

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



PUCP

**MÉTODO PREPARATIVO DE ÁCIDO URSÓLICO A PARTIR DE LA PLANTA
MEDICINAL FLOR DE ARENA (*Clinopodium revolutum*)**

Tesis para optar el grado de Magíster en Química que presenta

MICHAEL AZAEL LUDEÑA HUAMAN

Dirigido por

DRA. JUANA ROSA MARÍA ROBLES CAYCHO

San Miguel, 2017



Michael Azael Ludeña Huaman. /**Método preparativo de ácido ursólico a partir de la planta medicinal de Flor de arena (*Clinopodium revolutum*)**. Tesis para optar el grado de Magíster en Química. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Escuela de Posgrado.

Resumen

El ácido ursólico es un triterpeno pentacíclico que pertenece al grupo de los terpenoides y debido a sus diversas actividades farmacológicas, relacionadas con sus efectos hepatoprotectores, anti-oxidante, anti-inflamatorio y antitumoral, es objeto de un gran interés científico. Esta investigación tuvo como finalidad obtener ácido ursólico de alta pureza de una manera fácil, rápida y económica a partir de la especie *clinopodium revolutum* conocida comercialmente como flor de arena.

El proceso comenzó con la obtención del extracto de las hojas secas, a partir de ello se aisló ácido ursólico y se usó la técnica de recristalización para la separación y purificación. Finalmente se realizó análisis espectroscópicos de IR y RMN mono y bidimensional para caracterizar la molécula. Mediante la técnica de UPLC se determinó el contenido total y el porcentaje de pureza.

Entre los resultados más importantes del estudio se determinó que dicha especie es la que presenta mayor cantidad (4,864 %) de ácido ursólico entre las especies de la familia Lamiaceae. Entre las conclusiones se destaca que dicha planta medicinal *Clinopodium revolutum* conocida y comercializada con el nombre de flor de arena o té indio endémica del Perú, cultivada principalmente en las regiones de Huánuco y Cajamarca, resultó ser una importante biofuente de ácido ursólico, no solo por su alto contenido sino también por los métodos fáciles, económicos y reproducibles con las que se logró obtener cristales de ácido ursólico puro mediante la técnica de recristalización.

Michael Azael Ludeña Huaman. / **Preparative method of ursolic acid from the medicinal plant of Sand Flower (*Clinopodium revolutum*)**. Thesis to obtain the degree of Master in Chemistry. Lima: Pontifical Catholic University of Peru, Graduate School.

Abstract

Ursolic acid is a pentacyclic triterpene that belongs to the group of terpenoids and for its variety of pharmacological activities, related to their hepatoprotective effects, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-metastasis, is a subject of great scientific interest. This research aimed to obtain high purity ursolic acid in an easy, fast and economical way from the *Clinopodium revolutum* species known commercially as flor de arena.

The process began with obtaining the extract of the dried leaves, from which ursolic acid was isolated using and the recrystallization technique was used for separation and purification. Finally we performed spectroscopic analyzes of IR and mono and two-dimensional NMR to characterize the molecule. The total content and percentage of purity were determined by the UPLC technique.

Among the most important results of the study, it was determined that this species is the one with the highest amount (4.864%) of ursolic acid among species of the Lamiaceae family. Among the conclusions, it is noted that this medicinal plant known as *Clinopodium revolutum* and marketed under the name of flor de arena or té indio endemic of Peru, grown mainly in the regions of Huánuco and Cajamarca, proved to be an important biofuente of ursolic acid, not only for its high content but also by the easy, economical and reproducible methods with which crystals of pure ursolic acid were obtained by the recrystallization technique.

Índice

	Página
Abreviaturas	i
Índice de figuras	ii
Índice de esquemas	iv
Índice de tablas	iv
1 Problema de investigación	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Justificación de la investigación	2
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivo general	2
1.3.2 Objetivos específicos	2
2 Aspectos teóricos	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Marco teórico	5
2.2.1 <i>Clinopodium revolutum</i>	5
2.2.2 Terpenos	7
2.2.3 Biosíntesis de terpenoides	9
2.2.3.1 Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos	12
2.2.4 Ácido ursólico	14
2.2.4.1 Estructura cristalina del ácido ursólico	15
2.2.4.2 Recristalización de ácido ursólico	17
2.2.4.3 Ácido ursólico en la cutícula	18
2.2.4.4 Conversión de un método HPLC a uno UPLC	20
3 Parte experimental	22
Origen de la muestra	22
Ácido ursólico	23
3.1 Purificación de ácido ursólico	24
3.1.1 Obtención de ácido ursólico primer experimento	24

3.1.2	Obtención de ácido ursólico segundo experimento	26
3.1.3	Obtención de ácido ursólico tercer experimento	27
3.2	Caracterización espectroscópica	29
3.2.1	Caracterización por IR	29
3.2.2	Caracterización por RMN	29
3.3	Transferencia del método HPLC a uno UPLC.....	29
3.4	Cuantificación de ácido ursólico por UPLC	30
4	Resultados y discusión	31
4.1	Conversión del método HPLC a uno UPLC	31
4.2	Cuantificación de ácido ursólico	32
4.3	Purificación de ácido ursólico	36
4.3.1	Primer experimento	36
4.3.2	Segundo experimento	39
4.3.3	Tercer experimento	41
4.4	Caracterización espectroscópica	44
4.4.1	Espectroscopia IR	44
4.4.2	Espectroscopia RMN	45
5	Conclusión.....	67
6	Agradecimientos	67
7	Bibliografía	68
8	Apéndice.....	73

Abreviaturas:

AU	Ácido ursólico
AO	Ácido oleanólico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IR	Infrarrojo
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
RMN C ¹³	Resonancia magnética nuclear de ¹³ carbono
RMN H ¹	Resonancia magnética nuclear de ¹ hidrogeno
TLC	Cromatografía de capa fina
IPP	Isopentenil difosfato
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
MK	Mevalonato quinasa
PKM	Fosfomevalonato quinasa
MPD	Mevalonato difosfato decarboxilasa
EtOH	Etanol
COSY	Espectroscopia de correlación
HSQC	Coherencia cuántica heteronuclear única
HMBC	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares
DEPT	Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización

Índice de figuras:

	Página
<i>Figura 1.</i> Evaluación de triterpenos y fitoesteroles.	5
<i>Figura 2.</i> <i>Clinopodium Revolutum</i> en el Perú por Ruiz y Pav Govaerts.	6
<i>Figura 3.</i> Monoterpenos.	8
<i>Figura 4.</i> Terpenoides.	8
<i>Figura 5.</i> Isopentenil difosfato (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP).	9
<i>Figura 6.</i> Ruta del ácido mevalónico MVA.	10
<i>Figura 7.</i> Ruta del metileritritol fosfato MEP.	11
<i>Figura 8.</i> Biosíntesis de terpenos vía la ruta mevalónica y metileritritol fosfato.	12
<i>Figura 9.</i> Biosíntesis de triterpenos.	13
<i>Figura 10.</i> Número de publicaciones de AU (2009-2015).	14
<i>Figura 11.</i> Ácido ursólico y ácido oleanólico.	15
<i>Figura 12.</i> Celda unitaria de cristales de ácido ursólico (Acta de cristalografía).	16
<i>Figura 13.</i> Fracción molar de solubilidad de UA y AO en varios solventes.	17
<i>Figura 14.</i> Hojas secas de flor de arena vista a través de un microscopio óptico.	23
<i>Figura 15.</i> Cromatogramas HPLC (arriba) y UPLC (abajo).	32
<i>Figura 16.</i> Cromatograma de <i>clinopodium revolutum</i> .	32
<i>Figura 17.</i> Cromatogramas (a) 0,2; (b) 0,4 y (c) 0,6 mg/mL.	33
<i>Figura 18.</i> Curva de calibración.	34
<i>Figura 19.</i> Cristales obtenidos en la última recristalización del primer experimento.	36
<i>Figura 20.</i> Dimensiones de un cristal representativo.	37
<i>Figura 21.</i> Cromatograma de los cristales A pureza 98,7 %.	37
<i>Figura 22.</i> Espectro UV de los cristales A.	38
<i>Figura 23.</i> Cristales obtenidos en la última recristalización del segundo experimento.	39

<i>Figura 24.</i> Cromatograma de los cristales B pureza 97,28 %.	40
<i>Figura 25.</i> Espectro UV de los cristales B.	40
<i>Figura 26.</i> Cristales obtenidos en la última recristalización del tercer experimento.	41
<i>Figura 27.</i> Cromatograma de los cristales C pureza 95,7999 %.	42
<i>Figura 28.</i> Espectro UV de los cristales C.	42
<i>Figura 29.</i> Espectro IR del cristal A.	44
<i>Figura 30.</i> Espectro IR del cristal B.	44
<i>Figura 31.</i> Espectro IR del cristal C.	45
<i>Figura 32.</i> Espectro ¹ H- RMN del cristal A (arriba) ampliación (abajo).	46
<i>Figura 33.</i> Espectro ¹ H- RMN del cristal B (arriba) ampliación (abajo).	47
<i>Figura 34.</i> Espectro ¹ H- RMN del cristal C (arriba) ampliación (abajo).	48
<i>Figura 35.</i> Estructura del ácido ursólico C ₃₀ H ₄₈ O ₃ .	50
<i>Figura 36.</i> Ampliación de las señales del espectro de ¹ H.	51
<i>Figura 37.</i> Espectro ¹³ C- RMN del cristal A (arriba) ampliación (abajo).	52
<i>Figura 38.</i> Espectro ¹³ C- RMN del cristal B (arriba) ampliación (abajo).	53
<i>Figura 39.</i> Espectro ¹³ C- RMN del cristal C (arriba) ampliación (abajo).	54
<i>Figura 40.</i> Espectro DEPT 45 de los cristales A.	56
<i>Figura 41.</i> Espectro DEPT 90 de los cristales A.	57
<i>Figura 42.</i> Espectro DEPT 135 CH ₃ (lila), CH ₂ (naranja) y CH (celeste).	58
<i>Figura 43.</i> Estructura del ácido ursólico.	60
<i>Figura 44.</i> Espectro HSQC de los cristales A.	61
<i>Figura 45.</i> Espectro COSY de los cristales A.	62
<i>Figura 46.</i> Correlación COSY.	62
<i>Figura 47.</i> Espectro HMBC de los cristales A.	63
<i>Figura 48.</i> Correlación HBMC.	64

Índice de esquemas:

	Página
Esquema 1. Etapas de la parte experimental.	22
Esquema 2. Proceso de extracción del primer experimento.	24
Esquema 3. Proceso de recristalización del primer experimento.	25
Esquema 4. Proceso de extracción del segundo experimento.	26
Esquema 5. Proceso de cristalización del segundo experimento.	27
Esquema 6. Proceso de extracción del tercer experimento.	28
Esquema 7. Proceso de cristalización del tercer experimento.	28

Índice de tablas:

	Página
Tabla 1. <i>Clasificación de terpenoides</i>	8
Tabla 2. <i>Parámetros de red del Ácido ursólico</i>	16
Tabla 3. <i>Fracción molar de AO y AU en la mezcla de solventes etanol-agua</i>	18
Tabla 4. <i>Parámetros del método</i>	30
Tabla 5. <i>Condiciones HPLC y UPLC</i>	31
Tabla 6. <i>Resultados de los cromatogramas de los tres niveles inyectados</i>	33
Tabla 7. <i>Área [mAU*s] media y contenido real</i>	34
Tabla 8. <i>Registro de los pesos obtenidos del primer experimento</i>	36
Tabla 9. <i>Resultados del proceso de purificación de AU del primer experimento</i>	38
Tabla 10. <i>Registro de los pesos obtenidos del segundo experimento</i>	39
Tabla 11. <i>Resultados del proceso de purificación de AU del segundo experimento</i>	41
Tabla 12. <i>Registro de los pesos obtenidos del tercer experimento</i>	41
Tabla 13. <i>Resultados del proceso de purificación de AU del tercer experimento</i>	43

Tabla 14.	<i>Integración de las señales de los espectros de ^1H de los cristales</i>	49
Tabla 15.	<i>Señales de los espectros de ^{13}C de los cristales obtenidos</i>	55
Tabla 16.	<i>Desplazamiento de los diferentes tipos de carbonos</i>	59
Tabla 17.	<i>Asignación de las señales de ^{13}C y los ^1H unidos a el</i>	65
Tabla 18.	<i>Señales obtenidas de ^{13}C-RMN (ppm) y referencia</i>	66



1 Problema de investigación

1.1 Descripción del problema

La investigación de productos naturales mantiene el interés de los investigadores principalmente por sus propiedades farmacológicas y, a pesar de ser una fuente importante de compuestos biológicamente activos, solo un pequeño porcentaje de estos ha sido investigado fitoquímicamente. La flor de arena “*Clinopodium revolutum*” es una planta del género *Clinopodium* de la familia Lamiaceae, endémica de la región andina norperuana (Mostacero León y Mejía Coico, 2009) y es comercializada en herboristerías como un producto excelente para el tratamiento del hígado, cálculos vesiculares, eliminación de ácido úrico y problemas del riñón. Muchas de estas propiedades son atribuidas a los metabolitos secundarios conocidos como triterpenos que son los que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas de la familia Lamiaceae. El ácido ursólico (AU) es el principal triterpeno en la flor de arena, esta molécula ha mostrado actividad antioxidante (Kashyap, Tuli y Sharma, 2016), anti-microbial (Mallavadhani, Mahapatra, Jamil y Reddy, 2004), gastroprotectora (Rodríguez, Astudillo y Hirschmann, 2003), anti-inflamatorias y analgésica (Vasconcelos et al., 2014). En los últimos años los estudios se enfocaron mucho en sus propiedades anti-cancerígenas y en la síntesis de sus derivados con la intención de desarrollar nuevos compuestos con potencial actividad anticancerígena (Dar, Lone, Shah y Qurishi, 2016).

El ácido ursólico, $C_{30}H_{48}O_3$, es un compuesto pentacíclico ópticamente activo, con estructura considerablemente complicada con 10 átomos de carbono quirales, debido a estas características el AU no ha podido ser sintetizado aún y solo se ha obtenido por extracción y purificación a partir de productos naturales. El ácido oleanólico (AO) es un isómero estructural muy similar al ácido ursólico y a menudo están presentes simultáneamente en la misma planta como agliconas de saponinas o como ácidos libres (Janicsák, Veres, Zoltán Kakasy y Máthé, 2006). La purificación de AU se ve interferida por su isómero AO debido a la similitud estructural y a sus estrechas propiedades fisicoquímicas que complican la purificación y esto se refleja en el elevado costo del AU.

Para realizar un estudio a escala para la obtención de AU para una producción más barata y accesible, es necesario encontrar un método de separación más económico. En la presente

investigación se plantea obtener ácido ursólico de una manera fácil, rápida y económica mediante la técnica de recristalización selectiva a partir de la especie *Clinopodium revolutum*, conocida comercialmente como flor de arena o té indio; además de transferir un método de análisis de ácido ursólico por HPLC a uno UPLC que nos permita obtener cromatogramas en menor tiempo, con el ahorro no solo de tiempo sino también de solvente.

1.2 Justificación de la investigación

Los metabolitos secundarios presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones farmacológicas como el ácido ursólico y aislar este compuesto es el primer paso para posteriores estudios de sus propiedades bioactivas.

El aislamiento de ácido ursólico de la matriz de flor de arena se realizara de una manera más sencilla sin la necesidad del uso de reactivos tóxicos ni métodos de costo más elevado y además que el método pueda ser escalable, logrando así convertir esta especie vegetal en una importante biofuente de ácido ursólico y de esa manera ampliar el interés en el cultivo de la flor de arena y abrir una venta económica al procesar flor de arena para obtener ácido ursólico y no solo limitarse al cultivo.

Contar con un método UPLC para el análisis de ácido ursólico permitirá ahorrar tiempo y solvente.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Obtener ácido ursólico de alta pureza de una manera fácil, rápida y económica a partir de la especie *clinopodium revolutum* conocida comercialmente como flor de arena.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar el ácido ursólico por recristalización selectiva.
- Determinar el grado de pureza de ácido ursólico.

- Cuantificar el contenido de ácido ursólico presente en el material seco de flor de arena.
- Determinar el porcentaje de rendimiento y recuperación de ácido ursólico obtenido.
- Realizar la caracterización espectroscópica (IR, UV y RMN) del ácido ursólico obtenido.
- Realizar los análisis cromatograficos bajo las condiciones UPLC.
- Publicar la investigación en una revista indexada.

2 Aspectos teóricos

2.1 Antecedentes

Nuestro proyecto se basa en investigaciones que se han venido realizando concernientes al estudio del ácido ursólico, este metabolito es de especial interés por sus propiedades bioactivas. En el reporte de Kashyap et al. (2016) se describe el potencial que tiene el ácido ursólico como metabolito terapéutico intracelular y extracelular que juegan un papel en la apoptosis, la metástasis, la angiogénesis y los procesos inflamatorios, sus derivados también han presentado propiedades bioactivas interesantes. Las evidencias sugieren que el AU es un candidato potencial para desarrollar una estrategia integral competente hacia el tratamiento y prevención de trastornos de la salud. Durante los últimos cinco años se han publicado más de 900 artículos de investigación, esto incluye el aislamiento y purificación de este triterpeno en diversas plantas y hierbas. En el trabajo realizado por Janicsák, Veres, Kakasy y Máthé (2006), se investigó el contenido de ácido ursólico y también el de su isómero estructural el ácido oleanólico, en 88 taxas de Lamiaceae (19 géneros, 66 especies, 8 subespecies, 9 variedades) mediante el uso de la cromatografía de gases. Ambos triterpenos fueron encontrados en todas las taxas investigadas, pero las plantas que pertenecen a la subfamilia Nepetoideae producen significativamente mayor cantidad de estos compuestos que en los de la subfamilia Lamioideae. Por lo que se espera que la flor de arena una Lamiaceae de la subfamilia Nepetoideae presente ácido ursólico y en una cantidad considerable para ser aislado y purificado.

Un tercer trabajo consistió en la separación de los ácidos ursólico y oleanólico, publicado por Mučaji y Nagy (2011), el objetivo del estudio fue desarrollar un método de separación

rápido, efectivo y reproducible, de una mezcla natural de ácido ursólico y oleanólico por TLC. Debido a la similitud de la estructura química, fue necesaria una derivatización *in situ* con yodo para separar estos triterpenos ácidos. La separación fue lograda sobre placas de sílica gel. Después de la derivatización la placa cromatográfica fue desarrollada con una fase móvil constituida por éter de petróleo, acetato de etilo y acetona revelado por aspersion de ácido sulfúrico en dietileter y calentado a 120 °C por cinco minutos, este método cromatográfico usado es capaz de diferenciar ácido ursólico y oleanólico en todas sus proporciones. Con este método se monitoreará la extracción y purificación de AU.

La superficie de las partes aéreas (flores, hojas, frutos y tallos) de las plantas son cubiertas con una capa hidrofóbica llamada cutícula, los ácidos triterpénicos representan uno de los metabolitos más importantes que se encuentran en esta cutícula. El ácido ursólico (ácido 3- β -hidroxi-urs-12-en-28-ico) y su isómero el ácido oleanólico (ácido 3- β -hidroxi-olea-12-en-28-ico) son solo algunos ejemplos de triterpenos que se han podido extraer de la cutícula. El ácido oleanólico es secretado en la superficie de las hojas del olivo y juega un papel importante en la defensa contra el ataque de hongos (Kubo y Matsumoto, 1984), la cáscara de manzana también secreta triterpenos que fueron estudiados en 1920, siendo el ácido ursólico uno de los primeros metabolitos reportados (Belding, Blankenship, Young y Leidy, 1998) y desde entonces se han intentado varios métodos de extracción a partir de la cáscara de manzana, incluyendo la extracción con acetato de etilo (con una extracción de ácido ursólico del 0,15 % de peso fresco de la cáscara de manzana roja delicia (He y Liu, 2007)), extracción de la cáscara seca con cloroformo (con una extracción de ácido ursólico del 0,7 % de peso seco de la cáscara de manzana (Yamaguchi et al., 2008)). Esta técnica de extracción de la superficie será también aplicada a las hojas de flor de arena.

Un trabajo destacado realizado por Martelanc, Naumoska y Vovk (2016) reporta la determinación de triterpenos y fitoesteroles en la cera cuticular por HPTLC en vegetales como la espinaca, lechuga, pimiento rojo, tomate, acelga y varias especies de repollo y en todas encontraron triterpenos como el lupeol, ácido ursólico, ácido oleanólico, amirina, etc. Estos resultados demuestran que la cera cuticular de algunas plantas y frutos son fuentes de triterpenos y cabe resaltar que la extracción de esta cera cuticular se realiza de manera rápida, en este caso fue por inmersión de la planta en cloroformo por un minuto (*Figura 1*).

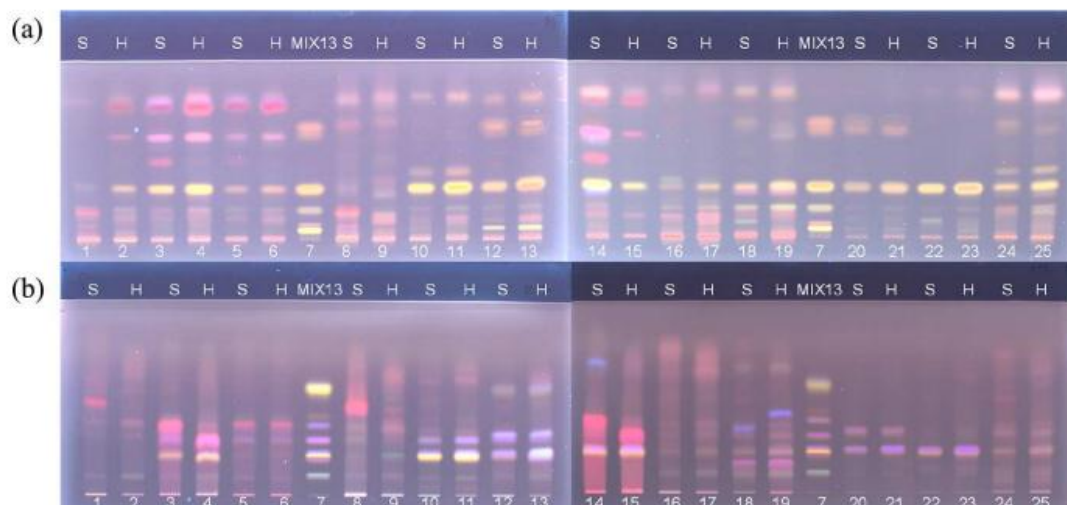


Figura 1. Evaluación de triterpenos y fitoesteroles (Martelanc et al., 2016).

El método analítico usado por Srivastava, Kasoju, Bora y Chaturvedi (2011) en el análisis de ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido betulínico fue ejecutado por HPLC en una columna BDS RP-C₁₈ con dimensiones de 250 × 4,6 mm y un diámetro de partícula de 5 µm, el método es isocrático con una fase móvil de agua : acetonitrilo (20:80) con un flujo de 1 mL/min, la muestra eluida se detecta a 210 nm.

2.2 Marco teórico

2.2.1 *Clinopodium revolutum*

Clinopodium revolutum conocida también como Flor de arena (Figura 2) es ampliamente utilizada en el campo de la farmacognosia por sus diferentes propiedades medicinales, así los pobladores quienes conocen de sus propiedades curativas, la consumen comúnmente en infusiones. Esta especie de *Clinopodium* crece por encima de los 3500 msnm, pudiéndola encontrar en toda la serranía del Perú; hasta el momento se ha encontrado, según lo reportado, en Cajamarca y Huánuco (Ministerio de Agricultura, 2012).

El Ministerio de Agricultura reportó la comercialización de unos 1370 kilos por la ciudad de Huánuco y también por el departamento de Cajamarca (Perú Forestal en números año 2013).

La flor de arena pertenece a la familia Lamiaceae, sub-familia Nepetoideae, género Clinopodium, especie *Clinopodium revolutum* (Ulloa, Zarucchi y León, 2004). Fue descubierta en el Perú por Ruiz y Pav Govaerts en el 2004 en el sector denominado Baños-Cajamarca y catalogada en el National Herbarium of the United States; así mismo esta especie de *clinopodium* fue incluida en la revista “Diez años de adiciones a la flora del Perú” en el mismo año.



Figura 2. Clinopodium Revolutum.

2.2.2 Terpenos

Hay muchas clases diferentes de compuestos de origen natural, los terpenos son un grupo de dichos compuestos que se producen en las plantas, aunque algunas veces también se han aislado de otras fuentes. Los monoterpenos son sustancias volátiles que brindan a las plantas y flores su fragancia, se producen ampliamente en las hojas y frutos de las plantas superiores como los cítricos y eucalipto. Los diterpenos y triterpenos son sólidos con propiedades bioactivas y los tetraterpenos forman un grupo separado de compuestos llamados carotenos.

De manera general los terpenos obedecen a lo que se conoce como regla del isopreno, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que puede localizarse varias unidades consecutivas de isopreno. Sin embargo, esto no siempre es cierto porque el número de átomos de carbono puede no ser un múltiplo de cinco, pues son frecuentes las reacciones de degradación, o bien suceden rearrreglos esqueléticos que conducen a secuencias anormales de la unidad de isoprenos. El descubrimiento de un gran número de compuestos que presentan diferentes grupos funcionales ha generado el uso del término "terpenoide" para designarlos en lugar de "terpeno" cuya terminación (-eno) denota más bien a hidrocarburos (Deanna y Masahia, 2002).

Muchos terpenoides naturales tienen la fórmula general $(C_5H_8)_n$. Ellos pueden ser clasificados en base al valor de "n" o al número de átomos de carbono presente en la estructura, Tabla 1. Cada clase puede ser además subdividida dentro de subclases acorde al número de anillos presente en la estructura.

- Terpenoides acíclicos: tiene una estructura abierta.
- Terpenoides monocíclicos: contiene un anillo en la estructura.
- Terpenoides bicíclicos: contiene dos anillos en la estructura.
- Terpenoides tricíclicos: contiene tres anillos en la estructura.
- Terpenoides tetracíclicos: contiene cuatro anillos en la estructura.

Algunos ejemplos de terpenoides y sus principales fuentes de materia prima se muestran en las *Figuras 3 y 4*.

Tabla1. Clasificación de terpenoides

Número de átomos de carbono	Valor de n	Clase
10	2	Monoterpenoides (C ₅ H ₈) ₂
15	3	Sequiterpenoides (C ₅ H ₈) ₃
20	4	Diterpenoides (C ₅ H ₈) ₄
25	5	Sesterpenoides (C ₅ H ₈) ₅
30	6	Triterpenoides (C ₅ H ₈) ₆
40	8	Tetraterpenoides (C ₅ H ₈) ₈
> 40	>8	Politerpenoides (C ₅ H ₈) _n



Figura 3. Monoterpenos a) Mentol b) Limoneno c) Mirceno (Elaboración propia).

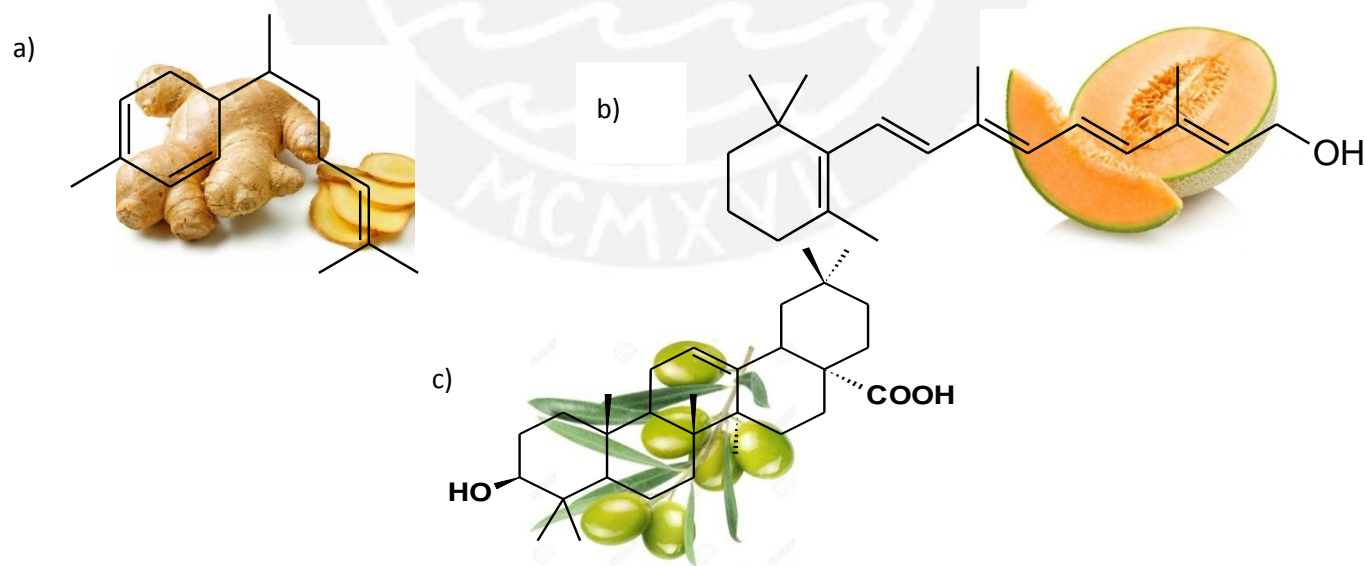


Figura 4. Terpenoides a) Sesquiterpenoide-Zingibereno b) Diterpenoide-Vitamina A c) Triterpenoide-Acido Oleanólico (Elaboración propia).

Propiedades generales de los terpenoides.

1. Muchos de los terpenoides son incoloros, líquidos fragantes que son más ligeros que el agua y muchos otros son sólidos, como el ácido oleanólico, lupeol o el ácido ursólico. Todos son solubles en solventes orgánicos y usualmente insolubles en agua. Muchos de ellos son ópticamente activos.
2. Son compuestos acíclicos o cíclicos insaturados con uno o más dobles enlaces. Sufren generalmente reacciones de adición con hidrogeno, halógeno, ácidos, etc.
3. Sufren polimerización y deshidrogenación.
4. Se oxidan fácilmente casi por todos los agentes oxidantes. En la descomposición térmica la mayor parte de los terpenos producen isoprenos como uno de los productos.

2.2.3 Biosíntesis de terpenoides

Es inmensa la diversidad en estructura y propiedades químicas de los terpenos que se encuentran en plantas y frutas. Cada año se reportan nuevos terpenoides, sus aplicaciones se distribuyen en áreas como colorantes, perfumería, colas, ceras, polímeros, agroquímicos, fármacos, etc. Los precursores de esta gran familia de terpenoides son los compuestos isopentenil difosfato (IPP) y el difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Figura 5).

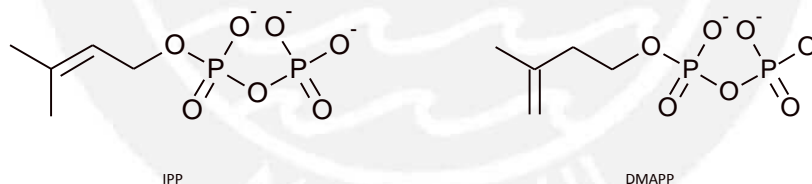


Figura 5. Isopentenil difosfato (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP).

Los compuestos IPP y DMAPP son biosintetizados por la ruta del ácido mevalónico o mevalonato la cual se inicia con la acetil-CoA e involucra a una serie de enzimas como la acetil-CoA acetil transferasa que condensa a la acetil-CoA para formar el acetoacetil-CoA que es el paso que da inicio a la biosíntesis de los terpenoides. La biosíntesis de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por condensación de acetil-CoA con acetoacetil-CoA fue demostrado usando la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS), la conversión de HMG-CoA carboxilo a un alcohol representa una reacción de dos pasos, primero se

produce el mevaldil-CoA, el colapso del tiohemiacetal libera HSCo-A y forma el mevaldehído. El segundo paso consiste en formar el mevalonato, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) es la enzima que interviene en este proceso de reducción, el mevalonato quinasa (MK) cataliza la transferencia de ATP δ -fosforil al oxígeno de hidróxido del C5 del ácido mevalónico, que resulta en la formación del mevalonato-5-fosfato y ADP, el fosfomevalonato quinasa (PKM) cataliza la reacción reversible del mevalonato-5-fosfato y ATP para formar el mevalonato-5-difosfato y ADP. El mevalonato difosfato decarboxilasa (MDD o MPD) cataliza la descarboxilación dependiente del ATP del mevalonato-5-difosfato para formar el isopentenil-5-difosfato (Figura 6) (Miziorko et al., 2011).

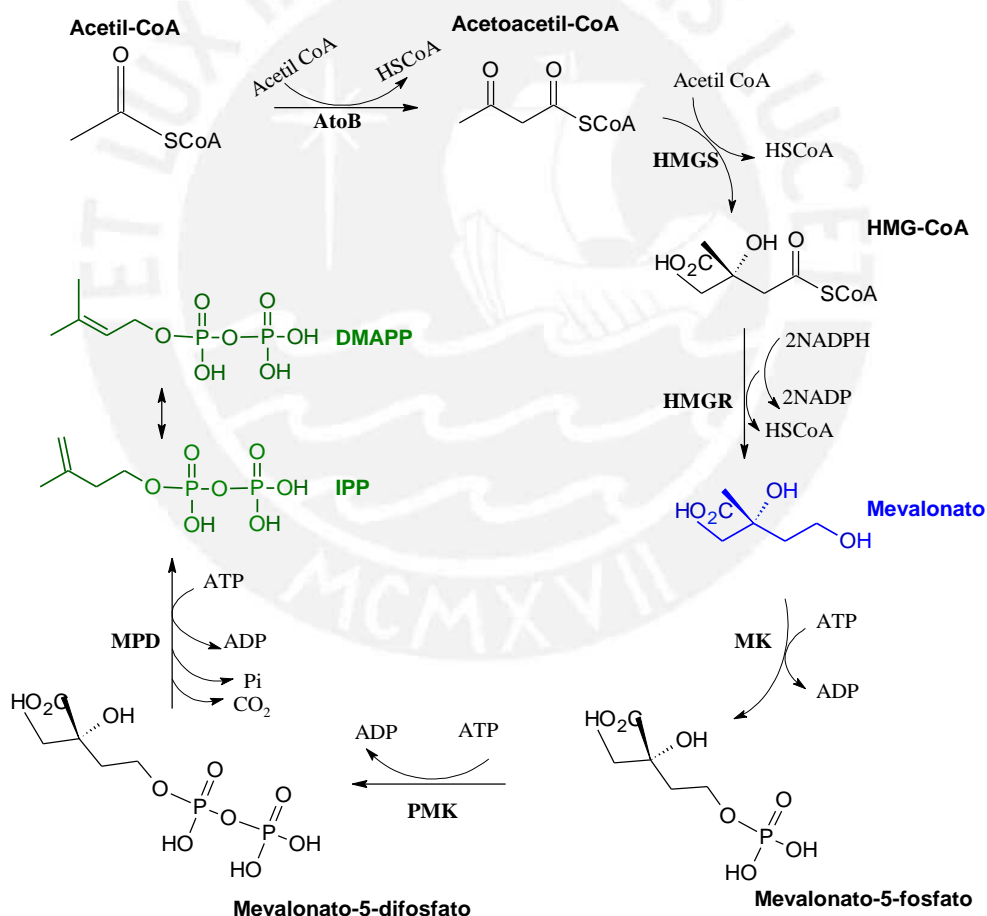


Figura 6. Ruta del ácido mevalónico MVA (adaptada de Goto et al. (2010)).

Ahora se conoce que la ruta del mevalonato no es la única, después de los estudios de marcación isotópica realizados por Rohmer, Knani, Simonin, Sutter y Sahm (1993), se verificó la existencia de una vía alternativa y no fue hasta el 2002 que se pudo elucidar esta ruta metabólica por Rohdich et al. (2002). Este camino alternativo ha sido llamado la ruta del Metileritritol fosfato (MEP) e inicia con el ácido pirúvico y el D-gliceraldehido-3-fosfato (*Figura 7*) donde la enzima 1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato sintasa (Dxs) cataliza la reacción para formar la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato y luego es convertido en 2-C-metil-eritritol-4-fosfato, el primer intermediario de la ruta MEP catalizada por la 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato sintasa (ispC). En los siguientes pasos también intervienen una serie de enzimas; 4-difosfocitidil-2-C-metil-d-eritritol sintasa (IspD), 4-difosfocitidil-2-C-metil-d-eritritol kinasa (IspE), 2-C-metil-d-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (IspF), 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa (IspG), 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato reductasa (IspH) hasta llegar a obtener los precursores de los terpenoides IPP y DMAPP, (*Figura 7*) (Rohdich et al., 2002).

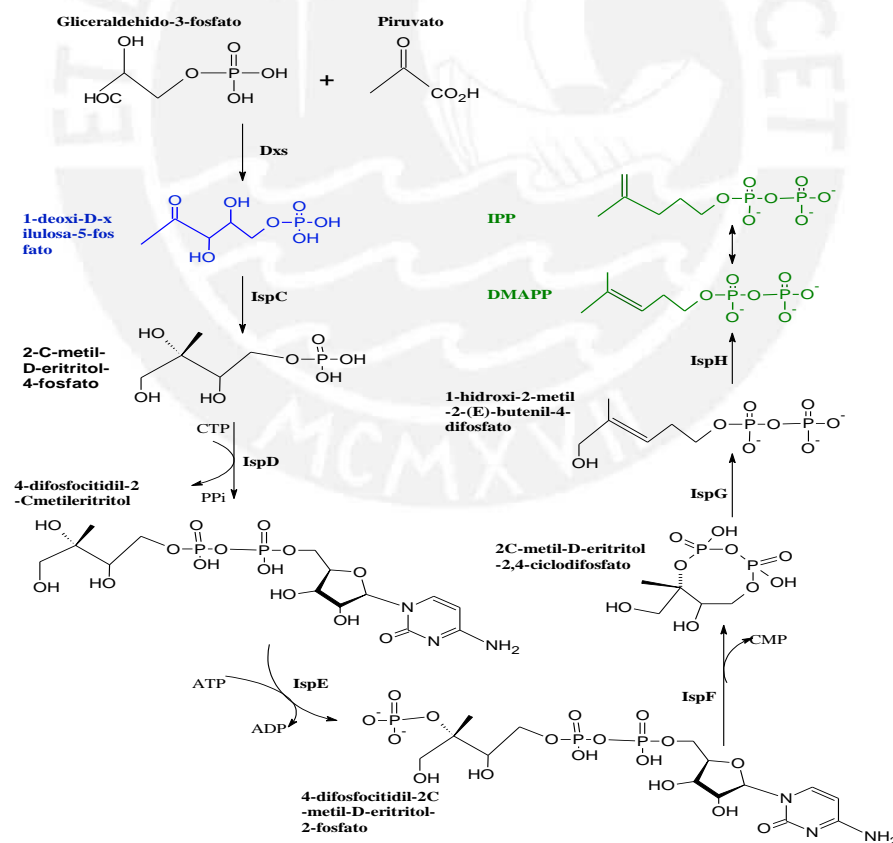


Figura 7. Ruta del Metileritritol fosfato MEP (adaptada de Goto et al. (2010)).

Independiente de la ruta metabólica se llega a forma los precursores isopentenil difosfato IPP y el difosfato de dimetilalilo DMAPP para dar inicio a la formación de la gran familia de terpenoides, las elongaciones de las cadenas son construidas por unidades de isoprenos, por la adición del alilo difosfato DMAPP al doble enlace del isopentenil difosfato IPP, la ciclación de estos compuestos da lugar a una serie de terpenos (*Figura 8*).

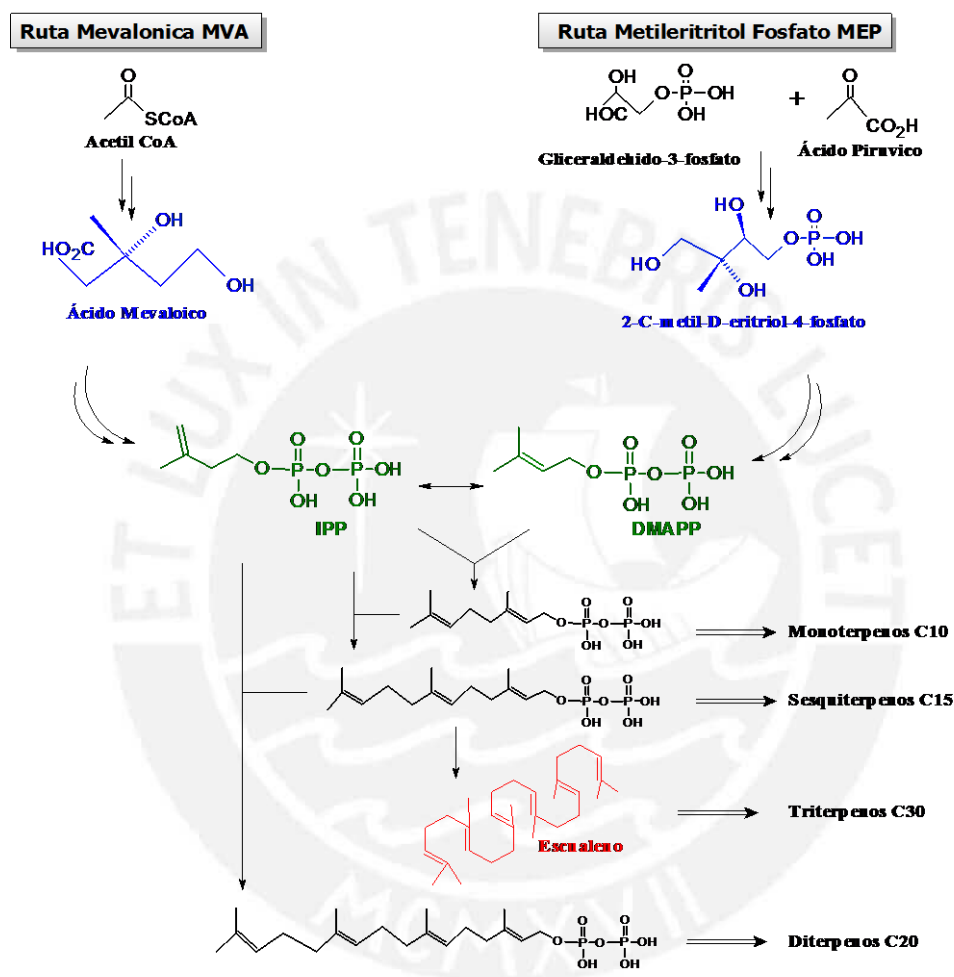


Figura 8. Biosíntesis de terpenos vía la ruta Mevalónica MVA y Metileritritol fosfato MEP (adaptada de Goto et al. (2010)).

2.2.3.1 Biosíntesis de triterpenoides pentacíclicos

La ciclación del escualeno da lugar a triterpenos o esteroides, es una de las reacciones enzimáticas más complejas. En la biosíntesis de esteroides el escualeno es ciclado a lanosterol (en animales) o cicloartenol (en plantas) vía la conformación silla-bote-silla

mientras que para la formación de triterpenos opta la vía conformacional silla-silla-silla dando lugar a una gran diversidad de esqueletos triterpénicos (Thimmappa, Geisler, Louveau, Maille y Osbourn, 2014). En la *Figura 9* se muestra esta reacción y las enzimas que participan en el proceso de la biosíntesis de triterpenoides.

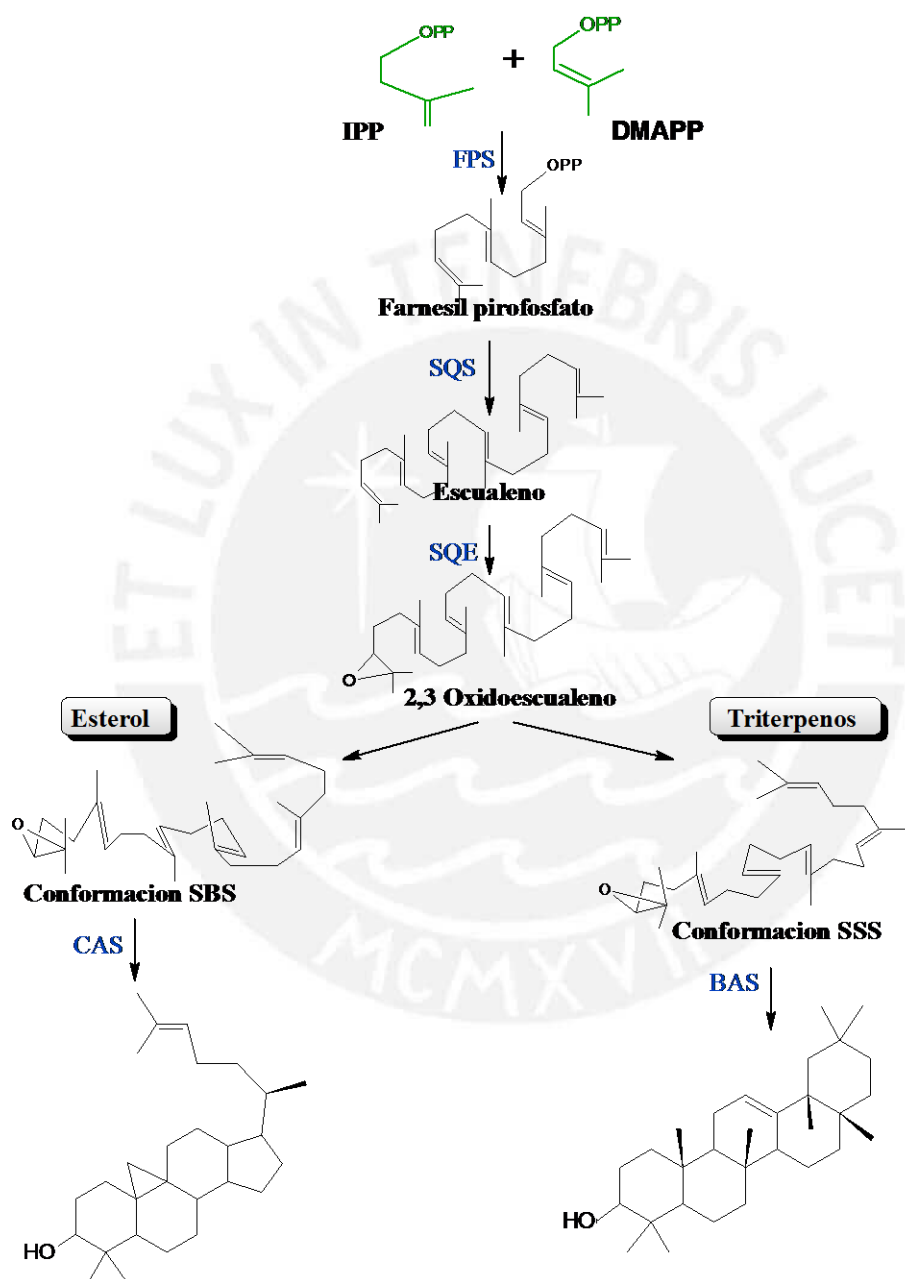


Figura 9. Biosíntesis de triterpenos (adaptada de Thimmappa et al. (2014)).

2.2.4 Ácido ursólico

El ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-ico) es un triterpeno pentacíclico que no ha podido ser sintetizado debido a su complicada estructura que incluye 10 carbonos quirales con fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃, peso molecular de 456,7 g/mol e insoluble en agua pero soluble en ácido acético, etanol caliente y dimetilsulfoxido (DMSO). Es ampliamente distribuido en muchas especies de plantas y de mucho interés por sus propiedades bioactivas. En los últimos años el número de publicaciones relacionadas con el AU ha incrementado (*Figura 10*) y el interés se ha enfocado sobre todo en sus propiedades anticancerígenas y en la síntesis de derivados con potente actividad anti-cancerígena (Oprean et al., 2016).

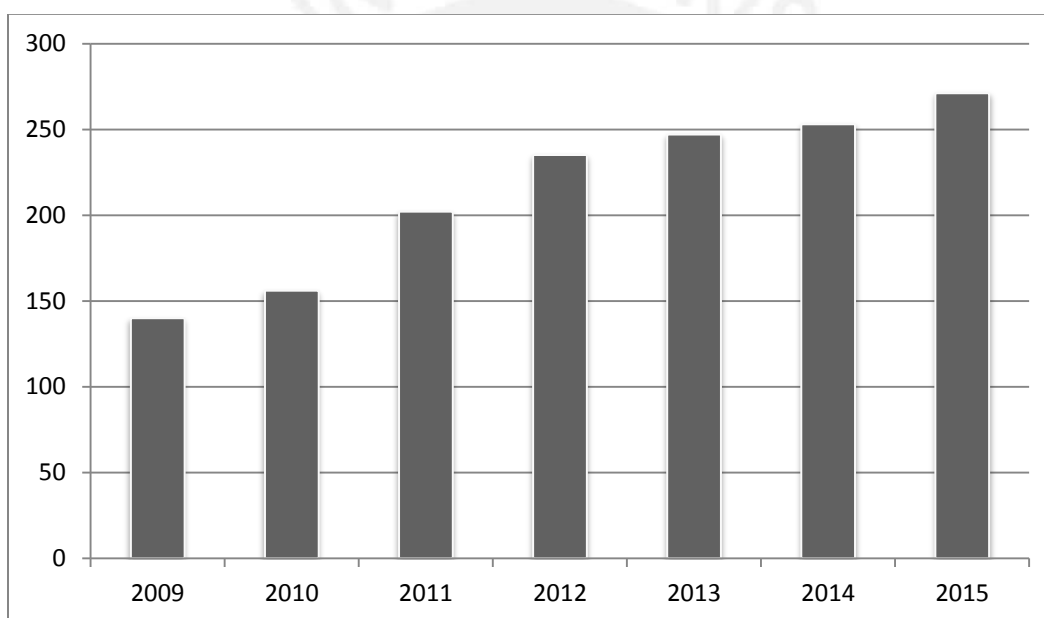


Figura 10. Número de publicaciones de AU (2009-2015), fuente: [Web of Science \(http://apps.webofknowledge.com\)](http://apps.webofknowledge.com) palabra clave “ursolic”.

La purificación de ácido ursólico es conocida por ser complicada por el hecho que esta se encuentra siempre acompañada de su isómero el ácido oleanólico, debido a la similitud estructural (*Figura 11*) y las estrechas propiedades fisicoquímicas de ambos isómeros las técnicas preparativas como de columna cromatográfica de silica gel no han tenido buenos resultados a la hora de resolver estos compuestos. Se han sido descritos varios métodos analíticos para el análisis de estos isómeros: HPLC (Zacchigna et al., 2009), GC-MS

(Radoslaw Kowalski, 2007), electroforesis capilar (Yang, Li, Liu y Jiang, 2007), cromatografía contra corriente (Frighetto, Welendorf, Nigro, Frighetto y Siani, 2008).

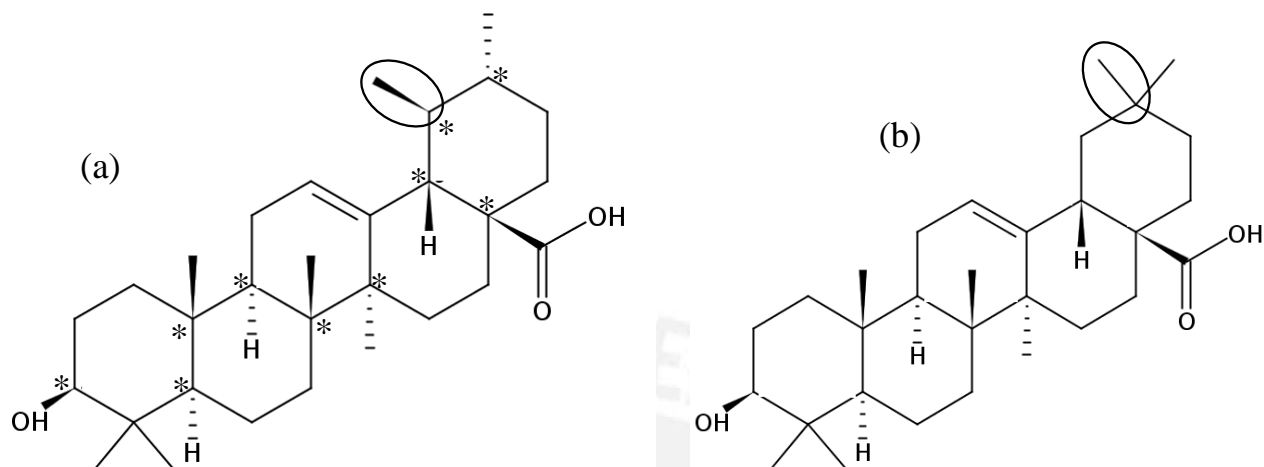


Figura 11. Estructura de ácido ursólico AU (a) y ácido oleanólico AO (b).

Fuentes alternativas de materias primas con matrices menos complejas y con la menor diferencia de concentraciones de estos dos isómeros AU y AO que faciliten la purificación de AU se han publicado en trabajos como el de Radoslaw (2007), que busca fuentes alternativas de ácido ursólico y oleanólico en 4 especies de plantas diferentes.

2.2.4.1 Estructura cristalina del ácido ursólico

En un primer estudio realizado por Simon et al. (1992), como parte de un programa para establecer la correlación de la actividad biológica y la estructura molecular, se determinó la estructura del ácido ursólico para establecer su conformación y configuración absoluta. El resultado de la difracción de rayos x de los cristales de ácido ursólico obtenidos de una solución de etanol, se muestra en la Tabla 2. Los datos de la posición de Wyckoff se muestran en el Apéndice y la celda unitaria se muestra en la Figura 12.

Tabla 2. Parámetros de red del Ácido ursólico (Simon et al., 1992)

Grupo espacial $P 2_12_12_1$ (19)		Simetría Ortorrómbica	
	a (Å)	b (Å)	c (Å)
Parámetros de celda	7,199	12,157	33,888
Posición de Wyckoff	X	y	z

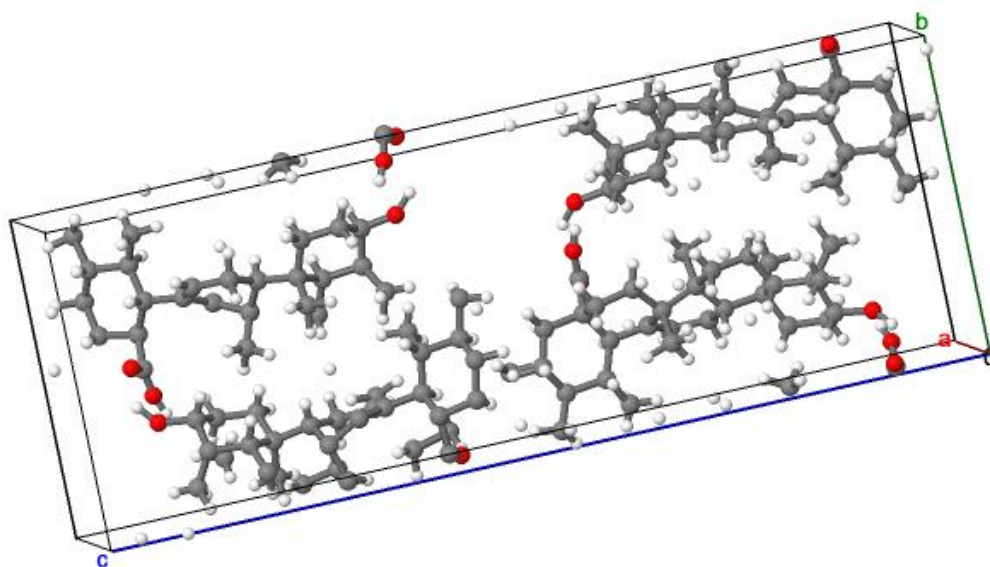


Figura 12. Celda unitaria de cristales de ácido ursólico $Z=4$ (Acta de cristalografía).

El trabajo publicado recientemente por Zhou et al. (2015) en el cual estudia la caracterización del estado sólido de los cristales de ácido ursólico obtenidos de diferentes solventes (etanol, isopropanol y propanol), muestra que el ácido ursólico presenta polimorfismo lo que debe ser tomado en consideración en su producción ya que puede afectar la actividad biológica, alterar la biodisponibilidad oral así como también las propiedades fisicoquímicas como la densidad, punto de fusión, velocidad de disolución, higroscopicidad, etc.

2.2.4.2 Recristalización de ácido ursólico

La purificación de un sólido por recristalización se basa en la diferencia de solubilidad en un solvente dado o en una mezcla de solventes. En el caso más simple, el proceso de recristalización consiste en: (i) disolver la sustancia impura en algún solvente recomendado cerca de su punto de ebullición (ii) filtrar la solución caliente para eliminar material insoluble y polvo (iii) enfriar la solución, esto permite la cristalización de la sustancia (iv) separar los cristales formados del licor madre (Vogel y Jeffery, 1989), de este modo se consigue el enriquecimiento o el agotamiento de las sustancias en la mezcla y la purificación es posible.

Para obtener un alto rendimiento y una separación efectiva es necesario usar el solvente de recristalización adecuado, lo que implica el conocimiento de la solubilidad del ácido ursólico y oleanólico en varios solventes. Fan et al. (2011) realizó este trabajo en cuatro solventes metanol, etanol, 2-propanol y acetato de etilo en el rango de temperatura de 283,2 a 329,7 K (Figura 13) y concluyó que la solubilidad de AO y AU es diferente, La solubilidad del AU en estos solventes se da en el siguiente orden 2-propanol > acetato de etilo > metanol > etanol y la solubilidad de AO se da en el siguiente orden acetato de etilo > 2-propanol~etanol > metanol.

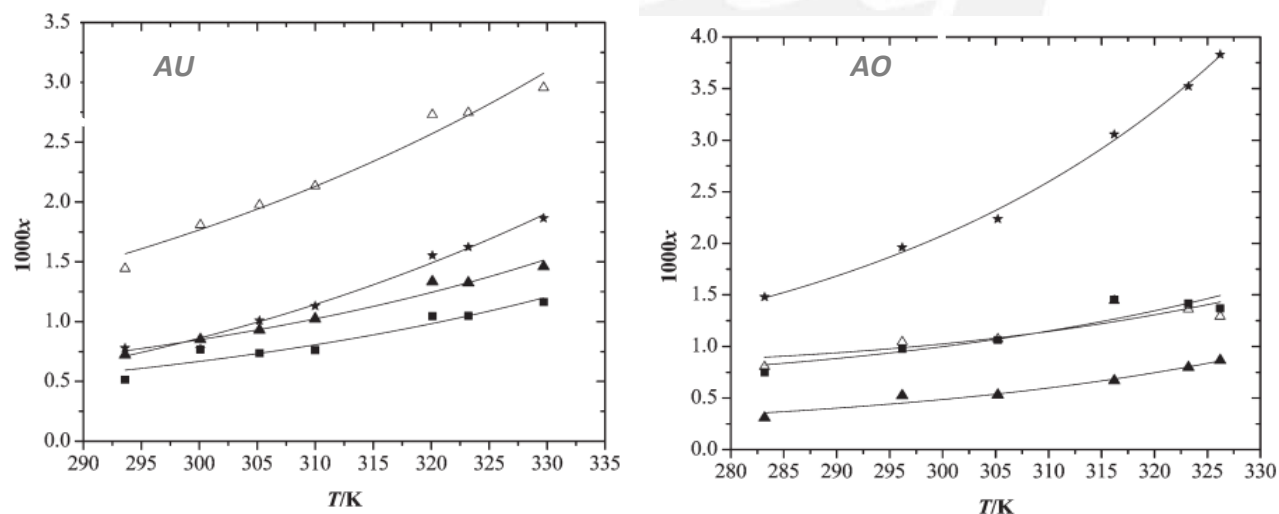


Figura 13. Fracción molar de solubilidad (x) de AU(izquierda) y AO (derecha) en varios solventes a diferentes temperaturas (T): Δ ,2-propanol; ★, acetato de etilo; ▲, metanol; ■, etanol.(Fan et al., 2011)

Si un compuesto resulta ser soluble en un solvente e insoluble en otro que no permita la elección de un adecuado solvente de recristalización, se puede usar una mezcla de solventes y conseguir una mejor separación que al usar solventes puros. Ambos el AO y el AU son insolubles en agua y solubles en etanol lo que permitiría usar una mezcla de estos solventes para obtener un solvente adecuado de recristalización. Fan et al. (2012) también realizó este trabajo y determino la solubilidad de AO y AU en una mezcla de etanol-agua a diferentes concentraciones y a diferentes temperaturas como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Solubilidad de la fracción molar de AO y AU en la mezcla de solventes etanol-agua en el rango de temperaturas de 292,2 a 328,2 K (Fan et al., 2012)

Temperatura k	$\Phi = 0,0331$	$\Phi = 0,2355$	$\Phi = 0,4182$	$\Phi = 0,7349$
	$AO \times 10^3$			
292,2	0,001147 \pm 0,000094	0,003674 \pm 0,000338	0,03268 \pm 0,00173	0,2728 \pm 0,0134
298,2	0,004716 \pm 0,000377	0,005813 \pm 0,000506	0,03789 \pm 0,00153	0,2828 \pm 0,0148
308,2	0,002667 \pm 0,000229	0,003409 \pm 0,000273	0,04371 \pm 0,00262	0,3542 \pm 0,0181
318,2	0,01303 \pm 0,00117	0,02074 \pm 0,00169	0,1407 \pm 0,0084	0,5728 \pm 0,0308
328,2	0,03600 \pm 0,00207	0,06921 \pm 0,00269	0,1419 \pm 0,0056	0,7779 \pm 0,0436
	$AU \times 10^3$			
292,2	0,001635 \pm 0,000137	0,001004 \pm 0,000082	0,02501 \pm 0,00225	0,1658 \pm 0,0081
298,2	0,001709 \pm 0,000164	0,003719 \pm 0,000335	0,02894 \pm 0,00232	0,1943 \pm 0,0045
308,2	0,003827 \pm 0,000325	0,003831 \pm 0,000161	0,04080 \pm 0,00140	0,2182 \pm 0,0109
318,2	0,003973 \pm 0,000318	0,005467 \pm 0,000443	0,06504 \pm 0,00517	0,3849 \pm 0,0285
328,2	0,004617 \pm 0,000420	0,01355 \pm 0,00115	0,09932 \pm 0,00226	0,4471 \pm 0,0246

Φ es la fracción molar de etanol en la mezcla de solventes

2.2.4.3 Ácido ursólico en la cutícula

Las plantas deben hacer frente a condiciones adversas que incluyen alta dosis de luz ultravioleta, prolongada exposición a una atmosfera seca, peligrosas concentraciones de contaminantes transmitidas por el aire y ataques por patógenos y herbívoros. Este estrés abiótico y biótico inicialmente afecta la superficie de la planta y por lo tanto debe ser contrarrestado de manera efectiva por mecanismos protectores localizados en la piel exterior, esta función protectora es ejecutada por un recubrimiento lipídico llamado cutícula.

La cutícula ésta formada por estructuras lipofílicas depositadas sobre el lado exterior de las paredes celulares epidérmicas. Dos componentes mayores de la cutícula son típicamente distinguibles en base a su solubilidad en solventes orgánicos: los compuestos lipofílicos liberados por extracción con solventes que son designados colectivamente como cera cuticular, mientras el segundo componente lipofílico, que no puede ser extraído debido a su

estructura polimérica, es llamado cutina. La cutina es un poliéster de ácidos grasos hidroxilados de 16 y 18 carbonos aunque los ácidos dicarboxílicos pueden también ser los compuestos mayoritarios. Por otro lado los componentes de la cera cuticular son una mezcla compleja de docenas de compuestos con diversas cadenas de hidrocarburos o anillos. Los compuestos presentes más frecuentes son los alifáticos saturados, cadenas hidrocarbonadas no ramificadas que contienen al menos 20 carbonos. Estos compuestos de cadena muy larga son biosintetizados por elongación de ácidos grasos de cadena de más de 18 carbonos y además son modificados en los correspondientes alcanos, aldehídos y cetonas, alcoholes primarios y secundarios, así como los ésteres formados mediante la combinación de ácidos grasos y alcoholes. Un segundo grupo de compuestos que se acumulan en la cera cuticular de muchas especies de plantas son los triterpenoides pentacíclicos, estos constituyentes alicíclicos también tienen en gran parte estructuras alifáticas saturadas, pero contienen anillos de hidrocarburos condensados en lugar de cadenas. Sobre la base de la evidencia microscópica se ha reconocido que la cera cuticular es dispersada a través de toda la profundidad de la cutícula, con algo de cera incrustado en la matriz del polímero de la cutina y algo de esto depositado sobre el exterior de la superficie del polímero. La primera ha sido designada como cera intracuticular mientras la última es la cera epicutícula (Buschhaus y Jetter, 2011).

Se reportó que los triterpenoides son localizados casi exclusivamente en la cera intracuticular (Jetter y Schäffer, 2001), estos compuestos tetra o pentacíclicos son distinguidos por su amplia diversidad estructural, sin embargo ellos son encontrados en las plantas no solo de forma libre sino también como ésteres y glucósidos conjugados llamados saponinas. Todas las formas de triterpenos se encuentran ampliamente distribuidas en plantas comestibles y medicinales y consecuentemente son una parte integral de la dieta humana. Se ha podido extraer triterpenos como el ácido ursólico de la superficie de la manzana, ácido oleanólico de la superficie de las hojas del olivo, ácido oleanólico y aldehído oleanólico de la superficie de la uva, lupeol y germanicol de la superficie del tomate y una gran serie de otros triterpenos han sido identificados (Szakiel, Pączkowski, Pensec y Bertsch, 2012).

2.2.4.4 Conversión de un método HPLC a uno UPLC

El UPLC se caracteriza por el uso de condiciones cromatográficas que emplean partículas de empaque más pequeñas e instrumentos con capacidad de operar a una alta presión y con mayor velocidad linear que los típicos equipos de HPLC. Las columnas UPLC son de longitud y diámetro más pequeños que las columnas HPLC convencionales. Transferir un método cromatográfico HPLC a uno UPLC se puede realizar vía los siguientes pasos: (i) seleccionar una columna UPLC con la misma química para mantener la selectividad (ii) medir el volumen de permanencia del instrumento (iii) calcular el volumen de inyección, la velocidad de flujo, el tiempo de permanencia, la gradiente para el UPLC (iv) Correr un experimento para verificar las condiciones (Xu, 2013).

Selección de una columna UPLC con la misma química

Para convertir el método HPLC a UPLC, uno debe contactar primero con los vendedores de columnas HPLC, ellos pueden proveer columnas UPLC con la misma química, los mayores proveedores son Waters y Agilent Technologies. Si la columna UPLC con la misma química no está disponible entonces pueden evaluarse columnas con química similar de otros vendedores, algunas herramientas que pueden ayudar a seleccionar columnas con la misma química se pueden encontrar en la página web de Waters <http://www.waters.com>. Una vez que se ha seleccionado la columna con la misma química o similar, se procede a la elección de las dimensiones tales como longitud y diámetro. Generalmente las columnas de UPLC son de una longitud de 150 a 50 mm y de 2,1 mm de diámetro, la elección de la longitud de la columna se realiza en función de la complejidad de la separación (Xu, 2013).

Calculo del volumen de inyección y velocidad de flujo

Volumen de inyección

El volumen de inyección debe de ser proporcional a las dimensiones de la columna UPLC para mantener la resolución y la selectividad, se determina de la siguiente manera:

$$V \text{ de inyección UPLC} = V \text{ inyección HPLC} \times \frac{V \text{ de la columna UPLC}}{V \text{ de la columna HPLC}} \quad (1)$$

$$\text{Volumen de la columna} = \pi \cdot l \cdot \varepsilon \frac{d^2}{4} \quad (2)$$

Dónde:

d: Es el diámetro de la columna

l: Es la longitud de la columna

ε : Es la porosidad del material de empaque (Xu, 2013).

Velocidad de flujo

La velocidad del flujo del UPLC debe ser ajustado acorde al diámetro de la columna (d) y la velocidad linear óptima (μ_{opt}) como se expresa en la ecuación 3:

$$\text{Velocidad e flujo} \frac{\text{mL}}{\text{min}} = 60 \cdot \mu_{opt} \cdot \frac{d^2}{4} \quad (3)$$

Y la velocidad linear óptima depende del tamaño de partícula (d_p) y el coeficiente de difusión en la fase móvil del compuesto a ser separado (D_m) la relación es mostrada en la siguiente ecuación (Xu, 2013).

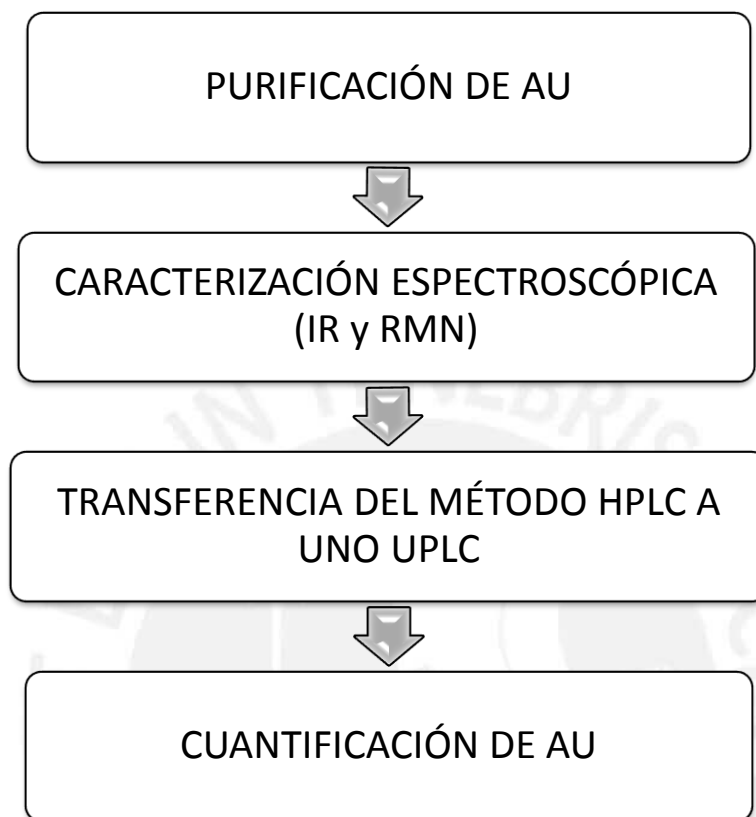
$$\mu_{opt} = 3 \cdot \frac{D_m}{d_p} \quad (4)$$

Hoja de cálculo de columnas UPLC

Las condiciones de UPLC pueden ser obtenidas utilizando hojas de cálculo disponibles en la web por ejemplo la hoja de cálculo de columnas THERMO SCIENTIFIC <http://www.separatedbyexperience.com>, lo que se debe hacer es alimentar los datos de la columna y las condiciones del método HPLC, este realiza los cálculos para pasarlas a unas condiciones de una columna UPLC.

3 Parte experimental

La parte experimental se basa en las cuatro etapas que se muestran en el esquema 1:



Esquema 1. Etapas de la parte experimental.

Origen de la muestra

La *Clinopodium revolutum* con la cual se trabajó se colectó en el departamento de Huánuco en el cerro Sullcapunta a 3770 msnm. Las herboristerías de Lima, Cusco y Huancayo que comercializan este producto también son provenientes de esta región y es vendida bajo el nombre de Flor de arena.

Las hojas secas no fueron trituradas, para la extracción se trabaja con las hojas secas intactas las cuales poseen unas dimensiones menores a 1mm (*Figura 14*).



Figura 14. Hojas secas de flor de arena vista a través de un microscopio óptico.

Ácido ursólico

El ácido ursólico es clasificado como una sustancia no peligrosa según la directiva 67/548/EEC. Es muy estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas según se describe en la ficha de seguridad de Sigma-Aldrich, se debe de mantener en lugares fríos con el recipiente bien cerrado, para almacenamientos prolongados se recomienda una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Algunas de sus propiedades físicas obtenida de Scifinder son, el punto de fusión $284\text{ }^{\circ}\text{C}$, punto de ebullición $556,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, densidad $1,09\text{ g/mL}$ y pKa de $4,68$.

3.1 Purificación de ácido ursólico

Con el objetivo de obtener ácido ursólico de manera fácil, rápida y económica se trabajó de tres maneras distintas obteniendo resultados diferentes.

3.1.1 Obtención de ácido ursólico primer experimento

La obtención de ácido ursólico se realizó a partir de 15 g de muestra seca, la extracción se realizó por maceración en 150 mL etanol al 96 % durante 24 horas, pasado el tiempo se filtró y se volvió a realizar la maceración, este proceso se repitió por tres veces. Terminada la extracción se juntaron los extractos y se procedió a recuperar el etanol y a concentrar lo extraído por una destilación a presión reducida con la ayuda de un equipo rotaevaporador a 40 °C para evitar cualquier formación de artefactos. El extracto seco se desgrasó con 25 mL de hexano por tres veces, el extracto desgrasado se dejó al ambiente para que se evapore el residuo de hexano. Luego se redisolvió en 100 mL de etanol 96 % a 60 °C y se concentró a 90 mL y se mantuvo en refrigeración durante 15 horas, el precipitado se filtró con la ayuda de una bomba de vacío, se secó en una estufa a 60 °C durante 2 horas, se pesó en una balanza analítica y se registró como **E1**, *esquema 2*.

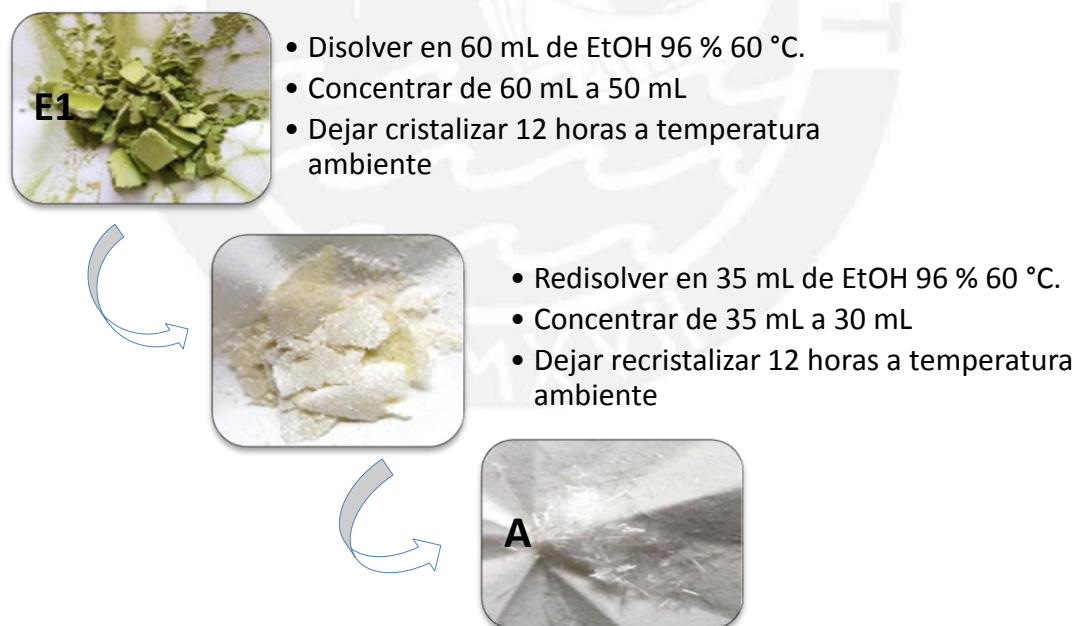


Esquema 2. Proceso de extracción del primer experimento.

Recristalización de ácido ursólico del primer experimento

El punto crucial en la recristalización es la elección de disolvente, si se quiere obtener un alto rendimiento y una separación efectiva es imprescindible utilizar el disolvente adecuado

y el conocer la solubilidad de los ácidos ursólico y oleanólico en varios solventes. Los trabajos realizados por Fan et al., 2011 y 2012 muestran resultados interesantes de las solubilidades de AO y AU en acetato de etilo, metanol, etanol, 2-propanol y en una mezcla etanol-agua. En base a dichos estudios, se eligió la mezcla de etanol : agua al 96 % como solvente para recristalización y con la que también se realizó la redisolución del extracto desgrasado. El proceso de purificación continuó con la cristalización de **E1** en 60 mL de etanol 96 % a 60 °C, se concentró a 50 mL y se dejó cristalizar a temperatura ambiente durante 12 horas. El precipitado se filtró y se lavó con etanol frío, se dejó secar en la estufa a 60 °C durante 1 hora, pasado el tiempo se retiró de la estufa y se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego registrar su peso en una balanza analítica. Este precipitado se recristalizó en 35 mL de etanol 96 % a 60 °C, se concentró a 30 mL y se dejó recristalizar a temperatura ambiente durante 12 horas. El precipitado se filtró y se lavó con etanol frío, se dejó secar en la estufa a 60 °C durante 1 hora, luego se retiró de la estufa y se dejó enfriar a temperatura ambiente para pesarlo en una balanza analítica y registrarlo como **A**, *esquema 3*.



Esquema 3. Proceso de recristalización del primer experimento.

3.1.2 Obtención de ácido ursólico segundo experimento

En este experimento se usó carbón activo como parte del proceso con el objetivo de decolorar la solución de cristalización. El trabajo se inició con 25 g de muestra seca, la extracción se realizó por maceración en 200 mL de etanol al 96 % durante 24 horas, pasado el tiempo se filtró y se volvió a realizar la maceración, este proceso se repitió por tres veces. Terminada la extracción se juntaron los extractos y se procedió a recuperar el etanol y concentrar lo extraído por una destilación a presión reducida, con la ayuda de un equipo rotaevaporador a 40 °C. El extracto seco se desgrasó con 50 mL de hexano por tres veces, el cual se dejó al ambiente para que se evapore el residuo de hexano. Luego el extracto desgrasado se redisolvió en 150 mL de etanol a 96 % a 60 °C y se concentró a 120 mL y se mantuvo en refrigeración durante 15 horas, el precipitado formado se filtró con la ayuda de una bomba de vacío, se secó en una estufa a 60 °C durante 2 horas, se pesó en una balanza analítica y se registró como **E2**, *esquema 4*.

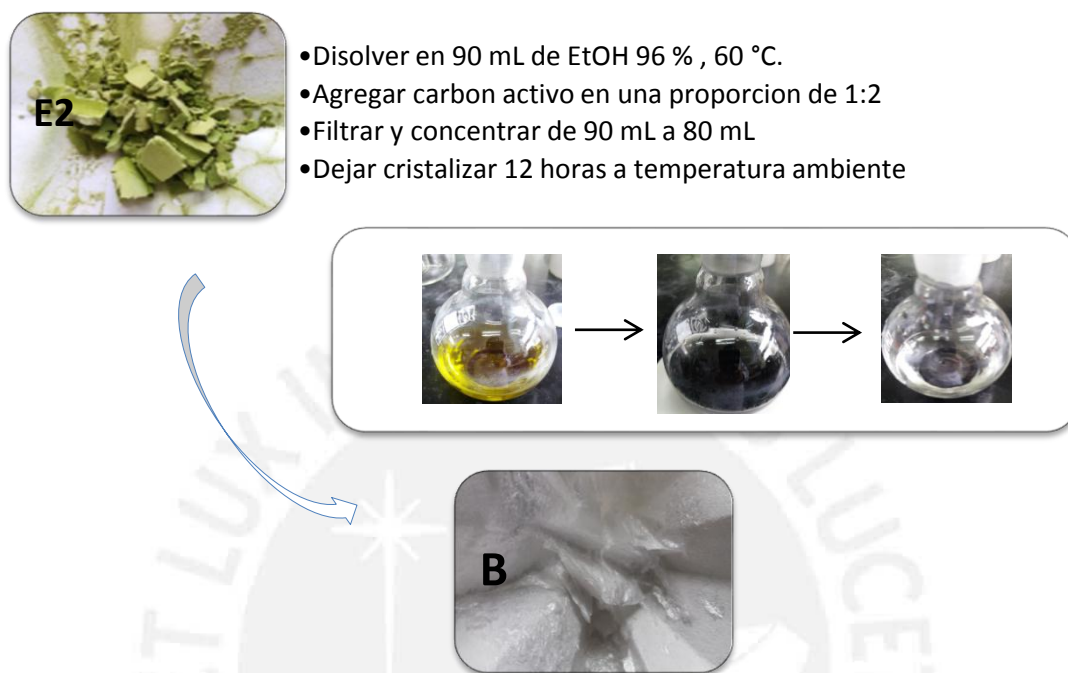


Esquema 4. Proceso de extracción del segundo experimento.

Cristalización de ácido ursólico del segundo experimento

El proceso de purificación continuó con la cristalización para ello se disolvió **E2** en 90 mL de etanol al 96 % a 60 °C, se agregó 4,2 gramos de carbón activado, se mantuvo en agitación a 60 °C durante 5 minutos, pasado este tiempo se filtró con la ayuda de una bomba de vacío, el carbón activo se eliminó y el filtrado se concentró a 80 mL y se dejó cristalizar a temperatura ambiente durante 12 horas. El precipitado se filtró y se lavó con

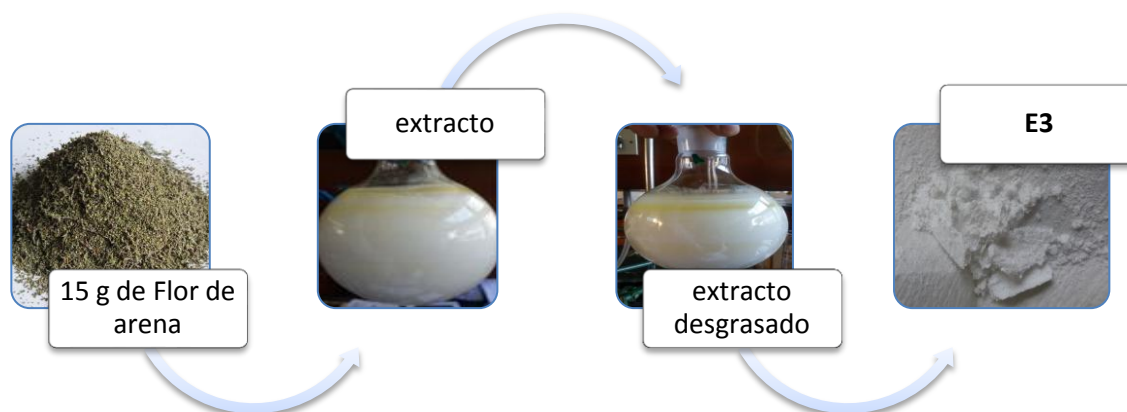
etanol frío, se dejó secar en la estufa a 60 °C durante 1 hora, luego se retiró de la estufa y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente para pesarlo en una balanza analítica y registró como **B**, *esquema 5*.



Esquema 5. Proceso de cristalización del segundo experimento.

3.1.3 Obtención de ácido ursólico tercer experimento

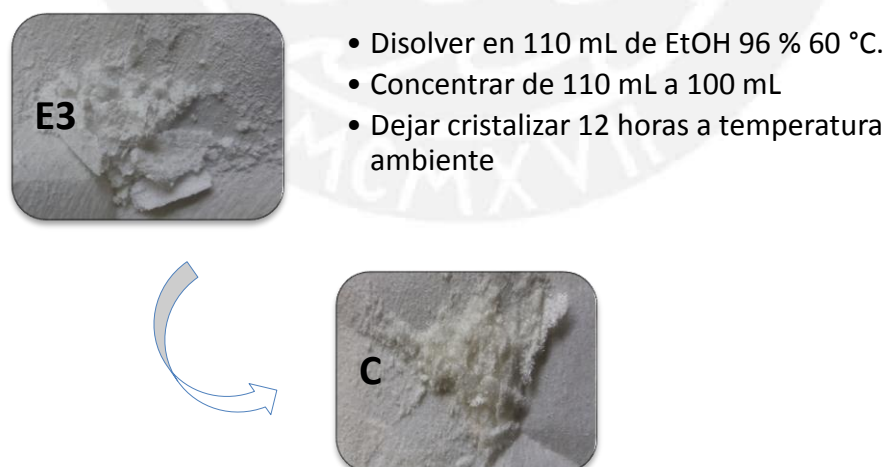
En este experimento la extracción se realizó con acetato de etilo, se inició el trabajo a partir de 15 g de muestra seca, se adicionaron 150 mL de acetato de etilo, se mantuvo en agitación mecánica durante 5 minutos, pasado el tiempo se filtró y se repitió el proceso de extracción por tres veces, luego se juntaron los extractos y se procedió a recuperar el acetato de etilo y a concentrar lo extraído por una destilación a presión reducida con la ayuda de un equipo rotaevaporador a 40°C. El extracto seco se desgrasó con 30 mL de hexano por 3 veces, el extracto desgrasado se dejó al ambiente para que se evapore el residuo de hexano. Luego se redisolvió en 65 mL de etanol 96 % a 60 °C y se concentró a 60 mL y se mantuvo en refrigeración durante 15 horas, el precipitado formado se filtró con la ayuda de una bomba de vacío, se secó en una estufa a 60 °C durante 2 horas, se pesó en una balanza analítica y se registró como **E3**, *esquema 6*.



Esquema 6. Proceso de extracción del tercer experimento.

Cristalización de ácido ursólico del tercer experimento

El proceso de purificación continuó con la cristalización de **E3** que se disolvió en 110 mL de etanol 96 % a 60 °C, se concentró a 100 mL y se dejó cristalizar durante 12 horas a temperatura ambiente, el precipitado se filtró y se lavó con etanol frío, se dejó secar en la estufa a una temperatura de 60 °C durante 1 hora. Pasado este tiempo se retiró de la estufa y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente para pesarlo en una balanza analítica y registrarlo como **C**, *esquema 7*.



Esquema 7. Proceso de cristalización del tercer experimento.

3.2 Caracterización espectroscópica

3.2.1 Caracterización por IR

Para identificar los grupos funcionales de los compuestos A, B y C se realizó un análisis espectroscópico infrarrojo.

Instrumento

IR Perkin Elmer FT-IR/NIR Frontier, el instrumento se encuentra en la sección de Química PUCP.

3.2.2 Caracterización por RMN

Para confirmar la estructura molecular de los compuestos obtenidos se realizó el análisis por espectroscopia de RMN 1D (^1H , ^{13}C y DEPT 45° , 90° y 135°) y 2D (HSQC, COSY y HBMC) para lo cual se disolvieron 35 mg de A, B y C en 600 μL de disolvente deuterado dimetil sulfóxido- D_6 , el análisis se realizó a temperatura ambiente.

Instrumento

Espectrómetro BRUKER ASCEND 500 MHz con consola AVANCE III HD, el instrumento se encuentra en la sección de Química PUCP.

3.3 Transferencia del método HPLC a UPLC

El método HPLC usado por Srivastava et al., (2011) para la cuantificación de ácido ursólico fue el elegido para transferirlo a uno UPLC. Lo que se hizo fue alimentar los datos en la hoja de cálculo de THERMO SCIENTIFIC, las dimensiones de las columnas HPLC y UPLC que son diferentes pero con química similar y los datos de las condiciones (tiempo de análisis, velocidad de flujo, volumen de inyección, temperatura de análisis) a las que se corrió el método HPLC y con los resultados de las nuevas condiciones UPLC se realizó un primer experimento.

3.4 Cuantificación de ácido ursólico por UPLC

Para cuantificar el contenido de ácido ursólico presente en la flor de arena, se tomó 0,1 gramo de muestra y se extrajo con 5 mL de EtOH, asistido con un equipo de ultrasonido durante 5 minutos, pasado este tiempo se filtró y se volvió a realizar el mismo procedimiento 10 veces, de esa manera se asegura la extracción total del ácido ursólico de su matriz. Luego se secó bajo presión reducida en un rotaevaporador a 40 °C, el extracto etanólico ya seco se desgrasó con 5 mL de hexano por 5 minutos, 3 veces y se dejó abierto al ambiente por 30 minutos para que pueda eliminarse los residuos de hexano, luego se redisolvió y se aforó a 25 mL con etanol (grado hplc), esta solución se filtró por una membrana de 0,45 µm y se inyectó 0,5 µL al cromatógrafo bajo las condiciones UPLC.

Instrumentación y metodología.

Para llevar a cabo el análisis se usó un equipo Agilent 1290 infinity LC, el cual se encuentra en la sección de Química-PUCP, las condiciones del método se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. *Condiciones del método*

Agilent 1290 infinity LC	
Columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18 150mm x 2,1 mm 1,8 µm
Fase móvil	A = 20 % agua B = 80 % acetonitrilo
Velocidad de flujo	0,5 mL/min
Modo de elución	Isocrático
Temperatura	30 °C
Inyección	0,5 µL
Detección	DAD, 210 nm
Tiempo de análisis	10 minutos

Curva de calibración

Se realizó de la siguiente manera: se preparó 10 mL de una solución de ácido ursólico a una concentración de 1mg/mL en etanol (grado hplc), a partir de esta solución se prepararon 5 mL de tres soluciones en concentraciones de 0,2; 0,4 y 0,6 mg/mL, se filtraron por una membrana de 0,45 μm y se inyectaron al cromatógrafo 0,5 μL por triplicado. Con los resultados obtenidos se realizó la curva de calibración.

Interferente

Uno de los principales interferentes en el análisis de ácido ursólico es su isómero el ácido oleanólico, que por su poca diferencia estructural con respecto a la posición de un grupo metilo, resulta un cromatograma con unos picos con muy poca resolución, hay ocasiones en el que los picos salen solapados o en el peor de los casos no se resuelven.

4 Resultados y discusión

4.1 Conversión del método HPLC a uno UPLC

Las dimensiones de la columna y las condiciones del nuevo método UPLC comparados al HPLC se muestran en la Tabla 5 y los cromatogramas bajo las condiciones HPLC y UPLC se observan en la *Figura 15*.

Tabla 5. Condiciones HPLC y UPLC

	HPLC	UPLC
Columna	Phenomenex RP-C18 de 250 x 4,6 mm y 5 μm	ZORBAX Eclipse XDB-C18 150x2,1 mm 1,8 μm
Fase móvil	A = 20 % agua B = 80 % acetonitrilo	A = 20 % agua B = 80 % acetonitrilo
Velocidad de flujo	1 mL/min	0,5 mL/min
Modo de elución	Isocrático	Isocrático
Temperatura	30 °C	30 °C
Inyección	5 μL	0,5 μL
Detección	DAD 210 nm	DAD 210 nm
Tiempo de análisis	35 minutos	10 minutos

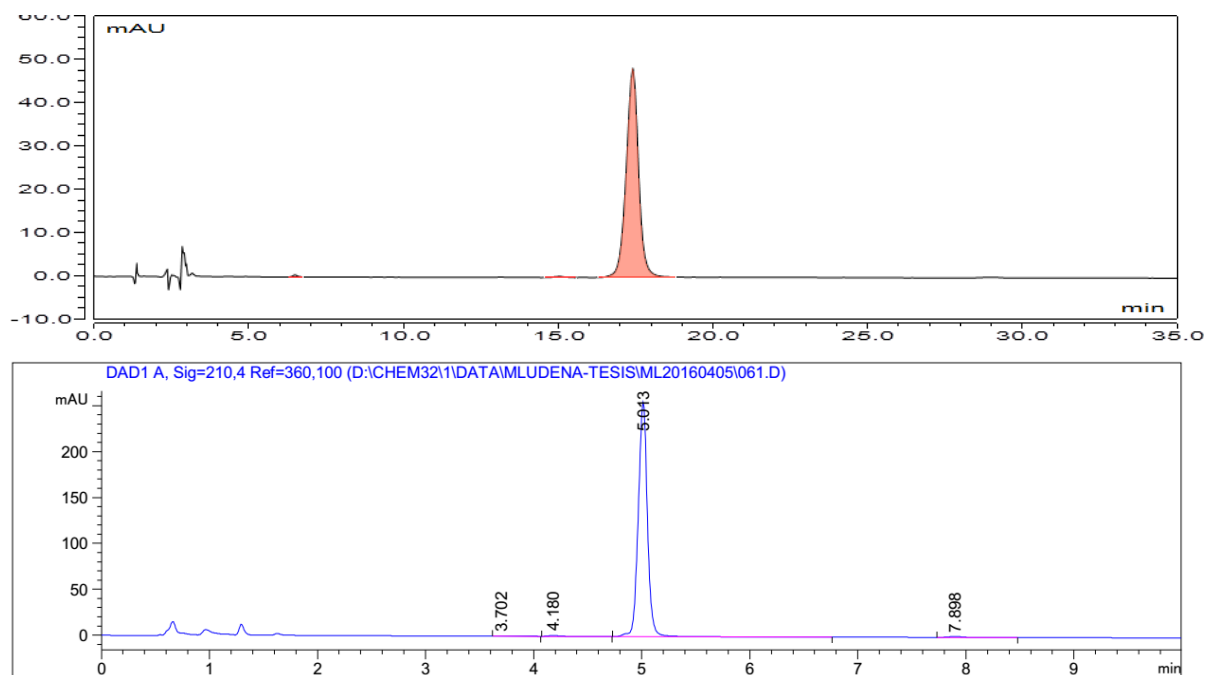


Figura 15. Cromatogramas HPLC (arriba) y UPLC (abajo).

En el método HPLC, el análisis requiere 35 minutos, a un flujo de 1 mL/min, con el método UPLC el análisis no necesita más de 10 minutos, a un flujo de 0,5 mL/min, lo que permite ahorrar un 85 % de solvente y un 71 % de tiempo de análisis. Con este método UPLC transferido se realizó el resto de los análisis.

4.2 Cuantificación de ácido ursólico

El cromatograma del extracto de la muestra y de los tres puntos inyectados para realizar la curva de calibración se observan en las Figuras 16-17 y los resultados en la Tabla 6.

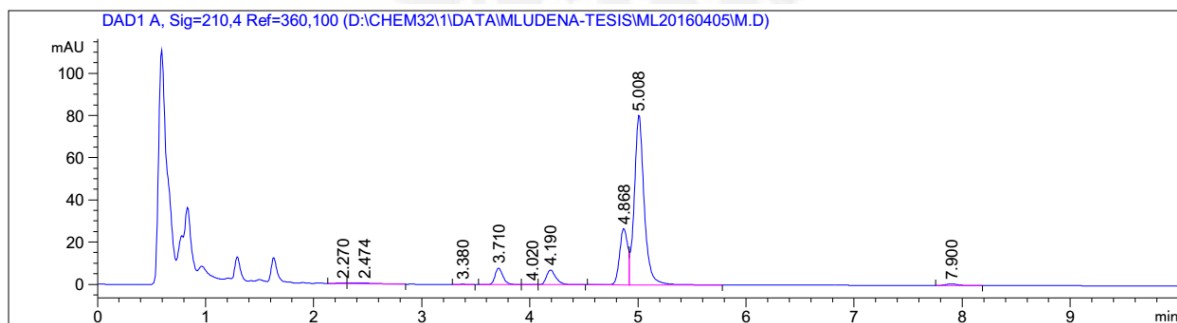


Figura 16. Cromatograma del extracto de *clinopodium revolutum*.

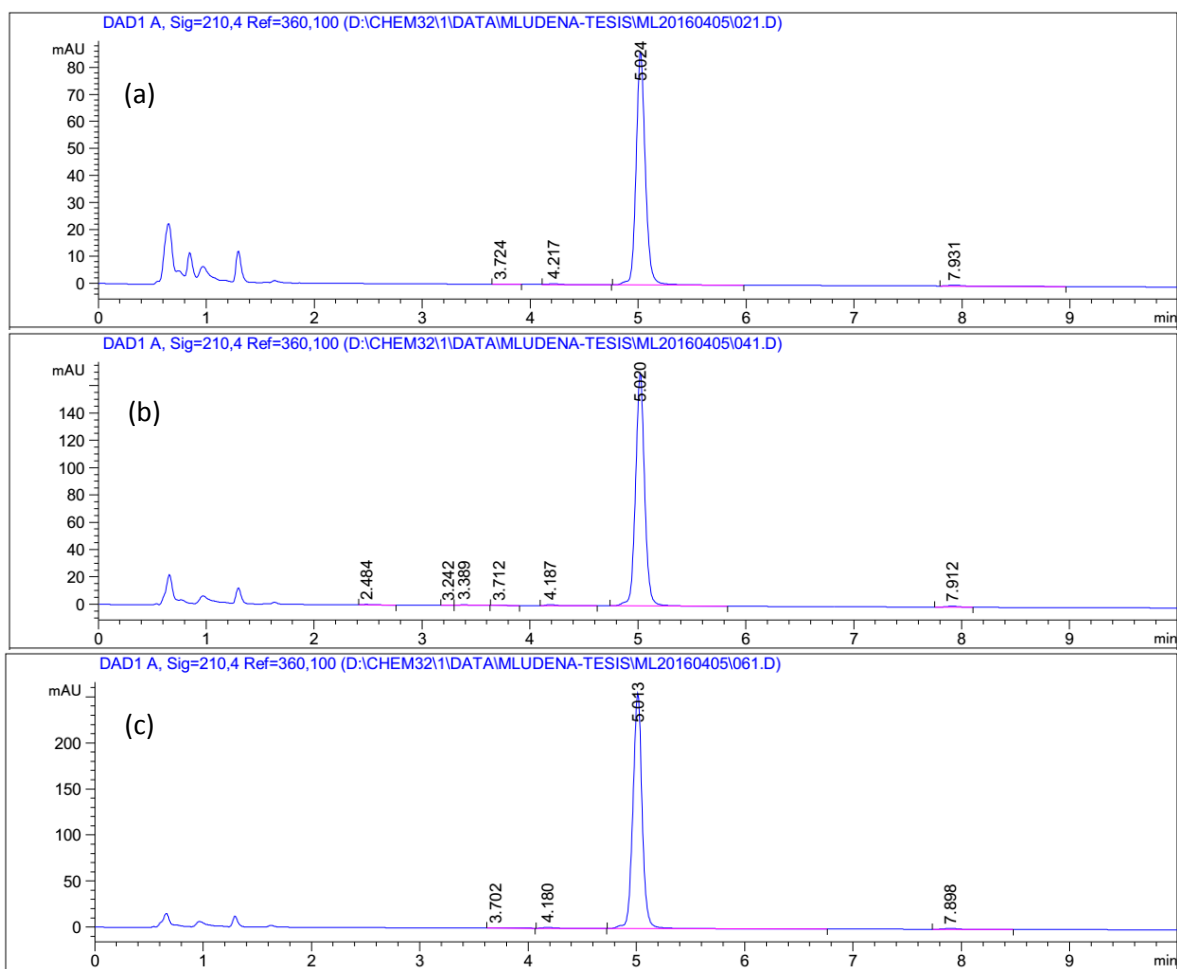


Figura 17. Cromatogramas (a) 0,2; (b) 0,4 y (c) 0,6 mg/mL.

Tabla 6. Resultados de los cromatogramas de los tres niveles inyectados por triplicado

n	0,2 mg/mL		0,4 mg/mL		0,6 mg/mL	
	Área [mAU*s]	Pureza %	Área [mAU*s]	Pureza %	Área [mAU*s]	Pureza %
1	510,650	98,603	998,526	98,421	1502,015	98,809
2	506,598	98,953	997,430	98,143	1508,345	98,821
3	512,407	97,457	996,420	98,187	1486,799	98,802
media	509,885	98,337	997,458	98,250	1499,053	98,810
SD	2,433	0,639	0,860	0,122	9,042	0,008

Con los resultados de la media del área [mAU*s] y la pureza se calculó la concentración real (Tabla 7) y se graficó la curva de calibración área media [mAU*s] vs concentración real (Figura 18).

Tabla 7. Área [mAU*s] media y contenido real

Área [mAU*s]	Pureza %	Concentración mg/mL	Concentración real mg/mL
509,885	98,337	0,2	0,197
997,458	98,250	0,4	0,393
1499,053	98,810	0,6	0,593

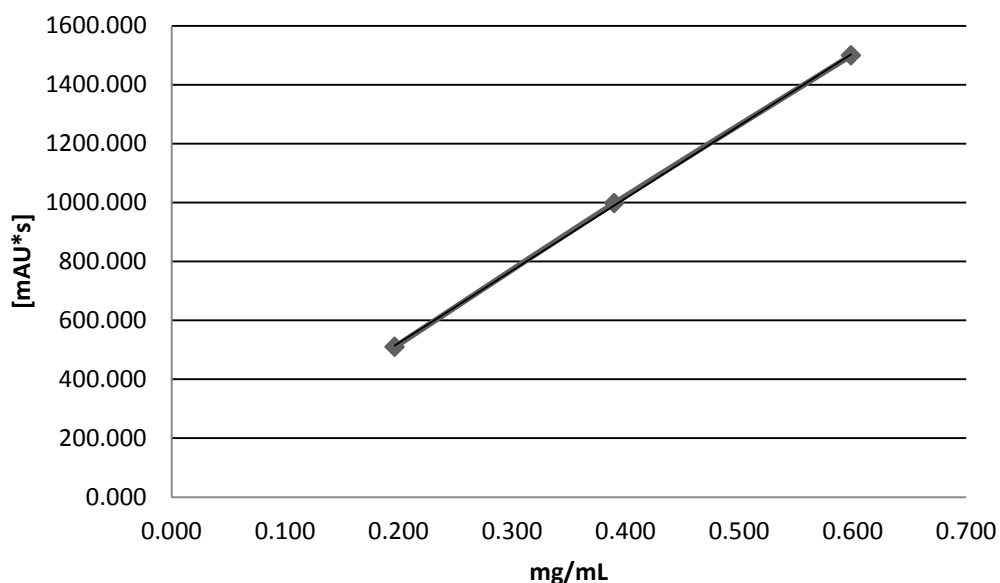


Figura 18. Curva de calibración.

De la curva de calibración la regresión lineal fue obtenida como la siguiente ecuación (5):

$$A = 2460,2B + 30,103 \quad (5)$$

Dónde:

A: área del pico del ácido ursólico [mAU*s]

B: concentración real inyectada de ácido ursólico en (mg/mL)

coeficiente de correlación (R^2) de la ecuación de regresión: 0,9998

Para determinar el contenido total de AU reemplazamos el área [mAU*s] de la muestra de *clinopodium* que es 508,76639 en la ecuación 5:

$$508,76639 = 2460,2B + 30,103$$

$$B = 0,19456$$

Como B es la concentración en mg/mL y el volumen de aforo fue de 25 mL entonces tenemos la siguiente relación:

$$\begin{array}{l} 0,19456 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ mL} \\ X \longrightarrow 25 \text{ mL} \\ X = 4,864 \text{ mg} \end{array}$$

Entonces tenemos 4,864 mg en los 25 mL, esto de una cantidad de muestra de 0,1 g (100 mg), el porcentaje de AU entonces es

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje de AU} &= \frac{\text{Cantidad de AU}}{\text{Cantidad de muestra inicial}} \times 100 \\ \text{Porcentaje de AU} &= \frac{4,864 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 100 \\ \text{Porcentaje de AU} &= 4,864 \% \end{aligned}$$

El contenido total de AU es de 4,864 % de peso seco de flor de arena, por lo que se puede observar que esta es la lamiaceae con el mayor contenido de ácido ursólico entre estas especies, comparado con lo reportado por Janicsák et al. (2006). Entre las 88 especies que analizó este investigador el mayor contenido de AU pertenece a la especie *Lavandula angustifoliay* con un porcentaje de 1,39 %, el resultado obtenido con flor de arena también supera a otras especies donde se ha encontrado AU como por ejemplo la *Macrocarpium officinalis* (0,520 %) (Wang, Wang y Guo, 2008), *Eriobotrya japonicda* (0,445 %) (Zhou, Li, Zhang, Sun y Chen, 2011).

4.3 Purificación de ácido ursólico

4.3.1 Primer experimento

El peso del extracto y de los precipitados se registró en la Tabla 8. En la *Figura 19* se puede observar la fotografía digital de los cristales obtenidos.

Tabla 8. Registro de los pesos obtenidos del primer experimento

Peso de extracto	2,198 gramos
Peso de primer precipitado (E1)	0,8774 gramos
Peso de segundo precipitado	324,1 miligramos
Peso de cristales (A)	96,4 miligramos

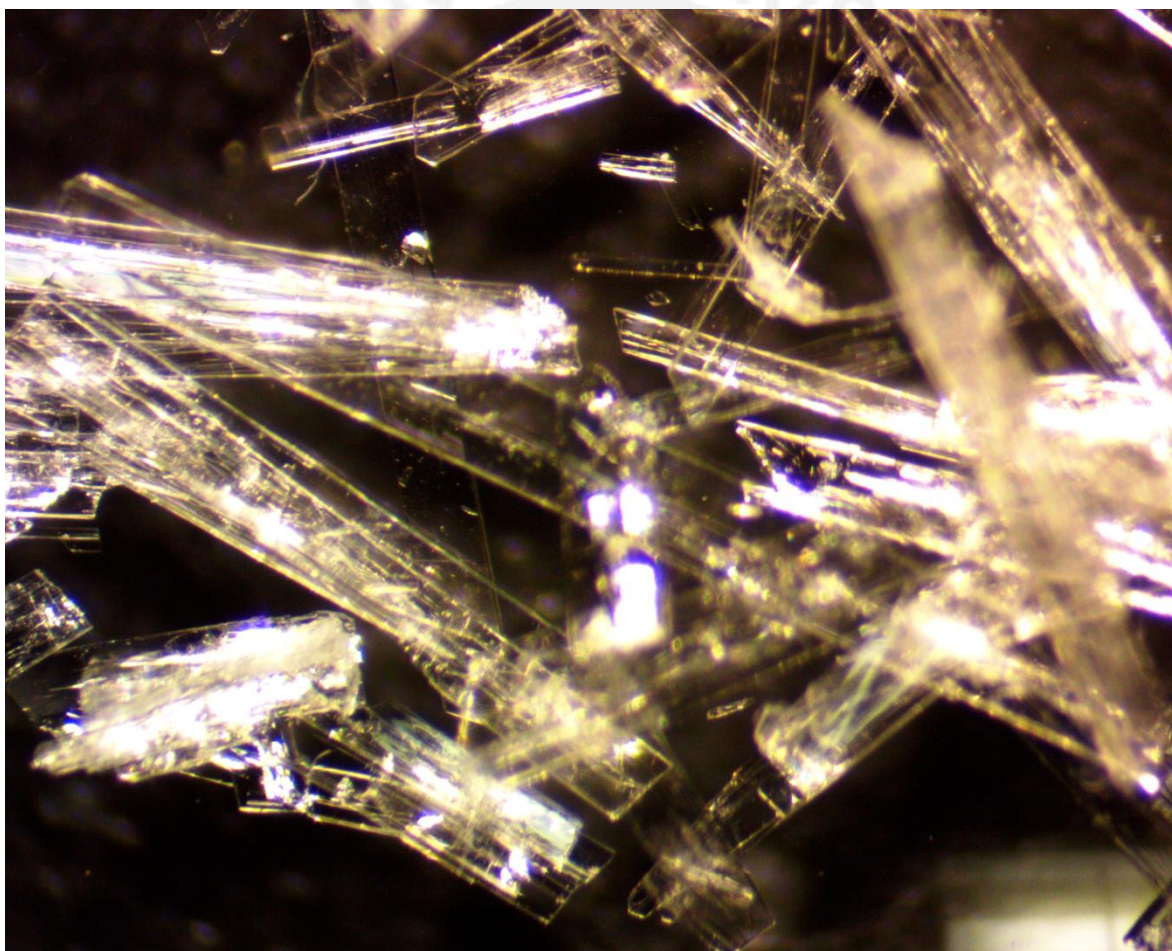


Figura 19. Cristales obtenidos en la última recristalización del primer experimento.

Se eligió un cristal representativo para medir las dimensiones, resultando ser de 0,302 x 3,078 mm ver *Figura 20*.

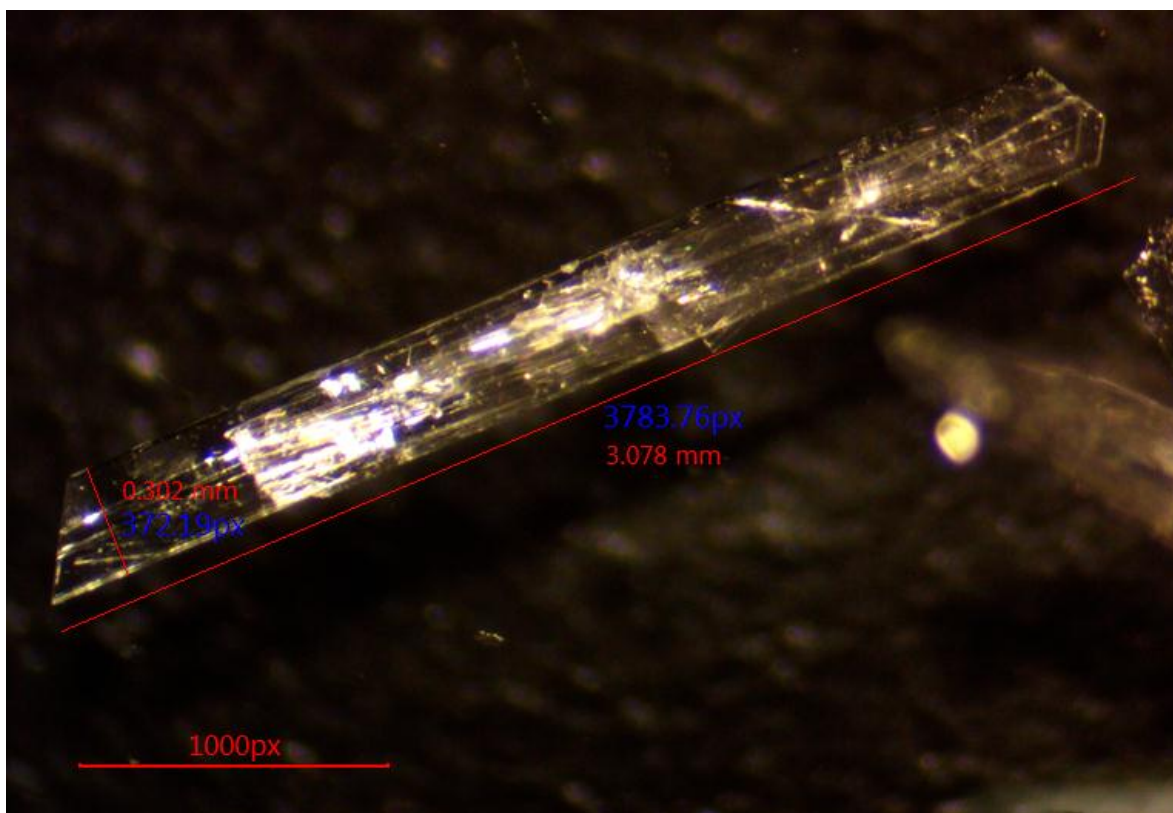


Figura 20. Dimensiones de un cristal representativo.

La pureza de **A** resultó ser de 98,7 %, en las *Figuras 21-22* se muestran el cromatograma y el espectro UV correspondiente, el porcentaje de rendimiento y el porcentaje de recuperación se calculó con las *ecuaciones (6)* y *(7)*.

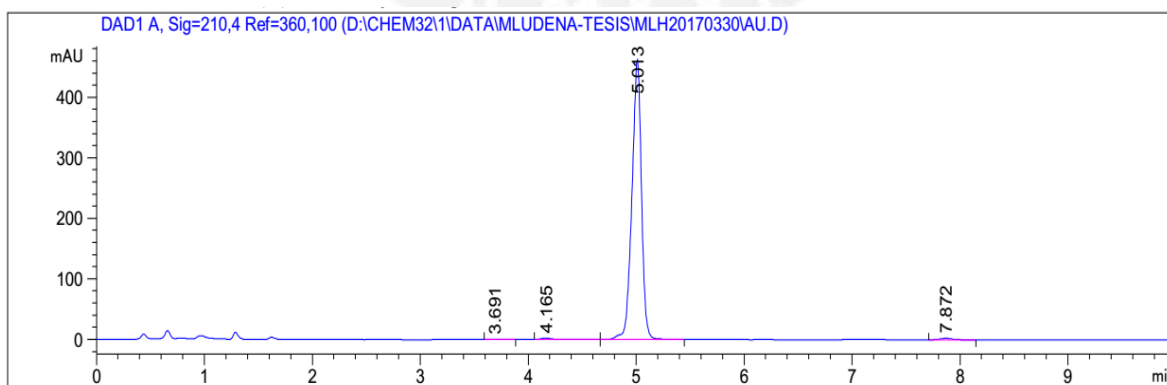


Figura 21. Cromatograma de los cristales **A** pureza 98,7 %.

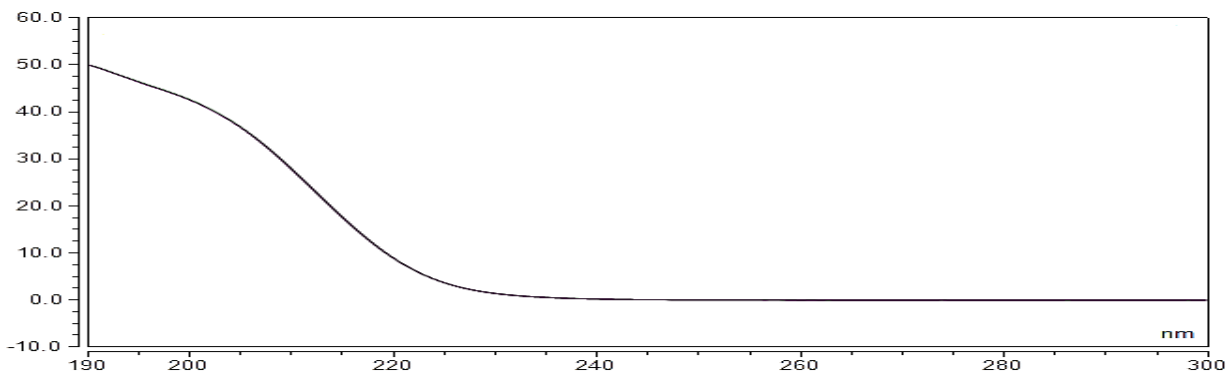


Figura 22. Espectro UV de los cristales A.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de AU}}{\text{Masa de flor de arena}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{96,4 \text{ mg}}{15000 \text{ mg}} \times 100 = 0,6426$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Rendimeto \% de AU}}{\text{Contenido \% real en flor de arena}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{0,6426 \%}{4,864 \%} \times 100 = 13,21$$

Con el objetivo de comprobar la repetibilidad del primer experimento, se trabajó de la misma manera una vez más. La Tabla 9 muestra el resumen de los resultados obtenidos en el proceso de purificación del ácido ursólico.

Tabla 9. Resultados del proceso de purificación de AU del primer experimento

n	mg AU obtenido	% de rendimiento	% de recuperación	% de pureza del AU
1	96,4 mg	0,6426	13,21	98,7
2	95,9 mg	0,6393	13,14	98,8

4.3.2 Segundo experimento

El peso del extracto y de los precipitados se registró en la Tabla 10. En la *Figura 23* se puede observar la fotografía digital de los cristales obtenidos.

Tabla 10. *Registro de los pesos obtenidos del segundo experimento*

Peso de extracto	3,4593 gramos
Peso de precipitado (E2)	2,589 gramos
Peso de cristales (B)	240,6 miligramos

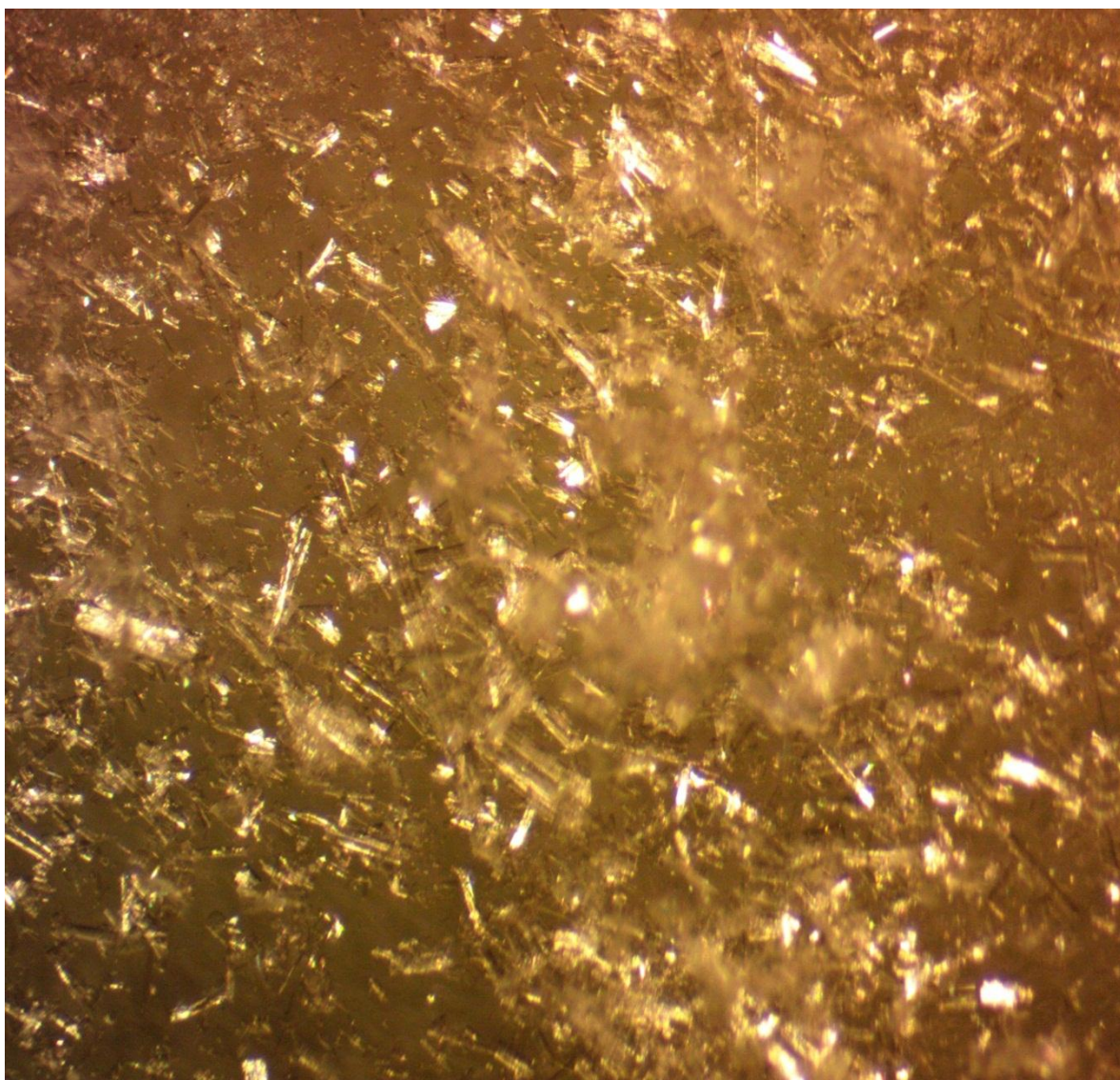


Figura 23. Cristales obtenidos en la última cristalización del segundo experimento.

La pureza de **B** resultó ser de 97,28 %, en las Figuras 24-25 se muestran el cromatograma y el espectro UV correspondientes, el porcentaje de rendimiento y el porcentaje de recuperación se calcularon con las ecuaciones (6) y (7).

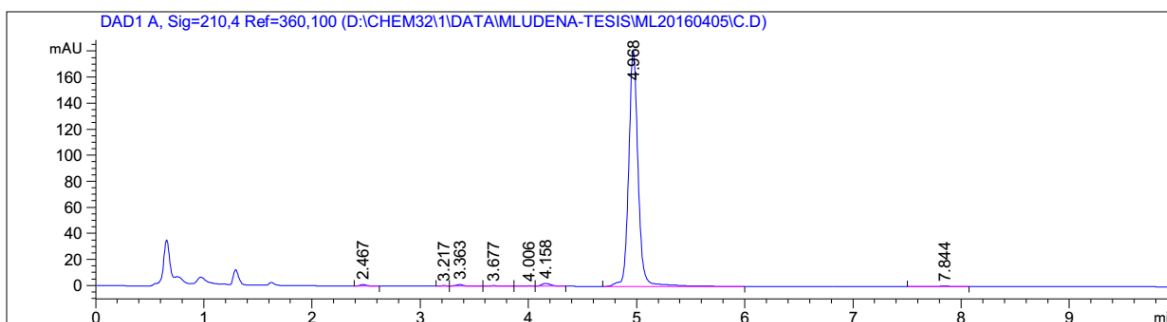


Figura 24. Cromatograma de los cristales **B** pureza 97,28 %.

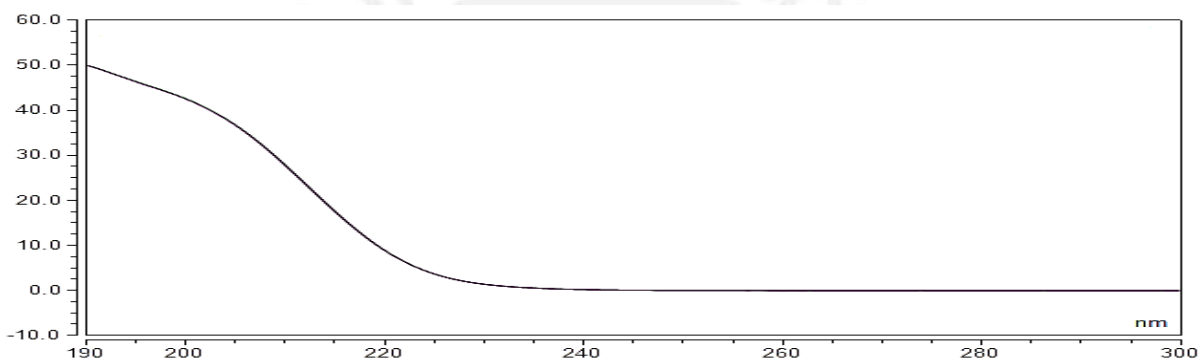


Figura 25. Espectro UV de los cristales **B**.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de AU}}{\text{Masa de flor de arena}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{240,6 \text{ mg}}{25000 \text{ mg}} \times 100 = 0,9624$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Rendimeto \% de AU}}{\text{Contenido \% real en flor de arena}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{0,9624 \%}{4,864 \%} \times 100 = 19,78$$

Con el objetivo de comprobar la repetibilidad del método se repitió el procedimiento por una vez más. La Tabla 11 muestra el resumen de los resultados obtenidos en el proceso de purificación del ácido ursólico.

Tabla 11. *Resultados del proceso de purificación de AU del segundo experimento*

n	mg de AU obtenido	% de rendimiento	% de recuperación	% de pureza del AU
1	240,6	0,9624	19,78	97,2806
2	239,8	0,9592	19,72	97,2775

4.3.3 Tercer experimento

El peso del extracto y de los precipitados se registró en la Tabla 12. En la *Figura 26* se puede observar la fotografía digital de los cristales obtenidos.

Tabla 12. *Registro de los pesos obtenidos del tercer experimento*

Peso de extracto	1,3604 gramos
Peso de precipitado (E3)	0,4398 gramos
Peso de cristales (C)	111,3 miligramos

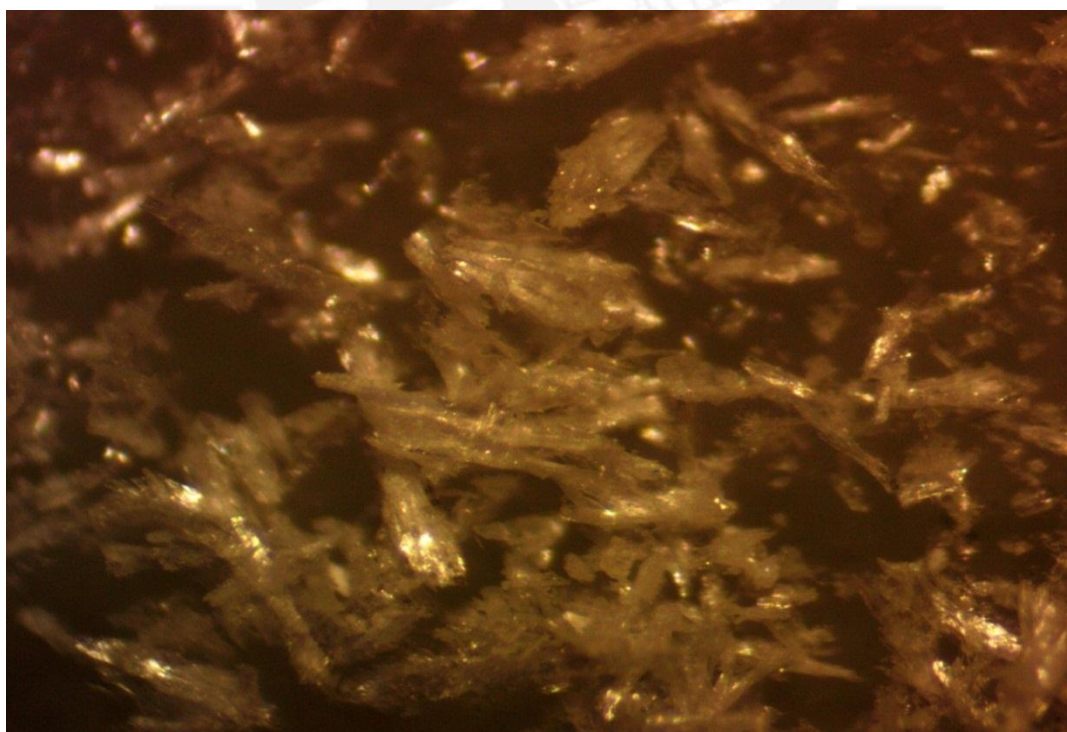


Figura 26. Cristales obtenidos en la última cristalización del tercer experimento.

La pureza de **C** resultó ser de 95,7999 %, en las Figuras 27-28 se muestran el cromatograma y el espectro UV correspondientes, el porcentaje de rendimiento y el porcentaje de recuperación se calcularon con las ecuaciones (6) y (7).

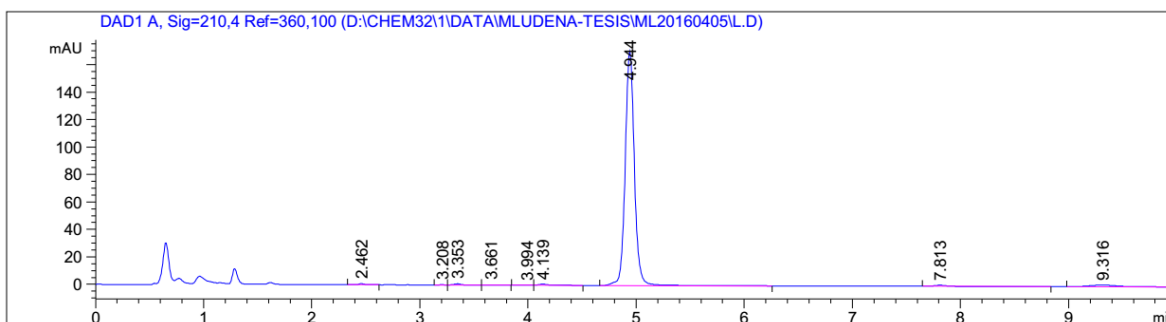


Figura 27. Cromatograma de los cristales **C** pureza 95,7999 %.

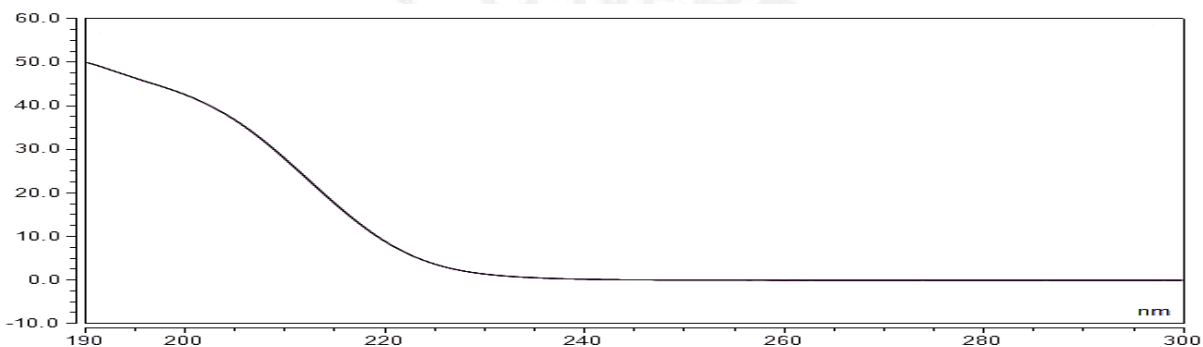


Figura 28. Espectro UV de los cristales **C**.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de AU}}{\text{Masa de flor de arena}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{111,3 \text{ mg}}{15000 \text{ mg}} \times 100 = 0,742$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Rendimeto \% de AU}}{\text{Contenido \% real en flor de arena}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{0,742 \text{ \%}}{4,864 \text{ \%}} \times 100 = 15,255$$

Con el objetivo de comprobar la repetibilidad del método se trabajó de la misma manera por una vez más. La Tabla 13 muestra el resumen de los resultados obtenidos en el proceso de purificación del ácido ursólico.

Tabla 13. *Resultados del proceso de purificación de AU del tercer experimento*

n	mg de AU obtenidos	% de rendimiento	% de recuperación	% de pureza del AU
1	111,3	0,742	15,255	95,7999
2	118,2	0,788	16,200	95,9656

De los tres métodos se resalta las diferencias sobre todo en términos de pureza, porcentaje de recuperación y tiempo para obtener los cristales, en el primer experimento donde no se usó carbón activo en la recristalización, se necesitaron prácticamente seis días para obtener los cristales, en el segundo experimento con uso de carbón activo, se requirieron cinco días para obtener los cristales y si bien el porcentaje de recuperación aumento en un 6,5 % se sacrificó en 1,5 % la pureza y no se obtuvo cristales que muestran claramente su simetría ortorrómbica como si sucedió en el primer experimento.

El tercer experimento es el más rápido, se obtiene AU en tan solo dos días esto es debido al hecho que la extracción se realiza por 5 minutos y no se deja macerando 24 horas como en el primer y segundo experimentos. Cabe resaltar que en la extracción con el uso de ultrasonido o sin él, se extrae la misma cantidad. En este caso los cristales son amorfos, parecidos a los del segundo experimento, con una pureza un poco inferior pero con un porcentaje de rendimiento mayor que en el primer experimento.

Cualquiera de los tres métodos que se plantea para obtener ácido ursólico resulta ser eficientes, ya sea con el primero con el cual se obtiene AU en un menor rendimiento pero de pureza de calidad de estándar o patrón, lo que hace posible su uso para estudios cristalográficos, porque se obtiene unos cristales bien definidos. En el segundo y tercer métodos se obtiene AU en un mayor rendimiento pero con una pureza inferior al del primero.

Comparando los resultados obtenidos, con otros ya reportados (Yamaguchi et al., 2008), (Frighetto et al., 2008), (He y Liu, 2007), (Chandramu et al., 2003), resultan ser mejores por el hecho de eliminar el uso de solventes tóxicos como cloroformo, el uso de columna cromatográfica preparativa de silica gel y además no requerir pre tratamiento de la muestra ni el uso de energía en el empleo de equipos de ultrasonido.

4.4 Caracterización espectroscópica

4.4.1 Espectroscopia IR

Los espectros IR obtenidos de los cristales **A**, **B** y **C** realizados con la mezcla de KBr para formar la pastilla se muestran en las *Figuras 29-31*.

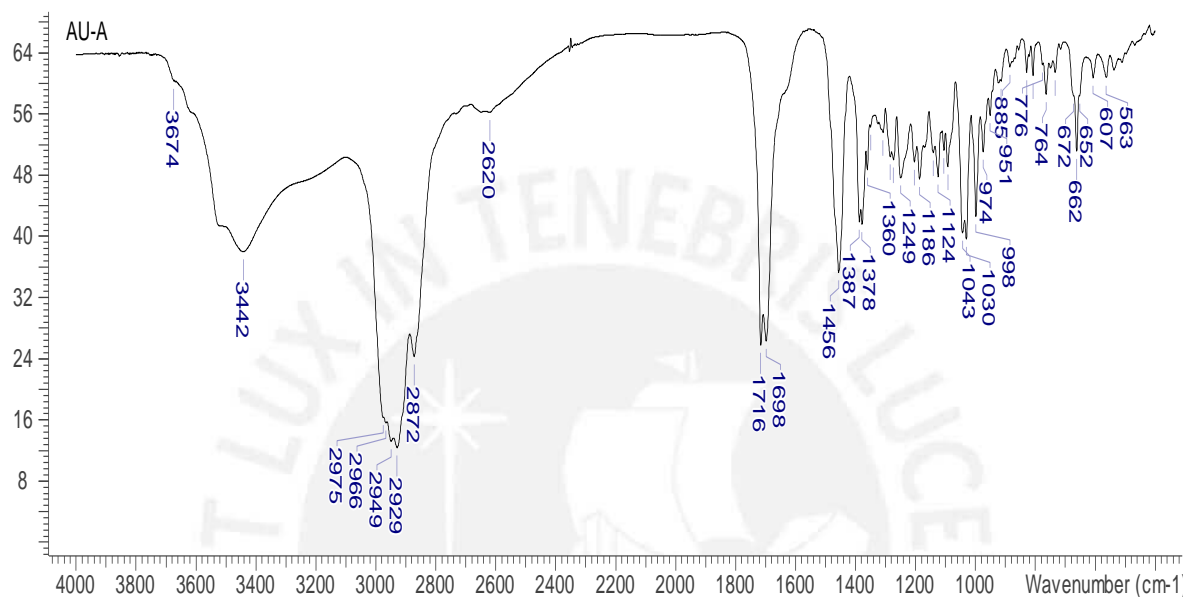


Figura 29. Espectro IR del cristal A.

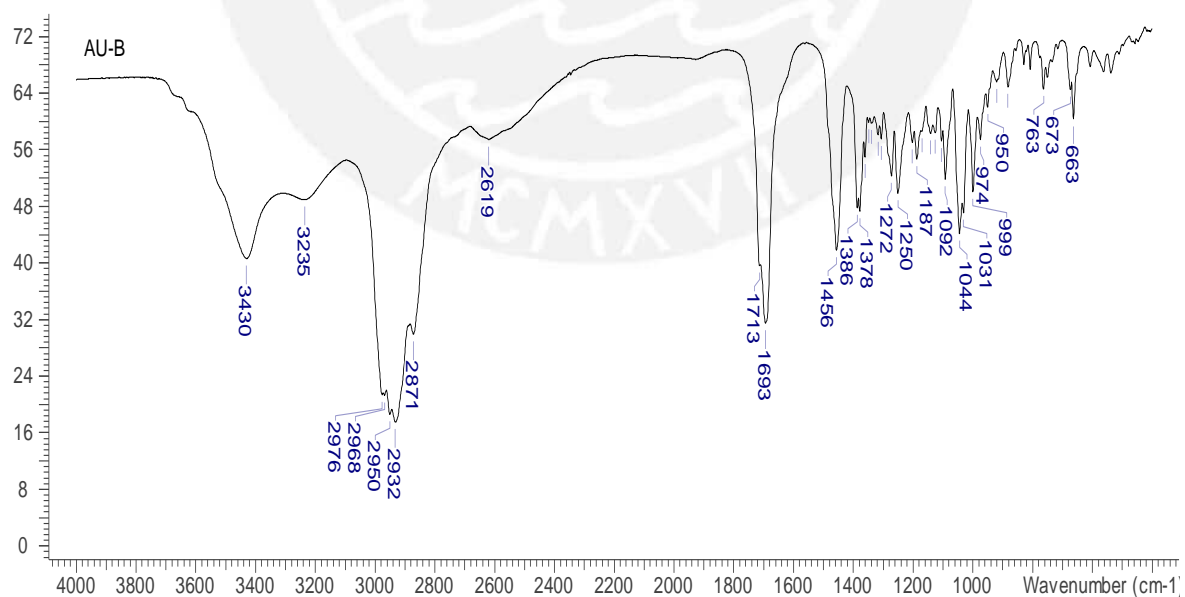


Figura 30. Espectro IR del cristal B.

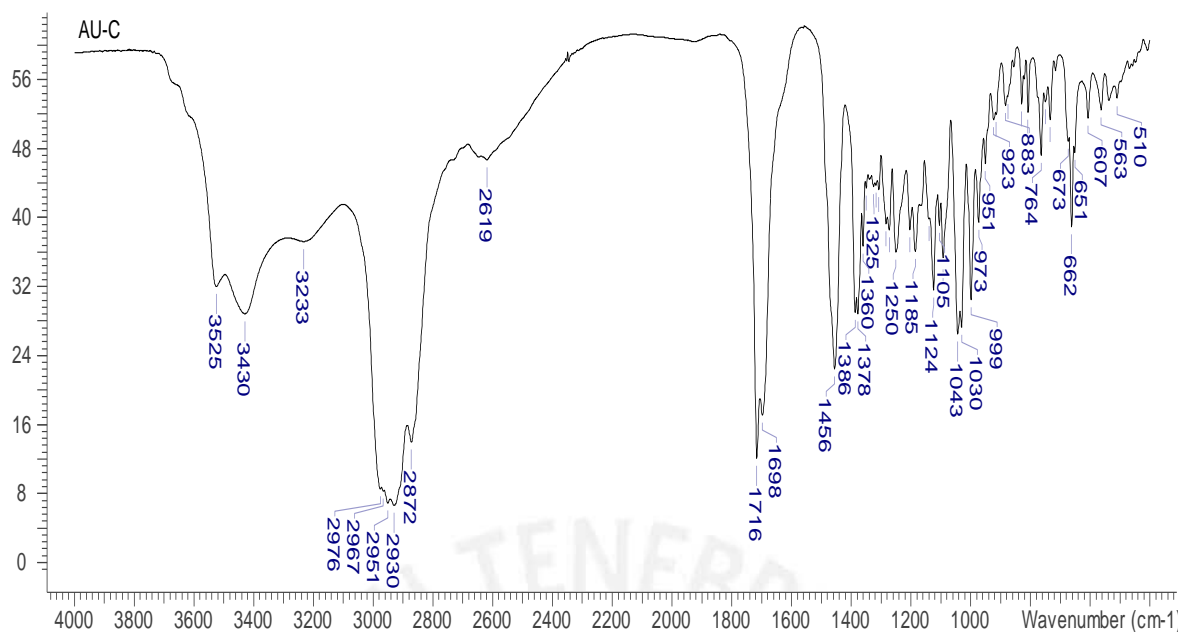


Figura 31. Espectro IR del cristal C.

Se observan las señales esperadas para los grupos funcionales del compuesto AU, alrededor de los 3400 cm^{-1} se tiene la banda característica de estiramiento simétrico del enlace O-H de grupo hidroxilo, el estiramiento asimétrico de los enlaces C-H del grupo CH_2 ($2951 - 2976\text{ cm}^{-1}$), así mismo estiramientos simétricos del enlace C-H del grupo CH_3 (2872 y 2930 cm^{-1}), una intensa banda de estiramiento simétrico del grupo carbonilo y la del doble enlace C=C a 1716 y 1698 cm^{-1} respectivamente, una banda correspondiente a la vibración de deformación angular del enlace C-H (1456 cm^{-2}), así mismo señales características de flexión del enlace C-H ($1386, 1378, 1360, 1307, 1286, 1272, 1250$).

4.4.2 Espectroscopia RMN

Para caracterizar completamente la estructura molecular del ácido ursólico fueron necesarios los espectros de RMN 1D y 2D. En las Figuras 32-34 se observa los espectros de ^1H -RMN de los cristales A, B y C, como era de esperar es un espectro complejo por la cantidad de protones acoplándose y por el solapamiento de multipletes, debido a la complicada estructura del ácido ursólico.

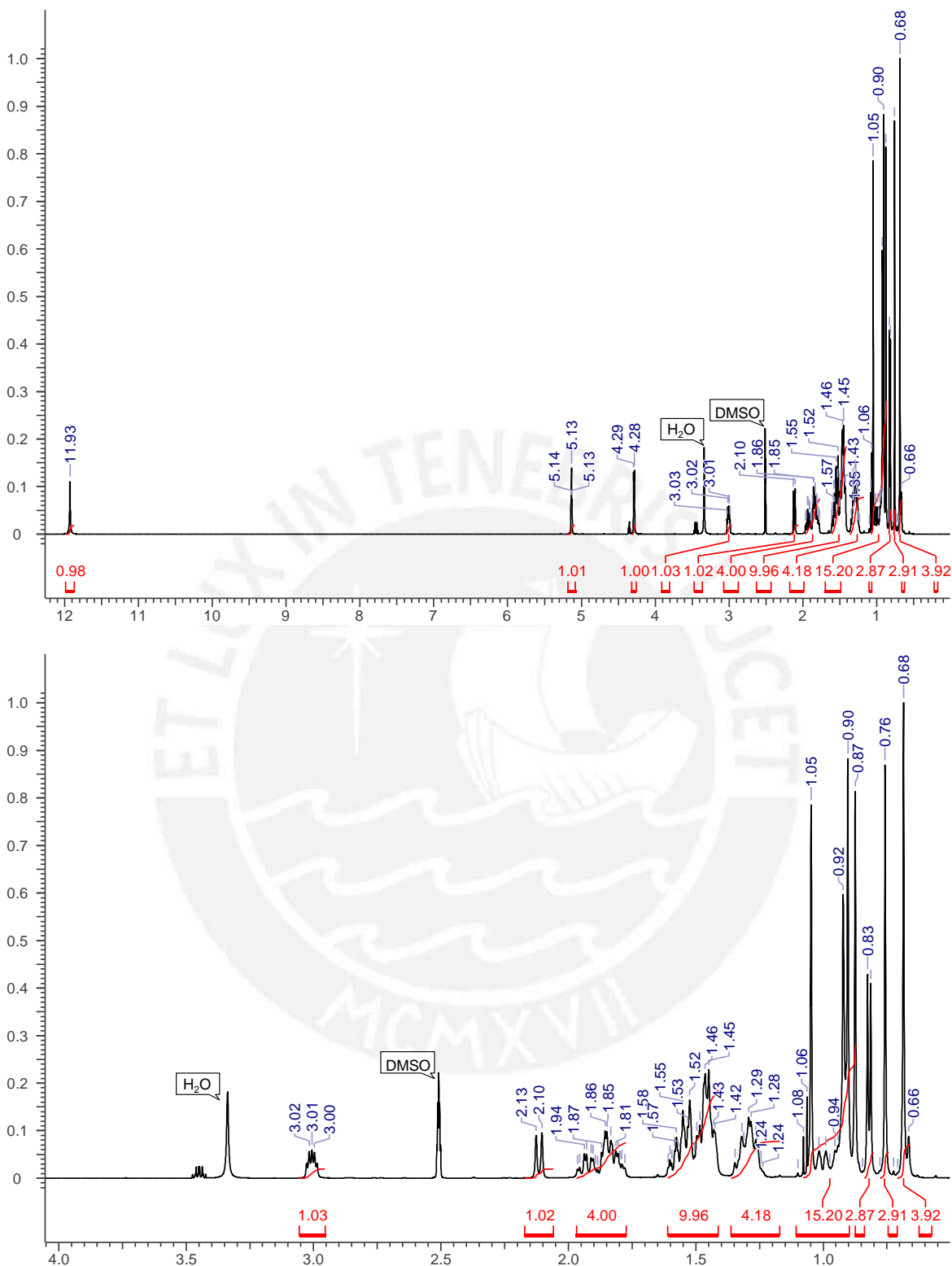


Figura 32. Espectro ^1H -RMN del cristal A (arriba) ampliación (abajo).

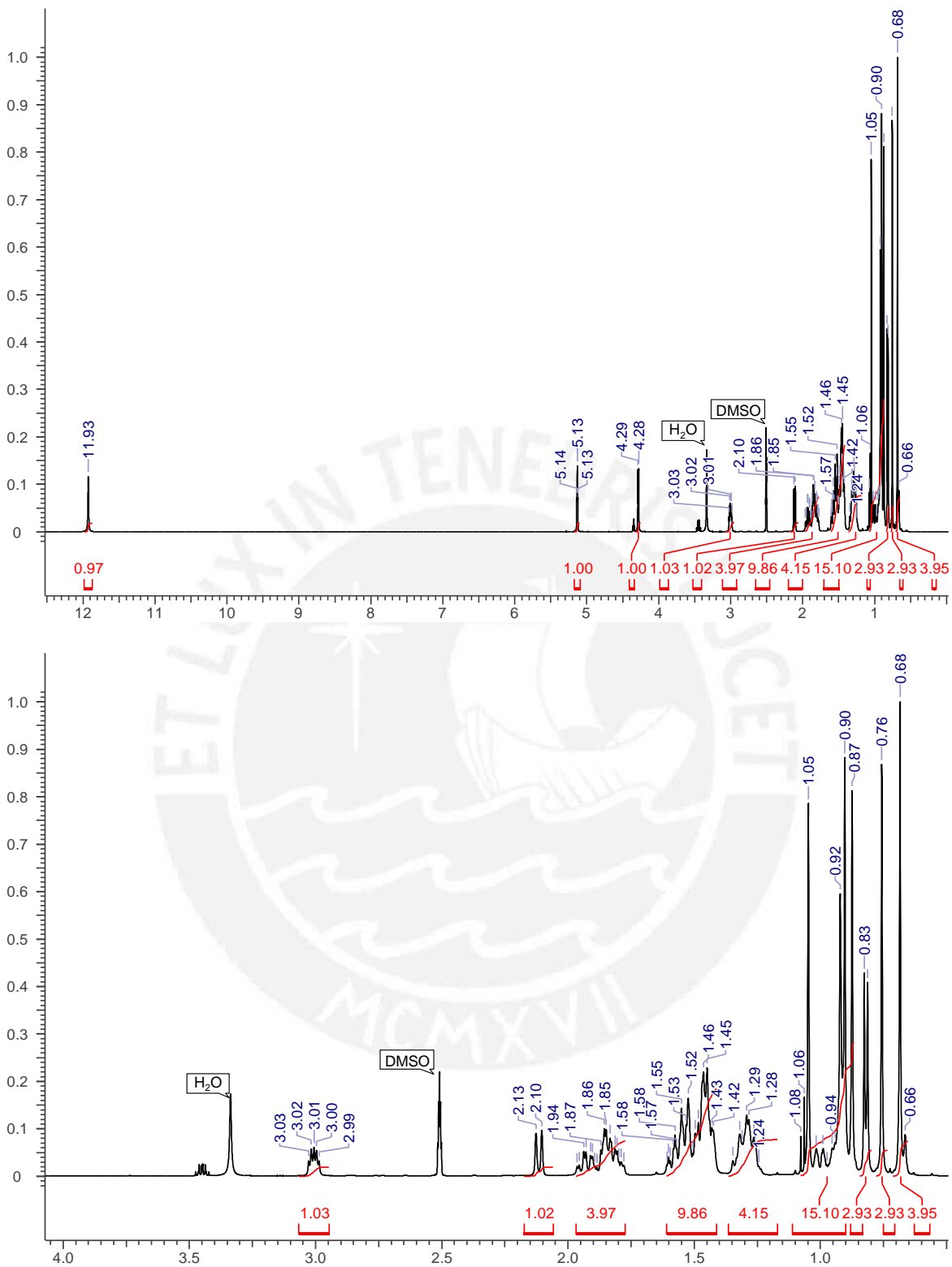


Figura 33. Espectro ¹H- RMN del cristal B (arriba) ampliación (abajo).

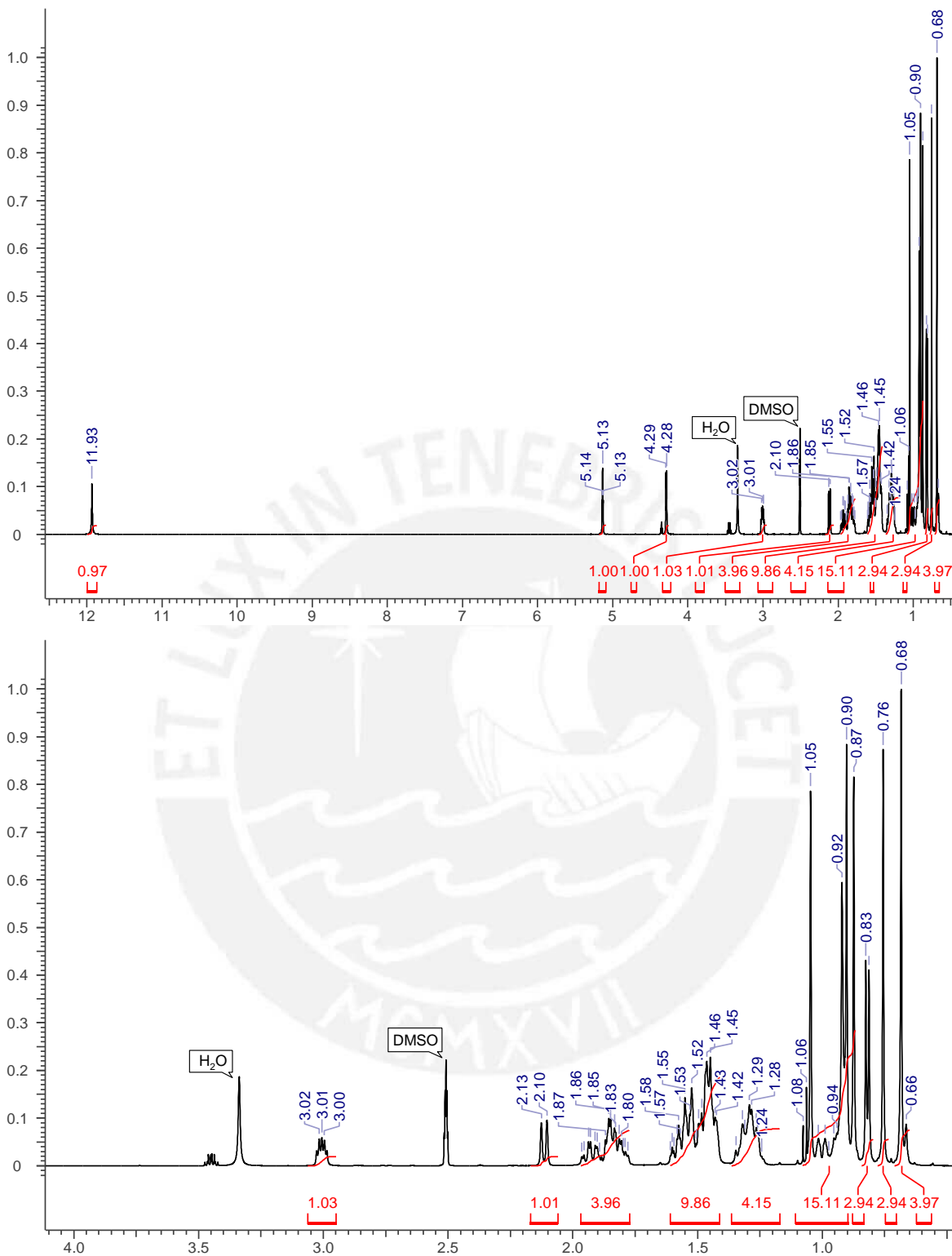


Figura 34. Espectro ^1H -RMN del cristal C (arriba) ampliación (abajo).

Se construyó la Tabla 14 con los resultados de la integración de los espectros de ^1H -RMN de los cristales A, B y C.

Tabla 14. Integración de las señales de los espectros de ^1H de los cristales obtenidos

Cristal A		Cristal B		Cristal C	
ppm	Integración	ppm	Integración	ppm	Integración
[11,87 - 11,99]	0,98	[11,87 - 11,99]	0,97	[11,87 - 12,00]	0,97
[5,09 - 5,18]	1,01	[5,09 - 5,18]	1,00	[5,09 - 5,18]	1,00
[4,26 - 4,32]	1,00	[4,25 - 4,32]	1,00	[4,25 - 4,32]	1,00
[2,95 - 3,06]	1,03	[2,95 - 3,07]	1,03	[2,95 - 3,06]	1,03
[2,06 - 2,17]	1,02	[2,06 - 2,17]	1,02	[2,06 - 2,17]	1,01
[1,77 - 1,97]	4,00	[1,77 - 1,97]	3,97	[1,77 - 1,97]	3,96
[1,41 - 1,61]	9,96	[1,41 - 1,61]	9,86	[1,41 - 1,61]	9,86
[1,17 - 1,36]	4,18	[1,17 - 1,36]	4,15	[1,17 - 1,36]	4,15
[0,87 - 1,08]	15,20	[0,87 - 1,08]	15,10	[0,87 - 1,08]	15,11
[0,80 - 0,84]	2,87	[0,80 - 0,84]	2,93	[0,80 - 0,84]	2,94
[0,74 - 0,78]	2,91	[0,73 - 0,78]	2,93	[0,73 - 0,78]	2,94
[0,66 - 0,71]	3,92	[0,65 - 0,71]	3,95	[0,65 - 0,71]	3,97
Total H	48	Total H	48	Total H	48
[2,48 - 2,52]	DMSO	[2,49 - 2,52]	DMSO	[2,49 - 2,52]	DMSO
[3,30 - 3,38]	H ₂ O	[3,30 - 3,39]	H ₂ O	[3,29 - 3,38]	H ₂ O

Mediante la integración de las señales en los espectros, se determinaron 48 átomos de hidrógeno correspondientes a la estructura del ácido ursólico (*Figura 35*), ya que el área debajo de un pico es proporcional al número de átomos de hidrógenos que generan la señal.

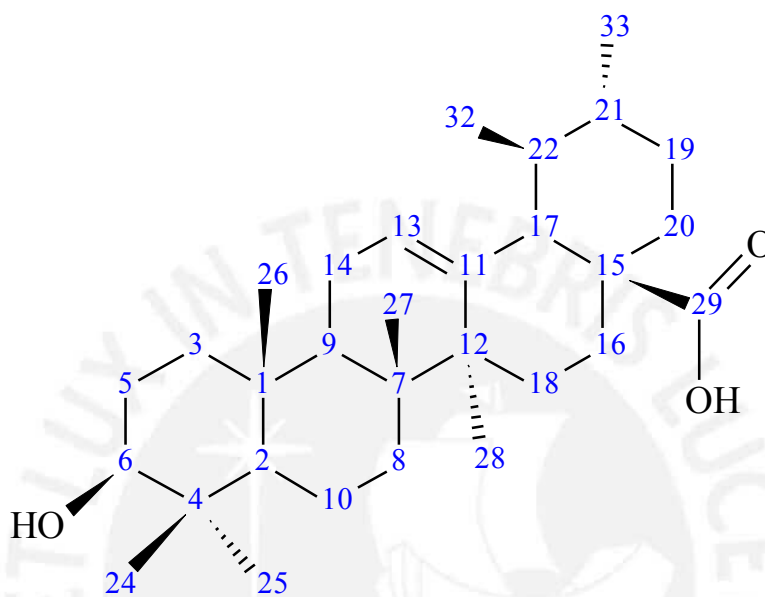


Figura 35. Estructura del ácido ursólico $C_{30}H_{48}O_3$.

Como los tres espectros de 1H son iguales se analizará las señales con el espectro de A. Se realizaron ampliaciones de la zona que se encuentra por encima de los 4 ppm (*Figura 36*), el singulete a 11,93 ppm es la señal del protón del ácido carboxílico (CO-OH) y se encuentra en campo bajo por el desapantallamiento que ejercen los oxígenos sobre el protón e integra para uno. La señal a 5,13 ppm es un triplete que corresponde al protón unido al 13C que tiene un doble enlace y solo acopla con los protones del 14C e integra para uno. La señal del protón del grupo hidroxilo (-OH) es la que se encuentra a 4,285 ppm ya que el experimento se realizó en DMSO, este solvente permite que pueda acoplarse el protón del grupo hidroxilo con el protón del 6C dando un doblete que integra para uno. La señal en 3,02 ppm corresponde al protón del 6C quien acopla con los protones del 5C, está a campo bajo por el desacoplamiento del grupo hidroxilo e integra también para uno.

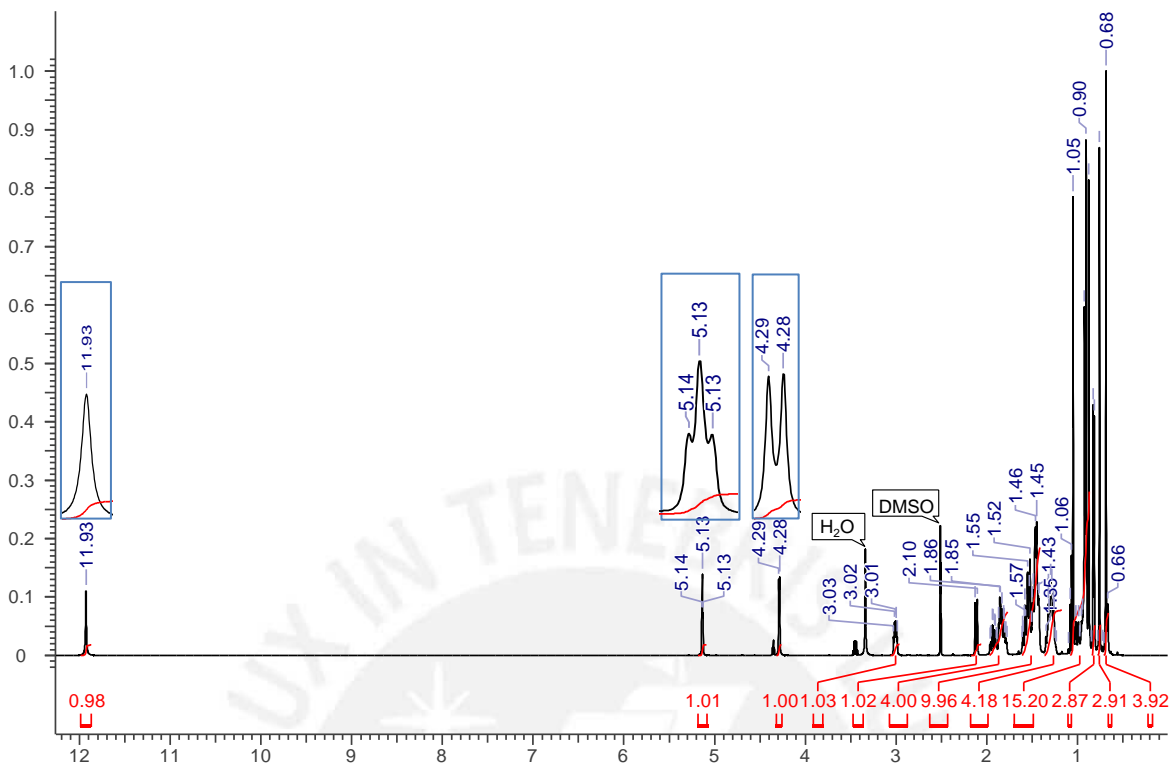


Figura 36. Ampliación de las señales del espectro de ^1H .

Las demás señales son más complejas de analizar pero se realizará más adelante con ayuda de otros espectros.

Es posible que el grupo hidróxido del ácido ursólico haya formado enlaces de puente de hidrógeno con el etanol que se usó para realizar la recristalización, es por eso que al momento de formarse los cristales también se encuentran moléculas de etanol solvatando al AU dentro del cristal. Esta observación explica la presencia de las pequeñas señales a 4,35 ppm (OH), 3,45 ppm (CH_2) y 1,06 ppm (CH_3) que corresponden al etanol. Esto también se observa en las señales en el espectro de ^{13}C a 56,49 ppm (CH_2) y 19,03 ppm (CH_3).

En las Figuras 37-39 se presenta los espectros de ^{13}C -RMN de los cristales A, B y C. Para poder comparar los tres espectros obtenidos se construyó la Tabla 15 con todas las señales observadas. En total se tiene 32 señales de las cuales dos corresponden al etanol (56,49 ppm y 19,03 ppm) y las otras 30 al ácido ursólico.

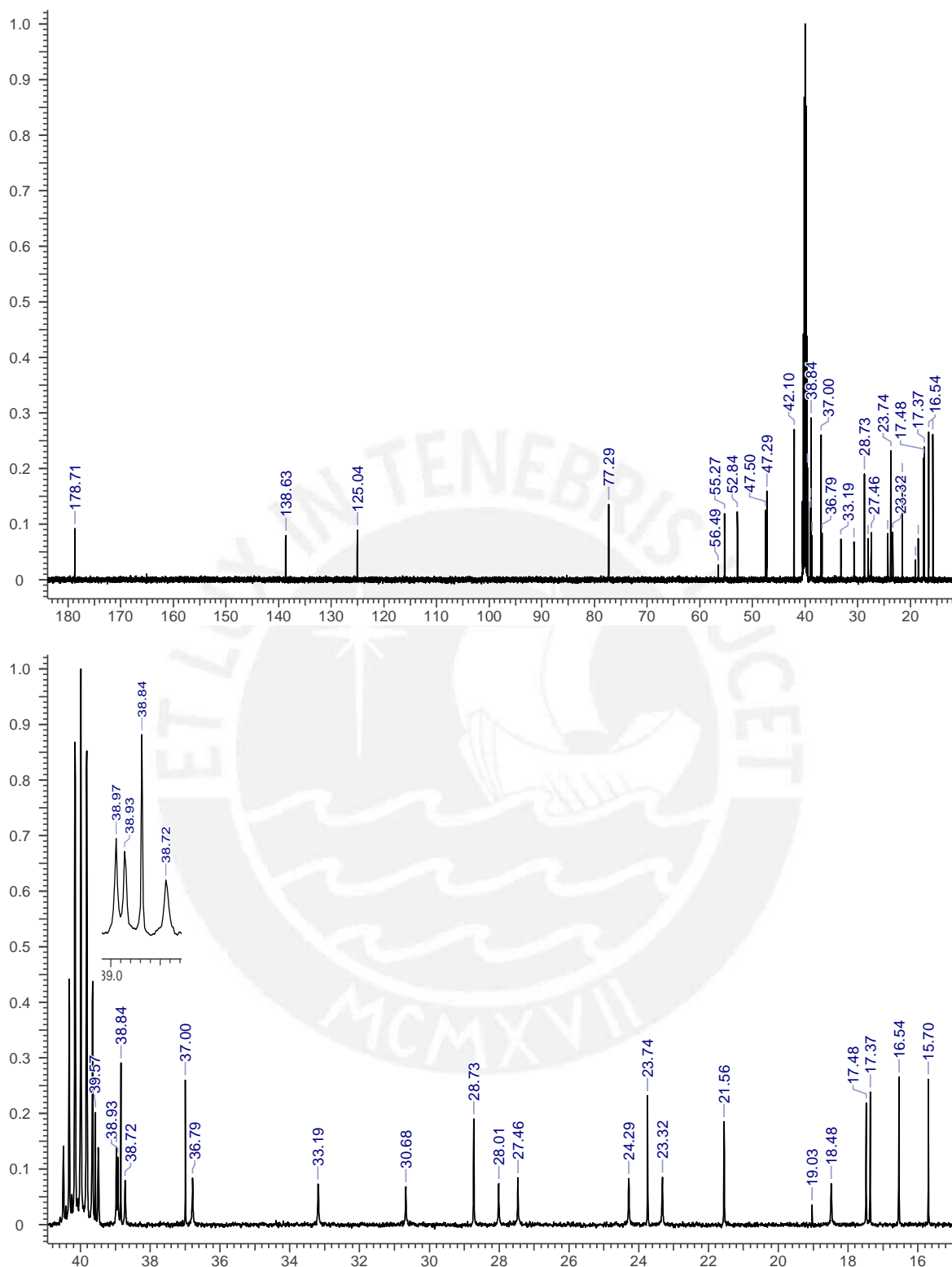


Figura 37. Espectro ^{13}C -RMN del cristal A (arriba) ampliación (abajo).

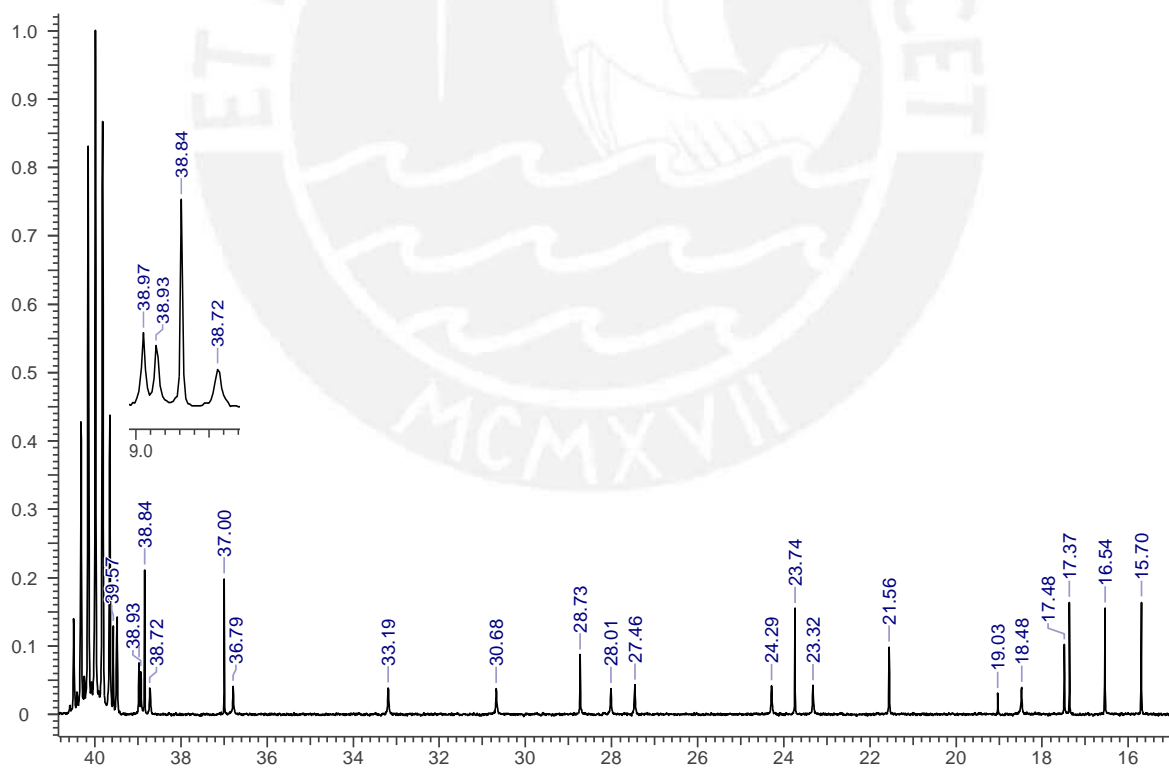
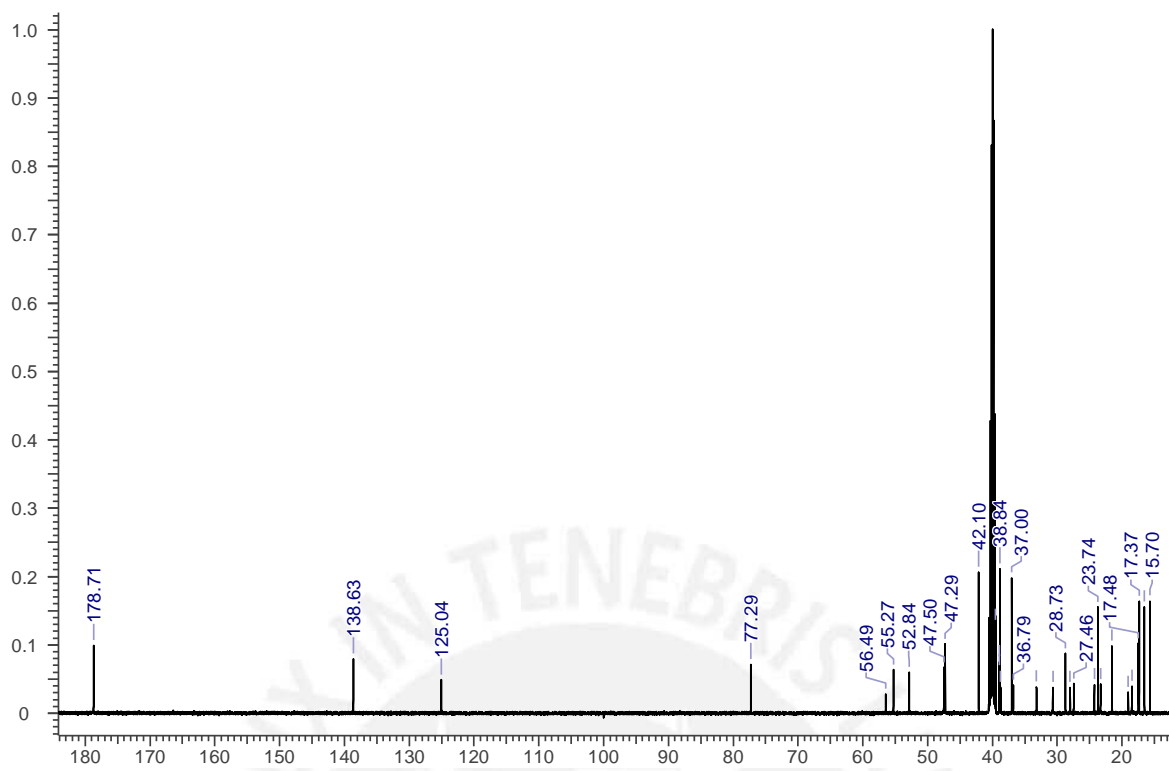


Figura 38. Espectro ^{13}C -RMN del cristal B (arriba) ampliación (abajo).

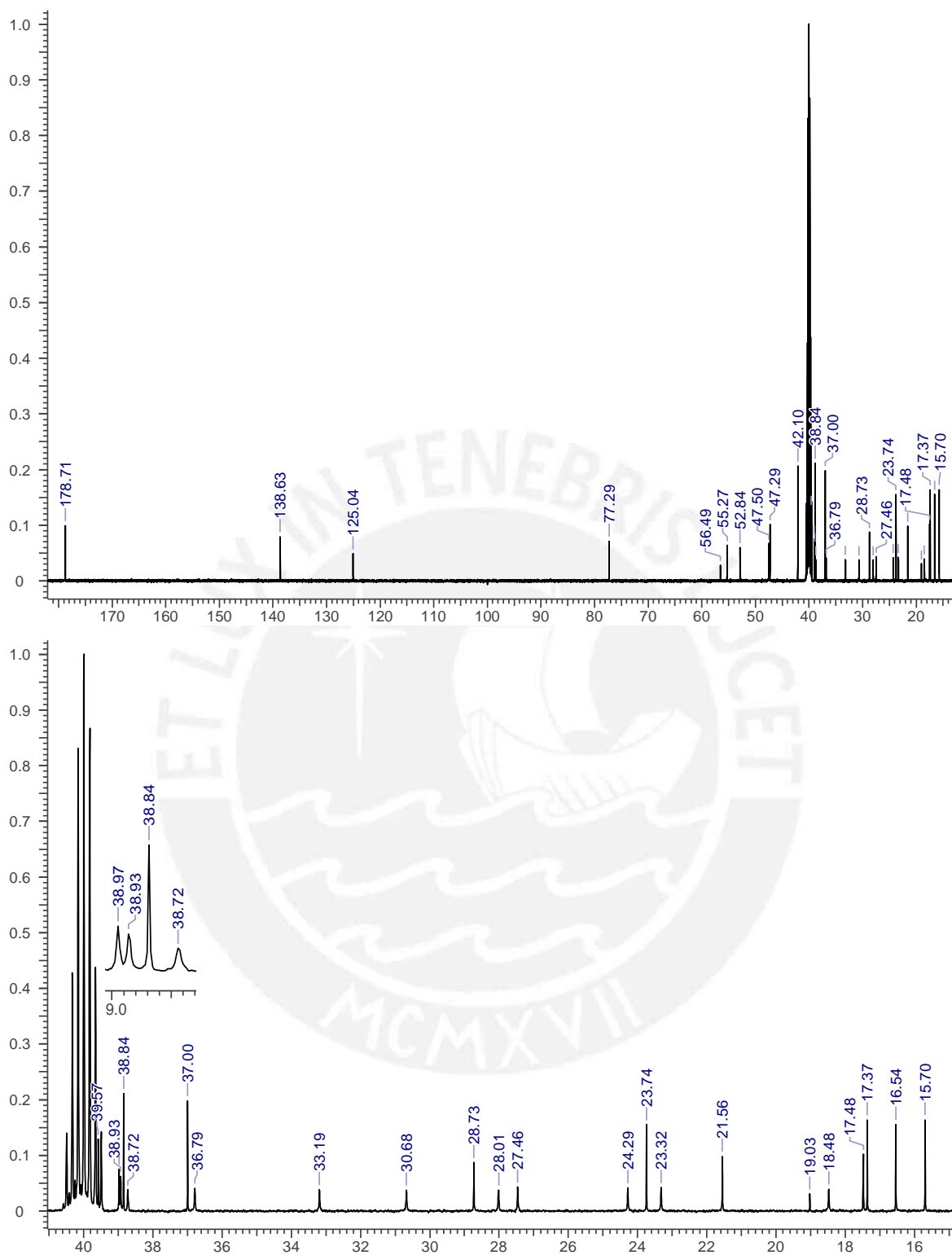


Figura 39. Espectro ^{13}C -RMN del cristal C (arriba) ampliación (abajo).

Tabla 15. Señales de los espectros de ^{13}C de los cristales obtenidos

Cristales A Desplazamiento en ppm	Cristales B Desplazamiento en ppm	Cristales C Desplazamiento en ppm
178,71	178,71	178,71
138,63	138,63	138,63
125,04	125,04	125,04
77,29	77,29	77,29
56,49	56,49	56,49
55,27	55,27	55,27
52,84	52,84	52,84
47,50	47,50	47,50
47,29	47,29	47,29
42,10	42,10	42,10
39,57	39,57	39,57
38,97	38,97	38,97
38,93	38,93	38,93
38,84	38,84	38,84
38,72	38,72	38,72
37,00	37,00	37,00
36,79	36,79	36,79
33,19	33,19	33,19
30,68	30,68	30,68
28,73	28,73	28,73
28,01	28,01	28,01
27,46	27,46	27,46
24,29	24,29	24,29
23,74	23,74	23,74
23,32	23,32	23,32
21,56	21,56	21,56
19,03	19,03	19,03
18,48	18,48	18,48
17,48	17,48	17,48
17,37	17,37	17,37
16,54	16,54	16,54
15,70	15,70	15,70

Los tres espectros presentas las mismas señales y para identificar el tipo y la cantidad de carbonos diferentes se utilizaron los espectros DEPT 45, 90 y 135 del cristal A.

Se identificaron siete señales ausentes en el espectro DEPT 45 que corresponden a los carbonos cuaternarios (Figura 40).

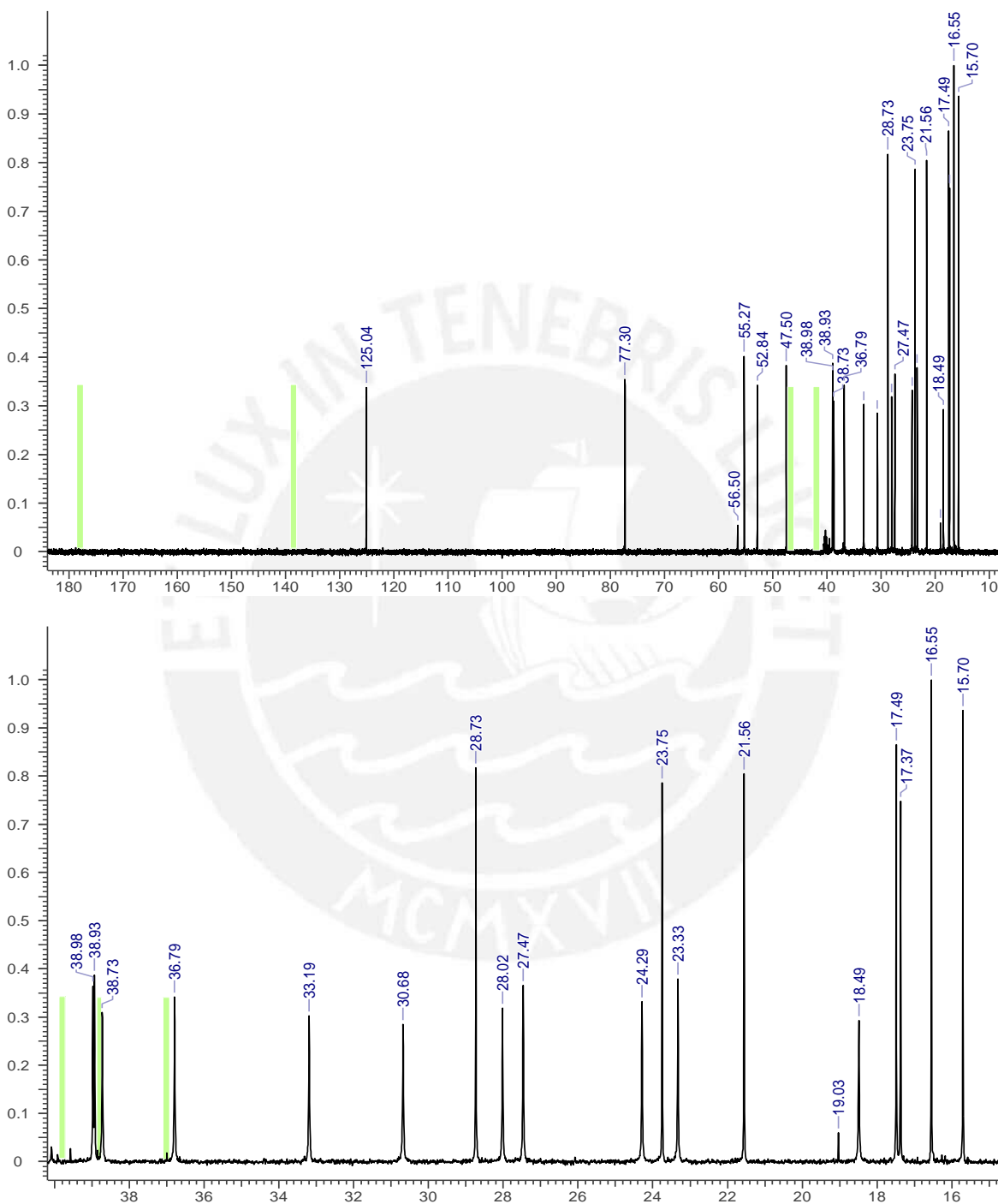


Figura 40. Espectro DEPT 45 de los cristales A.

Para determinar la cantidad de los carbonos terciarios se analizó el espectro DEPT 90, este experimento produce un espectro que contiene sólo carbonos con un único protón (CH), se encontraron siete señales de este tipo de carbono (*Figura 41*).

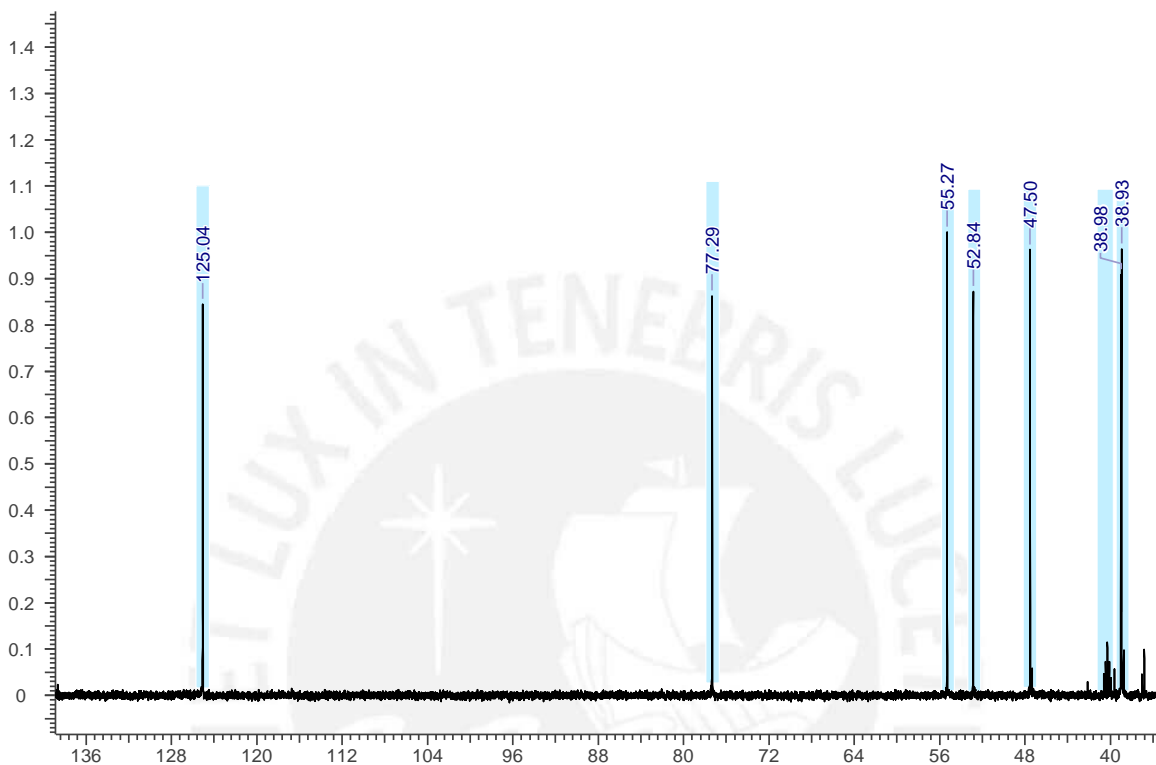


Figura 41. Espectro DEPT 90 de los cristales A.

Los carbonos primarios y secundarios se ubican al analizar el espectro DEPT 135. Las señales positivas corresponden a los carbonos primarios (CH₃) y terciarios (CH) y las señales negativas corresponde a los carbonos secundarios (CH₂). Se encontraron nueve señales en la zona negativa que corresponden a los carbonos secundarios (naranja) y en la zona positiva 14 señales, de las cuales siete corresponden a los carbonos terciarios (celeste) que se identificaron en el espectro DEPT 90 y las otras siete señales corresponden a los carbonos primarios (lila) (*Figura 42*).

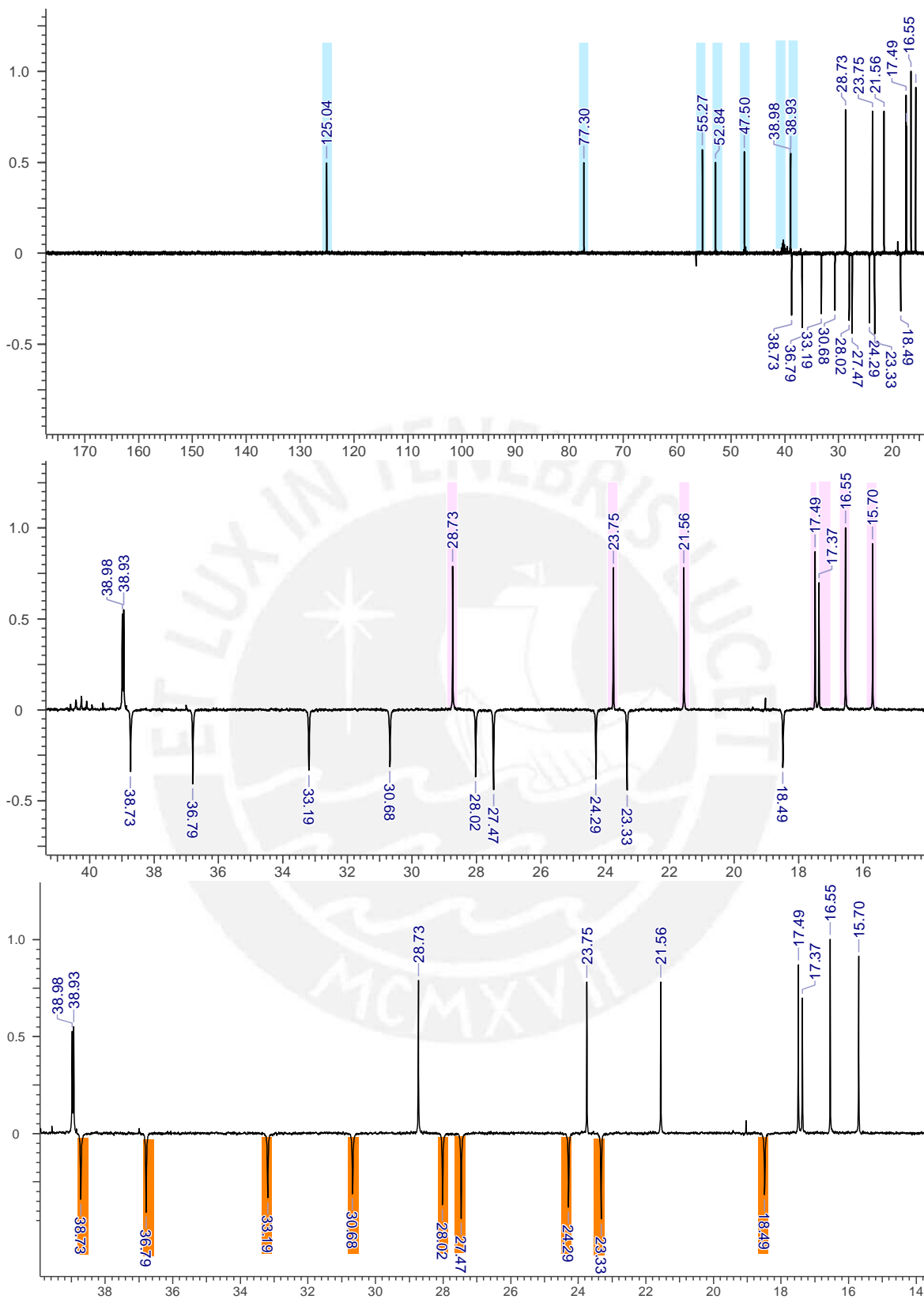


Figura 42. Espectro DEPT 135 CH₃ (lila), CH₂ (naranja) y CH (celeste).

Con todas las señales obtenidas de los espectros tanto de ^{13}C y DEPT 45, 90 y 135 se construyó la Tabla 16 y se identificó la cantidad de carbonos cuaternarios, terciarios, primarios y secundarios y además a los ppm que se encuentran.

Tabla 16. *Desplazamiento de los diferentes tipos de carbonos*

Espectro ^{13}C	Espectro DEPT 45	Espectro DEPT 90	Espectro DEPT 135	Tipo de Carbono
178,71				C
138,63				C
125,04	125,04	125,04	125,04	CH
77,29	77,30	77,29	77,30	CH
55,27	55,27	55,27	55,27	CH
52,84	52,84	52,84	52,84	CH
47,50	47,50	47,50	47,50	CH
47,29				C
42,10				C
39,57				C
38,97	38,98	38,98	38,98	CH
38,93	38,93	38,93	38,93	CH
38,84				C
38,72	38,73		38,73	CH ₂
37,00				C
36,79	36,79		36,79	CH ₂
33,19	33,19		33,19	CH ₂
30,68	30,68		30,68	CH ₂
28,73	28,73		28,73	CH ₃
28,01	28,02		28,02	CH ₂
27,46	27,47		27,47	CH ₂
24,29	24,29		24,29	CH ₂
23,74	23,75		23,75	CH ₃
23,32	23,33		23,33	CH ₂
21,56	21,56		21,56	CH ₃
18,48	18,49		18,49	CH ₂
17,48	17,49		17,49	CH ₃
17,37	17,37		17,37	CH ₃
16,54	16,55		16,55	CH ₃
15,70	15,70		15,70	CH ₃

Se identificaron en total 30 carbonos, de los cuales siete son cuaternarios (C ●), siete terciarios (CH ●), nueve secundarios (CH₂ ●) y siete primarios (CH₃ ●), lo que coincide con la estructura del ácido ursólico (*Figura 43*).

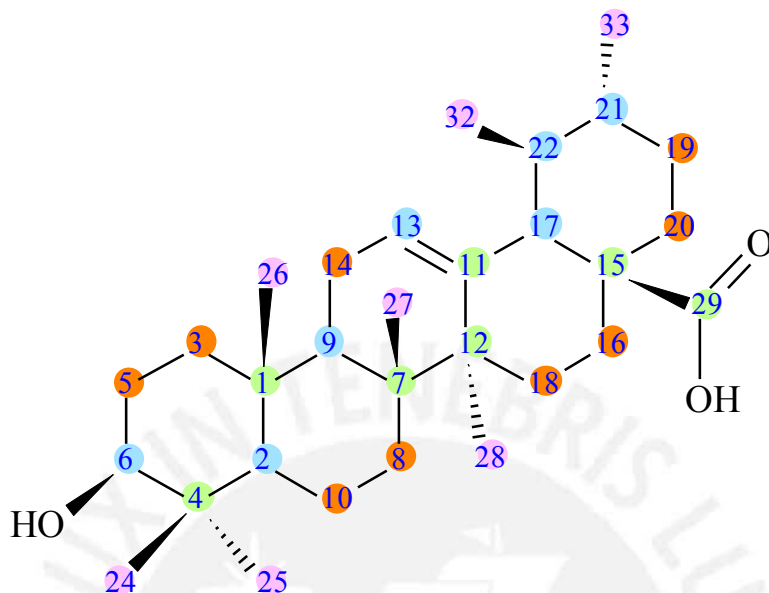


Figura 43. Estructura del ácido ursólico.

Algunas de las señales son características y se puede identificar a que número de carbono pertenece, por ejemplo las señales de carbono cuaternario que se encuentran a campo bajo a 178,71 ppm pertenece al carbono 29C debido al desapantallamiento por ser parte del grupo ácido, a 138,63 ppm corresponde al carbono 11C debido al desapantallamiento del doble enlace. Otras dos señales características son las de los carbono terciarios 13C en 125,04 ppm que forma el doble enlace y 6C a 77,29 ppm debido al desapantallamiento del grupo hidroxilo.

Con los espectros de RMN 2D se identificaron todas las señales, lo que permitió asignar a qué número de carbono y protón pertenecen y cómo se correlacionan. El experimento de correlación heteronuclear directa HSQC, nos permite identificar qué protones están enlazados a qué carbono, además de eso proporciona información del tipo de carbono al igual que los espectros DEPT, las señales negativas de color azul son las del CH₂ las señales positivas de color rojo son de carbonos primarios y terciarios (*Figura 44*).

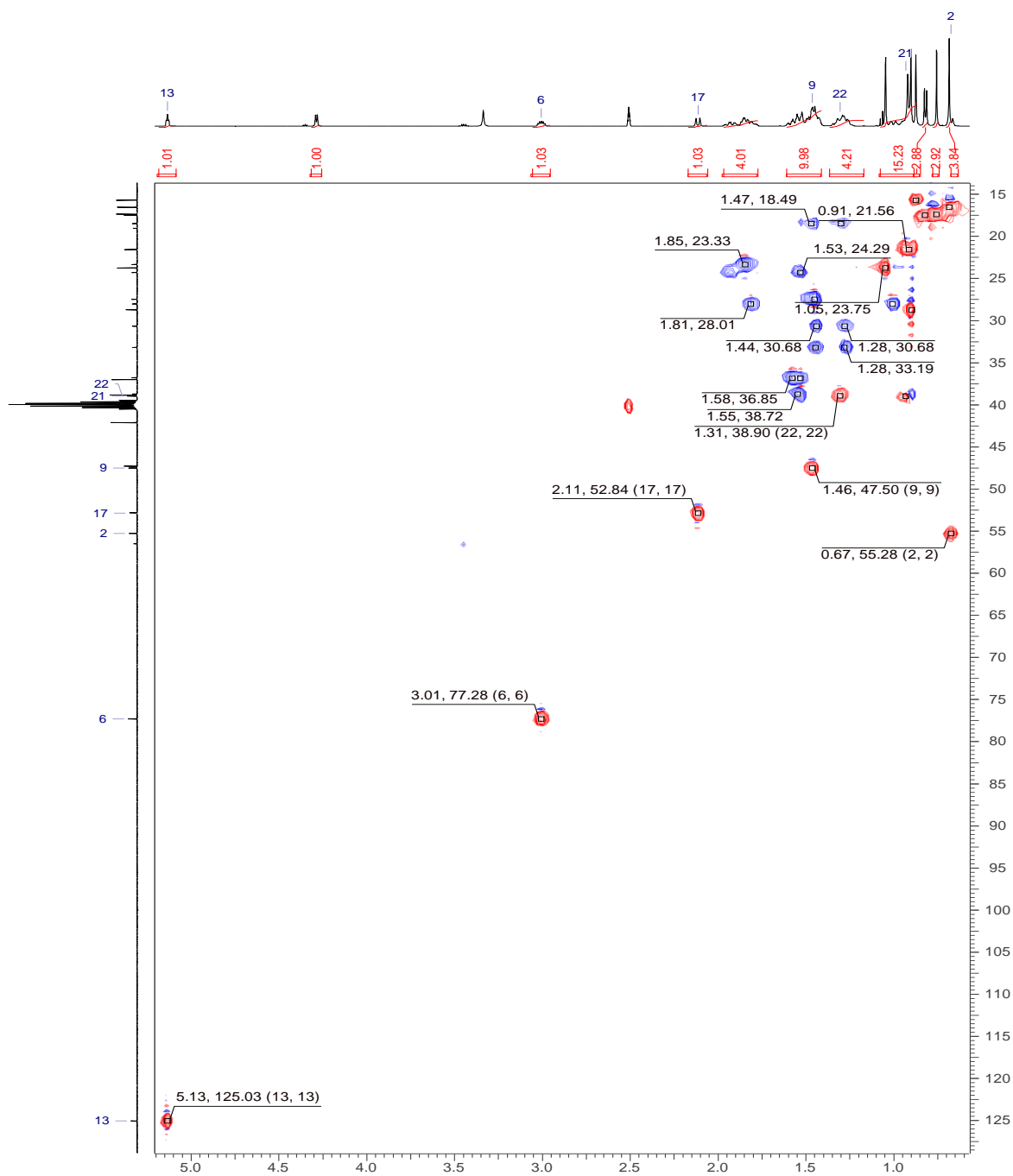


Figura 44. Espectro HSQC de los cristales A.

Se identificaron todas las señales de los protones y al tipo de carbono que le pertenece, se atribuyeron algunas señales, con estos datos se construyó la Tabla 14. En el espectro HSQC se puede apreciar que los carbonos secundarios (señales de color azul) presentan dos correlaciones para un único carbono esto es debido que sus protones geminales no son equivalentes uno podría estar en posición axial y el otro en ecuatorial.

Hasta el momento se tiene 48 protones (uno pertenece al grupo hidroxilo y uno al grupo ácido carboxílico), 30 carbonos de los cuales siete son primarios, nueve secundarios, siete terciarios y siete cuaternarios, además se conoce el desplazamiento de estos carbonos y de sus respectivos protones. También se determinó el desplazamiento de los carbonos 29C, 13C, 11C y 6C; de los protones de los grupo hidroxilo, carboxílico y de los unidos a los carbono 6C y 13C. Para identificar las demás señales se analizaron los espectros COSY (*Figura 45*) y HMBC (*Figura 47*) lo que permitió determinar cómo están correlacionadas.

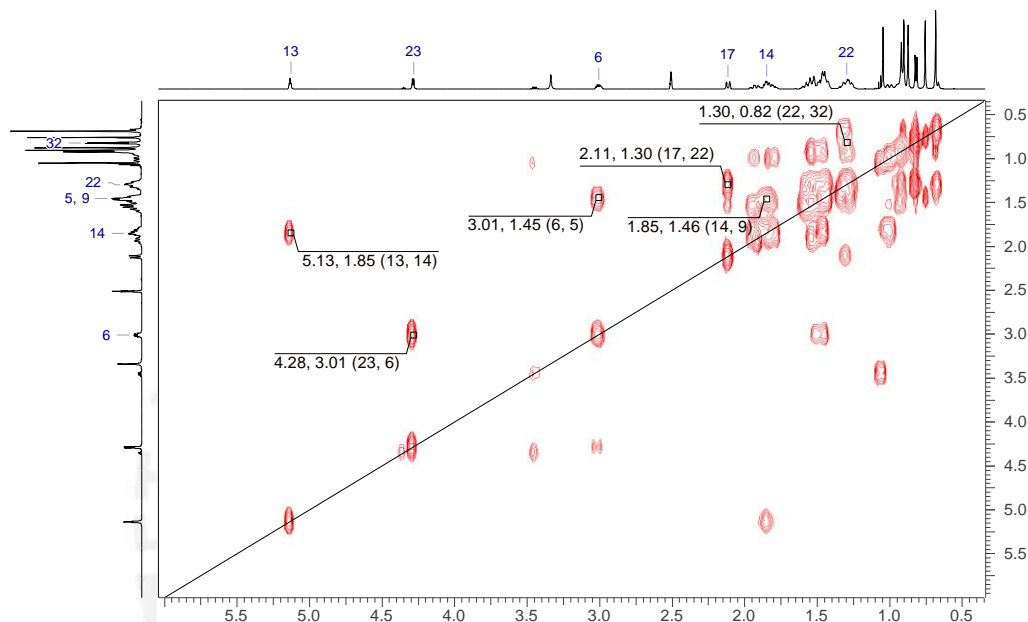


Figura 45. Espectro COSY de los cristales A.

El espectro COSY permitió determinar cómo están correlacionadas algunas señales, analizando la correlación del 17C-22C-32C permite diferenciar de su isómero ya que si no hubiese una correlación del 22C con el 32C la molécula no sería ácido ursólico (*Figura 46*).

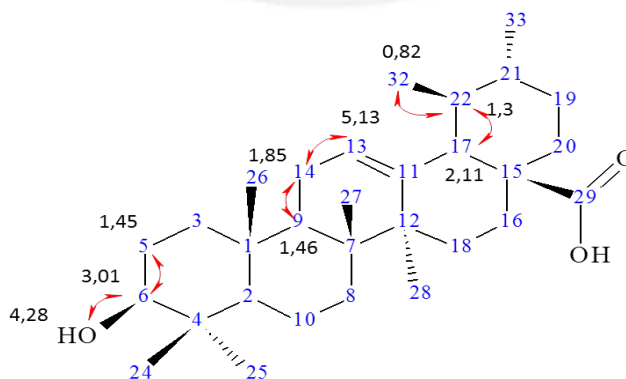


Figura 46. Correlación COSY.

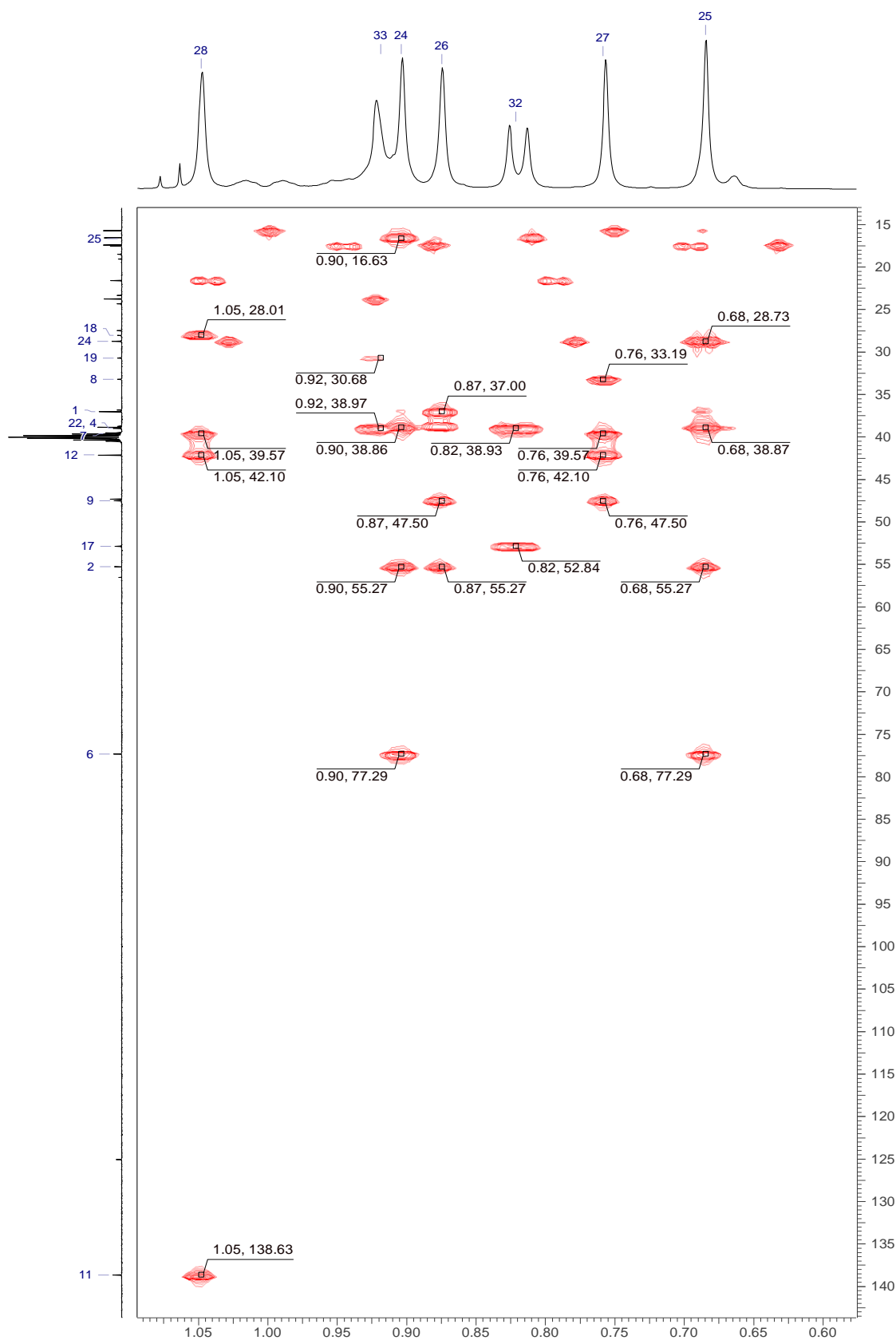


Figura 47. Espectro HMBC de los cristales A.

El espectro HMBC proporciona información de la correlación heteronuclear de largo alcance, lo cual permitió determinar cómo están correlacionadas las señales. Para esto se analizó las correlaciones de los protones de los metilos con los carbonos a una distancia de dos y tres enlaces. El análisis de este espectro también permitió diferenciar AU de AO, el hecho que no se tenga una correlación entre el protón del 33C con el 32C implica que el 33C no se encuentra enlazado a 21C y el hecho que se tenga una correlación de los protones de 32C con en carbono 22C implica que el 32C se encuentra enlazado a 22C. Esto afirma que la molécula purificada es AU (Figura 48).

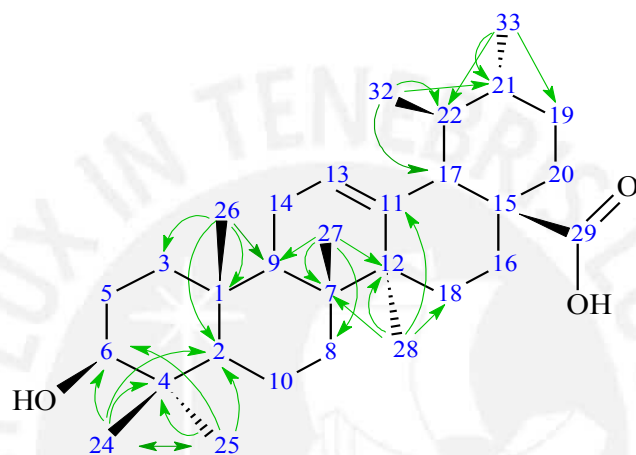


Figura 48. Correlación HBMC.

Integrando la información de COSY y HMBC (Figura 49) se puede atribuir las señales correspondientes a cada carbono (Tabla 17).

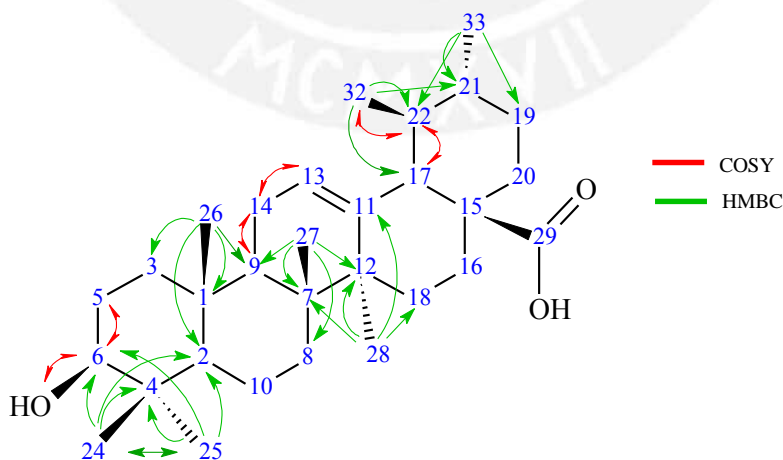


Figura 49. Correlación COSY y HMBC.

Tabla 17. Asignación de las señales de ^{13}C y los ^1H unidos a el

Número de carbono	Tipo de Carbono	Desplazamiento de ^{13}C en ppm	Desplazamiento de ^1H en ppm
29	C	178,71	
11	C	138,63	
13	CH	125,04	5,13
6	CH	77,29	3,01
2	CH	55,27	0,67
17	CH	52,84	2,11
9	CH	47,50	1,46
15	C	47,29	
12	C	42,10	
7	C	39,57	
21	CH	38,97	0,93
22	CH	38,93	1,3
4	C	38,84	
3	CH ₂	38,72	1,55
1	C	37,00	
20	CH ₂	36,79	1,58 1,54
8	CH ₂	33,19	1,45 1,28
19	CH ₂	30,68	1,44 1,28
24	CH ₃	28,73	0,9
18	CH ₂	28,01	1,81 1,01
5	CH ₂	27,46	1,45
16	CH ₂	24,29	1,53
28	CH ₃	23,74	1,05
14	CH ₂	23,32	1,85
33	CH ₃	21,56	0,91
10	CH ₂	18,48	1,47 1,30
32	CH ₃	17,48	0,82
27	CH ₃	17,37	0,76
25	CH ₃	16,54	0,68
26	CH ₃	15,70	0,87

Con el análisis de toda esta información se puede afirmar que los cristales que se obtuvieron por recristalización del extracto de la flor de arena, es ácido ursólico.

Se realizó una comparación de los desplazamientos de las señales de los carbonos obtenidos y los reportados por Uddin et al. (2011) (Tabla18).

Tabla 18. Señales obtenidas de ^{13}C -RMN (ppm) y referencia

Número de carbono	Tipo de Carbono	Desplazamiento de ^{13}C obtenido	Desplazamiento de ^{13}C referencia*
29	C	178,71	180,0
11	C	138,63	139,7
13	CH	125,04	125,6
6	CH	77,29	78,1
2	CH	55,27	55,8
17	CH	52,84	53,5
9	CH	47,50	48,3
15	C	47,29	48,0
12	C	42,10	42,5
7	C	39,57	40,0
21	CH	38,97	39,1
22	CH	38,93	39,5
4	C	38,84	38,4
3	CH ₂	38,72	38,4
1	C	37,00	37,4
20	CH ₂	36,79	37,3
8	CH ₂	33,19	33,6
19	CH ₂	30,68	31,1
24	CH ₃	28,73	28,8
18	CH ₂	28,01	28,7
5	CH ₂	27,46	28,1
16	CH ₂	24,29	24,9
28	CH ₃	23,74	23,8
14	CH ₂	23,32	23,6
33	CH ₃	21,56	21,4
10	CH ₂	18,48	18,8
32	CH ₃	17,48	17,5
27	CH ₃	17,37	17,4
25	CH ₃	16,54	16,6
26	CH ₃	15,70	15,7

* Referencia (Uddin et al., 2011)

Como se observa en la Tabla 18 existe una correlación entre los datos obtenidos y los determinados por Uddin.

5 Conclusión

Se cuantificó de manera exitosa el contenido total de ácido ursólico (4,864 %) en la planta medicinal conocida comercialmente como flor de arena, es la especie con mayor contenido de ácido ursólico reportado hasta el momento, entre la familia de las Lamiaceae y entre algunas otras especies. Se logró desarrollar tres métodos para obtener cristales de ácido ursólico de una manera fácil, sin la necesidad de métodos cromatográficos preparativos en sílica gel, ni uso de solventes tóxicos, lo que convierte a estos métodos no solo en fáciles, sino también en económicos. Los resultados muestran que la flor de arena es una importante biofuente para la obtención de ácido ursólico de calidad estándar o para su empleo en estudios de propiedades bioactivas y síntesis de derivados con potencial terapéutico.

La investigación fue aceptada para su publicación en la Revista Colombiana de Química la cual se encuentra indexada en las bases de datos SCOPUS, PUBLINDEX, DOAJ, SCIELO, LATINDEX y REDALYC.

6 Agradecimientos

Mis agradecimientos al Consejo Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el apoyo económico y al laboratorio de cromatografía y espectrometría de la UNSAAC por facilitar el acceso al microscopio óptico.

7 Bibliografía

- Belding, R. D., Blankenship, S. M., Young, E., & Leidy, R. B. (1998). Composition and Variability of Epicuticular Waxes in Apple Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(3), 348–356.
- Buschhaus, C., & Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 841–853. doi: 10.1093/jxb/erq366
- Chandramu, C., Manohar, R. D., Krupadanam, D. G. L., & Dashavantha, R. V. (2003). Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy Research*, 17(2), 129–134. doi: 10.1002/ptr.1088
- Dar, B. A., Lone, A. M., Shah, W. A., & Qurishi, M. A. (2016). Synthesis and screening of ursolic acid-benzylidene derivatives as potential anti-cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 111, 26–32. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.026
- Deanna, M. y Masahia, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas, Venezuela: Torino.
- Fan, J.-P., Kong, T., Zhang, L., Tong, S., Tian, Z.-Y., Duan, Y.-H., & Zhang, X.-H. (2011). Solubilities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Four Solvents from (283.2 to 329.7 K). *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(5), 2723–2725. doi: 10.1021/je101309a
- Fan, J.-P., Kong, T., Zhang, X.-H., Zhang, L., Tong, S., Tian, Z.-Y., & Zhu, J.-H. (2012). Solubilities of oleanolic acid and ursolic acid in (ethanol + water) mixed solvents from T = (292.2 to 328.2 K). *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 47, 372–375. doi: 10.1016/j.jct.2011.11.017
- Frighetto, R. T. S., Welendorf, R. M., Nigro, E. N., Frighetto, N., & Siani, A. C. (2008). Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 106(2), 767–771. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.06.003
- Goto, T., Takahashi, N., Hirai, S., & Kawada, T. (2010). Various Terpenoids Derived from Herbal and Dietary Plants Function as PPAR Modulators and Regulate

Carbohydrate and Lipid Metabolism. *PPAR Research*, 2010, 1–9. doi: 10.1155/2010/483958

He, X., & Liu, R. H. (2007). Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4366–4370. doi: 10.1021/jf063563o

Janicsák, G., Veres, K., Zoltán Kakasy, A., & Máthé, I. (2006a). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(5), 392–396. doi: 10.1016/j.bse.2005.12.004

Janicsák, G., Veres, K., Zoltán Kakasy, A., & Máthé, I. (2006b). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(5), 392–396. doi: 10.1016/j.bse.2005.12.004

Jetter, R., & Schäffer, S. (2001). Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. *Plant Physiology*, 126(4), 1725–1737. doi: 10.1104/pp.126.4.1725

Kashyap, D., Tuli, H. S., & Sharma, A. K. (2016). Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences*, 146, 201–213. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.017

Kubo, I., & Matsumoto, A. (1984). Secreted oleanolic acid on the cuticle *Olea europaea* (Oleaceae); a chemical barrier to fungal attack. *Experientia*, 40(9), 937–938. doi: 10.1007/BF01946446

Mallavadhani, U. V., Mahapatra, A., Jamil, K., & Reddy, P. S. (2004). Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-*O*-Lipophilic Chains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(10), 1576–1579. doi: 10.1248/bpb.27.1576

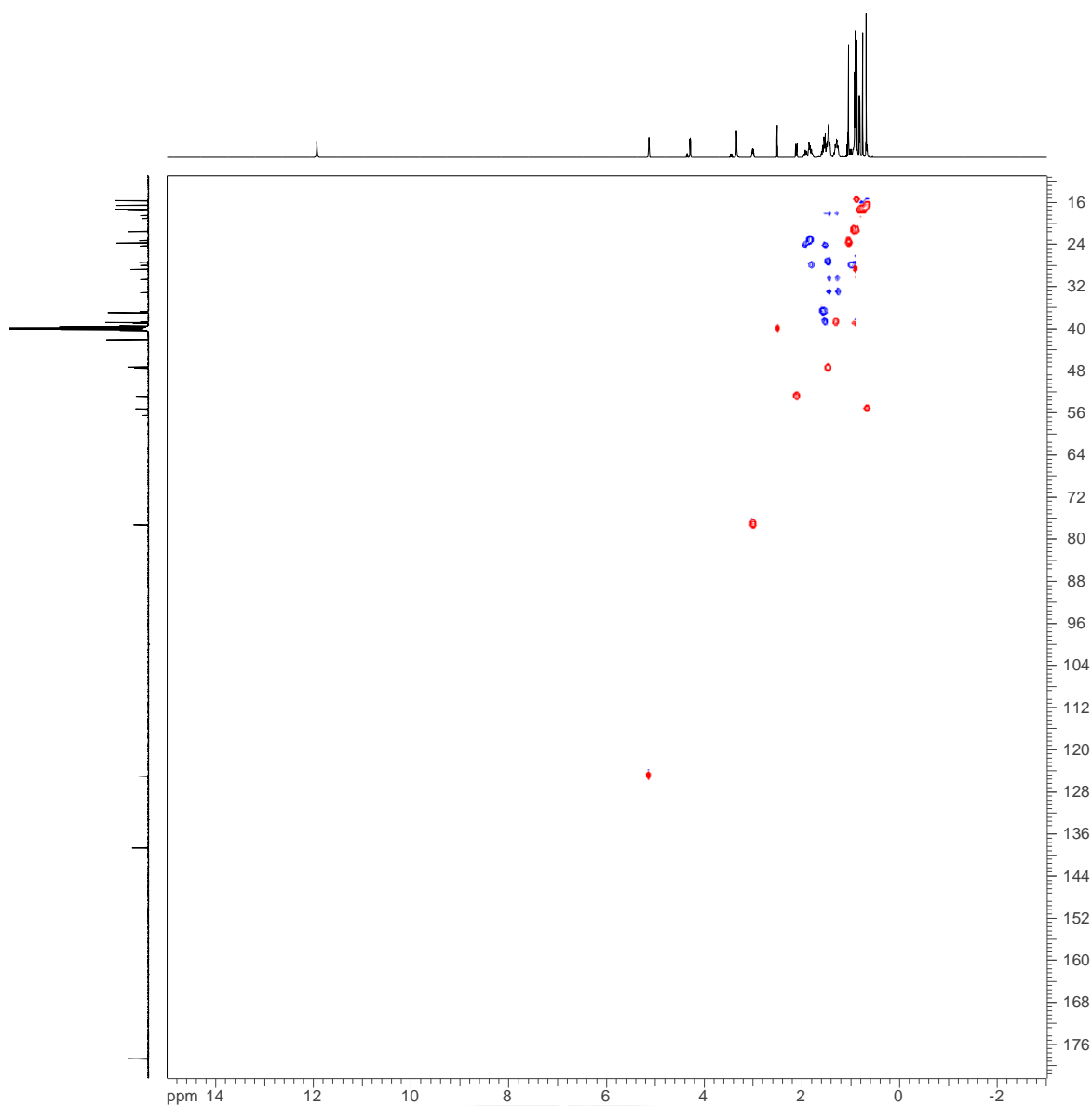
Martelanc, M., Naumoska, K., & Vovk, I. (2016). Determination of common triterpenoids and phytosterols in vegetable waxes by HPTLC—densitometry and HPTLC—image analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(5–6), 312–321. doi: 10.1080/10826076.2016.1165576

- Ministerio de Agricultura. (2012). Perú Forestal en números año 2012. Recuperado de <http://sinia.minam.gob.pe/documentos/peru-forestal-numeros-ano-2012>
- Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(2), 131–143. doi: 10.1016/j.abb.2010.09.028
- Mostacero León, J., & Mejía Coico, F. (2009). *Fanerógamas del Perú: taxonomía, utilidad y ecogeografía*. Trujillo, Perú: CONCYTEC.
- Mučaji, P., & Nagy, M. (2011). Contribution to the TLC separation of ursolic and oleanolic acid mixture. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 58(1), 56–61. doi: 10.2478/v10219-011-0006-0
- Oprean, C., Mioc, M., Csányi, E., Ambrus, R., Bojin, F., Tatu, C., Soica, C. (2016). Improvement of ursolic and oleanolic acids antitumor activity by complexation with hydrophilic cyclodextrins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1095–1104. doi: 10.1016/j.biopha.2016.08.030
- Radoslaw Kowalski. (2007). Studies of Selected Plant Raw Materials as Alternative Sources of Triterpenes of Oleanolic and Ursolic Acid Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 656–662. doi: 10.1021/jf0625858
- Rodríguez, J. A., Astudillo, L., & Schmeda-Hirschmann, G. (2003). Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacological Research*, 48(3), 291–294. doi: 10.1016/S1043-6618(03)00155-5
- Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Eisenreich, W. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1158–1163. doi: 10.1073/pnas.032658999
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., & Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal*, 295(Pt 2), 517–524.

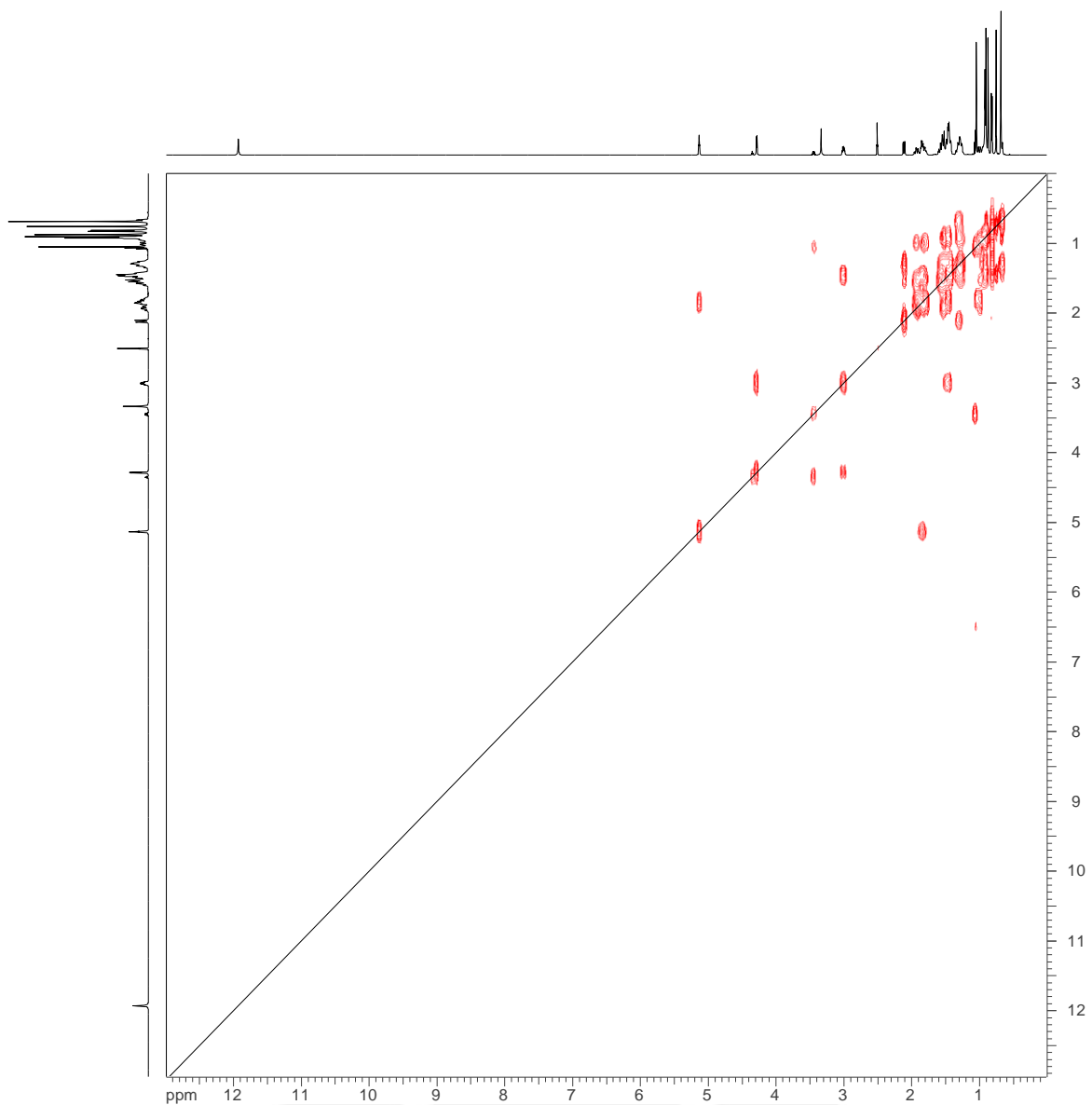
- Simon, A., Delage, C., Saux, M., Chulia, A. J., Najid, A., & Rigaud, M. (1992). Structure of ursolic acid ethanol solvate. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 48(4), 726–728. doi: 10.1107/S0108270191012581
- Srivastava, P., Kasoju, N., Bora, U., & Chaturvedi, R. (2011). Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in In vitro cell cultures of *Lantana camara* L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6), 1038–1046. doi: 10.1007/s12257-010-0054-7
- Szakiel, A., Pączkowski, C., Pensec, F., & Bertsch, C. (2012). Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), 263–284. doi: 10.1007/s11101-012-9241-9
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., & Osbourn, A. (2014). Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 225–257. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120229
- Uddin, G. H. W., Siddiqui, B. S. H., Alam, M., Sadat, A., Ahmad, A., & Uddin, A. (2011). Chemical constituents and phytotoxicity of solvent extracted fractions of stem bark of *Grewia optiva* Drummond ex burret. *Middle-East. J Sci Res*, 8, 85–91.
- Ulloa Ulloa, C., Zarucchi, J. L., & León, B. (2004). *Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003*. Trujillo, Perú: Museo de Historia Natural.
- Vasconcelos, M. A. L., Royo, V. A., Ferreira, D. S., Crotti, A. E. M., e, S. M. L. A., Carvalho, J. C. T., Cunha, W. R. (2014). In vivo Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(7–8), 477–482. doi: 10.1515/znc-2006-7-803
- Vogel, A. I., & Jeffery, G. H. (1989). *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. Longman Scientific & Technical.
- Wang, H., Wang, Z., & Guo, W. (2008). Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officinalis* (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 328–332. doi: 10.1016/j.indcrop.2008.03.004

- Xu, Q. A. (2013). *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*. New Jersey, United States: John Wiley & Sons.
- Yamaguchi, H., Noshita, T., Kidachi, Y., Umetsu, H., Hayashi, M., Komiyama, K., Ryoyama, K. (2008). Isolation of Ursolic Acid from Apple Peels and Its Specific Efficacy as a Potent Antitumor Agent. *Journal of Health Science*, 54(6), 654–660. doi: 10.1248/jhs.54.654
- Yang, P., Li, Y., Liu, X., & Jiang, S. (2007). Determination of free isomeric oleanolic acid and ursolic acid in *Pterocephalus hookeri* by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(4), 1331–1334. doi: 10.1016/j.jpba.2006.10.042
- Zacchigna, M. (2009). Rapid HPLC Analysis for Quantitative Determination of the Two Isomeric Triterpenic Acids, Oleanolic acid and Ursolic acid, in *Plantago Major*. *Scientia Pharmaceutica*, 77(1), 79–86. doi: 10.3797/scipharm.0809-08
- Zhou, C.-H., Li, X., Zhang, W.-S., Sun, C.-D., & Chen, K.-S. (2011). Oleanolic and ursolic acid in the fruit of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(9), 1735–1740.
- Zhou, Z., Tong, H. H. Y., Li, L., Shek, F. L. Y., Lv, Y., & Zheng, Y. (2015). Synthesis, characterization and thermal analysis of ursolic acid solid forms: Synthesis, characterization and thermal analysis of ursolic acid solid forms. *Crystal Research and Technology*, 50(7), 538–548. doi: 10.1002/crat.201500034

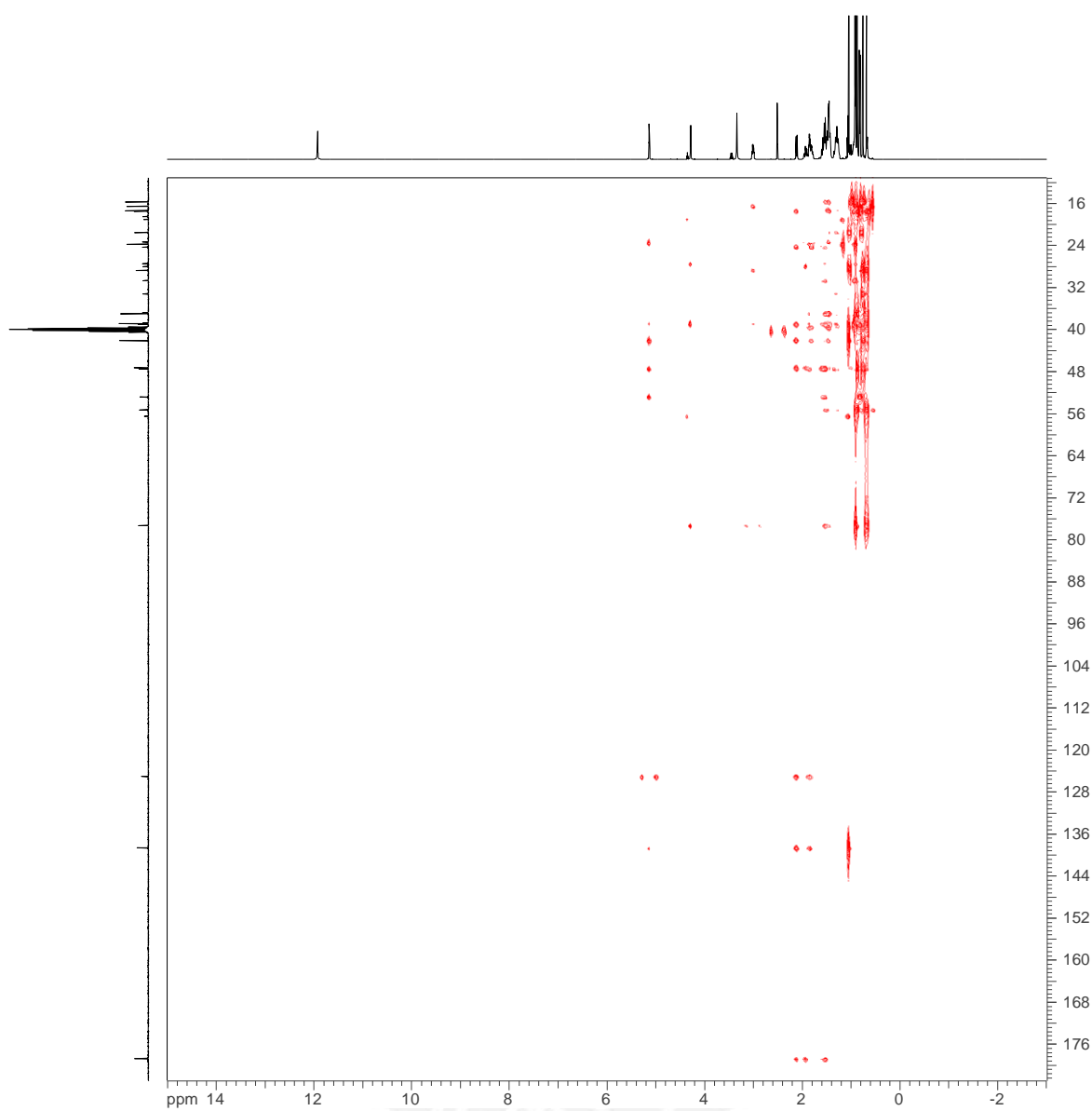
8 Apéndice



Espectro HSQC de los cristales A.



Espectro COSY de los cristales A.



Espectro HMBC de los cristales A.

Parámetros de red del Ácido ursólico (Simon et al., 1992)

Grupo espacial - $P 2_12_12_1 (19)$		Simetría Ortorrómbica	
	a (Å)	b (Å)	c (Å)
Parámetros de celda	7,199	12,157	33,888
Posición de Wyckoff	X	y	z
$O(1)$	0,7937	0,3065	0,8925
$O(2)$	0,6398	0,0151	0,5750
$O(3)$	0,9049	-0,0666	0,5841
$C(1)$	0,601	0,2841	0,7902
$C(2)$	0,600	0,2941	0,8349
$C(3)$	0,799	2,900	0,8506
$C(4)$	0,8987	0,1822	0,8403
$C(5)$	0,8919	0,1712	0,7944
$C(6)$	0,9974	0,0732	0,7777
$C(7)$	1,0433	0,0937	0,7345
$C(8)$	0,8745	0,1186	0,7086
$C(9)$	0,7361	0,1985	0,7293
$C(10)$	0,6978	0,1800	0,7748
$C(11)$	0,560	0,2105	0,7043
$C(12)$	0,600	0,2152	0,6606
$C(13)$	0,7625	0,2008	0,6437
$C(14)$	0,9348	0,1746	0,6685
$C(15)$	1,0699	0,0993	0,6458
$C(16)$	1,093	0,1268	0,6023
$C(17)$	0,908	0,1305	0,5809
$C(18)$	0,7814	0,2181	0,5992
$C(19)$	0,836	0,3376	0,5886
$C(20)$	0,862	0,3530	0,5430
$C(21)$	0,995	0,2688	0,5270
$C(22)$	0,938	0,1518	0,5362
$C(23)$	1,107	0,1981	0,8525
$C(24)$	0,822	0,0837	0,8630
$C(25)$	0,776	0,0065	0,6998
$C(26)$	0,570	0,0804	0,7834
$C(27)$	1,041	0,2848	0,6759
$C(28)$	0,820	0,0164	0,5815
$C(29)$	0,692	0,4191	0,6038
$C(30)$	0,930	0,4677	0,5321

**FLOR DE ARENA
O TE INDIO**
(GASTRITIS CRÓNICA)

C.N.S.R. S.A.C. **SAN ROQUE** C.N.S.R. S.A.C.

Esta planta es oriunda de nuestra serranía, conocida como excelente curativo en todo el país desde mucho tiempo, en casos de enfermedades del Hígado, Gastritis, Cálculos a la Vesícula, Elimina el Acido Úrico y los residuos que se acumulan en el estómago, riñones y Gonorrea



Dosis: Una cucharadita de flor de arena en 1 litro de agua, hacer hervir y tomar antes de los alimentos, con unas gotas de limón.

ENVASADO POR CASA NATURISTA "SAN ROQUE"
PEDIDOS A LOS TELEFAX: 474-4178 - 323-4881
R.U.C. 20506473315 - PRODUCTO PERUANO

RAYITO AZUL • RAYITO AZUL • RAYITO AZUL • RAYITO AZUL • RAYITO AZUL

**FLOR DE ARENA
TE INDIO**
(Gastritis Crónica)



INDICACIÓN:

Planta natural de nuestra serranía, es excelente para el tratamiento del hígado, cálculos a la vesícula, elimina el ácido úrico y los residuos que se acumulan en el estómago y riñones también es muy efectiva para los gases gástricos.

INDICACIÓN:

- * Hacer hervir en 1 litro de agua una cucharada de té indio durante 2 a 3 minutos.
- * Tomar 3 veces al día, antes de cada comida.

HERBISTERIA PERUANA "Rayito Azul" PRODUCTO PERUANO

Presentación comercial de la flor de arena



Cristales precipitados de AU