) higuera de hojas chicas fruto, 18) flor de mayo látex, 19) flor de mayo tallo, 20) guamuchill hojas, 21) guamuchill fruto, 22) mora hojas, 23) cruceta, 24) mango hojas, 25) guarumbo, 26) uva de mar hojas, 27) jaca látex, 28) sábila, 29) huizache, 30) nanche hojas, 31) nanche tallo, 32) zapote cáscara, 33) lupeol, 34) α -amirina.

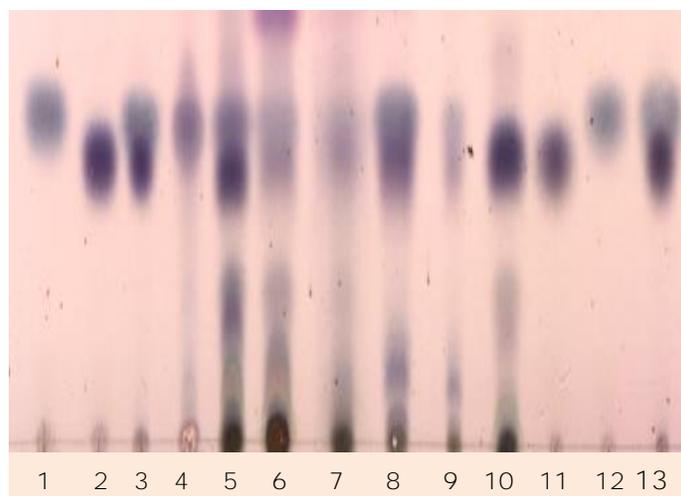


Figura 4.3. Cromatoplaqa en capa fina gel sílice impregnada con nitrato de plata. Eluída con una solución de hexano:diclorometano:acetato de etilo (8:1:1) y revelada con una la solución de anisaldehído. Carril: 1) α -amirina, 2) lupeol, 3) mezcla (amirina y lupeol), 4) hule látex, 5) hule hojas, 6) hojas de higuera de hojas chicas, 7) tallo higuera de hojas chicas, 8) flor de mayo látex, 9) flor de mayo tallo, 10) uva de mar hoja, 11) α -amirina , 12) lupeol, 13) mezcla (amirina y lupeol).

En algunas fuentes se evaluaron diferentes órganos de la planta (hojas, tallo fruto y/o látex) debido a que en trabajos relacionados se ha reportado que el lupeol se puede concentrar más en algunos órganos de la planta, o bien puede estar presente en grandes cantidades en las hojas, pero es indetectable en el tallo, o viceversa. Villavicencio-Armenta (2012) reporta 0.01% lupeol en la corteza de Guamuchill, aunque el lupeol no fue detectable en las hojas. Lo anterior es debido a que el lupeol al ser un metabolito secundario no es un compuesto esencial para la supervivencia de la planta y está implicado en relaciones ecológicas, es decir, en la relación de la planta productora con los otros organismos de su ámbito natural, lo anterior puede explicar porque el hule, el cual es muy sensible a hongos que producen manchas rojas en las hojas (Villavicencio-Armenta, 2012), produce una menor cantidad de lupeol en el tallo que en las hojas (Figura 4.1), las cuales son más susceptibles al ataque microbiano.

4.2. Segunda etapa del estudio (análisis cuantitativo)

En esta etapa se evaluó de manera cuantitativa, mediante CLAE, la eficiencia de extracción de lupeol al emplearse tres métodos diferentes tal como maceración, sonicación y reflujo. Utilizando dos diferentes métodos de secado: secado a temperatura ambiente-estufa y secado por microondas.

Para esta etapa se decidió utilizar hojas de mango, hule e higuera de hojas chicas debido a la disponibilidad y facilidad de trabajo de la muestra para la extracción de lupeol.

Tabla 4.1. Cuantificación de lupeol en diferentes fuentes sometidas a tres diferentes métodos (sonicación, maceración y reflujo) mediante CLAE.

	Sonicación	Maceración en frío	Reflujo
	(mg lupeol /g planta seca)	(mg lupeol /g planta seca)	(mg lupeol /g planta seca)
Mango hojas	0.23 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.04 ^b	0.27 ± 0.01 ^a
Mango hojas*	NC	NC	NC
Hule hojas	0.26 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^c
Hule hojas*	0.06 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.03 ^b	0.11 ± 0.03 ^b
Higuera de hojas chicas	0.17 ± 0.07 ^a	0.49 ± 0.04 ^b	0.34 ± 0.22 ^{a,b}
Higuera de hojas chicas*	NC	NC	NC

*Fuentes que fueron secadas por microondas. En las otras fuentes se realizó un secado a temperatura ambiente-estufa. NC: no cuantificable. Las letras a, b, y c indican diferencia estadística significativa entre las muestras de una misma fila.

4.2.1. Sonicación

Para las hojas de hule secadas a temperatura ambiente-estufa, la sonicación fue el método mediante el cual se extrajo una cantidad estadísticamente significativa mayor de lupeol 0.26 mg/100g comparado contra el reflujo y la maceración.

En cuanto a las hojas de mango secadas a temperatura ambiente-estufa la sonicación y el reflujo fueron los tratamientos mediante los cuales se extrajo una mayor cantidad

de lupeol 0.27 mg/g y 0.23 mg/g respectivamente, entre ellos no se observó una diferencia estadística significativa (Tabla 4.1).

De acuerdo a la metodología utilizada, se esperaban obtener rendimientos más bajos con la maceración en frío. Por el contrario, el rendimiento más alto mediante el reflujo o la sonicación, esto debido a que en la maceración solo se involucra la difusión del solvente, mientras que en la sonicación, adicional a lo anterior, se involucra el rompimiento de la pared celular y en el reflujo existe una mayor solubilidad del sólido en el líquido aumentando la velocidad de la extracción debido al aumento de temperatura (Ullauri, 2010).

Si bien lo anterior se visualizó para las hojas de mango secadas a temperatura ambiente esto no se observó para el resto de las muestras. Lo anterior se explica debido a que las condiciones utilizadas en cada método se mantuvieron constantes, pudiendo ser que las establecidas para el reflujo o sonicación no fueron las óptimas para cada muestra. Por ejemplo, Kaji-Garcia en el 2005 encuentra que utilizar soxhlet (8 h) es el método más eficiente para la extracción de limonín con metanol comparado con la sonicación por 1 h, aunque si las condiciones de sonicación aumentan a 2 h este último demuestra ser más eficiente. Además, las diferencias de composición y grosor de las paredes celulares también provocan diferencias en los resultados obtenidos. Kaji explica que cuando la pared es delgada puede ser fácilmente destruida por la sonicación, cuando es gruesa recomienda reducir el tamaño de partícula de la muestra lo más posible para lograr una mayor extracción.

En cuanto a las muestras secadas por microondas, las hojas de mango y las hojas de higuera, no se cuantificó la presencia de lupeol utilizando este método de secado, pues se observa claramente su ausencia en el cromatograma (Figura 4.4). Para el caso del hule pese a que hubo una reducción del extracto y lupeol extraído (comparando con la muestra secada a temperatura ambiente-estufa), la muestra no fue destruida por completo. Lo anterior se puede explicar a la suberina, el cual es un compuesto graso impermeable presente en las células de la peridermis que constituyen al hule (corcho), la

cual le confiere gran impermeabilidad (Estupiñan-Bravo,2000) lo que probablemente protegió a la planta del tratamiento intenso de las microondas disminuyendo la destrucción de la muestra.

A pesar de que el secado por microondas disminuye el tiempo de secado de días a minutos, se observa que no es un método viable, pues destruye al compuesto de interés como se muestra en la Figura 4.4 y Tabla 4.1, probablemente debido al efecto corona, el cual es causado por la ionización del aire circundante al conductor debido a los altos niveles de tensión causando el deterioro de los materiales ocasionado por el sobrecalentamiento de la muestra (Xu Duan *et al.*, 2013).

Con respecto al hule secado por microondas: el reflujo y la maceración fueron los tratamientos mediante los cuales se extrajo una mayor cantidad de lupeol. Aunque como se menciona anteriormente, hubo una reducción del lupeol extraído del 54.16 % al utilizar el secado por microondas y el reflujo como método de extracción versus el secado a temperatura ambiente-estufa y reflujo (método de extracción), razón por la cual para la siguiente etapa se descartó utilizar las microondas como método de secado.

4.2.2. Maceración en frío

En cuanto a las hojas de mango, se observó que la eficiencia de la extracción disminuyó 65% al emplear la maceración en frío como método alternativo respecto al tratamiento por reflujo.

Para las hojas de hule secadas a temperatura ambiente-estufa, mediante la maceración se extrajo una cantidad estadísticamente significativa menor de lupeol 0.21 mg/g con respecto a la sonicación 0.26 mg/g. Aunque para las hojas de higuera se observó un comportamiento totalmente opuesto, pues se extrajo una cantidad significativa mayor de lupeol 0.49 mg/g mediante la maceración versus la sonicación 0.17 mg/g.

4.2.3. Reflujo o maceración en caliente

Como se mencionó en párrafos anteriores en cuanto a las hojas de mango secadas a temperatura ambiente-estufa, el reflujo y la sonicación fueron los tratamientos mediante los cuales se extrajo una mayor cantidad de lupeol (0.23 mg/g y 0.27 mg/g) respectivamente comparado con la maceración.

En cuanto a las hojas de hule secadas a temperatura ambiente-estufa, mediante el reflujo se extrajo una cantidad estadísticamente significativa menor de lupeol 0.20 mg/g con respecto a la sonicación 0.26 mg/g y la maceración 0.21 mg/g.

Con respecto a las hojas de higuera se observó que no hay diferencia estadística significativa entre utilizar la sonicación 0.17 mg/g y maceración 0.49 mg/g versus el reflujo 0.34 mg/g.

Como se menciona anteriormente, no se observó una tendencia en general en la extracción de lupeol de las fuentes secadas mediante temperatura ambiente-estufa, el mejor tratamiento varió de acuerdo a la planta de estudio seleccionada. Como se sabe cada proceso actúa de manera diferente y la eficiencia de la extracción varía de acuerdo a la composición de la pared celular y estructura de cada planta, aunado a que la pared puede sufrir modificaciones como acumulación de cutina, suberina, ceras o bien se gelifican, lo anterior no afecta la apariencia de las células sino las propiedades físicas y químicas de las paredes (Estupiñan-Bravo,2000). Por ejemplo, el carbonato de calcio se puede acumular en el interior de las células epidérmicas de las plantas superiores de las familias moráceas como *Ficus elástica* (Waizel-Bucay, 2006). Estudios similares de extracción realizado por Talamantes-Gómez (2011) reportan misma tendencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa se decidió sólo secar las muestras mediante temperatura ambiente-estufa y utilizar los tres tratamientos de extracción: maceración, sonicación y reflujo (debido a que no se observó una tendencia de mejor método) para la siguiente etapa.

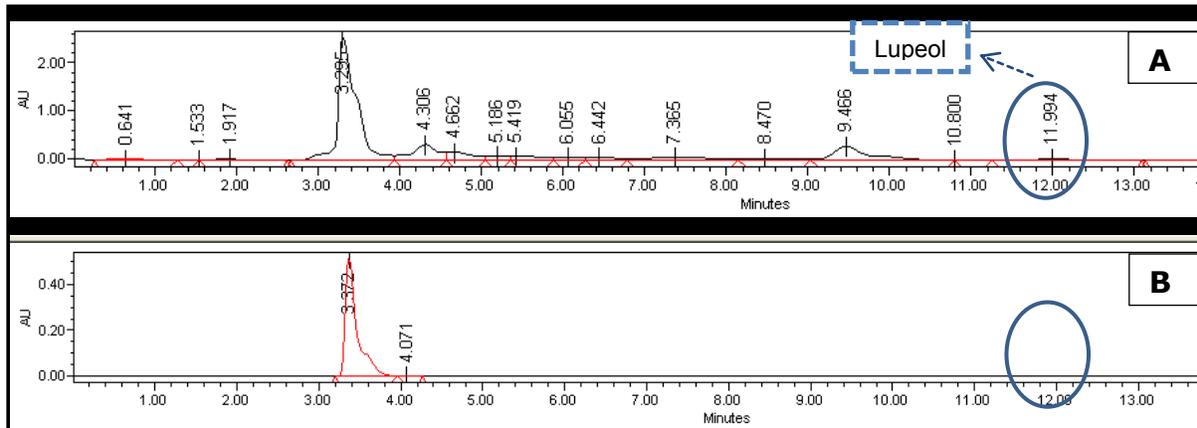


Figura 4.4. Análisis de CLAE. A=Extracto de hojas de mango secadas al natural mediante reflujo. B= Extracto de hojas de mango secadas por microondas mediante reflujo.

4.3. Tercera etapa. Evaluación de lupeol en árboles frutales (hoja, fruto y/o tallo) y látex.

De acuerdo a la segunda etapa del estudio, en la cual se evaluó de manera cuantitativa mediante CLAE la eficiencia de extracción de lupeol al emplearse tres métodos diferentes tal como maceración, sonicación y reflujo utilizando dos diferentes métodos de secado temperatura ambiente-estufa y microondas, se observó que el mejor método de extracción de lupeol varió de acuerdo a la fuente utilizada debido a las diferencias y modificaciones de las paredes vegetales de cada especie. En esta última etapa, se decidió utilizar los tres métodos de extracción utilizados previamente con la finalidad de evaluar cuantitativamente el contenido de lupeol en hojas y el fruto de nanche, pericarpio de mango de la variedad *Tomy*, resinas; de hule, corona de cristo, flor de mayo y dos nuevas fuentes; fruto, resina y pericarpio de jaca, tallo y hoja de uva de mar. De tal manera, se estableció el mejor método de extracción (sonicación, maceración y reflujo) para cada una de las especies seleccionadas. Las muestras en esta etapa se secaron mediante temperatura ambiente-estufa.

Tabla 4.2. Cuantificación de lupeol en uva de mar (hoja y tallo), jaca (pericarpio y pulpa), mango variedad Tomy (pericarpio) y nanche (hoja y fruto) utilizando tres métodos de extracción (sonicación, maceración y reflujo) mediante CLAE.

Fuente	Tratamiento [mg lupeol/g planta seca]		
	Sonicación	Maceración	Reflujo
Uva de mar	0.73 ±0.07 ^a	1.09 ±0.07 ^b	0.73 ±0.19 ^a
Uva de mar tallo	NC	NC	NC
Cascara de Jaca	1.01 ±0.44 ^a	0.19 ±0.03 ^b	1.44 ±0.35 ^a
Pulpa Jaca	NC	NC	NC
Cascara de mango	0.19 ±0.05 ^a	NC	0.09 ±0.02 ^b
Hojas de nanche	0.06 ±0.01 ^a	0.09 ±0.01 ^b	0.08 ±0.00 ^b
Nanche fruto	ND	ND	ND

*Las letras a, b, y c indican diferencia estadística significativa entre las muestras de una misma fila. NC: no cuantificable. ND: no determinable.

4.3.1. Uva de mar hoja (*Coccoloba acrostichoides*)

Los resultados de la cromatoplaqueta tomada (Figura 4.2 y 4.3), y al tiempo de retención de la uva de mar en la CLAE (Figura 4.5) Rf cercano a 12, indican que este compuesto es lupeol. Se propone identificar el compuesto mediante resonancia magnética nuclear para corroborar los resultados. Tal como se muestra en la Tabla 4.2 no existe diferencia estadística significativa entre utilizar la sonicación (0.73 mg/g) y el reflujo (0.73 mg/g) como método de extracción. La maceración es el mejor método para extraer lupeol pues se obtiene una mayor cantidad (1.09 mg/g), cabe mencionar que existe diferencia significativa versus los otros dos métodos. A pesar de que la presencia de lupeol no ha sido reportada en esta fuente, Barros *et al.* (2003) reportan la presencia de triterpenos en la especie *Coccoloba dungandiana* y β -lupeol en la especie *C. excoriata* por lo cual la presencia de este triterpeno en esta especie del mismo género *Coccoloba acrostichoides* podría explicar la actividad antimicrobiana y antifúngica reportada en esta planta Barros *et al.*, (2003).

4.3.2. Cáscara de Jaca (*Artocarpus heterophyllus*)

Los resultados de la cromatoplaqueta tomada (Figura 4.2 y 4.3), y el tiempo de retención de la jaca en el CLAE (Figura 4.5) R_f cercano a 12, indican que este compuesto es lupeol. Actualmente, no existen estudios previos en los cuales se reporte lupeol en esta fuente, por lo cual al igual que en la uva de mar se propone realizar un estudio de resonancia magnética para corroborar estos resultados.

Como se muestra en la Tabla 4.2 no hay diferencia estadística significativa entre utilizar la sonicación (1.01 mg/g) y el reflujo (1.44 mg/g) como método de extracción. La maceración no es el método más eficiente para extraer este compuesto en el pericarpio de la jaca, pues se obtiene una menor cantidad (0.19 mg/g) y existe diferencia significativa versus los otros dos métodos. Umesh B. *et al.* (2011) realizaron estudios *in vitro* en donde el vino de jaca reduce el daño del DNA causado por los radicales peróxidos, este jugo muestra una gran capacidad antioxidante a pesar de la baja concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, la presencia de lupeol en esta fuente explicaría esta actividad antioxidante.

Si extrapolamos los datos obtenidos, por cada 10 kg de cáscara obtendríamos aproximadamente 14 g de lupeol.

4.3.3. Cáscara de mango

Como se muestra en la Tabla 4.2, existe diferencia estadística significativa entre utilizar la sonicación (0.19 mg/g) y el reflujo (0.09 mg/g) como método de extracción. En donde la sonicación es el método mediante el cual se obtiene una mayor cantidad de lupeol. La maceración no sería un método adecuado para extraer lupeol en cáscara de mango, pues como se muestra en la tabla no se determinó mediante este método.

Estudios similares realizados en *Ficus racemosa* muestran resultados parecidos en cuanto al método más eficiente de extracción Kumar *et al.* (2013).

Al comparar los resultados aquí expuestos con otros trabajos, en los cuales se ha reportado 1.80 $\mu\text{g/g}$ de lupeol en pulpa de mango (Hafezz *et al.*, 2011) se pueden apreciar diferencias significativas en los valores, lo anterior puede deberse a diferentes factores:

- Composición y modificaciones de la pared celular: la composición de la pared celular de los vegetales sufre modificaciones a lo largo de su desarrollo. En mango Petit-Jiménez *et al.* (2007) observaron cambios en la composición y ultraestructura de la cutícula durante el crecimiento, desarrollo y almacenamiento en tres variedades.
- Condiciones ambientales: las diferencias de cantidades de lupeol encontradas entre hojas y cascaras depende de muchos factores, existen teorías como la del balance de nutrientes de carbono, en la cual se establece que la disponibilidad en el ambiente de carbono y nitrógeno, determinan la cantidad de recursos que la planta destinará a la producción de metabolitos secundarios (Pugnaire *et al.*, 2007).
- Diferencias en las condiciones de cada metodología empleada.

4.3.4. Hoja de nanche

No existe diferencia estadística significativa entre utilizar la maceración (0.09 mg/g) y el reflujo (0.08 mg/g) como método de extracción (Tabla 4.2). La sonicación resultó ser el método mediante al cual se obtuvo una menor cantidad de lupeol (0.06 mg/g). Talamantes-Gomez, (2011) expone que existe una diferencia estadística significativa al extraer lupeol mediante soxhlet, maceración y sonicación utilizando hexano como disolvente. Siendo este último mediante el cual extrajo una menor cantidad del compuesto en hojas de nanche (2.66 mg/100 g planta seca). Se puede observar que los resultados obtenidos en este estudio son del mismo rango de magnitud que los reportados por otros autores como Talamantes.

En el tallo de la uva de mar y la pulpa de la jaca la señal emitida fue tan baja que no fue posible cuantificarlo, aunque fue posible cuantificar la α y β amirina. En la fruta del nanche no se registró ninguna señal de la presencia de lupeol aunque no así para la α y β amirina. Los resultados se muestran en el apéndice C.

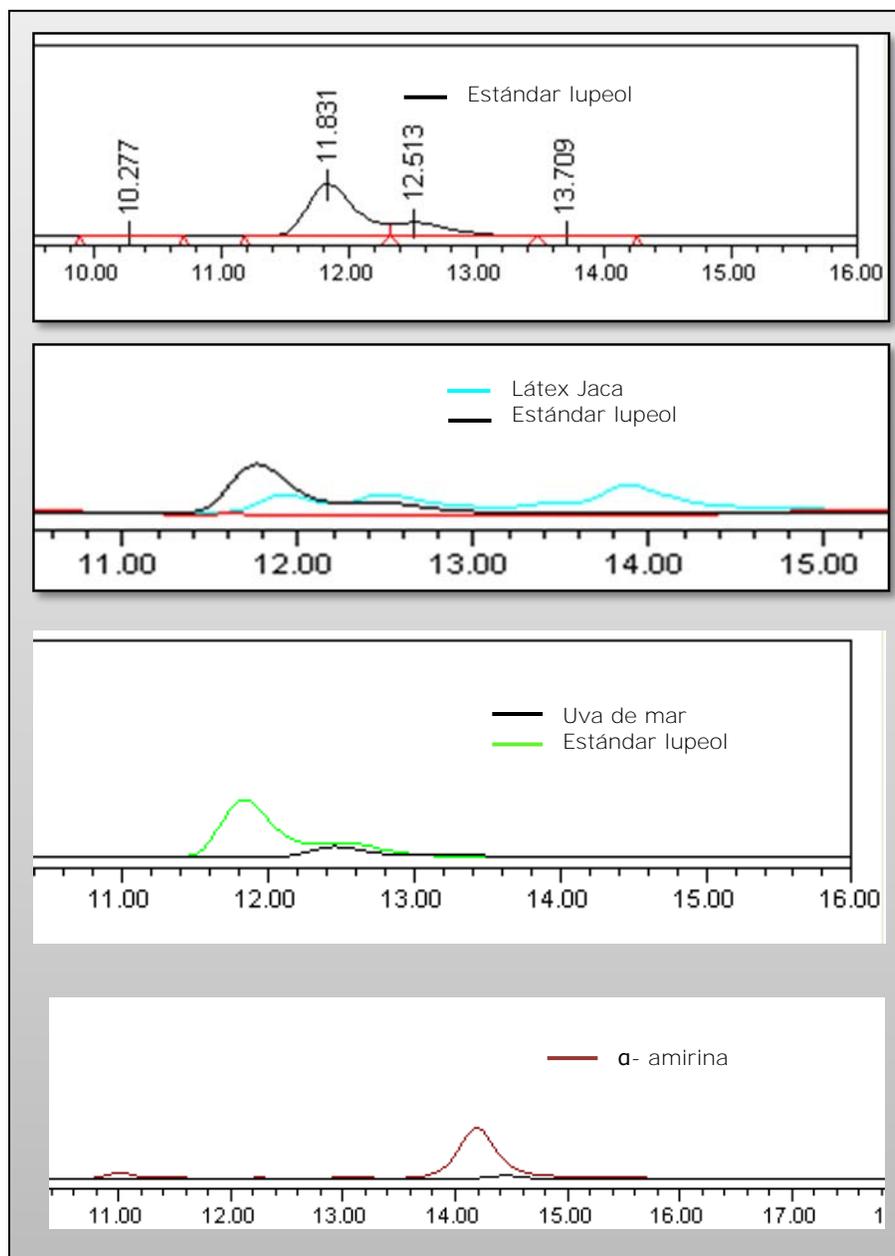


Figura 4.5. Cromatograma obtenido del lupeol, α - amirina, uva de mar y resina de Jaca mediante el CLAE.

4.3.5. Cuantificación de lupeol en látex

Debido a que las resinas son un concentrado, no se encuentran protegidos de una pared celular y fueron completamente solubles en el solvente utilizado (cloruro de metileno) no se evaluaron los diferentes métodos de extracción, razón por la cual se disolvieron, filtraron e hicieron las diluciones pertinentes para su cuantificación.

Tabla 4.3. Cuantificación (valores promedio y desviaciones estándar) de lupeol en diferentes látex mediante CLAE.

Fuente	[mg Lupeol/ g latex seco]
Látex hule	31.33 ± 12.6
Látex corona de cristo	11.02 ± 0.62
Látex jaca	58.48 ± 1.02
Látex flor de mayo	26.03 ± 11.9

De acuerdo a los resultados obtenidos Tabla 4.3., el látex de la jaca (58.48 mg/g) contiene una mayor cantidad de este compuesto comparado con el látex del hule (31.3 mg/g), el de flor de mayo (26.03 mg/g) y corona de cristo (11.02 mg/g).

Siddiqui *et al.* (1999) y Nargis *et al.* (1993) reportan triterpenos pentacíclicos en hojas de *Plumeria obtusa* y *Plumeria rubra* respectivamente. Berdonces en el 2004 reporta lupeol en *Plumeria rubra*. Así por lo anterior y de acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 4.3, y al Rf cercano a 12 *Plumeria rubra* contiene lupeol en una alta concentración (26.03 mg/g).

Villavicencio-Armenta (2012) reporta 5.5 mg/g y 0.14 mg/100 g de lupeol en el látex de hule y corona de cristo respectivamente. Estas diferencias en los valores obtenidos respecto a otros estudios, como se menciona en párrafos anteriores, pueden ser pero no se limita a: diferencias en las etapas de desarrollo, diferencias en las condiciones ambientales y al estrés sometido de cada especie vegetal y/o diferencias en la metodología empleada.

Comparando el contenido de lupeol obtenido en la resina o látex de las cinco especies evaluadas respecto a otros órganos (hojas, tallos, flores y frutos), se cuantificó una mayor cantidad de lupeol en las resinas (Tabla 4.3.). Es sabido que la función de este líquido blanco, es defender a la planta de los depredadores, además de proteger a la planta de infecciones a través de la formación de una barrera protectora (De marzi-Valeria, 2006). Por lo anterior, es razonable que la planta produzca una mayor cantidad de lupeol cuando está más vulnerable a infecciones debido a las grandes propiedades antimicrobianas y antiprotozoarias que exhibe este compuesto (Ziegler *et al.*, 2004). Todas las resinas presentaron ser una fuente potencial de lupeol debido a que se extrajo una fuente considerable de este compuesto (Tabla 4.3.) comparando con los otros órganos de las fuentes vegetales estudiadas. El látex de jaca es una fuente potencial de este compuesto pues mediante este se obtiene 58.48 mg/g de látex seco. Se propone utilizar esta materia prima como fuente potencial, debido a que existe una alta cantidad de lupeol tanto en cáscara como en látex y es de fácil obtención pues se producen 10, 103.25 toneladas anuales en México (SAGARPA).

CONCLUSIONES

- De acuerdo a la búsqueda bibliográfica realizada se utilizaron 20 fuentes de lupeol, de las cuales de acuerdo a la CCF impregnada con nitrato de plata se identificaron como posibles fuentes potenciales sólo 8 especies vegetales: hule (látex y hojas), nanche (hojas), mango (hojas), corona de cristo (resina), uva de mar (hojas), flor de mayo (látex), jaca (cáscara y látex) e higuera de hojas chicas (hojas).
- Se cuantificó la cantidad de lupeol presente en las especies vegetales: hule (hojas y látex), nanche (hojas), mango (hojas y cáscara), corona de cristo (látex), uva de mar (hoja y tallo), flor de mayo (látex), jaca (cáscara y látex), y en higuera de hojas chicas (hojas) mediante tres métodos diferentes de extracción (maceración, sonicación y reflujo).
- Los métodos de extracción utilizados (maceración, sonicación y reflujo) no funcionaron igual para cada especie vegetal utilizada, probablemente a las diferencias en la composición, grosor y estructura de su pared celular.

- La cantidad de lupeol presente en cada especie vegetal varió entre cada órgano (hoja, tallo, fruto y látex). Siendo mayor la cantidad extraída de los látex.
- A pesar de que las microondas reducen el tiempo de secado de días a minutos no fue un método viable, pues destruye al lupeol, probablemente debido al efecto corona (causado por la ionización del aire circundante al conductor debido a los altos niveles de tensión causando el deterioro de los materiales ocasionado por el sobrecalentamiento de la muestra).
- Los resultados de los ensayos realizados por cromatografía en capa fina impregnada con nitrato de plata y los tiempos de retención en el CLAE indican que existe lupeol en la cáscara y látex de jaca y en hojas de uva de mar.
- La jaca podría ser una fuente potencial de lupeol debido a que existe una alta concentración tanto en cáscara (1.435 mg/g) como en látex (58.48 mg/g) y su producción anual es de 10, 103.25 T en México. La sonicación y el refluo son los métodos más eficientes para extraer lupeol en jaca.
- La hoja de la uva de mar también podría utilizarse como fuente potencial de lupeol (1.094mg/g). Siendo la maceración el método más eficiente de extracción

APENDICE A

***Artocarpus heterophyllus*. Jaca.**

Descripción. La Jaca (jackfruit) es la fruta de árbol cultivado más grande del mundo, alcanzando 35 kg en peso, hasta 80 cm de largo y 40 de diámetro. El exterior de la fruta es verde o amarillo cuando es maduro; el interior consiste en bulbos comestibles grandes de la carne amarilla, que incluye una semilla lisa, oval, marrón clara, puede haber 100 o hasta 500 semillas en una sola fruta. Cuando se madura, la Jaca sin estar abierta, emite un olor desagradable fuerte, asemejándose a cebollas decaídas, mientras que la pulpa de los olores abiertos parece al de la piña y el plátano. Hay dos variedades principales, en una, las frutas tienen carpelos pequeños, fibrosos, suaves, pesados, pero muy dulces, con una textura algo relacionada con las ostras crudas, la otra variedad, es quebradiza y casi crujiente, esta forma es la más importante comercialmente y es más sabrosa al gusto occidental.

Clima. El árbol no tolera sequía.

Siembra. La propagación es generalmente por medio de semillas, la germinación requiere de 3 a 8 semanas. Una planta de semillero más avanzada, con su raíz larga y delicada es muy difícil de trasplantar con éxito, las plantas de semillero injertadas son posibles.

Cosecha. Todo el año, la mayor producción es en los meses de febrero a julio. La Jaca madura de 3 a 8 meses del florecimiento, cuando se madura hay generalmente un cambio del color de la fruta de amarillo-marrón a verde ligero, después de madurar, dan vuelta a marrón y se deterioran rápidamente. Los ensayos de la conservación en cámara frigorífica indican que las frutas maduras se pueden guardar de 3 a 6 semanas.

Usos. Su principal uso es para consumo en fresco o en la cocina internacional, se hierve, se fríe, o se asa la fruta verde. Los pedazos se cocinan en agua ligeramente salada y después se sirven. La única desventaja es el látex gomoso copioso que acumula en

los utensilios y las manos, a menos que primero se frote con aceite de cocina. Las semillas se pueden también hervir o asar y se comen como castañas.



Tomado de SAGARPA

Figura 5.1. Fruto de la Jaca.

Coccoloba uvifera (L.) L. Uva de mar

Descripción. Arbusto a árbol de hasta de 6m de altura, en ocasiones ramificado desde la base, con la corteza delgada, lisa, de color gris, que se desprende en escamas en los ejemplares viejos; las hojas alternas, redondeadas y coriáceas de 10 a 20 cm de longitud y hasta 25 de ancho; las flores se presentan en racimos de hasta 30 cm de longitud, de color blanco verdoso; los frutos globosos de 1-2 cm de diámetro con una cubierta carnosa de color morado cuando madura; el fruto contiene una sola semilla; florece entre marzo y junio, se propaga por semillas.

Familia. Polygonaceae

Distribución: Originario de América tropical. Se le encuentra al sur de Florida, Bermuda, Bahamas, Antillas y costa noreste de México. Se extiende a todo lo largo de la costa Atlántica de América Central, encontrándose también en ambas

Hábitat. Esta especie se encuentra limitada a las playas arenosas y rocosas y a las espesuras de la costa. Requiere de un clima tropical o subtropical y una precipitación de 500 a 1,400 mm.

Usos tradicionales de la especie. Esta especie es apreciada por sus frutos en poblaciones de la zona costera; como planta ornamental tiene poco uso, aunque tienen un gran potencial, para la costa se recomienda como fijadora de arena y como árbol rompeviento, en ocasiones es utilizada para el tratamiento de diarreas, como diurético y para el tratamiento de enfermedades venéreas.

Aspectos fisiológicos. Especie de rápido crecimiento. Buena capacidad competitiva con las malezas.



Tomada de SEDUMA.

Figura 5.2. Fotografía del árbol uva de mar.

***Euphorbia splendens*. 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.



Tomada de Villavicencio-Armenta 2012.

Figura 5.3 Fotografía corona de cristo.

***Plumeria rubra*. Flor de mayo**

Descripción. Árbol o arbusto caducifolio, de 5 a 8 m (hasta 25 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 70 cm, con abundante líquido lechoso en la corteza.

Copa / Hojas. Copa irregular, abierta. Hojas simples dispuestas en espiral, aglomeradas en las puntas de las ramas; láminas de 15 a 30 cm de largo por 4 a 8 cm de ancho, elípticas, margen entero; verde brillantes en el haz y verde pálidas en el envés.

Interna de color crema amarillento, granulosa, sabor picante, abundante exudado blanco.

Flor(es). En panículas densas en las axilas de hojas nuevas, de 15 a 35 cm, glabras; flores muy fragantes, actinomórficas; sépalos pardo verdosos; corola blanca pura y ligeramente amarilla en el cuello. Las plantas cultivadas producen flores de color amarillo o gamas que van de rosado a púrpura con interesantes combinaciones.

Fruto(s). Folículos (vainas) de 25 a 30 cm de largo amarillentos o verde anaranjados, glabros, con numerosas semillas

Distribución. En la vertiente del Pacífico se distribuye desde Baja California y Sonora, hasta Chiapas, incluyendo la Cuenca del Río Balsas; en la vertiente del Golfo se encuentra desde San Luis Potosí hasta Yucatán. Altitud: 0 a 1,500 m.

Origen. Especie originaria de Mesoamérica; se extiende de México a Ecuador, Perú y Brasil. Se le cultiva ampliamente en el sur de Florida (Estados Unidos), en las Antillas y en Hawai. Se ha introducido ampliamente a regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo. Su cultivo está muy extendido en Asia tropical, donde se le llama comúnmente planta del templo debido a que sus flores se ofrecen en los templos hindúes.

Habitat. Prospera en regiones de clima cálido y más bien seco. Se encuentra tanto en suelos derivados de materiales ígneos como de origen calizo.

Medicinal [toda la planta, corteza, exudado (látex)]. Uso potencial: toda la planta contiene alcaloides que actúan como estimulantes cardíacos pero no han sido bien estudiados. La infusión de la corteza se emplea para curar contusiones internas. El jugo se usa para curar heridas. Planta: Favorece la producción de leche (galactógeno), y es remedio contra la erisipela. El jugo cáustico lechoso que emana del tronco es venenoso.



Tomada de Instituto de Biología UNAM (IREKANI).
Figura 5.4. Fotografía flor de mayo.

***Byrsonima crassifolia*. Nanche**

Descripción. Árbol pequeño hasta de tres metros de altura, tronco tortuoso, con tendencia a ramificarse desde el suelo; corteza externa agrietada y escamosa desprendiéndose en placas rectangulares, gris parda a morena clara, en el interior de color crema rosado, fibrosa, amarga. Hojas decusadas simples, aovadas a elípticas, verde oscuras y casi glabras en el haz y abundantes tricomas en el envés.

Flores en racimos o panículas estrechas, terminales, pubescentes actinomorfas, con pétalos amarillento-anaranjados. Infrutescencias péndulas, drupas globosas, con las partes florales a excepción de los pétalos, persistentes, con una abundante carne agri-dulce rodeando a un hueso duro.

Familia. Malpigiaceas.

Origen. Este árbol frutal es originario de América tropical, cuya distribución comprende extensiones desde el trópico de Cáncer hasta el trópico de Capricornio. En la República Mexicana se distribuye desde el sur de Tamaulipas, al este de San Luis Potosí hasta Yucatán y Quintana Roo en la vertiente del Golfo de México y de Sinaloa hasta Chiapas en el Pacífico.

Fruto. Como fruta el nanche es de gran valor alimenticio. Los análisis de sus propiedades alimenticias han mostrado que posee gran contenido de vitamina C, que en algunas variedades asciende hasta 369 mg/100 g. En vitamina A, hasta 650 mg/100 g superando al mango. Otro estudio similar demostró que algunas variedades de nanche dulce superaron en ácido ascórbico a frutas como la fresa, mandarina, zapote negro y hasta a la guayaba, además de su alto valor de caroteno (Medina-Torres *et al.*, 2012).



Tomada de Medina-Torres *et al.*, 2012

Figura 5.5. Árbol y fruto de nanche.

APENDICE B. Curva Patrón de lupeol, α -amirina y β -amirina.

Curva Patrón Lupeol

Tabla 6.1. Curva patrón del lupeol CLAE.

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

Promedio Tr :12.44.

Desviación: 0.2741

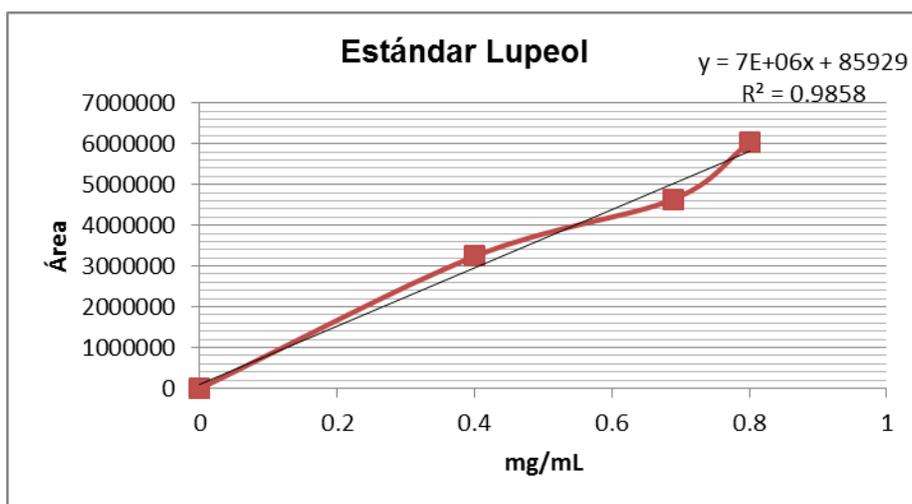


Figura 6.1. Curva patrón del lupeol CLAE.

Curva Estándar α -amirina

Tabla 6.2. Curva patrón de la α -amirina CLAE.

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

Promedio Tr :14.3106.

Desviación: 0.07128

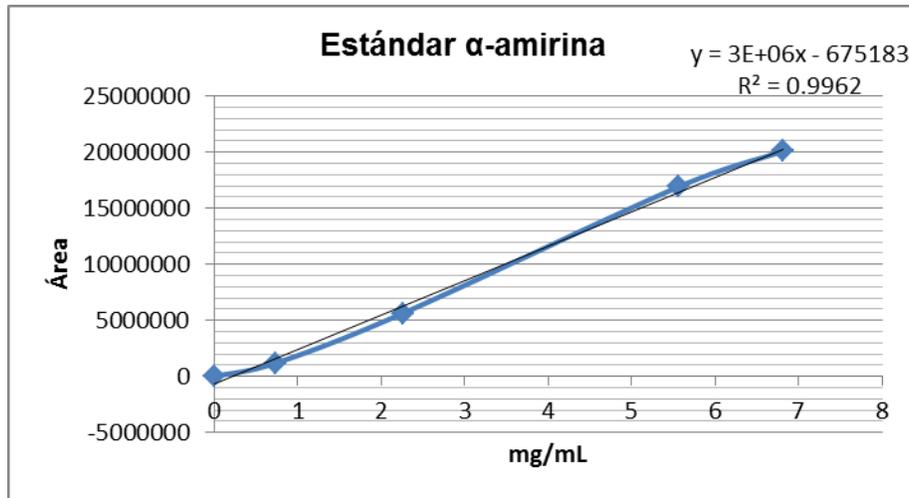


Figura 6.2. Curva patrón de la α -amirina CLAE.

Curva Estándar β -amirina

Tabla 6.3. Curva patrón de la β -amirina CLAE.

Concentración [mg/mL]	Área
0	0
0.7	2086895
2.2	4361516
5.72	17216514
6.4	23205788
9.18	31411376

Promedio Tr:13.6512

Desviación:0.066664

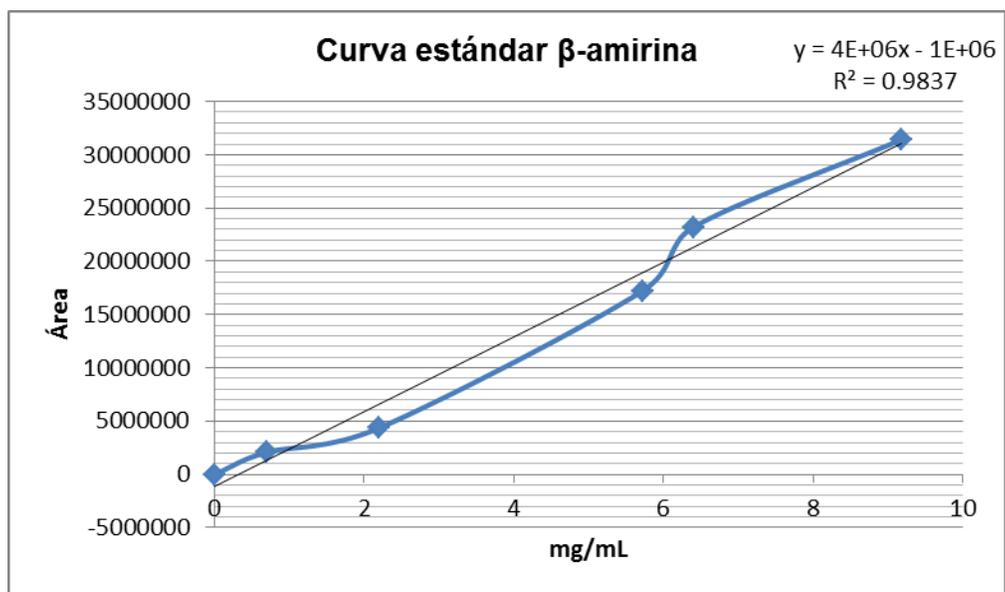


Figura 6.3. Curva patrón de la β -amirina CLAE.

APENDICE C. Cuantificación α y β amirina mediante CLAE en diversas fuentes.

Tabla 7.1. . Cuantificación α -amirina mediante CLAE en diversas fuentes.

[mg α -amirina/g planta seca]			
Fuente	Sonicación	Maceración	Reflujo
Mango hojas	1.146	0.906	1.057
Mango hojas microondas	ND	ND	ND
Hule	0.817	0.789	0.791
Hule microondas	ND	ND	ND
<i>Ficus</i>	0.185	1.017	1.861
<i>Ficus</i> microondas	ND	ND	ND
Látex Hule		74.185	
Látex corona de cristo	55.327		
Látex jaca		366.670	
Uva de mar hoja	ND	ND	ND
Uva de mar tallo	ND	ND	ND
Jaca pulpa	0.390	0.649	0.693
Jaca cáscara	8.751	1.428	12.122
Mango cáscara	0.452	0.571	0.461
Nanche hojas	2.396	2.391	2.417
Nanche fruto	ND	ND	ND
Látex flor de mayo		91.205	

7.2. Cuantificación β -amirina mediante CLAE en diversas fuentes.

Fuente	[mg β -amirina/g planta seca]		
	Sonicación	Maceración	Reflujo
Mango hojas	ND	ND	ND
Mango hojas microondas	ND	ND	ND
Hule	2.582	2.510	2.517
Hule microondas	1.391	2.252	1.401
Ficus	0.606	1.701	0.966
Ficus microondas	ND	ND	ND
Látex hule		32.415	
Látex corona de cristo		66.839	
Látex jaca	ND	ND	ND
Uva de mar Hoja	0.750	1.046	0.736
Uva de mar tallo	2.553	2.599	2.565
Jaca pulpa	0.272	0.527	0.539
Jaca cáscara	2.699	0.900	5.347
Mango cáscara	0.574	0.709	0.601
Nanche hojas	ND	ND	ND
Nanche fruto	ND	ND	ND
Látex flor de mayo		32.229	

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre J., De La Garza T., Zugasti C., Belmares C. and Aguilar C., The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface Methodology, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; 3(6):436-442.
- Arias M., Penichet I., Ysambertt F., Bauza R., Zougagh M. and Ríos A., Fast supercritical fluid extraction of low- and high-density polyethylene additives: Comparison with conventional reflux and automatic Soxhlet extraction, *The Journal of Supercritical Fluids* 2009; 50:22-28.
- Azcon-Bieto J. y Talon M., *Fisiología y bioquímica vegetal*, Facultad de Biligía, Universidad de Barcelona España, Mac Graw-Hill, España, 1993; pp. 233-244.
- Bani S., Kaul A., Khan B., Ahmad S., Suri K., Gupta B., Satti N. and Qazi G., Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolate from *Crataeva religiosa*. *Phytotherapy Research* 2006; 20(4):279-287.
- Barros C., Braga O., Dias S. and Castro B., Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*, Faculty of Pharmacy, UFMG, *Fitoterapia* 2003;74: 729–731.
- Berdonces J., *Gran enciclopedia de las plantas medicinales*, Oceano 2004, Vol. 1 y 2.
- Beyer H. y Walter W., *Manual de química organica*, Reverté 1987, N°19, pp 9-11.
- Boucher F., *Los productos nutraceuticos: oportunidad para los recursos naturales autóctonos*. Editorial Prodar 2000; N°11, pp. 1-10.
- Camacho- Madelaine, *Caracterización estructural de metabolitos secundarios en Capparis ovalifolia*, Universidad católica del Perú, Facultad de ciencias e ingeniería, Lima, Perú, 2012; pp. 1-30.
- Cejudo-Bastante, Durán-Enrique, Castro-Remedios, Rodríguez-Dodero, Natera R. and García-Barroso, Study of the volatile composition and sensory characteristics of new Sherry vinegar-derived products by maceration with fruits, *Food Science and Technology* 2013; 50: 469-479.

- CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y el uso de la biodiversidad. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/6-apocy2m.pdf (Última visita 27/12/13).
- De marzi-Valeria, Cien plantas Argentinas, ALBATROS, Buenos Aires, Argentina, 2006; pp.103-105.
- Dupuy L., Bonilla V., Murillo R., Taylor P., Abad M., González L. and Juliao A., *In vitro* effect of lupeol and casearin G on peripheral blood mononuclear and tumor cells, *Revista Médica de Chile* 2013;141:1150-1157.
- Estupiñan-Bravo., Manual de laboratorio de morfología Vegetal, Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE) Turrialba, Costa Rica 2000.
- Gallo-Margaret and Sarachine -Miranda, Biological Activities of Lupeol, *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2009; (Special issue 1):46-62.
- Guzmán-Juárez, Fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* en modelos de nocicepción en roedores, Facultad de química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF. 2011; pp 32-33.
- Hafeez L., Shahabuddin M., Nelofar A. and Khalid M., *Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol, *Industrial Crops and Products*, 2011;34:1141-1145.
- Hans W., Piechulla B. and Heldt F., *Plant Biochemistry*. Editorial Academic Press, San Diego, USA, 2011; pp. 399-400, 409-428.
- Haldar S., Balaji S., Dipesh D. and Hirekodathakallu V., Lipase mediated separation of triterpene structural isomers, a- and b-amyrin, *Tetrahedron Letters* 2014;55:3122-3125.
- Hernández-Vázquez, Mangas S., Palazón J. and Navarro O., Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties, *Industrial Crops and Products* 2010; 31: 476–480.
- Hifzur R. and Saleem M., Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies, *Life Sciences* 2011;88:285-293.
- HSDB. Hazardous Substances Data Bank, <http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm> (última visita 11/10/14).

· Ikan R., Bernard R. and Simoneit T., Selected Topics in the Chemistry of Natural Products, Editorial World Scientific Publishing Co, London, Inglaterra, 2008; pp.80-89.

· IREKANI. Instituto de biología UNAM
<http://www.siba.unam.mx/irekani/handle/123456789/5350?mode=full&proyecto=Irekani>.

Última visita 27/12/13.

· Kaji-Garcia, Estudio de ultrasonido y métodos convencionales sobre la extracción de limonín a partir de semillas de limón mexicano, Facultad de química Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 2005.

· Kpoviéssi D., Gbaguidi F., Gbénuou J., Accrombessi G., Moudachirou M., Rozet E., Hubert P., Quetin J., Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (nees) T. Anders by capillary gas chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2008;48:1127-1135.

· Kaufman P, Cseke L., Warber S., Duke A. and Brielman L., Natural Products from Plants. Editorial CRC Press, USA 1999; pp. 9-14-17, 75-76, 140-142.

· Kumar D., Vivekananda M. and Subhash C., Design of Experiment Approach for the Process Optimisation of Microwave Assisted Extraction of Lupeol from *Ficus racemosa* Leaves Using Response Surface Methodology, Phytochemistry Analysis, 2013; 24:230–247.

· Lockwood Brian, Nutraceuticals, Editorial Pharmaceutical Press, Manchester, UK, 2007; pp. 1-15.

· McKee T. and McKee R., Biochemistry the molecular basis of life. Editorial Oxford y University Press, New York, USA, 2012; vol. 5, pp. 369-40.

· Medina-Torres, Ortiz-Catón and Valdivia-Bernal, Propiedades Medicinales y otros usos del Nanche [*Byrsonima crassifolia* (L.) HBK], Revista Fuente nueva época 2012; 11: ISSN 2007 – 0713.

· Medical Subject Headings, <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html> (última visita 11/10/14).

· MNCN Museo Nacional de Ciencias Naturales (España)
http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf (Última revisión 27/07/14).

- Nargis A. and Abdul M., Oleanene type triterpenes from *Plumeria rubra*, *Phytochemistry*, 1993; 32: 1523-1525.
- Oliveira P., Silva R., Andrade P., Valenta O., Branca M. , Gonc-Alves F., Pereira A. and Guedes P., Further Insight into the Latex Metabolite Profile of *Ficus carica*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 10855–10863.
- Palanimuthu D., Baskaran N, Silvan S., Rajasekaran D. and Manoharan S., Lupeol, a Bioactive Triterpene, Prevents Tumor Formation During 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Oral Carcinogenesis, *Pathology & Oncology Research* 2012; 18:1029-1037.
- Pasto D., Johnson C. and Miller M., *Experiments and Techniques in Organic Chemistry*, Editorial Prentice Hall Inc., New Jersey, USA, 1992; pp. 56-62.
- Petit-Jiménez, González L., González A., Sotelo M. and Báez S., Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica*, *Revista Fitotecnia Mexicana* 2007;30:51-60.
- Pubchem substance, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary> (última visita 11/10/14).
- Pugnaire I. and Valladares F., *Functional Plant Ecology*, CRC Press, FL, USA, 2007; pp. 481-501.
- Rajendran P., Jaggi M., Singh M., Mukherjee R. and Burman AC., Pharmacological evaluation of C-3 modified betulinic acid derivatives with potent anticancer activity, *Investigational new Drugs* 2008; 26: 25-34.
- Rathee D., Rathee S., Rathee P. and Deep A., Arandjiwala S., Rathee D., HPTLC densitometric quantification of stigmasterol and lupeol from *Ficus religiosa*, *Arabian Journal of Chemistry* 2011; 10.1016:1-10.
- Roberts S., Production and engineering of terpenoids in plant cell culture, *Nature Chemical Biology* 2007;7:387-395.
- Ruiz-Montañez G. and Ragazzo-Sánchez J., Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica L.*), *Food Chemistry* 2014;159:267–272.

- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/Monografias/Frutales/Jaca.html>. (Última visita 29/10/13).
- Saleem M., Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpeno, *Cancer Letters* 2009; 285: 109–115.
- Santos-Hernandez, Identificación y cuantificación de terpenos en agave mezcalero por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas, Facultad de química Universidad Nacional Autónoma de México, México DF., 2008; pp 12-14.
- SEDUMA, Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente. www.seduma.yucatan.gob.mx/flora/fichas-tecnicas/Uva-mar.pdf (Última revisión 27/12/13).
- Shah M. and Rohit M., Novel Techniques for Isolation and Extraction of Phyto-Constituents from Herbal Plants, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 2013; 03: 338-350.
- Siddiqui B. and Sabira F., Two triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtuse*, *Phytochemistry* 1999; 52: 1111-1115.
- Siqueira S., Dos Santos V., Falcão-Silva, Agra F., Dariva C., Siqueira J. and Fonseca M., Biological activities of *Solanum paludosum Moric.* extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction, *The Journal of Supercritical Fluids* 2011; 58: 391-397.
- Sociedad Española de Nutracéutica Médica. <http://www.nutraceuticamedica.org/definicion.htm>. Última revisión (Última revisión 1/09/13).
- Szakiel A., Paćzkowski C., Pensec F. and Bertsch C., Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids, *Phytochemistry Reviews* 2012;11:263–284.
- Talamantes-Gómez, Agentes quimiopreventivos: cuantificación y obtención a escala preparativa de lupeol de varias plantas por tecnologías sustentables, Facultad de química Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Alimentos y Biotecnología, México DF, 2011.

- Ullauri P., Transporte de masa en extracción fase sólido líquido, Reciteia, Universidad central del Ecuador, Ecuador, 2010.
- Umesh B., Shailesh R., Vinayak H., Penna S. and Vishwas A., Preparation and evaluation of antioxidant capacity of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lam.*) wine and its protective role against radiation induced DNA damage, Industrial Crops and Products 2011;34: 1595– 1601.
- Villavicencio-Armenta, Moléculas con actividad biológica: obtención de lupeol de resinas, plantas comestibles y medicinales, Facultad de química Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Alimentos y Biotecnología, México DF, 2012.
- Waizel-Bucay, Las plantas medicinales y las ciencias una visión multidisciplinaria, Instituto Politécnico Nacional, México, 2006, pp. 25-35.
- Xu Duan , Li Li L., Guang Y. and Wen X., Microwave Freeze Drying of Type I Collagen from Bovine Bone, Drying Technology: An International Journal 2013; 10.1080: 31:13-14, 1701-1706.
- Ziegler H., Franzyk H., Sairafianpour M., Tabatabai M., Tehrani M., Bagherzadeh K., Hägerstrand H., Stearke D. and Jaroszewskia J., Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues, Bioorganic and Medicinal Chemistry 2004;12 : 119-127.