



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



División de Ciencias Forestales

MAESTRIA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE *Pouteria glomerata*, UNA PLANTA UTILIZADA PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES.

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES**

PRESENTA:

Raquel Contreras Corona

COMITÉ ASESOR:

Dra. Amparo Borja de la Rosa

Dr. Benito Reyes Trejo

Dra. Diana Guerra Ramírez

Chapingo, Texcoco, Estado de México

Enero 2016



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**

Tesis realizada por **Raquel Contreras Corona** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES



DIRECTOR::

DRA. AMPARO BORJA DE LA ROSA



CODIRECTOR:

DR. BENITO REYES TREJO



ASESOR:

DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

RECONOCIMIENTO

Al **DR. BENITO REYES TREJO** por su participación directa en la identificación de los metabolitos secundarios aislados, así como por su dirección y apoyo durante toda la parte experimental del proyecto, además de brindarme la oportunidad de poder trabajar a su lado y conocer el fantástico mundo de la fitoquímica.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi alma mater, que por segunda vez me brindó la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos y obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Postgrado.

Al Dr. Benito Reyes Trejo, por haber confiado en mí y poner este trabajo en mis manos al cual le debo mi grado. Por el tiempo dedicado a la dirección, revisión, correcciones y sugerencias para una mejor presentación.

A la Dra. Amparo Borja de la Rosa, por el tiempo dedicado a la revisión, observaciones y recomendaciones del presente trabajo, así como su apoyo para la obtención de los recursos económicos para la investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez, por las clases tan geniales de fitoquímica que fueron de gran ayuda para la parte experimental del proyecto, así como por el tiempo dedicado a la revisión, observaciones y recomendaciones del presente trabajo.

A la M.C. Ernestina Cedillo Portugal y el Ing. José María Cunill Flores por el tiempo empleado para la identificación botánica de la especie estudiada.

Al personal del Laboratorio de Productos Naturales por haber confiado y permitido el uso de las instalaciones para realizar este proyecto. Por su apoyo y consejos en la cromatografía y por los buenos ratos.

Al Programa Institucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico, por haberme permitido conocer a dos magníficos estudiantes; Fabiola y Anatalio, muchas gracias por su entusiasmo y trabajo aportado a esta investigación, les deseo lo mejor de lo mejor, son unos ángeles que llegaron justo a tiempo.

DEDICATORIA

A mi padre **León Contreras Cano †**, porque sé que con tu maravillosa luz me cuidas y guías para ser una buena persona, siempre estas en mi pensamiento.

A mi madre **Ana E. Corona Otero**, lo logramos de nuevo mami, este trabajo es de las dos, trabajare muy duro porque cada día te sientas orgullosa de mí.

Ana Lilia, León y Belén, porque son los mejores hermanos que me pudieron tocar, porque siempre nos apoyamos y nos cuidamos, sin duda alguna somos un gran equipo, los quiero demasiado.

A **Bety** y mis inteligentes sobrinos **Isaac y Arturo**, todo mi apoyo, tienen un gran cerebro para aprovechar.

A la niña de mi corazón **Ana Zazil**, pequeña cada día me sorprendes con tus éxitos, estoy segura que tendrás un gran futuro, lucha por tus sueños, recuerda que no existen imposibles.

A mis amigos, que son la familia que escogí: **Irmita, Dani, Gaby, Lalo, Viridiana, Tomas, Sr. Suarez**, que han estado a mi lado en los buenos y malos momentos, ¡VAMOS A CELEBRAR!

A todos mis compañeros de la maestría, por los agradables momentos que pasamos.

Do not stop believing!

DATOS BIOGRÁFICOS

Raquel Contreras Corona nació en Puebla, Puebla, el 21 de agosto de 1988. Sus estudios de nivel básico, los realizó en la misma ciudad. Estudio el nivel medio superior en la preparatoria “Lic. Benito Juárez García” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La licenciatura la realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, egresó de la carrera de Ingeniero Forestal Industrial en el año 2011.

Después de obtener el título profesional, apoyó por un corto tiempo como asistente de investigación con el Dr. Marcos Miguel Gonzales Peña, en la División de Ciencias Forestales de la UACH, posteriormente trabajó en el aserradero “Maderas Libertre” en el Estado de México durante 10 meses. Estudio el posgrado en la Universidad Autónoma Chapingo en el Programa de Maestría en Ciencias Forestales de enero de 2014 a diciembre de 2015.

CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISION DE LITERATURA.....	4
3.1. Plantas medicinales para el control de la diabetes.....	5
3.2. Métodos de extracción y descripción de compuestos orgánicos de las plantas ...	7
3.3. Descripción botánica de <i>Pouteria glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i>	8
4. MATERIALES Y METODOS.....	12
4.1. Material vegetal	12
4.2. Preparación de extractos.....	12
4.3. Análisis de extractos de hojas de <i>P. glomerata</i> , por Cromatografía en columna	14
4.3.1. Análisis del extracto de hexano	14

4.3.2.	Análisis del extracto de diclorometano.....	15
4.3.3.	Análisis del extracto de metanol	15
4.4.	Análisis de fracciones y sustancias puras.....	16
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	18
5.1.	Identificación botánica	18
5.2.	Rendimiento de los extractos.....	18
5.3.	Análisis del extracto de cloruro de metileno de <i>P. glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> .	18
5.4.	Análisis del extracto metanólico de hojas de <i>P. glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i>	20
5.5.	Análisis del extracto de hexano de hojas de <i>P. glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i>	21
5.5.1.	Aislamiento e identificación del escualeno.....	23
5.5.2.	Aislamiento e identificación de los acetatos de β -lupeol y de β -amirina.....	28
5.5.3.	Aislamiento e identificación de espinasterol.....	37
6.	CONCLUSIONES	43
7.	RECOMENDACIONES.....	44
8.	LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1 Fracciones del extracto de diclorometano de hojas de <i>P. glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i> .	19
2.- Fracciones del extracto de metanol de hojas de <i>P. glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i>	20
3 Fracciones del extracto de hexano de hojas de <i>P. glomerata</i> subsp. <i>glomerata</i>	21

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 Metabolitos secundarios aislados de <i>Pouteria glomerata</i>	xiii
2.- <i>Pouteria glomerata</i> (Miquel) Radlkofer subsp.subsp. <i>glomerata</i>	11
3.- Preparación de extractos	13
4 Preparación de la columna cromatográfica	15
5 Análisis de las fracciones por cromatografía de capa delgada (ccd)	16
6.- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	17
7 Análisis cromatográfico del extracto de hexano de Tzocohuite	22
8 .- Espectro de RMN de ^1H de escualeno en CDCl_3	24
9.- Espectro de RMN de ^{13}C del escualeno.....	25
10 Espectro DEPT del escualeno	26
11 .- Espectro de RMN de ^1H del acetato de β -lupeol.....	30
12.- Espectro de RMN de ^{13}C del acetato de β -lupeol.....	31
13 Espectro de RMN de ^1H del acetato de β -amirina	33
14.- Espectro de RMN de ^{13}C del acetato de β -amirina	34
15.- Espectro DEPT del acetato de β -amirina	35
16.- Espectro de RMN de ^1H del espinasterol	39

17.- Ampliación de los espectros de RMN de ^1H del estigmasterol y ergosta-7,22-dien-3 β -ol.....	40
18.- Espectro de RMN de ^{13}C del espinasterol.....	41
19.- Espectro DEPT del espinasterol	42

RESUMEN

Pouteria glomerata (Miquel) Radkofer subsp. *glomerata*, es un árbol comúnmente conocido como Tzocohuite. En la Huasteca Hidalguense, México, se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades como diabetes, nervios, purificación de la sangre y tosferina. El estudio fitoquímico de las hojas de *P. glomerata* permitió el aislamiento e identificación de (Figura 1): escualeno (1) acetato de β -lupeol (2), acetato de β -amirina (3), y espinasterol (4). Esta es la primera contribución al estudio fitoquímico de esta especie. Las estructuras moleculares fueron establecidas por métodos físicos y espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN ^1H y carbono 13 (RMN ^{13}C). Los resultados de este estudio corroboran el uso de esta especie para el tratamiento de la diabetes, ya que el escualeno, y los derivados acetilados de β -lupeol y β -amirina, son metabolitos secundarios previamente evaluados como hipoglucemiantes.

Palabras clave: *Pouteria glomerata*, acetato de β -amirina, acetato de β -lupeol, escualeno, espinasterol, Tzocohuite.

ABSTRACT

Pouteria glomerata (Miquel) Radkofer subsp. *glomerata*, commonly known as Tzocohite is a plant used at Huasteca Hidalguense, Mexico for the treatment of diabetes, nervousness, blood purification and whooping cough. Phytochemical study of leaves of *P. glomerata* underwent the isolation and identification of the compounds (Picture 1): β -lupeol and β -amyrin acetates (2, 3) together with squalene (1), and spinasterol (4). This is the first time that phytochemical composition of this tree is established. The molecular structures were established by means of physical and spectroscopic methods including ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. The results of this study demonstrate the use of this specie for diabetes treatment, in fact that squalene, and the acetylated derivatives of β -lupeol and β -amyrin are secondary metabolites evaluated previously as hypoglycemic.

Keywords: *Pouteria glomerata*, β -amyrin acetate, β -lupeol acetate, spinasterol, squalene, Tzocohuite.

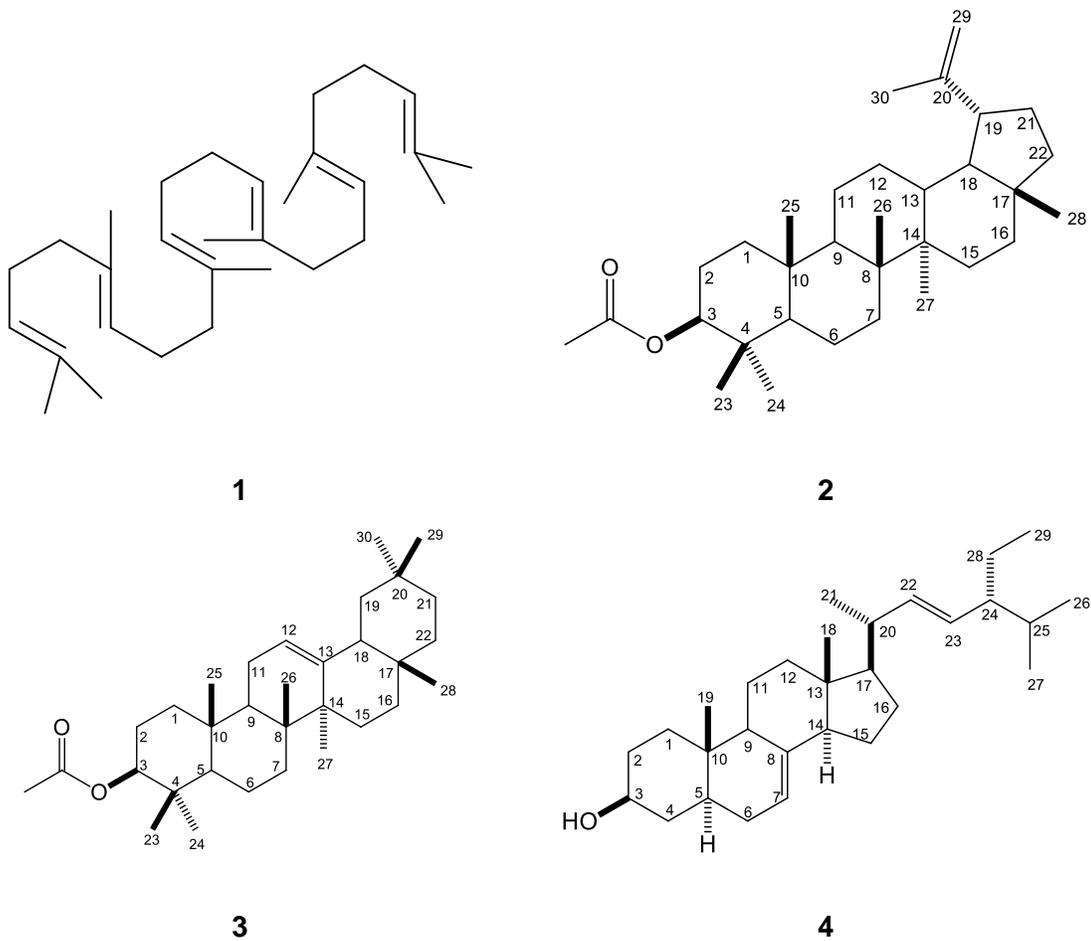


Figura 1 Metabolitos secundarios aislados de *Pouteria glomerata*

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales y aromáticas han sido durante siglos la base de la fitoterapia, constituyendo todavía la única medicina disponible para determinados grupos étnicos, y una medicina de elección cada vez más revalorizada para otros. Muchas de estas especies son endémicas y la recolección indiscriminada está conduciendo a que muchas de ellas se encuentren amenazadas. La gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas. Este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación, de manera que algunas costumbres subsisten y son ejercidas de manera cotidiana, tanto en áreas rurales como urbanas (García de Alba *et al.*, 2012).

Pouteria glomerata (Miquel) Radlkofer subsp. *glomerata* (Sapotaceae) es un árbol medicinal de la Huasteca Hidalguense popularmente llamada “Tzocohuite”, sus hojas y corteza se utilizan para preparar una infusión que se recomienda tomar como agua de tiempo para el control de la diabetes y nervios, así como, purificar la sangre y contrarresta la tosferina (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

La diabetes es una enfermedad que afecta cada vez más a la población mundial, acorde con la Organización Mundial de la Salud, se pronostica que para el 2030 habrá 6 millones de personas con esta enfermedad. El panorama en México no es nada favorable, ya que tan solo en el 2001 los servicios de salud reportaron que la diabetes fue la primera causa de mortandad (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). En México la diabetes mellitus es comúnmente tratada con extractos herbales, existe una variedad de plantas con compuestos antidiabéticos los cuales han sido aislados de ellas y han tenido un uso potencial; alcaloides, flavonoides, terpenos, e incluso péptidos han sido empleados para este fin. Se estima que en México hay cerca de 306 especies que son usadas popularmente en el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

El género *Pouteria* ha sido poco estudiado, sin embargo, se ha reportado que algunas especies tienen actividades biológicas, tales como, antioxidante, anti-inflamatoria, antibacterial, antifungica e hipoglucemica. De los estudios fitoquímicos del género *Pouteria* sp. se han aislado triterpenos, hidrocarburos, alcoholes, ácidos y ésteres. Algunos de los

triterpenos aislados de estas especies, se han probado *in vitro* y/o *in vivo* contra la diabetes y los resultados han sido favorables (Silva *et al.*, 2008).

El propósito de este estudio es analizar la composición de los extractos (hexano, diclorometano y metanol) de las hojas del “Tzocohuite”, y relacionar la presencia de sus metabolitos secundarios con el tratamiento de la diabetes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar los extractos de las hojas de *Pouteria glomerata* subsp. *glomerata* mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas para determinar los metabolitos secundarios con actividad biológica

2.2. Objetivos específicos

- Comprobar la identidad botánica de los especímenes colectados de Tzocohuite mediante el uso de claves taxonómicas
- Obtener extractos de las hojas de *P. glomerata* usando disolventes de diferente polaridad para separar y aislar metabolitos secundarios con actividad biológica.
- Identificar la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados de las hojas de *P. glomerata* de acuerdo a sus propiedades físicas y espectroscópicas.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

Los Productos Forestales No Maderables (PFNM), son todos aquellos productos y servicios vegetales y animales, excluida la madera rolliza comercial y la madera par energía, derivados de los bosques y otras tierras forestadas y de árboles fuera del bosque (Tapia y Reyes, 2008). De la Peña e Illsley (2010), clasifican a los PFNM en siete categorías de uso: alimentos y bebidas, medicina tradicional, instrumentos rituales, especias, insumos industriales, artesanías, y ornamentales. Los PFNM contribuyen a los medios de vida, incluyendo a la seguridad alimentaria, la salud, el bienestar y los ingresos. En muchas partes del mundo estos recursos son indispensables para los habitantes más pobres, quienes constituyen los actores principales en la extracción de los PFNM, pudiendo constituir su única fuente de ingresos (Tapia y Reyes, 2008). En el ámbito de la salud los PFNM han ocupado un lugar importante, actualmente el 30% de los fármacos utilizados en medicina proceden del reino vegetal, y hay una tendencia notable a elevar esta cifra, debido al constante descubrimiento de nuevos principios activos de origen botánico (Villarreal *et al.*, 2014). Debido a lo anterior cada día se presta más atención al uso de las plantas medicinales de forma que la Etnobotánica, la Fitoterapia y la Fitoquímica están tomando un auge inesperado, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico. La Organización Mundial de la Salud reporta que el 80% de la población mundial, utiliza las plantas como principal remedio medicinal (García *et al.*, 2009).

La OMS definió en 1978 el concepto de planta medicinal como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Cañigüeral *et al.*, 2003). México posee una rica tradición en el empleo de las plantas medicinales entre sus varias prácticas populares. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3 000 y 5 000 plantas que tiene potencial terapéutico. Increíblemente, aproximadamente el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades (Esquivel *et al.*, 2012).

García de Alba *et al.*, (2012) reportaron que las enfermedades más comunes por la que la gente busca la cura con plantas medicinales en orden decreciente son: infecciones respiratorias agudas altas, enfermedades infecciosas intestinales, infección de vías

urinarias, úlceras, gastritis y duodenitis, hipertensión arterial, diabetes mellitus, otitis media aguda, asma y estado asmático, accidentes (de tráfico de vehículo de motor). En cuanto a las plantas que son más utilizadas son: gordolobo, eucalipto, hierbabuena, manzanilla, nopal, árnica, guarumbo, verbena, sauco amarillo, epazote, sábila, ruda y romero (Esquivel *et al.*, 2012). Dentro de las plantas medicinales poco conocidas se encuentra el Tzocohuite (*Pouteria glomerata* subsp. *glomerata*). Es un árbol que pertenece a la familia *Sapotacea*; Espinosa (1985) en su estudio de plantas medicinales en la Huasteca Hidalguense, menciona que las hojas de este árbol son utilizadas para preparar te, éste tiene efectos sobre enfermedades como diabetes, nervios, purificación de la sangre y contrarresta la tosferina.

3.1. Plantas medicinales para el control de la diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo heterogéneo de trastornos del sistema endocrino, que se caracteriza por un deterioro en la capacidad para metabolizar carbohidratos y grasas, lo que origina un aumento en la concentración de glucosa (hiperglucemia) y lípidos (hiperlipidemia). La anomalía en el metabolismo se debe a la secreción inadecuada de insulina o a la ineficiencia de la disponible. De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes, la diabetes se clasifica principalmente en: diabetes tipo 1 o insulino dependiente, diabetes tipo 2 quien no utiliza insulina y diabetes gestacional, de todos los casos diagnosticados de 90 a 95% son de diabetes tipo 2 (Saucedo *et al.*, 2006). La diabetes se está convirtiendo en una epidemia y por lo tanto en un reto para la salud global. Estimaciones de la OMS indican que a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes, con cifra actual estimada en más de 347 millones de personas con diabetes. La Federación Internacional de Diabetes reporta que China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son los países con mayor número de diabéticos (Hernández *et al.*, 2013). En México, alrededor del 10% de la población padece de diabetes mellitus, se presenta con mayor frecuencia en adultos mayores y en personas obesas, por lo que se ha convertido en la principal causa de muerte con el 12% del total de defunciones. Sin duda la diabetes es quizá el mayor reto que enfrenta el sistema de salud mexicano en términos de atención médica y salud pública (Esquivel *et al.*, 2012).

Actualmente se buscan y ensayan diversas estrategias médicas para el tratamiento de la diabetes mediante una combinación de la dieta, educación, ejercicio físico, inmunoterapia, incluso trasplantes pancreáticos; es importante mencionar que las investigaciones están orientadas a la obtención de nueva drogas hipoglucemiantes. Sin embargo, debido a las limitaciones económicas, la mayoría de los mexicanos no tienen acceso a los modernos esquemas de tratamiento, surgiendo entonces la fitoterapia o medicina natural como alternativa con igual efectividad (Esquivel *et al.*, 2012). El uso de plantas medicinales como parte de la medicina alternativa complementaria (MAC) ha tenido un notable incremento en la cultura occidental y es ampliamente usada de manera regular y significativa en proporciones variables en Europa y Estados Unidos. En México el uso de plantas como principal modalidad de la Medicina Alternativa Complementaria es más significativa y es muy clara la tendencia de su aceptación en hospitales y unidades de atención médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los datos preliminares muestran que pacientes diabéticos y los que padecen de colelitiasis utilizan MAC 87.5% y 83% respectivamente y en menor proporción 63% los que padecen obesidad (Miranda *et al.*, 2005).

Para México se tiene documentado 400 tratamientos naturales con plantas para la diabetes mellitus, pero solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia (Miranda *et al.*, 2005). Se han registrado alrededor de 306 plantas de 235 géneros y 93 familias que son usadas como agentes hipoglucémicos. Las familias que aparecen con mayor frecuencia son: Asteraceae (47 sp.), Fabaceae (27), Cactaceae (16), Solanaceae y Euphorbiaceae (10). Y Lamiaceae (9) (Andrade y Heinrich, 2005). Los efectos hipoglucémicos de algunas plantas usadas como remedio antidiabéticos se han confirmado en las poblaciones rurales que las usan, y los mecanismos de la actividad hipoglucémica de estas plantas se ha comenzado a estudiar. Estos remedios son efectivos, producen efectos secundarios mínimos o no los producen y son de bajo costo comparados con los agentes hipoglucémicos sintéticos orales (García *et al.*, 2009).

Dentro de las plantas más recomendadas para el manejo de la diabetes están: el nopal (*Opuntia joconostle*), *Cecropia obtusifolia* conocida comúnmente como Guarumbo o Chancarro, *Guazuma ulmifolia* comúnmente llamada Guácima, Guácimo o Cualote, *Parmentiera aculeata* cuyo nombre común es Cuajilote y la tronadora (*Tecoma stans*) (Esquivel *et al.*, 2012). En Alemania existen dos productos para el tratamiento de diabetes,

elaborados con plantas medicinales de México: Hando, que está elaborado con Nopal (*Opuntia* sp.), fabricado por Hando Austria y Sucontral, cuya fórmula tiene Coplachi (*Hintonia* sp.) elaborado por Harrass Pharma, Munich. En este contexto es importante recordar que una medicina moderna la metformina es un derivado de un producto natural, la galegina o guanidina, aislada de *Galega officinalis* L., esta planta fue utilizada durante el periodo medieval para el control de las personas diabéticas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005)

El ácido kaurico es un potente compuesto hipoglucémico, éste ha sido aislado del “zoapatle” (*Montanoa tomentosa*), se ha evaluado y los resultados muestran que es más potente que la glibenclamida, una droga administrada en pacientes con diabetes tipo 2 (Villa *et al.*, 2011). Como se puede apreciar, las plantas son, han sido y serán un recurso indispensable en el descubrimiento de nuevos fármacos, por lo tanto la Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromáticas (REDMEXPLAM), fomenta proyectos comunitarios a pequeña escala bajo el concepto de conservación ecológica, manejo sustentable y comercio justo (Juárez *et al.*, 2013).

3.2. Métodos de extracción y descripción de compuestos orgánicos de las plantas

A pesar de los siglos de tradición, la fitoterapia-del friego *phyton* (planta), tratamiento de las enfermedades por plantas frescas, secas o sus extractos- ha evolucionado y ha ganado prestigio y eficacia, sobre todo en los últimos tiempos, acercándose cada vez más a las normas y usos que exige la medicina moderna (Carballo *et al.*, 2005). Los medicamentos fitoterapéuticos están constituidos exclusivamente por ingredientes activos de origen vegetal usualmente no definidos químicamente, formulados bajo la forma farmacéutica más adecuada para su administración, lo que implica que para la elaboración de medicamentos fitoterapéuticos se pueden emplear principalmente: a) drogas vegetales que por lo general se presentan en forma molida o pulverizada, b) productos obtenidos por extracción o c) en algunos casos particulares, principios activos purificados (Cañigüeral *et al.*, 2003).

La extracción de los principios activos por medio de la fitoquímica se basa en conceptos básicos de la polaridad de las moléculas. De acuerdo a los mismos, se han desarrollado técnicas analíticas de separación, que facilita la obtención de perfiles químicos detallados, lo que a su vez permite la identificación y el aislamiento de moléculas bioactivas con mayor

rapidez y precisión (Villa *et al.*, 2011). Habitualmente se utilizan procedimientos cromatográficos especializados que permiten el aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las plantas. Dentro de estos, destacan en orden creciente de complejidad la cromatografía de capa delgada (TLC), de alta presión de líquidos (HPLC), de gases (GC) y líquida de ultra-resolución (UPLC). Más adelante los compuestos las estructuras de los compuestos aislados y purificados se elucidan usando para ello técnicas espectroscópicas convencionales como son la resonancia magnética nuclear (RMN) o la cristalografía de rayo X (Villa *et al.*, 2011; Villareal *et al.*, 2014). La información anterior es necesaria para llevar a cabo estudios clínicos controlados donde se pueda establecer, en función de la dosis, la actividad y seguridad del medicamento herbolario estandarizado. El concurso de otras disciplinas de frontera como la biología molecular, la biotecnología, la fisiología molecular y la biología de sistemas entre otras, está permitiendo elucidar los mecanismos de acción de los fármacos vegetales, establecer las rutas metabólicas de síntesis y diseñar procedimientos para lograr la producción controlada de los principios activos (Villareal *et al.*, 2014).

3.3. Descripción botánica de *Pouteria glomerata* subsp. *glomerata*

El Tzocouite (*Pouteria glomerata* subsp. *glomerata*) antes *Pouteria hypoglauca* (Espinosa, 1985), es un árbol que pertenece a la familia Sapotaceae. Esta familia comprende 54 géneros y cerca de 1175 especies, de las que alrededor de 400 se encuentran en la región neotropical, unas 350 en África y otras tantas en Asia tropical. Prosperan principalmente en bosques húmedos, pero algunos géneros como *Sideroxylon* y *Argania* se extienden a regiones áridas y semiáridas. En México se encuentra 5 géneros y 38 especies distribuidas por lo general en bosques húmedos y pocos en regiones áridas o semiáridas (Instituto de Biología, 2008; Carranza, 2005). Esta familia tiene importancia económica ya que algunos géneros como *Chrysophyllum*, *Manilkara* y *Pouteria* se cultivan por sus frutos comestibles, látex, y su madera durable y pesada, a su vez la goma de mascar natural se obtiene de *Manilkara zapota* (L.) van Royen (Azurdia, 2006; Carranza 2005). El género *Pouteria* comprende árboles o arbustos, constituidos por 188 especies en el neotrópico y alrededor de 150 especies en Asia tropical y la región del Pacífico. En México existen 10 especies (Pennington 1990): *Pouteria belizensis* (Standley) Cronquist, *P. campaechiana* (Kunth) Baehni, *P. durlandii* (Standley) Baehni, *P. glomerata* (Miquel) Radlkofer, *P. reticulata*

(Engler) Eyma, *P. rhynchocarpa* Pennington, *P. sapota* (Jacquin) H.E. Moore y Stearn, *P. squamosa* Cronquist, *P. torta* (Martius) Radlkofer, y *P. viridis* (Pittier) Cronquist.

Pouteria glomerata (Miquel) Radlkofer, Sitzungsber. Math.-Phys. Cl. Königl. Bayer. Akad. Wiss. München 12: 333. 1882. *Lucuma glomerata* Miquel, Fl. Bras. 7: 81. 1863. (Standley y Williams 1967). Está ubicada en un conjunto de árboles monoicos o dioicos, hasta 30 m, el fuste acostillado; corteza interna con látex. Hojas 6-20(-24) × 2.7-6(-8.5) cm, agrupadas en el ápice, dispuestas en espiral. Flores 2-10, unisexuales, en fascículos axilares y por debajo de las hojas. Fruto 2.5-9 cm, frecuentemente más ancho que largo, globoso o deprimido globoso, o muy irregular y nodoso, la superficie rugosa o lisa, glabra o con algo de indumento casposo residual cerca de la base, la base y el ápice truncados. Semillas 1-numerosas, 2-4.5 cm, anchamente elipsoidales (cuando solitarias) o plano convexas.

P. glomerata que se distribuye desde México hasta Paraguay y Argentina. Se reconocen dos variedades: *Pouteria glomerata* subsp. *glomerata* y *Pouteria glomerata* subsp. *stylosa* (Pierre) T.D. Penn.

Pouteria glomerata (Miquel) Radlkofer subsp. ***glomerata***, (Figura 2) nombrado comúnmente como Tzocohuite (Huasteca Hidalguense), algunos otros nombres comunes fuera de la zona de estudio son chicozapote, socovite, tilapo, y/o zapote prieto (Carranza 2005), es un árbol de estatura media, a veces hasta 20 m de alto, copa baja y ancha, con un diámetro hasta 45 cm, ramas jóvenes densamente poblados por hojas, densamente cerosas. Hojas pecioladas (6-12 mm de largo) oblongas u oblanceolado-oblongo de 8 a 22 cm de largo y de 2.5 a 5 cm de ancho, el ápice comúnmente obtuso, base aguda a más o menos redondeada, envés diminuta y finamente blanquizco-pubérulo, los pelos adpresos, por lo común formando una delgada película, en ocasiones casi glabro con la edad. Flores fasciculadas en la axila foliar, subséciles; 5 sépalos en general elípticos de 3 mm de largo, obtusos o redondeados, en el ápice densamente pubescentes; corola de 2 mm de largo, glabra, los lóbulos son más anchos que largos, generalmente redondeados o truncados en el ápice, estambres ovados de la mitad de largo que los lóbulos de la corola; ovario densamente pubescente; fruto oval-globoso, alrededor de 7 cm de largo por 5 cm de ancho, suave, glabro de piel delgada y dura; semillas alrededor de 4, normalmente blancas y tersas, de 4 cm de largo por 2 cm de ancho, con la cicatriz hilar de forma elíptico lineal, de 2.5 cm de largo (Standley y Williams 1967). El Tzocohuite se distribuye desde la vertiente

del Golfo en la porción central de México (San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz, y Yucatán); Centroamérica y Sudamérica (Paraguay, Argentina y Brasil) (Carranza, 2005).

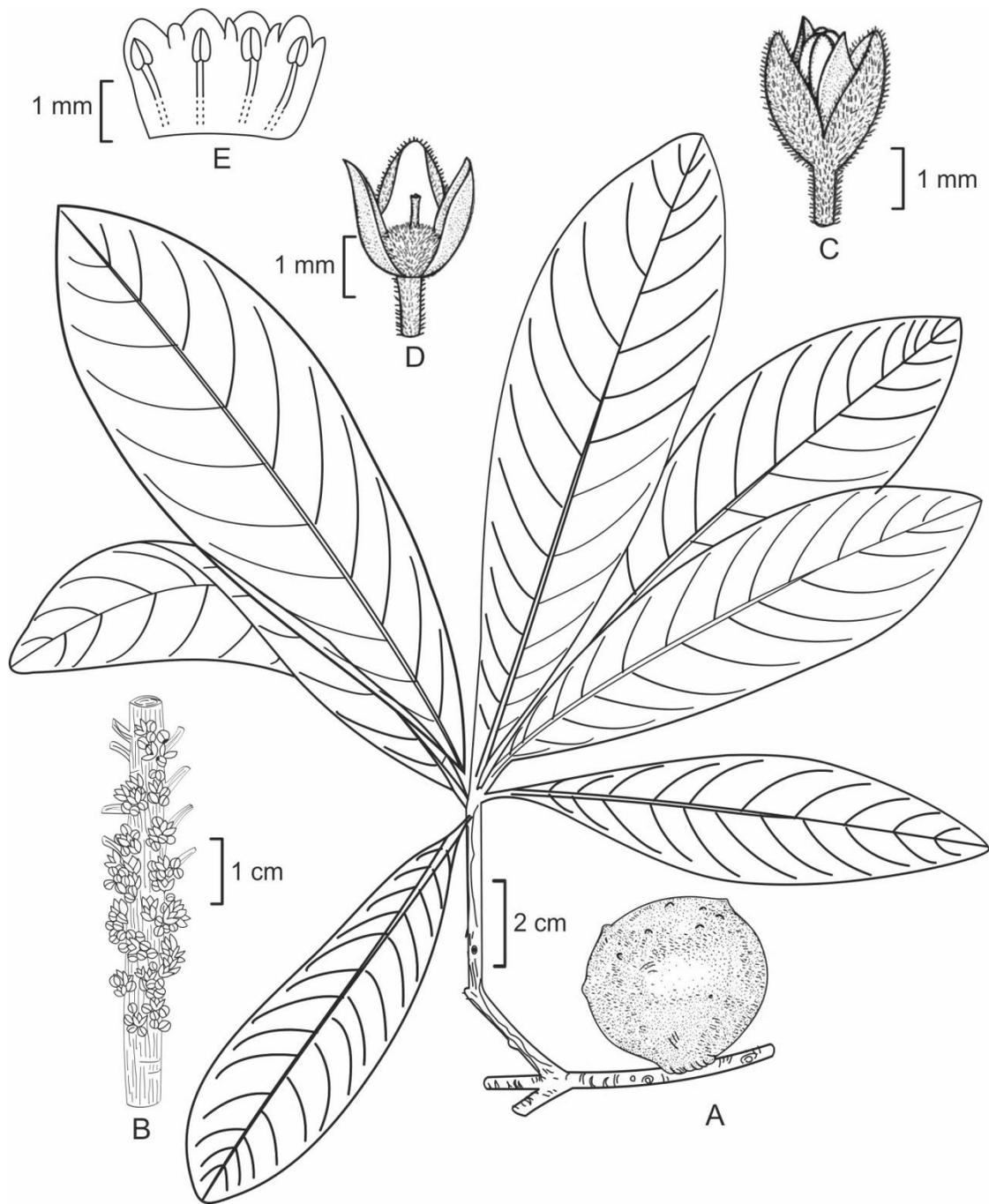


Figura 2.- *Pouteria glomerata* (Miquel) Radlkofer subsp.subsp. *glomerata*. A. rama con fruto; B. sección de una rama con inflorescencias; C. flor; D. flor desprovista de un sépalo y de la corola, mostrando el gineceo; E. corola abierta mostrando estambres (Fuente: Carranza 2005)

4. MATERIALES Y METODOS

La etapa experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.1. Material vegetal

Se colectó corteza, hojas, flores y frutos de *P. glomerata* subsp. *glomerata* en Tehuatlan, Municipio de Huejutla en el Estado de Hidalgo. Las hojas y la corteza fueron secadas a la sombra. Los frutos y las semillas se secaron en una estufa de temperatura controlada (aprox. 70°C).

La identificación de los especímenes colectados fue hecha por la M.C. Ernestina Cedillo Portugal y el Ing. José María Cunill Flores en el Herbario-Hortorio Jorge Espinoza Salas (JES), del área de Biología del Departamento de Preparatoria Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo, corroborando en el Herbario Nacional de México (MEXU) de la Universidad Nacional Autónoma de México y le fue asignado el No. de depósito 25502 y 25504.

4.2. Preparación de extractos

Los extractos fueron obtenidos vía maceración, para lo cual, en un garrafón de vidrio de 20 L se colocaron 4.2 kg de hojas secas y molidas de *P. glomerata* subsp. *glomerata* y se adicionaron 9.6 L de hexano, Esta mezcla se dejó en reposo a la sombra por tres días, transcurrido dicho tiempo, el hexano se filtró y se evaporó en un rotaevaporador al vacío (Büchi Modelo R111, Waterbath B-461) obteniéndose un extracto de hexano y el residuo vegetal, esta proceso se repitió tres veces. En la tercera repetición el residuo vegetal fue puesto en contacto con 7 L de diclorometano (CH_2Cl_2) vía maceración (3 veces por 3 días), en cada ocasión el disolvente filtrado fue evaporado en el rotaevaporador sin vacío. En la tercera repetición se adiciono al residuo 7.5 L de metanol (MeOH), al igual que las dos extractos anteriores se hizo tres veces cada 3 días, para poder evaporar el metanol se utilizó vacío (Figura 3). Los extractos de corteza de obtuvieron de la misma forma que los

de hoja, en un garrafón de vidrio se agregaron 375.5 g de corteza y se utilizaron 4 litros de hexano, diclorometano y metanol, respectivamente.



Figura 3.- Preparación de extractos: maceración, filtración y evaporación

4.3. Análisis de extractos de hojas de *P. glomerata*, por Cromatografía en columna

4.3.1. Análisis del extracto de hexano

El extracto de hexano obtenido de las hojas de *Pouteria glomerata* subsp.. *glomerata*, fue sometido a un proceso de precipitación de material graso, aplicando una cantidad de metanol y calentando en baño de agua durante 5 minutos, se permitió enfriar a temperatura ambiente y se colocó bajo refrigeración a 5° C por espacio de 5 horas, observándose un precipitado que fue separado por filtración a gravedad, el filtrado se sometió a otro proceso adicional de refrigeración y así sucesivamente hasta que no se observó algún precipitado. Finalmente se eliminó el disolvente en un rotavapor al vacío para dar 10 g de extracto de hexano desengrasado. Este extracto libre de grasas fue disuelto en CH₂Cl₂ y preadsorbido en 11 g de gel de sílice, se mantuvo con agitación ocasional y al final se obtuvo un polvo verdoso. . El extracto hexánico preadsorbido anterior, fue aplicado en la parte superior de una columna de vidrio empacada (Figura 4) con 100 g de gel de sílice. La columna se eluyó primero con hexano, posteriormente con mezclas de hexano /AcOEt de polaridad creciente y al final con AcOEt y metanol (MeOH).). Se colectaron inicialmente fracciones de 200 mL, mismas que fueron evaporadas en un rotavapor, a partir de la fracción 52 se recogieron fracciones de 20 mL, evaporando el disolvente en un baño de agua. El seguimiento de dichas fracciones se efectuó empleando la técnica de cromatografía en capa delgada (ccd), aplicando cada una de ellas en cromatoplasmas analíticas Merck y revelando con luz ultravioleta y con disoluciones de ácido fosfomolibdico o de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico 2N, para enseguida someterse a un proceso de calentamiento para la observación de manchas usando una pistola de aire caliente o una plancha de calentamiento, se reunieron las fracciones semejantes por su similitud en sus valores de R_f vistos en la ccd.



Figura 4 Preparación de la columna cromatográfica y aplicación del extracto

4.3.2. Análisis del extracto de diclorometano

Se pesaron 40 g de extracto de diclorometano de las hojas de *Pouteria glomerata* subsp. *glomerata*, este extracto fue disuelto en CH_2Cl_2 y preadsorbido en 40 g de gel de sílice, se dejó reposar y al final se obtuvo un polvo de color verde oscuro. El extracto preadsorbido, fue aplicado en la parte superior de una columna de vidrio empacada con 400 g de gel de sílice, eluyendo con hexano e incrementando la polaridad con mezclas de hexano/AcOEt y al final con AcOEt y MeOH. Se colectaron fracciones de 200 mL, mismas que fueron evaporadas en un rotavapor. Al igual que en el extracto hexánico las fracciones fueron monitoreadas por cromatografía de capa delgada (ccd) y se reunieron las fracciones semejantes por su similitud en sus valores de R_f .

4.3.3. Análisis del extracto de metanol

Para el análisis del extracto MeOH de las hojas de Tzocohuite se preadsorbieron 5 g de extracto en 5 g de gel de sílice. Una vez preadsorbido el extracto se aplicó en la parte superior de una columna de vidrio empacada con 50 g de sílica gel, eluyendo con CH_2Cl_2 e incrementando la polaridad con mezclas de diclorometano y metanol, al final solo con metanol. Se colectaron 8 fracciones de 200 mL, mismas que fueron evaporadas en un

rotavapor, a partir de la fracción 9 se recogieron fracciones de 20 mL, evaporando el disolvente en un baño de vapor. Las fracciones se monitorearon por cromatografía de capa delgada, al igual que los otros dos extractos, y se reunieron aquellas fracciones con un Rf similar (Figura 5).



Figura 5 Análisis de las fracciones por cromatografía de capa delgada (ccd)

4.4. Análisis de fracciones y sustancias puras

Se empleó en la identificación un espectrómetro Agilent 400 MR DD2 espectrómetro (Santa Clara, CA, USA) operando a 100 MHz para ^{13}C y 400 MHz para ^1H . En la Figura 6 se muestra el equipo de RMN que se encuentra en la Universidad Autónoma Chapingo, este equipo está a cargo del Laboratorio de Productos Naturales.

De las fracciones procedentes de la columna de separación de los extracto de las hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*, se seleccionaron aquellas que mostraron cierto grado de pureza en la ccd o formación de sólidos cristalinos. Se pesaron al menos 50 mg de cada fracción seleccionada y se sometieron a un estudio de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN ^1H), cuando se obtuvieron espectros de interés, entonces se determinó otro espectro de RMN de carbono 13 (RMN ^{13}C).



Figura 6.- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y preparación de la muestra

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación botánica

El material vegetal herborizado se identificó en el herbario JES, del área de Biología del Departamento de Preparatoria Agrícola de la UACH, de acuerdo con las taxonómicas (Standley y Stademark, año; Carranza 2005) dando como resultado *Pouteria glomerata* subsp. *glomerata*. Se depositaron 5 ejemplares con frutos (25502-25506), que se destinaron de la siguiente manera, 2 ejemplares para el herbario, 1 ejemplar para enseñanza y 2 ejemplares para intercambio con otras instituciones (Figura 7).

5.2. Rendimiento de los extractos

De la preparación de extractos de hojas de Tzocohuite, se obtuvieron 38.1 g de extracto hexánico de color verde oscuro, 73.8 g de extracto de diclorometano con un color verde grisáceo y 217.4 g de extracto de metanol con un color verde oscuro. En cuanto a los extractos de corteza de Tzocohuite el rendimiento fue el siguiente; 4.3 g de extracto de hexano de color blanco, 4 g de extracto de cloruro de metileno de color verde oscuro grisáceo, y 4.5 g de extracto de metanol de color café.

5.3. Análisis del extracto de cloruro de metileno de *P. glomerata* subsp. *glomerata*

En la Cuadro 1, se muestran las fracciones obtenidas y su polaridad, aproximadamente el 90% de las fracciones obtenidas de esta columna cromatográfica consistieron en sólidos y algunos cristales de diversos colores.

Cuadro 1 Fracciones del extracto de diclorometano de hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*

Eluyente	Fracciones	Fracciones reunidas	Metabolitos identificados
Hexano puro	1-98	5-6; 7-9; 10-18; 19-22; 24-27; 28-36; 40-65; 67-72; 73-81	---
Hexano/AcOEt 95:5	99-252	82-101; 103-108; 109-115; 116-117; 127-135; 136-143; 144-152; 153-161; 162-170; 162-170; 171-179; 180-188; 189-197; 198-206; 207-215; 216-232; 233-251	---
Hexano/AcOEt 90:10	253-469	252-267; 268-283; 284-300; 301-305; 306-317; 318-336; 337-339; 340-341; 342-345; 346-348; 350-352; 353-354; 355-371; 372-390; 391-395; 396-424; 427-443; 444-462	---
Hexano/AcOEt 80:20	470-674	465-479; 480-498; 499-516; 517-522; 523-525; 526-544; 545-552; 554-570; 571-588; 589-606; 607-624; 625-642; 643-660; 661-676	---
Hexano/AcOEt 70:30	675-768	677-696; 697-714; 715-732; 733-744; 745-757; 758-763; 764-768	---
Hexano/AcOEt 60:40	769-828	769-786; 787-804; 805-813; 814-822; 823-829	---
Hexano/AcOEt 50:50	829-883	831-835; 836-840; 841-858; 859-870; 871-876; 877-882	---
Hexano/AcOEt 60:40	884-972	883-894; 895-930; 931-966;	---
Hexano/AcOEt 30:70	973-977	967-982	---
100% AcOEt	978-1048	983-986; 987-996; 997-1011; 1012-1018; 1019-1038; 1039-1048	---
100% MeOH	1049-1078	1049-1057; 1058-1078	---

5.4. Análisis del extracto metanólico de hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*

El análisis del extracto de metanol fue complicado, debido a la presencia de una saponina en su composición, esta saponina taponeaba la columna, evitando la elución de los compuestos. De las tres columnas, se colectaron menos fracciones (417); en el Cuadro 2 se muestra las fracciones obtenidas y su polaridad, ninguna de ellas tanto en su aspecto físico como en la cromatografía de capa delgada mostraron algo interesante.

Cuadro 2.- Fracciones del extracto de metanol de hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*

Eluyente	Fracciones	Fracciones reunidas	Metabolitos identificados
CH ₂ Cl ₂ puro	1-61	1-3; 2-12; 13-17; 19-36; 37-54; 55-66	---
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5	62-153	71-81; 82-90; 91-101; 102-108; 109-126; 127-144;	---
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 90:10	154-247	145-162; 163-177; 178-180; 181-198; 199-216; 218-223; 224-234	---
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 85:15	248-293	235-252; 253-270; 271-288	---
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 80:20	294-347	289-306; 307-324; 325-342	---
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 70:30	348-396	343-360; 361-378; 379-396	---
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 60:40	397-413		---
100% MeOH	414-417	414-415; 416-417	---

5.5. Análisis del extracto de hexano de hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*

De los tres extractos estudiados, el extracto de hexano de hojas de Tzocohuite, fue el que más se analizó. Se obtuvieron 904 fracciones como se puede ver en el Cuadro 3. Se identificaron 4 metabolitos secundarios del extracto hexánico, todos ellos previamente descritos en la literatura y con una amplia variedad de estudios. Los 4 metabolitos identificados fueron: escualeno (fracciones 16-20), acetato de β -lupeol y acetato de β -amirina (fracciones 50-52) y espinasterol (fracción 68).

Cuadro 3 Fracciones del extracto de hexano de hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*

Eluyente	Fracciones	Fracciones reunidas	Metabolitos identificados
Hexano puro	1-48	1-15; 16-20; 21-36; 37-49	Escualeno
Hexano/AcOEt 95:5	49-257	50-52; 53-55; 56-59; 60-63; 86-100; 101-154; 155-172; 173-208; 209-226; 227-244;	Acetato de β -lupeol Acetato de β -amirina Espinasterol
Hexano/AcOEt 90:10	248-616	245-304; 306-315; 316-340; 342-370; 371-388; 389-400; 402-405; 406-424; 425-500; 501-514; 515-568; 569-586; 587-604; 605-615	---
Hexano/AcOEt 85:15	617-874	616-658; 659-676; 677-694; 695-712; 713-724; 726-734; 735-738; 739-768; 769-776; 777-784; 785-856; 857-874	---
100% AcOEt	875-901	875-901	---
100% MeOH	902-904	902-904	---

En la Figura 7 se muestra el avance de la columna cromatográfica del extracto de hexano de las hojas del Tzocohuite

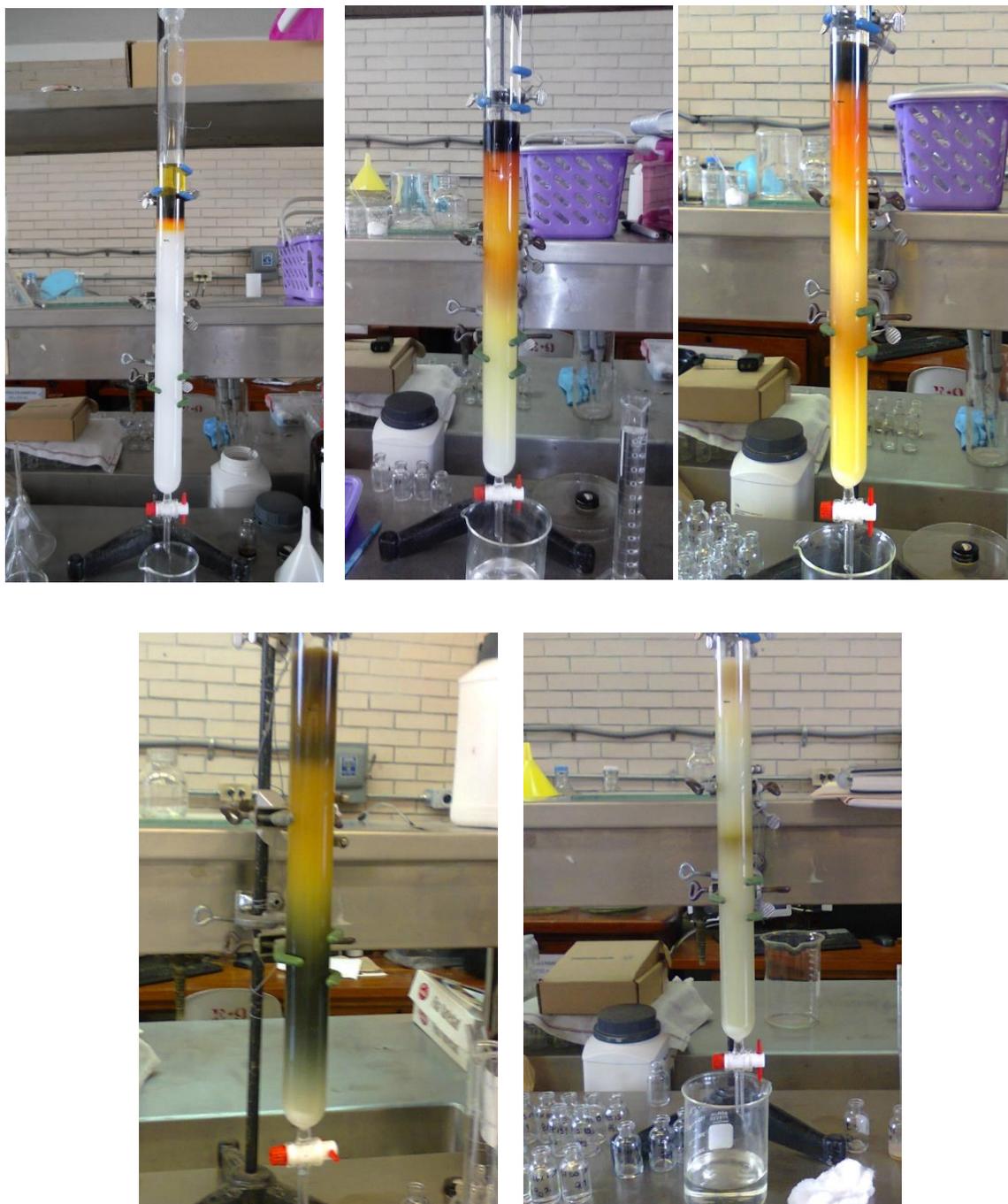


Figura 7 Análisis cromatográfico del extracto de hexano de Tzocohuite

5.5.1. Aislamiento e identificación del escualeno

De las fracciones 16-20 obtenidas del extracto de hexano analizado por cromatografía en columna de hojas de *P. glomerata* subsp. *glomerata*, se obtuvo una sustancia de aspecto aceitoso que en su espectro de RMN (Figura 8) de ^1H mostró en 5.1 ppm un conjunto de señales que integraron para 6H correspondientes a hidrógenos de alquenos, así mismo en 2.01 ppm se observó un conjunto complejo de señales que integraron para 20H de protones en posición alfa a un enlace doble, finalmente en 1.5 ppm se observaron dos señales simples e intensas que integraron para 12H, con la información anterior es posible proponer una serie de fragmentos que están presentes en este aceite.

Por otro lado, en su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 9), se observaron 15 señales, 6 de ellas corresponden a carbonos de tipo alqueno y las 9 restantes corresponden a carbonos con enlace simple.

En tanto que en su espectro DEPT (Figura 10) se observaron 3 señales de carbonos sin hidrógenos en el trazo inferior, 3 señales para carbonos de alqueno tipo =C-H, en el trazo de tercer nivel se observaron 5 carbonos de tipo CH_2 , y en el trazo superior se apreciaron 4 resonancias para grupos metilo (CH_3), al reunir esta información, resulta un derivado de fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{25}$, sin embargo ningún derivado del carbono responde a dicha fórmula, por lo tanto la molécula deberá contener el doble de átomos y entonces su estructura deberá corresponder a la fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, al analizar la información de productos naturales aislados de otras plantas y cotejar sus datos del espectro publicado por la empresa Sigma-Aldrich, se identificó este aceite como escualeno (He *et al.*, 2002).

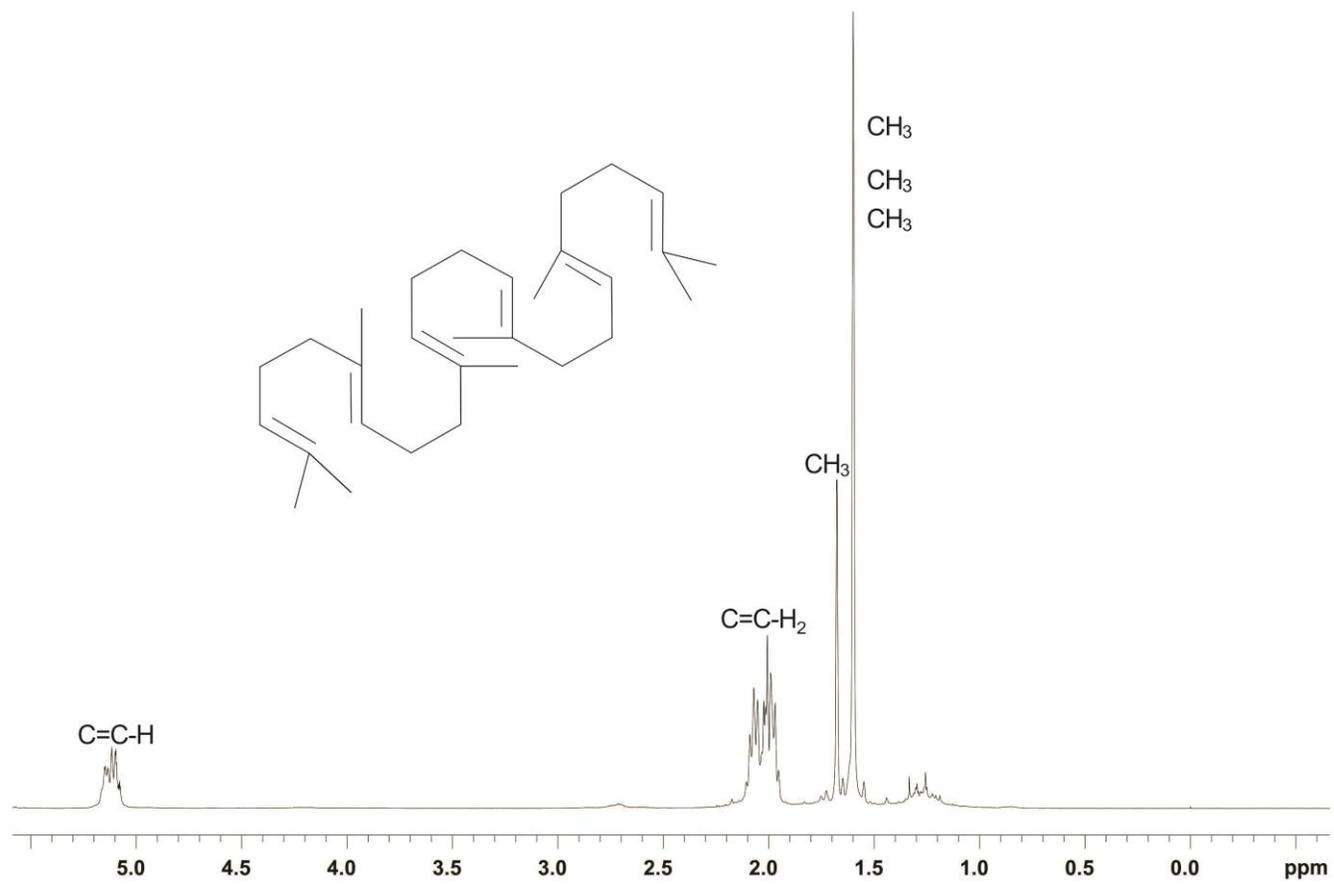


Figura 8 .- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de escualeno en CDCl₃



Figura 9.- Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) en CDCl₃ del escualeno

CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons



Quaternary carbons

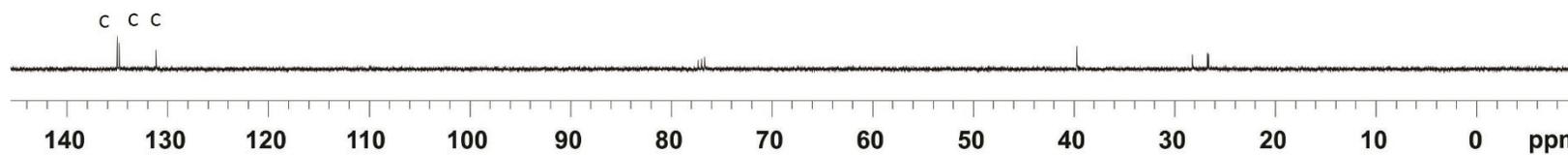


Figura 10 Espectro DEPT del escualeno

El escualeno ($C_{30}H_{50}$) es producido tanto por plantas como animales; se encuentra de manera natural en algunas aceitunas, en el aceite de hígado de tiburón, germen de trigo y en el salvado de arroz (Reddy y Couvreur, 2009). En humanos el escualeno es el precursor de la síntesis del colesterol y de todos los esteroides (Gary *et al.*, 2000), y se sintetiza en el hígado y la piel, transportado en la sangre por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), y secretado en grandes cantidades por las glándulas sebáceas (Reddy y Couvreur, 2009). El escualeno ha sido estudiado debido a los beneficios que este producto natural ha mostrado en la salud del ser humano, algunos de los reportes han sido por su actividad anticancerígena. Se ha demostrado que el escualeno puede prevenir o detener el crecimiento de tumores en conjunto con medicamento anticancerígeno (Reddy y Couvreur, 2009). El aceite de olivo contiene importantes cantidades de escualeno (150-170 mg/100g) y en estudios comparativos de incidencia de cáncer de pecho entre países de la región Mediterránea donde el aceite de oliva es común en su dieta diaria, contra países Escandinavos y EUA donde consumen 85% menos de aceite de oliva, estos últimos tienen un 35% más de incidencia de cáncer de pecho que los países Mediterráneos, esta diferencia se ha vinculado al consumo del aceite de oliva, (Popa *et al.*, 2015). Al igual que el aceite de olivo, el amaranto (*Amaranthus* sp.) en su composición química hay escualeno (6000 a 8000 mg/100g), y ha sido recomendado para la cura de dolores de cabeza y tumores (Ofitserov, 2001).

El escualeno también es conocido por los grandes beneficios para la piel. Se ha demostrado que hidrata, repara la piel dañada y también la rejuvenece. Las propiedades de hidratación y emulsión así como la biocompatibilidad con la piel hacen al escualeno un compuesto importante en la industria de la cosmética (cremas, maquillaje, labiales y productos para uñas y cabello) (Huang *et al.*, 2009). Se sabe que el escualeno muestra actividad antioxidante, y se le atribuye a su estructura química, sus dobles bandas en su esqueleto y los isoprenoides actúan como un fuerte antioxidante y un natural antibiótico (Popa *et al.*, 2015). El aceite de oliva ha mostrado una considerable protección contra la enfermedad cardíaca coronaria y el envejecimiento, debido a la presencia de escualeno y compuestos fenólicos en su composición química. Este triterpeno se acumula en altas concentraciones en la piel, donde tiene un papel importante al eliminar los radicales libres, previniendo el efecto perjudicial de la peroxidación de lípidos (Reddy y Couvreur, 2009). Por otra parte Widyawati *et al.*, (2015), probaron el efecto anti-hiperglucémico del extracto metanólico de

Syzygium polyanthum (Wight.) en ratas diabéticas. Los resultados fueron positivos, demostrando la actividad anti-hiperglucemiante del escualeno.

5.5.2. Aislamiento e identificación de los acetatos de β -lupeol y de β -amirina

De las fracciones 50-52 procedentes del extracto de hexano analizado por cromatografía en columna de hojas del árbol de Tzocohuite. se obtuvo una sustancia sólida que en su espectro de RMN de ^1H , aportó en el intervalo de 5.2 a 4.4 ppm un conjunto de señales que integraron para 5H correspondientes a hidrógenos de alquenos, y de protones base de acetato de dos alcoholes triterpénicos, información que pudo corroborarse en el mismo espectro al observar en 2.01 ppm dos señales intensas que integran para 6H, de dos metilos de grupo acetato. Otro grupo de al menos 15 señales entre 1.7 y 0.6 ppm altas y finas que indican la naturaleza triterpenica de esta mezcla, una de las señales en 5.15 ppm integra para un hidrogeno que podría asignarse a un triterpeno de tipo amirina, en tanto que el conjunto de dos hidrógenos en 4.55 y 4.68 ppm se ha observado en triterpenos de tipo lupano. Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla de triterpenos contenidos en la fracción 50-52 del extracto hexanico de *P. glomerata* subsp. *glomerata*, se observaron 65 señales, restando tres del disolvente CDCl_3 quedan 62 resonancias que corroboran la presencia de al menos dos triterpenos.

Para analizar más detalladamente la estructura de los triterpenos contenidos en la mezcla de la fracción 50-52 de *P. glomerata* subsp. *glomerata*, se aplicaron 110 mg disueltos en hexano de esta mezcla a una columna de vidrio empacada con 10 g de gel de sílice y eluyendo con mezclas de hexano/ CH_2Cl_2 , para dar 15 mg de un sólido blanco en cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 11) en el intervalo de 4.68 y 4.55 ppm se observaron tres grupos de señales, dos de ellas correspondieron a los protones vinílicos del radical isopropileno que se puede encontrar en varios metabolitos secundarios como en monoterpenos, sesquiterpenos o en triterpenos de tipo lupano, además que en 4.45 ppm se observó una señal múltiple que correspondió al protón base de acetato ($\text{CH}_3\text{-C=O}$), y en 2.01 ppm se observó solo una señal del metilo (CH_3) del grupo acetato. Al analizar el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12), del derivado purificado por cromatografía en columna y procedente de la fracción 50-52 (F35) se observaron 36 señales, 2 de ellas corresponden a carbonos de tipo alqueno en 109.3 y 151 ppm del grupo isopropileno y una corresponde a carbono de tipo carbonilo en 171.0 ppm del grupo acetato. En 81 ppm se observó otra

señal característica de carbono tipo CH que contiene un átomo de oxígeno del grupo acetato. Con los datos anteriores y por comparación con los publicados para triterpenos con esqueleto de lupano, se dedujo que la estructura de este metabolito secundario corresponde a la del acetato de β -lupeol (Reynolds *et al.*, 1986).

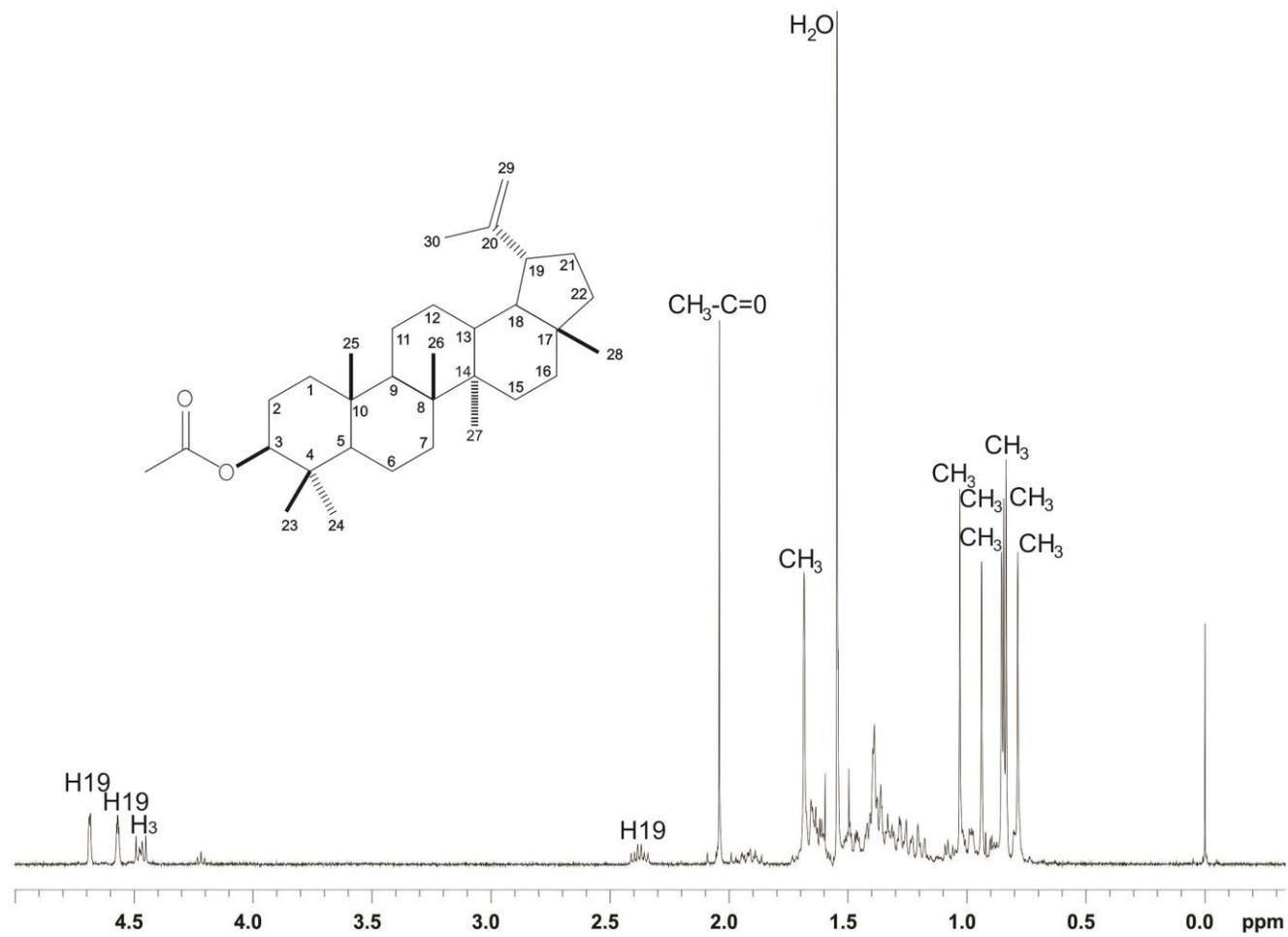


Figura 11 .- Espectro de RMN de ^1H del acetato de β -lupeol

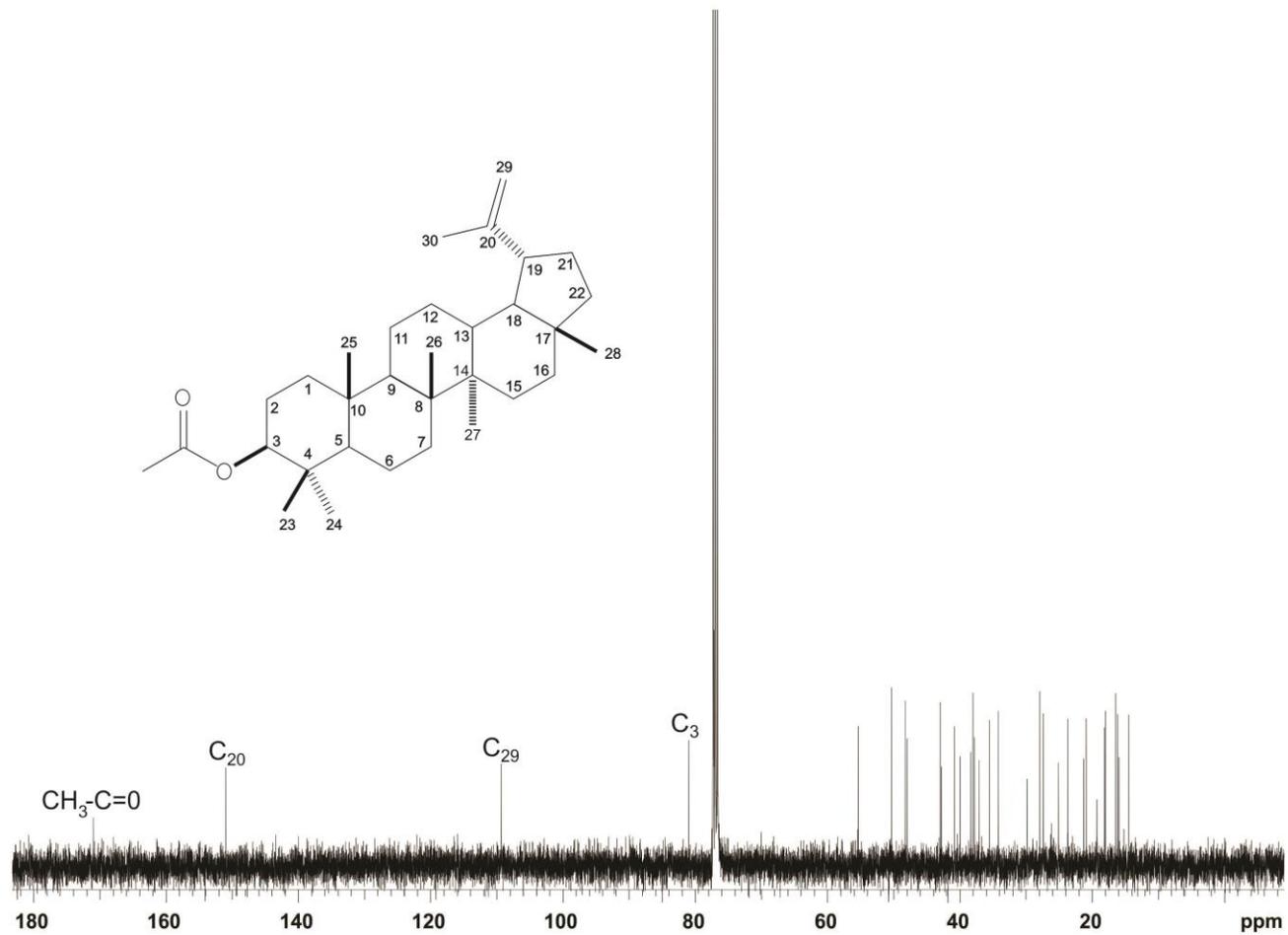


Figura 12.- Espectro de RMN de ^{13}C del acetato de β -lupeol

La mezcla de triterpenos procedente de la fracción F50-52 (F50) del extracto de hexano de *P. glomerata* subsp. *glomerata*, fue sometida a una segunda recromatografía, por lo que fue aplicada a una columna de vidrio empacada con silicagel pero esta vez se eluyo con hexano y mezclas de hexano/CH₂Cl₂, incrementando la polaridad en el orden 99:1, 98:2, 97:3, 96:4 y 95:5. De las fracciones eluidas con la polaridad 99:1, se obtuvo una sustancia sólida cuyo espectro de RMN de ¹H (Figura 13), en 5.18 ppm se observó una señal triple que integro para 1H misma que fue asignada a un hidrógeno de tipo alqueno (C=C-H) en 4.5 ppm se observó una señal múltiple que correspondió al protón base de acetato (CH₃-C=O), y en 2.01 ppm se observó solo una señal del metilo (CH₃) del mismo grupo acetato.

Al analizar el espectro de RMN de ¹³C (Figura 14), del derivado purificado por cromatografía en columna y procedente de la F50-52 (F50) se observaron 36 señales, 2 de ellas corresponden a carbonos de tipo alqueno en 121.6 y 145.2 ppm y una corresponde a carbono de tipo carbonilo en 171.0 ppm del grupo acetato. En 81.0 ppm se observó otra señal característica de carbono tipo CH que contiene un átomo de oxígeno del grupo acetato. Para corroborar la información anterior, el espectro DEPT (Figura 15) de este triterpeno, aporto 9 señales para grupos metilo (CH₃), 10 resonancias para grupos metileno (CH₂), 4 señales para grupos metino (CH) y 8 resonancias para átomos de carbono no-protonados (C). Con los datos anteriores y por comparación con los publicados para triterpenos con esqueleto de amirina, se dedujo que la estructura de este metabolito secundario corresponde a la del acetato de β-amirina (Hossain y Ismail, 2013).

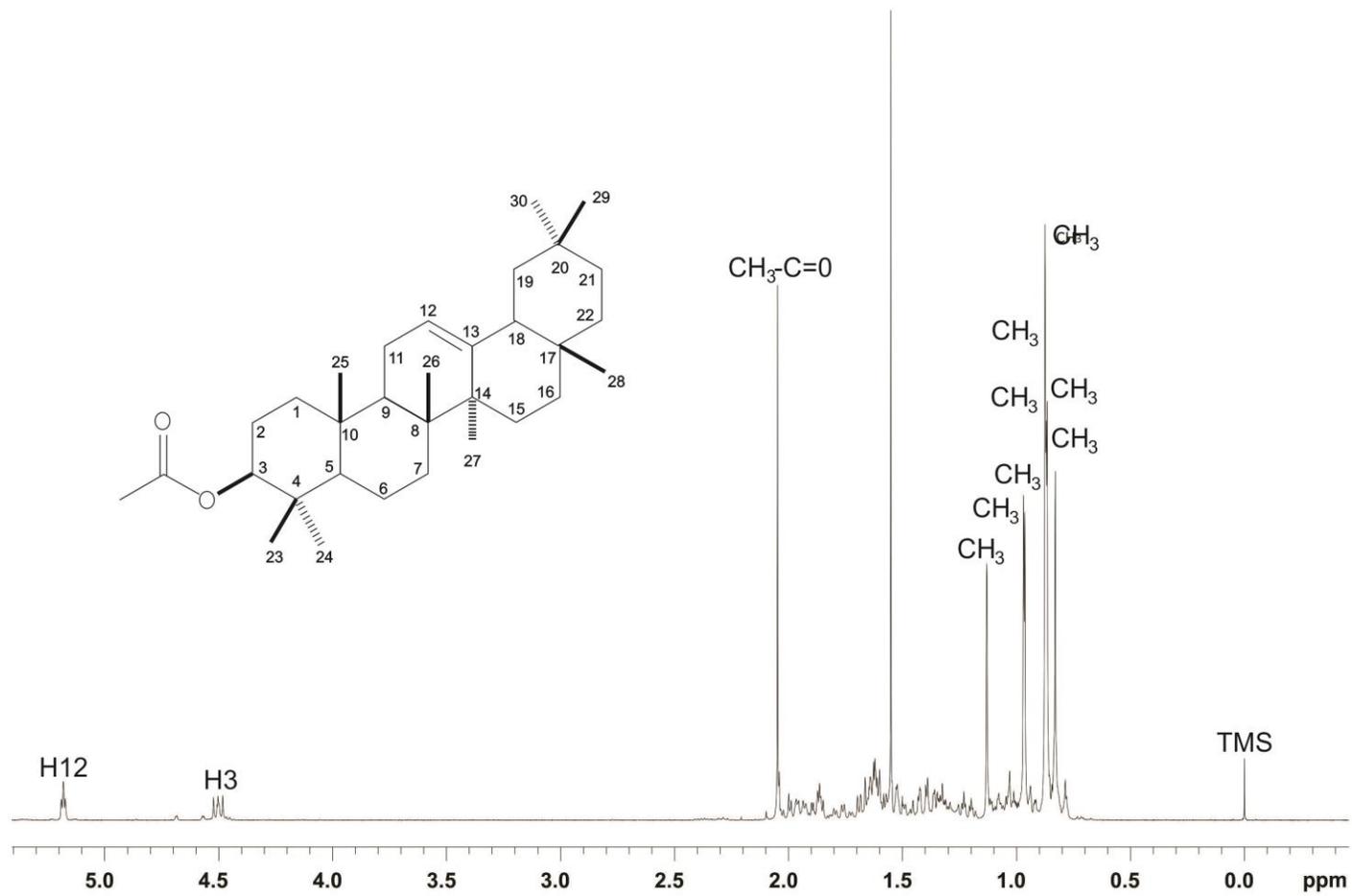


Figura 13 Espectro de RMN de ^1H del acetato de β -amirina

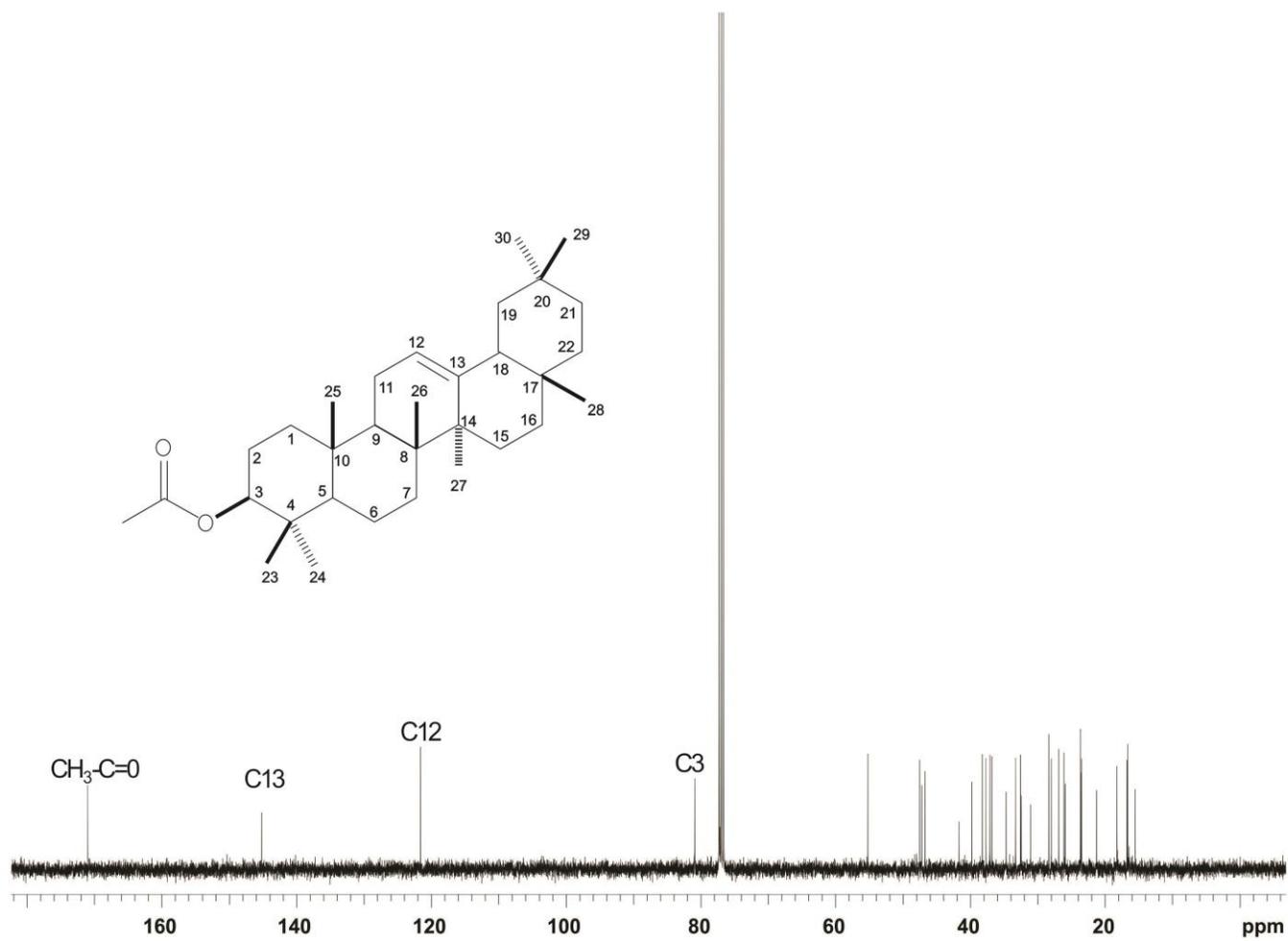


Figura 14.- Espectro de RMN de ¹³C del acetato de β-amirina

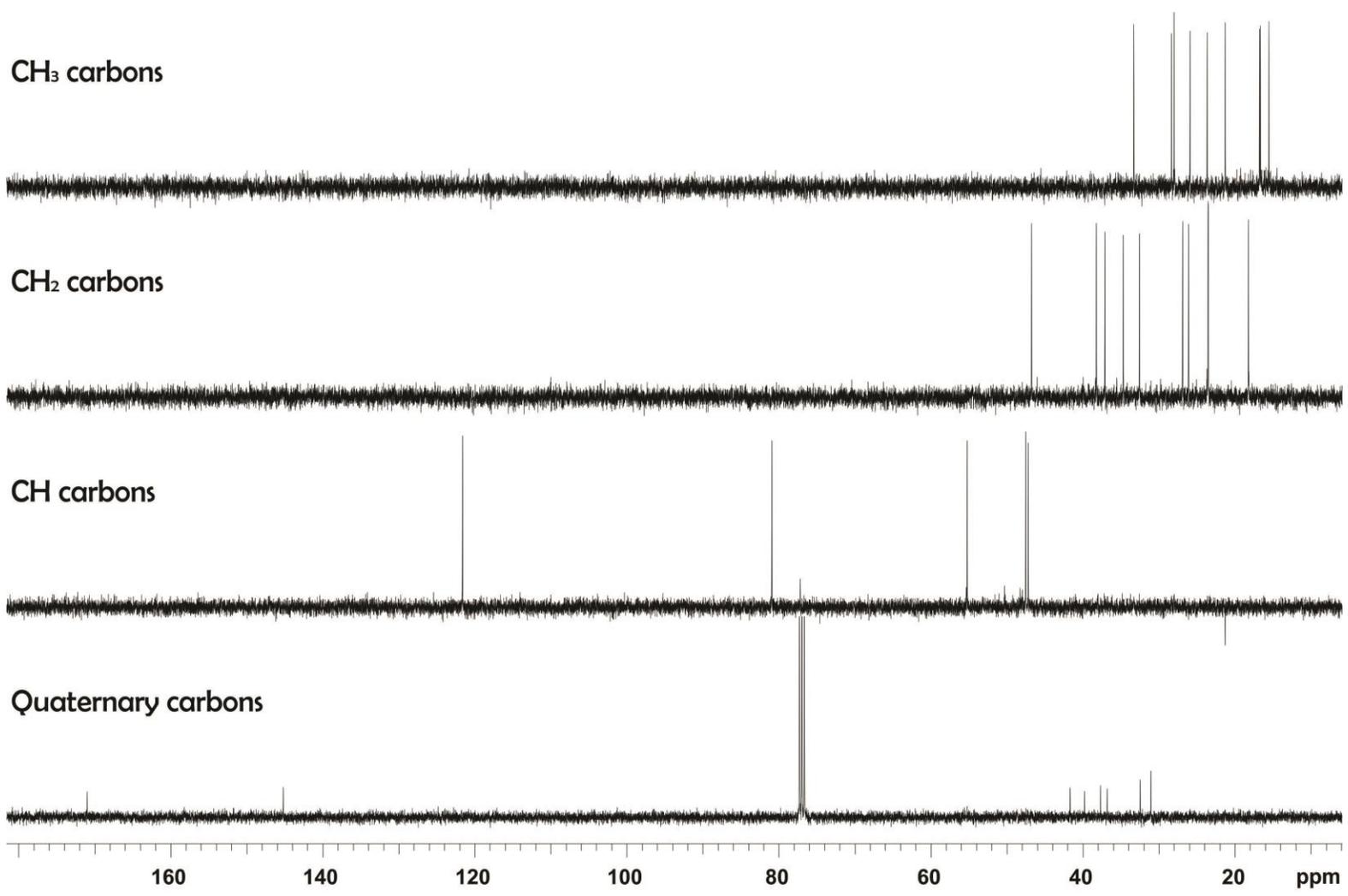


Figura 15.- Espectro DEPT del acetato de β -amirina

El acetato de α -amirina y el acetato de β -amirina aislados por Okoye *et al.* (2014) de la corteza de *Alstonia boonei*, mostraron gran actividad anti-inflamatoria. Mientras que Aragão *et al.* (2009) reporto que ambos triterpenos tiene actividad sedante, y propiedades ansiolíticas y anticonvulsivo. Fabiyi *et al.* (2012) en su estudio concluyen que la actividad antioxidante y citotóxica de las hojas de *Bridelia ferruginea* se debe a la abundante presencia del acetato de β -amirina (66.14%). El acetato de β -amirina también se ha reportado con actividad antitubercular. Higuchi *et al.*, (2011) estudiaron el extracto de cloroformo de las hojas de *Byrsonimia fagifolia* para probar su actividad contra la tuberculosis, midiendo la concentración mínima inhibitoria, siendo la menor, una mezcla de lupeol, acetato de α - y β -amirina (31.25 $\mu\text{g/mL}$). Nasution *et al.* (2015) probaron la actividad antidiabética del acetato de β -amirina, este compuesto fue aislado de la corteza de *Artocarpus camasi*. Los resultados mostraron que el acetato de β -amirina disminuye los niveles de glucosa en la sangre de los ratones a los 60 y 90 minutos, sin embargo su actividad antidiabética es menor que el β -sitosterol.

Lupeol y sus derivados se han descrito con actividad antiprotozoaria, antiinflamatoria, antitumoral, protege el sistema cardiaco, hepatoprotectora, antimicrobiana y recientemente se ha demostrado su actividad antihiper glucemiante (Gallo y Sarachine, 2009). El acetato de β -lupeol es un derivado del lupeol, que se ha reportado con efectos anticonceptivos y antiinflamatorios. Chen *et al.* (2012) probaron los extractos de *Balanophora spicata*. Los resultados mostraron que el acetato de β -lupeol, que fue uno de los terpenos identificados en su composición química, es el metabolito que le da el mayor efecto antiinflamatori a *B. spicata*. Los derivados como el acetato de β -lupeol, toluato de β -lupeol, palmitato de β -lupeol, y el cinamato de β -lupeol, se ha reportado con actividad antidiabética, hipoglucémica y/o antihiper glucemiante. Lakshmi *et al.* (2014) evaluó dicho efecto en ratas diabéticas. Los resultados probaron que los derivados del lupeol poseen mejor actividad antidiabética que el lupeol, actúan disminuyendo los niveles de glucosa en la sangres, estos niveles son comparables al efecto de la metmorfina, uno de los medicamentos más utilizado en el tratamiento de la diabetes. El acetato de β -lupeol de forma natural se ha aislado de la corteza, tallos y frutos de varias plantas medicinales, Adebajo *et al.* (2013), probó la actividad hipoglucémica del acetato de lupeol, al aislarlo de las hojas de *Gongronema latifolium*, evaluando su efecto en ratas diabéticas, y teniendo resultados positivos, ya que tuvo un efecto similar a la insulina. Del extracto acuoso de las hojas de *Ficus carica* se

aislaron cuatro triterpenos, entre ellos el acetato de β -lupeol (Mawa *et al.*, 2013). El extracto fue administrado vía oral e intraperitoneal en ratas diabéticas, con excelentes resultados, comprobando así los efectos hipoglucémicos de *F. carica* (Perez *et al.*, 1998).

5.5.3. Aislamiento e identificación de espinasterol

De la fracción F68 del extracto de hexano estudiado por cromatografía en columna de hojas del árbol de Tzocohuite, se obtuvo una sustancia sólida que en su espectro de RMN de ^1H (Figura 16), en 3.6 ppm se observa una señal múltiple que integra para 1H, misma que es característica para esteroides como β -sitosterol y estigmasterol entre otros. Además en 5.15 y 5.05 ppm se observan dos señales que integran para dos hidrógenos vinílicos con una multiplicidad de doble de dobles y constante de acoplamiento (J) de 15.3 y 8.6 Hz, que corresponden a un enlace doble cuyos hidrógenos tienen una geometría trans- y están acoplados con otro hidrógeno de dos grupos CH de cadena alifática. En el mismo espectro de RMN de ^1H , en 5.10 ppm se observa una señal triple que integra para ^1H , misma que es característica para esteroides y triterpenos, esta señal se encuentra sobrepuesta sobre el sistema doble de dobles en 5.10 y 5.05 ppm, indicando entonces que dicho hidrógeno vinílico está ubicado en una posición diferente al carbono C6 de la mayoría de los esteroides como estigmasterol, proponiéndose una estructura semejante al de un ergosta-7,22-dien-3 β -ol (Figura 17).

Al estudiar el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 18), del metabolito obtenido de la fracción F68 del extracto de hexano obtenido de columna cromatográfica de hojas del árbol de Tzocohuite, se observaron 29 señales, 4 de ellas corresponden a carbonos de tipo alqueno en 139.6, 138.2, 129.5 y 117.4 ppm entonces este metabolito debe contener dos enlaces dobles C=C. Como se mencionó anteriormente, en 5.16 ppm (Espectro de RMN de ^1H) corresponde al protón vinílico (H-C=C) sobre el carbono C7 que absorbe en 117.4 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C , a diferencia del estigmasterol (Figura 25) esta sustancia natural posee un carbono adicional o sea es un esteroide de 29 átomos de carbono, en su espectro DEPT (Figura 19), se distinguen 6 señales para grupos metilo (CH_3), 9 resonancias para grupos metileno (CH_2), 11 señales para grupos metino (CH) y 3 resonancias para átomos de carbono no-protonados (C), aun cuando existe semejanza espectroscópica con el ergosta-7,22-dien-3 β -ol (Figura 25), la presencia de un grupo metileno (CH_2) adicional, permite distinguir a esta sustancia por sus valores de RMN de ^{13}C , de 138.2 y 129.6 ppm

para el producto natural en discusión, contra los valores de 131.4 y 131.2 ppm para el derivado 4. Entonces, de acuerdo con los datos proporcionados de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C y comparados con los de literatura, se concluye que el producto natural en discusión corresponde con la estructura del espinasterol (4) (Itoh *et al.*, 1981; Itoh *et al.*, 1980).

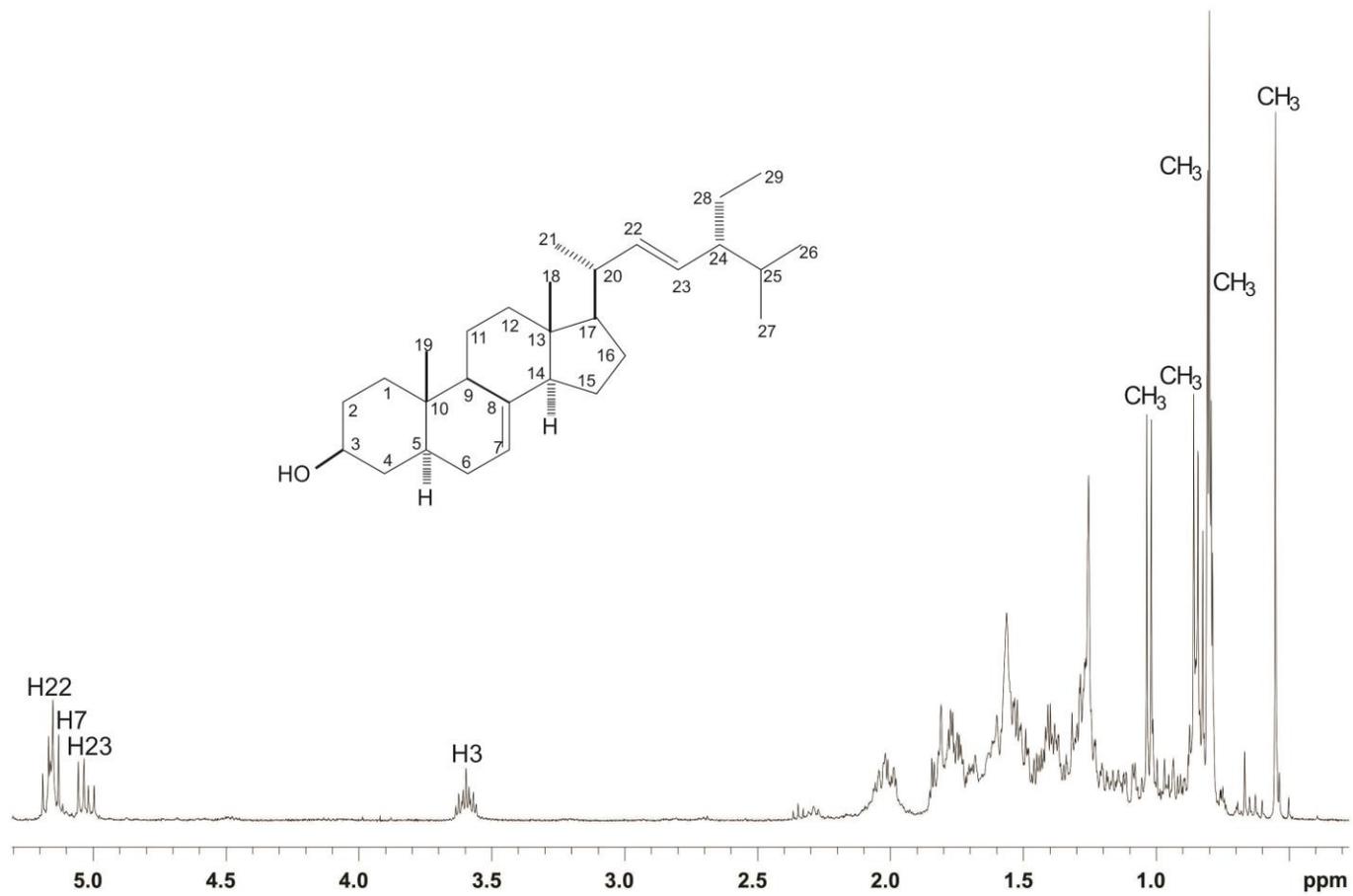
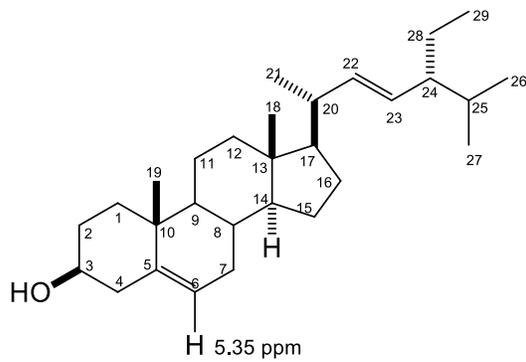
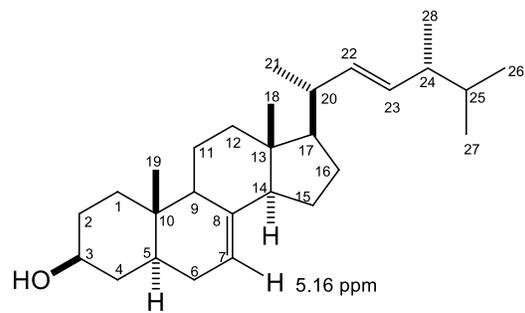


Figura 16.- Espectro de RMN de ¹H del espinasterol



stigmasterol



ergosta-7,22-dien-3 β -ol

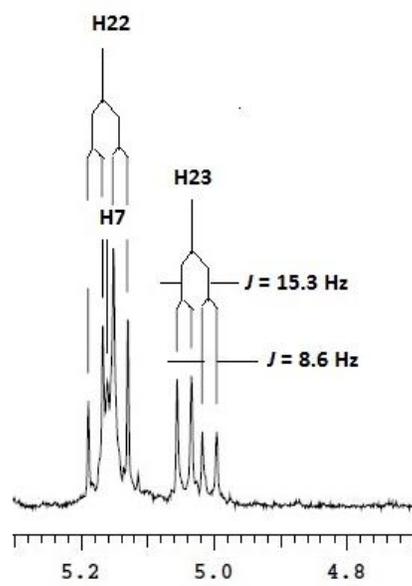
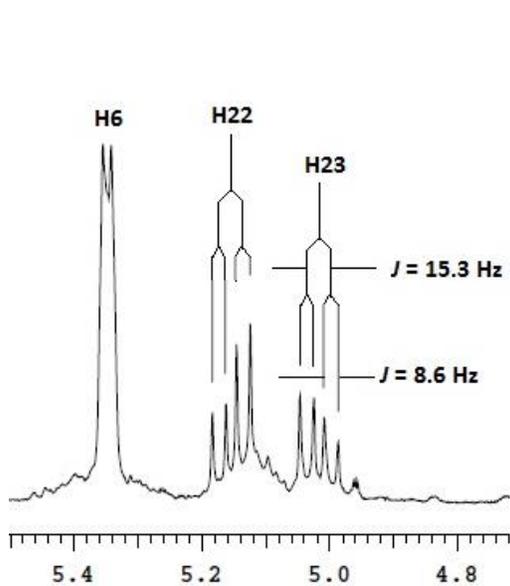


Figura 17.- Ampliación de los espectros de RMN de ^1H del stigmasterol y ergosta-7,22-dien-3 β -ol mostrando la diferencia de desplazamientos químicos del protón vinílico C=C-H

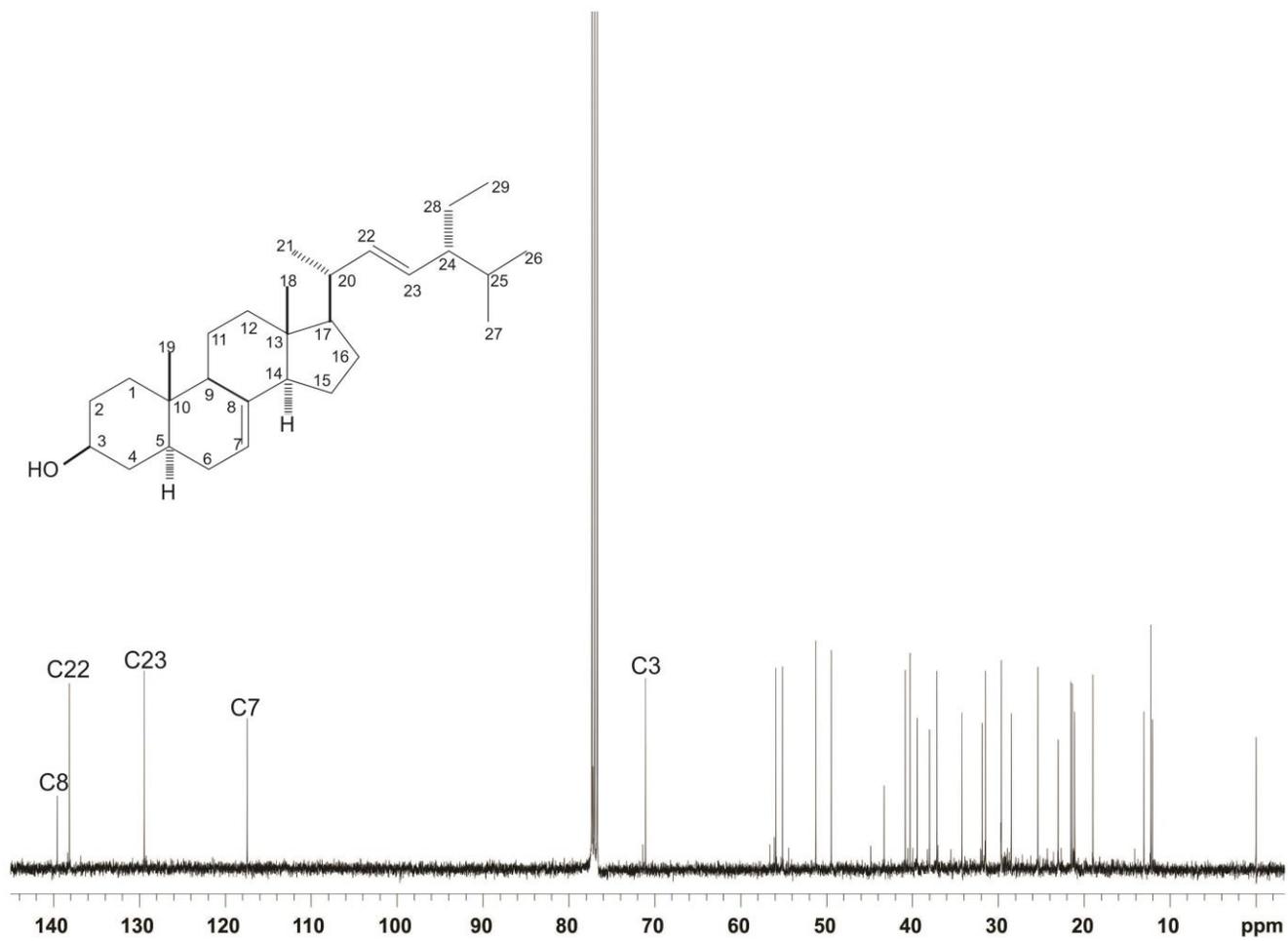
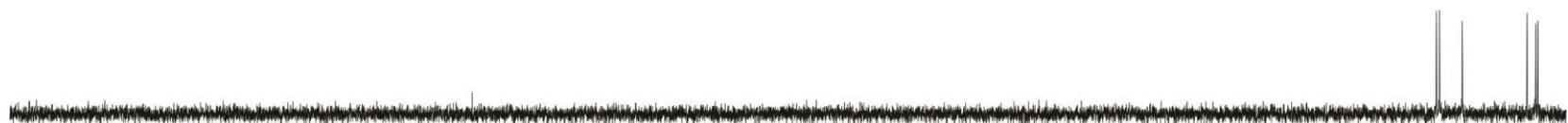


Figura 18.- Espectro de RMN de ¹³C del espirosterol

CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons



Quaternary carbons

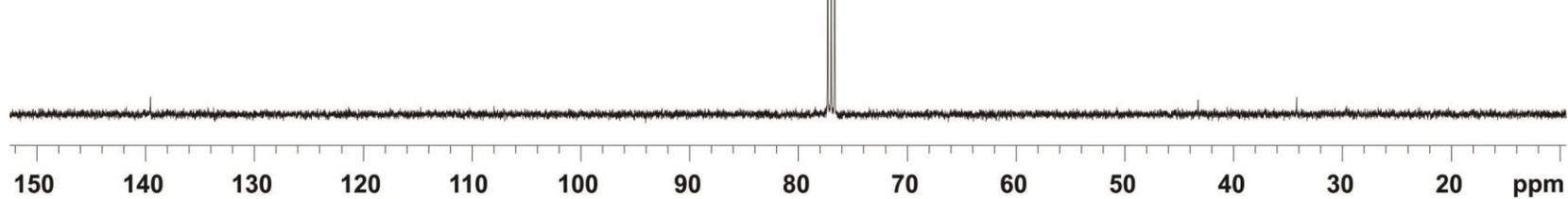


Figura 19.- Espectro DEPT del espinasterol

6. CONCLUSIONES

El espécimen colectado como *Pouteria hypoglauca* fue identificado como *Pouteria glomerata* subsp *glomerata*. El extracto hexánico de las hojas de este árbol fue analizado fitoquímicamente y aportó cuatro metabolitos secundarios conocidos como escualeno, los derivados acetilados de β -lupeol y β -amirina además de espinasterol. Existe evidencia de la efectividad de *P. glomerata* en el tratamiento de diabetes, debido a que de los compuestos aislados, tres han sido evaluados y todos ellos tienen actividad hipoglucemiante. Otras propiedades farmacológicas atribuidas a *P. glomerata* son: antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, antimicrobiana y sedante.

7. RECOMENDACIONES

- Continuar y profundizar en el estudio de las fracciones obtenidas del extracto de cloruro de metileno, ya que el 90% de ellas formaron sólidos y podrían contener compuestos interesantes.
- Analizar los extractos de corteza de Tzocohuite ya que en algunos estudios fitoquímicos reportan que los compuestos que se encuentran en los extractos de las hojas también se pueden aislar de la corteza y en ocasiones en mayor cantidad.
- Evaluar el efecto hipoglucémico del acetato de β -mirina y acetato de β -lupeol en ratas, y así tener mayor conocimiento sobre el efecto de los extractos del árbol de Tzocohuite sobre el control de la diabetes.

8. LITERATURA CITADA

- Adebajo A. C., M.D. Ayoola, S. A. Odediran, A. J. Aladesamni, T. J. Schmidt and E. J. Verspohl (2013) Evaluation of ethnomedical claimIII: anti-hyperglycemic activities of *Gongronema latifolium* root and stem. *Journal of Diabetes* 5:336–343.
- Andrade-Cetto A. and M. Heinrich (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99(2005):325-348.
- Aragão G.F, L.M.V. Carneiro, A.P.F. Junior, P.N. Bandeira, I.L.G. Lemos and G.S. dB. Viana (2009) Evidence for excitatory and inhibitory amino acids participation in the neuropharmacological activity of alpha- and beta- amyryn acetate. *The Open Pharmacol J* 3:9-16.
- Azurdia. C. (2006). Tres especies de zapote en América tropical. Southampton Centre for Underutilised Crops, Universidad de Southampton, Southampton, UK. 216 p.
- Cañigüeral, S., E. Dellacassa y A. L. Bandoni (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farm. Bonaerense* 22(3): 265-278.
- Carranza, G.E. (2005). Flora del Bajío y de regiones adyacentes: Sapotaceae. *Instituto Nacional de Ecología* 132: 34 p.
- Carballo, M. A., C. Cortada M. y A. Gadano B. (2005). Riesgos y Beneficios en el Consumo de Plantas Medicinales. *Theoria* 14 (2): 95-108.
- Chen Y. F., C. Ching, T.S. Wu, C. R. Wu, W. T. Hsieh and H.Y. Tsai (2012) *Balanophora spicata* and Lupeol Acetate Possess Antinociceptive and anti-inflammatory activities *in vivo* and *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 (371273): 10 pages.

- De la Peña, V. G. y C. Illsley. (2010). Productos Forestales no maderables y legislación ambiental: sobre-regulación y vacíos jurídicos. Una propuesta de agenda para la promoción del aprovechamiento sustentable de los productos forestales no maderables desde la perspectiva legal. México.<http://www.raises.org/documentacion/documentos/manejocampesino/ANorpfnm.pdf>
- Espinosa, S. A. J. (1985). Plantas Medicinales de la Huasteca Hidalguense. (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Esquivel, G. E.R., R. Noriega C., M. A. Bello G., A. Saavedra M. y R. Salgado G. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas* 14(1): 45-52.
- Fabiyi O.A., O. Atolani, O.S. Adeyemi and G.A. Olatunji (2012) Antioxidant and Citotoxicity of beta-Amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* Leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S982-S984.
- Gallo M.B.C. and M.J. Sarachine (2009) Biological activities of lupeol. *Int. J. Biomed Pharma. Sci.* 3:46-66.
- García de Alba, G. J., Ramírez, H. B., Robles, A. G., Zañudo, H. J., Salcedo, R. A. y García de Alba, V. J. (2012). Conocimiento y Uso de las Plantas Medicinales en la Zona Metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 39, 29-44.
- García, L. C., B. E. Pérez H., A. Martínez R. y F. Castro B. (2009). Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 8: 229-239.
- Gary, R. M., N. M. Wassef, M. Rao y C. R. Alving. (2000). Induction and detection of antibodies to squalene. *Journal of Immunological Methods*: 1-14.
- He H. P., Y. Cai, M. Sun, and H. Corke (2002) Extraction and Purification of Squalene from *Amaranthus grain*. *Journal of Agricultural food Chemistry* 50: 368–372

- Hernández A. M., J. P. Pablo G. y N. Reynoso N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México* 55(2): s129-s136.
- Higuchi C.T., M. Sannomiya, F.R. Pavan, S.R.A. Leite, D.N. Sato, S.G. Franzblau, L.V. S. Sacramento, W. Vilegas, and C.Q.F. Leite (2008) *Byrsonima fagifolia* Niedenzu Apolar Compounds with Antitubercular Activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011(128349): 5 pages.
- Hossain M.H. and Z. Ismail (2013) Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arabian Journal of Chemistry* 6: 295-298
- Huang Z.R., Y. K. Lin and J.Y Fang (2009) Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potencial uses in cosmetic dermatology. *Molecules* 12(1): 540-554.
- Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. (2008). Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlan. Universidad Nacional Autónoma de México. 29 p.
- Itoh T., Y. Kikuchi, T. Tamura and T. Matsumoto (1981). Co-occurrence of chondrillasterol and spinasterol in two cucurbitaceae seeds as shown by ¹³C NMR. *Phytochemistry*, 20: 761-764
- Itoh T., T. Tamura, T. M. Jeong, T. Tamura and T. Matsumoto (1980). 10 α -Cucurbita-5,24-dien-3 β -ol from gourd seed oil. *Lipids*, 15: 122-123
- Juárez, R. C. R., C. Aguilar J.A., R. Juárez M. E., M. Bugarin, R., L. Juárez, P. y C. Cruz E. (2013). Hierbas Aromáticas y Medicinales en México; tradición e innovación. *Bio Ciencias*, 2(3), 119-129.
- Lakshmi V., A. A. Mahdi, M. K. Ahmad, S. K Agarwal and A. K. Srivastava (2014) Antidiabetic Activity of Lupeol and Lupeol Esters in Streptozotocin- Induced Diabetic Rats. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* 17(2): 138-146.
- Mawa S., K. Husain and I. Jantan (2013) *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013 (974256): 8 pages.

- Miranda, B. M. L., L. Huacuja R., A. L. López V. y A. Panduro C. (2005). Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. Investigación en salud, publicación del Centro Universitario de investigación en salud VII: 64-70.
- Nasution R., M. Nur and H. Nur (2015) beta- Amyrin acetate of ethyl acetate extract of the bark plant *Artocarpus camansi* and its antidiabetic activity. Der Pharma Chemica 7(6):71-78.
- Ofitserov E.N. (2001) Amaranth: Perspective raw material for food processing and pharmaceutical industry, Chemistry and Computational Simulation. Butlerov Communications 2(5):1-4.
- Okoye N.N., D.L. Ajaghaku, H.N. Okeke, E.E. Ildigwe, C.S. Nworu and F.B.C. Okoye (2014) beta-Amiryn and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. Pharm Biol 52 (11):1478-1486.
- Pennington, T. D. (1990). Sapotaceae, Flora Neotropica. Monograph 52: 1-770.
- Perez E., E. Dominguez, J.M. Ramiro, A. Romero, J. E. Campillo and M.D. Torres (1998) A study on the glycaemic balance in streptozotocin-diabetic rats treated with an aqueous extract of *Ficus carica* (fig tree) leaves. Phytotherapy Research 10(1): 364-366.
- Popa O., N. E. Băbeanu, I. Popa, S. Nită and C. E. Dinu-Pârvu (2015) Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015 (367202): 16 pages.
- Reddy L.H and P. Couvreur (2009) Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. Advanced Drug Delivery Reviews 61:1412-1426.
- Reynolds, W.F., S. McLean, J. Poplawski, R. G. Enriquez, L. I. Escobar, I. Leon (1986). Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products Tetrahedron, 42: 3419-3428

- Saucedo, T. M. A., N. Bañuelos F., R. M. Cabrera P. y M. N. Ballesteros V. (2006). La práctica de la medicina alternativa una realidad en el paciente diabético en Hermosillo, Sonora, México. *RESPYN* 7(4) 12 paginas.
- Silva C. A. M., L. A. Simeoni and D. Silveira (2008) Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(2A):501-509.
- Standley, C. P. y L. O. Williams (1967). Flora de Guatemala: Serie Fiel DIANA; Botany 24(VIII):3. Fiel Museum of Natural History. USA.
- Tapia, T. E. C. y R. Reyes C. (2008). Productos forestales no maderables en México: aspectos económicos para el desarrollo sustentable. *Madera y Bosques* 14(3): 95-112.
- Villa, R. N., H. Pachecho Y., Z. Lara B.E., M. Franco J., B. Cardeña M. I., V. Galvan T. O y G. Ruiz L.M. (2011). Biotecnología de Plantas Medicinales Generando Fármacos de un Futuro Tornado Presente. *Temas de Ciencia y Tecnología* 15 (43): 13-20.
- Villareal, M. L., T. Cardoso A., A. Ortiz y A. Sharma (2014). Biotecnología para Producir Medicinas de Plantas Medicinales. *Revista Digital Universitaria* 15 (8): 1-14.
- Widayawati T., N. A. Yudoff, M. Z. Asmawi and M. Ahmad (2015) Antihyperglycemic Effect of Methanol Extract of *Syzygium polyanthum* (Wight.)Leaf in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Nutrients* 7: 7764-7780.