

**CARACTERIZACIÓN DE DOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE  
LAS HOJAS DE *Pouteria caimito***

**CARLOS MARIO PALACIOS MOSQUERA  
JUAN DAVID ARISTIZÁBAL CARDONA**

**UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2012**

**CARACTERIZACIÓN DE DOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE  
LAS HOJAS DE *Pouteria caimito***

**JUAN DAVID ARISTIZÁBAL CARDONA  
CARLOS MARIO PALACIOS MOSQUERA**

**Proyecto de grado para optar al título de  
Ingeniero de Procesos**

**Asesor  
PhD. Guillermo León Palacio G.**

**UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2012**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Firma Presidente del jurado**

---

**Firma del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

---

**Ciudad y Fecha (día, mes, año)**

**Agradecemos a Dios por darnos la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.**

**A nuestro maestro Guillermo León Palacio – Ingeniero Químico, PhD - por su entrega y apoyo incondicional, a Daniel Carvajal – Ingeniero de Procesos- por su colaboración continua en cada una de las etapas del proyecto.**

**A mis padres por ser el conducto que ha permitido llegar al final de este sendero.**

**A mis padres, Santiago Aristizábal y Carmenza Cardona, a mi hermana Lina María y a mi abuela Clara, por su apoyo permanente y por la buena energía que me transmiten en todo momento.**

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE ECUACIONES .....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
ANEXO.....	10
ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
III. OBJETIVOS.....	13
IV. JUSTIFICACIÓN .....	14
1 MARCO TEÓRICO.....	16
1.1 Metabolitos secundarios .....	16
1.1.1 Triterpenos .....	22
1.2 Actividad biológica de la amirina y derivados.....	26
1.3 Actividad biológica del lupeol y derivados.....	27
1.4 Género <i>Pouteria</i> .....	28
1.5 <i>Pouteria caimito</i> .....	28
1.6 Métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.....	31
1.6.1 Cromatografía de capa fina .....	31
1.6.2 Cromatografía de columna.....	32
1.6.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia .....	32
1.6.4 Espectroscopía UV - Visible .....	32
1.6.5 Espectroscopía infrarrojo .....	33
1.6.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	34
2 ANTECEDENTES.....	36
2.1 Género <i>Pouteria</i> .....	36
2.1.1 Compuestos aislados .....	36
2.1.2 Actividad biológica.....	37
2.2 <i>Pouteria caimito</i> .....	39
2.2.1 Compuestos aislados .....	39
2.2.1.1 Frutos .....	39

2.2.1.2	Corteza .....	40
2.2.1.3	Hojas.....	40
2.2.2	Evaluación de la capacidad antioxidante de las hojas .....	42
3	METODOLOGÍA .....	43
3.1	Recolección e identificación de material vegetal.....	43
3.2	Materiales y Reactivos.....	43
3.3	Tratamiento de hojas de <i>P. Caimito</i> .....	45
3.3.1	Secado.....	45
3.3.2	Molienda .....	45
3.3.3	Extracción Soxhlet.....	45
3.3.4	Extracción a reflujo .....	46
3.3.5	Purificación y seguimiento cromatográfico.....	47
3.4	Evaluación de la capacidad antioxidante radical DPPH .....	48
3.5	Preparación de derivados .....	48
3.5.1	Hidrólisis alcalina de compuesto 2 (CP2) y esterificación del ácido graso.....	48
3.5.2	Hidrólisis alcalina de compuesto 3 (CP3) .....	49
3.6	Liebermann Burchard .....	50
3.7	Métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.....	50
3.7.1	Cromatografía de capa fina .....	50
3.7.2	Cromatografía de columna.....	50
3.7.3	Cromatografía líquida de alta eficacia .....	51
3.7.4	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	51
3.7.5	Espectroscopía infrarrojo .....	51
3.7.6	Espectrofotometría Ultravioleta - Visible.....	51
4	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	53
4.1	Evaluación de la capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH .....	53
4.2	Cromatografía de capa fina y de columna .....	56
4.3	Caracterización de Compuestos Aislados .....	60
4.3.1	Compuesto 1 .....	60
4.3.1.1	Punto de fusión.....	60

4.3.1.2	Espectroscopía infrarrojo .....	60
4.3.1.3	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	61
4.3.1.3.1	Análisis CG-EM en tiempo de retención (Rt) 36.50 min .....	62
4.3.1.3.2	Análisis del CG-EM en tiempo de retención (Rt) 39.878 min .....	64
4.3.2	Compuesto 2 .....	65
4.3.2.1	Punto de fusión.....	66
4.3.2.2	Ensayo Liebermann – Burchard .....	66
4.3.2.3	Espectrofotometría UV - Visible .....	66
4.3.2.4	Espectroscopía infrarrojo .....	68
4.3.2.4.1	CP2 .....	68
4.3.2.4.2	Producto de hidrólisis – Fase orgánica antes de acidulación .....	69
4.3.2.5	Preparación del derivado .....	71
4.3.2.6	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	71
4.3.2.6.1	Análisis CG-EM - Producto de hidrólisis - Fase orgánica antes de acidulación .....	71
4.3.2.6.1.1	Análisis CG-EM en tiempo de retención (Rt) 47 min .....	72
4.3.2.6.2	Análisis CG-EM - Producto de hidrólisis - Fase orgánica después de acidulación .....	75
4.3.2.6.2.1	Análisis CG-EM en tiempo de retención (Rt) 16.13 min .....	76
4.3.3	Compuesto 3 .....	78
4.3.3.1	Punto de fusión.....	79
4.3.3.2	Ensayo Lieberman – Burchard .....	79
4.3.3.3	Espectrofotometría UV – Visible.....	80
4.3.3.4	Espectroscopía infrarrojo .....	81
4.3.3.4.1	CP3 .....	81
4.3.3.4.2	Producto de hidrólisis CP3 – Alcohol triterpénico .....	83
4.3.3.5	Preparación del derivado .....	84
4.3.3.6	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	84
4.3.3.6.1	Análisis del CG-EM en tiempo de retención (Rt) 49.092 min .....	85
4.3.3.6.2	Análisis del CG-EM en tiempo de retención (Rt) 50.291 min .....	87
4.4	Cromatografía líquida de alta eficiencia .....	88

CONCLUSIONES.....	92
RECOMENDACIONES.....	93
ANEXO.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	97

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de variación de metabolitos secundarios por factores bióticos y abióticos. ....	21
Tabla 2. Actividad biológica de la amirina y derivados. ....	26
Tabla 3. Actividad biológica del lupeol y derivados. ....	27
Tabla 4. Nombres vulgares de <i>P. caimito</i> en regiones del país. ....	29
Tabla 5. Vibraciones de enlaces IR (Skoog <i>et al</i> , 2001). ....	34
Tabla 6. Actividad biológica de especies del género <i>Pouteria</i> , (Silva <i>et al</i> , 2009). ....	38
Tabla 7. Concentraciones efectivas medias para inhibición del radical DPPH (Castro <i>et al</i> , 2006)..	42
Tabla 8. Condiciones de extracción a reflujo.....	46
Tabla 9. Datos de concentración, inhibición DPPH y absorbancia para el ensayo con el EM. ....	54
Tabla 10. Datos de concentración, inhibición DPPH y absorbancia para el ensayo con ASC. ....	55
Tabla 11. Concentraciones efectivas medias de EM y ASC para inhibir DPPH. ....	56
Tabla 12. Información de proceso de purificación por CC1. ....	57
Tabla 13. Información de proceso de purificación por CC2. ....	59
Tabla 14. Espectro IR compuesto 1.....	60
Tabla 15. Espectro IR compuesto 2.....	68
Tabla 16. Espectro IR producto de hidrólisis CP2 – fase orgánica antes de acidulación. ....	70
Tabla 17. Puntos de fusión mezcla de acetato de $\alpha$ y $\beta$ amirina .....	79
Tabla 18. Espectro IR compuesto 3.....	81
Tabla 19. Espectro IR producto de hidrólisis CP3. ....	83

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Factor de retención CCF.....	31
Ecuación 2. Cálculo relación de isómeros acetato de amirina. ....	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos protectores. ....	16
Figura 2. Factores que influyen en la acumulación de los metabolitos en las plantas. ....	18
Figura 3. Esquema biosintético de formación de terpenos. ....	23
Figura 4. Esquema de ciclación del escualeno. ....	24
Figura 5. Síntesis de triterpenos a partir del óxido de escualeno. ....	25
Figura 6. Estructura molecular de oleanano, ursano, dammarano y lupano. ....	26
Figura 7. Planta (A), Hojas (B), Semillas (C), Frutos (D). ....	29
Figura 8. Algunos de los compuestos aislados de especies del género <i>Pouteria</i> . ....	37
Figura 9. Compuestos aislados del fruto de <i>P. caimito</i> . ....	39
Figura 10. Compuestos volátiles aislados del fruto de <i>P. caimito</i> . ....	40
Figura 11. Compuestos aislados de corteza de <i>P. caimito</i> . ....	40
Figura 12. Compuestos aislados de hojas de <i>P. caimito</i> . ....	42
Figura 13. (a) Extracción Soxhlet (b) Material Obtenido de la Extracción. ....	46
Figura 14. Extractos metanólicos (negro) y hexánicos (amarillo-verdoso) en caliente. ....	47
Figura 15. Empacado de fase estacionaria. ....	48
Figura 16. Ensayo DPPH (Oliveira, 2011). ....	53
Figura 17. Comportamiento inhibición DPPH vs concentración EM. ....	54
Figura 18. Comportamiento inhibición DPPH vs concentración ASC. ....	55
Figura 19. CCF Extracto hexánico ....	56
Figura 20. Proceso separación de compuestos a) CC1 b) CC2 c) fracciones recolectadas. ....	57
Figura 21. Seguimiento por CCF a las fracciones recolectadas de CC1 a) FR 1-12 b) FR 13-34 c) FR 35-38 d) FR 39-49 e) FR 50-52 f) FR 53-54 ....	58
Figura 22. Proceso separación de compuestos a) CC2 b) fracciones recolectadas. ....	58
Figura 23. Seguimiento por CCF a las fracciones recolectadas de CC2 a) FR 1-64 b) FR 65-94. ....	59
Figura 24. CCF de compuestos aislados de <i>P. caimito</i> . ....	59
Figura 25. Espectro infrarrojo de CP1. ....	61
Figura 26. CG compuesto 1. ....	62
Figura 27. Espectro de masas parafina Rt = 36.5 min. ....	62
Figura 28. Patrones de fragmentación hidrocarburos. ....	63
Figura 29. Comparación espectro obtenido y librería NIST – parafina. ....	64
Figura 30. Espectro de masas parafina Rt = 39.87 min. ....	64
Figura 31. Comparación espectro obtenido y librería NIST - parafina. ....	65
Figura 32. Prueba de Liebermann Burchard (LB) a) compuesto CP2 - positivo LB, b) $\alpha$ - $\beta$ amirina - positivo LB, c) compuesto CP1 - negativo LB. ....	66
Figura 33. Espectro UV – reacción CP2 y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	67
Figura 34. Espectro UV –CP2 en etanol. ....	68
Figura 35. Espectro infrarrojo de CP2. ....	69
Figura 36. Espectro infrarrojo producto hidrólisis – fase orgánica antes de acidulación. ....	70

Figura 37. CCF para progreso de hidrólisis CP2.....	71
Figura 38. CG producto de hidrólisis – fase orgánica.....	72
Figura 39. Espectro de masas del producto de hidrólisis – Lupeol.....	72
Figura 40. Estructura química del lupeol.....	73
Figura 41. Patrones de fragmentación Lupeol (Carvalho <i>et al</i> , 2010). ....	74
Figura 42. Comparación espectro producto de hidrólisis-fase orgánica y librería NIST. ....	75
Figura 43. CG producto de hidrólisis – fase orgánica después de acidulación.....	76
Figura 44. Espectro de masas del producto de hidrólisis – etíl palmitato. ....	77
Figura 45. Comparación espectro obtenido y librería NIST para etíl palmitato.....	77
Figura 46. Espectro de masas para el etíl palmitato (Ryhage and Stenhagen, 1959).....	78
Figura 47. Espectro de masas para el etíl palmitato de pherobase.....	78
Figura 48. Prueba de Lieberman Burchard (LB) a) compuesto CP3 - positivo LB, b) $\alpha$ - $\beta$ amirina - positivo LB, c) compuesto CP1 - negativo LB.....	80
Figura 49. Espectro UV – reacción CP3 y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	80
Figura 50. Espectro UV –CP3 en etanol.....	81
Figura 51. Espectro infrarrojo de CP3 – Acetato de $\alpha$ y $\beta$ amirina. ....	82
Figura 52. Espectro IR producto de hidrólisis CP3 – Alcohol triterpénico. ....	83
Figura 53. CCF para progreso de hidrólisis CP3. ....	84
Figura 54. CG compuesto 3. ....	84
Figura 55. Espectro de masas CP3 con Rt 49.092 - Acetato $\beta$ amirina. ....	85
Figura 56. Patrones de fragmentación acetato $\beta$ amirina. ....	86
Figura 57. Espectro de masas acetato $\alpha$ amirina. ....	87
Figura 58. Patrones de fragmentación acetato $\alpha$ amirina. ....	88
Figura 59. HPLC para el acetato de $\alpha$ y $\beta$ amirina – ACN (90%).H <sub>2</sub> O.....	89
Figura 60. HPLC para el palmitato de lupeol – ACN(90%). H <sub>2</sub> O.....	89
Figura 61. HPLC para el acetato de $\alpha$ y $\beta$ amirina - ACN (80%).H <sub>2</sub> O. ....	90
Figura 62. Análisis, por HPLC, de extracto hexánico - ACN (90%).H <sub>2</sub> O.....	90
Figura 63. a) datos curvas de calibración b) acetato de $\beta$ amirina c) acetato de $\alpha$ amirina d) palmitato de lupeol.....	91

## ANEXO

Anexo 1. Condiciones de operación CG-EM. ....	94
---	----

## ABREVIATURAS

ABS	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ASC	Ácido ascórbico
BHT	Butilhidroxitolueno
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
DPPH	1,1-difenil-1-picrilhidrazilo
EH	Extracto hexánico
EM	Extracto metanólico
FR	Fracción
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo transformada de Fourier
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
KBr	Bromuro de potasio
LB	Liebermann Burchard
mAU	Unidades de miliabsorbancia
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
p.f.	Punto de fusión
Rf	Factor de retención
Rt	Tiempo de retención
UV-VIS	Espectrofotometría ultravioleta-visible
µg	Microgramo
int. rel.	Intensidad relativa

## I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo describe el estudio químico de las hojas de *P. caimito* recolectadas en la ciudad de Quibdó, Departamento del Chocó. Se caracterizaron dos compuestos triterpénicos, correspondientes a un acetato y a un éster de ácido graso al igual que dos compuestos hidrocarbonados acíclicos. Es el primer estudio donde se reportan estos metabolitos secundarios en la especie.

Las investigaciones sobre *P. caimito* han estado centradas en estudios fenológicos (De Aguiar *et al*, 1998) y químicos de frutos (Pelliciani *et al*, 1972), corteza (Ardon *et al*, 1973) y hojas (Ramos *et al*, 2006). El estudio químico previo de las hojas de *P. caimito*, provenientes de la región Amazónica, realizado por Ramos reporta la presencia de compuestos diferentes a los caracterizados en la presente investigación, dando indicios del fenómeno de variabilidad intraespecífica en la producción de metabolitos secundarios, relacionado con los diferentes factores bióticos y abióticos del entorno de la planta.

*P. caimito* pertenece al género *Pouteria* de la familia Sapotaceae dividida en 53 géneros y 1250 especies, distribuidas en el mundo entero, principalmente en regiones tropicales y subtropicales de Asia y América del Sur (Swenson & Anderberg, 2005).

En Colombia *P. caimito* se encuentra distribuido principalmente en Caquetá, Chocó, Meta, Nariño, Huila, Amazonía y Valle recibiendo distintas denominaciones según la región.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según estudios preliminares del grupo GIPAB, línea de productos vegetales, los extractos polar y no polar de las hojas de *P. caimito* provenientes del Chocó, presentan un compuesto mayoritario, del cual no se conoce estructura molecular ni propiedades fisicoquímicas. Además, se indica la presencia de varios compuestos y algunos de ellos apuntan a estructuras triterpénicas aún no identificadas.

Este sería el primer estudio fitoquímico de un individuo de *P. caimito* del Chocó y en forma particular el primero realizado de un extracto hexánico.

### **III. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Caracterizar dos metabolitos secundarios presentes en las hojas de *P. caimito* para contribuir al conocimiento químico de la especie.

#### **Objetivos Específicos**

Purificar dos metabolitos secundarios del extracto hexánico de las hojas de *P. caimito* para determinar sus propiedades fisicoquímicas.

Caracterizar los metabolitos aislados de las hojas de *P. caimito* por técnicas instrumentales (CG-EM, FTIR, HPLC), para determinar su estructura molecular.

Sintetizar al menos un derivado de los metabolitos aislados con el fin de complementar su caracterización.

Evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *P. caimito*, obtenidos por lixiviación, para determinar la concentración inhibitoria media del radical DPPH.

Realizar curvas de calibración, por HPLC, para la cuantificación de los dos metabolitos secundarios aislados de las hojas de *P. caimito*.

Establecer la importancia de los productos obtenidos de las hojas de *P. caimito* para promover su propagación.

## **IV. JUSTIFICACIÓN**

### **Aspecto científico**

El conocimiento de los metabolitos secundarios de una especie vegetal es de vital importancia ya que estos presentan propiedades biológicas, desempeñan funciones ecológicas, tienen aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Ávalos *et al*, 2009). Es importante investigar *P. caimito* debido a que se ha reportado actividad biológica para algunas especies de la familia Sapotaceae, a la cual pertenece *P. caimito*, como antioxidante (Castro *et al*, 2006), anti-inflamatoria (Pal *et al*, 1999; Falcão *et al*, 2005), antibacteriana (Kudi *et al*, 1999; Ogunwande *et al*, 2001), y antifúngica (Ogunwande *et al*, 2001). De las hojas de *Pouteria gardnerii* ha sido aislado naturalmente el acetato de amirina (Silva *et al*, 2007). Este compuesto reduce los niveles de azúcar en la sangre (Narender *et al*, 2009).

### **Aspecto económico**

El mercado mundial de medicamentos derivado de plantas ha sido estimado en aproximadamente 30.69 billones de dólares durante la última década, donde los terpenos y esteroides representan la fracción más importante, con ventas anuales estimadas en 12.4 billones de dólares (Muffler *et al*, 2010). Se debe profundizar la investigación fitoquímica en especies del género *Pouteria* debido a que los compuestos principalmente aislados de este han sido triterpenos, esteroides y flavonoides, haciendo de este modo al género *Pouteria* fuente importante de productos naturales con alto valor agregado en los mercados internacionales.

### **Aspecto ambiental**

Actualmente, el árbol es talado para su aprovechamiento como fuente maderable y los frutos son comercializados como fuente comestible, por lo que un mayor conocimiento fitoquímico de las partes del árbol contribuirá a que se puedan descubrir alternativas de utilización frente a las convencionales, previniendo de este modo la tala y pérdida de biodiversidad.

En 2006 un grupo empresarial canadiense obtuvo una licencia de aprovechamiento forestal, otorgada por Codechocó, para explotar durante 15 años más de cinco millones de metros cúbicos de madera; unos US\$1.500 millones. La empresa ha comenzado a talar árboles en Bahía Solano para

exportar a China, las maderas más finas del Chocó. algarrobo, sande, cedro amargo, bálsamo, caimito, chanul y virola.

### **Aspecto social**

La pérdida de biodiversidad de una región conlleva a que se disminuya su potencial socioeconómico, su desarrollo sostenible y halla menos oportunidades para mejorar la calidad de vida de sus habitantes, por lo tanto, es necesario aprovechar los recursos con los que contamos y esto sólo puede hacerse si tenemos claro lo que poseemos y su potencial.

El Departamento del Chocó se caracteriza por su amplia biodiversidad, la cual puede ser aprovechada para alcanzar un desarrollo sostenible que beneficie a los habitantes de esta región. Esta alta diversidad reporta diferentes usos promisorios de importancia para la economía del departamento y del país en general, especialmente en la parte alimenticia y medicinal (Medina *et al*, 2002, Castro *et al*, 2003). Al tenerse un mayor conocimiento de los productos de alto valor que pueden ser extraídos de *P. caimito*, los cultivadores podrían aumentar su calidad de vida debido a que su fuente de ingresos no sólo sería la venta de frutos y material maderable.

# 1 MARCO TEÓRICO

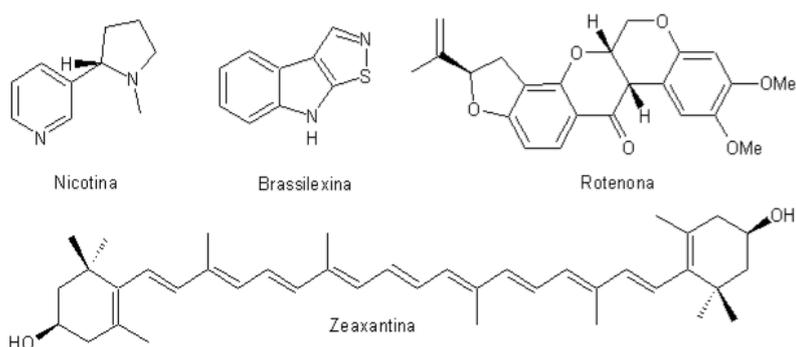
## 1.1 Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran variedad de productos naturales con estructuras muy diversas. Estos productos se denominan comúnmente "metabolitos secundarios", en contraste con los "metabolitos primarios" (Springob *et al*, 2009), que son de carácter universal ya que están presente tanto en hombres, animales y plantas. Los metabolitos primarios están involucrados en la respiración, asimilación de nutrientes, crecimiento y desarrollo siendo los principales lípidos, carbohidratos, ácidos grasos y proteínas (Homero, 2008). Los metabolitos secundarios son productos naturales que cumplen funciones importantes en la interacción entre plantas y su entorno biótico y abiótico. (Springob *et al*, 2009).

Entre las principales funciones de los metabolitos secundarios se destacan:

- Defensa contra bacterias, hongos, amebas, virus y plantas competidoras.
- Mediadores químicos en la simbiosis entre la planta-microbios, planta-insecto ó planta- animales.
- Agentes protectores contra el medio, como la radiación ultravioleta y congelamiento. (Bennet *et al*, 1994; Demain *et al*, 2000).
- Señalizadores para atracción de polinizadores y dispersores de semillas (Croteau *et al*, 2000).

En la figura 1, se presentan las estructuras de algunos metabolitos secundarios.



**Figura 1.** Metabolitos protectores.

Los metabolitos secundarios en las plantas se conciben como el resultado de la adaptación durante los procesos evolutivos.

Sobre la base de su origen biosintético, los metabolitos secundarios de las plantas se pueden dividir en tres grupos principales. flavonoides (i) compuestos fenólicos y polifenólicos, (ii) los terpenoides. (iii) alcaloides y compuestos que contienen azufre (Crozier, 2006).

La habilidad de sintetizar metabolitos secundarios es restringida a ciertos tipos de plantas, siendo el proceso evolutivo el garante de esta selectividad y diferenciación. Cada especie cuenta generalmente con un conjunto de genes responsables por los metabolitos secundarios, los cuales permiten montar mapas fitogenéticos que alejan ó aproximan una especie de otra (Pichersky *et al*, 2000).

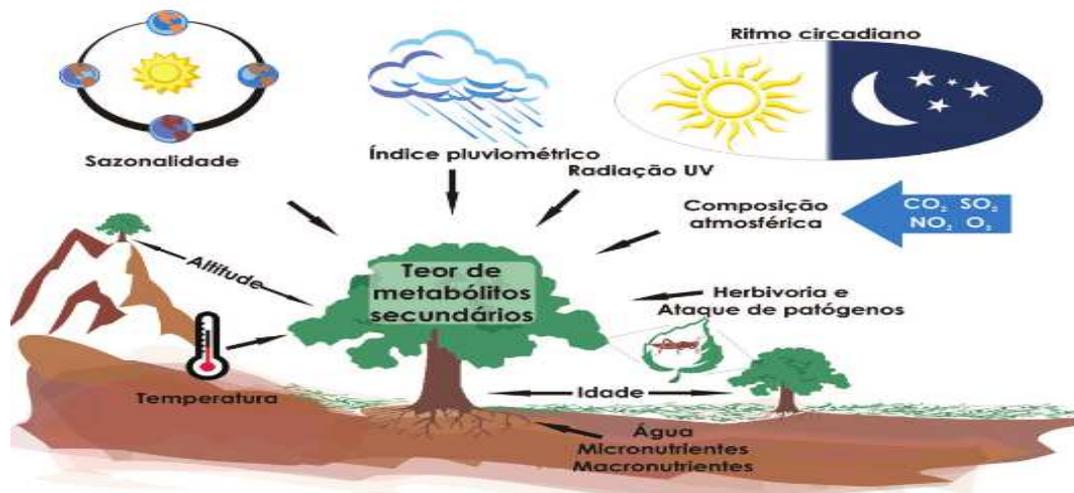
La cantidad de metabolitos secundarios en las plantas no es un fenómeno lineal ya que pueden existir variaciones estacionales o temporales en el contenido de los metabolitos, estas variaciones se establecen en tres niveles; intra-planta, interespecífico e intraespecífico.

La variación intraespecífica de los metabolitos secundarios de la planta se puede presentar como se describe a continuación:

- Variación dentro diferentes partes de la planta.
- Variación de un mismo individuo en la misma población.
- Variación para un mismo individuo entre hábitats.
- Variación estacional.

Debido a que los metabolitos secundarios representan una interfaz química entre la planta y sus alrededores, estos se ven afectados por las condiciones ambientales.

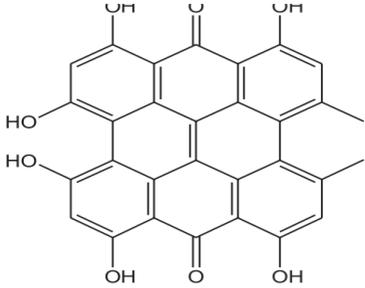
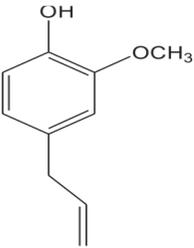
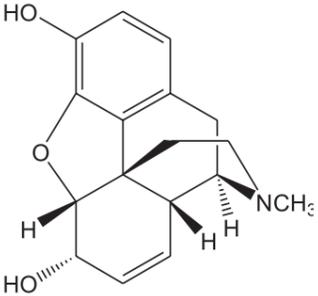
La figura 2, muestra los principales factores que afectan la variabilidad cualitativa y cuantitativa de los metabolitos secundarios en las plantas, entre los que se encuentra; la humedad, altitud, disponibilidad de agua, composición del aire, índice pluviométrico, disponibilidad de micro y macro nutrientes, ataques de herbívoros y patógenos, ritmo circadiano, temperatura y edad de la planta, siendo los dos últimos los factores principales en la comprensión de la variación cualitativa (Gobbo *et al*, 2007).

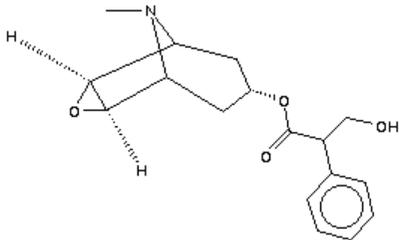
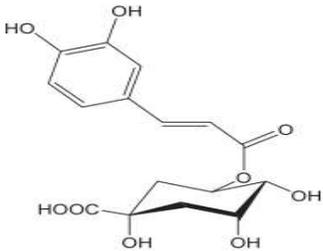
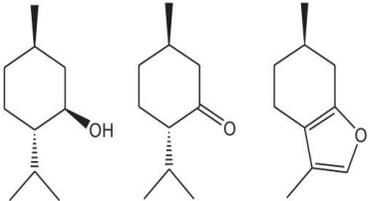


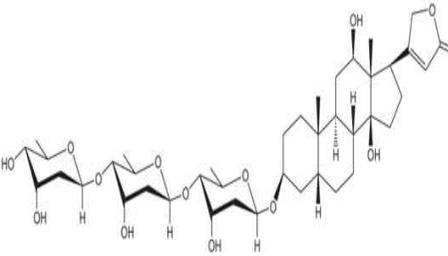
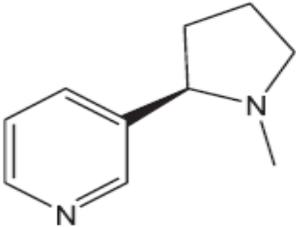
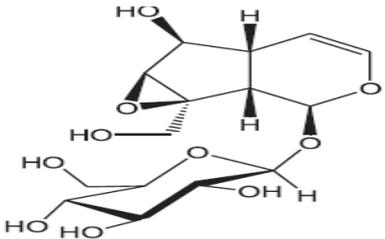
**Figura 2.** Factores que influyen en la acumulación de los metabolitos en las plantas.

En la tabla 1, se describen algunos ejemplos sobre la variabilidad de metabolitos secundarios en las plantas por efectos estacionales, radiación UV, temperatura, disponibilidad hídrica, contaminación atmosférica, altitud, edad de la planta, estímulos mecánicos y por el ciclo día/noche.

**Tabla 1.** Ejemplos de variación de metabolitos secundarios por factores bióticos y abióticos.

Factor	Compuesto	Estructura	Variación	Referencia
Estacional	Hipericina		<p>Las concentraciones de Hipericina en <i>Hypericum perforatum</i>, aumentan de 100 ppm en verano a más de 3000 en invierno.</p>	<p>Southwell <i>et al</i>, 2001.</p>
Ciclo Día/Noche	Eugenol		<p>En el aceite esencial de la albaca, el eugenol alcanza su concentración máxima al medio día, correspondiente al 98% del aceite esencial, en contraste con un 11% a las 17 horas.</p>	<p>Silva <i>et al</i>, 1999</p>
Edad	Morfina		<p>En <i>Papaver Soniferum</i> el contenido de Morfina aumentó de 20 µg/g en el día 50 a más de 120 µg/g en el día 75 después de la germinación.</p>	<p>Williams <i>et al</i>, 1989.</p>

<p><b>Temperatura</b></p>	<p>Escopolamina</p>		<p>En hojas de tabaco (<i>Nicotiana Tabacum</i>), aumentó el contenido de escopolamina de 4 a 5 veces, durante la temporada de baja temperaturas.</p>	<p>Koepe <i>et al</i>, 1970</p>
<p><b>Disponibilidad de Hídrica</b></p>	<p>Ácido clorogénico</p>		<p>En <i>Hypericum Perforatum</i> existe un aumento del contenido del ácido clorogénico con el aumento de las precipitaciones.</p>	<p>Gray <i>et al</i> ,2003</p>
<p><b>Radiación UV</b></p>	<p>Mentol Mentona Mentofurano</p>		<p>Las hojas bajo condiciones de día largo contienen mentol, mentona y pequeñas cantidades de mentofurano, mientras que en días cortos el componente mayoritario es el mentofurano.</p>	<p>Voirin <i>et al</i>, 1990.</p>

<p><b>Contaminación Atmosférica</b></p>	<p>Digoxina</p>		<p>En <i>Digitalis Lanasa</i>, una atmósfera enriquecida con 1000 ppm de CO<sub>2</sub>, producen 3.5 veces más digoxina por hectárea que plantas cultivadas en el campo.</p>	<p>Evans <i>et al</i>, 1996.</p>
<p><b>Estímulos Mecánicos</b></p>	<p>Nicotina</p>		<p>En un estudio sobre <i>Nicotiana sylvestris</i> en el cual se varió el número de heridas artificiales, al ser cuantificada la concentración de nicotina después de 5 días se encontró una correlación positiva entre el número de heridas y la acumulación de nicotina en toda la planta.</p>	<p>Baldwin <i>et al</i>, 1997.</p>
<p><b>Altitud</b></p>	<p>Catalpol</p>		<p>Estudios efectuados en altas y bajas altitudes demostraron que la concentración de catalpol en <i>Plantago lanceolata</i>, aumenta con la altitud.</p>	<p>Darrow <i>et al</i>, 1997.</p>

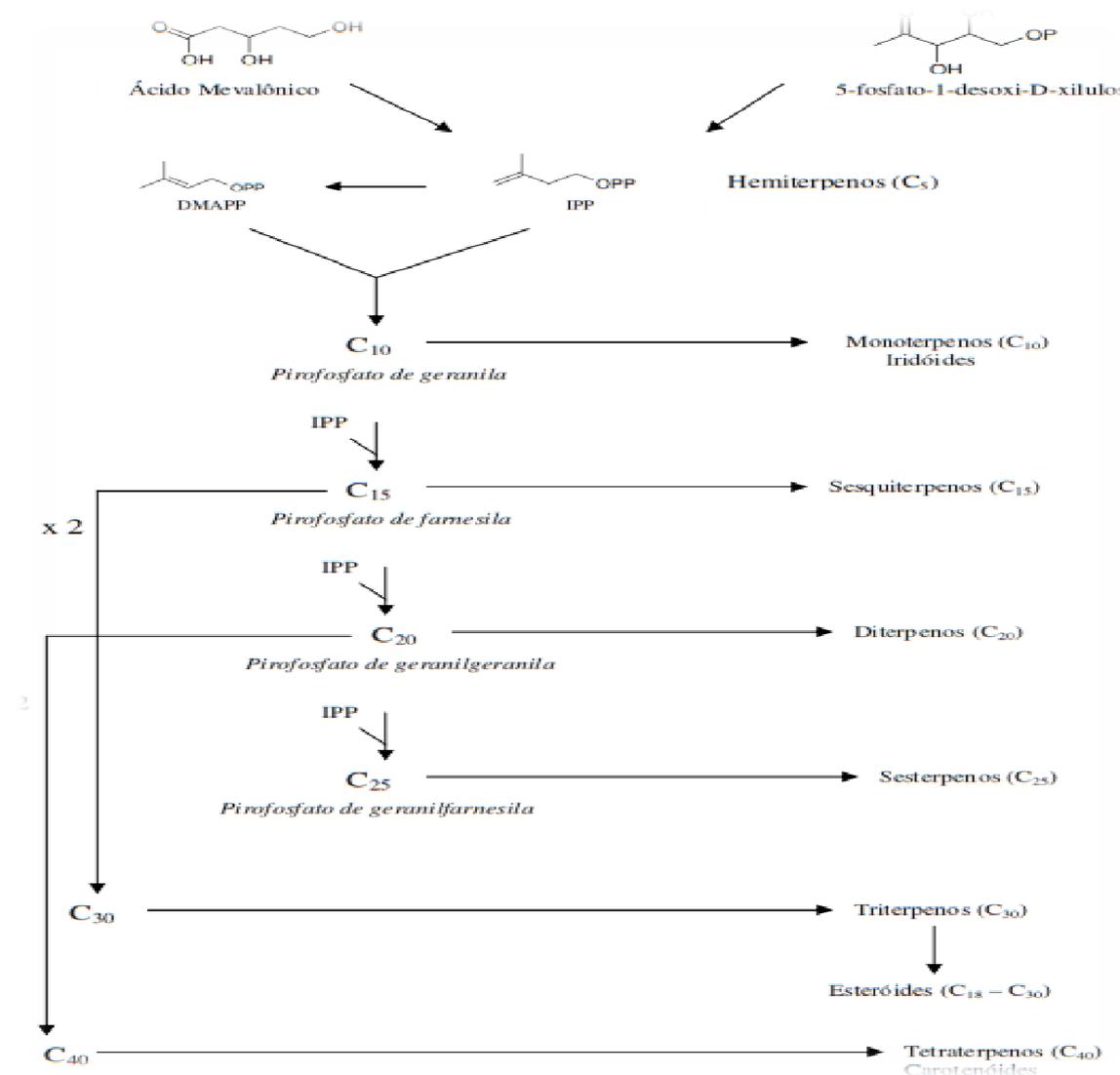
### 1.1.1 Triterpenos

Los terpenos son compuestos diversos que tienen esqueletos formados por unidades de isopreno ( $C_n$ ). Se clasifican en hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) y tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (Silva *et al*, 2007).

Los monoterpenos son constituyentes de aceites volátiles, actúan como atrayentes de polinizadores. Los sesquiterpenos en general presentan funciones protectoras contra hongos y bacterias, algunos dan origen al desarrollo de hormonas de origen vegetal (Silva *et al*, 2007). Los triterpenos y sus derivados presentan funciones de protección contra herbívoros, favorecen la germinación de semillas e inhiben el crecimiento de raíces (Oliveira *et al*, 2003). El esqueleto de carbono de los triterpenos puede ser acíclico o estructuras mono, bi, tri, tetra y penta cíclicas (Muffler *et al*, 2010).

Muchos productos naturales se derivan de los terpenos, a pesar de que no tengan esqueletos de carbono formados exclusivamente por unidades  $C_5$  de isopreno. A estos compuestos, similares a los terpenos, se les denomina terpenoides. Estos pueden haber sido alterados a través de reordenamientos, pérdida de átomos de carbono o por introducción de átomos adicionales de carbono (Wade, 2004).

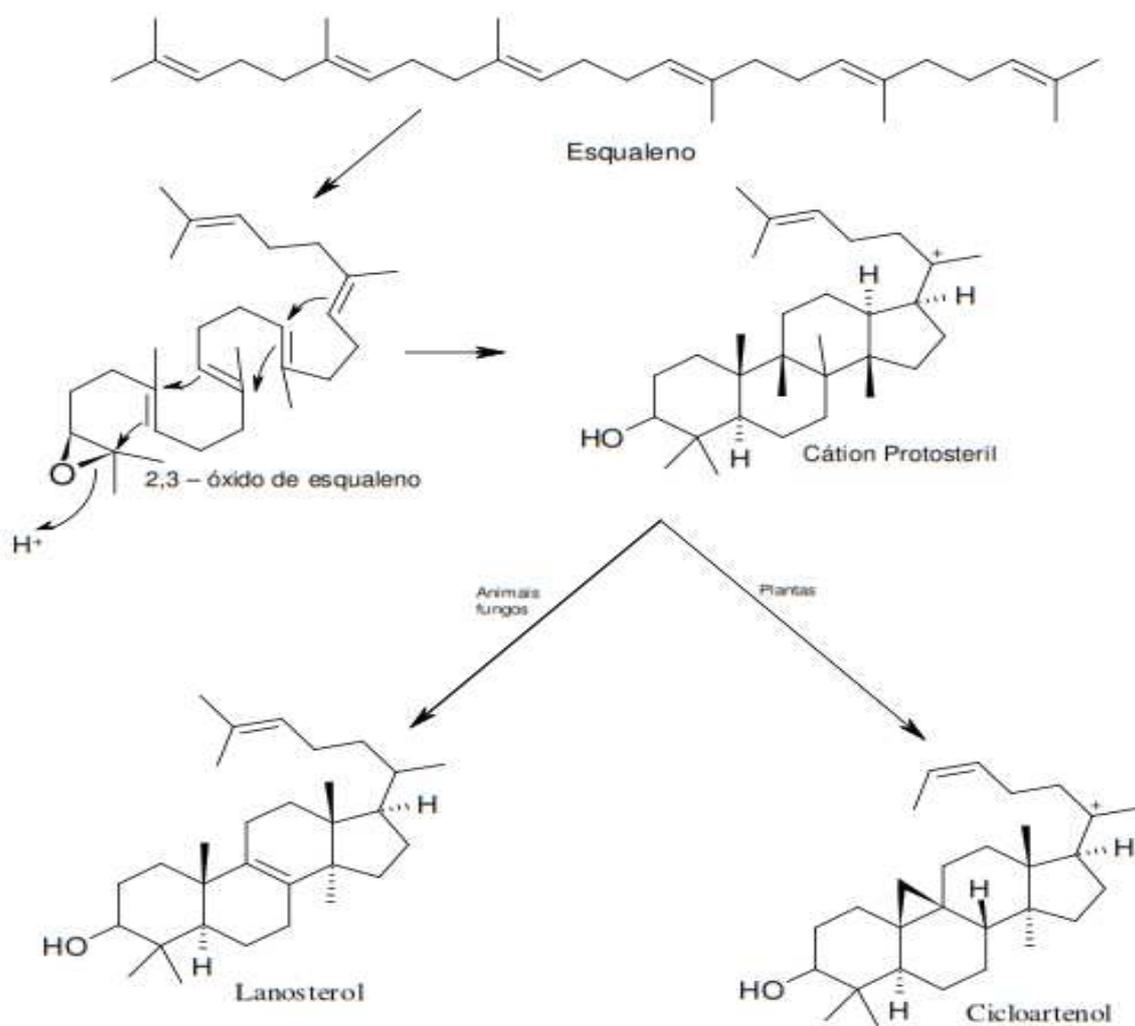
La figura 3, presenta el mecanismo biosintético de formación de terpenos, la cual se da a partir de la adición de unidades de isoprenos.



**Figura 3.** Esquema biosintético de formación de terpenos.

La forma de triterpeno más sencilla, respecto a la complejidad de su estructura carbonada es el escualeno, este compuesto aislado por primera vez a partir de aceites de hígado de pescado, también se encuentra en los aceites vegetales y grasas de mamíferos (Catchpole, 1997). Debido a sus enlaces no saturados, la estructura del escualeno presenta características de reactividad. El escualeno es el precursor del grupo diverso de triterpenos policíclicos (Pietsch, 2007).

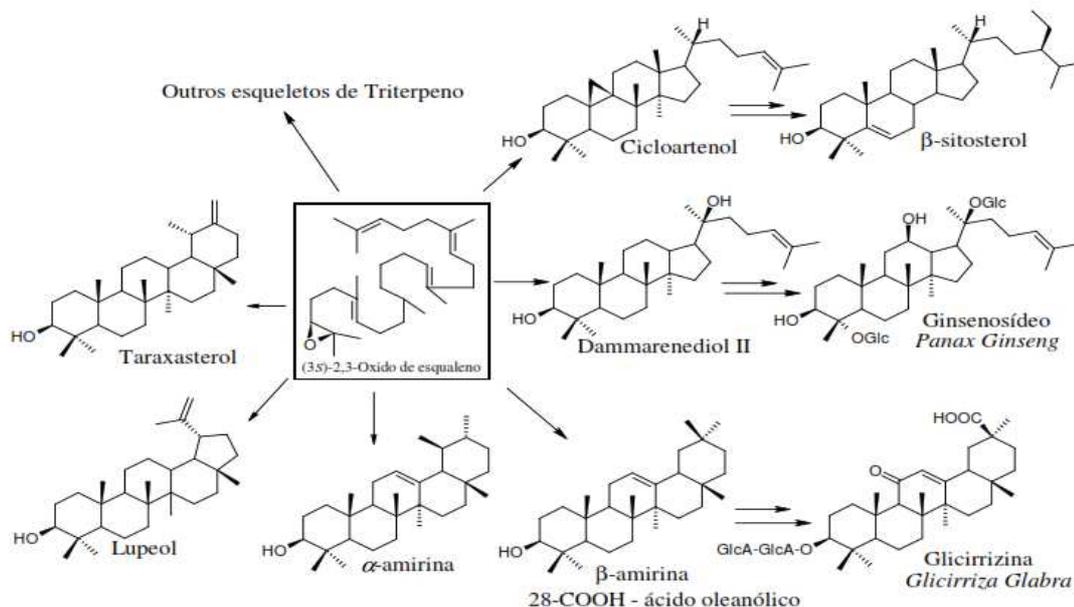
La figura 4, describe el proceso de ciclación del escualeno para la formación de esteroides y triterpenos.



**Figura 4.** Esquema de ciclación del escualeno.

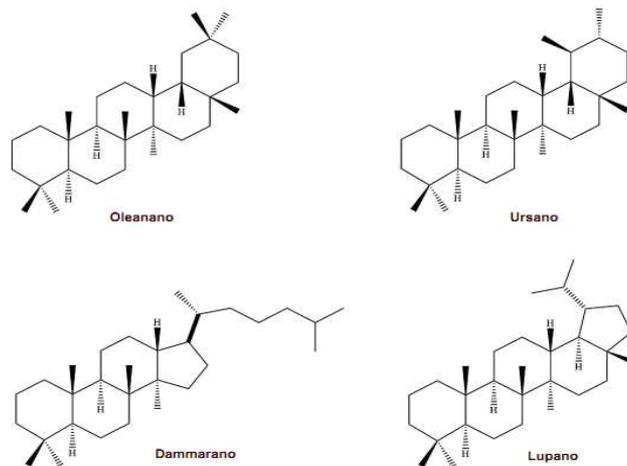
La diversidad estructural de los triterpenos es catalizada por la enzimas triterpenosintaza, en donde a partir del óxido de escualeno se sintetizan diversos triterpenos.

La figura 5, describe la formación de alcoholes triterpénicos y glucósidos a partir del oxido de escualeno.



**Figura 5.** Síntesis de triterpenos a partir del óxido de escualeno.

Desde una perspectiva biológica, se supone que la mayoría de las estructuras importantes de triterpenoides son los oleanano, ursano, lupano, y dammarano (Eggersdofer, 2005) cuyas estructuras se muestran en la figura 6. Estas estructuras policíclicas pueden ocurrir como triterpenoides libres o glucósidos triterpénicos, así como sus precursores. Los efectos biológicos de los terpenoides son muy diversos y pueden resumirse de la siguiente manera; anti-inflamatorios, hepatoprotectores, analgésicos, antibióticos, antimicóticos, virostáticos, inmunomoduladores, y algunos tienen efectos tónicos (Dzubak, 2006).



**Figura 6.** Estructura molecular de oleanano, ursano, dammarano y lupano.

## 1.2 Actividad biológica de la amirina y derivados

Los alcoholes de las estructuras del oleanano y ursano son llamados comúnmente  $\beta$  amirina y  $\alpha$  amirina respectivamente. Estos triterpenos son mencionados conjuntamente porque comparten similares características estructurales y actividades farmacológicas. En la tabla 2, se resumen las actividades biológicas reportadas en la literatura, para los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de la amirina, el acetato de amirina y octanoato de amirina.

**Tabla 2.** Actividad biológica de la amirina y derivados.

Compuesto	Actividad Biológica	Referencia
Ac. $\alpha$ y $\beta$ Amirina	Neurofarmacológica	Gislei <i>et al</i> , 2009.
	Anxiolítico	
	Anticonvulsionante	
	Sedativo	
	Antiinflamatorio	Okai <i>et al</i> , 2000.
$\alpha$ y $\beta$ Amirina	Antiartrítico	Aragão <i>et al</i> , 2006
	Antidepresivo	
	Inhibición de Plaquetas Humanas	
Octanoato $\alpha$ y $\beta$	Antinociceptiva	Soldi <i>et al</i> , 2008

### 1.3 Actividad biológica del lupeol y derivados

El lupeol y algunos de sus derivados han sido reportados en hongos, animales y en diversidad de familias de plantas. El mango, la zanahoria, melón, uva y la corteza de quebracho son fuentes de lupeol.

Algunas plantas medicinales presentan como componente activo el lupeol o sus derivados, como la corteza de *Careya arbórea*, esta es usada en terapias para tratar tumores y como antídoto ante picaduras de serpientes (Senthilkumar *et al*, 2008), las raíces de *Echinops echinatus* se utilizan para tratar desórdenes del sistema reproductivo (Padasshetty *et al*, 2007), en cuanto el *Aspidosperma nitidum* es usado por nativos amazónicos para inflamaciones del útero y ovarios, como anticancerígeno, antireumático y para terapias contra la malaria (Pereira *et al*, 2006). Otras actividades son reportadas para el lupeol y sus esteres en la tabla 3.

**Tabla 3.** Actividad biológica del lupeol y derivados.

<b>Actividad</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Referencia</b>
<b>Antiinflamatorio</b>	Lupeol Lupeol Lineato	Gupta <i>et al</i> , 1969
	Lupeol Acetato Lupeol Palmitato	Nikiéma <i>et al</i> , 2001
<b>Antiartrítico</b>	Lupeol Lupeol Palmitato Lupeol Linoleato	Kweifio <i>et al</i> , 1995
<b>Anticancerígeno</b>	Lupenona Lupeol Acetato	Hata <i>et al</i> , 2002
	Betulin Betulinato de Metil	Gauthier <i>et al</i> , 2006
<b>Anticáncerígeno prostata</b>	Lupeol	Prasat <i>et al</i> , 2008
<b>Anticancerígeno pancreas</b>	Lupeol	Saleem <i>et al</i> , 2005
<b>Antiproteasa</b>	Lupeol Palmitato Lupeol Linoleato	Lynn D. Hodges <i>et al</i> , 2003
<b>Inhibición de Enzimas</b>	Lupeol (Neurodaminasa)	Kim <i>et al</i> , 2003
	Lupenona (Tirosinasa Fosfatasa)	Na <i>et al</i> , 2009

<b>Inhibición de Enzimas</b>	Lupeol Acetato (DNA Polimerasa $\beta$ )	Chaturvedula <i>et al</i> , 2004
	Lupeol Palmitato (Trypsin)	Rajic <i>et al</i> , 2000
	Lupeol Linoleato (PKC) (Trypsin)	Hasmeda <i>et al</i> , 1999 Rajic <i>et al</i> , 2009
<b>Cardioprotector</b>	Lupeol Lupeol Acetato	Saleem <i>et al</i> , 2003
	Luperol Linoleato	Sudhahar <i>et al</i> , 2006
<b>Antimicrobiana</b>	Lupeol Ácido Betulinico Betunil Aldehido	Shai <i>et al</i> , 2008
<b>Antifúngica</b>	Lupeol Ácido Betulinico	Shai <i>et al</i> , 2008

#### 1.4 Género *Pouteria*

El Género *Pouteria* consiste de 9 secciones y 325 especies (Triono *et al*, 2007), Las especies del género *Pouteria* han sido utilizadas como fuente de alimentos, en la medicina popular y como fuente maderable. Varias especies producen frutos comestibles y conocer la composición de sus aceites esenciales sería una información valiosa para la industria alimenticia, ya que podrían ser usados para el desarrollo de nuevos aromas y sabores. Sin embargo, a sólo cuatro especies del género se les ha analizado el contenido de aceites esenciales (Silva *et al*, 2009).

A pesar del potencial que pueden tener las especies del género *Pouteria* como fuente de nuevos fármacos, hasta el año 2008, sólo el 4% de las especies del género habían sido estudiadas biológicamente (Silva *et al*, 2009).

#### 1.5 *Pouteria caimito*

Árbol originario del norte de América del Sur, cultivado ampliamente en Brasil y Colombia e introducido en otras áreas de América tropical. *P. caimito* (Lucuma Caimito R. y P.), en Ecuador se conoce como luma, en Venezuela como temare, otros nombres comunes son Madura Verde, Avio, y en Brasil es conocido como Abieiro. En Colombia se conoce como Caimo (Morton, 1987). En la tabla 4 se presentan los nombres comunes dados a *P. caimito* según la región.

**Tabla 4.** Nombres vulgares de *P. caimito* en regiones del país.

<b>Dispersión Geográfica</b>	<b>Nombres vulgares</b>
Caquetá, Chocó, Meta, Nariño, Vaupés	Caimito
Caquetá	Caimito amarillo
Huila, Valle	Caimo
Meta	Madura-verde

*P. caimito* crece mejor en áreas que tienen suelo húmedo, selvas húmedas tropicales, durante todo el año. En la actualidad se pueden encontrar la mayor parte en la Amazonia; este es un árbol que crece en patios pero no suele ser cultivado comercialmente; en el Perú no crece por encima de 610 msnm, en Colombia se ha encontrado que crece hasta los 1.800 msnm (Morton, 1987).

El árbol presenta una altura entre 5- 15 metros, de porte irregular (León, 2000), la primera ramificación se produce entre 1- 1.5 m, tronco de 30 cm de diámetro, recto, externamente de color marrón y con abundante secreción de látex blanquecino (Arotoma, 2009). Imágenes del tronco, hojas, semillas y frutos se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Planta (A), Hojas (B), Semillas (C), Frutos (D).

### **Hojas**

Las hojas brillantes varían considerablemente en forma, oblanceoladas en la mayoría de los cultivos, tienen una longitud que va desde 10 – 20 cm (León, 2000).

### **Flores**

Las flores que aparecen en las ramillas, tienen el pedicelo fino y corto, cáliz verdoso y corola mucho más larga; las flores son pequeñas, cáliz con cuatro

sépalos, corola con cuatro pétalos, estos son cilíndricos y de color blanco verdoso (Arotoma, 2009). Las flores son hermafroditas, presentan ambos sexos por cada flor, generalmente se abren por la mañana y pueden permanecer abiertas durante dos días (Morton, 1987).

### **Frutos**

Los frutos son esféricos o elipsoidales, de superficie lisa y brillante amarillo dorado en ciertas áreas, verdoso en otras, de 6-12 cm de largo por 4-10 cm de diámetro (Arotoma, 2009). El interior de la fruta es translúcido y blanco, de textura cremosa, gelatinosa y sabor dulce como el caramelo, cada árbol puede producir alrededor de 100-1000 frutos cada año con peso promedio de 200- 250 gr (Calzavara, 1970). Existen dos períodos de floración, estos se dan en los meses donde las lluvias son muy intensas, mientras que el período de fructificación ocurre en épocas con menos intensidad de lluvia (Vélez, 1992).

### **Variedades**

En Puerto Ospina, a lo largo del río Putumayo en Colombia, el árbol produce frutos a partir del cuarto año, cerca del río Inírida. En el Vaupés, Colombia, hay un tipo de *P. caimito* que produce frutos a partir del primer año, pero los frutos son pequeños y con poca pulpa. (Morton, 1987).

### **Semillas**

Los frutos contienen de 1-4 semillas, la mayor germinación se obtiene cuando la siembra se realiza inmediatamente después de extraída la semilla y retirando el mucílago que la cubre; este procedimiento posibilita la germinación relativamente rápida y uniforme, iniciándose la emergencia de las plántulas 22 días después de la siembra, con el 90% de germinación a los 50 días (Arotoma, 2009).

### **Usos**

En Brasil, se consume la pulpa con el fin de aliviar la tos, bronquitis y otros problemas pulmonares, *P. caimito* también se usa para mitigar la tos, diarrea y fiebre, como medicamento ha sido utilizado contra la anemia, como purgante y anti-inflamatorio (Morton, 1987).

La madera del árbol de *P. caimito* es densa, pesada y dura y se utiliza principalmente en la construcción de muebles, armarios y casas (Morton, 1987).

## 1.6 Métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos

En todo trabajo de investigación sobre productos naturales es preciso extraer cuidadosamente los componentes del vegetal en estudio y luego aislar y purificar los compuestos presentes en los extractos obtenidos. Los compuestos puros se analizan con técnicas espectroscópicas y métodos químicos, lo que permite obtener las estructuras químicas correspondientes (Gros, 1985).

### 1.6.1 Cromatografía de capa fina

Técnica utilizada para la separación y determinación de los compuestos presentes en una mezcla. La cromatografía de capa fina consiste en aplicar una capa delgada de un adsorbente en placas de vidrio o principalmente de aluminio, la cual es la fase estacionaria.

La naturaleza de la placa, polaridad de los compuestos presentes en la mezcla y el tipo de eluente son los factores predominantes en estos análisis.

En este tipo de cromatografía, la acción capilar permite empujar los solventes a través de la placa y separar los compuestos, estos se mueven a velocidades distintas debido a las diferencias de solubilidad en el solvente y atracción ejercida por el material adsorbente.

El factor de retención ( $R_f$ ) es utilizado en cromatografía de capa fina como indicativo cuantitativo de como un compuesto viaja a través de la fase estacionaria (Waksmundzka *et al*, 2011). El factor de retención es definido como se presenta en la ecuación 1.

$$R_f = \frac{D_1}{D_2} \quad (1)$$

**Ecuación 1.** Factor de retención CCF.

Donde,

$D_1$ = Distancia recorrida por el soluto desde el punto de referencia o aplicación.

$D_2$ =Distancia viajada por el frente del solvente.

### **1.6.2 Cromatografía de columna**

Se usa para separar y purificar los componentes de una mezcla. La cromatografía de columna utiliza como fase estacionaria un adsorbente en polvo que se coloca en una columna vertical de vidrio. Para el análisis se carga el material en la parte superior de la columna. La fase móvil es un disolvente que se vierte en la parte superior de la columna. El flujo de este a lo largo de la columna, hace que los componentes de la mezcla se distribuyan entre el adsorbente en polvo y el disolvente, separando así los componentes, como resultado del proceso algunos compuestos descienden con las primeras fracciones y otros al final.

El esquema clásico consta de un tubo de vidrio con un diámetro de 10 a 100 mm y una altura de 10 cm a 1 m, que se llena con materiales adsorbentes como sílica gel o alúmina (Waksmundzka *et al*, 2011).

### **1.6.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia**

Técnica utilizada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos. El HPLC utiliza una columna en la cual se empaca la fase estacionaria, una bomba que mueve la fase móvil a través de la columna y un detector que muestra los tiempos de retención ( $R_t$ ) de las moléculas monitoreadas. El tiempo de retención varía dependiendo de la interacción entre la fase estacionaria, moléculas analizadas y el eluyente. La cromatografía en fase normal consiste de una columna de naturaleza polar (sílica) y un eluyente no polar (hexano).

La cromatografía en fase reversa consiste de una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar, generalmente se utiliza sílica tratada con  $RMe_2SiCl$ , donde R es una cadena larga alkil que puede ser  $C_{18}H_{37}$  o  $C_8H_{17}$ . La fase estacionaria empleada conlleva a que el tiempo de retención sea más largo para moléculas que son menos polares mientras que facilita la elución de las moléculas más polares.

En estos procesos suele utilizarse gradientes de elución para el cambio de polaridad durante el análisis de los procedimientos.

### **1.6.4 Espectroscopía UV - Visible**

Se basa en las transiciones electrónicas y proporciona información sobre el tipo y la naturaleza (electrónica) de los enlaces en la molécula de la muestra. La

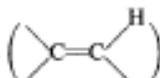
muestra se disuelve en un solvente y se coloca en una celda de cuarzo y parte del solvente se coloca en una celda de referencia. El espectrofotómetro opera, entre 200-400 nm y 400-800 nm, comparando la cantidad de luz transmitida a través de la muestra con la cantidad de luz del haz de referencia. El haz de referencia pasa a través de la celda de referencia para compensar cualquier absorción de luz debida a la celda y al solvente. (Wade, 2004).

### **1.6.5 Espectroscopía infrarrojo**

La espectroscopia infrarrojo se debe a las vibraciones de los enlaces y proporciona información de los grupos funcionales presentes y opera en longitudes de ondas de  $2.5 \times 10^{-4}$  y  $25 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ . Las vibraciones dependen de las masas de los átomos y de la rigidez del enlace, en donde los átomos más pesados vibran más lentamente que los más ligeros. En un espectro infrarrojo se mide las frecuencias de luz infrarroja que es absorbida por un compuesto. Los espectros infrarrojos utilizan generalmente 2 haces de luz. El haz de luz de la muestra que pasa a través de la celda que contiene la muestra y el haz de luz de referencia que contiene el solvente ó no contiene nada en el caso de sólidos o gases. Un espejo rotario hace que la luz de cada una de las fuentes pase a un monocromador, el cual permite que sólo entre una sola frecuencia de luz en el detector, en este se explora y se hace un barrido en el intervalo de frecuencias; el registro de éstas es conocido como espectro. (Wade, 2004).

La siguiente tabla presenta las absorciones correspondientes a distintos grupos funcionales en la región del infrarrojo.

**Tabla 5.** Vibraciones de enlaces IR (Skoog *et al*, 2001).

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias, $\text{cm}^{-1}$	Intensidad
C—H	Alcanos	2.850-2.970 1.340-1.470	Fuerte Fuerte
C—H	Alquenos 	3.010-3.095 675-995	Media Fuerte
C—H	Alquinos (—C≡C—H)	330	Fuerte
C—H	Anillos aromáticos	3.010-3.100 690-900	Media Fuerte
O—H	Alcoholes y fenoles (monómeros)	3.590-3.650	Variable
	Alcoholes y fenoles (unidos por puentes de hidrógeno)	3.200-3.600	Variable, a veces ancha
	Ácidos carboxílicos (monómeros)	3.500-3.650	Media
	Ácidos carboxílicos (unidos por puentes de hidrógeno)	2.500-2.700	Ancha
N—H	Aminas, amidas	3.300-3.500	Media
C=C	Alquenos	1.610-1.680	Variable
C=C	Anillos aromáticos	1.500-1.600	Variable
C≡C	Alquinos	2.100-2.260	Variable
C—N	Aminas, amidas	1.180-1.360	Fuerte
C≡N	Nitrilos	2.210-2.280	Fuerte
C—O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1.050-1.300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1.690-1.760	Fuerte
NO <sub>2</sub>	Nitroderivados	1.500-1.570 1.300-1.370	Fuerte Fuerte

### 1.6.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La espectrometría de masas proporciona la masa molecular e información importante sobre la fórmula molecular, utilizando una pequeña cantidad de sustancia. Un espectrómetro de masas ioniza moléculas a alto vacío, separa los iones de acuerdo con sus masas y mide la abundancia de los diferentes iones según sus masas. La técnica combinada de cromatografía de gases y espectrometría de gases permite realizar análisis de mezclas de compuestos, como las mezclas que se obtienen en las reacciones o las muestras que se

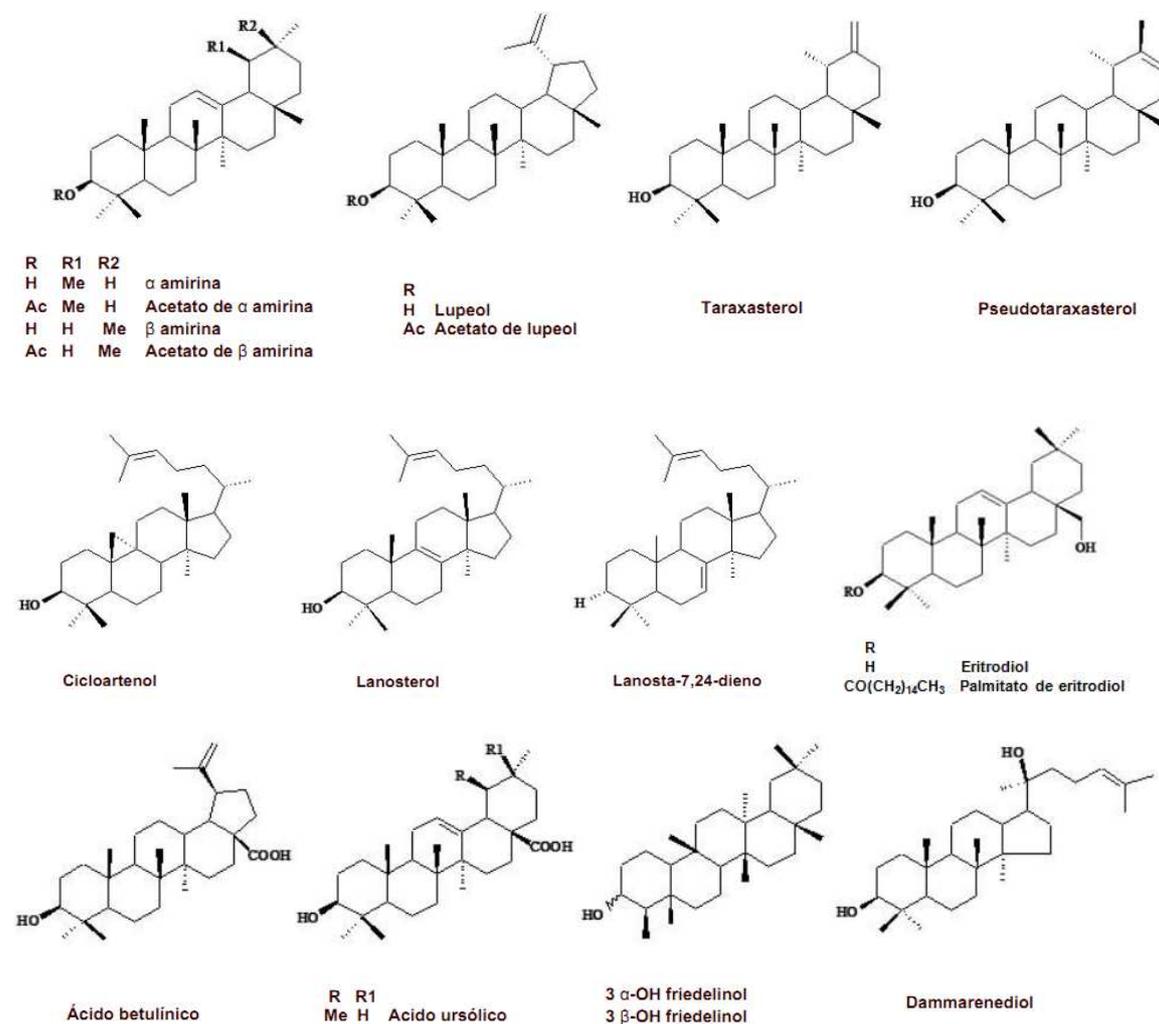
recogen en el medio ambiente. El cromatógrafo de gases utiliza una columna capilar incluida en horno termostático. Esta columna está revestida en su interior con gel de sílice (u otra fase estacionaria), cuya diferente interacción con las sustancias de la mezcla permite separar los componentes de la misma. Esta poderosa combinación de GC-EM permite que el cromatógrafo de gases separe los componentes de la mezcla y que posteriormente sean identificados por su espectro de masas (Wade, 2004).

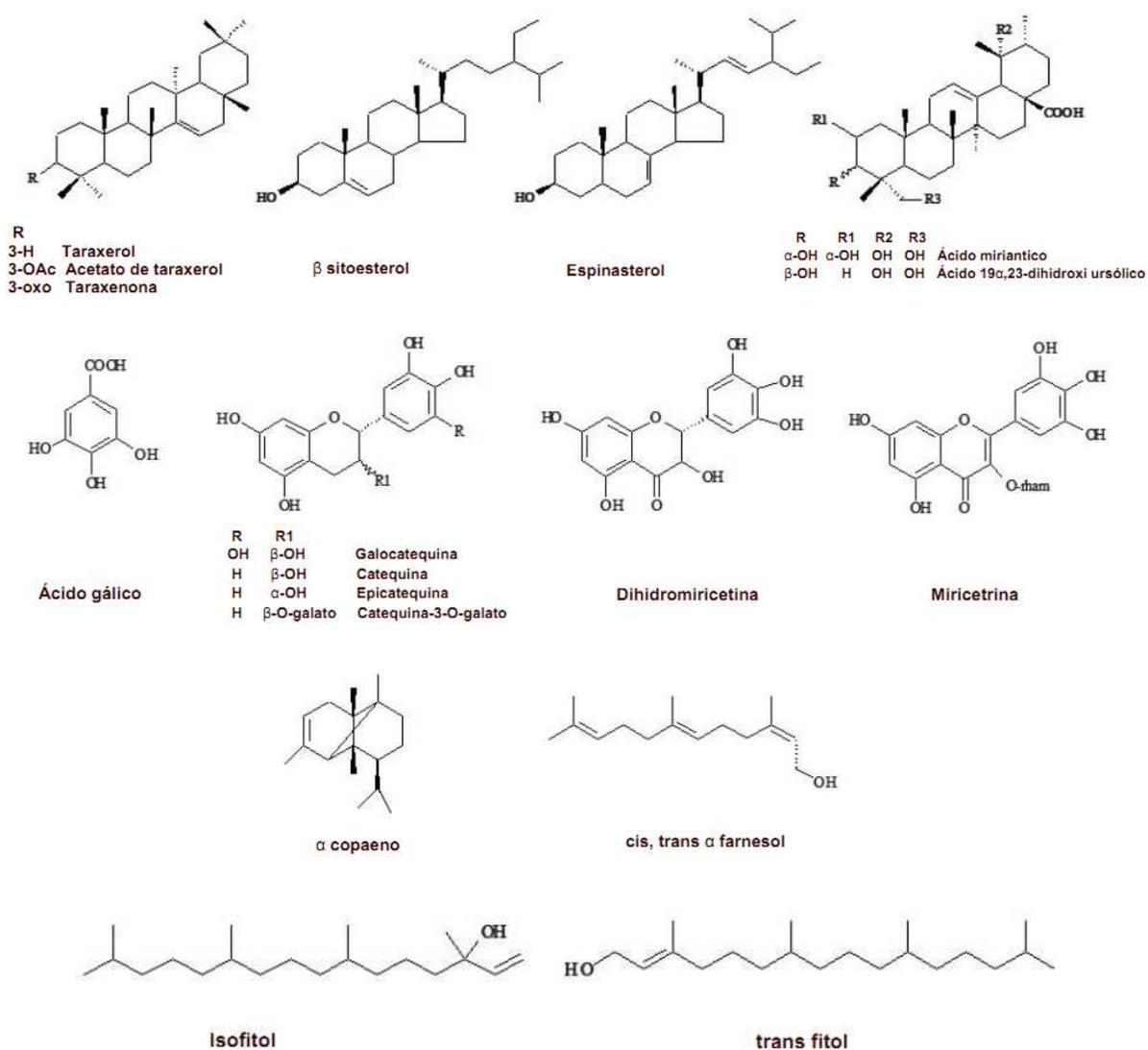
## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Género *Pouteria*

#### 2.1.1 Compuestos aislados

Los compuestos aislados del género *Pouteria* han sido principalmente triterpenos en forma de ésteres ó cadenas largas, esteroides y flavonoides los cuales se muestran en la figura 8 (Silva *et al*, 2009).





**Figura 8.** Algunos de los compuestos aislados de especies del género *Pouteria*.

### 2.1.2 Actividad biológica

Las especies del género han mostrado tener actividad antiinflamatoria, anti-fúngica, antioxidante y antibacteriana por la presencia de metabolitos secundarios en sus frutos, madera, tallo, hojas y corteza (Silva *et al*, 2009). Las actividades biológicas investigadas para las especies del género *Pouteria* se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Actividad biológica de especies del género *Pouteria*, (Silva *et al*, 2009).

<b>Especie</b>	<b>Parte</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pouteria caimito</i>	Hojas	Antioxidante	(Castro <i>et al</i> , 2006)
<i>Pouteria cambodiana</i>	Corteza	Inmunomodulador Antiploriferador de células Antioxidante	(Manosroi <i>et al</i> , 2006)
<i>Pouteria campechiana</i>	Fruto	Antioxidante y antinitrosativo Antimitótico	(Franco, 2006) (Hernandez <i>et al</i> , 2008)
<i>Pouteria grandiflora</i>	Hojas	Produce daño del DNA Antimicrobial	(Agripino <i>et al</i> , 2004)
<i>Pouteria guianensis</i>	Madera	Embriotoxicidad subcrónica para <i>Crassostrea gigas</i>	(Libralato <i>et al</i> , 2007)
<i>Pouteria psamophila</i>	Madera Hojas	Fungicida Antimicrobiano	(Costa <i>et al</i> , 2003) (Agripino <i>et al</i> , 2004)
<i>Pouteria ramiflora</i>	Hojas	Antioxidante Anti-inflamatorio y antinociceptivo Toxicidad a larva <i>Artemia Salina</i>	(Fontes- Junior, 2004) (Nuñez, 2004) (Castro <i>et al</i> , 2006)
<i>Pouteria reticulata</i>	Corteza	Antimicobacterial	(Graham <i>et al</i> , 2003)
<i>Pouteria sapota</i>	Fruto Tallo	Antioxidante Actividad Tripanocidal in Vitro	(Franco, 2006) (Abe <i>et al</i> , 2002)
<i>Pouteria splendens</i>	Hojas	Inhibición a germinación	(Bustamante <i>et al</i> , 2007)
<i>Pouteria torta</i>	Semillas	Toxicidad a larva <i>Artemia Salina</i> Inhibición a germinación y crecimiento Antibacterial y Antifungico Antioxidante Antifungico	(Franzotti, 2004) (Perfeito <i>et al</i> , 2005) (Lopez,2005) (Alves <i>et al</i> 2000) (Nascimento <i>et al</i> , 2007) (Boleti <i>et al</i> , 2007)
<i>Pouteria venosa</i>	Hojas	Antioxidante, actividad antimalarial in vivo Anti-HIV	(Montenegro <i>et al</i> , 2006) (Bedoya <i>et al</i> , 2008)
<i>Pouteria viridis</i>	Fruto Tallo	Antioxidante Antitermita	(Franco, 2006) (Barbosa <i>et al</i> , 2007)

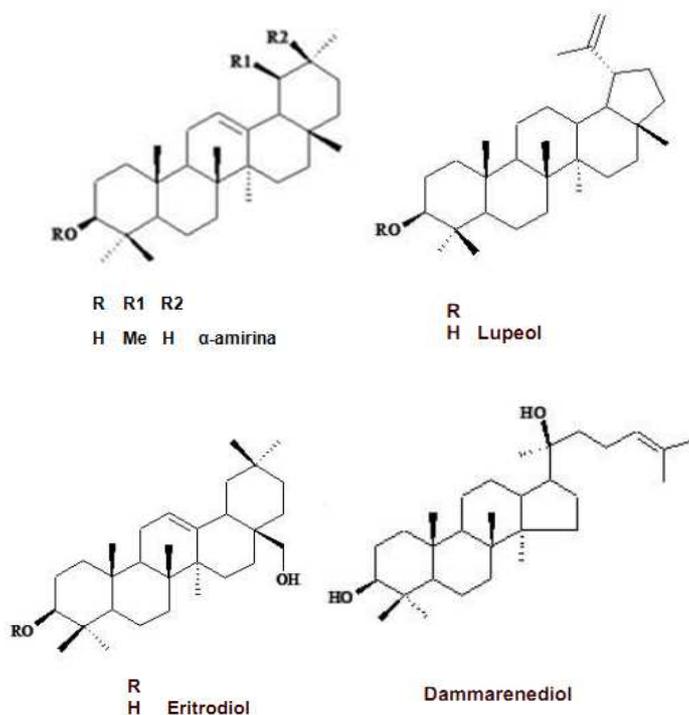
## 2.2 *Pouteria caimito*

### 2.2.1 Compuestos aislados

Los principales compuestos aislados de *P. caimito* han sido monoterpenos, esteroides, triterpenos y ácidos grasos.

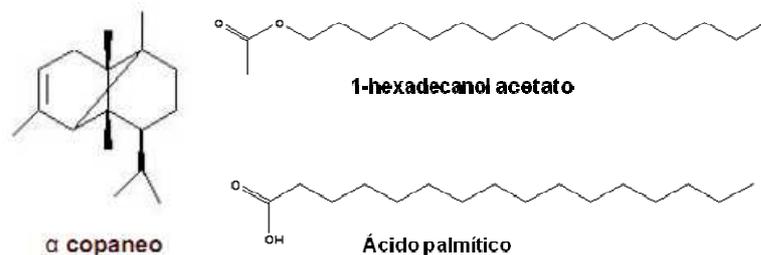
#### 2.2.1.1 Frutos

La investigación fitoquímica del extracto bencénico de la fruta de *P. caimito* reveló la presencia de  $\alpha$  amirina, lupeol, eritrodiol y dammarenediol (Pellicieri *et al*, 1972), cuyas estructuras son presentadas en la figura 9.



**Figura 9.** Compuestos aislados del fruto de *P.caimito*.

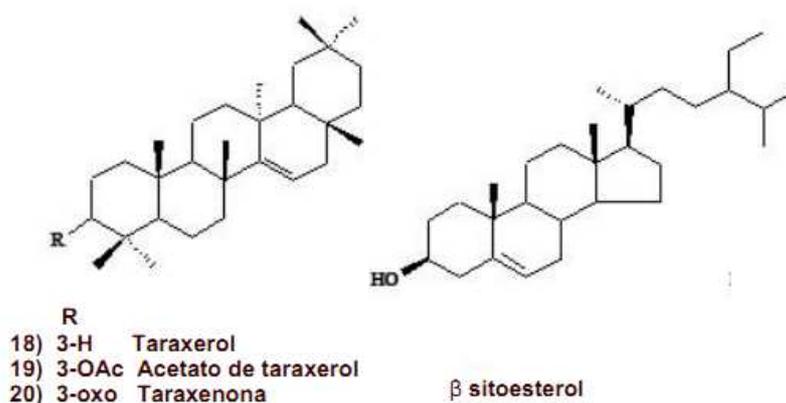
En la figura 10, se presentan las estructuras químicas de los compuestos volátiles, más abundantes, aislados de los frutos, el  $\alpha$ -copaeno (30.5%), hexadecil acetato (20.9%) y ácido palmítico (13.6%) (Maia, 2003).



**Figura 10.** Compuestos volátiles aislados del fruto de *P. caimito*.

### 2.2.1.2 Corteza

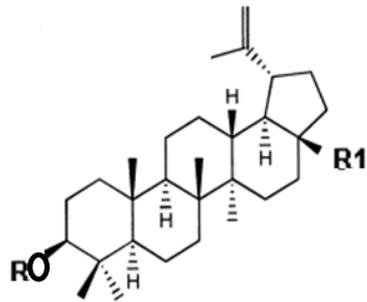
De la corteza de *P. caimito* se aislaron, taraxerol, acetato de taraxerol, taraxeno-3-ona, y  $\beta$  sitoesterol (Ardon *et al*, 1973), cuyas estructuras químicas se presentan en la figura 11.



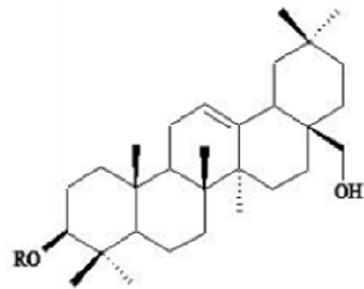
**Figura 11.** Compuestos aislados de corteza de *P. caimito*.

### 2.2.1.3 Hojas

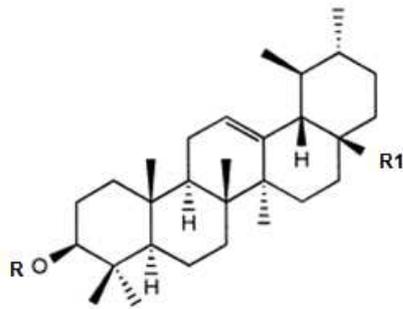
Del extracto metanólico de la hojas se aislaron e identificaron 3 nuevos ésteres de ácidos grasos triterpénicos, junto con palmitato de betulin, palmitato de eritrodíol, palmitato de uvaol,  $\alpha$ -amirina,  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, *E* y *Z* fitol, ácido fitánico y crocetano (Ramos *et al*, 2006), cuyas estructuras son presentadas en la figura 12.



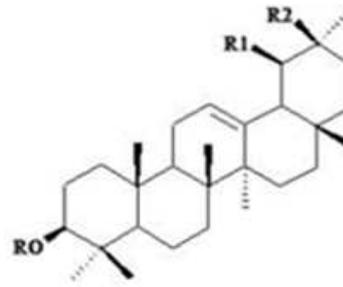
R R1  
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$   $\text{CH}_2\text{OH}$  Palmitato de betulin



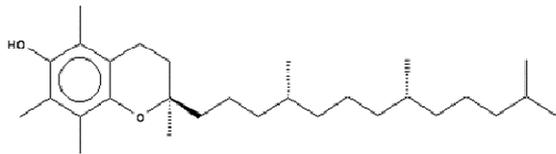
R  
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$  Palmitato de eritrodol



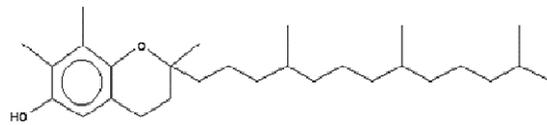
R R1  
 $\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$   $\text{CH}_2\text{OH}$  Palmitato de uvaol



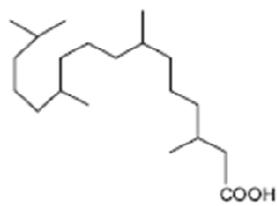
R R1 R2  
 H Me H  $\alpha$ -amirina



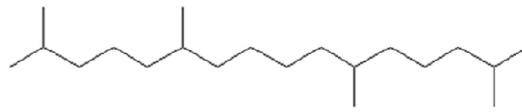
$\alpha$ -tocoferol



$\gamma$ -tocoferol



Ácido fitánico



Crocetano



### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 Recolección e identificación de material vegetal

El material vegetal se recolectó en el barrio Jardín, en la ciudad de Quibdó, Chocó en las coordenadas 05°41'N 76°39'O. Botánicos del Herbario de la Universidad de Antioquia establecieron que el material vegetal recolectado correspondía a *P. caimito*, mediante la comparación con especímenes presentes en el herbario.

#### 3.2 Materiales y Reactivos

- HPLC Agilent 1200 Series
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin, Elmer Spectrum BX. FTIR
- Espectrofotómetro Ultravioleta Spectronic Genesys 2 pc
- Fusiómetro Buchi 510 Melting Point Tottoli B-210
- Extractor Soxhlet fabricado en vidrio capacidad 3 L.
- Horno Hareaeus. Modelo UT6 120 V Hareaeus Instruments
- Cámara extractora de vapores C4 Modelo C1800X
- Condensador de vidrio.
- Plancha de calentamiento y agitación, Corning Stirrer Hot Plate
- Papel filtro, grado. 3 hw; 65 g/cm<sup>2</sup>.
- Placas TLC Aluminio en sílica gel 60, F254 Merck
- Pinzas quirúrgicas
- Termómetro de vidrio de -10° hasta 410° C paso de 2°C
- Erlenmeyers de 50, 100 y 250mL
- Beakers de 10, 50, 250, 1000 mL
- Embudo de vidrio
- Embudo de decantación 5000 mL
- Agitador magnético de 25,4 mm
- Balanza OHAUS Modelo TS 600 S, OHAUS Corporation capacidad 600 g, precisión 0.01 g
- Balones de fondo plano de 6L y 250 mL.
- Columna de cromatografía 1.5 cm diámetro. Longitud. 1.3 m.
- Bomba de vacío BUCHI, Modelo B-169
- Soporte universal
- Capilares, Diámetro. 1.15 mm, Longitud . 75 mm.
- Molino de discos
- Sílica Gel 60 63-200 micras
- Etanol 96% marca Merck
- Cloroformo grado analítico marca Merck
- Anhídrido acético grado analítico marca Merck
- Agua desionizada

- Bencina (Disolvente 10:20)  
marca Merck
- Acetonitrilo grado analítico  
marca Merck
- Metanol grado analítico marca  
Merck
- Ácido sulfúrico concentrado  
marca Merck
- Acetato de etilo grado analítico  
marca Merck
- Revelador universal, ácido  
acético, anhídrido acético y  
ácido sulfúrico.

### **3.3 Tratamiento de hojas de *P. Caimito***

#### **3.3.1 Secado**

Las hojas fueron expuestas al sol durante 2 semanas, en canastas de aluminio con la finalidad de aprovechar el calor concentrado por el material, aumentando de esta forma la tasa de remoción de humedad.

#### **3.3.2 Molienda**

Se utilizó un molino de discos giratorios acoplado a un tamiz con el cual se obtuvo un tamaño de partícula aproximado de 1 mm.

#### **3.3.3 Extracción Soxhlet**

Se sometieron a extracción 896 gr de hojas obtenidas de la molienda, con 5 L de hexano, debido a que esta es la capacidad máxima por batch para el equipo soxhlet utilizado. Durante la extracción se agregó frecuentemente solvente para compensar la pérdida por evaporación evitando de este modo la adhesión del material extraído al fondo del balón.

El proceso de extracción Soxhlet se realizó durante 10 horas, con la finalidad de extraer la mayor cantidad de los metabolitos presentes en las hojas. El extracto se concentró hasta un volumen de 160 ml. Los metabolitos secundarios se aislaron del extracto obtenido, combinando técnicas de extracción sólido-líquido, cromatografía de columna y cristalizaciones sucesivas variando la polaridad del solvente Hex: AcEt. En la figura 13, se presenta el montaje utilizado para realizar las extracciones y el extracto obtenido luego de ser concentrado.



**Figura 13.** (a) Extracción Soxhlet (b) Material Obtenido de la Extracción.

En la presente investigación no se llevo a cabo diseño de experimento debido a que el fin último del proyecto era la caracterización de los metabolitos presentes en las hojas y no la evaluación de factores que pudieran tener incidencia en el proceso de extracción, tales como temperatura, relación solvente: material, tipo de solvente y agitación. Sin embargo, se recomienda desarrollar diseño de experimento para optimizar las condiciones de extracción en estudios posteriores que tengan como finalidad, el escalamiento del proceso para explotación comercial.

### 3.3.4 Extracción a reflujo

Cada extracción se realizó a 1 gr de hojas utilizando como solvente hexano y metanol durante cuatro horas. Las condiciones de extracción se describen en la siguiente tabla.

**Tabla 8.** Condiciones de extracción a reflujo.

Tipo de extracción	Solvente	Tiempo extracción (h)
<b>Caliente (80 C)</b>	Hexano 20ml	4
	Metanol 20 ml	

Al extracto metanólico (EM) obtenido durante cuatro horas de procesamiento, se le evaluó la capacidad antioxidante por el método DPPH y el extracto hexánico se analizó por HPLC, según lo descrito en la sección 3.7.3.

Imágenes de los extractos obtenidos se presentan en la figura 14, donde extractos metanólicos y extractos hexánicos presentan coloraciones negras y verdes respectivamente.



**Figura 14.** Extractos metanólicos (negro) y hexánicos (amarillo-verdoso) en caliente.

### 3.3.5 Purificación y seguimiento cromatográfico

En el proceso de purificación se emplearon columnas de cromatografía con sílica gel como fase estacionaria y gradientes de Hex:AcEt como fase móvil. Se utilizó un sistema de bombeo al vacío, como se presenta en la figura 15, para la compactación de la sílica dentro de la columna evitando el fraccionamiento de ésta durante el proceso de separación.

Las soluciones que contenían los metabolitos secundarios de interés se eluyeron en columnas de cromatografía de las cuales se tomaron fracciones de 10 ml. El seguimiento de las fracciones por cromatografía de capa fina permitió determinar cualitativamente los compuestos presentes en ellas, para unir las fracciones con similar contenido.

Para completar el proceso de separación y purificación de los compuestos, fueron llevadas a cabo cristalizaciones sucesivas, las cuales consisten en disolver, en caliente, los sólidos en solventes con polaridad contraria. Esto permite la remoción de impurezas y favorece la cristalización de compuestos con baja solubilidad en el solvente empleado.



**Figura 15.** Empacado de fase estacionaria.

### **3.4 Evaluación de la capacidad antioxidante radical DPPH**

Se empleó el método de Brand-Williams *et al* (1995) con algunas modificaciones (Rojano *et al*, 2008). El 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), es un radical libre estable que presenta una coloración púrpura en medio metanólico, como consecuencia de la donación de un electrón o un protón por un compuesto con poder antioxidante, la tonalidad desaparece. Este procedimiento se lleva a cabo utilizando 10  $\mu$ L del compuesto estudiado y 990  $\mu$ L de la solución metanólica de DPPH<sup>•</sup> (20 mg/L). Como referencia se usó la misma cantidad de DPPH<sup>•</sup> y 10  $\mu$ L del solvente de la muestra (MeOH). Luego de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se lee la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm (Gaviria *et al*, 2009). Para cada concentración se calcula el porcentaje de inhibición del radical y se determina el CE<sub>50</sub>, concentración a la cual se obtiene el 50% de inhibición. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### **3.5 Preparación de derivados**

Con base en un conocimiento previo de la molécula asilada, la preparación de los derivados permite obtener información adicional sobre la molécula y así completar su caracterización.

#### **3.5.1 Hidrólisis alcalina de compuesto 2 (CP2) y esterificación del ácido graso.**

Se pusieron a reflujo en 50 ml de etanol, 100 mg de CP2 y 40 mg de hidróxido de sodio (NaOH) en escamas según lo descrito por Iwagawa *et al*, 1982. Después de

8 horas de seguimiento cromatográfico por CCF se observaron trazas del compuesto inicial y una mancha que indicaba alta concentración de un compuesto con un Rf de 0.3 similar al Rf del estándar de  $\alpha$ - $\beta$  amirina obtenida en el laboratorio.

La mezcla reaccionante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró hasta sequedad para retirar el etanol. El material resultante se redisolvió en agua con agitación.

Para la recuperación de los productos de hidrólisis (ácido graso, alcohol del triterpeno, NaOH en exceso) se realizó una extracción líquido-líquido de la fase acuosa, en un embudo de separación, con éter dietílico, permitiendo de este modo la partición de los productos de menor polaridad en la fase orgánica y los de mayor polaridad en la fase acuosa. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces para remover trazas de compuestos menos polares aún presentes en la fase acuosa.

Las fases orgánicas fueron reunidas y cromatografiadas. Por CCF se determinó la remoción total del compuesto con Rf de 0.3, de la fase acuosa lavada.

Debido a que el ácido graso presente en la fase acuosa se encontraba en forma de sal, se aciduló la fase con ácido clorhídrico (HCl), obteniendo de este modo el ácido graso libre y trazas de cloruro de sodio (NaCl). La fase acuosa se lavó tres veces con éter dietílico para extraer el ácido graso, estas se juntaron y se llevaron a sequedad.

El sólido obtenido se redisolvió en etanol, con calentamiento, y se adicionaron unas gotas de HCl para realizar la esterificación. Este procedimiento fue adoptado para obtener una buena resolución del espectro en CG-EM.

Los cristales se filtraron, dejando de este modo el compuesto de interés retenido en el papel de filtro y las impurezas en solución.

### **3.5.2 Hidrólisis alcalina de compuesto 3 (CP3)**

Se disolvieron 500 mg de CP3 en 50 ml de etanol comercial y a esta solución se agregó 50 mg NaOH en escamas según lo descrito por Iwagawa *et al*, 1982. La mezcla resultante se colocó a reflujo. Después de media hora con base en un monitoreo cada 10 minutos por CCF, el derivado de CP3 mostró una mancha con

un Rf igual a un estándar de  $\alpha$ - $\beta$  amirina obtenida en el laboratorio. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó suficiente cantidad de agua hasta obtener un sólido casi blanco debido al cambio de polaridad. El sólido se separó por filtración y se lavó tres veces con agua para su posterior cristalización.

### **3.6 Liebermann Burchard**

El ensayo de Liebermann – Burchard, permite identificar estructuras triterpénicas y esteroidales. Para la realización de la prueba se agregan 1.5 mg de muestra en 1 ml de cloroformo, posteriormente se añade 1 ml de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado (98%). La solución se agita y se espera luego el cambio de color. La prueba se considera positiva cuando se obtiene un cambio de color a violeta, rojo ó marrón.

### **3.7 Métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos**

#### **3.7.1 Cromatografía de capa fina**

En los procesos de purificación y separación de los compuestos se utilizó como herramienta clave la cromatografía de capa fina, a partir de la cual se determinaron los metabolitos e impurezas presentes en los extractos y fracciones obtenidas. El seguimiento a través de cromatografía de capa fina se llevó a cabo durante todo el desarrollo experimental hasta constatar la pureza de los metabolitos obtenidos.

Las cromatografías fueron realizadas en placas TLC de Aluminio impregnadas con sílica gel 60 F254 Merck, estas fueron dispuestas en una cámara Cammag de dos compartimientos de 10 X 7 cm. Se utilizó como agente visualizador una mezcla de ácido acético y ácido sulfúrico que una vez esparcido sobre la placa se revela en el horno a 110°C durante 3 minutos. Las eluciones se realizaron con hexano:acetato de etilo (1:0,05).

#### **3.7.2 Cromatografía de columna**

Se usaron columnas de 1.3 m de longitud y 1 cm de diámetro empacadas con sílica gel 60, hasta 1 m de altura. La elución se realizó con gradientes de Hex:AcEt en proporciones de 1:0 y 1:0,05. Se utilizaron dos columnas de cromatografía, CC1 y CC2. En CC1 se eluyó el extracto hexánico (EH) y en CC2

la reunión de fracciones 13-34, las cuales mostraban por CCF mezcla de compuesto 1 (CP1) y compuesto 2 (CP2).

En el proceso de separación por columna se recolectaron fracciones de 10 ml, al tiempo que se les hacía seguimiento cromatográfico por CCF.

Con el fin de eluir el menor volumen de extracto posible dentro de la columna, se siguió el siguiente procedimiento; el extracto que debía ser purificado se llevó a sequedad y se le agregó sílica gel, se homogenizó y se dejó caer sobre la capa superior de sílica pura dentro de la columna cromatográfica.

### **3.7.3 Cromatografía líquida de alta eficacia**

Las curvas patrón de dos metabolitos secundarios, aislados de las hojas de *P.caimito*, se realizaron en un cromatógrafo líquido de alta eficacia, Agilent Series 1200, con columna de fenilo como fase estacionaria y ACN (90%): H<sub>2</sub>O (10%), como fase móvil. El rango de concentraciones de los metabolitos usado para construir la curva patrón fue de 0.1 a 1 mg/ml empleando como solvente isopropanol. Se utilizó detector de arreglo de diodos DAD a una longitud de onda de 210 nm. El método y las condiciones adoptadas permitieron la identificación y cuantificación de los compuestos de interés de manera confiable.

### **3.7.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Las pruebas de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa fueron realizadas en la Sede de Investigación Universitaria – SIU – de la Universidad de Antioquia con las condiciones descritas en el anexo 1.

### **3.7.5 Espectroscopía infrarrojo**

Los espectros de infrarrojo fueron tomados en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer modelo Spectrum BS. El software utilizado en los análisis fue Spectrum V. 5.3.1 Perkin Elmer 2005.

### **3.7.6 Espectrofotometría Ultravioleta - Visible**

Los metabolitos obtenidos se diluyeron en ácido sulfúrico en una concentración de 0,4% relación peso /volumen, la mezcla se calentó a baño María a 60 °C durante

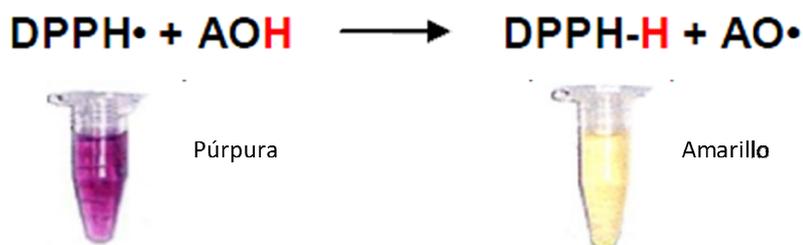
15 minutos y se dejó en reposo durante 12 horas antes de medir su absorción en el espectro ultravioleta según lo descrito por Oganesyán (1968) para la identificación de estructuras de naturaleza triterpénica. Este procedimiento se realizó en un espectrofotómetro UV/Vis Genesys 2 PC Spectronics 30 Instruments. El software asociado al equipo es Winspec Versión 1.23. Spectronics Instruments 1997.

## 4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 Evaluación de la capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH

El butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica; sin embargo, se han encontrado efectos secundarios en humanos, como el aumento del colesterol, inducción de cáncer hepático, entre otras. Debido a la creciente importancia de los antioxidantes en la industria farmacéutica y alimenticia es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con gran actividad y que no tengan efectos citotóxicos ni genotóxicos (Rojano *et al*, 2008).

El ensayo de DPPH es un modelo ampliamente usado para evaluar la rapidez que tiene un antioxidante para atrapar radicales (Brand-Williams, 1995). El ensayo de DPPH refleja la habilidad que posee un antioxidante para donar protones en un medio metanólico (Rojano *et al*, 2008), como se describe en la figura 16, donde la coloración de la mezcla cambia de púrpura a amarillo.



**Figura 16.** Ensayo DPPH (Oliveira, 2011).

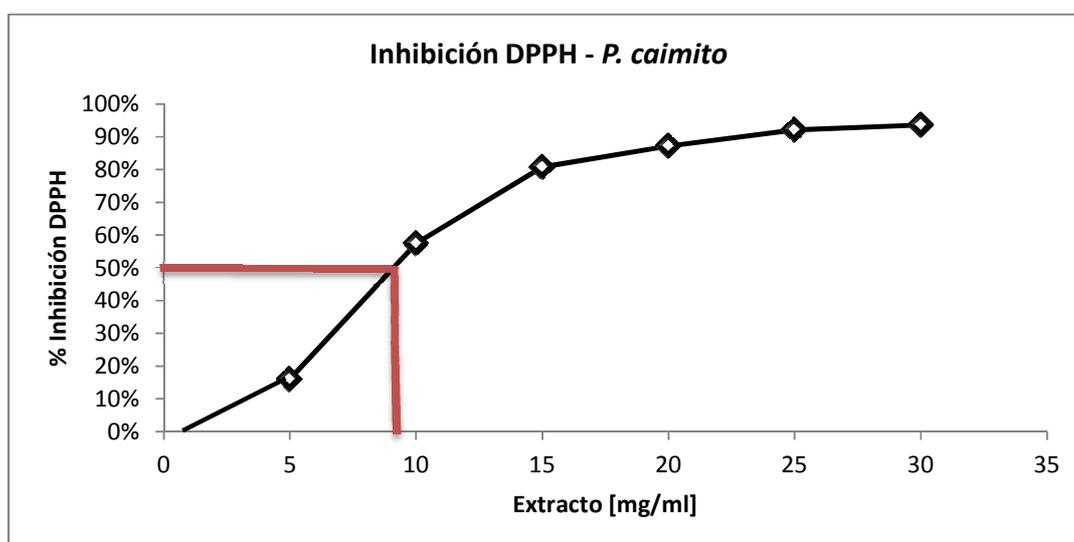
La inhibición del radical DPPH por parte del extracto metanólico de las hojas de *P. caimito*, tiene un comportamiento lineal desde concentraciones de 5 a 15 mg/ml, por lo que esta región se utilizó para hallar la  $CE_{50}$ . La ecuación de la recta para esta región,  $y = 15.048x + 2.2653$ , tiene un ajuste del 0.97. Los datos experimentales utilizados para construir el modelo se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Datos de concentración, inhibición DPPH y absorbancia para el ensayo con el EM.

Extracto [mg/ml]	% Inhibición	ABS
30	94%	0.025
25	92%	0.031
20	87%	0.05
15	81%	0.075
10	57%	0.166
5	16%	0.3276

Nota. ABS Control = 0.390

La figura 17, describe el % de inhibición del radical DPPH al variar la concentración del extracto, presentándose mayores tasas de inhibición en el rango de concentraciones de 5 a 10 mg/ml.



**Figura 17.** Comportamiento inhibición DPPH vs concentración EM.

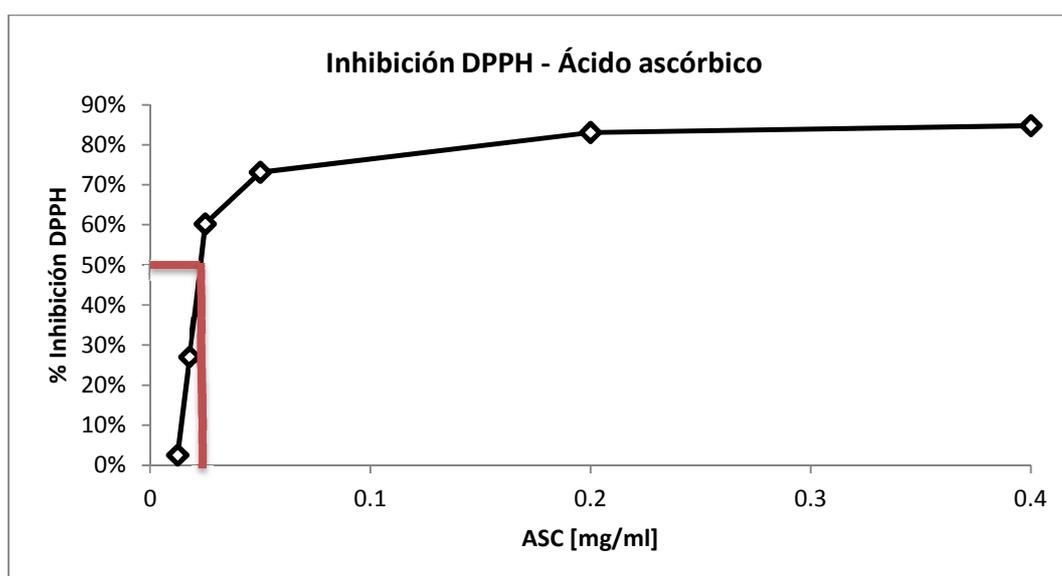
El ácido ascórbico es un potente antioxidante que se utilizó como control positivo de la prueba. Se presenta comportamiento lineal entre la inhibición del radical y la concentración de ASC de 0.0125 a 0.025 mg/ml, región que comprende inhibición del DPPH de 0 a 60 %. La ecuación lineal que la representa,  $y = 0.0216x + 0.012$ , tiene un ajuste del 0.99. Los datos experimentales utilizados para construir el modelo se presentan en la tabla 10.

**Tabla 10.** Datos de concentración, inhibición DPPH y absorbancia para el ensayo con ASC.

ASC [mg/ml]	% Inhibición	ABS
0.4	85%	0.072
0.2	83%	0.080
0.05	73%	0.127
0.025	60%	0.188
0.018	27%	0.345
0.0125	3%	0.461

Nota. ABS Control = 0.473

La figura 18, describe el % de inhibición del radical DPPH al variar la concentración del ácido ascórbico, presentándose mayores tasas de inhibición en el rango de concentraciones de 0.0125 a 0.025 mg/ml.



**Figura 18.** Comportamiento inhibición DPPH vs concentración ASC.

El extracto metanólico (EM) de las hojas de *P.caimito*, recolectadas del Chocó, presentó una capacidad de inhibición del radical DPPH muy inferior a la presentada por el ácido ascórbico. La  $CE_{50}$  del ASC es 426 veces menor que la del EM. Los resultados para el EM, ASC expresados en  $CE_{50}$ , se presentan en la tabla 11.

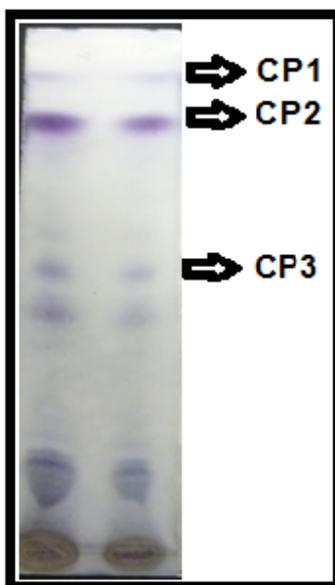
**Tabla 11.** Concentraciones efectivas medias de EM y ASC para inhibir DPPH.

Sustancia	CE 50 [mg/ml]
Extracto <i>P. caimito</i>	9.8
Ácido ascórbico	0.023
Reportado en literatura extracto hojas <i>P.caimito</i> (Castro, 2006)	0.0201

La CE<sub>50</sub> del extracto evaluado en este trabajo es 467 veces mayor al reportado por Castro en 2006 para un individuo de *P. caimito* recolectado en Brasil. Lo anterior se debe a la variabilidad intraespecífica en la producción de metabolitos secundarios, compuestos fenólicos, afectada por los factores bióticos y abióticos del entorno de la planta.

#### 4.2 Cromatografía de capa fina y de columna

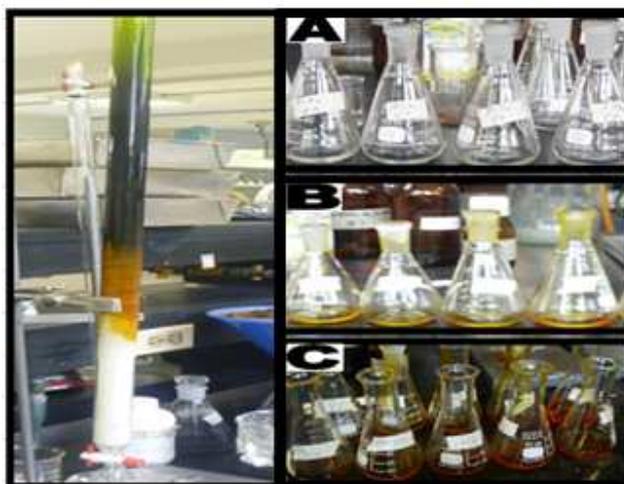
El análisis por CCF de EH mostró, cualitativamente, 6 compuestos. Los compuestos de menor polaridad están en la parte superior de la placa, como se muestra en la figura 19, debido al alto poder de arrastre de la fase móvil y la poca interacción de estos con la fase estacionaria.



**Figura 19.** CCF Extracto hexánico

Los compuestos de menor polaridad se encuentran en mayor concentración, esto es determinado con base en la intensidad de las manchas por CCF, ver figura 19. Otra característica observada es la diferencia de colores en las manchas lo cual indica la presencia de compuestos de naturaleza diferente.

Imágenes del proceso de separación se muestran en la figura 20, donde se observa la distribución de los compuestos en la fase móvil y estacionaria en CC1 y las fracciones recolectadas en dicho proceso.



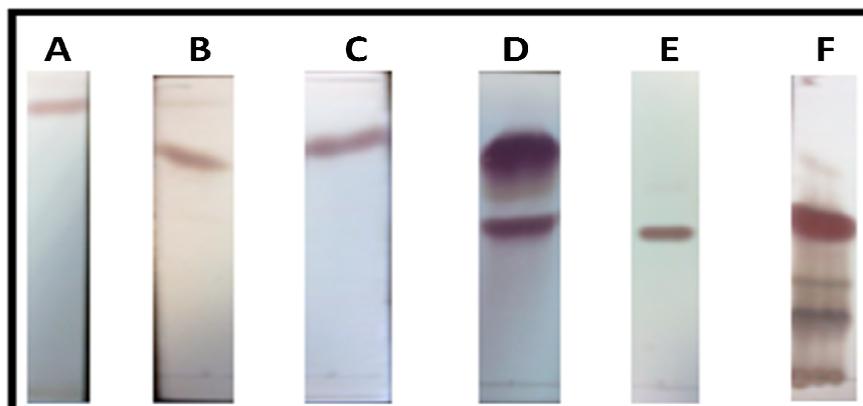
**Figura 20.** Proceso separación de compuestos a) CC1 b) CC2 c) fracciones recolectadas.

De CC1 fueron obtenidas 54 fracciones, para las cuales se presenta un análisis detallado en la siguiente tabla.

**Tabla 12.** Información de proceso de purificación por CC1.

<b>Fracciones (FR)</b>	<b>Constituyentes</b>	<b>Color de fracción</b>
<b>1-12</b>	CP1	Incoloro
<b>13-34</b>	CP2+CP1	Amarillo
<b>35-38</b>	CP2	Amarillo
<b>39-49</b>	CP2+CP3	Rojiso
<b>50-52</b>	CP3	Rojiso
<b>53-54</b>	CP3 y contaminantes	Negro

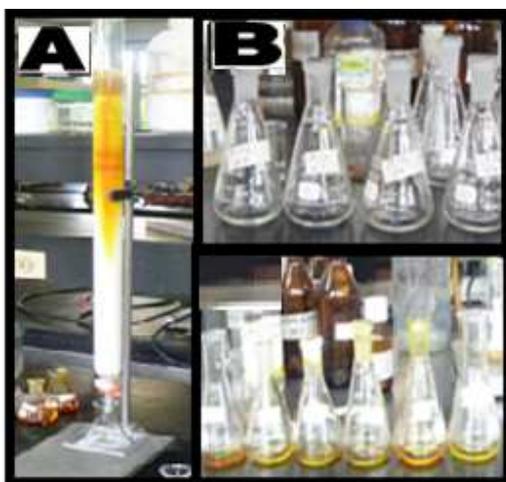
La siguiente figura describe el seguimiento cromatográfico realizado a las fracciones obtenidas del proceso de separación en CC1.



**Figura 21.** Seguimiento por CCF a las fracciones recolectadas de CC1 a)FR 1-12 b) FR 13-34 c) FR 35-38 d) FR 39-49 e) FR 50-52 f) FR 53-54 .

Las primeras 12 fracciones recolectadas muestra solamente CP1, compuesto de menor polaridad del extracto de *P.caimito*, que por su cadena hidrocarbonada y ausencia de grupos funcionales tiene gran afinidad con el eluyente, Hex:AcEt (1:0), y baja interacción molecular con la fase estacionaria.

De la segunda columna de cromatografía (CC2), donde se eluyeron las fracciones 13 a 34 con hexano, se obtuvieron 94 fracciones. Imágenes del proceso de separación se muestran en la figura 22.



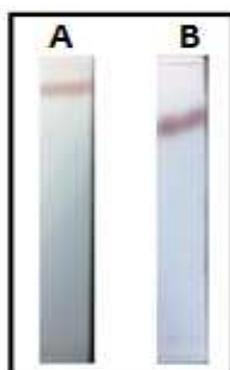
**Figura 22.** Proceso separación de compuestos a) CC2 b) fracciones recolectadas.

La siguiente tabla describe la cantidad de compuestos y el color de las fracciones obtenidas del proceso llevado en CC2.

**Tabla 13.** Información de proceso de purificación por CC2.

Fracciones	Constituyentes	Color
1-64	CP1	Incoloro
65-94	CP2	Amarillo

La figura 23, describe el seguimiento cromatográfico realizado a las fracciones obtenidas del proceso de separación por CC2, donde se separaron CP1 de CP2.

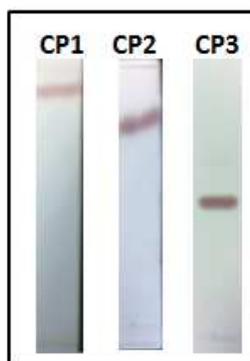


**Figura 23.** Seguimiento por CCF a las fracciones recolectadas de CC2 a) FR 1-64 b) FR 65-94.

Los procesos de separación de los compuestos en CC1 y CC2 fueron eficaces ya que permitieron obtener soluciones enriquecidas con CP1, CP2 y CP3.

La separación de CP2 y CP3 no fue posible por CC, por lo que se realizó por cristalizaciones sucesivas.

El análisis por CCF de los metabolitos aislados y purificados de las hojas de *P. caimito* se muestran en la figura 24.



**Figura 24.** CCF de compuestos aislados de *P. caimito*.

### 4.3 Caracterización de Compuestos Aislados

#### 4.3.1 Compuesto 1

Se obtuvo 173 mg de un sólido blanco y ligero presentando un rendimiento de extracción del 0.02%. En otra investigación CP1 fue aislado de las hojas del repollo, presentando un rendimiento de extracción del 0.000681% (Channon *et al*, 1929).

##### 4.3.1.1 Punto de fusión

El nonacosano ( $C_{29}H_{60}$ ) y el triacontano ( $C_{30}H_{62}$ ) funden a  $63.7^{\circ}C$  y  $65.8^{\circ}C$ , respectivamente. CP1 obtenido de las hojas de *P. caimito*, que es una mezcla de nonacosano y triacontano, funde a  $65^{\circ}C$ .

##### 4.3.1.2 Espectroscopía infrarrojo

El espectro obtenido muestra seis picos representativos los cuales se comparan, con datos reportados en la literatura, en la tabla 14.

**Tabla 14.** Espectro IR compuesto 1.

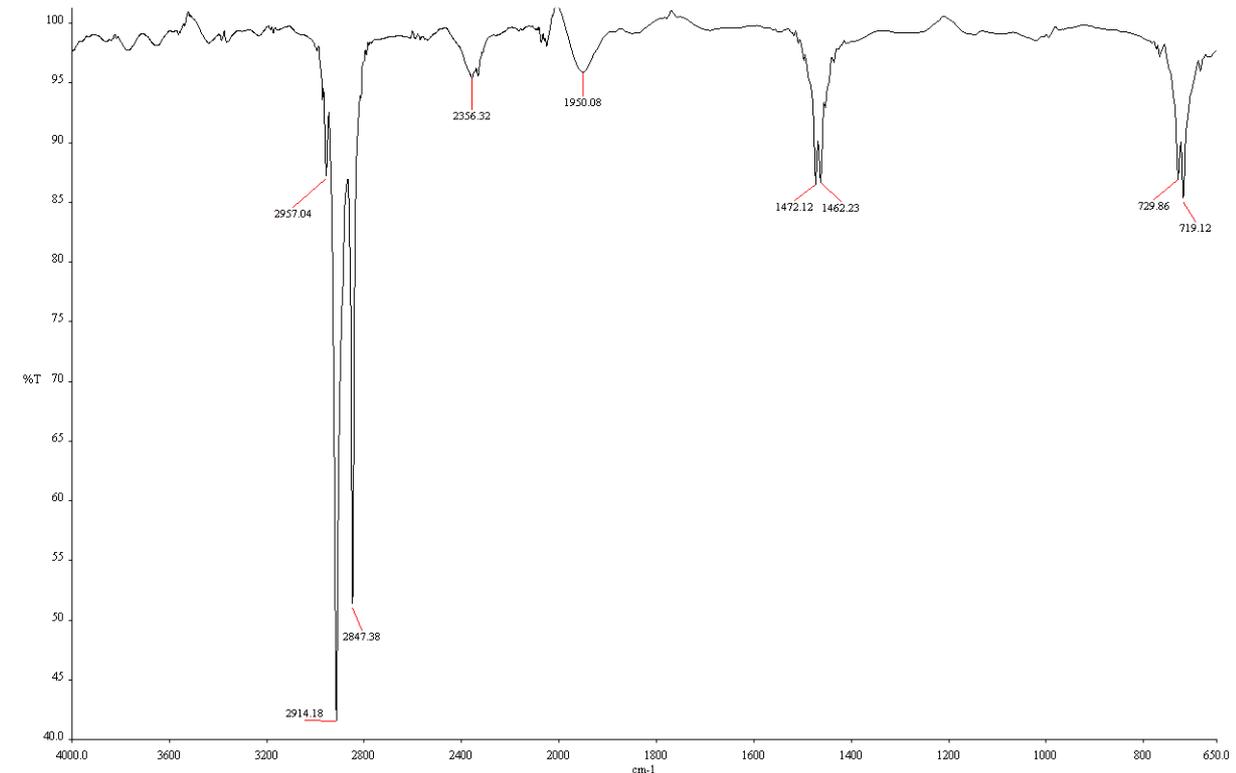
Longitud de onda ( $cm^{-1}$ )	Reportado* ( $cm^{-1}$ )
2914.18	2917
2847.38	2849
1472.12	1473
1462.23	1462
729.86	730
719.12	719

\*Longitud de onda reportada en (Silva *et al*, 2007) (KBr).

Las absorciones presentadas en el espectro infrarrojo obtenido y presentado en la figura 25, son características de hidrocarburos. Las bandas a  $2914$ ,  $2847\text{ cm}^{-1}$  son debidas a estiramientos C-H, las absorciones a  $1472$  y  $1462\text{ cm}^{-1}$  son características de deformaciones angulares de enlaces C-H de hidrocarburos alifáticos ó alicíclicos y las bandas a  $729$  y  $719\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la deformación asimétrica de enlaces C-H.

Las bandas presentes en el espectro infrarrojo coinciden en su totalidad con espectros reportados en la literatura para hidrocarburos saturados.

Con base en el espectro se puede determinar que el compuesto corresponde a una parafina, los cuales son compuestos que se encuentra en la superficie de las plantas, estas se extraen fácilmente con solventes orgánicos como cloroformo ó hexano. Generalmente son mezclas complejas de cadenas largas (>C18) tales como ácidos grasos, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, compuestos alifáticos, fenólicos y otros que presenten masas moleculares altas. (Silva *et al*, 2007).



**Figura 25.** Espectro infrarrojo de CP1.

#### **4.3.1.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

El espectro, presentado en la figura 26, muestra dos picos los cuales presentan tiempos de retención de 36.379 y 40.24 min, respectivamente.

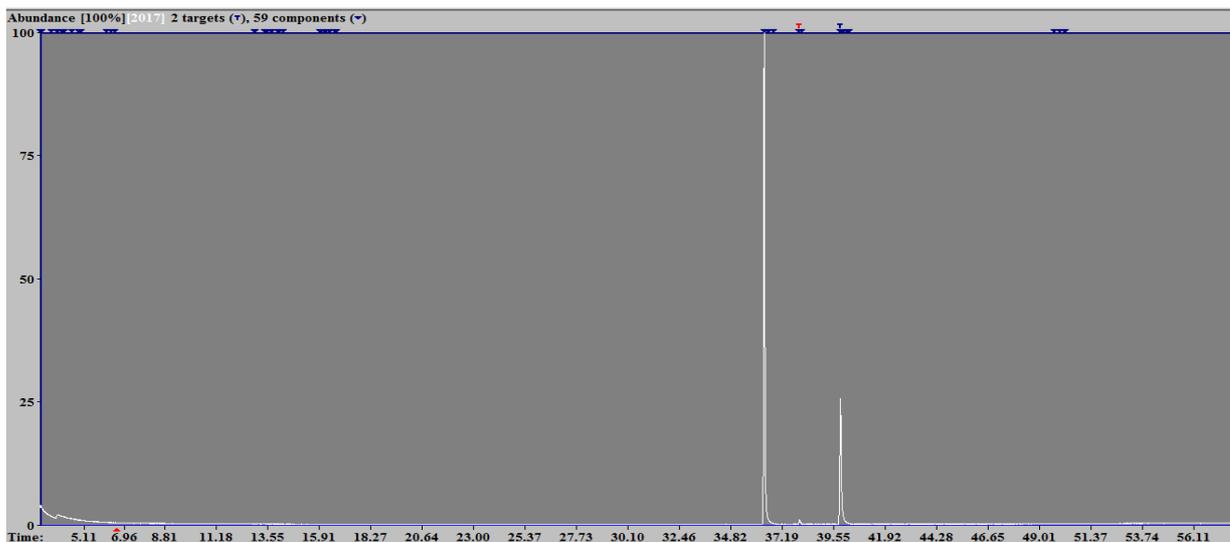


Figura 26. CG compuesto 1.

#### 4.3.1.3.1 Análisis CG-EM en tiempo de retención (Rt) 36.50 min

El espectro de masas, presentado en la figura 27, indica como señales de fragmentación más importantes, las siguientes;  $m/z$  (int. rel.). 43(55) 57 (100), 71(78), 85(57), 99(20), 113(10), 127 (8), 141(7).155(6), 169(4), 183(4), 197(3), 211(3), 225(2), 240(2), 253(2), 267(2), 281(2), 291(1), 309(1), 323(1), 337(1), 351(1), 365, 408.

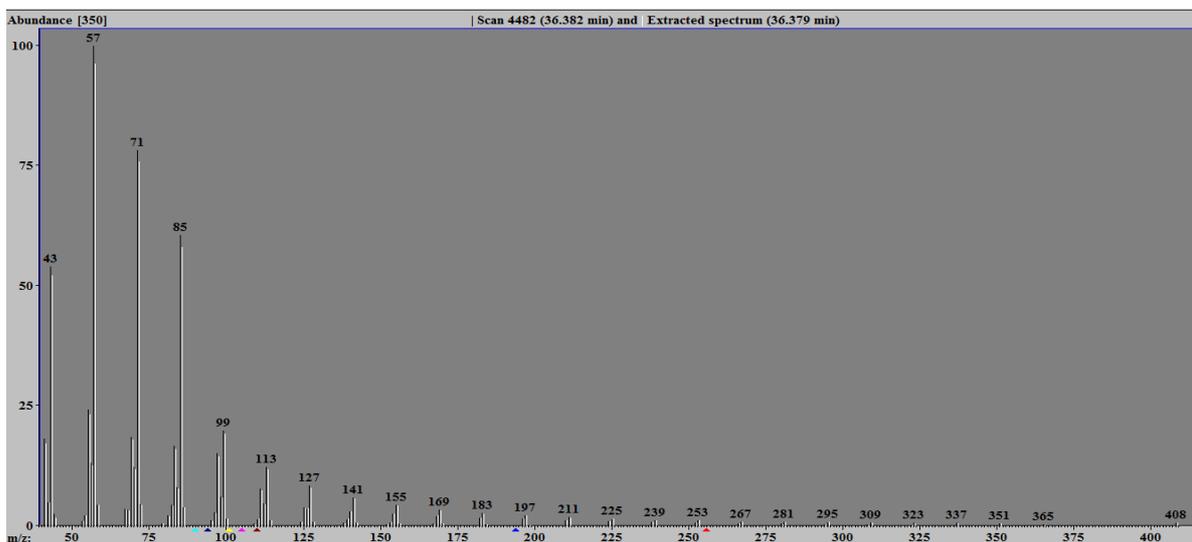
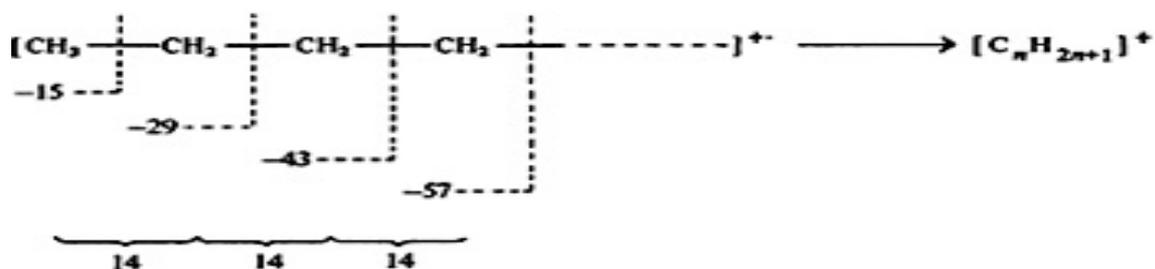


Figura 27. Espectro de masas parafina Rt = 36.5 min.

La señal a 57 corresponde al pico base de los compuestos reportados como hidrocarburos. Para el actual compuesto se detectó como ión molecular  $m/z$  408. Los hidrocarburos presentan como característica principal, fragmentaciones que aumentan cada 14 unidades de masa, lo cual es observado en el espectrograma presente. Este tipo de fragmentación se presenta cuando todos los enlaces C-C del ión molecular de un alcano tiene igual fuerza.

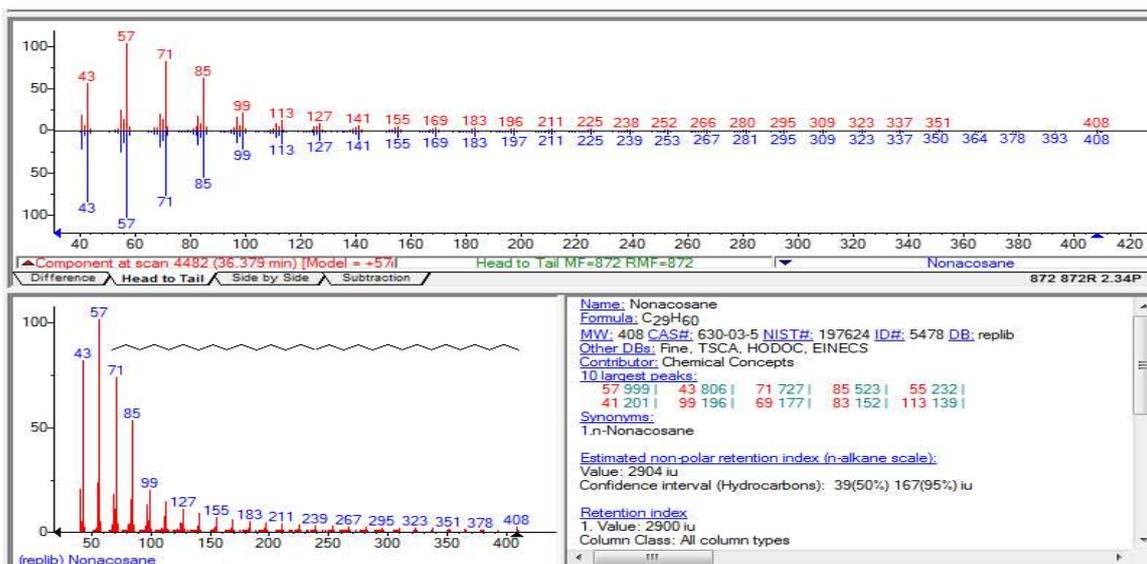
En la figura 28, se presenta el modo de fragmentación de alcanos.



**Figura 28.** Patrones de fragmentación hidrocarburos.

La base de datos pherobase reporta el nonacosano ( $C_{29}H_{60}$ ) con ión molecular de  $m/z$  408, el espectro de masas reporta como los iones más representativos  $m/z$  (int. rel.) 43(68), 57 (100), 71(73), 85(60), 99(24), 113(22), 127 (15), 141(12), 155(11), 169(10), 183(10), 197(9), 211(8), 225(6), 240(4), 253(4), 267(4), 281(3), 291(3), 309(3), 323(3), 337(2), 351(2), 365(1), 408(1). La validación de estos iones con los obtenidos en el espectrograma permite establecer que corresponde al nonacosano.

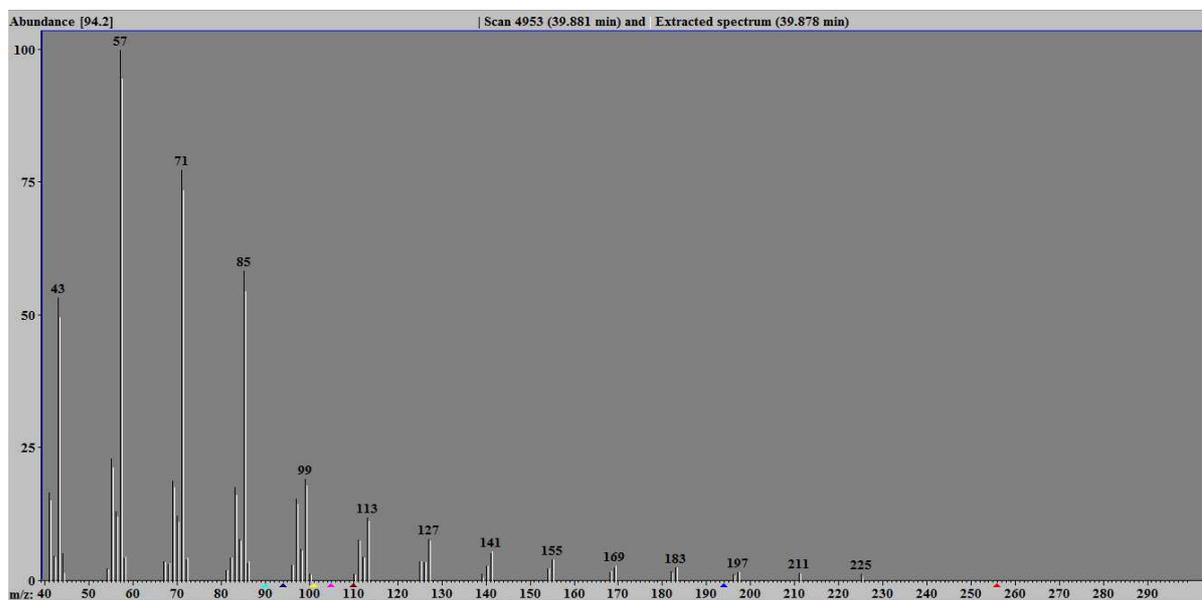
Lo anterior es confirmado por el software de análisis de espectros de masa NIST, en el cual se indica que existe alrededor de un 90% de similitud entre el espectro obtenido y el espectro del nonacosano reportado en esta base de datos. La figura 29, presenta el espectro de masas del compuesto vs el compuesto de mayor similitud presente en la librería NIST, correspondiente al nonacosano.



**Figura 29.** Comparación espectro obtenido y librería NIST – parafina  
Rt = 36.5 min.

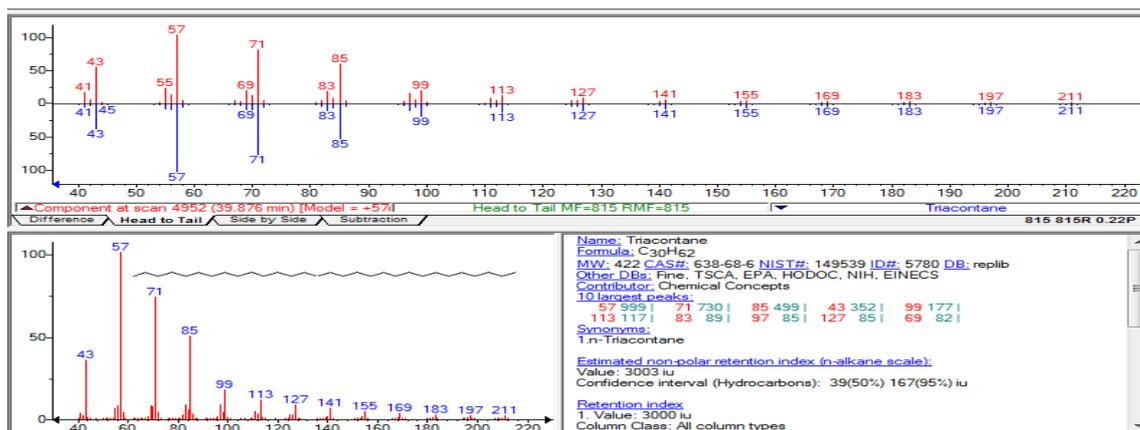
#### 4.3.1.3.2 Análisis del CG-EM en tiempo de retención (Rt) 39.878 min

Las señales de fragmentación más importante presentadas por el reporte, mostrado en la figura 30, fueron m/z (int. rel.) 43(49), 57 (100), 71(78), 85(53), 99(23), 113(15), 127 (12), 141(7).155(6), 169(4), 183(4), 197(3), 211(3), 225(2)



**Figura 30.** Espectro de masas parafina Rt = 39.87 min.

La señal a 57 corresponde al pico base de los compuestos reportados como hidrocarburo. En el espectro no se logra apreciar el ión molecular, esto se puede deber a la poca abundancia relativa del ión, a pesar de lo anterior, el software de análisis de espectros de masas NIST establece que el compuesto en estudio se asemeja en un 90% al triacontano. La figura 31, presenta el espectro de masas del compuesto vs el compuesto de mayor similitud presente en la librería NIST, correspondiente al triacontano.



**Figura 31.** Comparación espectro obtenido y librería NIST - parafina  
Rt = 39.9 min.

A pesar de no contar con el ión molecular el reporte es muy coherente debido a que en el análisis del tiempo de retención, se detectó un compuesto de 29 átomos de carbono a 36.5 min, por lo cual en este tiempo de retención mayor, 39.87 min, debería aumentar el número de átomos de carbono.

La base de datos pherobase reporta el triacontano (C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>) con ión molecular m/z 422, el espectro de masas reporta como los iones más representativos m/z (int. rel.) 43(52), 57 (100), 71(75), 85(52), 99(20), 113(22), 127 (18), 141(15), 155(12), 169(10), 183(10), 197(9), 211(8), 225(6), 240(4), 253(4), 267(4), 281(3), 291(3), 309(3), 323(3), 337(1), 351(1), 422(3).

#### 4.3.2 Compuesto 2

Se obtuvo 170 mg de un sólido blanco, presentando un rendimiento de extracción del 0.019%. El rendimiento de extracción para CP2, aislado de las hojas de *Viburnum urceolatum* fue del 0.003 % según reporta Iwagawa *et al*, 1982. Para la

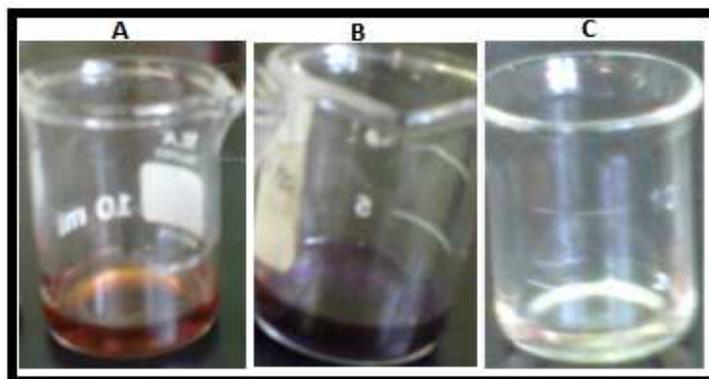
corteza de *Populus tremuloides* se reporta un rendimiento de extracción del 0.0338% (Serreji *et al*, 2000).

#### 4.3.2.1 Punto de fusión

El palmitato de lupeol tiene un punto de fusión de 74-78°C (Iwagawa *et al*, 1982). El punto de fusión del producto obtenido de las hojas de *P. caimito* fue de 75.6 °C.

#### 4.3.2.2 Ensayo Liebermann – Burchard

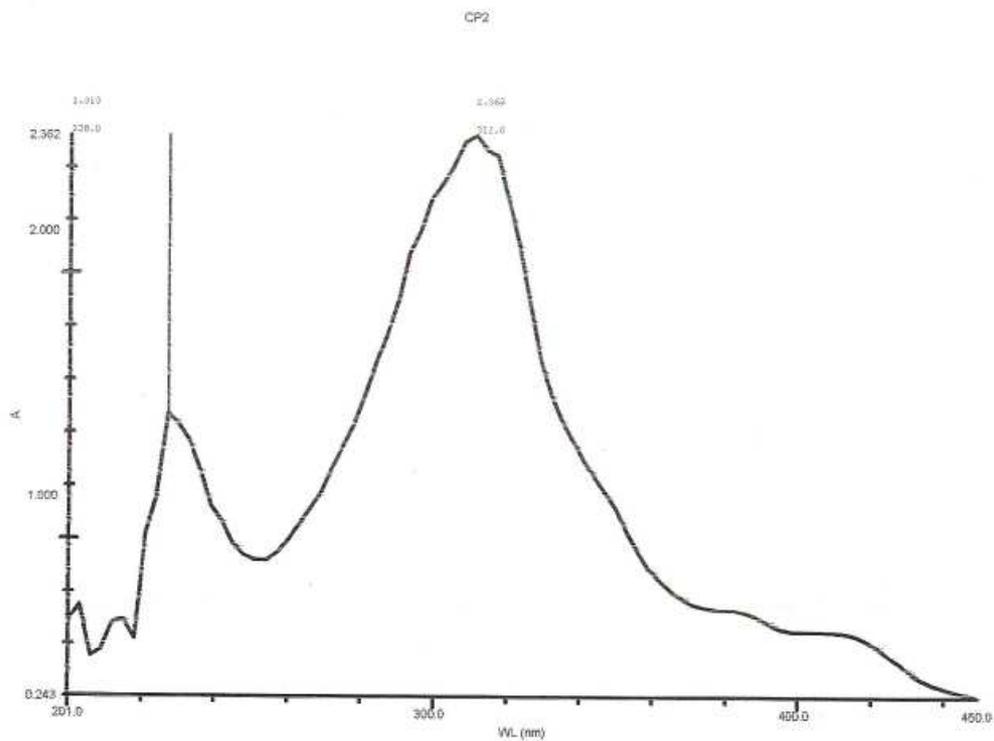
CP2 dio positivo la prueba de LB presentando cambio de color a rojizo, como se presenta en la figura 32, indicando la presencia de una estructura triterpénica.



**Figura 32.** Prueba de Liebermann Burchard (LB) a) compuesto CP2 - positivo LB, b)  $\alpha$ - $\beta$  amirina - positivo LB, c) compuesto CP1 - negativo LB.

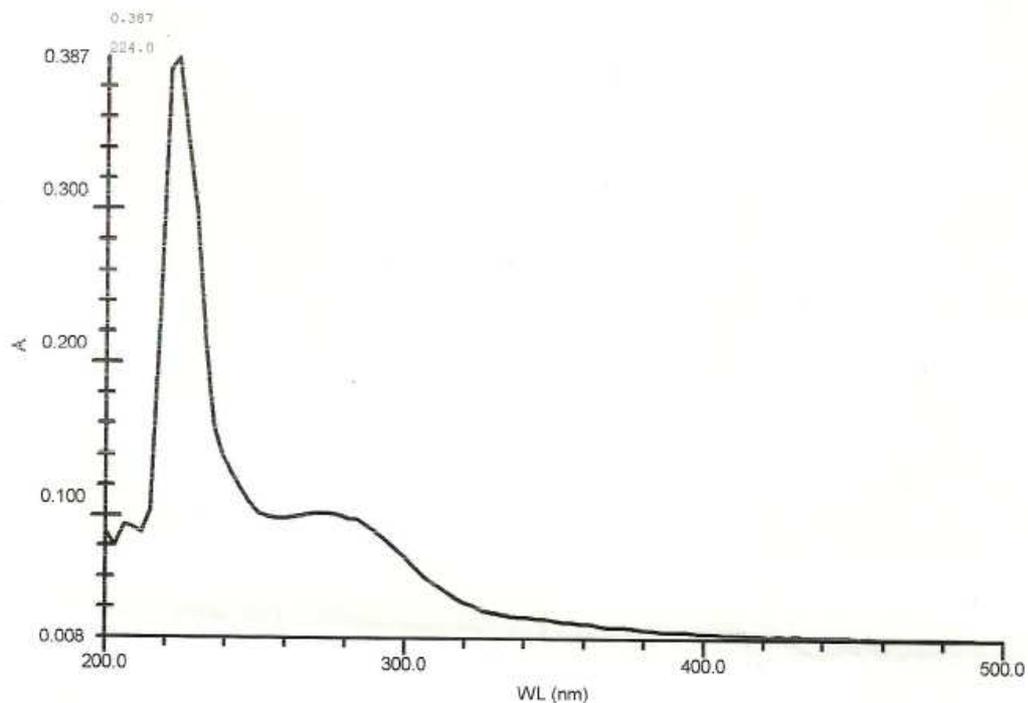
#### 4.3.2.3 Espectrofotometría UV - Visible

El espectro, presentado en la figura 33, muestra la absorción característica de estructuras triterpénicas en el UV a 310 nm (Ponomarev *et al*, 1971), por la reacción del triterpeno con el ácido sulfúrico, en la cual se forman derivados de la molécula con dobles enlaces conjugados en los anillos C y D (Oganesyán *et al*, 1981).



**Figura 33.** Espectro UV – reacción CP2 y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El pico a 224 nm, observado en la figura 33, corresponde a remanente de CP2, que no reaccionó con el ácido sulfúrico. Lo anterior fue corroborado al disolver CP2 en etanol y realizar un barrido de absorbancia de 200 a 500 nm, ver la siguiente figura.



**Figura 34.** Espectro UV –CP2 en etanol.

#### 4.3.2.4 Espectroscopía infrarrojo

##### 4.3.2.4.1 CP2

El espectro obtenido muestra 5 picos representativos los cuales se comparan, con datos reportados en la literatura, en la tabla 15.

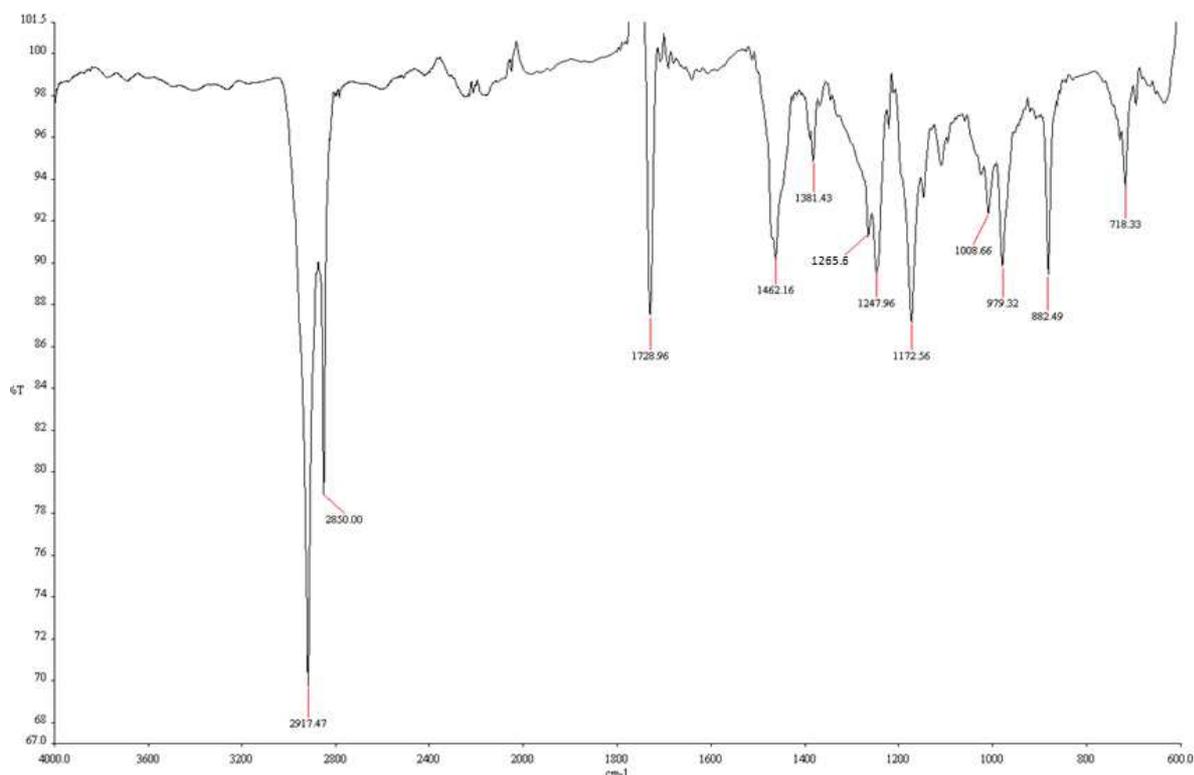
**Tabla 15.** Espectro IR compuesto 2.

Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Reportado* ( $\text{cm}^{-1}$ )
2917.47	2924
1728.96	1728
1462.16	1468
1381.43	1382
1172.56	1180

\*Longitud de onda en literatura (KBr) (Serreji *et al*, 2000).

Las absorciones presentadas en el espectro infrarrojo obtenido y presentado en la figura 35, a 2917 y 2850  $\text{cm}^{-1}$  son características de tensiones C-H de grupos metílicos y metilénicos, la banda a 1729  $\text{cm}^{-1}$  es originada por las vibraciones de

tensión C=O, las cuales vinculadas a las bandas a 1243 y 1172  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a la vibración de tensión C-O, han sugerido la presencia de un grupo funcional tipo éster. Las bandas a 1462  $\text{cm}^{-1}$  y 1381  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a las vibraciones de flexión de los grupos metilénicos y metílicos y las banda a 979 $^{-1}$  y 718  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a flexión fuera del plano y a flexión asimétrica de enlace C-H.



**Figura 35.** Espectro infrarrojo de CP2.

#### 4.3.2.4.2 Producto de hidrólisis – Fase orgánica antes de acidulación

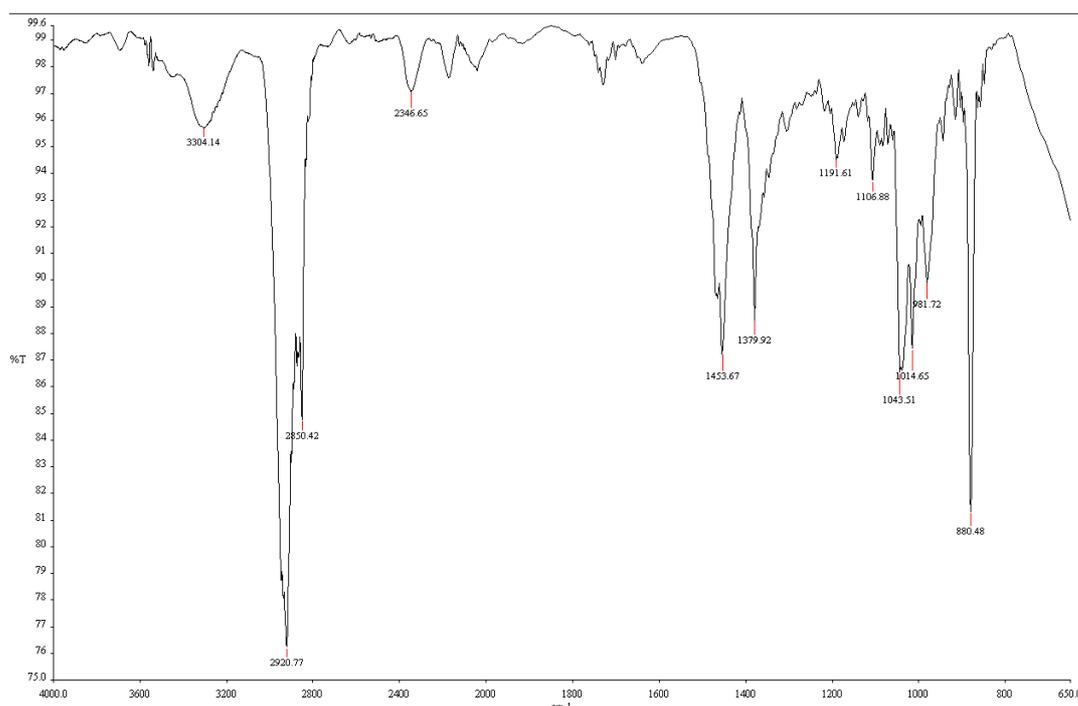
El espectro IR del producto de hidrólisis recuperado en la fase orgánica muestra 4 picos representativos los cuales se comparan, con datos reportados en la literatura, en la tabla 16.

**Tabla 16.** Espectro IR producto de hidrólisis CP2 – fase orgánica antes de acidulación.

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Reportado* (cm <sup>-1</sup> )
3304	3308
2850	2872
1453	1468
1380	1380

\*Longitud de onda reportada (KBr) (Kovač, 2009).

La figura 36, muestra el espectro obtenido, con banda a 3304 cm<sup>-1</sup> correspondiente a vibración de tensión de grupo hidroxilo, bandas a 2920 y 2850 cm<sup>-1</sup> características de tensiones C-H de grupos metílicos y metilénicos, bandas a 1453 cm<sup>-1</sup> y 1380 cm<sup>-1</sup> que se asignan a las vibraciones de flexión de los grupos metilénicos y metílicos.



**Figura 36.** Espectro infrarrojo producto hidrólisis – fase orgánica antes de acidulación.

#### 4.3.2.5 Preparación del derivado

La recristalización del producto crudo de etanol dio 40 mg de lupeol con punto de fusión de 180°C. El rendimiento de la hidrólisis fue del 62 %. El punto de fusión reportado en literatura es de 213-215°C (Iwagawa *et al*, 1982; Fotie *et al*, 2006). La diferencia en el punto de fusión se debe a que el producto obtenido tiene trazas de palmitato de lupeol con p.f. de 75°C, debido a que la hidrólisis no fue completa y el análisis por CCF del producto así lo determina, ver figura 37.



**Figura 37.** CCF para progreso de hidrólisis CP2.

#### 4.3.2.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis de cromatografía gaseosa y espectrometría de masas de los productos de hidrólisis de CP2 se presenta a continuación.

##### 4.3.2.6.1 Análisis CG-EM - Producto de hidrólisis - Fase orgánica antes de acidulación

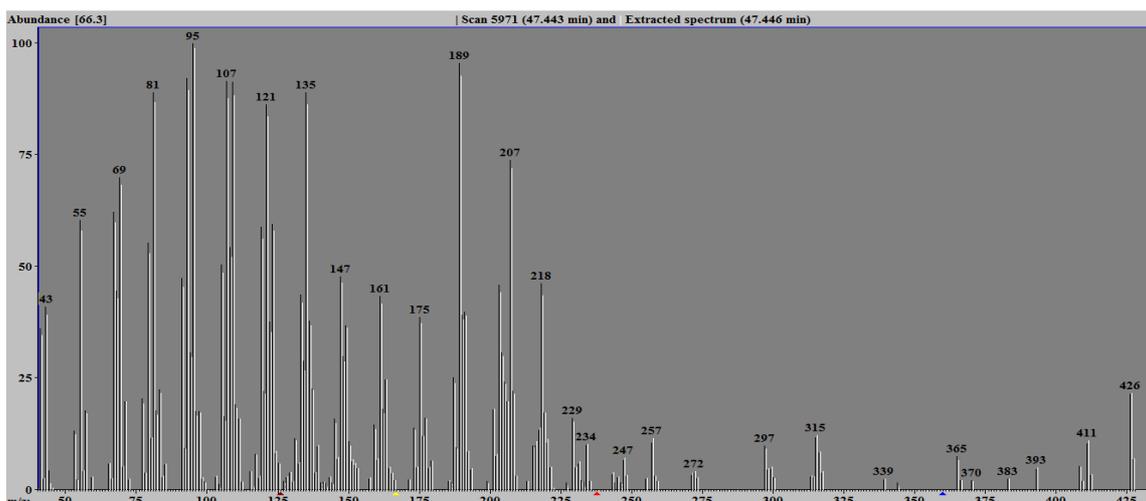
El cromatograma de gases del producto de hidrólisis extraído en la fase orgánica, con dietil éter, presentado en la figura 38, muestra un pico a 47 min correspondiente al alcohol triterpénico.



**Figura 38.** CG producto de hidrólisis – fase orgánica.

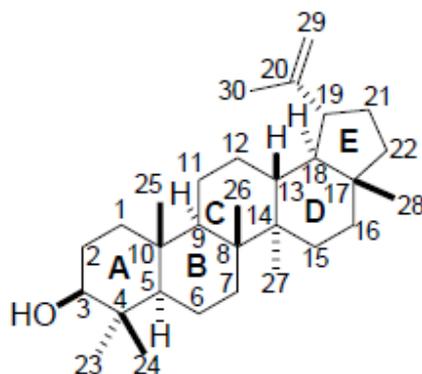
#### 4.3.2.6.1.1 Análisis CG-EM en tiempo de retención (Rt) 47 min

Las señales de fragmentación más abundantes para el producto de hidrólisis extraído en la fase orgánica, presentadas en la figura 39, son  $m/z$  (int rel). 426 [M<sup>+</sup>] (25), 207 (75), 189 (96), 107 (95) y 95(100), en donde el ión 426 corresponde al ión molecular con fórmula C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O.



**Figura 39.** Espectro de masas del producto de hidrólisis – Lupeol.

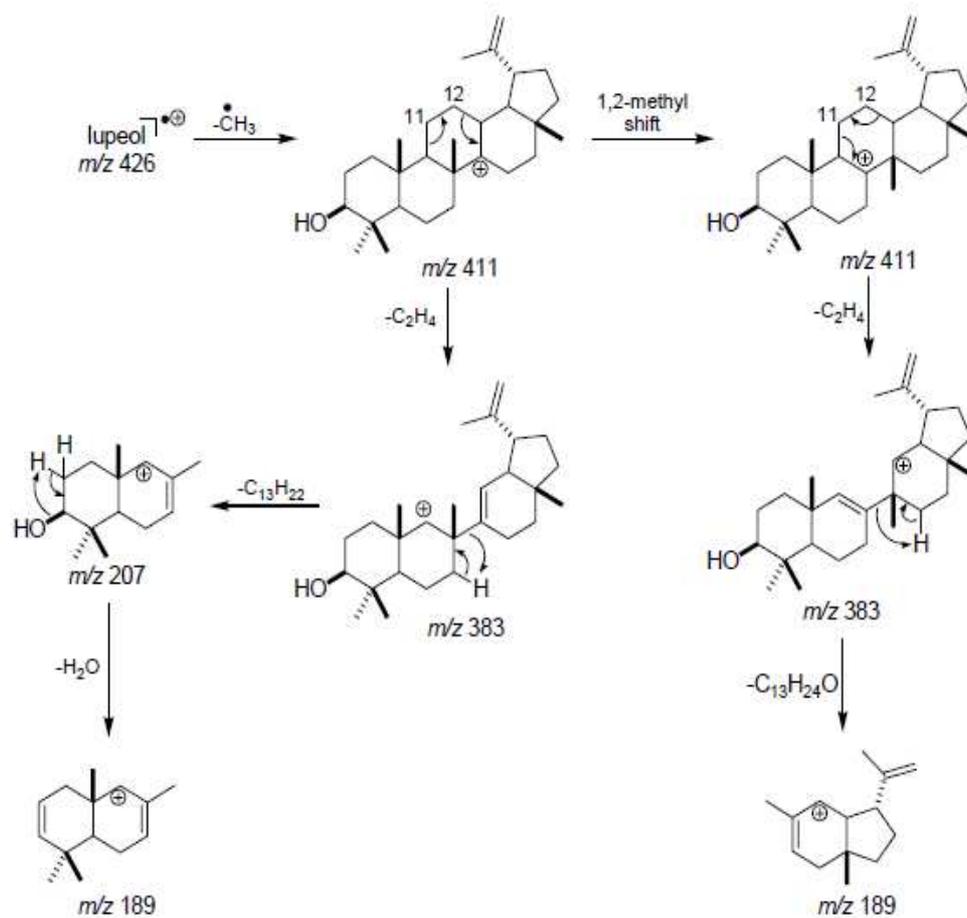
La serie lupano, presentada en la figura 40, se caracteriza por un anillo de cinco miembros (E) en el que un grupo isopropilo o isopropenilo está presente. La pérdida de 43 unidades de masa ( $C_3H_7$ ) es muy pronunciada en ciertas estructuras, pero se convierte en un mínimo en los derivados altamente sustituidos o cuando hay presencia del grupo isopropenilo (Assimopoulou *et al*, 2005).



**Figura 40.** Estructura química del lupeol.

La fragmentación de lupeol, que se presenta en la figura 41, se inicia por la escisión de C-14—C-27 y la consiguiente eliminación del radical  $\bullet CH_3$ . Los fragmentos de iones  $m/z$  411 y  $m/z$  383 no se observan abundantemente, ya que fácilmente se descomponen en iones con menor  $m/z$ . Por lo contrario, los fragmentos de iones  $m/z$  207 y  $m/z$  189 son abundantes y son formados como resultado de dos vías competitivas, que pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de sustituyentes en los anillos A, B, C, D ó E (Carvalho *et al*, 2010).

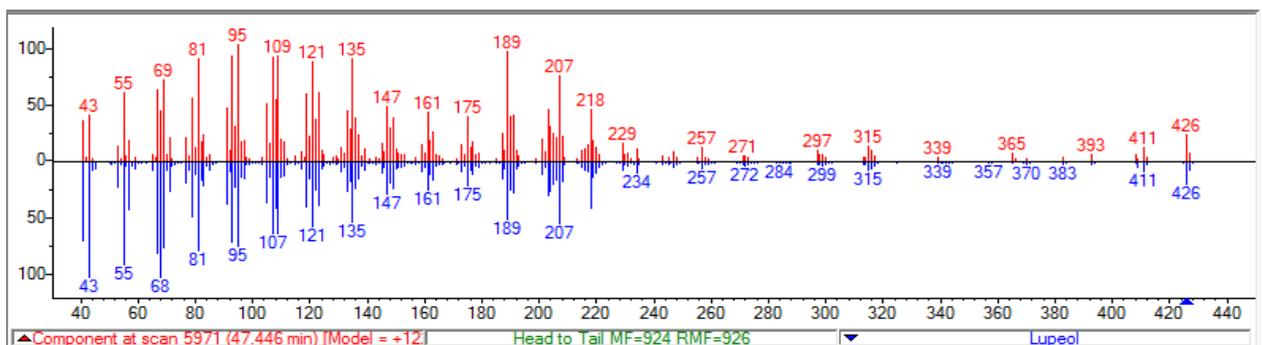
Los EIMS muestra abundantes picos de fragmentos de iones a  $m/z$  218, 207, y 189. Estos datos espectrales sugieren que el triterpeno con esqueleto de lupano posee un grupo hidroxilo. Además, los EIMS muestra un pico del fragmento de ion a  $m/z$  207, lo que indica que el grupo hidroxilo se encuentra en el anillo A o B del esqueleto (Ogihara, *et al*, 2010).



**Figura 41.** Patrones de fragmentación Lupeol (Carvalho *et al*, 2010).

La comparación del espectro obtenido con la librería NIST da un acoplamiento del 92 % con el espectro del lupeol.

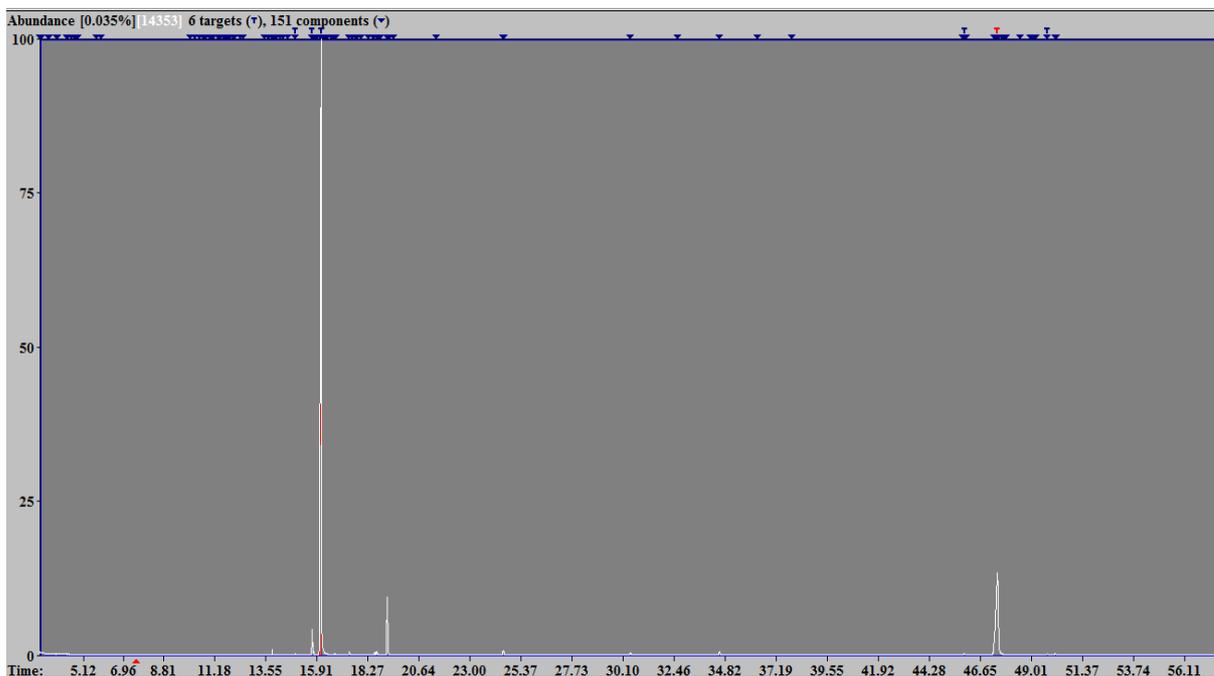
La figura 42 presenta los picos del espectro de masas del compuesto de hidrólisis extraído en la fase orgánica vs el compuesto de mayor similitud presente en la librería NIST, correspondiente al lupeol.



**Figura 42.** Comparación espectro producto de hidrólisis-fase orgánica y librería NIST.

#### 4.3.2.6.2 Análisis CG-EM - Producto de hidrólisis - Fase orgánica después de acidulación

El cromatograma de gases del producto de hidrólisis extraído en la fase orgánica después de acidulación, presentado en la figura 43, muestra un pico mayoritario correspondiente al etil palmitato con  $R_t$  de 15.91 min. El producto de hidrólisis extraído en esta fase presenta remanente del alcohol triterpénico, lupeol, y así lo evidencia el cromatograma de gases que presenta el pico del lupeol a 47 min.

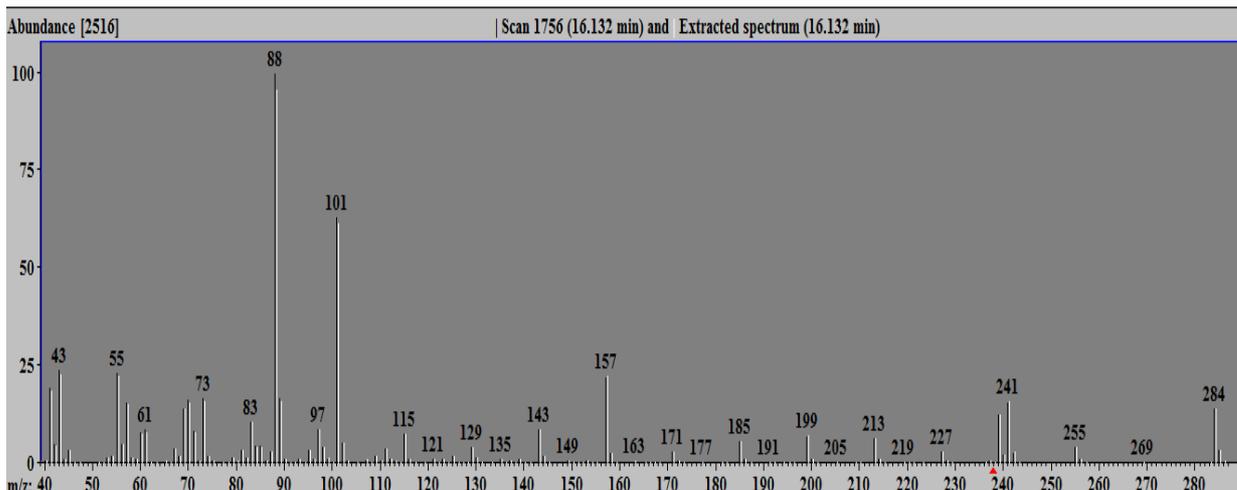


**Figura 43.** CG producto de hidrólisis – fase orgánica después de acidulación.

#### 4.3.2.6.2.1 Análisis CG-EM en tiempo de retención (Rt) 16.13 min

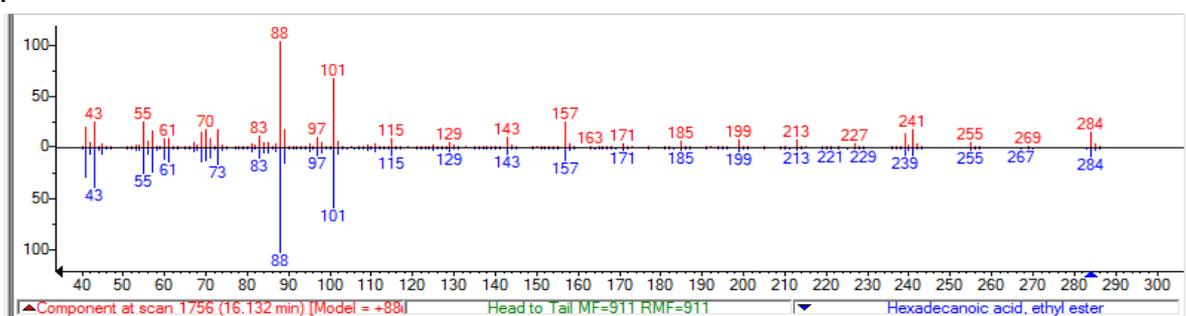
Las señales de fragmentación más abundantes para el producto de hidrólisis extraído en la fase etérea luego de la acidulación, presentadas en la figura 44, son  $m/z$  (int rel). 284 [ $M^+$ ] (25), 241 (23), 157 (25), 101 (62), 88 (100), donde el ión 284 corresponde al ión molecular con fórmula  $C_{18}H_{36}O_2$ .

Se presenta el pico base a  $m/z$  88, un ion a  $m/z$  255 por la pérdida del grupo etilo, el pico a  $m/z$  = 241 surge de un reordenamiento que involucra la expulsión de un fragmento de tres carbonos y el ion a  $m/z$  = 239, representa la pérdida de un ion etóxido ( $[M-45]^+$ ).



**Figura 44.** Espectro de masas del producto de hidrólisis – etíl palmitato.

La comparación del espectro obtenido, con la librería NIST, da un acoplamiento mayor al 93 % con el espectro del etíl palmitato. La figura 45 presenta las señales de fragmentación del compuesto de hidrólisis extraído en la fase orgánica luego de acidular vs el compuesto de mayor similitud presente en la librería NIST, correspondiente al etíl palmitato.



**Figura 45.** Comparación espectro obtenido y librería NIST para etíl palmitato.

Los espectros de masa para el etíl palmitato extraídos de la librería, lipid library y de pherobase, se muestran en la figura 46 y 47 respectivamente, los cuales tienen un 96% de similitud con el obtenido en la presente investigación.

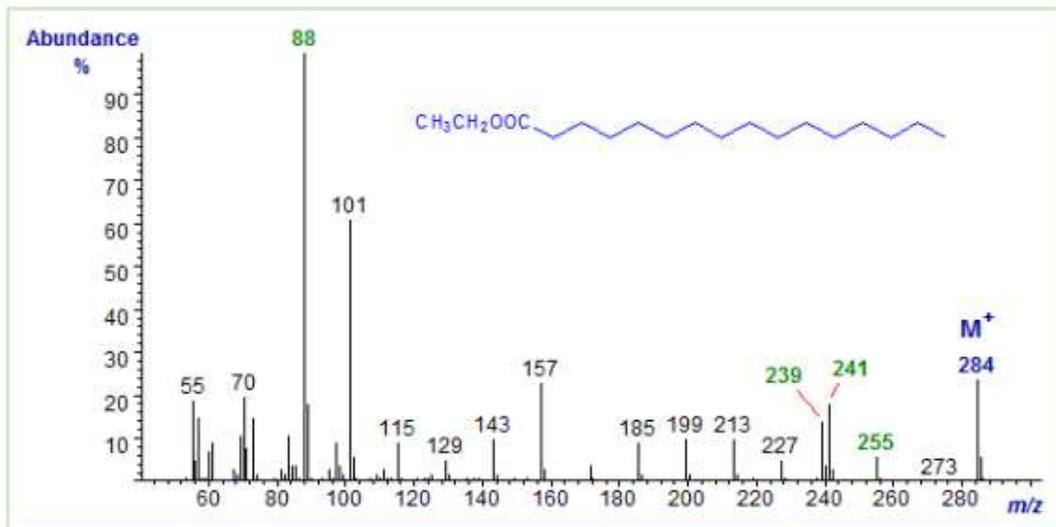


Figura 46. Espectro de masas para el etíl palmitato (Ryhage and Stenhagen, 1959).

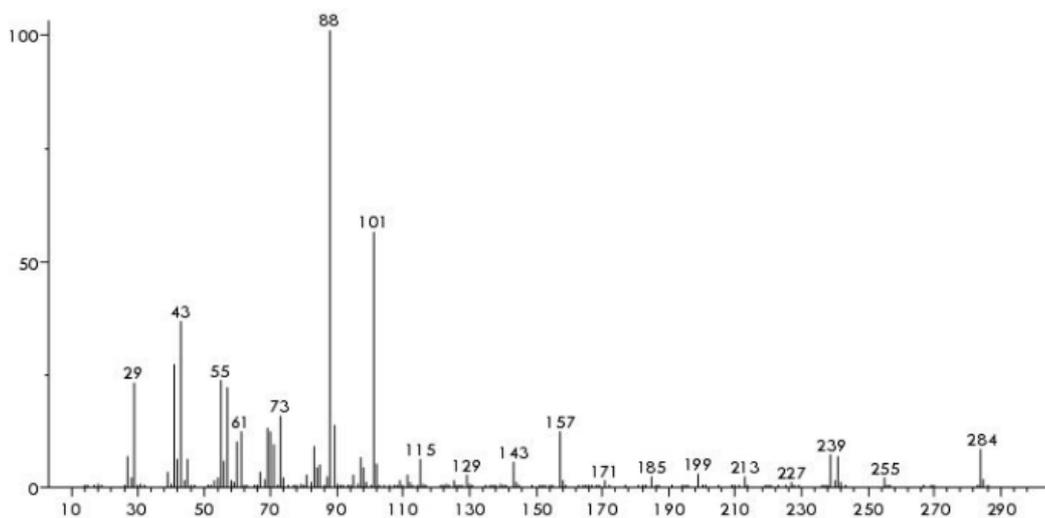


Figura 47. Espectro de masas para el etíl palmitato de pherobase.

### 4.3.3 Compuesto 3

Se obtuvo 1000 mg de un sólido blanco, presentando un rendimiento de extracción del 0.1%.

Los rendimientos de extracción del compuesto CP3 no son igualados por los reportados para otras especies; de la corteza de *Pouteria gardenrii* se reporta un rendimiento de extracción del 0.015 % (Silva *et al*, 2009). De las hojas de *Ambrosia artemisiifolia* se reporta un rendimiento de extracción del 0.0008 % (Yasumori *et al*, 2004).

#### 4.3.3.1 Punto de fusión

Se reporta para una mezcla de acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina (64%:36%), un punto de fusión de 179-181°C (Gislei *et al*, 2009). El punto de fusión de la mezcla obtenida de las hojas de *P. caimito* fue de 190°C. El punto de fusión del acetato de  $\alpha$  amirina es de 224-226°C (Chenniappan *et al*, 2011) y del acetato de  $\beta$  amirina es de 237°C (Iwagawa *et al*, 1982). La mezcla de los acetatos presenta un punto de fusión menor a los de cada uno de los componentes. Esto es debido a que las propiedades coligativas de la mezcla se ven afectadas por las composiciones de los isómeros, generando un punto de fusión menor a los individuales, específico para cada composición (Carvajal, 2010). Datos de puntos de fusión para mezclas de isómeros de acetato de amirina se presentan en la tabla 17.

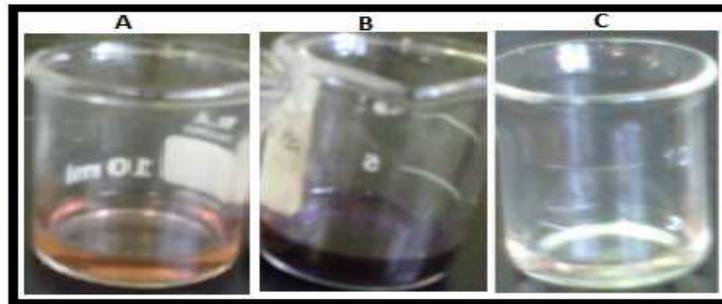
**Tabla 17.** Puntos de fusión mezcla de acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina

Mezcla	Punto de fusión (°C)	Relación %	Referencia
Acetato de $\alpha$ y $\beta$ amirina	190	89:11	*
	179-181	64:36	Gislei <i>et al</i> , 2009
	220	60:40	Carvajal <i>et al</i> , 2010
	192-193	No reportado	Bandeira <i>et al</i> , 2007

\* Punto de fusión obtenido en la presente investigación.

#### 4.3.3.2 Ensayo Lieberman – Burchard

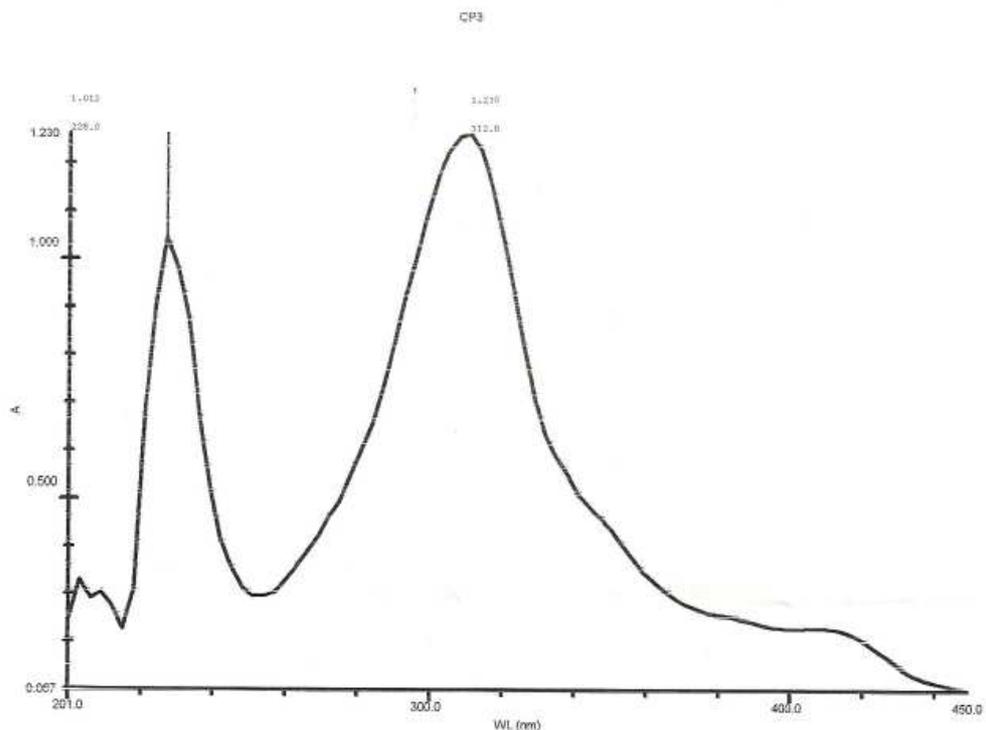
CP3 dio positivo la prueba de LB presentando cambio de color a rojizo, como se presenta en la figura 48, indicando la presencia de una estructura triterpénica.



**Figura 48.** Prueba de Lieberman Burchard (LB) a) compuesto CP3 - positivo LB, b)  $\alpha$ - $\beta$  amirina - positivo LB, c) compuesto CP1 - negativo LB.

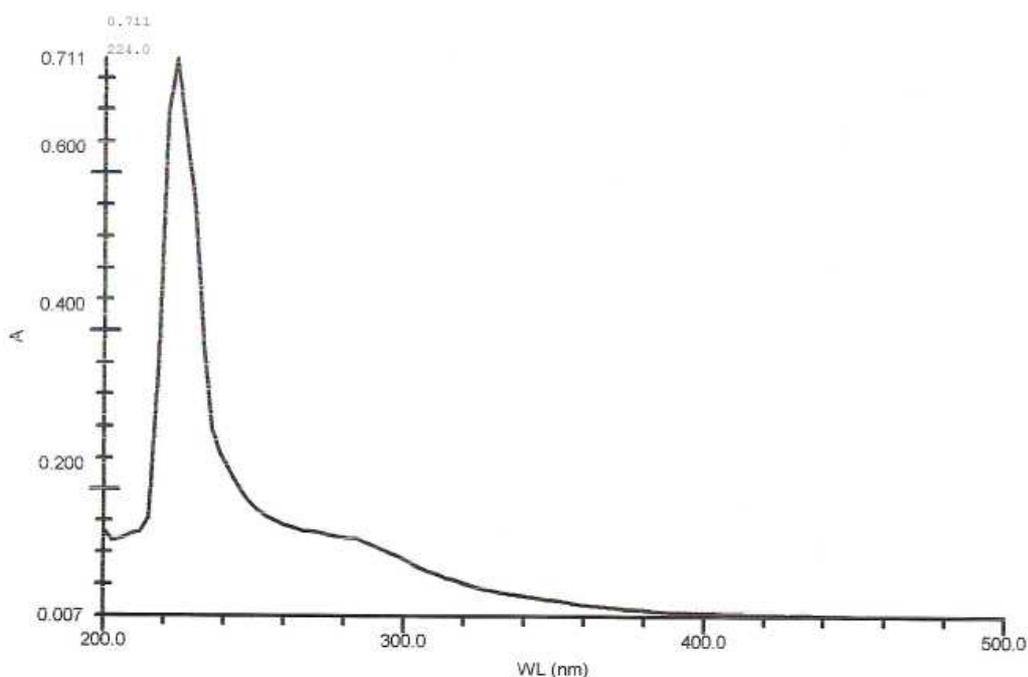
#### 4.3.3.3 Espectrofotometría UV – Visible

El espectro, presentado en la figura 49, muestra la absorción característica de estructuras triterpénicas en el UV a 310 nm (Ponomarev *et al*, 1971), por la reacción del triterpeno con el ácido sulfúrico, en la cual se forman derivados de la molécula con dobles enlaces conjugados en los anillos C y D (Oganesyan *et al*, 1981).



**Figura 49.** Espectro UV – reacción CP3 y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

La figura 49 muestra el pico a 224 nm correspondiente a remanente de CP3, que no reaccionó con el ácido sulfúrico. Lo anterior fue corroborado al disolver CP3 en etanol y realizar un barrido de absorbancia de 200 a 500nm, ver figura 50.



**Figura 50.** Espectro UV –CP3 en etanol.

#### 4.3.3.4 Espectroscopía infrarrojo

##### 4.3.3.4.1 CP3

El espectro IR obtenido muestra 10 picos representativos los cuales se comparan, con los datos reportados en la literatura, en la tabla 18.

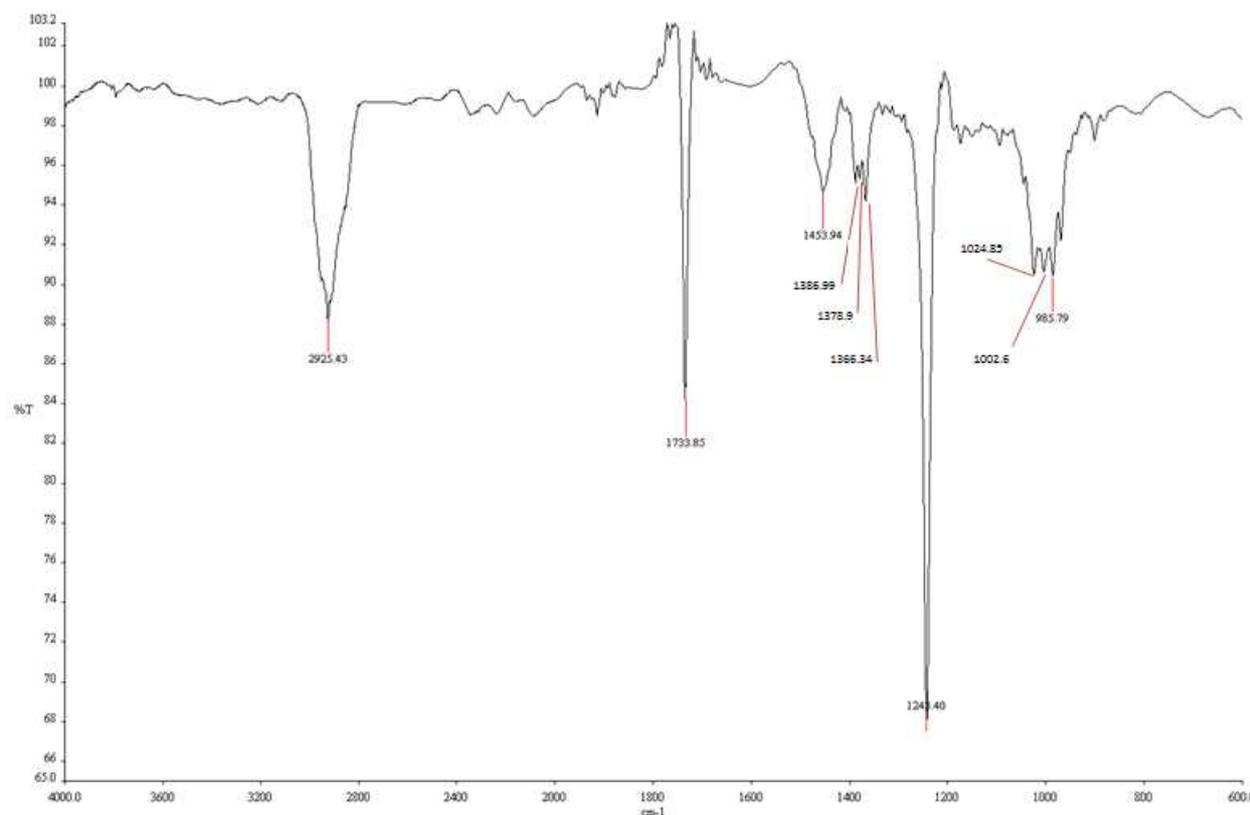
**Tabla 18.** Espectro IR compuesto 3.

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Reportado* (cm <sup>-1</sup> )
2925.43	2923.91
1733.85	1734.71
1453.94	1453.98
1386.99	1387.32
1378.9	1378.12
1366.34	1366.19

1243.4	1242.86
1024.85	1022.83
1002.6	1004
985.79	986.41

\*Longitud de onda reportada en la literatura (Carvajal, 2010).

La figura 51 muestra el espectro obtenido, con bandas de absorción a 2925, 1733, 1454, 1387, 1378, 1366, 1243, 1024 y 1002 y 985  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 1733  $\text{cm}^{-1}$ , originada por las vibraciones de tensión C=O, vinculada a la banda a 1243  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de tensión C-O, han sugerido la presencia de un grupo funcional tipo éster. Por otro lado, las bandas a 2925  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de tensión C-H. Estas bandas tanto como las de 1454  $\text{cm}^{-1}$  y 1387  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones de flexión de los grupos metilénicos y metílicos, han demostrado la naturaleza hidrocarbonada del compuesto.



**Figura 51.** Espectro infrarrojo de CP3 – Acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina.

#### 4.3.3.4.2 Producto de hidrólisis CP3 – Alcohol triterpénico

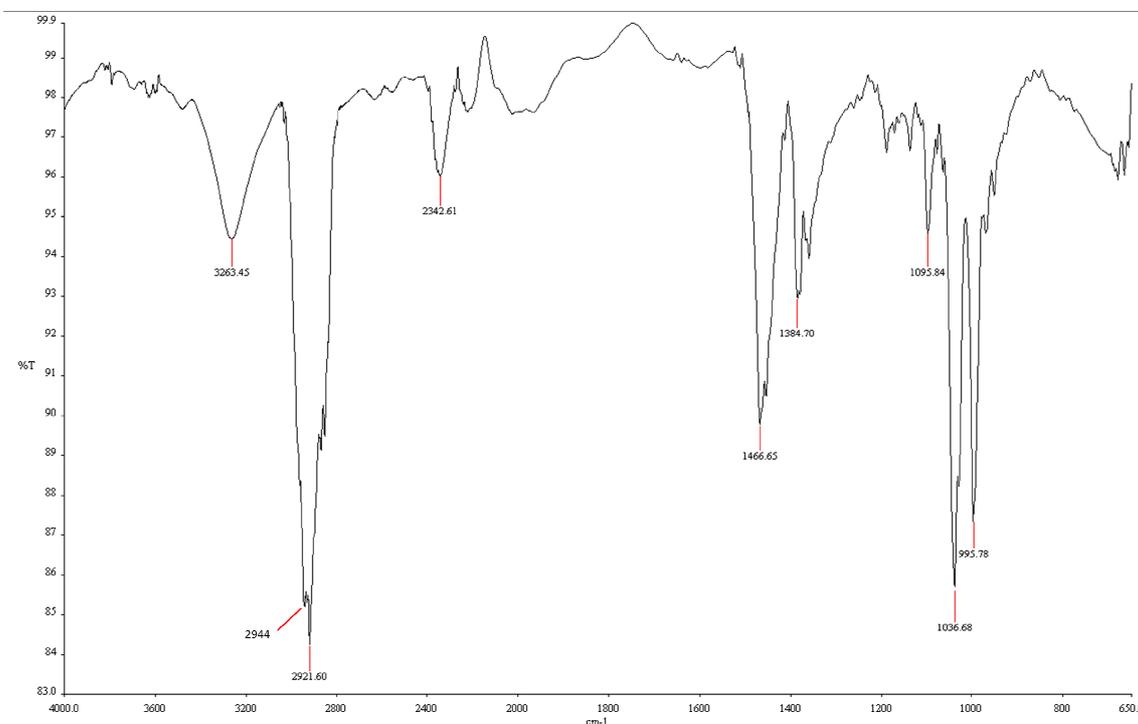
El espectro IR del producto de hidrólisis, correspondiente al alcohol triterpénico, muestra 7 picos representativos los cuales se comparan, con los datos reportados en la literatura, en tabla 19.

**Tabla 19.** Espectro IR producto de hidrólisis CP3.

Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )	Reportado* (cm <sup>-1</sup> )
3263.45	3269.84
2944	2944.98
2921.6	2919
1466.65	1463
1384.7	1386.77
1036.68	1036.79
995.78	992.49

\*Longitud de onda reportada en literatura (Carvajal, 2010).

La figura 52 muestra el espectro obtenido, con banda a 3263 cm<sup>-1</sup> correspondiente a un grupo hidroxilo, bandas a 2944 y 2921 cm<sup>-1</sup> características a tensiones C-H de grupos metílicos y metilénicos y bandas a 1466 cm<sup>-1</sup> y 1384 cm<sup>-1</sup> asignadas a vibraciones de flexión de los grupos metilénicos y metílicos.



**Figura 52.** Espectro IR producto de hidrólisis CP3 – Alcohol triterpénico.

#### 4.3.3.5 Preparación del derivado

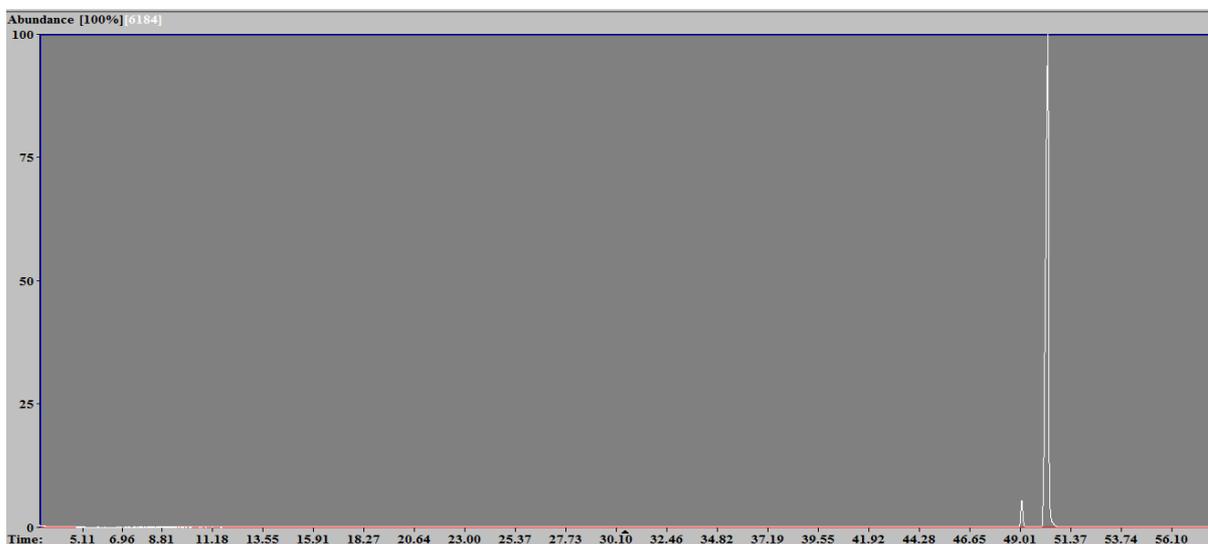
La recristalización del producto crudo de etanol dio 300 mg de  $\alpha$ - $\beta$  amirina (p.f. 170°C). La figura 53 muestra el progreso de la hidrólisis cuyo rendimiento fue de 66 %.



**Figura 53.** CCF para progreso de hidrólisis CP3.

#### 4.3.3.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

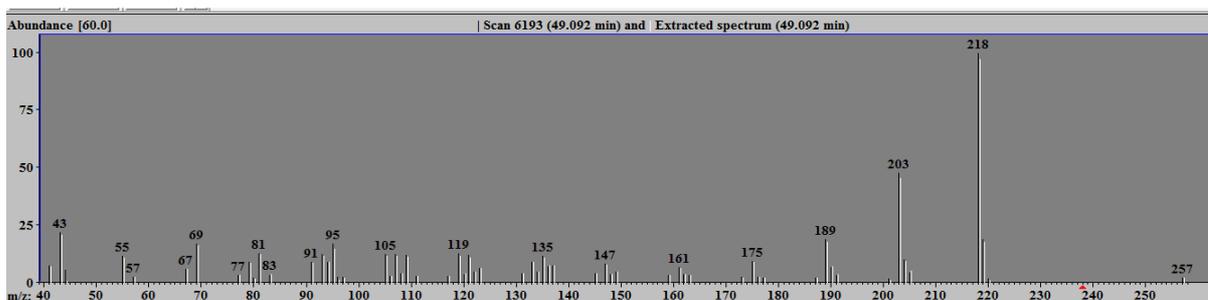
La figura 54 muestra el cromatograma de gases, del compuesto 3 purificado, con un pico a 49 min y uno a 50.41 min, correspondientes a sus isómeros.



**Figura 54.** CG compuesto 3.

#### 4.3.3.6.1 Análisis del CG-EM en tiempo de retención (Rt) 49.092 min

Las señales de fragmentación más abundantes para el compuesto, presentadas en la figura 55, son m/z (int rel.) 189(25), 203(50), 218(100), 257(5), 468(2), 408 (5), 468(2), ver figura 55.

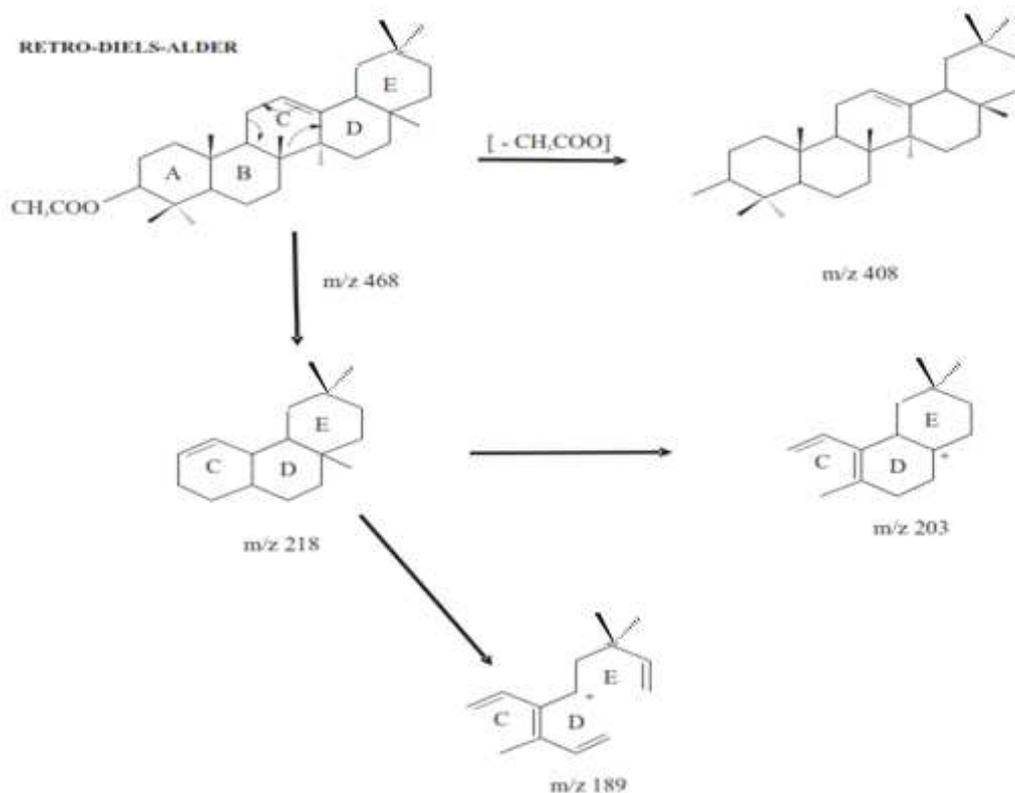


**Figura 55.** Espectro de masas CP3 con Rt 49.092 - Acetato  $\beta$  amirina.

Comparado con los datos de la literatura los cuales presentan como principales señales m/z (int. rel.) 189 (85), 203 (70), 218 (100), 468(2) características de triterpenos tipo amirina, se determinó que las señales presentadas por el compuesto se acoplan perfectamente al espectro reportado por la literatura (Silva *et al*, 2007). Aunque el porcentaje de abundancia es diferente, esto se debe principalmente al método empleado en el proceso de bombardeo de electrones.

El espectro muestra la señal de fragmentación m/z 189 menos intensa que la m/z 203, características de los derivados del oleanano ( $\beta$  amirina), esta relación es inversa para los derivados del ursano ( $\alpha$  amirina)

El proceso de fragmentación se da bajo la reacción RETRO-DIELS-ALDER para triterpenos pentacíclicos, como se muestra en la figura 56.



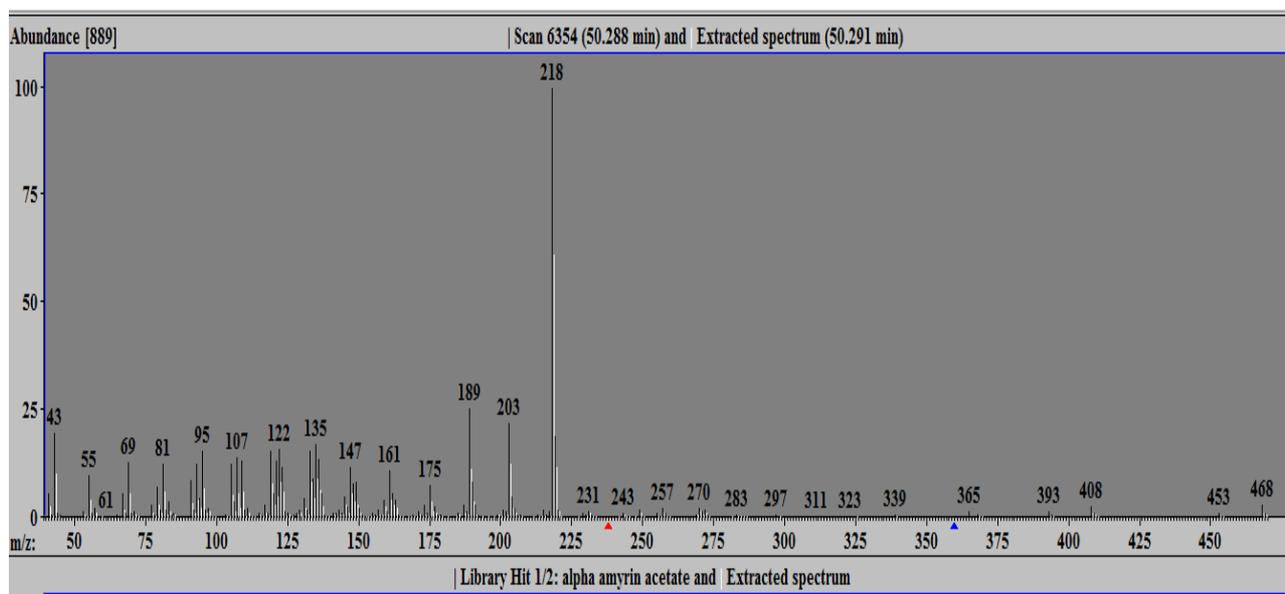
**Figura 56.** Patrones de fragmentación acetato  $\beta$  amirina.

En este proceso se pierde el acetato ( $M^+$  -  $CH_3COO(68)$ ) dando origen al grupo ursano m/z 408, otro de los rompimientos sugiere la pérdida de los anillos A-B, pérdida de 4 grupos metílicos, el acetato y reordenamiento del enlace doble en el anillo C, con lo cual se obtiene m/z 218, a partir de este rompimiento se presentan dos subsecuentes, uno de los cuales puede originar m/z 203 por la pérdida del grupo metílico unido al anillo E y C-H del anillo C, a partir de esta pérdida en este anillo se genera un reordenamiento del mismo dando origen a un nuevo doble enlace. La otra fragmentación presentada por m/z 218 conlleva a la obtención del ión m/z 189, en donde se pierden grupos C-H en los anillos C, D y E y al mismo tiempo se generan dobles enlaces.

El espectro de masa, referente al isómero con  $R_t = 49.01$  fue sugerido por el banco de datos NIST como acetato de  $\beta$  amirina, lo cual es corroborado por la similitud casi en un 100% de los iones de fragmentación con los datos reportados por la literatura para el acetato de  $\beta$  amirina.

#### 4.3.3.6.2 Análisis del CG-EM en tiempo de retención (Rt) 50.291 min

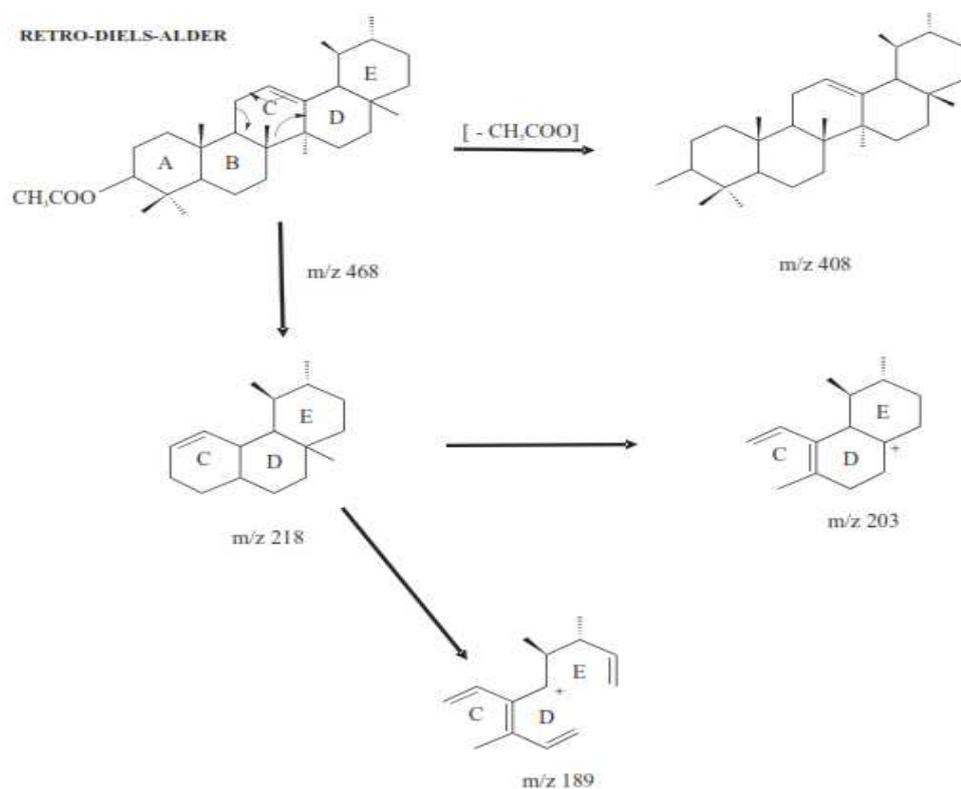
Las señales de fragmentación más abundantes, presentadas en la figura 57, son m/z (int. rel.) 189(30), 203(23), 218(100), 257(5), 468(2), 408 (5), 468(2), ver figura 57.



**Figura 57.** Espectro de masas acetato  $\alpha$  amirina.

Comparado con los datos de la literatura, se presentan como principales señales m/z (int. rel.) 109(8), 189 (60), 203 (55), 218 (100), 468(2) (Silva *et al*, 2007). De igual modo que en la literatura se observa que para el acetato de  $\alpha$  amirina el ión a m/z (int. rel.) 189 (30) presenta una abundancia relativa mayor al m/z (int. rel.) 203 (23).

La fragmentación del acetato de  $\alpha$  amirina se presenta bajo el siguiente mecanismo.



**Figura 58.** Patrones de fragmentación acetato  $\alpha$  amirina.

El proceso de fragmentación del acetato de  $\alpha$  amirina ocurre de igual modo al descrito anteriormente para el acetato de  $\beta$  amirina.

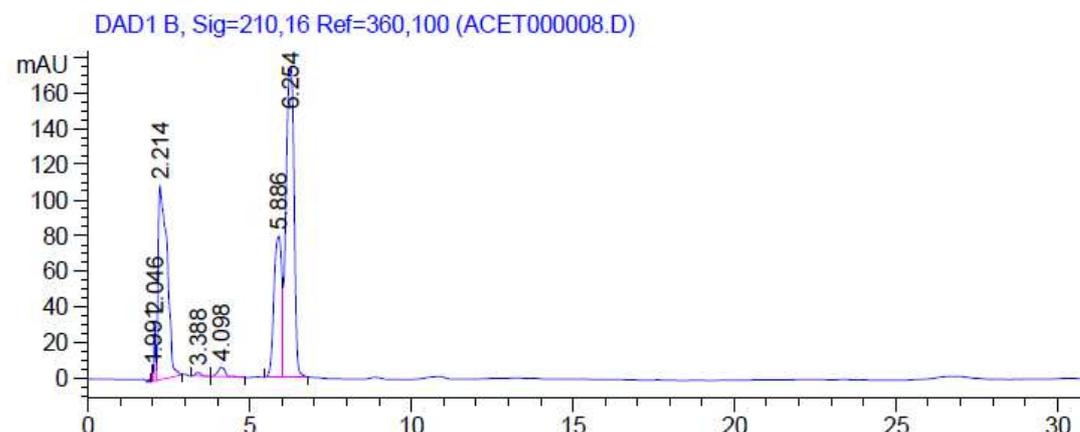
El espectro de masas referente al isómero con  $R_t = 50.291$ , fue sugerido por el banco de datos NIST como acetato de  $\alpha$  amirina, lo cual es corroborado por la similitud en un 99% de los iones de fragmentación con los datos reportados por la literatura para el acetato de  $\alpha$  amirina.

#### 4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia

Las curvas patrón construidas por HPLC permitirán determinar a qué concentración se encuentra los dos metabolitos secundarios aislados de la presente investigación, en cualquier extracto que se realice a las hojas de *P. caimito* provenientes del Chocó.

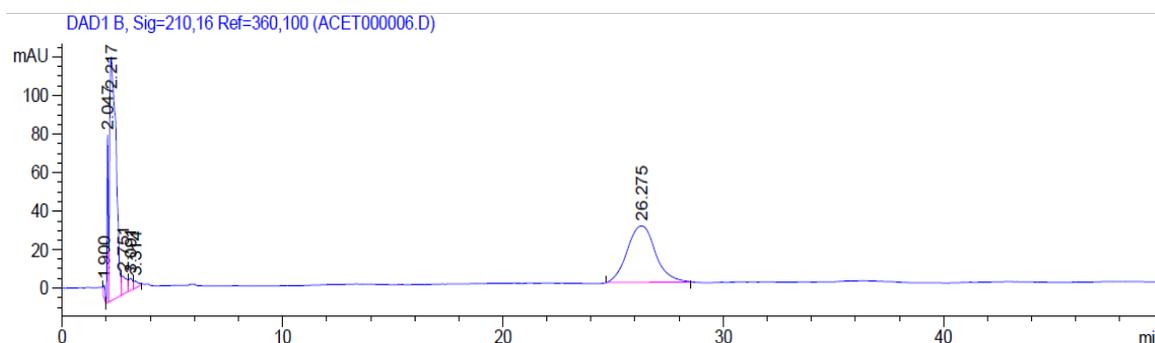
CP3 es una mezcla de isómeros de acetato de  $\beta$  y  $\alpha$  amirina, los cuales tienen tiempos de retención de 5.86 y 6.25 min, respectivamente, bajo las condiciones

descritas en la sección de metodología para HPLC. En la figura 59 se presenta el cromatograma donde se identifican los isómeros.



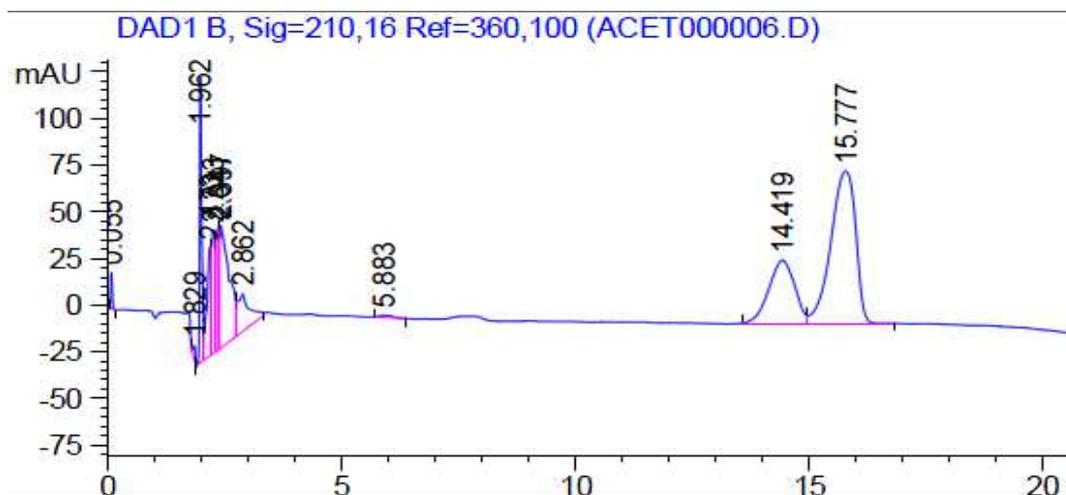
**Figura 59.** HPLC para el acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina – ACN (90%).H<sub>2</sub>O.

El palmitato de lupeol presenta un tiempo de retención de 26.3 min por HPLC, como se muestra en la figura 60, mucho mayor al de la mezcla de acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, debido a su baja polaridad por su estructura hidrocarbonada y a su alto peso molecular.



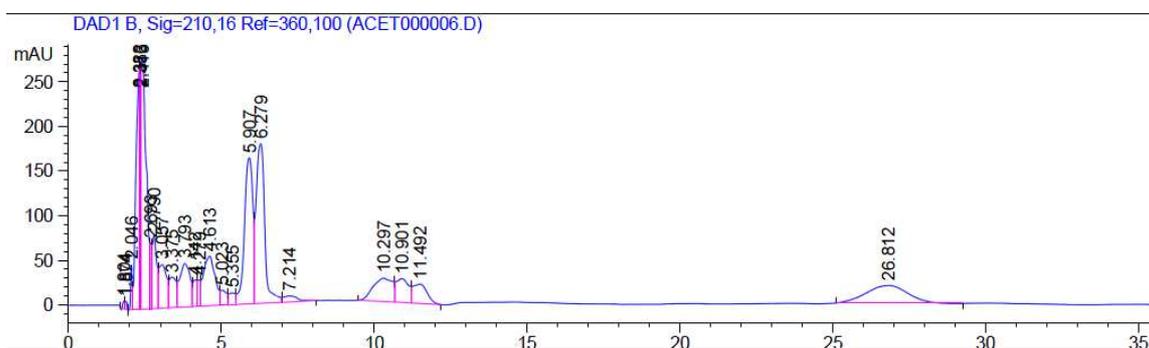
**Figura 60.** HPLC para el palmitato de lupeol – ACN(90%). H<sub>2</sub>O.

Una mejor separación de los picos correspondientes al acetato de  $\beta$  amirina y al acetato de  $\alpha$  amirina, se logró con una mezcla de ACN (80%) y H<sub>2</sub>O en columna de fenilo, obteniéndose tiempos de retención de 14.4 y 15.7 min respectivamente, ver figura 61.



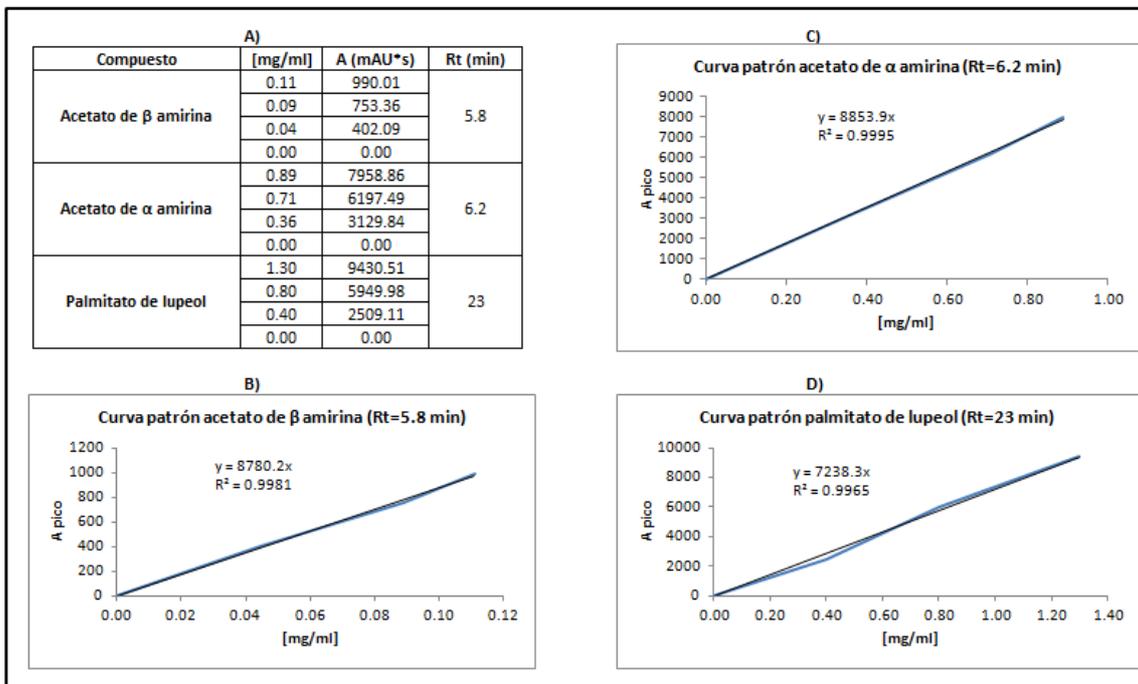
**Figura 61.** HPLC para el acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina - ACN (80%).H<sub>2</sub>O.

El análisis por HPLC, de un extracto hexánico de las hojas de *P. caimito*, se muestra en la figura 62, donde se pueden identificar por sus tiempos de retención los compuestos aislados en esta investigación, acetato de  $\beta$  amirina (Rt=5.9 min), acetato de  $\alpha$  amirina (Rt=6.3) y palmitato de lupeol (Rt=26.8), al igual que varios compuestos que se les desconoce su estructura molecular.



**Figura 62.** Análisis, por HPLC, de extracto hexánico - ACN (90%).H<sub>2</sub>O.

Los ajustes de las curvas patrón obtenidas, fueron superiores al 98%, como se presenta en la figura 63, asegurando de este modo la fiabilidad de los modelos para la predicción del contenido de los metabolitos secundarios en cualquier extracto que se le realice a las hojas de *P. caimito*.



**Figura 63.** a) datos curvas de calibración b) acetato de  $\beta$  amirina c) acetato de  $\alpha$  amirina d) palmitato de lupeol.

La relación de los isómeros del acetato de amirina se determinó a partir del área bajo la curva de los picos a 210 nm, según la siguiente ecuación.

$$\% \text{CP3 } \alpha = \frac{A \alpha}{A \alpha + A \beta} \quad , \quad \% \text{CP3 } \beta = \frac{A \beta}{A \alpha + A \beta}$$

**Ecuación 2.** Cálculo relación de isómeros acetato de amirina.

La relación del acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, para el producto aislado es de 8:1, equivalente a 89% y 11%, respectivamente. El extracto hexánico evaluado tiene una relación de 12:11, equivalente al 53% y 47%.

La variación de la relación del acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, del producto utilizado para construir la curva patrón y del extracto evaluado, se debe a la variabilidad en la producción de los metabolitos de las hojas ya que estas fueron recolectadas en diferentes épocas del año.

La concentración del acetato de  $\alpha$  amirina, acetato de  $\beta$  amirina y palmitato de lupeol, en el extracto evaluado, es de 0.36, 0.34 y 0.19 mg/ml respectivamente.

## CONCLUSIONES

Se purificó una mezcla de compuestos parafínicos, una mezcla de isómeros triterpénicos y un éster de ácido graso triterpénico, con puntos de fusión de 65, 190 y 75 °C, respectivamente.

Se caracterizaron cuatro metabolitos secundarios aislados por primera vez de las hojas de *P. caimito*, correspondientes a una mezcla de acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, palmitato de lupeol, nonaconaso y triacontano. El palmitato de lupeol es el primer éster de ácido graso de lupeol reportado en el género *Pouteria*.

El extracto metanólico de las hojas de *P. caimito* presenta una  $CE_{50}$ , para la inhibición del radical DPPH, 426 veces mayor a la presentada por el control positivo ASC.

Los alcoholes obtenidos mediante el proceso de hidrólisis permitieron constatar la naturaleza triterpénica de los compuestos aislados, permitiendo complementar su caracterización.

Se obtuvieron productos de alto valor comercial debido a las propiedades ansiolíticas, antiinflamatorias y antiartríticas reportadas para los ésteres triterpénicos aislados.

Las curvas patrón, obtenidas por HPLC, presentan ajustes superiores al 98%, permitiendo de este modo la predicción del contenido de los metabolitos secundarios en cualquier extracto que se le realice a las hojas de *P. caimito* con fiabilidad y de una manera rápida.

## RECOMENDACIONES

Evaluar las condiciones óptimas de extracción del acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina mediante diseño de experimentos.

El metabolito secundario de mayor abundancia encontrado en este estudio es el acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, isómeros que presentan un gran valor comercial si se obtienen individualmente, por lo que se recomienda encontrar un método eficaz de separación.

Determinar la estructura de costos para extraer 1 mg de compuestos.

Evaluar la incidencia de factores ambientales y ecológicos, tales como el índice pluviométrico y el ataque de herbívoros, en la variabilidad de producción del acetato de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina para las hojas de *P. caimito*.

La capacidad antioxidante fue medida bajo el método DPPH el cual es un radical libre no producido por el cuerpo, por lo cual se recomienda el análisis de esta actividad por métodos que involucren radicales presente en el cuerpo.

Datos de literatura reportan que los derivados de alcoholes triterpénicos presentan actividad biológica en algunos casos superior a la reportada para los alcoholes, por lo tanto, sería pertinente evaluar actividades biológicas tales como antiinflamatoria, sedativa, antiartrítica, entre otras para los ésteres triterpénicos obtenidos.

## ANEXO

### Anexo 1. Condiciones de operación CG-EM.

#### CONDICIONES DE REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Registro de Ensayo No: 12-004

Fecha de Inicio: 2012-02-22

Fecha de Finalización: 2012-02-22

Condiciones Ambientales:

Humedad: 37 Temperatura: 25

Técnica de Análisis: HPLC  GC-MS  GC-FID  UV-VIS  ABS. ATO  FT-IR

#### Condiciones del Equipo

##### OVEN

Initial temp: 100 °C (On)

Maximum temp: 325 °C

Initial time: 1.00 min

Equilibration time: 0.50 min

Ramps:

# Rate Final temp Final time

1 5.00 200 3.00

2 3.00 250 4.00

3 5.00 300 5.33

4 0.0(Off)

Post temp: 100 °C

Post time: 0.00 min

Run time: 60.00 min

##### FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

##### BACK INLET (UNKNOWN)

Mode: Splitless

Initial temp: 150 °C (On)

Pressure: 0.50 psi (On)

Purge flow: 10.0 mL/min

Purge time: 1.00 min

Total flow: 14.1 mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 20.0 mL/min

Saver time: 2.00 min  
Gas type: Helium

COLUMN 1	COLUMN 2
Capillary Column	(not installed)
Model Number: Agilent 19091J-113	
HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane	
Max temperature: 325 °C	
Nominal length: 30.0 m	
Nominal diameter: 320.00 um	
Nominal film thickness: 0.50 um	
Mode: constant flow	
Initial flow: 1.0 mL/min	
Nominal Init pressure: 0.51 psi	
Average velocity: 37 cm/sec	
Inlet: Front Inlet	
Outlet: MSD	
Outlet pressure: vacuum	

#### THERMAL AUX 2

Use: MSD Transfer Line Heater  
Description:  
Initial temp: 350 °C (On)  
Initial time: 0.00 min  
# Rate Final temp Final time  
1 0.0(Off)

#### POST RUN

Post Time: 0.00 min

#### GC Injector

##### Front Injector:

Sample Washes	3
Sample Pumps	5
Injection Volume	5.00 microliters
Syringe Size	10.0 microliters
Preinj Solvent A Washes	4
Preinj Solvent B Washes	0
Postinj Solvent A Washes	4
Postinj Solvent B Washes	0
Viscosity Delay	3 seconds
Plunger Speed	Fast
Preinjection Dwell	0.00 minutes
Postinjection Dwell	0.00 minutes

**Acquisition Mode: Scan**

**MS Information**

**Solvent Delay: 4.00 min**

**EM Absolute: False**

**EM Offset: 0**

**Resulting EM Voltage: 1635.3**

**[Scan Parameters]**

**Low Mass: 30.0**

**High Mass: 800.0**

**Threshold: 30**

**Sample #: 2 A/D Samples 4**

**Plot 2 low mass: 30.0**

**Plot 2 high mass: 800.0**

**[MSZones]**

**MS Quad: 150 C maximum 200 C**

**MS Source: 230 C maximum 250 C**

**Método de Análisis**

Acetles.M

## BIBLIOGRAFÍA

Abe F, Nagafuji S, Yamauchi T, Okabe H, Maki J, Higo H, Akahane H, Aguilar A, Jiménez-Estrada M, Reyes Chilpa R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of Some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull* 2002, 25.1188-1191.

Agripino DG, Lima MEL, Silva MR, Meda CI, Bolzani VS, Cordeiro I, Young MCM, Moreno PRH Screening of brazilian plants for antimicrobial and dna-damaging activities. i. Atlantic Rain Forest Ecological Station Juréia-Itatins. *Biotaneotropica* 2004,4.1-15

De Aguiar Falcão Martha, Clement Roland Charles. Fenologia e Productividade de Pouteria caimito na Amazônia Central. *Acta Amazonica* 1999., 29(1).3-12

Alves TMA, Silva AF, Brandão MGL, Grandi TSM, Smânia EF, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, 95. 367373.

Aragão, G.F.; Carneiro, L.M.V.; Junior, A.P.F.; Vieira, L.C.; Bandeira, P.N.; Lemos, T.L.G.; Viana, G.S. de B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and  $\beta$ -amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2006 Vol. 85 páginas 827–834.

Ardon A. Nakano T. Triterpenes from the bark of Pouteria Caimito. *Planta Medica*. 1973. 23 (4). 348-352.

Arotoma S. Marketing Caimito. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Perú. Serie 300-I. 2009.

Assimopoulou A., Papageorgiou V.P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY*. 2005. 19. 285–31.

Ávalos A., Pérez E. Metabolitos Secundarios de Plantas. Serie Fisiología Vegetal. No 2. 2009.

Baldwin, I. T.; Zhang, Z. P.; Diab, N.; Ohnmeiss, T. E.; McCloud, E. S.; Lynds, G. Y.; Schmelz, E. A.; *Planta* 1997, 201, 397.

Bandeira P., Lemos T., Costa S., Dos Santos H. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007. 17(2). 204-208.

Barbosa AP, Nascimento CS, Morais JW. Estudos de propriedades antitermíticas de extratos brutos de madeira e casca de espécies florestais da Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazonica* 2007, 37. 213-218.

Bedoya LM, Alvarez A, Bermejo M, Gonzalez N, Beltran M, Sanchez-Palomino S, Cruz SM, Gaitan I, Del Olmo E, Escarcena R. Guatemalan plants extracts as virucides against HIV-1 infection. *Phytomedicine* 2008, 15. 520-524.

Bennet, R. N e Wallsgrove R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 1994, 127.617-633.

Boleti AP, Freire MG, Coelho MB, Silva W, Baldasso PA, Gomes VM, Marangoni S, Novello JC, Macedo ML. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *J Agric Food Chem* 2007, 55. 2653-2658.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss U Technol* 1995; 28. 25-30.

Bustamante RO, Marín R, Sotes G, Teillier S, Henríquez C Estructura comunitaria del matorral mediterráneo costero, Los Molles, IV Región. el rol del fuego y de la alelopatía. *Biol Res* 2007 40. R-100.

Calzavara, B.B.G Fruteiras. abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro e cupuacuzeiro. Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Nordeste, Belem, Pará. 1970. 42p.

Carvajal D., Restrepo I. Caracterización de los principales compuestos presentes en los extractos de protium colombianun cuatrec (burseraceae). 2010. Proyecto de grado, Universidad EAFIT.

Carvalho T., Polizeli A., Turatti I., Severiano M. Screening of Filamentous Fungi to Identify Biocatalysts for Lupeol Biotransformation. *J. Molecules*. 2010. 15, 6140-6151.

Castro CFS, Silva CAM, Perfeito JP, Santos ML, Resck IS, Paula JE, Silveira D Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia. 2006.

Castro A., N. Pino, D. Abadía. Una aproximación al uso tradicional de las especies vegetales colorantes en el municipio de Quibdó, Chocó. *Rev. Inst. Universidad Tecnológica del Chocó* 2003. 18. 37-42.

Catchpole OJ, von Kamp JC, Grey JB. Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide. *Ind Eng Chem Res* 1997; 36.4318–24.

Channon J., Chibnall A., The ether soluble substances of cabbage leaf cytoplasm. Department of Experimental Pathology and Cancer Research. 1929. University of Leeds.

Chaturvedula VSP, Zhou B, Gao Z, Thomas SJ. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase B. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2004, 12, 6271- 6275.

Chenniappan K., Kadarkari M. Adult mortality and blood feeding behavioral effects of  $\alpha$ -amyrin acetate, a novel bioactive compound on in vivo exposed females of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera. Culicidae) . 2011. *Parasitol Research*.

Costa AF, Silva GF, Escudero MC. Estudo comparativo entre produtos químicos preservantes e licores pirolenhosos na inibição de fungos emboloradores. *Brasil Florestal* 2003, 21. 24-30.

Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. Natural products secondary metabolites. In B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones (eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, (2000), pp. 1250–1318.

Crozier A, Michael N. Clifford, Hiroshi Ashihara. *Plant Secondary Metabolites, Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing Ltd. 2006.

Darrow, K.; Bowers, M. D.; *Biochem. Syst. Ecol.* 1997, 25, 1.

Demain, A. L. e Fang. The natural functions of secondary metabolites *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2000, 69. 1-39.

Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, *et al.* Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep* 2006; 23:394–411.

Eggersdofer M. Terpenes. In. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, electronic release*. Weinheim.Wiley-VCH; 2005.

Evans, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14th ed., WB Saunders Company. London, 1996, cap. 7.

Falcão HS, Lima IO, Santos VL, Dantas HF, Diniz MFFM, Barbosa-Filho JM, Batista LM Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 2005. 15. 381-391.

Fontes-Junior EA 2004. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora*. Belém 110 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Parána.

Fotie J., Bohle S., Leimanis L., Georges E., Rukunga G., Nkengfack A. Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*. *J. Nat. Prod.* 2006. 69, 62-67.

Franco EM. Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas. *Bebidas Alfa Editores Técnicos*. 2006 Junio/Julio. 20-27.

Franzotti EM. Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais. *Morus nigra* L., *Plectranthus ornatus* Codd., *Ipomoea cairica* (L) Sweet e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. Brasília, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2004, p 150.

Gauthier C, Legault J. Lebrun M. Glycosidation of lupane- type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 2006. 14, 6713-6725.

Gaviria C., Ochoa C. Sánchez N.. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2009, 8 (6), 519 – 528.

*Gislei F. Aragão, Lyvia M.V. Carneiro, Antônio P.F. Junior, Paulo N. Bandeira, Telm L.G. Lemos and Glauce S. de B. Vian* Evidence for Excitatory and Inhibitory Amino Acids Participation in the Neuropharmacological Activity of Alpha- and Beta-Amyrin Acetate. *The Open Pharmacology Journal* 2009, 3, P 9-16.

Gobbo- Neto, L. e Lopes, N.P. Plantas medicinais. fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 2007. 30. 374-381.

Graham JG, Pendland SL, Prause JL, Danzinger LH, Schunke Vigo J, Cabieses F, Farnsworth NR. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. *Phytomedicine* 2003, 10. 528-535.

Gray, D. E.; Pallardy, S. G.; Garret, H. E.; Rottinghaus, G. E.; *Planta Med.* 2003, 69, 1024.

Gros Eduardo, Pomilio Alicia, *et al.* Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. 1985. Monografía No. 30.

Gupta MB, Bhalla TN, Gupta GP. Anti-inflammatory activity of natural products. Triterpenoids. *European Journal of Pharmacology*. 1969, 6, 67-70.

Hasmeda M, Kweifio-Okal G, Macrides T, Polya GM, Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Medica* 1999. 65, 14-18.

Hata K, Hori K, H Takahashi S. Differentiation and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line, *Journal of Natural Products* 2002, 65, 645-648.

Hernandez C, Villaseñor I, Joseph E, Tolliday N. Isolation and evaluation of antimetabolic activity of phenolic compounds from *Pouteria campechiana* Baehni. *Philipp J Sci* 2008, 137.

Homero, João. Variações diárias, sazonais e intraespecíficas em *Piper solmsianum*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2008. Pag 10.

Iwagawa T., Tanoue C., Toyota T., Hase T.. The constituents of the leaves of *Viburnum phlebotrimum*. *Rep. Fac. Sci., Kagoshima Univ.* 1982, No.15, p 57-62.

Iwagawa T., Tanoue C., Toyota T., Hase T.. The constituents of the leaves of *Viburnum urceolatum*. *Rep. Fac. Sci., Kagoshima Univ.* 1982, No.15, p 63-68.

Jiménez, Alex. Ramos, Yan, García, Fabio. El Chocó. una fuente de oportunidades comerciales, a partir del conocimiento, valoración y manejo de su biodiversidad, *Rev. Inst. Universidad Tecnológica del Chocó.* 2005. No 22, pp 3-9.

Kim KB, Kim SI, Song KS. Neuraminidase inhibitors from mushroom *Microphorus affinis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003. 13, 778-782.

Kovač, Durić K., Kalođera Z., Sofić E. Identification and isolation of pharmacologically active triterpenes in betula cortex, *betula pendula* roth., *Betulaceae*. *Bosnian journal of basic medical sciences.* 2009; 9 (1). 31-38.

Koeppel, D. E.; Rohrbaugh, L. M.; Rice, E. L.; Wender, S. H.; *Physiol. Plant.* 1970, 23, 258.

Kudi A, Umoh J, Eduvie L, Gefu J. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 1999. 67. 225-228.

Kweifio-Okai G, de Munk, Macrides, Smith P. Antiarthritic mechanism of lupeol triterpenes. *Drug Develop Res.* 1995. 36, 20-24

León, Jorge. *Botánica de los cultivos tropicales.* Agroamerica 2000. 3 Edición.

Libralato G, Losso C, Ghirardini AV. Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (*Crassostrea gigas* and *Artemia franciscana*). *J Hazard Mater* 2007. 144. 590-593.

Lopez KSE. *Estudo químico e atividades biológicas de Pouteria torta (Mart.) Radlk (Sapotaceae)*. Brasília, Dissertação de Mestrado, Ciências da Saúde, Universidade de Brasília 2005, 74 p.

Lynn D. Hodges, George Kweifio-Okai and Theodore A. Macrides. Molecular and Cellular Biochemistry Antiprotease effect of anti-inflammatory lupeol esters. 2003. Volume 252, Numbers 1-2, Pag 97-101.

Maia JGS, Andrade EHA, Zoghbi MGB Volatiles from fruits of *Pouteria pariry* (Ducke) Baehni and *P.caimito* (Ruiz and Pavon.) Rdlkl. *Journal of Essential. Oil-Bearing Plants* 2003. 6. 127-129.

Manosroi A, Saraphanchotiwitthaya A, Manosroi J. Effects of *Pouteria cambodiana* extracts on in vitro immunomodulatory activity of mouse immune system. *Fitoterapia* 2006. 77. 189-193.

Medina, M., A. Ríos, J. Prohens, F. Nuez. Recursos vegetales promisorios del departamento del Chocó. *Rev. Inst. Universidad Tecnológica del Chocó*. 2002. 16.28-35.

Montenegro LHM, Oliveira PES, Conserva LM, Rocham EMM, Brito AC, Araújo RM, Trevisan MTS, Lemos RPL. Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterástico de *Pouteria venosa* L (Sapotaceae). *Rev Bras Farmacogn* 2006, 16. 611-617.

Morton, J. Abiu. In. *Fruits of warm climates*. Miami. 1987. p. 406–408.

Muffler K., Leipold D. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry*. 2010; 46. 1-15.

Na M, Kim BY, Osada H, Ahn JS. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus commixta*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2009. 24, 1056-1059.

Narender, T., Khaliq, T., Singh, A.B., Joshi, M.D., Mishra, P., Chaturvedi, J.P., Srivastava, A.K., Maurya, R.; Agarwal, S.C. Synthesis of  $\alpha$ -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009 Vol. 44 páginas 1215–1222.

Nascimento MC, Alcantara SF, Haddad CRB, Martins FR. Allelopathic potential of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., a species of the Brazilian cerrado. *Allelopathy* 2007 *J* 20. 279-285

Nikiéma JB, Vanhaelen- Fastré R, Vanhaelen M, Fontaine J. Effects of anti-inflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. *Phytotherapy Research*. 2001. 15, 131-134.

Nunes MM. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotaceae. Brasília, Dissertação de Mestrado, Ciências Médicas, Universidade de Brasília 2004, p 60.

Oganesyan E.T., Shinkarenko A.L., Bandykova V.A. Absorption spectra of some pentacyclic triterpenoids in sulfuric acid. *Khimiya Prirodykh Soedinenii*. 1968. Vol.4, No.4, pp 212-213.

Ogihara K., Nishizato S., Ishigaki M. Triterpenoids and Phytosteroids from the Leaves of *Cynanchum liukuense*. *Bulletin of the College of Science, University of the Ryukyus*. 2000, No.70, 83 – 92.

Ogunwande I, Bello M, Olawire O, Muili K. Phytochemical and antimicrobial studies on *Butyrospermum paradoxum*. *Fitoterapia* 2001, 72. 54-56.

Oliveira S. Determinación de capacidad antirradicalaria de productos naturales utilizando quimiluminiscencia y ensayos fotométricos con radicales estables. Universidad de Sao Paulo. 2011.

Pal S, Nandy A Antiinflammatory, analgesic and antipyretic of *Achras sapota* Linn. Leaf extracts and its isolated compounds. *Indian Drugs* 1999. 36. 106-114.

Pellicciari R, Ardon A, Bellavita V. Triterpenes from *Pouteria caimito*. *Planta Medica* 1972, 22. 196-200.

Perfeito JP, Santos ML, Lopez KSE, Paula JE, Silveira D Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts. a preliminary study. *Rev Bras Farmacogn* 2005, 15. 183-186

Pichersky. E. e Gang, D. R. Genetics and Biochemistry of secondary metabolites in plants. an evolutionary perspective. *Trend in Plant Science*. 2000. 5.439-445.

Pietsch A, Jaeger P. Concentration of squalene from shark liver oil by shortpath distillation. *Eur J Lipid Sci Technol* 2007; 109.1077–82.

Ponomarev V.D., Oganesyan E.T., Semenchenko V.F. Absorption spectra of pentacyclic triterpenoids in sulfuric acid. *Khimiya Prirodykh Soedinenii*. 1971. No.2, pp 147-150.

Prasad S, Kaira N, Singh M, Shukla Y. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian Journal of Andrology* 2008c. 10 313-318.

Rajic A, Kweifio-Okai G, Macrides T, Sanderman RM, Chandler DS, Polya. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory terpenoids. *Planta Medica* 2000. 66, 206-210.

Rojano B., Gaviria C., Gil M. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. VITAE, revista de la facultad de química farmacéutica. 2008, Vol 15. No.1. Pg 173-181.

Saleem M, Kaur S, Kweon, Adami VM, Afaq F, Mukhtar H. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of the human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. Carcinogenesis. 2005. 26,1956-1954.

Saleem R, Ahmad SI, Ahmed M, Faizi Z, Zikr-ur-Rehman S, Ali M, Faizi S. Hypotensive activity and toxicology of constituents from Bombax ceiba stem bark. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2003. 26, 41-46.

Serreqi A., Leone R., Del Rio L., Mei S., Fernandez M., Breuil C. Identification and Quantification of Important Steryl Esters in Aspen Wood. 2000. JAOCS, Vol. 77, no. 4.

Skoog D., Holler J., Nieman T. Principios de análisis instrumental. 2001. Mc Graw Hill. 5ta edición.

Shai LJ, McGaw LJ, Aderogba MA, Mdee LK, Eloff JN. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from Curtisiadentate leaves. Journal of Ethnopharmacology. 2008. 119, 238-244.

Silva C., Simeoni L., Silveira D. Genus *Pouteria*. Chemistry and biological activity, Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2009, 19(2A). 501-509.

Silva C. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Brasília, dissertation, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. 2007. 150 p.

Silva, M. G. V.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Alencar, J. W.; *Fitoterapia* 1999, 70, 32.

Soldi, C.; Pizzolatti, M. G.; Luiz, A. P.; Marcon, R.; Meotti, F. C.; Mito, L. A.; Santos, A. R. S. Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ - Amirina triterpenes and their antinociceptive properties. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2008 Vol. 16 páginas 3377–3386.

Southwell, I. A, Bourke, C. A. *Phytochemistry*, 2001, 56, 437.

Springob K., Kutchan T. Plant-derived Natural Products Synthesis, Function, and Application. Springer. 2009.

Sudhahar V, Kumar SA, Varalakshmi P. Role of Lupeol and Lupeol linoate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. Life Sciences 2006. 78, 1329-1335.

Swenson U, Anderberg AA. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). *Cladistics* 2005, 21. 101-130.

Triono T, Brown AHD, West JG, Crisp MD. A phylogeny of *Pouteria* (Sapotaceae) from Malesia and Australasia. *Aust Syst Bot* 2007,20. 107-118.

Vélez, G.A.O. Estudio fenológico de diecinueve frutales silvestres utilizados por las comunidades indígenas de la región Araracuara – Amazonia Colombiana. Colombia Amazónica, 1992. 6(1). 174-183.

Voirin, B.; Brun, N.; Bayet, C.; *Phytochemistry* 1990, 29, 749.

Wade L. G., Química Orgánica. Pearson educación. . 2004. 5ta edición

Waksmundzka Monika, Sherma Joseph. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Cromatographic Science Series 2011. Vol 2.

Williams, R. D.; Ellis, B. E.; *Phytochemistry* 1989, 28, 2085.

Yoshihisa Takaishi, Yoshinori Fujimoto, Coralia Osorio, Carmenza Duque Beltran, Cristina Garzon, Freddy Alejandro Ramos Rodriguez, "Triterpene fatty acid esters from *Pouteria caimito* leaves" *Evento*. Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmaceutical Sciences Japón. 2006 p.83 - 83 , v.126, fasc.4.

Yasumori T., Makoto H., Kotaro K., Yoshiaki K., Hiroshi H., Hiroshi O., Mitsuru Y. Triterpenoid and caffeic acid derivatives in the leaves of ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales: Asteraceae), as feeding stimulants of *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae). 2004. 14. p 113–118.