

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

**CAMPUS MONTERREY
ESCUELA DE BIOTECNOLOGIA Y ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGIA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY®**

**“Proceso de extracción y aislamiento de pristimerina de tallo y raíz de
Mortonia greggii, arbusto de la familia *Celastraceae*”**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR:

LUIS ALBERTO MEJÍA MANZANO

MONTERREY, N.L.

MAYO DE 2012

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

ESCUELA DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA

Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por el Ing. Luis Alberto Mejía Manzano, sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias con
Especialidad En Biotecnología

Comité de Tesis:



Dra. Janet Alejandra Gutiérrez Uribe
Asesor



Dra. Bertha Alicia Barba Dávila
Co-asesor (Sinodal)

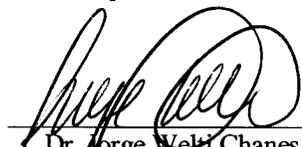


Dr. Silverio García Lara
Sinodal



Dr. Edgardo Jorge Escalante Vázquez
Sinodal

Aprobado:



Dr. Jorge Weltri Chanes
Director de Posgrado de la
Escuela de Biotecnología y Alimentos
Mayo 2012

DEDICATORIAS

A Dios:

Por brindarme la oportunidad de vivir,
conocer, cuidarme a mí y a las personas
que me rodean

A mi familia:

Mis padres por el apoyo continuo e
incondicional

Mi hermana Angélica, a quien quiero
mucho por su fortaleza y coraje en los
momentos más difíciles

A mis catedráticos eméritos:

Profra. Esperanza Gutiérrez Soto (†),
por inculcarme el interés por el estudio.

Dra. Alma Patricia Maqueda Gálvez,
por su ayuda, humildad y demás virtudes
humanas y científicas.

M. Carmen Godínez Flores, por ser el
ejemplo más fiel de la bondad humana

A mis grandes amigos y amigas:

Los cuales he venido acumulando con el
paso del tiempo...

¡Gracias por su motivación continua,
consejos y confianza en cada uno de los
momentos difíciles!

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras:

- **Dra. Bertha Barba Dávila**, por su confianza, motivación, asesoría y amistad
- **Dra. Janet A. Gutiérrez Uribe**, por su asesoramiento, apoyo y paciencia.

A mis sinodales por su disponibilidad, asesoramiento y tiempo para revisar este trabajo

- **Dr. Silverio García**, por sus aportaciones
- **Dr. Edgardo Escalante**, por sus conocimientos y asesoramiento.

Al Dr. Sergio Serna Saldívar, por su apoyo y permitirme integrarme a este grupo de investigación

A la Cátedra de Nutraceúticos y compañeros de otras cátedras y del programa de posgrado en general.

Al grupo de trabajo de Aislamiento Molecular por su colaboración en las diversas actividades y experimentos para conseguir y generar este conocimiento.

A mi amiga Paty Vázquez por su amistad y a quien mucha molestia cause con los artículos de investigación, ¡gracias!

A todos aquellos que facilitaron y contribuyeron de alguna manera al proyecto

Al Tecnológico de Monterrey por las facilidades otorgadas al cursar este posgrado

A cada una de aquellas personas que durante mi estancia en Monterrey me tendieron la mano y me hicieron sentir como en casa: Marce, Agus, Cris y demás...

A ti ser extraordinario, por estar siempre ahí ser la motivación, inspiración, fuerza, inteligencia y voluntad, el espejo que me permite contemplarme.

CONTENIDO GENERAL

Contenido general	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	X
Índice de anexos	XI
Abreviaturas	XII
Unidades	XII
Resumen	XIII
I. Introducción	1
1.1 Objetivo general	2
1.1.1 Objetivos particulares	2
II. Antecedentes	3
2.1 Cáncer: conceptualización y estadísticas	3
2.1.1 Tratamiento de cáncer	4
2.1.2 Productos naturales con actividad anticancerígena	5
2.2 Triterpenos	8
2.2.1 Biosíntesis de triterpenos en plantas	8
2.2.2 Metilénquinonas y pristimerina	10
2.2.3 Actividad biológica de la pristimerina	12
2.2.4 Biosíntesis de pristimerina	13
2.2.5 Fuentes de obtención	15
2.2.5.1 <i>Mortonia greggii</i>	16
2.2.6 Métodos de extracción y aislamiento molecular de pristimerina	18
2.2.6.1 Principios de extracción sólido-líquido	18
2.2.6.2 Proceso de extracción sólido-líquido de pristimerina en plantas	19
2.2.6.3 Principios de cromatografía en columna	21
2.2.6.4 Proceso de aislamiento de pristimerina en plantas	24
III. Materiales y métodos	26
3.1 Caracterización de matriz vegetal y metodología general de extracción y aislamiento de pristimerina	26

3.1.1 Metodología general	26
3.1.2 Colecta de material vegetal	27
3.1.3 Preparación de matriz biológica	28
3.1.4 Análisis de pristimerina por HPLC-MS	29
3.1.5 Análisis de pristimerina por HPLC-UV-VIS	29
3.1.6 Curva de calibración	30
3.1.7 Identificación de pristimerina en hoja, tallo y raíz de <i>Mortonia greggii</i>	30
3.1.8 Análisis de anillos de crecimiento para determinar la edad de la planta	31
3.1.9 Efecto de fecha de colecta de planta sobre la cantidad de pristimerina	31
3.1.9.1 Análisis estadístico	32
3.2 Proceso de extracción sólido-líquido de pristimerina en tallo y raíz	32
3.2.1 Metodología para determinar el efecto de los factores en la extracción sólido-líquido.....	32
3.2.1.1 Prueba con sistemas de solventes y número de extracciones	36
3.2.1.2 Prueba de proporción peso de planta/volumen de solvente (p/v)	37
3.2.1.3 Cinética de extracción y número de extracción	37
3.2.1.4 Prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura	37
3.2.2 Análisis estadístico	39
3.3 Aislamiento molecular de pristimerina	39
3.3.1 Columna cromatográfica de sephadex para extracto de corteza de raíz.....	39
3.3.2. Separación líquido-líquido	41
3.3.3 Análisis estadístico	43
IV. Resultados y discusión	44
4.1 Caracterización de la matriz vegetal	44
4.1.1 Identificación de pristimerina en órganos y tejidos de <i>Mortonia greggii</i>	44
4.1.2 Análisis de anillos de crecimiento para determinar la edad de la planta	47
4.1.3 Efecto de fecha de colecta de planta sobre la cantidad de pristimerina	50
4.2 Proceso de extracción sólido-líquido de pristimerina en tallo y raíz	52
4.2.1 Prueba con sistemas de solventes y número de extracciones	52
4.2.2 Prueba de proporción peso de planta/volumen de solvente (p/v)	60
4.2.3 Cinética de extracción y número de extracción	63

4.2.4 Prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura	68
4.3 Aislamiento molecular de pristimerina	80
4.3.1 Cromatografía en columna de sephadex con extracto de corteza de raíz	80
4.3.2 Separación líquido-líquido	82
4.3.3 Propuesta de proceso de extracción y aislamiento de pristimerina	83
V. Conclusiones	88
VI. Recomendaciones	90
VII. Referencias	92
VIII. Anexos	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de defunciones por tumores malignos por sexo en México	4
Figura 2. Todos los nuevos medicamentos aprobados, 1981-2010, por fuente	6
Figura 3. Medicamentos anticancerígenos disponibles, 1940-2010, por fuente	7
Figura 4. Medicamentos anticancerígenos disponibles, 1981-2010, por fuente	7
Figura 5. Biosíntesis de IPP por ruta de mevalonato y de 2,3-epoxidoescualeno	10
Figura 6. Estructura química desarrollada de pristimerina	11
Figura 7. Formación de friedelanos y biosíntesis de pristimerina propuestas	14
Figura 8. Estructura química de mortoninas.....	16
Figura 9. Estructura parcial del sephadex LH-20.....	23
Figura 10. Metodología general de obtención, aislamiento, identificación / cuantificación de pristimerina	27
Figura 11. Parque ecológico “La Huasteca”, Santa Catarina, N.L.	27
Figura 12. Corte de raíz de <i>Mortonia greggii</i>	29
Figura 13. Metodología para evaluar el efecto de los 6 factores en extracción sólido-líquido	33
Figura 14. Procedimiento para pruebas de extracción sólido-líquido.....	35
Figura 15. Representación esquemática de diseño Box-Behnken para tallo	38
Figura 16. Representación esquemática de diseño Box-Behnken para raíz	38
Figura 17. Procedimiento de operación de columnas cromatográficas	40
Figura 18. Procedimiento en el establecimiento de la separación líquido-líquido ...	42
Figura 19. Cromatograma de iones extraídos y espectro de masas de estándar de pristimerina	44
Figura 20. Fragmentación propuesta por Khalid, <i>et al</i> (2007) para pristimerina	45
Figura 21. Cromatograma de estándar de pristimerina en HPLC-UV-VIS a 420 nm	46
Figura 22. Cromatogramas HPLC-UV-VIS de extractos de corteza de tallo y tejido fundamental-conductivo de tallo a 420 nm	46
Figura 23. Observación al microscopio en 40X de corte transversal de tallo. Visualización de la presencia del compuesto en la corteza	48

Figura 24. Cromatograma HPLC-UV-VIS de corteza de raíz a 420 nm	48
Figura 25. Observación microscópica de anillos de crecimiento en tinción con orceína de tallo de planta G a 40X	48
Figura 26. Gráfica que muestra la relación entre el espesor de anillos de crecimiento en unidades arbitrarias (uA) y precipitación media anual en el estado de Nuevo León	49
Figura 27. Gráfica comparativa de la cantidad de pristimerina extraída de tallo y raíz de <i>M. greggii</i> de dos diferentes colectas	51
Figura 28. Efecto del sistema de solventes a diferente número de extracciones sobre la pureza de pristimerina en un extracto crudo de tallo de <i>M. greggii</i>	53
Figura 29. Rendimiento de extracción de pristimerina en tallo de <i>M. greggii</i> usando diferentes sistemas de solventes en hasta 4 extracciones sucesivas	54
Figura 30. Porcentaje acumulado de recuperación de pristimerina por extracción en tallo de <i>M. greggii</i> para hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol	55
Figura 31. Efecto del sistema de solventes a diferente número de extracciones sobre la pureza de pristimerina en un extracto crudo de raíz de <i>M. greggii</i>	57
Figura 32. Rendimiento de extracción de pristimerina en raíz de <i>M. greggii</i> usando diferentes sistemas de solventes en 4 extracciones sucesivas	58
Figura 33. Porcentaje acumulado de recuperación de pristimerina por extracción en raíz de <i>M. greggii</i> para hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol.....	59
Figura 34. Efecto de la proporción (p/v) y sistema de solventes sobre la pureza de pristimerina en el extracto crudo de tallo de <i>M. greggii</i>	60
Figura 35. Rendimiento de pristimerina extracto de tallo de <i>M. greggii</i> en función del sistema de solventes-proporción p/v	61
Figura 36. Efecto de la interacción proporción (p/v) y sistema de solventes sobre la pureza de pristimerina en el extracto crudo de raíz de <i>M. greggii</i>	62
Figura 37. Rendimiento de pristimerina en extracto de raíz de <i>M. greggii</i> en función del sistema de solventes-proporción p/v	62
Figura 38. Pureza de pristimerina en extracto crudo de tallo de <i>M. greggii</i> a diferentes tiempos de extracción y 4 extracciones sucesivas.....	63
Figura 39. Cinética del rendimiento de pristimerina en extracto de tallo de <i>M.</i>	64

<i>greggii</i> para cuatro extracciones sucesivas	
Figura 40. Pureza de pristimerina en extracto crudo de raíz de <i>M. greggii</i> a diferentes tiempos de extracción y 4 extracciones sucesivas	66
Figura 41. Cinética del rendimiento de pristimerina en extracto de raíz de <i>M. greggii</i> para cuatro extracciones sucesivas	67
Figura 42. Superficies de respuesta para la pureza de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de tallo de <i>M. greggii</i>	70
Figura 43. Respuesta de optimizador para pureza de extracto de tallo	71
Figura 44. Superficies de respuesta para rendimiento de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de tallo de <i>M. greggii</i>	72
Figura 45. Respuesta de optimizador de rendimiento de tallo	73
Figura 46. Respuesta para pureza y rendimiento de extracto de tallo	73
Figura 47. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para pureza de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de raíz de <i>M. greggii</i>	76
Figura 48. Respuesta de optimizador para pureza de extracto de raíz	77
Figura 49. Superficies de respuesta y gráfica de contorno de interacción para rendimiento de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de raíz de <i>M. greggii</i>	78
Figura 50. Respuesta de optimizador para rendimiento de extracto de raíz	79
Figura 51. Respuesta de optimizador para pureza y rendimiento de extracto de raíz	79
Figura 52. Índice de pureza y porcentaje de recuperación de pristimerina en fracciones de columna de sephadex con extracto de corteza de raíz	81
Figura 53A. Proceso de extracción propuesto para pristimerina a partir de <i>Mortonia greggii</i>	85
Figura 53B. Proceso de aislamiento propuesto para pristimerina a partir de <i>Mortonia greggii</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de pristimerina	12
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Mortonia greggii</i>	17
Tabla 3. Sistemas de solventes usados en extracción sólido-líquido de pristimerina en plantas de la familia <i>Celastraceae</i>	21
Tabla 4. Métodos de aislamiento y purificación de pristimerina reportados	25
Tabla 5. Fechas, plantas colectadas y observaciones	28
Tabla 6. Pruebas de hipótesis para pureza (μ)	34
Tabla 7. Pruebas de hipótesis para rendimiento (ρ)	34
Tabla 8. Composiciones S, T y U del sistema Arizona	42
Tabla 9. Iones principales detectados en el estándar de pristimerina	45
Tabla 10. Constantes dieléctricas para los sistemas de solventes evaluados en extracción de pristimerina en tallo y raíz de <i>M. greggii</i>	55
Tabla 11. Coeficientes de partición, pureza y porcentaje de recuperación de pristimerina en las fases de las composiciones evaluadas en la separación líquido-líquido	83

ÍNDICE DE ANEXOS

A. Planta <i>Mortonia greggii</i> en su hábitat	100
B. Fracciones (1-23) columna de sephadex corteza de raíz E	100
C. Curva de calibración de pristimerina	100
D. Análisis del efecto de la fecha de colecta sobre la cantidad de pristimerina (prueba de dos medias con varianzas desconocidas y diferentes)	101
E. Análisis de varianza pureza prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para tallo.....	101
F. Supuestos del análisis de varianza para pureza en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de tallo	102
G. Análisis de varianza rendimiento prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para tallo	102
H. Supuestos del análisis de rendimiento en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de tallo	103
I. Análisis de varianza pureza prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para raíz	103
J. Supuestos del análisis de varianza para pureza en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de raíz	104
K. Análisis de varianza rendimiento prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para raíz	104
L. Supuestos del análisis de varianza para rendimiento en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de raíz	105
M. Análisis de variación en prueba de tiempo, temperatura y agitación	105

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
CC	Cromatografía en columna
CHCl₃	Cloroformo
ETOH	Etanol
HEX	Hexano
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
IC₅₀	Máxima media concentración inhibitoria
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
L/D	Longitud/diámetro
m/z	Masa-carga
MEOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
P	Peso
<i>P</i>	p-valor
TLC	Cromatografía en Capa Fina
UV	Ultravioleta
V	Volumen
VIS	Visible

UNIDADES

°C	Grado centígrado	mL	Mililitro
g	Gramos	mM	Milimolar
h	Horas	rpm	Revoluciones por minuto
mg	Miligramo	μM	Micromolar
min	Minuto		

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad en la población mundial. Un amplio número de productos naturales se han investigado con el objeto de evaluar su actividad anticancerígena. Uno de estos compuestos con resultados satisfactorios es la pristimerina, un triterpeno metilénquinona capaz de inducir apoptosis por diversos mecanismos en distintas líneas celulares de cáncer.

En el presente trabajo se evaluó la presencia de pristimerina en raíz, tallo y hoja de la planta *Mortonia greggii*, identificándose únicamente en los dos primeros órganos. La edad de las plantas empleadas se determinó en función de sus anillos de crecimiento, estimándoles una edad aproximada de 9 años. Al analizar la cantidad del metabolito de interés en dos diferentes fechas de colecta de la planta, se halló que la concentración de pristimerina en tallo colectado en enero de 2012 fue un 25% mayor con respecto a la colecta en agosto del 2011, mientras que en raíz, la colecta de enero 2012 tuvo un 56% más.

En el proceso de extracción sólido-líquido a partir de corteza de tallo y raíz se estudió el efecto del sistema de solventes, número de extracción y proporción entre material vegetal y solvente (p/v) sobre la pureza y rendimiento de pristimerina en los extractos crudos. En tallo, al realizar la extracción de pristimerina con hexano:acetona 2:8 (v/v), en tres extracciones sucesivas permitió obtener un porcentaje de recuperación de hasta el 97.39% con una pureza de 5.6 mg de pristimerina/g de extracto que no se afectó con estas reextracciones. En raíz, el solvente más adecuado fue etanol, y a pesar de que una segunda extracción permitía una recuperación acumulada del 85.74%, se observó un decremento de pureza de 27%. La proporción indicada para realizar la extracción en ambos tipos de extracto fue 0.05g planta/ mL solvente. En tallo los tiempos de extracción que se seleccionaron fue el intervalo 0.5 a 1.5h por favorecer pureza y rendimiento, mientras en raíz se halló que al incrementar el tiempo de extracción a 10h se obtenía el mayor rendimiento y la pureza no se modificaba con los tiempos de extracción. Estos resultados se obtuvieron bajo condiciones estáticas de extracción, por lo que se buscó optimizar el

proceso con una extracción dinámica mediante la aplicación de un diseño Box-Behnken. Las condiciones óptimas para la extracción de tallo fueron 1h 5min 45.6 s, 103.0 rpm y 29.7 °C con una pureza de 4.01mg pristimerina/g de extracto y rendimiento de 4.33mg pristimerina/10 g de planta. Para corteza de raíz las condiciones óptimas fueron 30 minutos, 200 rpm y 49.7 °C, logrando una pureza de 72.37mg pristimerina/g de extracto y un rendimiento de 86.77 mg pristimerina/10g de planta.

Para el aislamiento se realizaron columnas cromatográficas sephadex LH-20, encontrándose que la columna de sephadex incrementó al doble la pureza de pristimerina en el extracto de corteza de raíz con un 28.28% de recuperación. Otra estrategia de separación fue la partición en 2 fases inmiscibles a partir de fracciones de baja pureza después de haber pasado por una columna de sephadex LH-20 para su enriquecimiento. Se estimaron 3 coeficientes de partición de entre 2.27 y 3.01 y porcentajes de recuperación del 65 al 76% para las composiciones S, T y U del sistema Arizona.

Finalmente se propuso un proceso de extracción y aislamiento de pristimerina basado en los resultados obtenidos. En este proceso se propone decorticación y molido de corteza de tallo y raíz, una extracción dinámica en las condiciones óptimas y en el caso de tallo dos extracciones sucesivas estáticas adicionales mientras que para raíz ocurre una extracción más. Los extractos de raíz se pasan por una columna de filtración en gel LH-20 y las fracciones con índices de pureza menores a dos se particionan para conseguir la pureza deseada para el CPC. El extracto de tallo se somete a separación en proporción 15:1 de las fases acuosa y orgánica y se multiplica la pureza 32 veces contribuyendo a poseer una muestra para aislar por CPC con la pureza adecuada. Se concluyó es posible purificar 364 mg de pristimerina a partir de 60.5g de corteza de raíz y 396.2 mg de pristimerina de 800 g de corteza de tallo con base al diagrama de proceso propuesto.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad crónica-degenerativa que ataca indiscriminadamente a diversos sectores de la población, se estima que alrededor del mundo se diagnostica cáncer a 24 personas por minuto y mueren 15 cada minuto. A nivel nacional el panorama es también poco alentador, cada hora se diagnostican 14 personas y mueren 8 por hora (Fundación Teletón, 2012). En este contexto, el cáncer en la actualidad es una temática de interés en investigación con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos eficaces para su prevención y tratamiento.

Las plantas representan una importante fuente natural de diversos metabolitos secundarios que son útiles al ser humano por su actividad biológica y en particular por sus propiedades anticancerígenas. Desde tiempos ancestrales, diversas civilizaciones han aprovechado las plantas en preparaciones para su uso terapéutico y en los últimos años se han conjuntado esfuerzos por identificar, aislar y/o caracterizar a la(s) molécula(s) responsable(s). Entre los diversos grupos de compuestos responsables de brindar estas propiedades medicinales a las plantas están los triterpenos metilénquinonas, compuestos electrofílicos con capacidad de inducir muerte celular en células cancerígenas por mecanismos aun no elucidados por completo.

La pristimerina es uno de estos compuestos del tipo metilénquinona aislado de diversas plantas de la familia *Celastraceae*. En estudios *in vitro* la pristimerina ha mostrado mayor citotoxicidad IC_{50} en comparación con otros productos naturales entre los cuales se encuentra el paclitaxol (Gomes, *et al*, 2011), por lo cual la pristimerina se ha perfilado como un interesante agente anticáncer.

El precio actual de la pristimerina (25 mg) en el mercado oscila entre \$6,155 (Cayman chemical, 2011) y \$10,370 (Sigma Aldrich, 2011) siendo inaccesible prácticamente su adquisición para fines terapéuticos. Este costo se encuentra en función del estado traza (0.0024-0.0045 %) en el que se encuentra la molécula en la raíz de las plantas y a los métodos de extracción y aislamiento empleados. Debido a estas razones

surge la necesidad de buscar por nuevas fuentes vegetales y establecer más y mejores técnicas para su obtención. La optimización del método de extracción permite contar con un extracto de mayor calidad en cuanto a pureza y rendimiento de pristimerina y así reducir el número de etapas subsecuentes de purificación. En el aislamiento, la selección de columnas cromatográficas con la mejor purificación y condiciones de operación permite un aislamiento eficiente que repercutirá a largo plazo sobre la disponibilidad y demanda futura de pristimerina.

1.1 Objetivo general

- ✓ **Establecer un proceso de extracción y aislamiento de pristimerina a partir de la planta *Mortonia greggii*.**

1.1.1Objetivos particulares

- ✓ **Evaluar la presencia de pristimerina en los distintos órganos y tejidos de la planta y ubicar temporalmente a la planta.**
- ✓ **Determinar las variables que afectan la extracción sólido-líquido de pristimerina en *Mortonia greggii*.**
- ✓ **Definir las condiciones óptimas en la extracción sólido-líquido de pristimerina.**
- ✓ **Establecer un método de aislamiento de pristimerina mediante cromatografía en columna.**

II. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer: conceptualización y estadísticas

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011) por cáncer se designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden atacar diversas partes del cuerpo y que se caracterizan por el crecimiento rápido de células anormales.

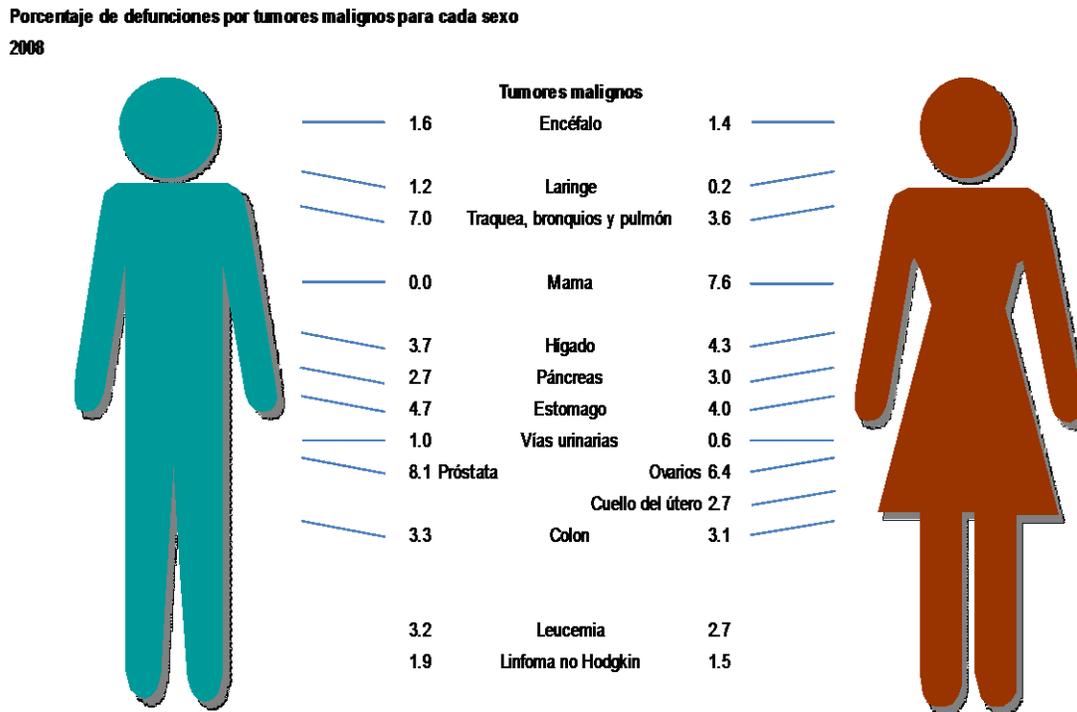
De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer (INC, 2011) el cáncer se puede agrupar en las siguientes categorías de acuerdo al origen embrionario del tejido a través del cual se deriva la masa (Kindt, 2007):

- Carcinoma. Cáncer desarrollado en la piel y en los revestimientos de los órganos internos. Ejemplos de estos cánceres son de colon, mama, próstata y pulmón.
- Sarcoma. Cáncer desarrollado de tejidos conjuntivos mesodérmicos o de sostén como hueso, grasa y cartílago.
- Leucemia. Cáncer que empieza en las células sanguíneas.
- Linfoma y mieloma. Cánceres iniciados en células del sistema inmunitario.
- Cánceres del sistema nervioso central. Aquellos desarrollados en cerebro y médula espinal.

En el 2008, el 30 % de las defunciones mundiales (7.6 millones) se atribuyó al cáncer. A nivel mundial los cánceres causantes de mayor número de defunciones por año son de pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011).

En México, las estadísticas más recientes son las proporcionadas en 2008 por INEGI, en las cuales se indica que de 1998 a 2008 la tasa de defunción por tumores tuvo un incremento de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes. Entre los hombres, el cáncer de próstata fue el tipo de cáncer que causó el mayor porcentaje de muertes (8.1%) seguido por el de tráquea, bronquios y pulmón; mientras en las mujeres el cáncer de mama fue el

predominante (7.6%) seguido de los tumores malignos de ovarios (INEGI, 2008). La distribución de muertes en el año 2008 por tipo de cáncer se indica en la figura 1.



Fuente: INEGI Estadísticas Vitales. Defunciones 2008. Base de datos.

Figura 1. Porcentajes de defunciones por tumores malignos por sexo en México. Fuente: INEGI, 2011.

2.1.1 Tratamiento de cáncer

El tratamiento del cáncer depende de diversos factores entre los que se encuentran la edad de la persona, su estado de salud, el tipo y estadio del cáncer (Roberts, 2003); además en ocasiones se utiliza más de un tipo de tratamiento en combinación de otros. Entre los distintos tratamientos que existen actualmente para el tratamiento del cáncer se enumeran los siguientes (Kindt, 2007):

- ❖ Cirugía. Implica la eliminación del tumor y de los tejidos circundantes, es aplicable cuando el cáncer se detecta tempranamente.

- ❖ Quimioterapia. Es el uso de fármacos administrados por diversas vías para el tratamiento.
- ❖ Radioterapia. Emplea rayos de alta energía para interrumpir el desarrollo y división de las células cancerosas.
- ❖ Hormonoterapia. Se administran fármacos que reducen la producción de hormonas y es eficaz para los cánceres hormonodependientes (cáncer de mama y de próstata).
- ❖ Terapia biológica. También conocida como inmunoterapia, consiste en reforzar el sistema inmune a través del uso de un coadyuvante (citocinas o anticuerpos) para combatir los tumores malignos.
- ❖ Trasplante de médula ósea. Esta modalidad de tratamiento se emplea para cánceres en sangre o en el sistema linfático y representa una opción en la formación de nuevas células sanguíneas cuando se usa la quimioterapia.
- ❖ Terapia génica. Aun no está autorizada como tratamiento para humanos, su uso es aplicable sólo en ensayos clínicos, mediante un vehículo se introducen genes sanos en células humanas para sustituir genes defectuosos causantes del cáncer.

Muchos de estos tratamientos resultan agresivos, por lo cual se buscan opciones más eficaces y con menos efectos secundarios, tales como los productos naturales.

2.1.2 Productos naturales con actividad anticancerígena

Antes de describir la importancia que han tomado los productos naturales en el tratamiento de cáncer, es necesario establecer el concepto de producto natural. Marcano y Hasegawa (2002) definen a producto natural como sinónimo de metabolito secundario, y a éste como un compuesto químico o molécula polifuncional sintetizado en los seres vivos y en la mayoría de los casos “no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza a diferencia de los metabolitos primarios”, aunque en bastantes casos esta idea se ha ido descartando.

La revisión hecha por Newman y Cragg (2010) sobre las nuevas entidades químicas reportadas por la FDA en el periodo de 1981 a 2010 muestra que la contribución

de los productos naturales (N) a los medicamentos es de alrededor del 4% (figura 2). Además un 22% de sustancias provienen de derivados de productos naturales (ND) y cerca del 1% de los medicamentos es de origen natural botánico u obtenido de plantas (NB). En suma, el porcentaje de drogas derivado de los productos naturales incluyendo las subcategorías N, NB y ND es de aproximadamente 27%, con esto se indica la importancia de los productos naturales como agentes terapéuticos.

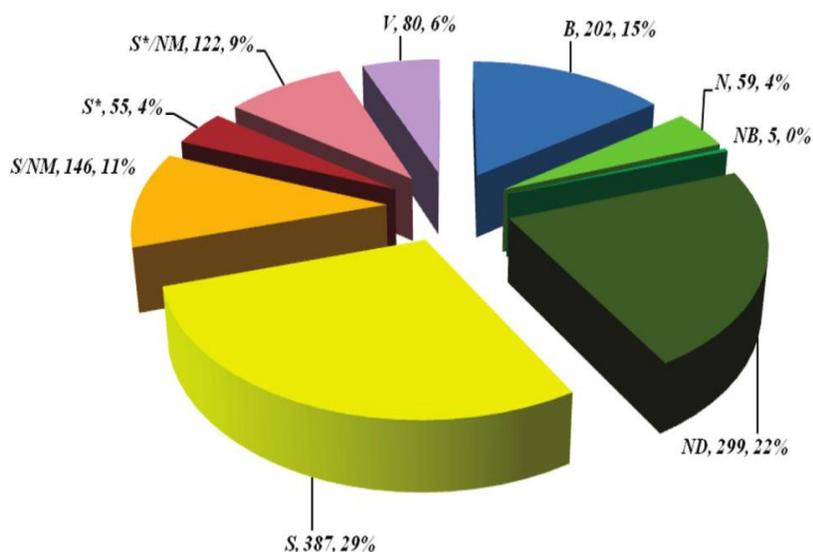


Figura 2. Todos los nuevos medicamentos aprobados, 1981-2010, por fuente: B=biológico, N=producto natural, NB=producto natural botánico, ND= derivado de producto natural, S=Totalmente sintético, S*= Elaborado por síntesis total pero de origen natural, V=vacuna y NM= modificación de producto natural o producto natural mímico (N=1355). Fuente: Newman y Cragg, 2010.

En el caso particular de cáncer, en la misma revisión de Newman y Cragg (2010) en el periodo de 1940 hasta 2010 se indica la contribución de los productos naturales (13%) al desarrollo de fármacos contra el cáncer (figura 3).

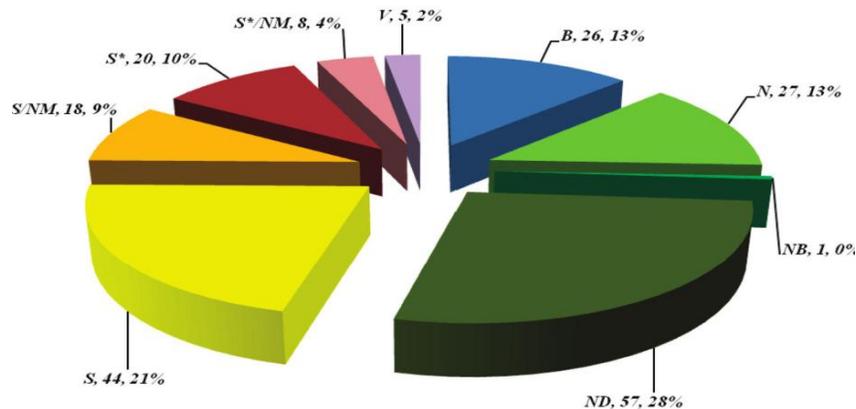


Figura 3. Medicamentos anticancerígenos disponibles, 1940-2010, por fuente: B=biológico, N=producto natural, NB=producto natural botánico, ND= derivado de producto natural, S=Totalmente sintético, S*= Elaborado por síntesis total pero de origen natural, V=vacuna y NM= modificación de producto natural o producto natural mímico. Fuente: Newman y Cragg, 2010.

En la figura 3, se observa también que aparentemente el porcentaje correspondiente a productos naturales de plantas es casi nulo (0%), sin embargo si lo sólo consideramos los medicamentos aprobados de 1981 a 2010 ya es visualizable un 1% para este subcategoría de los compuestos naturales (figura 4).

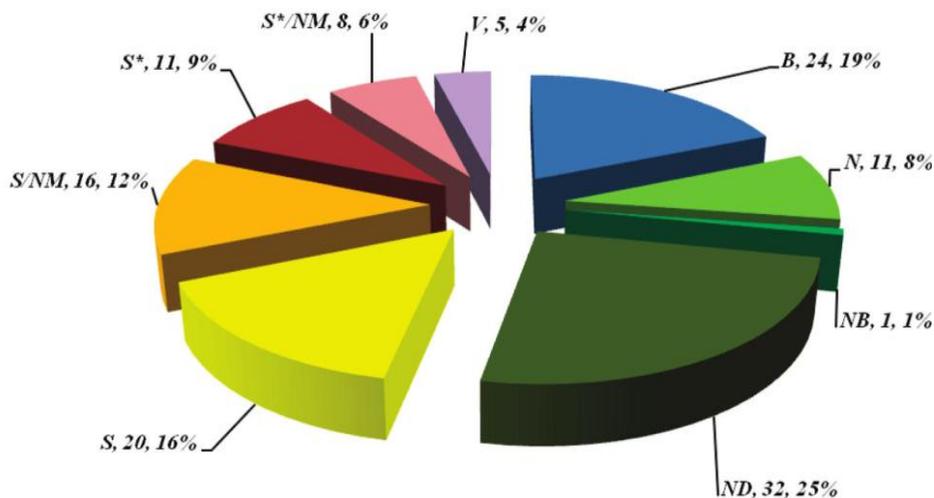


Figura 4. Medicamentos anticancerígenos disponibles, 1981-2010, por fuente: B=biológico, N=producto natural, NB=producto natural botánico, ND= derivado de producto natural, S=Totalmente sintético, S*= Elaborado por síntesis total pero de origen natural, V=vacuna y NM= modificación de producto natural o producto natural mímico. Fuente: Newman y Cragg, 2010.

2.2 Triterpenos

Los triterpenos son compuestos de 30 carbonos formados por 6 unidades de isopreno o 2-metil-buta-1,3-dieno (Spivey, *et al.*, 2002), se encuentran distribuidos en forma amplia en animales y plantas.

Entre las funciones que se les atribuyen a los triterpenos en plantas están la reparación de heridas y la defensa química frente a insectos y al propio ambiente (Salminen, *et al.*, 2008). El estudio de los triterpenos ha llamado la atención debido a su relación con los esteroides y las hormonas sexuales humanas (Marcano y Hasegawa, 2002). Sin embargo, el grupo de los triterpenos es extenso y dentro de éste se pueden encontrar diversas subcategorías de compuestos, en los cuales la presencia o ausencia de uno o más grupos funcionales les confiere distinta actividad biológica.

2.2.1 Biosíntesis de triterpenos en plantas

En animales, el proceso de biosíntesis de triterpenos es complejo y menos conocido que en plantas. Los triterpenos, como se mencionó anteriormente, se forman por unidades de isopreno. Estas unidades de isopreno provienen de dos rutas metabólicas: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del metileritritolfosfato, también llamada del no mevalonato. La primer ruta ocurre en el citosol de las células partiendo de acetil-CoA, mientras la segunda vía se efectúa en los cloroplastos, y parte de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, ambos provenientes de la glucólisis (Dewick, 2009). Se cree que por la naturaleza citosólica de la mayoría de triterpenos, esteroides y algunos sesquiterpenos las unidades de isopreno que los conforman son preferentemente sintetizadas por la vía del mevalonato (MVA), por tanto para fines de esta revisión únicamente se hablará acerca de esta vía para explicar la formación de isoprenoides.

La ruta biosintética del mevalonato (MVA) comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, se incorpora una tercer molécula de acetil-CoA para producir β -hidroxi- β -metilglutarilCoA (HMG-CoA) por acción de la

enzima HMG-CoA sintasa. En una tercera reacción, la proteína integral del retículo endoplásmico liso, la HMG-CoA reductasa cataliza la conversión del HMG-CoA a mevalonato. Al mevalonato se transfieren tres grupos fosfatos de ATPs (Trifosfato de Adenosina) y por una reacción de descarboxilación el 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato pierde el grupo carboxilo y un fosfato generando dos isoprenos activados: isopentenilpirofosfato (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DMAPP), interconvertibles entre sí por la IPP isomerasa (Lehninger, 2003), figura 5.

Después de ocurrir la síntesis del IPP y DAMPP, estos se unen y generan geranylpirofosfato (GPP) con 10 carbonos, al cual si se adiciona un IPP más se obtiene farnesilpirofosfato (FPP) de 15 carbonos, estas reacciones de polimerización (figura 5) son realizadas por enzimas preniltransferasas (McGarvey y Croteau, 1995). Dos moléculas de FPP son enlazadas para formar triterpenos a través de la escualeno sintasa, como se espera el producto de la adición electrofílica se logra el escualeno, importante precursor de triterpenos y fitoesteroles en plantas. Para la formación de ciclos se requiere como intermediario al 2,3-oxidoescualeno. La flavoproteína responsable es la escualeno epoxidasa. Protonación y adiciones electrofílicas suceden hasta un catión protosteril que en el caso del reino vegetal conduce al cicloartenol, por pérdida de un protón (Dewick, 2009); el catión protosteril también da lugar a la formación de otra clase de triterpenos y se puede señalar como un significativo intermediario y a partir de éste las reacciones parecen ser bastante específicas dependiendo el subgrupo de compuestos a estudiar.

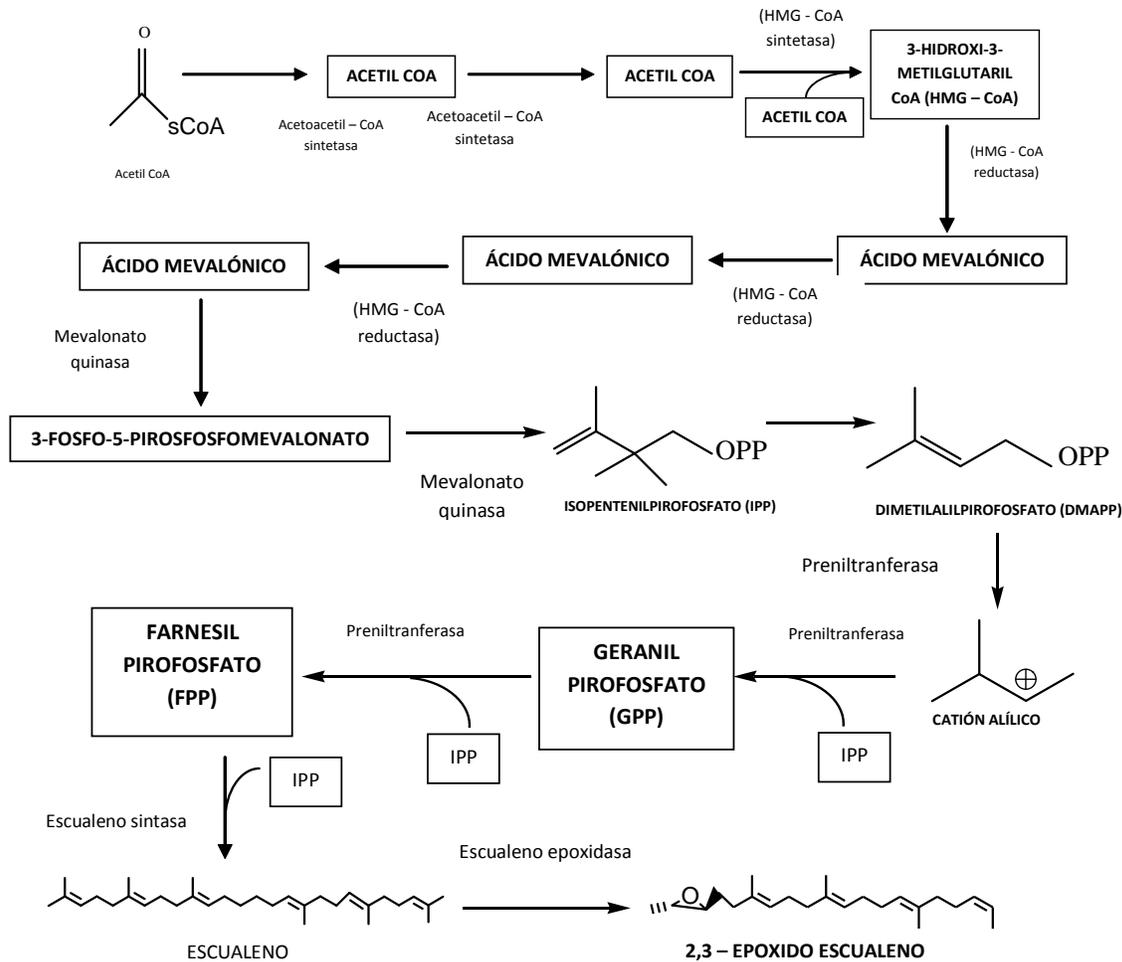


Figura 5. Biosíntesis de IPP por ruta de mevalonato y del 2,3-epoxidoescualeno.

2.2.2 Metilénquinonas y pristimerina

El término metilénquinona se utiliza para referirse a un compuesto análogo a las quinonas en el cual un oxígeno del grupo carbonilo es desplazado por un metileno. Estos compuestos son más reactivos que la quinona y han cobrado importancia en los últimos años por su uso como intermediarios químicos en la síntesis orgánica para el diseño de fármacos con actividad antibiótica y antitumoral (Rokita, 2009). Entre las principales ventajas descritas por Rokita (2009) para el uso de estos compuestos metilénquinonas en el diseño de fármacos se hallan la reversibilidad de las reacciones que se ejecutan con estos y su capacidad de extender la vida de electrófilos en los sistemas biológicos.

Existen una gran variedad de triterpenos que son metilénquinónicos y son productos naturales que quimiotaxonómicamente caracterizan a plantas de las familias *Hippocrateaceae* y *Celastraceae*. En los diversos reportes donde se han aislado y evaluado compuestos de esta naturaleza, se ha destacado su actividad antimicrobiana, antimalaria, citotóxica y antitumoral (Carvalho, *et al*, 2005).

La pristimerina (figura 6) o metil éster celastrol es un triterpeno metilénquinona pentacíclico perteneciente al grupo de los friedelanos aislado de diversas plantas de las familias *Celastraceae* e *Hippocrateaceae* que en los últimos ha llamado la atención por ser un potente producto natural con actividad anticancerígena.

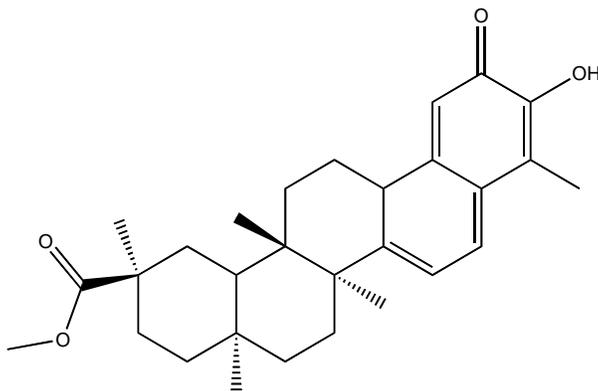


Figura 6. Estructura química desarrollada de pristimerina

El nombre IUPAC para esta molécula es (9b, 13a, 14b, 20a)-3-hidroxi-9,13-dimetil-2-oxo-24, 25, 26-trinoleana-1(10), ácido 3, 5,7-tetraen-29-oico metil éster, sus propiedades físicas y químicas se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de pristimerina. Fuente: The Chapman And Hall Natural Products, 2011

Sinónimo	Metil éster celastrol
Fórmula molecular	C ₃₀ H ₄₀ O ₄
Peso molecular	464.64 g/mol
Apariencia	Cristal anaranjado en aguja
Solubilidad	Soluble en EtOAc, CHCl ₃ , C ₆ H ₆ , Et ₂ O; medianamente soluble en MeOH, acetona, hexano y EtOH (10 mM); poco soluble en H ₂ O, ácidos y bases. Solubilidad en DMSO ≥5 mg/mL
UV-Vis	MeOH λ _{max} 245 (ε10700), 419 (ε15500); en EtOH λ _{max} 221 (ε11220), 252 (ε8910), 424 (ε12020)

2.2.3 Actividad biológica de la pristimerina

La pristimerina al pertenecer a los compuestos metilénquinona se ha encontrado también en las plantas de las familias *Celastraceae* e *Hippocrateaceae*. En la década de 1990, Gunatilaka y Dirsch reportaron la actividad antimicrobiana, antitumoral y antiinflamatoria de este compuesto, no obstante, desde hace tiempo extractos de plantas con pristimerina y muchos otros triterpenos metilénquinonas son usados en la medicina tradicional para tratar reumatismo, soriasis y cáncer (Dirsch, *et al*, 1997). En 1996, Khalid, *et al*, reportó el aislamiento de una fracción de pristimerina con IC₅₀ =1.6 µg/mL de actividad antimalarial y IC₅₀ = 6.3 µg/mL de actividad antileishmanial. Dirsch y colaboradores (1997) evaluaron pristimerina en concentraciones de 0.1 a 1 µM, observando inhibición en la expresión del RNAm de la óxido nítrico sintasa en macrófagos activados con lipopolisacáridos con lo cual se verificaba la actividad antiinflamatoria de la pristimerina. Más tarde, Alvarenga y colaboradores (2001) demostraron la actividad insecticida del compuesto contra la polilla de la manzana *Cydia pomonella* a concentraciones desde 20 a 80 mg/mL.

La pristimerina ha mostrado citotoxicidad en varias líneas de cáncer pulmón (A549), mama (MCF-7) e hígado (HepG2 y Hep3B). En células de cáncer de mama MDA-

MB-231 tratadas con pristimerina a 1 y 3 μM se detectó apoptosis celular como la forma de muerte causada por el compuesto. En este estudio se midió mediante Western Blot la expresión de las proteínas caspasas 3, proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L) y proteínas proapoptóticas (Bax), concluyendo que la activación apoptótica por este compuesto metilénquinona es dependiente de caspasas (Wu, *et al*, 2005). La inhibición del NF κ B con concentraciones de pristimerina menores a 100nM en células de mieloma humano y ratones inmunodeficientes fue observada en el estudio publicado por Tiedemann, *et al* (2009), donde se discutió la apoptosis generada por supresión de ciclinas D e inhibición del proteosoma. Yang y colaboradores (2008) encontraron que pristimerina también inducía apoptosis por inhibición de proteosoma en las células PC-3 de cáncer de próstata tratadas con 5 μM por 8h.

Uno de los estudios más recientes en cuanto a la actividad anticancerígena de pristimerina también indicó reducción hasta en un 50% del crecimiento celular e inducción de apoptosis en células de leucemia mieloide crónica tomadas de pacientes (Lu, *et al*, 2010) además de células que presentaban resistencia al fármaco imatinib por mutación del gen Bcr-Abl (KBM5). López (2010) estudió el efecto de modificaciones químicas realizadas a la pristimerina sobre la citotoxicidad del compuesto en células Hepa-1c1c7 y se percató que disminuyó la citotoxicidad en 5 de los 6 derivados evaluados posiblemente por la alteración química del grupo metilénquinona.

2.2.4 Biosíntesis de pristimerina

La pristimerina es un triterpeno pentacíclico, los triterpenos pentacíclicos pueden estar conformados por cinco anillos de 6 miembros (glutinano, ursano, oleano, taraxerano y friedelano) o cuatro anillos de 6 miembros y uno de cinco (lupano y hopano). En particular la pristimerina pertenece a la serie de friedelanos, los cuales derivan del oxidoescualeno (Nuñez, 2004). Después de la biosíntesis de este intermediario descrita anteriormente, el epoxidoescualeno sufre protonación, ruptura del anillo y ciclaciones conduciendo al catión dammarenilo (figura 7).

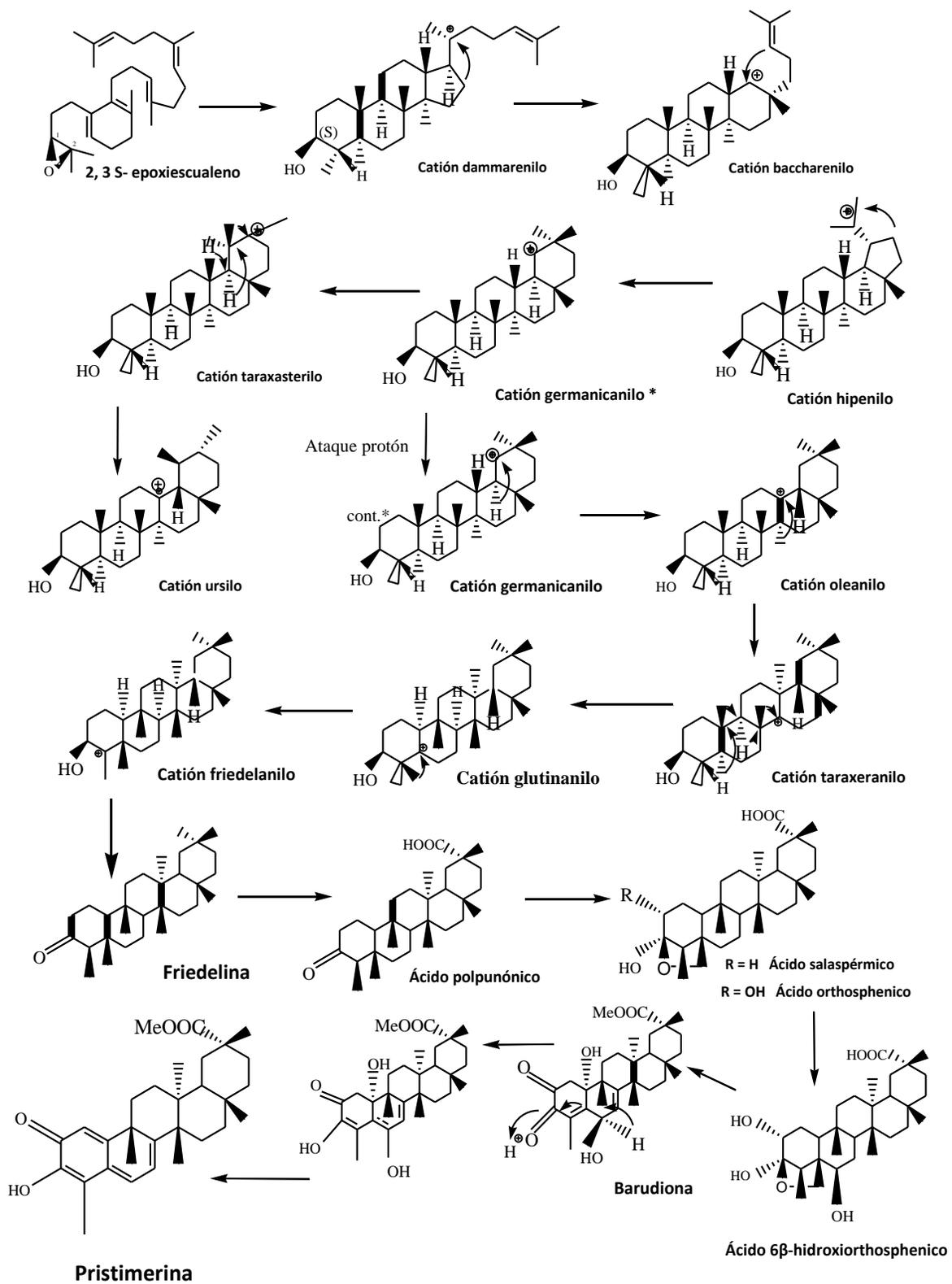


Figura 7. Formación de friedelanos y biosíntesis de pristimerina propuestas. Fuente: Nuñez (2004).

Un cuarto anillo de cinco carbonos se expande para consolidarse en 6 carbonos y obtener el catión baccharenilo por migración alquílica, la ciclación del doble enlace del baccharenilo genera el quinto anillo de 5 carbonos con un catión terciario o mejor conocido como catión lupenilo interviniendo como enzima la lupeol sintasa. La expansión del lupenilo por migración de un enlace genera el sistema oleano, este catión se convierte en taraxarenil por traslocación de un metilo (Dewick, 2009), en taraxarenilo ocurren nuevamente dos rearrreglos de metilos para tener glutinanilo y finalmente la última traslocación conduce al catión friedelanilo (Nuñez, 2004). La friedelina es considerada el precursor más cercano de la pristimerina, este proceso de conversión también es desconocido hasta el momento (figura 7).

2.2.5 Fuentes de obtención

Las plantas empleadas actualmente en la obtención de pristimerina son las que pertenecen a las familias *Celastraceae* e *Hippocrateaceae*, recientemente en la publicación de Alvarenga y Lombardi (2010) se halló que *Hippocrateaceae* es incluida en la familia *Celastraceae*, que a su vez se divide en *Salacioideae* y *Hippocrateoideae*.

Las plantas de esta familia *Celastraceae* son arbustos y árboles distribuidos en las regiones tropicales y templadas, integrada por 55 géneros y 850 especies, su principal uso es ornamental. Como características generales tienen hojas simples, alternadas u opuestas; flores pequeñas, regulares, usualmente bisexuales; cáliz de 3 a 5 sépalos unidos o separados; corola de 3 a 5 pétalos libres; ovario superior de 2 a 5 unidades de carpelo generalmente con dos óvulos; semilla con endospermo y arilo colorido (Hickey y King, 2007).

La quimiotaxonomía de las plantas pertenecientes a esta familia se compone principalmente por fenilalquilaminas, maytansinoides, flavonoides y terpenoides (Spivey, *et al*, 2002), dentro de los cuales se encuentran los triterpenos que han sido mencionados anteriormente y que a su vez incluyen en este grupo a los compuestos metinoquinonas. Los sesquiterpenos agarofuranos son diversos y compuestos característicos de la familia

Celastraceae, son poliésteres polioxigenados de triciclos basados en un esqueleto de 15 carbonos denominado dehidroagarofurano (Spivey, *et al*, 2002).

2.2.5.1 *Mortonia greggii*

En este proyecto se plantea la obtención de pristimerina a partir de *Mortonia greggii*, planta perteneciente a la familia *Celastraceae* anteriormente descrita. En particular, el género *Mortonia* se compone de once especies, algunos ejemplos son *Mortonia hidalguensis*, *Mortonia palmeri*, *Mortonia scabrella*, *Mortonia diffusa*, *Mortonia utahensis* y *Mortonia greggii*.

Investigaciones destacadas en plantas del género comprenden el aislamiento de mortoninas y sus precursores sesquiterpénicos (mortonoles) en hojas de *Mortonia hidalguensis* (Martínez, *et al*, 1981) y de fridelanos y mortoninas A y C en la parte aérea de *Mortonia diffusa* (Martínez, *et al*, 1988), estas dos plantas localizadas en los estados de Hidalgo y Puebla respectivamente. Las mortoninas son compuestos sesquiterpenos con un núcleo tetrahidro-oxepina, estas moléculas se han llegado a considerar como característica diagnóstica y quimiotaxonómica del género *Mortonia* (Martínez, *et al*, 1988).



Figura 8. Estructura química de mortoninas

Mortonia greggii es una planta de la cual existe escasa información botánica, los datos que se poseen son los reportados por algunos exploradores, se conoce comúnmente como “afinador”, su clasificación taxonómica (ITIS, 2011) se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Mortonia greggii*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Magnoliophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Superorden	Celastranae
Orden	Celastrales
Familia	Celastraceae
Subfamilia	Celastroidae
Tribu	Celastreae
Género	<i>Mortonia</i>
Especie	<i>Mortonia greggii</i>

Esta planta crece en colinas de tierra caliza alcalina al norte de México y sur de Estados Unidos (Everitt, 2002). Richardson (1995) mencionó que esta planta es un arbusto pequeño con hojas alternadas y oblanceoladas de 2.5cm de largo, fruto en aquenio, cáliz de cinco lóbulos de 2mm de largo con flores de pétalos blancos que aparecen en primavera e invierno (Universidad de Texas, 2011).

Hasta el momento el único estudio fitoquímico detectado en esta planta es el realizado por Arciniégas y colaboradores (2004), en el cual se aislaron 11 compuestos con actividad antiinflamatoria en la raíz extraída con hexano y acetona, el friedelano ácido metil éster dehidrocanofílico, su ácido libre y derivados de lupeol inhibieron la producción de óxido nítrico en ratas machos inducidas con carrageninas y 13-acetato 12-O-tetradecanoilforbol.

2.2.6 Métodos de extracción y aislamiento molecular de pristimerina

2.2.6.1 Principios de extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es un método que desde la antigüedad se ha utilizado para la obtención de principios activos y productos naturales procedentes de plantas. Se define como una “operación básica y unitaria cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida” (Ibartz y Barbosa, 2005). Los componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida se denominan solutos y el sólido insoluble en la fase líquida se conoce como inerte (Ulluari, 2010).

Los procesos de extracción sólido-líquidos se clasifican según Sharapin (2000) en dos grupos: procesos resultado de un equilibrio de concentración del soluto y del residuo (maceración) y aquellos que agotan el soluto (percolación y extracción en contra corriente). La maceración es permitir el contacto del soluto con el solvente durante determinado tiempo hasta lograr un equilibrio, este equilibrio se produce cuando se alcanza la misma concentración al interior y exterior de las células vegetales o en su defecto cuando la solución se sature con el soluto debido al gran contenido de la molécula en el sólido (Ibartz, 2005). La maceración a su vez puede dividirse en estática y dinámica, la primera cuando hay ausencia en agitación y la segunda cuando se proporciona movimiento constante al proceso (Sharapin, 2000). En las siguientes líneas y contenido de este documento se hará referencia a la maceración como proceso de extracción sólido-líquido.

Un aspecto importante al practicar esta operación en materiales vegetales es contar con la planta seca para prevenir el ataque microbiano, degradación de metabolitos o interferencia de agua en la extracción. El secado puede realizarse dejando la planta a temperatura ambiente en una habitación con ventilación adecuada y se puede acelerar empleando un horno, otra opción es la liofilización (Sarker, *et al*, 2006).

En la extracción sólido-líquido por maceración ocurren tres fenómenos consecutivos:

- Cambio de fase del soluto. Consiste en la penetración del solvente a las células y contacto con el sólido ó material vegetal y su paso de estado sólido al líquido (Ulluari, 2010).
- Difusión del soluto en el solvente contenido en los poros del sólido por difusión molecular. En esta etapa las sustancias solubles de células rotas se lixivian mientras que en células intactas el soluto se difunde a través de membrana por aumento de su permeabilidad, consecuencia del humedecimiento y ablandamiento de la misma. La transferencia del soluto desde el interior hacia la superficie del sólido ocurre debido a un gradiente de concentración.
- Transferencia del soluto desde la superficie del sólido hasta el seno de la disolución por convección. Por concentración desde la superficie del sólido, el soluto se transfiere a la solución hasta alcanzar el equilibrio.

Aunque en la maceración se indica como desventajas la lentitud del proceso por consumo de tiempo elevado para su realización y la negativa de alcanzar la extracción completa de la sustancia o soluto (Sharapin, 2000), se ha propuesto la adopción de la maceración dinámica y el uso de extracciones sucesivas o en serie como alternativas de solución a los problemas señalados correspondientemente. Una de las importantes ventajas atribuibles a este proceso es que se evita la degradación de metabolitos termolábiles (Sarker, *et al*, 2006) que puede ocurrir al recurrir a otros métodos como la extracción en Soxhlet al usar temperaturas altas. Por lo general, en la maceración la temperatura empleada es la ambiente aunque puede modificarse sin perjudicar la estabilidad del soluto.

2.2.6.2 Proceso de extracción sólido-líquido de pristimerina en plantas

Hasta el momento la extracción de pristimerina en plantas de las familias *Celastraceae* e *Hippocrataceae* se ha realizado con la raíz de las mismas. En la

preparación de la raíz, Carvalho, *et al* (2005) y Nossack, *et al* (2004) brindaron un secado a 40°C por 24h a ventilación forzada y subsecuente pulverización, Ankli, *et al* (2000) sólo usó aire para el secado mientras el resto de autores no mencionan el proceso de pretratamiento de la planta.

En la tabla 3 se indica la planta, sistemas de solventes, y referencia de los métodos de extracción de pristimerina. Se puede visualizar que los sistemas más usados son el hexano: éter etílico (1:1) y cloruro de metileno con constantes dieléctricas de 3.11 y 8.93 respectivamente, lo cual indica en estas matrices vegetales la extracción con sistemas de baja polaridad. En el proceso de Rojo, *et al* (2010), el hexano fue sustituido por ciclohexano, sin embargo la constante dieléctrica del sistema con éter etílico se conservó dentro de aquellos sistemas de baja polaridad. Otros solventes que en menor grado se han empleado son alcoholes como metanol y etanol.

Cabe resaltar que en algunos de estos estudios (Quiang, *et al* 2005 y Gutiérrez, *et al* 2007) se recurrió al uso de Soxhlet, sin embargo se cree que el empleo de esta técnica puede descomponer térmicamente a los compuestos además de requerir energía para realizar la evaporación y condensación de los solventes (Wang y Weller, 2006).

Tabla 3. Sistemas de solventes usados en extracción-sólido líquido de pristimerina en plantas de la familia *Celastraceae*.

PLANTA	SISTEMA DE SOLVENTES	REFERENCIA
<i>Crossopetalum gaumeri</i>	CH ₂ Cl ₂	Ankli, <i>et al</i> , 2000
<i>Crossopetalum uragoga</i>	Hexano: Et ₂ O (1:1)	Nuñez, 2003
<i>Cheiloclinium cognatum</i>	Etanol	Haroldo, <i>et al</i> , 2004
<i>Maytenus aquifolium</i>	MeOH	Nossack, <i>et al</i> , 2004
<i>Salacia campestris</i>	CH ₂ Cl ₂	Carvalho, <i>et al</i> , 2005
<i>Celastrus hypoleucus</i>	Acetona en reflujo	Quiang, <i>et al</i> , 2005
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Hexano: Et ₂ O (1:1) en Soxhlet (48h)	Gutiérrez, <i>et al</i> , 2007
<i>Maytenus senegalensis</i>	Cloroformo (CHCl ₃)	Khalid, <i>et al</i> , 2007
<i>Maytenus vitis-idaea</i>	Et ₂ O:ciclohexano (1:1)	Rojo, <i>et al</i> , 2010

2.2.6.3 Principios de cromatografía en columna

La cromatografía ha sido utilizada como método para la purificación de pequeñas cantidades de complejas mezclas orgánicas, aprovechando la distribución de los componentes de la mezcla entre una fase móvil y una fase estacionaria (Armarego y Chai, 2009). Por la naturaleza de la fase estacionaria, la cromatografía es clasificada en líquida y de gases. En la líquida la fase móvil es un líquido y esta clase de cromatografía se subdivide en: adsorción, partición, intercambio iónico y de filtración en gel. Dentro de la cromatografía de adsorción encontramos la cromatografía en capa fina (CCF) y la

cromatografía en columna (CC) o también nombrada como Cromatografía Líquida de Baja Presión (CLBP).

Existen diversos materiales adsorbentes que se utilizan en el empaquetamiento de columnas, uno de los más comunes es la sílica gel, un polímero tridimensional de óxido de silicón ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), poroso que ofrece un área de contacto entre 5-800 m^2/g con tamaños de partícula en el rango de 40-200 μm y tamaño de poro de 40-300 \AA . La superficie de la sílica gel es débilmente ácida por la presencia de grupos silanol que pueden formar fuertes puentes de hidrógeno con compuestos polares conteniendo aminas, amidas y ácidos carboxílicos como sustituyentes mientras compuestos no polares son adsorbidos de forma débil o no son retenidos en el soporte, aunque este comportamiento está en función de la polaridad de la fase móvil, principalmente el uso de este soporte está destinado a la separación de compuestos no polares y de polaridad intermedia (Sarker y Gray, 2006).

Una de las opciones que se ha empleado recientemente en la purificación de productos naturales es la cromatografía por exclusión de tamaño o filtración en gel mediante el uso de sephadex LH-20 para separar moléculas con base al tamaño. El sephadex LH-20 es una forma hidroxipropilada del sephadex G-25 (figura 9), un entrecruzamiento de moléculas de dextranos (Amersham Biosciences, 2002). El rango de fraccionamiento que ofrece es de 100 a 4000 uma y exhibe propiedades hidrófobas e hidrofílicas (Sarker y Gray, 2006) que le permiten eluir compuestos polares y no polares, dependiendo del sistema de solventes electo. El uso repetido del sephadex sin la necesidad de su regeneración y su propiedad de inerte son ventajas que se le atribuyen a este soporte. A través de este tipo de cromatografía de filtración en gel ha sido posible aislar esteroides, lípidos, terpenoides y péptidos de bajo peso molecular (Amersham Biosciences, 2002).

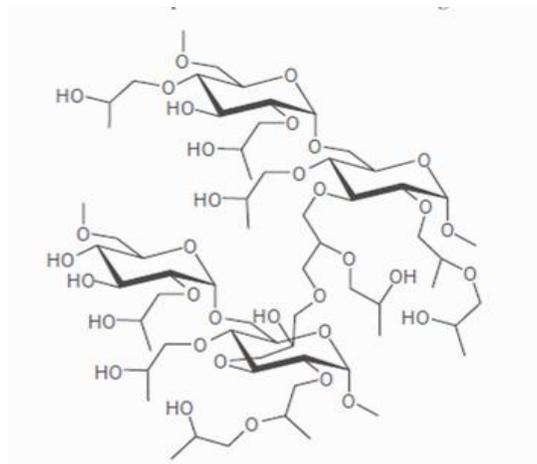


Figura 9. Estructura parcial del sephadex LH-20

El proceso general de realización de la cromatografía en columna se compone de las siguientes etapas (Sarker y Gray, 2006):

1. Empaquetamiento de la columna y equilibrado. Consiste en el empaquetado del soporte en la columna, puede efectuarse en forma seca o húmeda, utilizando el sistema de solventes electo para la elución.
2. Aplicación de la muestra. Esta etapa también es variable, puede efectuarse disolviendo la muestra en un volumen pequeño del solvente o impregnando la sílica con la muestra y su empaquetado en seco sobre la superficie de la columna.
3. Operación de la columna: elución de muestra y colección de fracciones. En la elución de la muestra se utilizan varios métodos para hacer fluir la fase móvil (gravedad, aplicación de presión con nitrógeno, vacío a la salida o por bombeo de la fase móvil). El modo de elución puede ser en gradiente (cambiando la composición de las fase móvil) o isocrática (concentración constante de la fase móvil).
4. Detección. Las fracciones pueden analizarse por TLC aplicando luz ultravioleta o algún revelador químico específico a las moléculas a identificar o por HPLC acoplado a UV o índice de refracción.

2.2.6.4 Proceso de aislamiento de pristimerina en plantas

En la tabla 4 se indican los métodos de aislamiento y purificación de pristimerina en distintos trabajos y en plantas diferentes. Las técnicas de aislamientos más usadas para pristimerina son la cromatografía en columna de sephadex y sílica, siendo el último soporte el más recurrido con elución en gradiente con hexano:acetato de etilo(AcOEt). Una excepción al sistema de elución fue el trabajo de Quiang, *et al* (2005), quién utilizó éter de petróleo-acetona en gradiente. Las columnas de sephadex LH-20 se han eluido con el clásico sistema hexano:cloroformo (CHCl_3):metanol (MEOH). En general el aislamiento se ha efectuado empleando uniformemente un soporte y hasta dos tratamientos en columna cromatográfica. El grupo de investigación de Gutiérrez y colaboradores (2007) fue el único localizado que manejara inicialmente una columna con sephadex y cambiara en la siguiente columna al tratamiento con sílica gel. En la mayoría de los reportes no se indica la(s) proporción(es) en la(s) cual(es) ocurre la elución de pristimerina, así como el resto de parámetros de columna (longitud, diámetro, cantidad de soporte). Un aspecto a analizar en estos métodos de aislamiento es que al utilizar alcoholes (metanol, etanol) en el proceso de extracción se requirió particionar el extracto con cloruro de metileno y cloroformo en las plantas *Cheiloclinium cognatum* y *Maytenus aquifolium*, posiblemente con el objetivo de eliminar contaminantes de carácter polar extraídos al emplear estos solventes.

Dentro de las técnicas descritas para la purificación destaca el empleo de la cromatografía en capa fina (CCF) preparativa y en los estudios más recientes el empleo de instrumentación a través de HPLC con una columna en fase reversa en especies del género *Maytenus*. En esta etapa Gutiérrez, *et al* (2007) por cromatografía de partición centrífuga (CPC) mediante tres corridas lograron separar pristimerina de netzahualcoyona, un isómero metilenquinónico, el cual incluso por TLC preparativa no se lograba separar de pristimerina. El fraccionamiento con HPLC en fase reversa con acetonitrilo (CH_3CN):agua(H_2O) realizado para la fracción de columna en *Maytenus vitis-idaea* (Rojo, *et al*, 2010) produjo el aislamiento de escutona, tingenona, celastrol y pristimerina, estos últimos tres compuestos muy relacionados estructuralmente, mientras en *Maytenus*

senegalensis una fracción bioactiva eluida con metanol (MEOH):agua (H₂O) en el HPLC únicamente permitió obtener pristimerina.

Tabla 4. Métodos de aislamiento y purificación de pristimerina reportados

PLANTA	TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN	REFERENCIA
<i>Crossopetalum gaumeri</i>	CC sílica gel en gradiente con hexano:AcOEt.	Ankli, <i>et al</i> , 2000
<i>Crossopetalum uragoga</i>	1. CC sephadex LH-20 eluida con Hex:CHCl ₃ :MEOH 2. CC sephadex LH-20 3. CCF preparativa	Núñez, 2003
<i>Cheiloclinium cognatum</i>	1. Particionamiento con CH ₂ Cl ₂ 2. CC sílica gel en gradiente con hexano:AcOEt 3. CC sílica gel flash en gradiente con hexano:AcOEt 4. CCF preparativa eluida hexano:AcOEt (4:1)	Haroldo, <i>et al</i> , 2004
<i>Maytenus aquifolium</i>	1. Partición MeOH acuoso:CHCl ₃ 2. CC sílica gel en gradiente con hexano:AcOEt, AcOEt:MeOH 3. CC sílica gel con hexano:AcOEt (7:3)	Nossack, <i>et al</i> , 2004
<i>Salacia campestris</i>	1. CC sílica gel en gradiente con hexano:AcOEt y gradiente de AcOEt:MeOH 2. CC sílica gel en gradiente con hexano:AcOEt 3. CCF eluida con CHCl ₃ :MeOH:AcOH (99:1:1)	Carvalho, <i>et al</i> , 2005
<i>Celastrus hypoleucus</i>	1. CC sílica gel en gradiente con Éter de petróleo:acetona 2. CC sílica gel en gradiente con Éter de petróleo:acetona 3. Cristalización	Quiang, <i>et al</i> , 2005
<i>Maytenus ilicifolia</i>	1. CC sephadex LH-20 eluida con Hex:CHCl ₃ :MEOH 2. CC sílica gel en gradiente con hexano:AcOEt 3. CPC con Heptano:AcOEt:MeOH:H ₂ O (8:1:6:1)	Gutiérrez, <i>et al</i> , 2007
<i>Maytenus senegalensis</i>	1. CC sílica gel en gradiente Éter de petróleo:AcOEt y AcOEt:etanol 2. HPLC fase reversa C-18 con MeOH:H ₂ O (70:100)	Khalid, <i>et al</i> , 2007
<i>Maytenus vitis-idaea</i>	1. CC sílica gel flash al vacío en gradiente con ciclohexano:AcOEt 2. HPLC fase reversa con CH ₃ CN:H ₂ O (85:15)	Rajo, <i>et al</i> , 2010

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Caracterización de matriz vegetal y metodología general de extracción y aislamiento de pristimerina

La planta *Mortonia greggii* es un modelo que anteriormente no había sido muy estudiado fitoquímicamente, por tanto la metodología se basó en algunos otros estudios de aislamiento de esta molécula en plantas de la familia *Celastraceae*, y se modificó conforme se obtenían resultados.

3.1.1 Metodología general

El esquema general para la obtención e identificación/cuantificación de pristimerina es el mostrado en la figura 10. El primer paso fue la colecta de la planta, traslado y conservación de este material biológico en las condiciones adecuadas hasta el lugar de trabajo. El segundo paso involucra la preparación de la muestra donde se realizaron las acciones necesarias para tener las partes de la planta de interés en las condiciones requeridas para iniciar el proceso de extracción sólido-líquido como tercer paso. Después de la extracción se aplicaron las técnicas de aislamiento principalmente representadas por el uso de la cromatografía en columna. Finalmente, se hizo a través de HPLC acoplado a espectrometría de masas y HPLC con detector de luz UV-VIS, la identificación y la cuantificación de pristimerina, respectivamente.

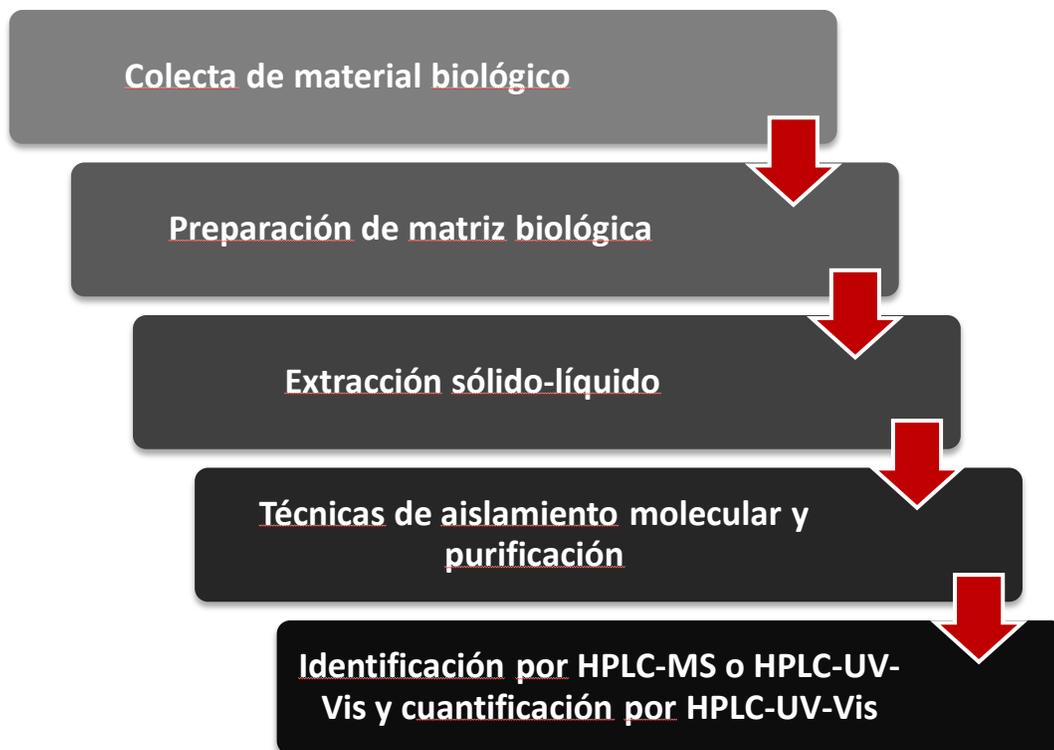


Figura 10. Metodología general de obtención, aislamiento, identificación/cuantificación de pristimerina

3.1.2 Colecta de material biológico

La planta *Mortonia greggii* (*anexo A*) se colectó en el Parque Ecológico “La Huasteca”, ubicado en el municipio de Santa Catarina, Nuevo León con las coordenadas geográficas 25°36′54.11” latitud Norte y 100°27′48.54” longitud Oeste a 740 m sobre el nivel del mar (figura 11)

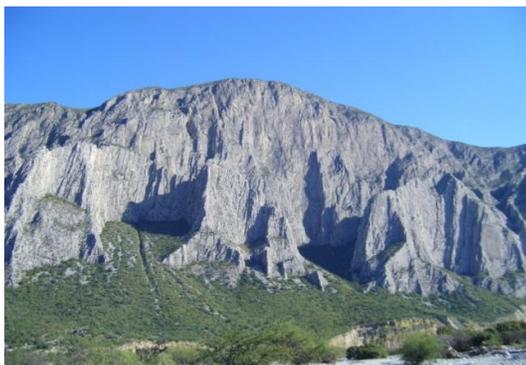


Figura 11. Parque ecológico “La Huasteca”, Santa Catarina, N.L.

Se realizaron 4 colectas en total, sin embargo para fines de los resultados que se presentarán sólo se indican (tabla 5) las plantas y colectas que fueron utilizadas en los experimentos que se reportarán.

Tabla 5. Fechas, plantas colectadas y observaciones

FECHA	CLAVE DE PLANTAS COLECTADAS	OBSERVACIONES
9 de febrero de 2011	C	Tallo con coloración naranja intensa
20 de agosto de 2011	E y F	Detección de escasas flores secas
29 de enero de 2012	G y H	G fue la planta más estresada por raíz descubierta

Durante este proceso de colecta la raíz de la planta fue desenterrada por completo cuidando la integridad de la misma. Se cubrió la raíz y tallo de la exposición solar y se trasladó al laboratorio de Aislamiento Molecular donde se dejó secar por completo a temperatura ambiente con ventilación.

3.1.3 Preparación de matriz biológica

Las plantas colectadas se separaron en órganos (hoja, tallo y raíz) de forma manual y con la ayuda de pinzas y tijeras de jardinería (figura 12). El tallo y raíz fueron cortados en fragmentos regulares de aproximadamente 5cm para su posterior separación física de la peridermis o corteza (decorticación) con una navaja. Los tallos y raíces de un diámetro muy pequeño (inferior a 3mm) por su dificultad en el decorticado se sometieron a molienda en un molino de cuchillas (Wiley Mill, USA) con un tamaño de malla de 1mm. El material vegetal decorticado y el molido se homogenizaron para tener un lote uniforme.



Figura 12. Corte de raíz de *Mortonia greggii*.

3.1.4 Análisis de pristimerina por HPLC-MS

Para identificar la presencia de la molécula de pristimerina en extractos o fracciones se recurrió al uso de HPLC-MS diluyendo la muestra en metanol grado HPLC (VWR, México), se filtró con un filtro de 0.45 μ m (Corning syringe filter) y se analizó en un HPLC-MS 1100 con un analizador de tiempo de vuelo TOF (Time of Flying). La fuente de ionización fue por electroespray (ESI). El volumen de inyección fue de 1 μ L de muestra. La separación se hizo en una columna de fase reversa Zorbax SB-C18 (2.1mm x 30mm x 3.5 μ m) a 35 °C con elución isocrática en metanol (80%) y agua con 0.1% de ácido fórmico (20%) con un flujo de 0.6 mL/min. El detector se operó con nitrógeno como gas de nebulización, presión de nebulización 35 psig a una velocidad de flujo de 10L/min, fragmentador 70V, temperatura de gas 350°C y rango de m/z de 100 a 3000.

3.1.5 Análisis de pristimerina por HPLC-UV-VIS

La cuantificación de pristimerina se realizó por HPLC acoplado a un detector UV-VIS (Agilent 1100, México) con la misma columna y condiciones indicadas en la sección del análisis por HPLC-MS. La detección se realizó a 420nm.

3.1.6 Curva de calibración

El estándar de pristimerina fue adquirido de Axxora (San Diego, CA, USA) con una pureza del 98%, a partir de éste se preparó una solución stock en metanol a 1mM de pristimerina y se realizaron diluciones subsecuentes de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μM . Mediante las áreas se construyó una gráfica y por regresión lineal se determinó la ecuación para el cálculo de la concentración de pristimerina (*anexo C*).

$$C_{\text{pristimerina}} (\mu\text{M}) = \frac{(\text{Área} + 5.6137)}{0.8926}$$

3.1.7 Identificación de pristimerina en órganos y tejidos de *Mortonia greggii*

Con la finalidad de verificar la presencia de pristimerina en los diferentes órganos de la planta, 1g de hoja, tallo o raíz se extrajeron por separado. La hoja y el tallo se extrajeron con 20 mL de hexano:acetona 2:8 (v/v) mientras que la raíz fue con etanol y se evaporó el solvente. Los extractos se analizaron por HPLC-MS junto con el estándar de pristimerina.

De los órganos en los cuales se identificó la molécula de pristimerina por HPLC-MS se prepararon nuevamente extractos de corteza de tallo, tejido fundamental-conductivo del tallo y corteza de raíz con la finalidad de hacer una localización más específica del compuesto en los tejidos de los órganos de las plantas. Estos extractos se analizaron por HPLC UV-VIS junto con el estándar de pristimerina.

Esta identificación de pristimerina en tejidos específicos de tallo se reforzó con la observación microscópica de un corte transversal de tallo de la planta G con objetivo de 40x.

3.1.8 Análisis de anillos de crecimiento para determinar la edad de la planta

Mediante la observación de un fragmento de tallo de la planta G teñido con orceína (para lograr un mayor contraste) en un microscopio óptico se contabilizaron los anillos de crecimiento de la planta y con base en la cantidad de anillos observados se estimó su edad (Raven, *et al*, 1992).

3.1.9 Efecto de fecha de colecta de planta sobre la cantidad de pristimerina

Se realizó extracción en las mismas condiciones óptimas a corteza de tallo y corteza de raíz de plantas colectadas en dos meses distintos (agosto y enero) con 3 réplicas cada uno con el objeto de evaluar el efecto de la temporada de recolección de la planta sobre el rendimiento de pristimerina.

Las muestras se colocaron en extracción sólido-líquido. El tallo se extrajo con 20 mL de hexano:acetona 2:8 (v/v) por 1h y la raíz con 20 mL de etanol por 30 minutos, se evaporó el solvente, se analizaron por HPLC UV-VIS y se estimó el rendimiento de pristimerina.

Las pruebas de hipótesis planteadas para este análisis en raíz y tallo son las siguientes:

$$H_0 : \tau_A - \tau_B = 0$$

$$H_a : \tau_A - \tau_B \neq 0$$

De donde:

H_0 = Hipótesis nula

H_a = Hipótesis alterna

τ_A = Rendimiento de pristimerina para colecta de enero (mg pristimerina/10 g planta)

τ_B = Rendimiento de pristimerina para colecta de agosto (mg pristimerina/10 g planta)

3.1.9.1 Análisis estadístico

Los cálculos de rendimiento de pristimerina se realizaron en Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, México). Se aplicó una prueba de hipótesis de dos medias con varianzas desconocidas y diferentes a los datos del rendimiento por fecha de colecta a través del programa Minitab 15.1.20.0, 2007 (Minitab Inc, USA).

3.2 Proceso de extracción sólido-líquido de pristimerina en tallo y raíz

3.2.1 Metodología para determinar el efecto de los factores en la extracción sólido-líquido

Se evaluó el efecto de 6 factores (sistema de solventes, relación peso/volumen (p/v), número de extracciones, tiempo de extracción, agitación y temperatura) sobre la **pureza** y el **rendimiento** de pristimerina en la extracción sólido-líquido de tallo y raíz de *Mortonia greggii*. La pureza se define como la cantidad de pristimerina (mg) contenida por g de extracto y el rendimiento como la cantidad de pristimerina extraída (mg) por 10 g de planta colocada en extracción. Estas variables de respuesta se estimaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$P_{Pr} = \frac{m_{Pr(mg)}}{m_{Ext}}$$

$$Rdt_{Pr} = \left(\frac{m_{Pr(mg)}}{m_{planta}} \right) * 10$$

De donde:

P_{Pr} = Pureza de pristimerina (mg/g de extracto)

$m_{Pr(mg)}$ = Masa de pristimerina expresada en mg

m_{Ext} = Masa de extracto en g

Rdt_{Pr} = Rendimiento de pristimerina (mg/10 g de planta)

m_{planta} = Masa planta empleada en la extracción en g.

La evaluación de estos 6 factores se realizó a través de 4 experimentos o pruebas de extracción (figura 13) debido a la complejidad en el número de niveles por factor y el número de réplicas a manejar.

En el primer experimento consistió en evaluar el efecto del solvente y el número de extracciones sobre el comportamiento de las variables de respuesta. La segunda prueba se dedicó a la selección de la relación peso de planta (g) por volumen de solvente (mL) más adecuada en la extracción. En el tercer experimento los factores estudiados fueron el tiempo de extracción y el número de extracciones nuevamente, con el objeto de observar si existía alguna interacción entre ambas variables. En la cuarta prueba se optimizó la pureza y rendimiento utilizando como factores el tiempo de extracción, la agitación y la temperatura.

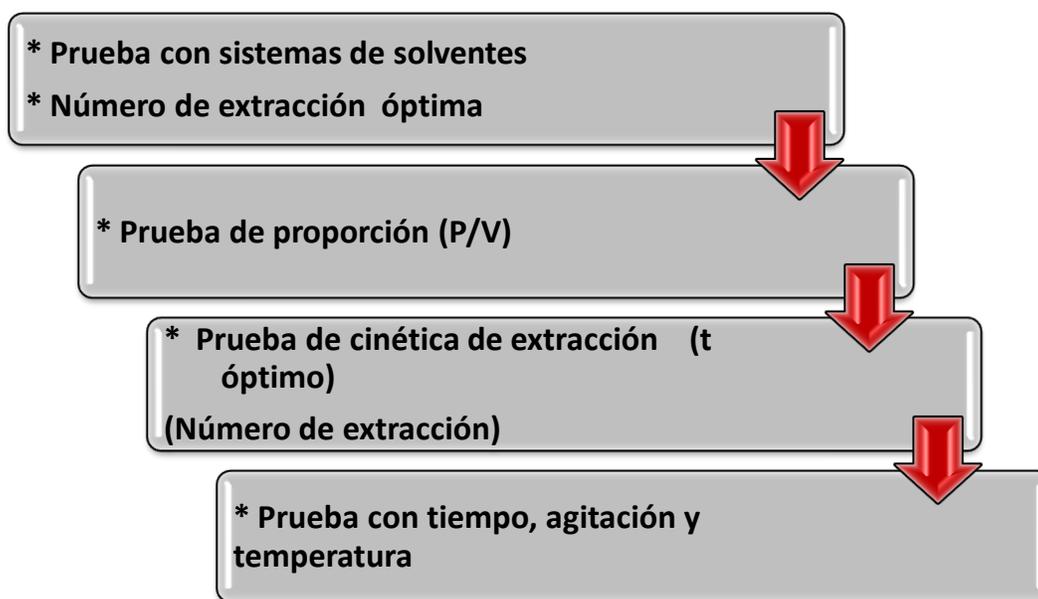


Figura 13. Metodología para evaluar el efecto de los 6 factores en extracción sólido-líquido

Las hipótesis planteadas durante estas pruebas de extracción son las siguientes:

Tabla 6. Pruebas de hipótesis para pureza (μ)

Ho : $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D$	Ha: Al menos un μ_i es diferente
Ho : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$	Ha: Al menos un μ_j es diferente
Ho : $\mu_{A,1} = \mu_{A,2} = \dots = \mu_{ij}$	Ha: Al menos un μ_{ij} es diferente

Ho = Hipótesis nula, Ha = Hipótesis alterna, i = Nivel de factor I(A, B, C, D ...), j = Nivel del factor II (1, 2, 3, 4 ...), μ = Pureza

Tabla 7. Pruebas de hipótesis para rendimiento (ρ)

Ho : $\rho_A = \rho_B = \rho_C = \rho_D$	Ha: Al menos un ρ_i es diferente
Ho : $\rho_1 = \rho_2 = \rho_3 = \rho_4$	Ha: Al menos un ρ_j es diferente
Ho : $\rho_{A,1} = \rho_{A,2} = \dots = \rho_{ij}$	Ha: Al menos un ρ_{ij} es diferente

Ho = Hipótesis nula, Ha = Hipótesis alterna, i = Nivel de factor I(A, B, C, D ...), j = Nivel del factor II (1, 2, 3, 4 ...), ρ = Rendimiento

Para estos experimentos el procedimiento general se representa en el esquema de la figura 14.

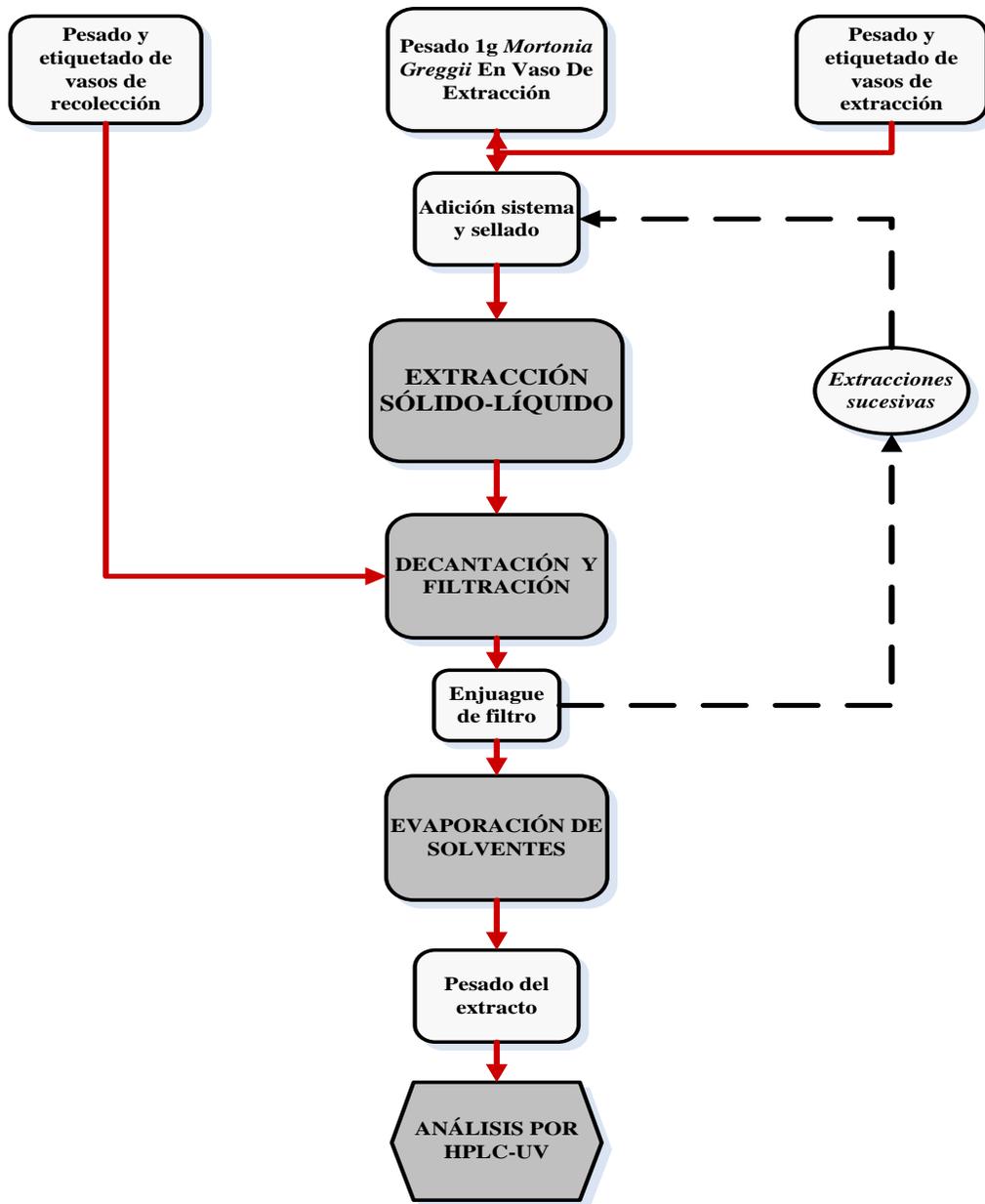


Figura 14. Procedimiento para pruebas de extracción sólido-líquido

Se pesaron los vasos de extracción y 1g de planta (corteza de tallo o raíz) se colocó en los mismos para conformar lotes de extracción, se agregó el sistema de solventes y se llevó a cabo la extracción sólido-líquido de pristimerina en condiciones herméticas y de acuerdo a la prueba que se estuviera efectuando. Después de la extracción, el extracto se decantó y filtró, se enjuagó el filtro con solvente para evitar pérdida y acumulación del analito en el filtro. Los solventes fueron removidos por evaporación en una campana de

extracción a temperatura ambiente. Los extractos secos se pesaron y se mantuvieron secos y protegidos de la luz hasta su análisis, posteriormente se resuspendieron en metanol grado HPLC, se tomó una alícuota de 1mL y se analizó por HPLC-UV-Vis bajo las condiciones expuestas en la sección 3.2.5 para obtener la concentración de pristimerina en extractos y de este modo realizar los cálculos de pureza y rendimiento. Cuando fue necesario se prepararon diluciones de la muestra de extracto original.

3.2.1.1 Prueba con sistemas de solventes y número de extracciones

Para tallo se utilizaron como sistemas de solventes a evaluar (metanol, hexano:acetona 8:2 (v/v), hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol) con base en revisión bibliográfica y disponibilidad de los mismos, así como 4 extracciones sucesivas, cada uno de los tratamientos con 3 réplicas genuinas (48 muestras). En el caso de raíz se fijaron 6 sistemas de solventes (metanol, hexano: acetona 8:2 (v/v), hexano: acetona 1:1 (v/v), hexano:acetona 2:8 (v/v), acetona y etanol) con respecto a literatura y con base en los resultados observados en el tallo. Del mismo modo, en raíz se practicaron 4 extracciones sucesivas al material vegetal con 3 réplicas por tratamiento (72 muestras). El tiempo de extracción fue de 3h.

Para el cálculo de las constantes dieléctricas de los sistemas de hexano:acetona se utilizó la fórmula siguiente (Sharapin, 2000):

$$Cde = \frac{(Cd_A * \%A) + (Cd_B * \%B)}{100}$$

De donde:

Cde = Constante dieléctrica del sistema

Cde_A = Constante dieléctrica de solvente A

%A = Porcentaje de A en el sistema

Cde_B = Constante dieléctrica de solvente B

%B = Porcentaje de B en el sistema

3.2.1.2 Prueba de proporción peso de planta/volumen de solvente (p/v)

El objetivo de este experimento consistió en determinar la mejor relación de la cantidad planta a utilizar en extracción (g) por volumen de solvente (mL) para incrementar la pureza y rendimiento de pristimerina. Se incluyeron como niveles 4 proporciones establecidas (0.05, 0.1, 0.13 y 0.2) con 3 réplicas (12 muestras) de acuerdo a las reportadas en literatura para la extracción de otras plantas de la familia *Celastraceae*. También en este experimento se llegó a incluir como factor el sistema de solventes cuando en la prueba anterior (sistema de solventes y número de extracción) no se detectó diferencia significativa entre dos o más de los sistemas de solventes evaluados. Para esta determinación el tiempo de extracción empleado fue de 3h.

3.2.1.3 Cinética de extracción y número de extracción

Una vez determinado el sistema de solventes y la proporción p/v, tanto para tallo como para raíz se consideraron 10 niveles del tiempo de extracción (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10h) y nuevamente se decidió verificar como factor el número de extracciones con 4 niveles. Los tratamientos con sus réplicas generaron 120 muestras.

3.2.1.4 Prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura

Después de determinar un sistema de solventes, una relación p/V, número de extracciones y tiempos de extracción que favorecieran la obtención de pristimerina se decidió optimizar la extracción considerando como factores el tiempo de extracción, agitación y temperatura. De estos factores se seleccionaron dos niveles para cada uno y se aplicó un diseño Box-Behnken que se construyó a través del software Minitab 15. Se definieron 3 puntos centrales y 5 réplicas para cada tratamiento con base a lo propuesto por Schmidt y Launsby (1994).

Para tallo los niveles que se establecieron para elaborar el diseño para cada factor fueron los siguientes (figura 15):

- Tiempo: 0.5-1.5 h
- Agitación: 0-200 rpm
- Temperatura: 20-40 °C

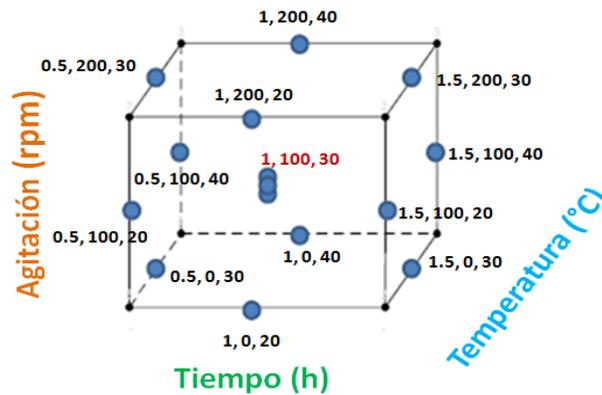


Figura 15. Representación esquemática de diseño Box-Behnken para tallo.

En raíz, el diseño se elaboró con los siguientes niveles para los factores (figura 16):

- Tiempo: 0.5-10 h
- Agitación: 0-200 rpm
- Temperatura: 20-50 °C

En esta cuarta prueba la extracción se llevó a cabo con tubos de centrifuga (Pyrex) y en una incubadora agitadora orbital Benchtop (Stadysshake, USA). Los siguientes pasos del proceso para la separación y análisis del extracto se efectuaron como se ha descrito anteriormente.

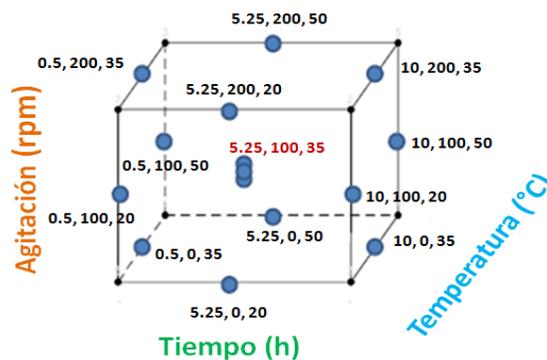


Figura 16. Representación esquemática de diseño Box-Behnken para raíz.

3.2.2. Análisis estadístico

Los cálculos de concentración, pureza y rendimiento de pristimerina se realizaron en Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, México). Los Análisis de Varianza (ANOVAS), Test de Tukey para las medias y Diseños Box-Behnken se efectuaron en Minitab 15.1.20.0, 2007 (Minitab Inc, USA) con el 95% de confianza. Los gráficos sobre pureza y rendimiento de pristimerina en las tres primeras de extracción se hicieron con Excel, y los correspondientes análisis de regresión y ajustes de modelo para las superficies de respuesta, gráficas de contorno y del optimizador se elaboraron a través del software de Minitab 16, 2011 (Minitab Inc, USA).

3.3 Aislamiento molecular de pristimerina

En el aislamiento de pristimerina se empleó la cromatografía en columna y la separación líquido-líquido. En cromatografía en columna se utilizó la exclusión de tamaño (sephadex-LH20).

3.3.1 Columna cromatográfica de sephadex para extracto de corteza de raíz

La corteza de raíz de la planta E (127.3 g) fue sometida a extracción sólido-líquido utilizando el sistema hexano: acetona 2:8 (v/v) en proporción 0.13 p/v, de esta forma se obtuvo el extracto de corteza de raíz.

El procedimiento general de operación de las columnas cromatográficas se resume en la figura 17. La cantidad de 2.45 g de extracto corteza de raíz fueron separados en una columna cromatográfica de sephadex LH-20 (Sigma Aldrich, México) usando como relación 0.2 g de extracto por 1g de sephadex y una relación L/D de 9-10. El sistema de elución fue Hex: CHCl₃: MEOH (2:1:1) en modo isocrático, para su introducción en la columna el extracto fue solubilizado en 6mL de este mismo sistema. Se colectaron fracciones de 5 mL.

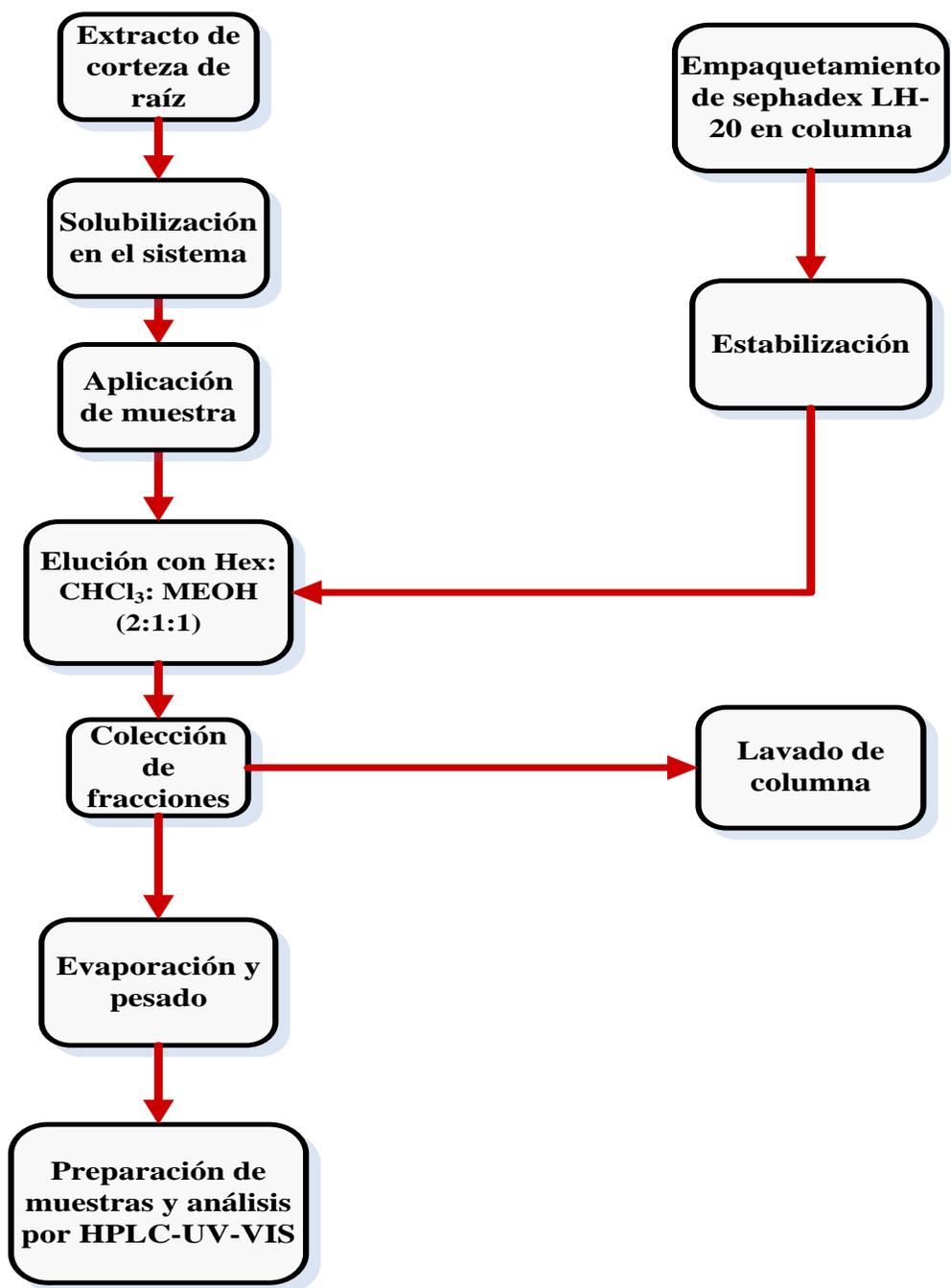


Figura 17. Procedimiento de operación de columnas cromatográficas de sephadex.

A todas las fracciones obtenidas de cada columna se permitió la evaporación de los solventes, se pesaron y se resuspendieron en metanol grado HPLC para su análisis por HPLC-UV-VIS y consecutivos cálculos de pureza, índice de purificación y recuperación de pristimerina.

El índice de purificación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{P_f}{P_o}$$

De donde:

IP = Índice de pureza

P_f = Pureza final alcanzada en la fracción (mg pristimerina/g de fracción)

P_o = Pureza inicial en el extracto (mg pristimerina/g de extracto)

Esta columna de sephadex con extracto proveniente de corteza de raíz se realizó por triplicado con las mismas condiciones para realizar estadística a los resultados.

3.3.2 Separación líquido-líquido

Con el objetivo de emplearse como una estrategia adicional al aislamiento molecular de pristimerina, la separación líquido-líquido se ensayó con fracciones eluidas en la columna de sephadex mencionada con anterioridad. Con el extracto crudo no fue posible aplicar la separación líquido-líquido debido a que la presencia de contaminantes no permitía la cuantificación de pristimerina por el método instrumental.

El material empleado para ensayar las particiones fue la reagrupación de las fracciones 3 a 5 (fracciones con índices de pureza inferiores a la unidad) de la columna de sephadex extracto de raíz. El proceso de selección del sistema y desarrollo se esquematiza en la figura 18. Consistió en tomar una cantidad representativa del extracto seco y diluirlo en una cantidad indicada de acetato de etilo para su particionamiento de acuerdo a las composiciones P a Y del Sistema Arizona (Berthod, *et al*, 2005) recomendadas para moléculas hidrófobas con carácter parcialmente polar como la pristimerina, el volumen de ensayo fue de 10 mL. Cualitativamente mediante la observación de la distribución del color naranja en ambas fases se seleccionaron los sistemas en los que se vió una

distribución similar del extracto en ambas fases (orgánica y acuosa). Las composiciones electas S, T y U, se escalaron a volúmenes de 25mL, de acuerdo a la tabla 8 para tratar 200 mg de fracción a particionar.

Tabla 8. Composiciones S, T y U del sistema Arizona. Fuente: Berthod, *et al*, 2005.

COMPOSICIÓN	% v/v			
	Heptano	Acetato de etilo	Metanol	Agua
S	35.7	14.3	35.7	14.3
T	37.5	12.5	37.5	12.5
U	40	10	40	10

Para el establecimiento de la carga de muestra, se recurrió a pesar determinada cantidad de la misma (0.5, 0.3, 0.2g) y distintos volúmenes de trabajo (10, 20, 25 mL) y se eligió aquella carga y volumen que permitieran cuantificar y operarse en la separación.

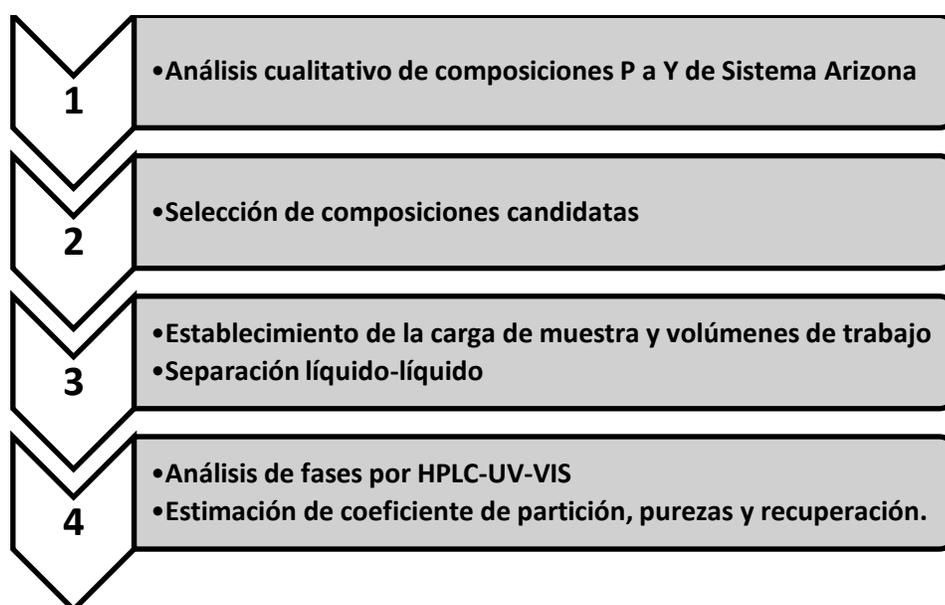


Figura 18. Procedimiento en el establecimiento de la separación líquido-líquido

Los 200 mg de cada muestra se diluyeron en la cantidad correspondiente de AcOEt, previa separación líquido-líquido se tomó una alícuota de 300 μ L para conocer la cantidad y pureza de pristimerina en la fracción por HPLC-UV-VIS. Después de la separación se

tomaron alícuotas de las fases orgánica y acuosa y se analizaron del mismo modo que la fracción sin particionar y conocer cantidad y pureza del compuesto de interés.

Se realizaron los cálculos y se estimaron el coeficiente de partición de pristimerina en este extracto y el porcentaje de recuperación de la misma para cada una de las composiciones evaluadas.

$$K_D = \frac{C_{P\ org}}{C_{P\ ac}}$$

$$\% Rp = \left(\frac{m_{P\ fase}}{m_{oP}} \right) * 100\%$$

De donde:

K_D = Coeficiente de partición de pristimerina

$C_{P\ org}$ = Concentración de pristimerina en fase orgánica (μM)

$C_{P\ ac}$ = Concentración de pristimerina en fase acuosa (μM)

$\% Rp$ = Porcentaje de recuperación de pristimerina

$m_{P\ fase}$ = Masa de pristimerina en la fase (mg de pristimerina)

m_{oP} = Masa inicial de pristimerina en la fracción. (mg de pristimerina)

3.3.3 Análisis estadístico

La concentración y pureza de pristimerina se calcularon con Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, México); también mediante este software se elaboraron los gráficos correspondientes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de matriz vegetal

4.1.1 Identificación de pristimerina en órganos y tejidos de *Mortonia greggii*

La inyección de 1 μ L del estándar de pristimerina adquirido de la comercializadora de reactivos Axxora a una concentración de 100 μ M permitió detectar y corroborar los principales iones del espectro de masas de este compuesto bajo las condiciones de análisis así como identificar la presencia de la molécula en extractos de tallo y raíz y su ausencia en hoja. En la figura 19 se muestra el cromatograma de iones extraídos en un rango de m/z de 465.30-465.31 y el espectro de masas para el estándar de pristimerina.

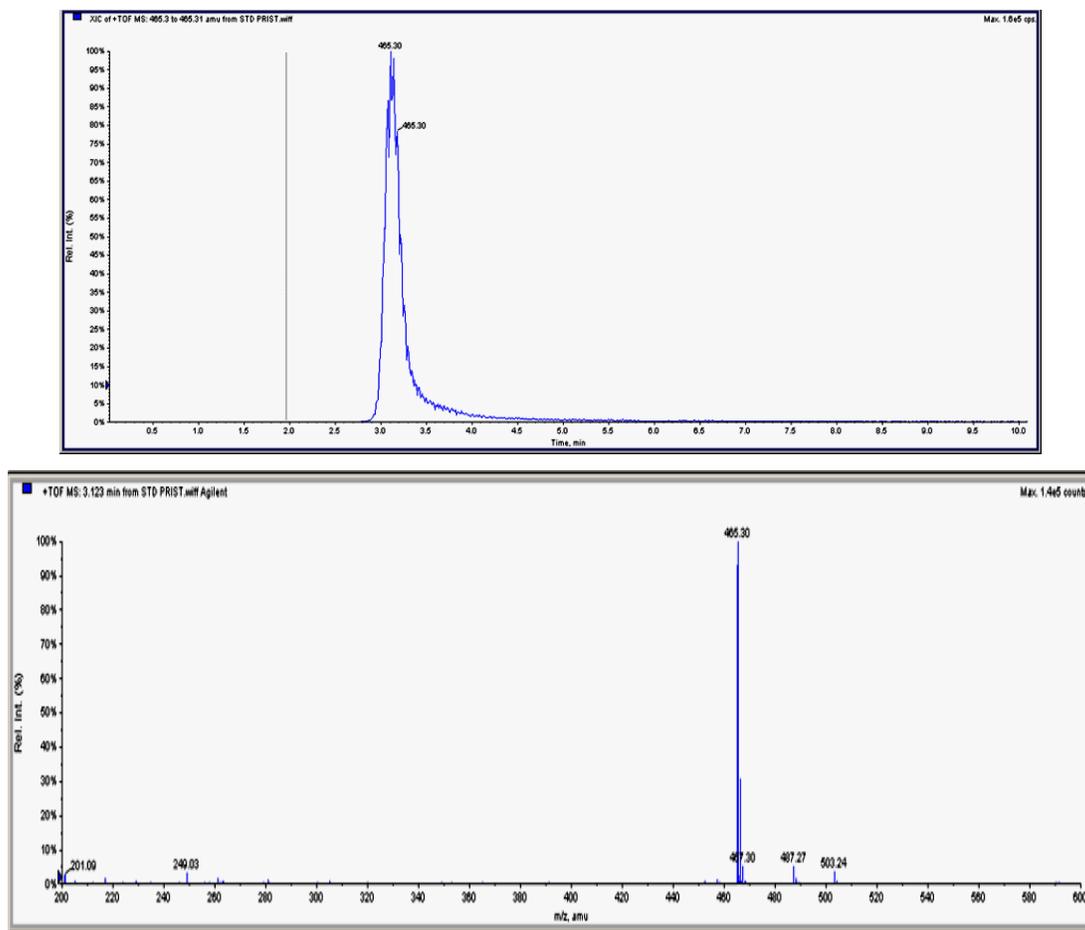


Figura 19. Cromatograma de iones extraídos y espectro de masas de estándar de pristimerina.

Los picos con m/z detectados en el espectro de masas del estándar se relacionaron con lo reportado en literatura (tabla 9) donde se caracterizó por espectrometría de masas a pristimerina obtenida de plantas del género *Maytenus* (Nossack, *et al*, 2004 y Khalid, *et al*, 2007).

Tabla 9. Iones principales detectados en el estándar de pristimerina

Relación m/z	Fragmento o estructura
465.3	$M + H^+$
487.27	$M + Na^+$
503.24	$M + K^+$
201.09	Ion tropilo

El ion molecular poseía una relación m/z de 465.3, el ion de 487.27 es el correspondiente al aducto de la molécula de pristimerina con sodio mientras el ion de 503.24 es el aducto de pristimerina con potasio. El fragmento con m/z de 201.09 es el ion tropilo (figura 20), un fragmento muy común encontrado en los espectros de masas para los compuestos de la serie de los friedelanos (Khalid, *et al*, 2007). Otros fragmentos en menor abundancia con m/z de 452.31 y 261.13 se piensa corresponden a la pristimerina desmetilada en el carboxilo y a la pérdida de dos de los ciclohexanos superiores en la molécula, sin embargo estas señales no pudieron ser corroboradas con exactitud con los reportes en trabajos previos.

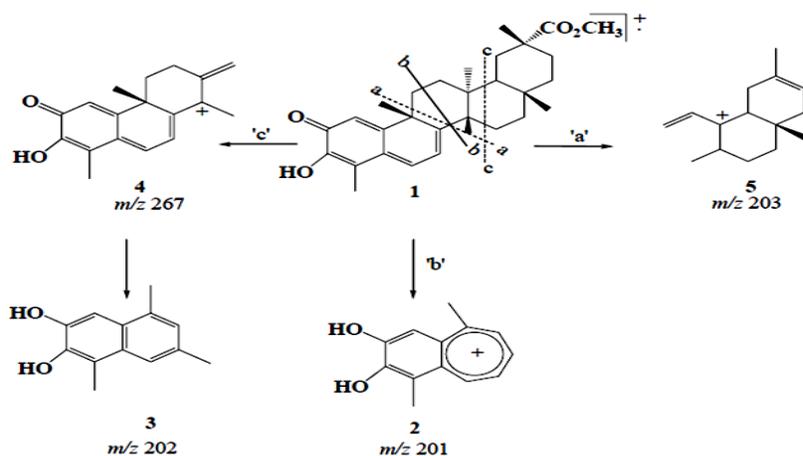


Figura 20. Fragmentación propuesta por Khalid, *et al* (2007) para pristimerina.

El análisis del estándar de pristimerina por HPLC-UV-VIS permitió concluir que pristimerina tiene un tiempo de retención en las condiciones de análisis de 2.2 ± 0.1 min (figura 21). Como resultado de los análisis de extractos de hoja, tallo y raíz se identificó pristimerina en tallo y en raíz.

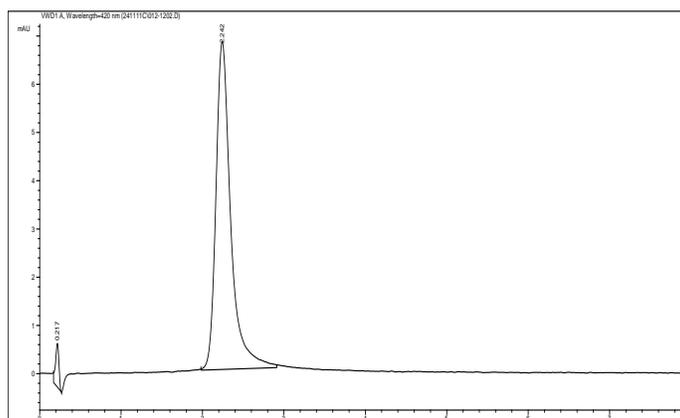


Figura 21. Cromatograma de estándar de pristimerina en HPLC-UV-VIS a 420 nm

El análisis específico entre el extracto crudo de corteza de tallo y de tejido fundamental-conductivo de tallo mostró la presencia del compuesto metilénquinona de interés únicamente en la corteza tallo. En la figura 22 se observa la presencia del pico de pristimerina al tiempo de retención característico en el extracto de corteza de tallo y su ausencia en el extracto del tejido fundamental-conductivo.

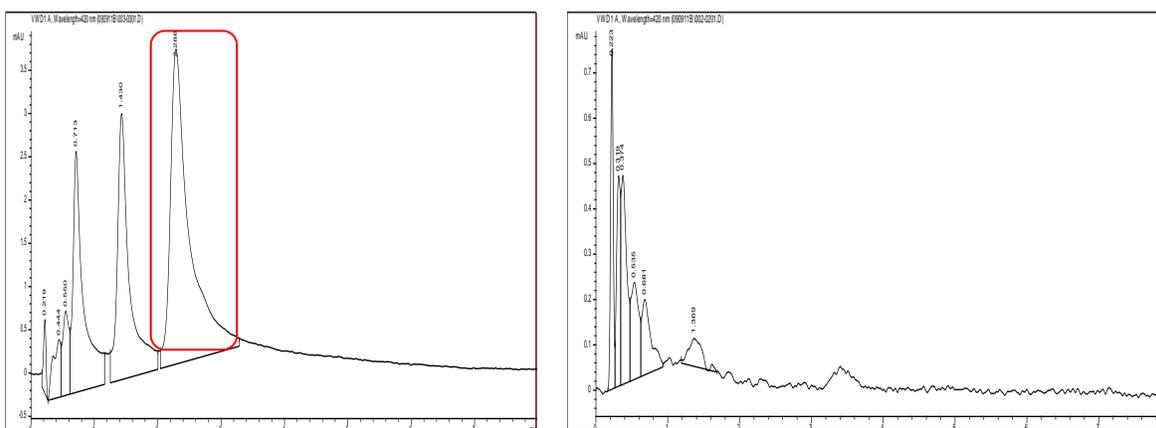


Figura 22. Cromatogramas HPLC-UV-VIS de extractos de corteza de tallo y tejido fundamental-conductivo de tallo a 420 nm

La observación microscópica de un corte transversal de tallo permitió corroborar la presencia de pristimerina en la corteza de tallo, como se observa en la figura 23 sobre la peridermis se nota una capa delgada de color naranja.

Comparando las señales observadas en los cromatogramas de corteza de tallo y corteza de raíz (figura 24) se verifica la presencia además de pristimerina de otros componentes en tallo que son detectados a la longitud de onda de la detección pero a tiempos de retención de alrededor de 0.5 min, 0.71 min y 1.43 min. En raíz se observan picos también a tiempos de retención menores pero con menor concentración. Hasta el momento estos compuestos no han sido identificados pero se piensa pueden estar relacionados con estructuras de triterpenos cercanas a la pristimerina.

4.1.2 Análisis de anillos de crecimiento para determinar la edad de la planta

Los anillos de crecimiento se definen como incrementos de grosor en el floema y en el xilema de plantas leñosas que representan una estación de crecimiento (anillo anual), la anchura de estos anillos puede afectarse por factores como luz, temperatura, disponibilidad de agua y lluvia (Raven, *et al*, 1992), sin embargo este método proporciona una edad aproximada de la planta.

En la observación de un corte transversal de tallo de planta G (altura 153 cm) al microscopio se visualizaron 9 anillos de crecimiento (figura 25), con lo cual se estimó una edad para esta planta de 9 años.

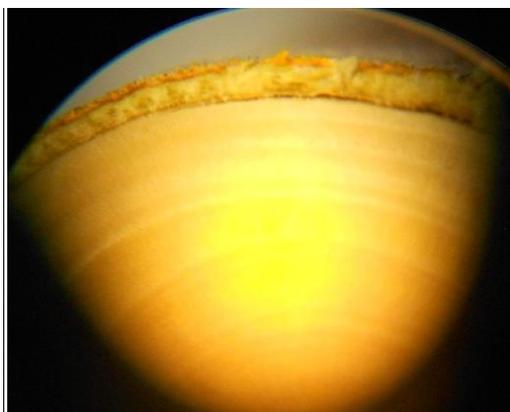


Figura 23. Observación al microscopio en 40x de corte transversal de tallo. Visualización de la presencia del compuesto en corteza.

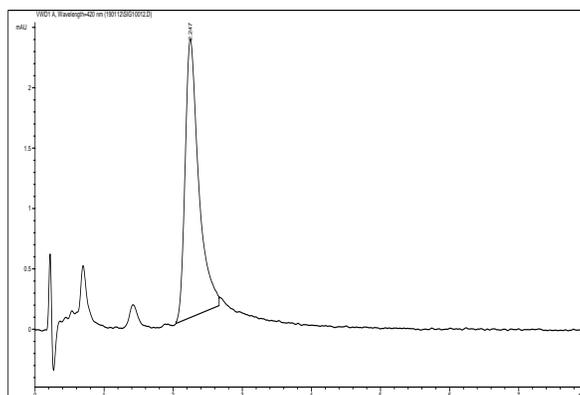


Figura 24. Cromatograma HPLC-UV-VIS de corteza de raíz a 420 nm.

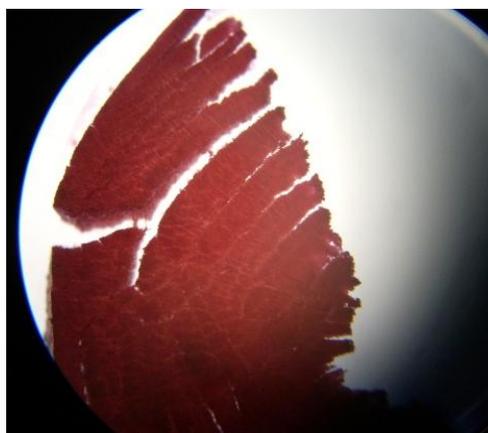


Figura 25. Observación microscópica de anillos de crecimiento en tinción con orceína de tallo de planta G a 40X

En la imagen los anillos más cercanos al corazón del tallo son más gruesos mientras los ubicados más al exterior son más delgados, esta característica es un índice de la cantidad de lluvia en los últimos años (Raven, *et al*, 1992). Al consultar la precipitación media anual en el estado de Nuevo León en los últimos 9 años y relacionarla con la anchura de los anillos de crecimiento en el tallo de *Mortonia* (figura 26) es notable que en los primeros años de vida de esta planta la lluvia fue abundante o suficiente (anillos anchos) superando el promedio de 602 mm, sin embargo en los últimos años la precipitación ha sido escasa (2009 y 2011) este efecto es observable en los anillos de crecimiento más externos los cuales son delgados, la excepción en esta relación fue el año 2010 donde Nuevo León fue azotado por el huracán Alex y el valor de la precipitación resultó mayor debido al efecto de este fenómeno metereológico. Es importante aclarar que los valores de precipitación mostrados son los correspondientes al estado de Nuevo León debido a que los datos específicos para la región de La Huasteca no se encontraron disponibles.

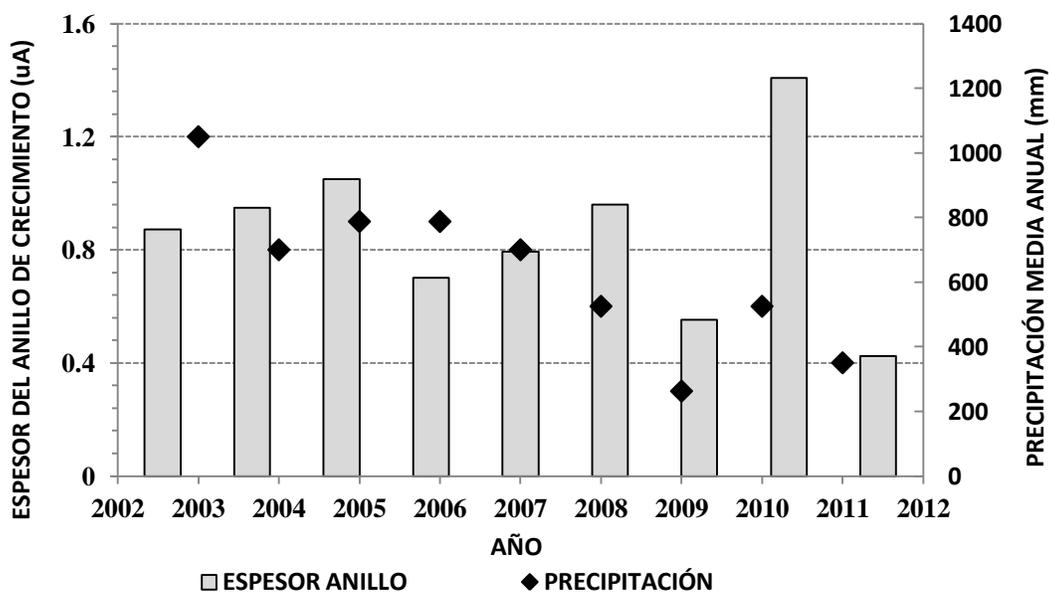


Figura 26. Gráfica que muestra la relación entre el espesor de anillos de crecimiento en unidades arbitrarias (uA) y precipitación media anual en el estado de Nuevo León. Fuente: SMN (2012).

4.1.3 Efecto de fecha de colecta de planta sobre la cantidad de pristimerina

Como se especificó en la sección de materiales y métodos, la extracción y aislamiento de pristimerina se realizó con plantas colectadas en distintas fechas por lo cual se evaluó si existían diferencias en la cantidad de pristimerina con la temporada de colecta. Las pruebas de hipótesis de diferencia de medias para los extractos de corteza de tallo y corteza de raíz (*anexo D*) de dos distintas fechas de colecta (enero 2012 y agosto 2011) mostraron que si hubo diferencia (figura 27) en la cantidad de pristimerina extraída de tallo colectado en enero y agosto ($p = 0.020$) y entre raíz de enero y agosto ($p = 0.020$). El rendimiento de pristimerina para tallo de enero (13.57 ± 1.03 mg pristimerina/10 g de planta) superó en 24.9% al rendimiento para tallo de agosto (10.19 ± 0.76 mg pristimerina/10 g de planta) mientras que para raíz el rendimiento de la colecta de enero (53.55 ± 7.38 mg pristimerina/10 g de planta) superó en 56.8 % al de agosto (23.11 ± 1.87 mg pristimerina/10 g de planta). En general, el rendimiento de pristimerina por planta fue 50.3% mayor en enero al obtenido con la planta de agosto y de acuerdo con Seigler (2002), la cantidad de un metabolito secundario en organismos vegetales es el resultado del proceso de regulación en la síntesis, degradación y almacenamiento y la producción es dependiente del estado de desarrollo de la planta y la influencia de diversos factores ambientales como disponibilidad de nutrientes y otros metabolitos. Al relacionar la cantidad de pristimerina con la temperatura y la precipitación en los meses de estudio, observamos que en el mes de enero los valores en esta variable fueron menores a los existentes en el mes de agosto, de hecho la temperatura fue la mitad de la registrada como promedio en el mes de agosto y la precipitación fue dos terceras partes en enero de 2012 con respecto a agosto de 2011, por lo cual estas condiciones adversas de baja temperatura y escasa disponibilidad de agua a las que se haya expuesta la planta en los meses de invierno fomentan la biosíntesis de pristimerina, como mecanismo de protección y defensa frente al ataque de diversos factores bióticos, pues en diversos estudios se ha evidenciado la actividad antialimentaria e insecticida (Reyes, *et al*, 2003) de la pristimerina y antimicótico (Quiang, *et al*, 2005).

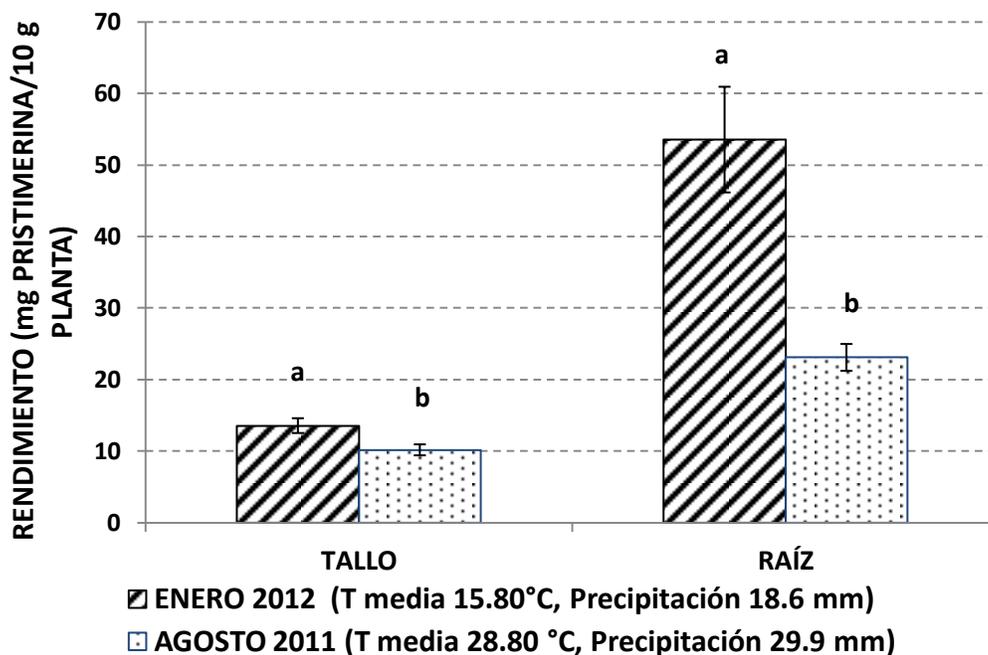


Figura 27. Gráfica comparativa de la cantidad de pristimerina extraída de tallo y raíz de *M. greggii* de dos diferentes colectas. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En este aspecto existen escasos estudios donde se verifiquen diferencias en la extracción de metabolitos secundarios basados en fecha de colecta de la fuente vegetal, uno de estos trabajos es el realizado por De la Re (2010) quien encontró que la cantidad de ácido oleanólico en la planta *Phoradendrom tomentosum* fue al menos un 20% mayor en la etapa a punto de florecer y al dar fruto (agosto y septiembre) comparado con una colecta de marzo. Otro trabajo similar es el de Singh y colaboradores (2010) donde se halló que el contenido de fitoquímicos (vitamina C, carotenoides, fenólicos totales, proteínas y carbohidratos) en las plantas medicinales *Trigonella foenicum-graecum* y *Foeniculum vulgare* era superior en la etapa de madurez que en estadios tempranos del desarrollo. Con estas evidencias se reafirma la importancia de estudiar la variación del contenido de pristimerina en plantas colectadas en distintas etapas del desarrollo y fechas de colecta.

4.2 Proceso de extracción sólido-líquido de pristimerina en tallo y raíz

En las plantas donde se ha extraído pristimerina particularmente no hay estudios similares sobre cuantificaciones de pristimerina en el extracto ni evaluando diferentes condiciones de extracción, por lo cual los estudios en la extracción de pristimerina y su optimización en esta planta son novedosos.

4.2.1 Prueba con sistemas de solventes y número de extracciones

➤ Tallo

Para la pureza en tallo el análisis de varianza indicó que el sistema de solventes y número de extracciones resultaron ser significativos del mismo modo que la interacción entre ambos factores ($p < 0.05$). La pureza del extracto de tallo, como se observa en la figura 28 durante las tres primeras extracciones se mantiene cercana a 4mg de pristimerina por g de extracto y no se observan diferencias significativas entre solventes empleados, sin embargo en la cuarta extracción el valor de pureza promedio por extracción decrementa en aproximadamente el 60% (2 mg/g de extracto) con respecto a la primera extracción. Una excepción fue el extracto metanólico, el cual en todas las extracciones consecutivas mostró purezas cercanas o inferiores a 3 mg /g e incluso en la primera extracción no se detectó respuesta en los análisis por HPLC, lo cual se debió posiblemente a la interferencia de otros componentes mayoritarios en el tallo y una pobre extracción de pristimerina con este solvente que no permitieron su cuantificación en este extracto.

Considerando la primera extracción los sistemas de solventes con la mayor pureza fueron etanol y hexano:acetona 2:8 (v/v), en la segunda y tercera extracción la pureza para los 4 sistemas fueron similares entre sí.

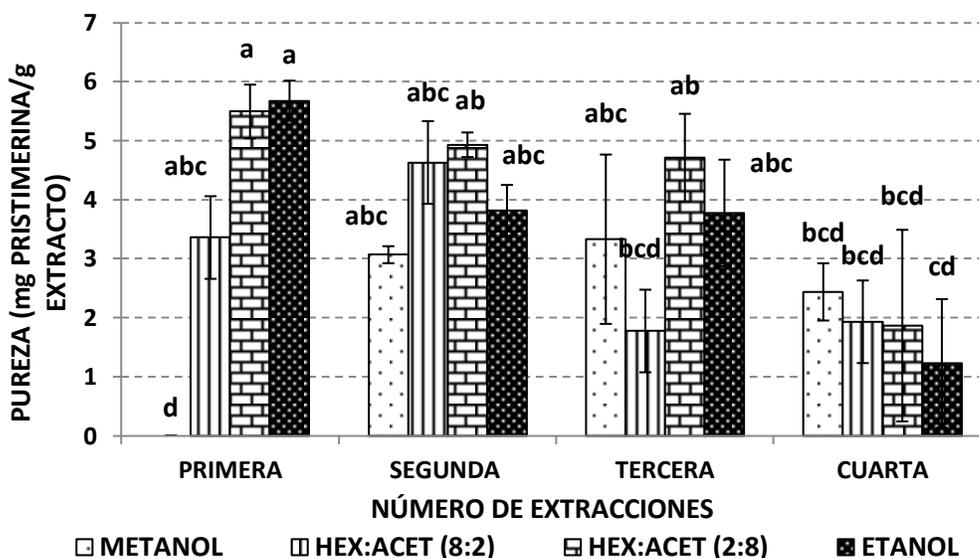


Figura 28. Efecto del sistema de solventes a diferente número de extracciones sobre la pureza de pristimerina en un extracto crudo de tallo de *M. greggii*. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En el análisis de rendimiento la interacción entre el sistema de solventes y el número de extracciones nuevamente resultó significativa ($p < 0.05$). Con estos resultados es posible definir que el mayor rendimiento se obtiene al realizar la primera extracción y es el más alto para hexano:acetona 8:2 (v/v), hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol (figura 29), siendo los últimos dos sistemas los que más favorecen el rendimiento de pristimerina. Para las subsecuentes extracciones no se observaron diferencias en cuanto al rendimiento. Del mismo modo que en la pureza en el tratamiento de metanol con la primera extracción no se cuantificó pristimerina.

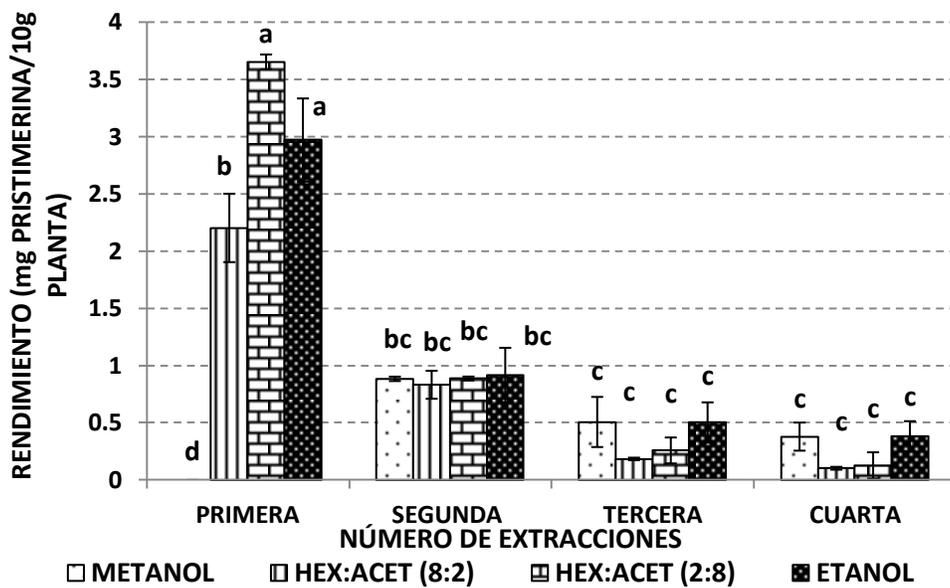


Figura 29. Rendimiento de extracción de pristimerina en tallo de *M. greggii* usando diferentes sistemas de solventes en hasta 4 extracciones sucesivas. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Revisando los porcentajes acumulados de recuperación de pristimerina para hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol por separado del resto de los sistemas (figura 30), se observa que en la primera extracción se logró recuperar el 74 y 62 % de pristimerina correspondientemente, con una segunda extracción la recuperación es de alrededor 20% y en la tercera varía entre 5 y 10 %. Estos porcentajes si se realizan hasta tres extracciones sucesivas brindan un rendimiento acumulado de hasta el 97.39 y 91.97 % con hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol, respectivamente.

Para esta prueba en el tallo se definieron como mejores condiciones la primera extracción con hexano:acetona 2:8 (v/v) o con etanol y se establece que se pueden realizar hasta tres extracciones para aumentar la recuperación de la molécula sin perder la pureza.

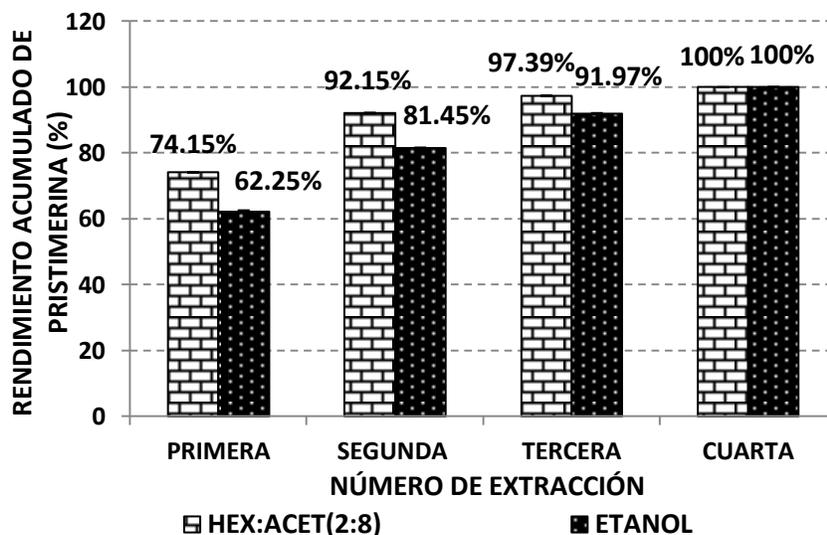


Figura 30. Porcentaje acumulado de recuperación de pristimerina por extracción en tallo de *M. greggii* para hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol.

Los resultados observados para pureza y rendimiento se correlacionaron con las constantes dieléctricas a 25°C calculadas para los sistemas empleados (tabla 10) y se encontró que los sistemas de solventes con constantes de 16.77 y 24.85 habían favorecido el proceso extractivo. De acuerdo con Barwick (1997) la separación de un componente por un solvente depende de la polaridad del componente y del solvente, así como de sus propiedades y del resto de componentes en la matriz.

Tabla 10. Constantes dieléctricas para los sistemas de solventes evaluados en extracción de pristimerina en tallo y raíz de *M. greggii*.

SISTEMA DE SOLVENTES	CONSTANTE DIELÉCTRICA
Hexano:acetona 8:2 (v/v)	5.65
Hexano:acetona 1:1 (v/v)	11.30
Hexano:acetona 2:8 (v/v)	16.77
Acetona	20.70
Etanol	24.85
Metanol	33.6

Se deduce que los componentes en el tallo de *Mortonia greggii* tienen carácter hidrofílico porque los alcoholes no favorecieron el rendimiento pues también extraen al resto de moléculas polares (glicósidos, flavonoides, alcaloides y terpenos propiamente) del tallo (Sharapin, 2000). Esta hipótesis de la presencia de compuestos polares en tallo se puede comprobar en el cromatograma correspondiente al extracto de corteza de tallo de la figura 23, donde se identifican otros compuestos que absorben a 420 nm y que eluyen antes que la pristimerina por sus propiedades polares en la columna de fase reversa. Estos compuestos con tiempos de elución tempranos podrían atribuirse a derivados triterpénicos metilénquinona cercanos a la pristimerina pero con carácter más polar.

➤ Raíz

Basados en los resultados hallados en tallo, para raíz se decidió evaluar 6 sistemas de solventes, además de los 4 ya probados en tallo se incluyeron hexano:acetona (1:1) y acetona que poseen constantes dieléctricas (Cde) menor y mayor en aproximadamente 5 unidades al sistema hexano:acetona 2:8 (v/v), uno de los dos sistemas que favorecieron la extracción en tallo.

Para la pureza en raíz la interacción sistema de solventes-número de extracción también fue significativa en esta prueba ($p < 0.05$). Se halló que la media de pureza para todas las extracciones fue diferente, las más altas mostraron purezas arriba de los 20 mg de compuesto/g de extracto, en la segunda extracción la media global fue de 15mg/g de extracto y en la tercera disminuyó a la mitad (7.7 mg/g). Los sistemas con los valores más altos para la media fueron etanol y metanol en todas las extracciones sucesivas (figura 31) y poseen constantes dieléctricas de 24.85 y 33.6. y su tendencia se mantuvo en la mayoría de las extracciones a excepción de la segunda.

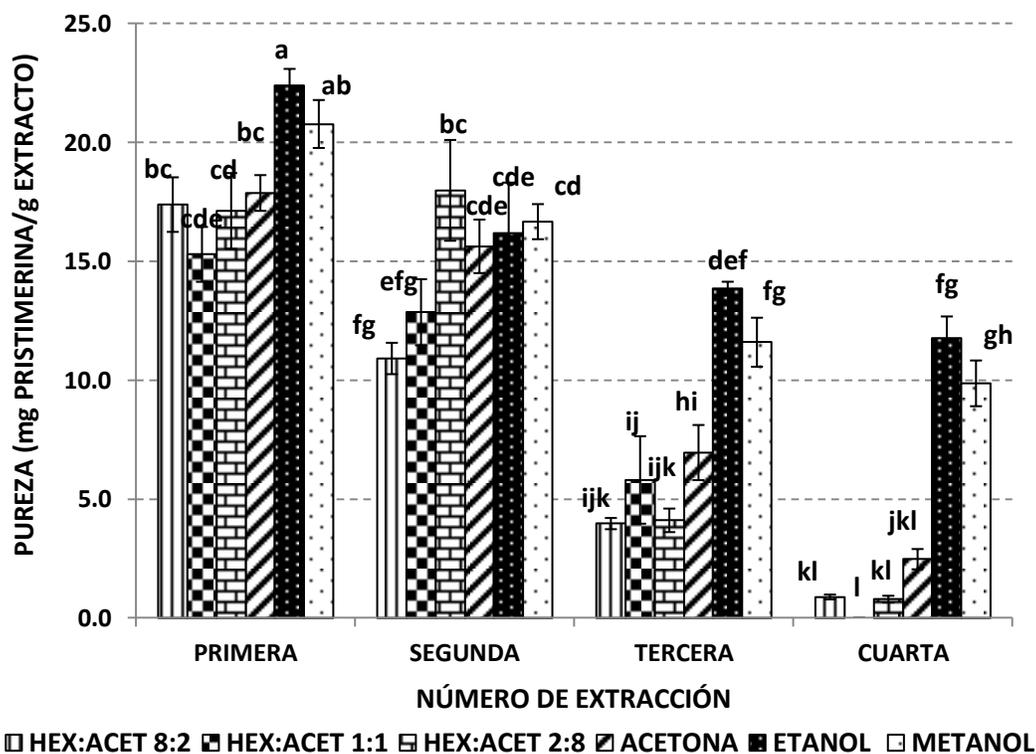


Figura 31. Efecto del sistema de solventes a diferente número de extracciones sobre la pureza de pristimerina en un extracto crudo de raíz de *M. greggii*. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En el rendimiento de pristimerina en raíz, los más altos valores se atribuyen a la primera extracción (figura 32) para todos los sistemas, sin embargo entre sistemas en cada una de las extracciones individuales no hubo diferencias entre los solventes, por lo cual se optó por quedarse con los alcoholes (metanol y etanol) para la extracción en raíz debido a su tendencia mostrada en la primera, tercera y cuarta extracción en el análisis de pureza. En este caso el análisis de pureza permitió seleccionar los sistemas de solventes y es aceptable porque este órgano de la planta la presencia de pristimerina es más abundante a diferencia del tallo y se prefieren extractos con menor número de contaminantes aunque el rendimiento sea comprometido en escasa medida.

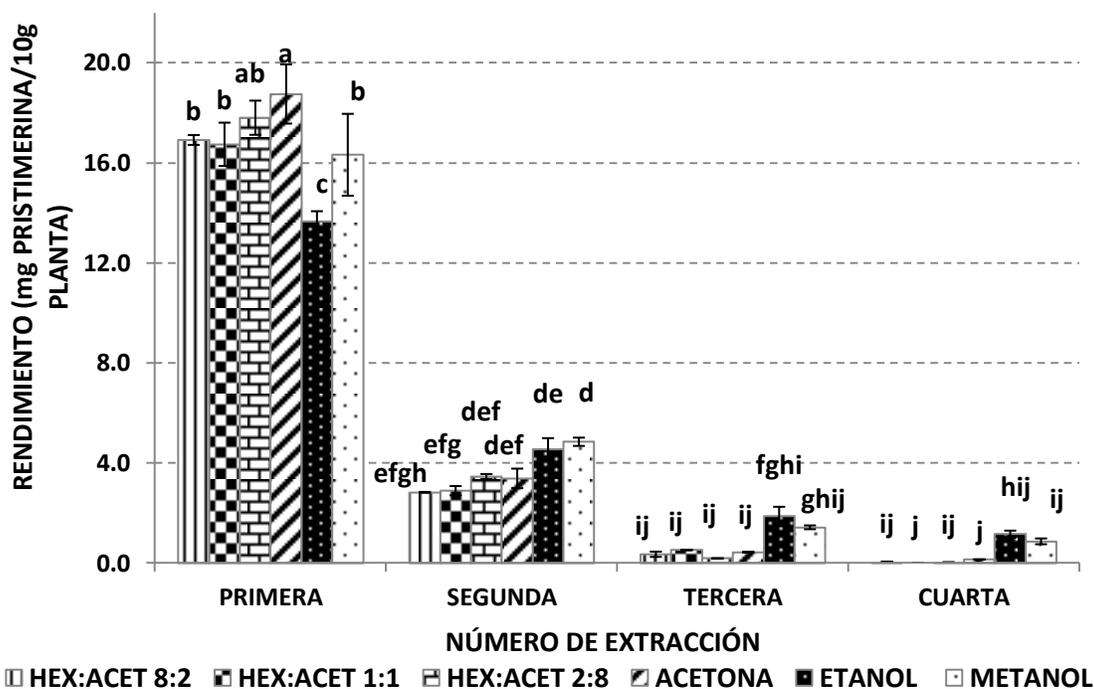


Figura 32. Rendimiento de extracción de pristimerina en raíz de *M. greggii* usando diferentes sistemas de solventes en 4 extracciones sucesivas. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Al revisar cómo mejora el porcentaje de recuperación del compuesto (figura 33) usando los alcoholes con las extracciones se encuentra que en la primera extracción se logra un 64.26 y 56.71% de rendimiento con etanol y metanol, respectivamente; al realizar una segunda extracción la recuperación acumulada aumenta entre el 20 y 22% para ambos solventes y dar recuperaciones acumuladas de 85.73 y 77.40% para cada uno, sin embargo como se menciona anteriormente la pureza decrece significativamente para etanol una tercera parte aproximadamente (27%) y en un 19.77% para metanol.

En raíz, la escasez de compuestos polares en este órgano de la planta puede explicar la factibilidad de los alcoholes para la liberación de pristimerina y aunque pristimerina es una molécula hidrófoba, los grupos químicos que presenta (carboxilo, carbonilo e hidroxilo) le otorgan un carácter medianamente polar lo cual le permite ser eluida los alcoholes. La evidencia de escasos compuestos polares en este órgano se encuentra en el cromatograma de corteza de raíz de la figura 24, donde únicamente se observan dos

señales adicionales a la de pristimerina a 420 nm, que se encuentran en muy baja concentración y que además son polares por su elución temprana en esta columna. Hasta el momento los compuestos que se han aislado de la raíz de *M. greggii* son triterpenos como derivados de friedelina, lupeol y ácido metil éster dehidrocanofílico y sesquiterpenos agarofuranos polioxigenados (Arciniégas, 2004), sin embargo aún es necesario realizar un estudio fitoquímico más profundo en tallo y raíz de esta especie para identificar los compuestos presentes en estos órganos. Trabajos en los cuales se han preparado extractos de corteza de raíz en otras plantas de la familia *Celastraceae* con alcoholes son los realizados por Haroldo y colaboradores (2004) y Nossack y colaboradores (2004), en el primero la corteza de *Cheiloclinium cognatum* se extrajo con metanol y en el segundo con *Maytenus aquifolium* se empleó metanol. El resto de solventes reportados para la extracción en literatura han sido cloroformo, cloruro de metileno, hexano: éter etílico 1:1 (v/v), estos sistemas oscilan en el rango de 3 a 9 para la constante dieléctrica, lejano a los valores de las constantes para los alcoholes (24.85 y 33.6) que en raíz de *Mortonia greggii* proporcionaron mayor extractibilidad y menor contaminación del extracto con otros compuestos de la misma planta.

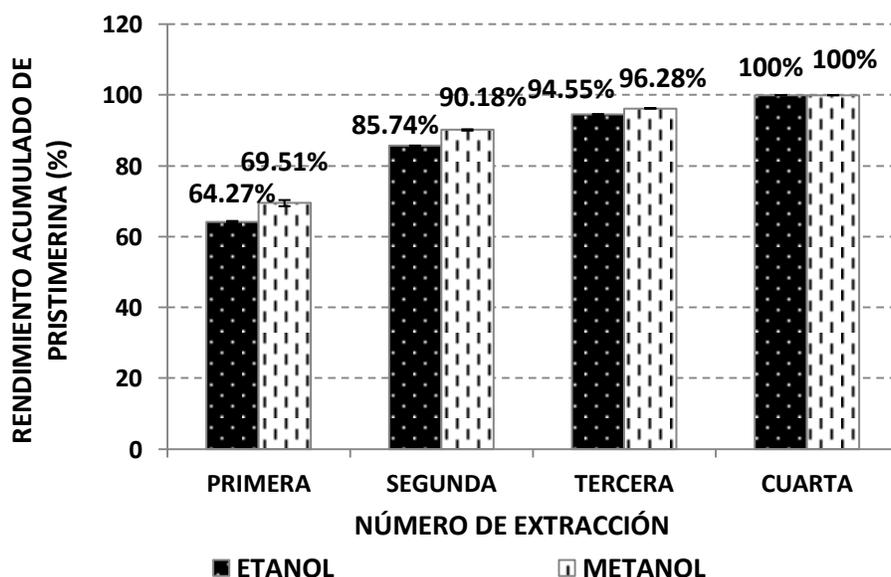


Figura 33. Porcentaje acumulado de recuperación de pristimerina por extracción en raíz de *M. greggii* para hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol.

4.2.2 Prueba de proporción peso de planta/volumen de solvente (p/v)

➤ Tallo

Se ensayaron 4 relaciones de peso de planta con volumen de solvente y en tallo se retomaron como solventes para la prueba hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanol, en los cuales no se observó diferencia significativa entre estos sistemas en la prueba de solventes. El análisis de varianza para la pureza indicó que el sistema de solventes (hexano:acetona 2:8 (v/v) o etanol) y la interacción de este factor con la proporción eran significativos ($p < 0.05$), la proporción por sí sola no fue significativa por lo cual la pureza no se ve alterada con cualquiera de las cuatro proporciones usadas (figura 34). La pureza de extractos hexano:acetona 2:8 (v/v) y etanólicos de tallo no fueron diferentes en las extracciones salvo la primera extracción en la cual fue superior la pureza del hexano:acetona 2:8 (v/v) hasta en un 50 % con respecto al extracto de etanol.

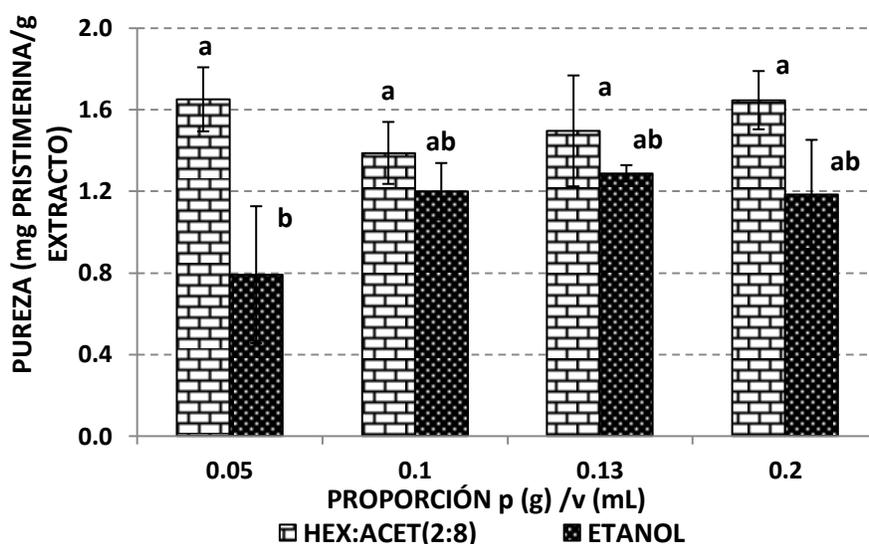


Figura 34. Efecto de la proporción (p/v) y sistema de solventes sobre la pureza de pristimerina en el extracto crudo de tallo de *M. greggii*. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En rendimiento, los factores solventes y proporción fueron significativos ($p < 0.05$) pero no su interacción. En las gráficas del rendimiento (figura 35) por solvente,

hexano:acetona 2:8 (v/v) provee el mayor rendimiento (el doble del extracto etanólico) descartando al etanol como solvente para la extracción de tallo. Las proporciones de 0.05, 0.10 y 0.13 en el Test de Tukey mostraron ser iguales al presentar altos rendimientos, porque el rendimiento disminuye al aumentar la relación de materia prima/solvente. En particular se prefiere la proporción 0.05 (1g de planta por 20 mL de solvente) para la extracción por maximizar el rendimiento del extracto, entre mayor es la cantidad de solvente que se dispone para la extracción menor es la saturación del mismo y se puede obtener mayor cantidad del metabolito de interés debido a que la extracción sólido-líquido es un equilibrio entre la concentración de la sustancia y el solvente como lo explica Sharapin (2000).

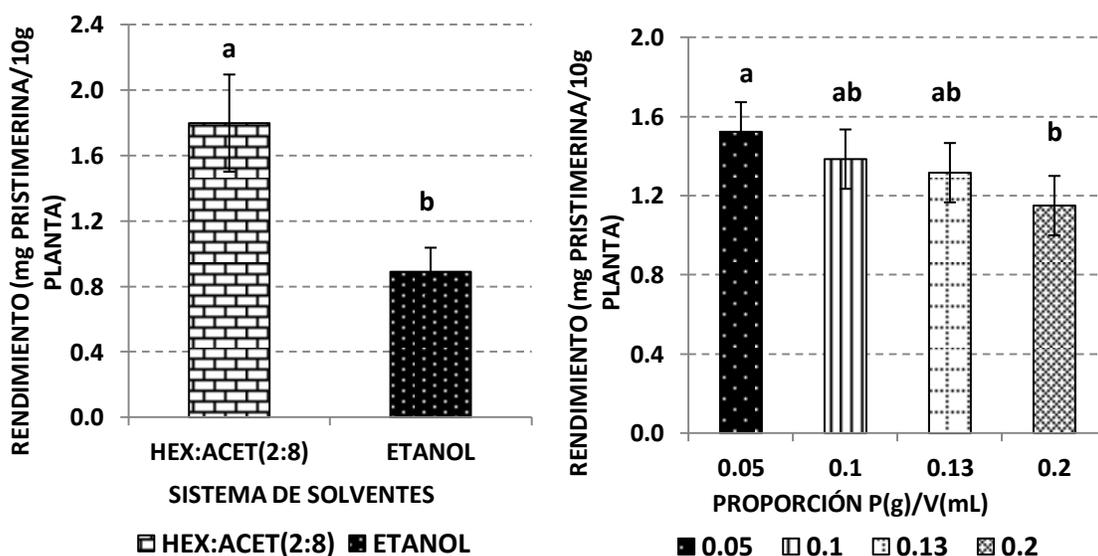


Figura 35. Rendimiento de pristimerina extracto de tallo de *M. greggii* en función del sistema de solventes-proporción p/v. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

➤ Raíz

En el análisis de varianza de la prueba de proporción para raíz, los factores y la interacción resultaron significativos ($p < 0.05$), el tratamiento distinto a los demás fue etanol con la proporción de 0.05 g planta/mL de solvente (figura 36), en éste se observó un extracto de raíz 20% más puro (30 mg de pristimerina/g de extracto) que en resto de los

tratamientos y de esta forma el metanol como solvente de extracción fue rechazado. En los resultados para el rendimiento, la media mayor también correspondió al tratamiento etanol 0.05 pero no hubo diferencias estadísticas con metanol a 0.05 y 0.10 g planta/mL no (figura 38), sin embargo como criterio de selección de los niveles de estos factores se tomó como definitiva la diferencia observada en los resultados de pureza.

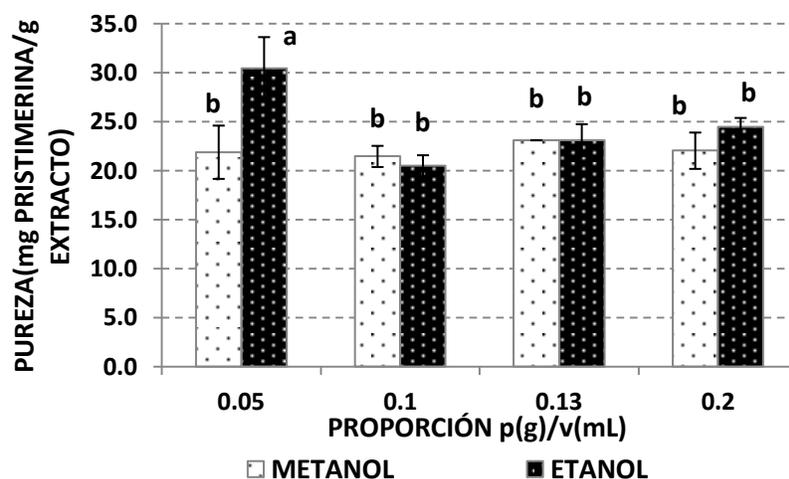


Figura 36. Efecto de la interacción proporción (p/v) y sistema de solventes sobre la pureza de pristimerina en el extracto crudo de raíz de *M. greggii*. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

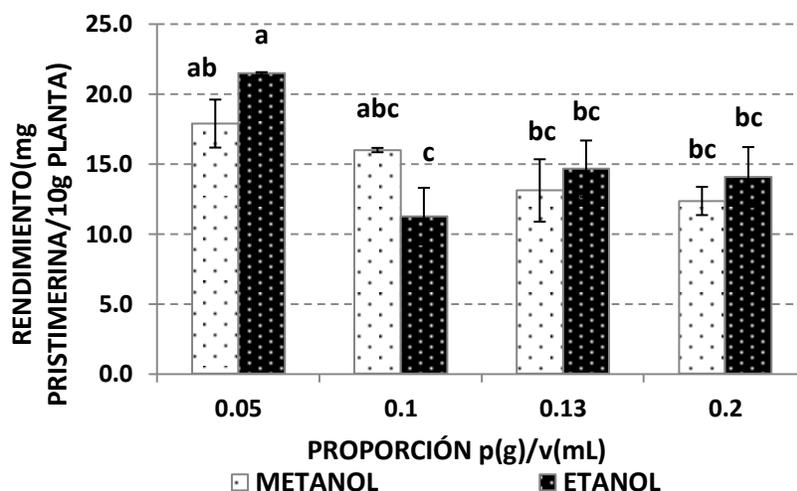


Figura 37. Rendimiento de pristimerina en extracto de raíz de *M. greggii* en función del sistema de solventes-proporción p/v. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

4.2.3 Cinética de extracción y número de extracción

➤ Tallo

El tiempo de extracción es un importante factor porque se encuentra relacionado a la saturación del solvente y a la eficiencia del proceso. De los tiempos evaluados para la pureza en tallo tanto el tiempo de extracción y como el número de extracciones fueron significativos y se identificó interacción de ambos factores ($p < 0.05$). Como se observa en la gráfica de pureza (figura 38), la mayoría de tiempos en la primera y segunda extracción no presentan diferencias entre sí. Los tiempos de extracción que produjeron altas purezas son 0.5, 1, 1.5, 6, 8 y 10h, sin embargo es posible que en los últimos tiempos (6 a 10h) en los sistemas haya ocurrido evaporación del solvente en el sistema lo que causó una concentración del extracto y por consecuencia valores altos de pureza, por esta razón se descartaron los últimos tiempos de extracción.

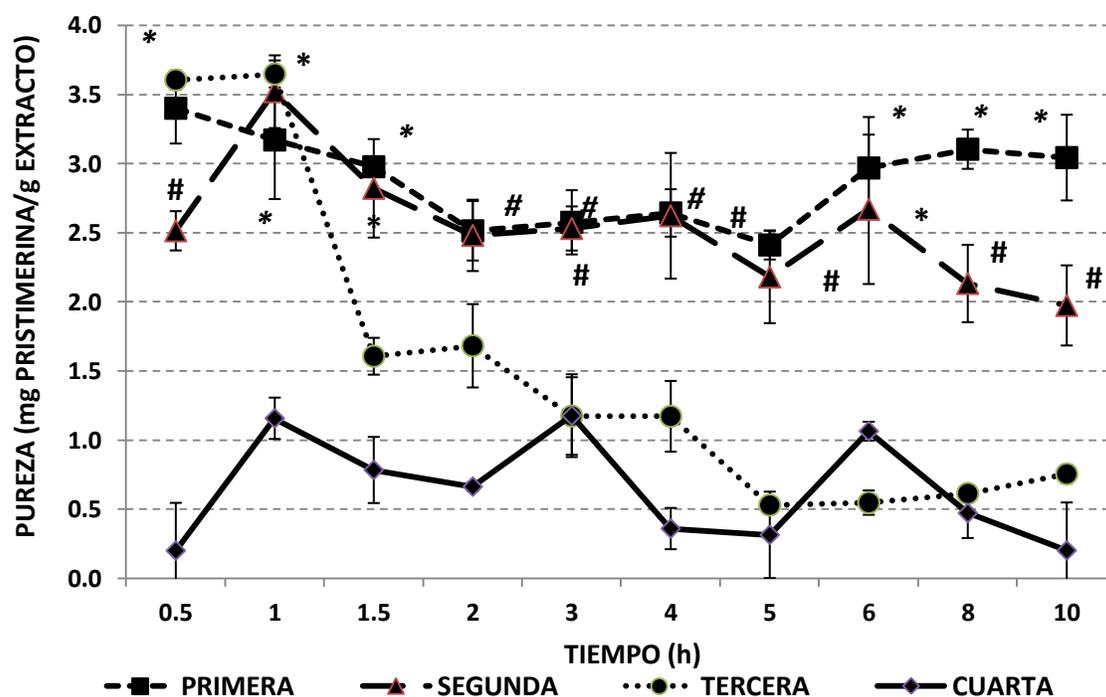


Figura 38. Pureza de pristimerina en extracto crudo de tallo de *M. greggii* a diferentes tiempos de extracción y 4 extracciones sucesivas. Las medias con el mismo símbolo son significativamente iguales.

En los tiempos de 0.5 y 1h se visualiza que hasta tres extracciones se mantiene la pureza a estas condiciones de extracción, sin embargo en el resto de los tiempos evaluados únicamente dos extracciones conservan similar entre sí la pureza del extracto de tallo.

Para el rendimiento de este extracto de tallo, la cinética realizada (figura 39) muestra que la primera extracción brinda el rendimiento más alto para todos los tiempos de extracción. Los tiempos con los más altos rendimientos fueron 8 y 10h, seguidos de 6, 0.5, 1 y 1.5h, no obstante se piensa que para términos de esta segunda variable de respuesta también hubo un efecto de la evaporación del solvente en los últimos tiempos de extracción de 6, 8 y 10h, por los cuales se les descartó como condición óptima.

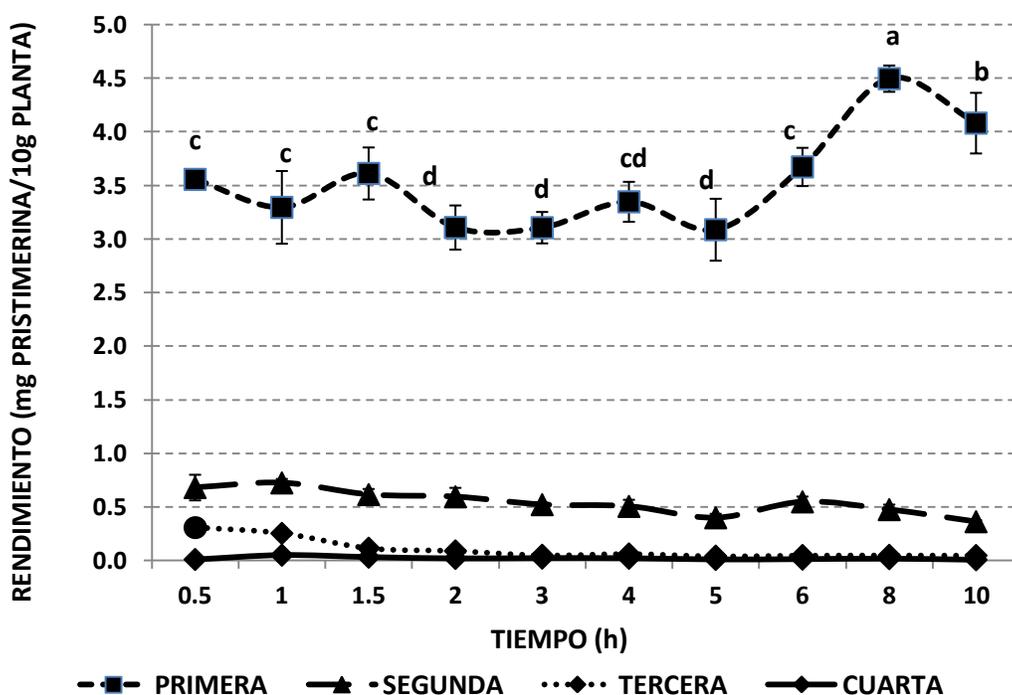


Figura 39. Cinética del rendimiento de pristimerina en extracto de tallo de *M. greggii* para cuatro extracciones sucesivas. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En los tiempos de extracción de 0.5 a 1.5h, el porcentaje de recuperación de pristimerina es de entre el 78 y 82.5%, una segunda extracción permite del 14 al 16.8% de recuperación para generar recuperaciones acumuladas de entre 92.9 al 96.5% y el incluir una tercera extracción puede producir una recuperación total de aproximadamente el 99% del compuesto. Comparando estos resultados con los obtenidos en la primer prueba de extracción para tallo con hexano:acetona 2:8 (v/v) donde el tiempo fue arbitrario, se concluye que la búsqueda de un rango de tiempos de extracción óptimos permitió mejorar el rendimiento acumulado de pristimerina de 97.39 a 99%

Al reunir los resultados obtenidos en la pureza y rendimiento en tallo de *M. greggii* de esta prueba reafirmamos la primera extracción como número de extracción óptima y el rango de tiempo de entre 0.5 y 1.5h empleando como solvente hexano:acetona 2:8 (v/v) como condiciones adecuadas para la extracción de pristimerina de corteza de tallo.

➤ Raíz

En la pureza de extracto de raíz como respuesta del tiempo y extracción (figura 40) al comparar las medias entre sí no se distinguieron diferencias importantes entre las extracciones y los tiempos, la media que fue sobresaliente y diferente fue la pureza de 30 mg pristimerina/ g extracto, correspondiente al tratamiento de 10h primera extracción aunque es posible que sea un efecto de evaporación del solvente en este tratamiento. En el resto de tratamientos no hubo prácticamente diferencias entre las medias de pureza en la primer extracción ni entre tiempos con re-extracción.

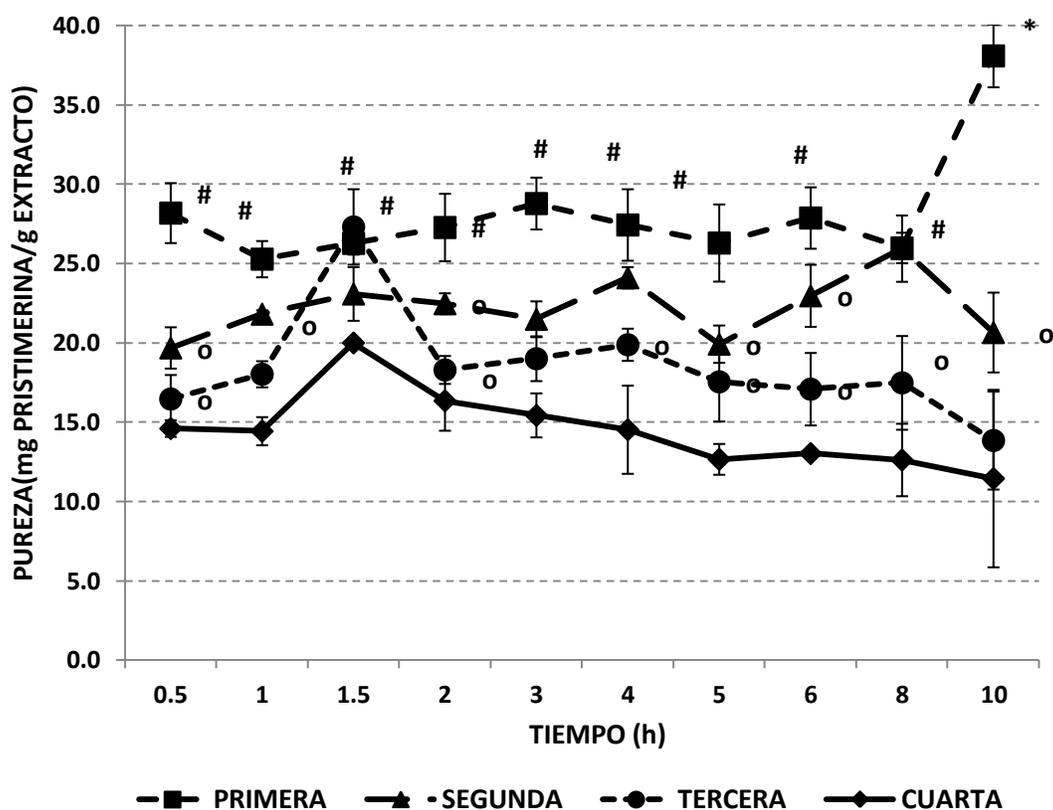


Figura 40. Pureza de pristimerina en extracto crudo de raíz de *M. greggii* a diferentes tiempos de extracción y 4 extracciones sucesivas. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

La cinética del rendimiento de pristimerina (figura 41) en raíz muestra que la primera extracción nuevamente es la adecuada para obtener un rendimiento máximo, los primeros tiempos (0.5-1.5h) en esta extracción produjeron rendimientos bajos, y conforme se incrementa el tiempo de extracción el rendimiento aumenta mientras en el resto de número de extracciones no cambió. El tratamiento de 10h primera extracción tuvo un rendimiento alto casi 1.5 veces mayor al observado para el tiempo de 0.5h. Si se analiza el gráfico desde el punto de vista de número de extracción, la media global de la primera extracción es de 28 mg pristimerina/ g planta, en la segunda es de 22 mg/g y para una tercer re-extracción la pureza disminuyó 4 unidades.

Para este caso parece que tiempos largos de extracción son los indicados, sin embargo uno de los objetivos del presente trabajo es la optimización de las condiciones y como describe Sharapin (2000) aunque los tiempos prolongados no influyen negativamente en el proceso extractivo frecuentemente implican costos de mano de obra, recursos y retardo en etapas subsecuentes de utilización del extracto. Para este extracto de raíz de *M. greggii* se sugiere de acuerdo a los resultados la utilización de un tiempo de 10h para un rendimiento y pureza altos, sin embargo este intervalo de tiempo que se evaluó 0.5 a 10h se consideró en la siguiente prueba de extracción con el objeto de ver si se disminuye el tiempo de extracción al implicar otros factores en el proceso.

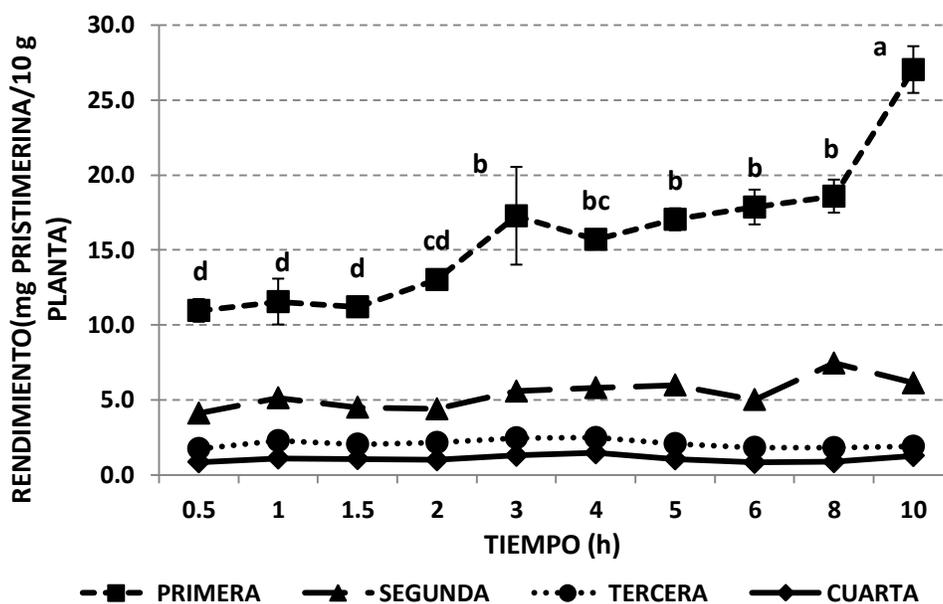


Figura 41. Cinética del rendimiento de pristimerina en extracto de raíz de *M. greggii* para cuatro extracciones sucesivas. Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Hasta el momento las condiciones óptimas para la extracción de pristimerina a partir de corteza de raíz de *M. greggii* son una primera extracción a una proporción de 1g de planta por 20 mL de etanol (0.05) por 10h.

4.2.4 Prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura

➤ Tallo

En esta prueba de extracción con el diseño Box-Behnken planteado para tres factores (tiempo, agitación y temperatura) se pasó de realizar un proceso de extracción estática a una extracción dinámica (Sharapin, 2000) al incluir en el diseño como factor la agitación.

El análisis de regresión realizado a los datos experimentales y su ajuste a un modelo polinomial de segundo orden generó las siguientes ecuaciones, las cuales representan modelos para la pureza y rendimiento de la extracción de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura a partir de corteza de tallo en *Mortonia greggii*.

Modelo para pureza de extracción de pristimerina en tallo:

$$P_{Pr} = -2.66043 + 3.87064t + 0.01800A + 0.244835T - 1.77369t^2 - 8.78167 \times 10^{-5}A^2 - 0.004121T^2$$

De donde:

P_{Pr} = Pureza de pristimerina (mg de pristimerina/g de extracto)

t = Tiempo (h): 0.5-1.5

A = Agitación (rpm): 0-200

T = Temperatura (°C): 20-40

Modelo para rendimiento de extracción de pristimerina en tallo:

$$\mathbf{Rdt_{Pr} = -2.89774 + 3.47296t + 0.02196A + 0.241962T - 1.39286t^2 - 1.04169x10^{-4}A^2 - 0.00368051T^2}$$

De donde:

Rdt_{Pr} = Rendimiento de pristimerina (mg de pristimerina/10g de planta)

t = Tiempo (h): 0.5-1.5

A = Agitación (rpm): 0-200

T = Temperatura (°C): 20-40

El análisis de varianza para los datos de pureza (*anexo G*) mostró que el tiempo de extracción (t) fue el factor que más afecta la pureza de pristimerina en el extracto de tallo ($p < 0.05$) así como la existencia de una fuerte influencia de los términos cuadráticos de los factores en el modelo. Las suposiciones de normalidad y varianza constante se cumplieron para los datos del análisis (*anexo H*), la independencia de residuos no fue posible verificarlas dado a que las réplicas que se corrieron fueron no genuinas para cada tratamiento en el diseño, Minitab mostró este análisis considerando réplicas genuinas por lo cual no es válido. El ajuste de los datos al modelo fue de 70.6%.

Las gráficas de superficie muestran el comportamiento de la pureza a las condiciones de evaluación (figura 42) en los factores estudiados. En las tres gráficas de superficie observamos que prácticamente la pureza del extracto visualizado las variables muestran un desarrollo parabólico. En la gráfica del inciso a tiempo de extracción-agitación, se observa que pureza con los extremos de tiempo de extracción (0.5h y 1.5h) y la nula y la más alta agitación posee valores extremadamente bajos, los cuales a medida que ocurre un desplazamiento de los niveles al punto central mejora notablemente la pureza, al ubicarnos en la condición de máxima agitación las purezas a determinados tiempos no son tan bajas como cuando no existe agitación en el sistema. En la gráfica b y c también el comportamiento paraboloide de las dos variables graficadas se visualiza, en

particular en la superficie de respuesta c, en el punto agitación a 200 rpm y temperatura cercana a los 30°C la pureza no tiene tan pronunciado el ascenso parabólico y lo mismo se advierte en la gráfica tiempo-temperatura en la que fijando el tiempo en 1.5h la parábola descrita por el desplazamiento de la temperatura es más baja y más ancha en su abertura (gráfica c). La descripción parabólica más fiel de la pureza es para la agitación. En todos los casos la pureza máxima en las condiciones óptimas es superior a los 4 mg/g de extracto.

Las gráficas de contorno se omitieron de figura 42 dado a que las interacciones entre factores diferentes no resultaron significativas.

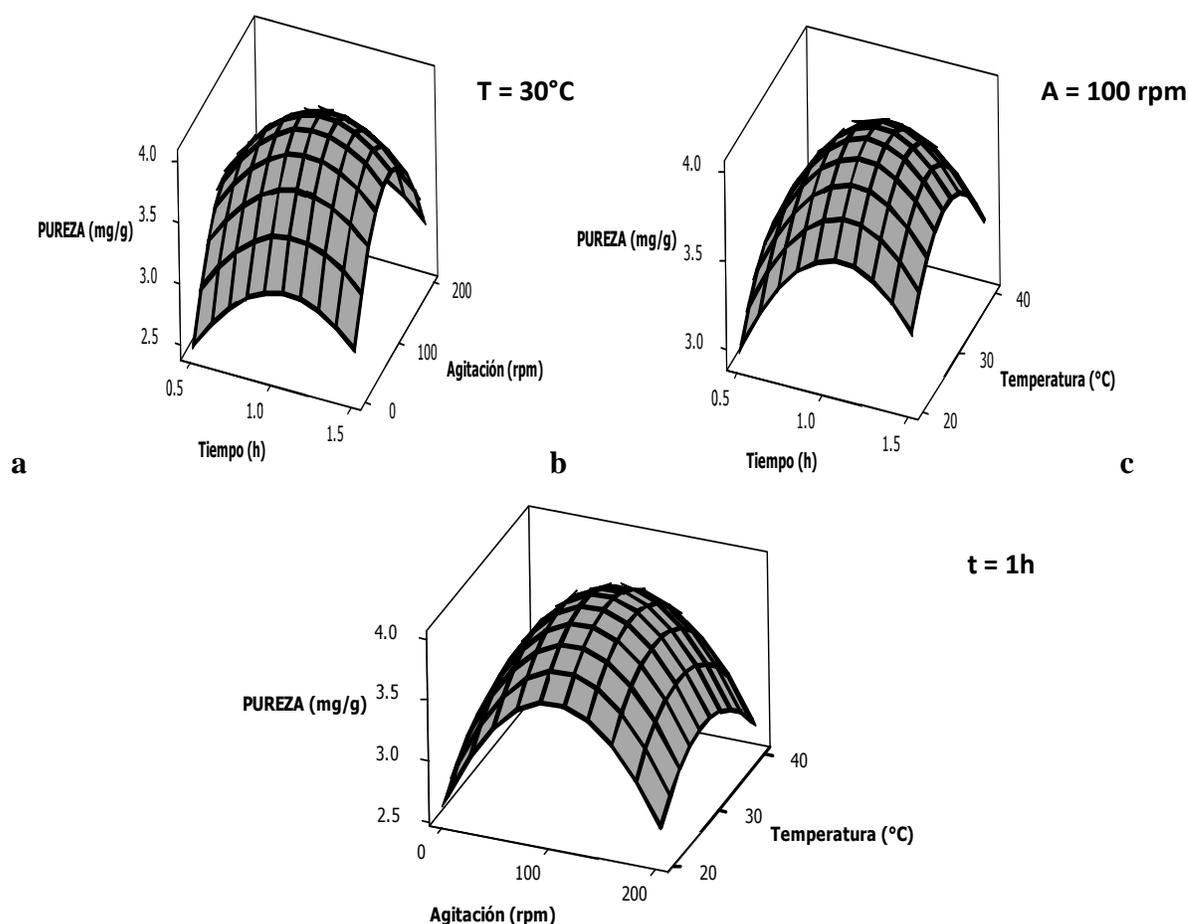


Figura 42. Superficies de respuesta para la pureza de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de tallo de *M. greggii*.

Las condiciones óptimas para obtener la mayor pureza (4.0101 mg pristimerina/g de extracto) se establecieron por medio del optimizador de Minitab con una deseabilidad de 0.92 y corresponden a un tiempo de extracción de 1h 5min 45.6s, 103.0 rpm y 29.7°C (figura 43).

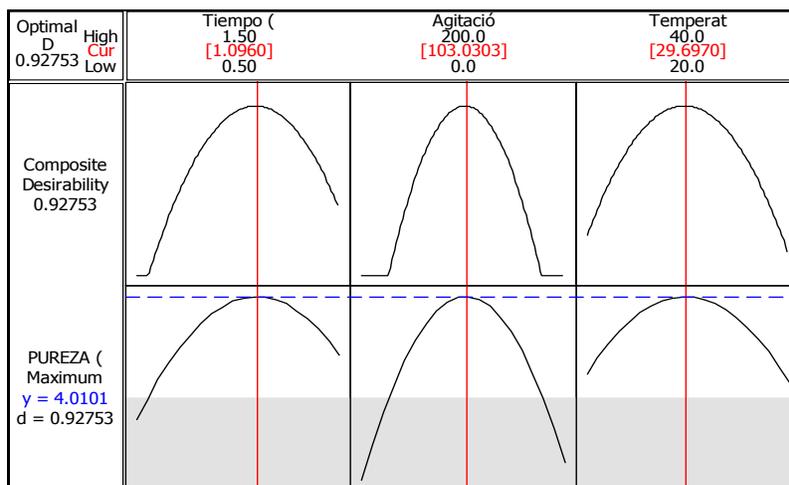


Figura 43. Respuesta de optimizador para pureza de extracto de tallo

En cuanto al rendimiento, el tiempo de extracción (t) también fue uno de los factores más significativos (*anexo G*) así como la temperatura (T) para la obtención de una mayor cantidad de pristimerina. Los términos cuadráticos de los factores también fueron significativos para el modelo, se descartaron interacciones entre los factores y se cumplieron los supuestos del análisis de varianza (*anexo H*) a excepción de la independencia de los residuos que no se verificó por la razón explicada en el análisis de pureza de tallo. Este modelo presentó un ajuste con los datos de 75.99 %.

En estas gráficas de superficie de respuesta (figura 44) el rendimiento máximo es superior al 4%. Se concluye que el incremento de temperatura desde la ambiental no afecta la extractibilidad de pristimerina durante el proceso sino al contrario suele favorecerla ligeramente cuando la agitación está en su óptimo valor (gráfica c). La parábola más definida suele corresponder a la agitación. Fijando la temperatura, el punto de menor rendimiento para el extracto sucede a un tiempo de extracción de 0.5 h y cero agitación y mejora con el incremento del tiempo y la media de la agitación. Si el factor fijo es la

agitación, tiempos de extracción cercanos a 1.5 h y elevación de temperatura brindan rendimientos aceptables y permiten una extracción gradual de pristimerina.

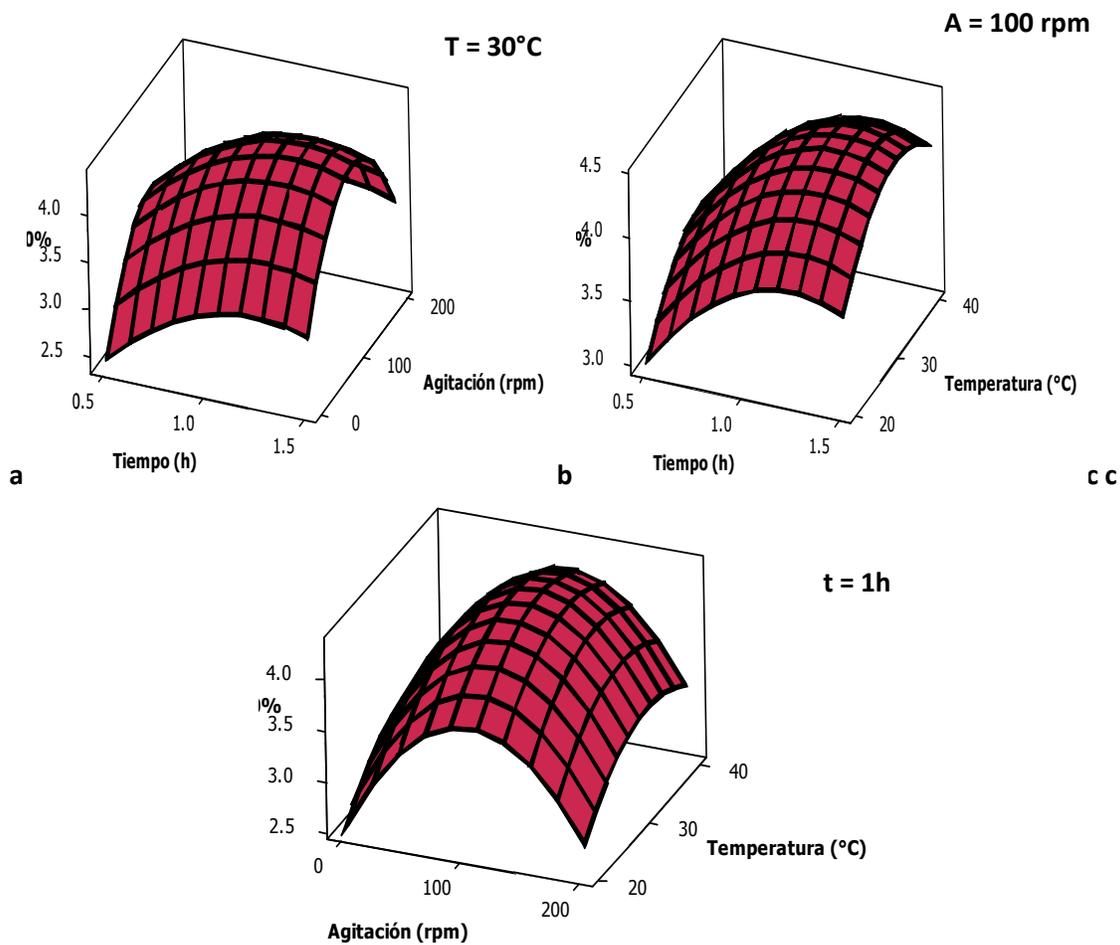


Figura 44. Superficies de respuesta para rendimiento de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de tallo de *M. greggii*.

El optimizador del programa provee para maximizar el rendimiento (4.4022 mg pristimerina/10g de planta) como valores óptimos de los factores 1h 14min 51s, 105.0 rpm y 32.9°C con deseabilidad de 0.90 (figura 45).

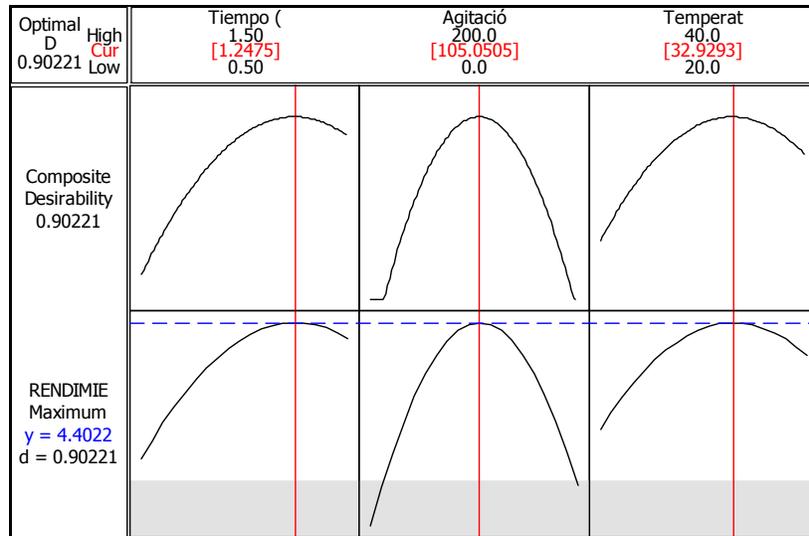


Figura 45. Respuesta de optimizador para rendimiento de extracto de tallo

Como la maximización de las variables de respuesta (pureza y rendimiento) es el objetivo conjunto, se realizó la búsqueda de condiciones mediante el optimizador que trataran de cumplir con los dos objetivos al mismo tiempo. La deseabilidad lograda fue de 0.96 y las condiciones óptimas para pureza y rendimiento en conjunto son: 1h 5min 45.6 s, 103.0 rpm y 29.7 °C. Estas condiciones están más cercanas a las óptimas de la pureza individual que a las del rendimiento, la deseabilidad aumentó en la compuesta para pureza y disminuyó en rendimiento.

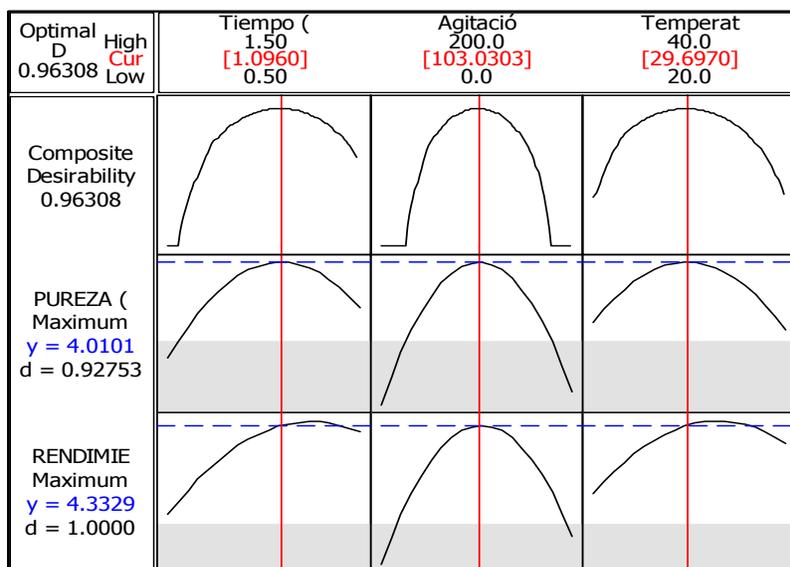


Figura 46. Respuesta de optimizador para pureza y rendimiento de extracto de tallo

➤ Raíz

El modelo obtenido para pureza y rendimiento de pristimerina en el extracto de corteza de raíz en *Mortonia greggii* en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura se representa por las ecuaciones siguientes.

Modelo para pureza de extracción de pristimerina en raíz:

$$P_{Pr} = 41.8556 - 2.71034t - 0.09792A + 1.51277T + 0.442013t^2 - 0.0220364T^2 - 0.00412195At - 0.0483004Tt + 0.00324091AT$$

De donde:

P_{Pr} = Pureza de pristimerina (mg de pristimerina/g de extracto)

t = Tiempo (h): 0.5-10

A = Agitación (rpm): 0-200

T = Temperatura (°C): 20-50

Modelo para rendimiento de extracción de pristimerina en raíz:

$$Rdt_{Pr} = 30.0975 - 2.23861t - 0.287666A + 2.94909T + 0.329544t^2 - 0.0465069T^2 + 0.00840590AT$$

De donde:

Rdt_{Pr} = Rendimiento de pristimerina (mg de pristimerina/10g de planta)

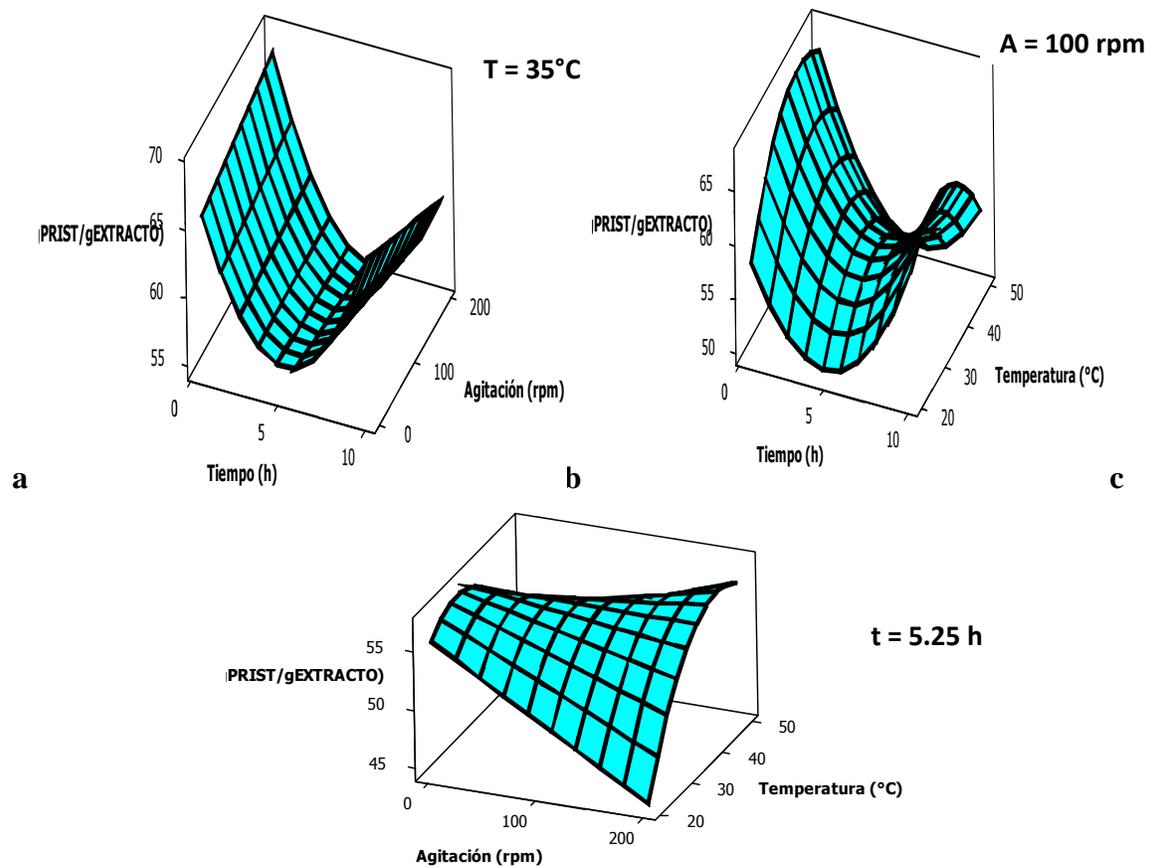
t = Tiempo (h):0.5-10

A = Agitación (rpm):0-200

T = Temperatura (°C):20-50

El único factor que resultó significativo en la pureza del extracto de raíz (*anexo I*) fue el tiempo de extracción y las interacciones entre los tres factores, cumpliéndose dos de los supuestos del análisis: la distribución normal de los datos y la varianza constante (*anexo J*). Los datos tuvieron un ajuste del 68.42 % con respecto al modelo.

En la figura 47 se observan las gráficas de superficie y de contorno de pureza en corteza de raíz generadas en Minitab para cada una de las interacciones de los factores. En la interacción tiempo de extracción-agitación a temperatura fija (gráfica a), si el tiempo se acerca a valores alrededor de las 5h la pureza decrementa en un orden de 10mg/g de extracto, alrededor de pero a tiempos cercanos a 0.5 h o de 10 h se tienen valores altos, la modificación de la agitación altera escasamente la pureza. Este mismo comportamiento descrito para el tiempo se encuentra en la gráfica tiempo-temperatura (gráfica b) donde la pureza disminuye en 5 unidades más cuando el tiempo se sitúa en los alrededores de la media entre ambos niveles, la temperatura en este caso si influye ligeramente en la variable de respuesta y hasta resulta contradictoria porque a tiempos de extracción de 0.5h, la pureza mejora con temperaturas altas y a tiempos de extracción largos (10h) temperaturas cerca de la ambiental (20°C) la pureza tiene un valor intermedio. La variación de la pureza con los tiempos de extracción mencionados pueden deberse a que al entrar la planta en contacto con el solvente, la pristimerina se lixivie hacia afuera y con el aumento del tiempo otras moléculas empiecen a migrar de los tejidos al exterior desplazando o superando la salida de pristimerina y posteriormente al concluirse la elución de estas moléculas que deben hallarse en menor cantidad continúe ocurriendo la liberación del metabolito de interés. Finalmente en la gráfica c, a agitación 0 aumento de temperatura baja la pureza y a medida que se aplica agitación temperaturas altas mejoran bastante la pureza, parece suceder que la agitación pudiera favorecer la extracción de otros compuestos y posteriormente la temperatura afectar a algunas moléculas distintas y reconstituir la pureza de este extracto de raíz.



Gráficas de contorno de PUREZA(mgPRIST/gEXTRACTO)

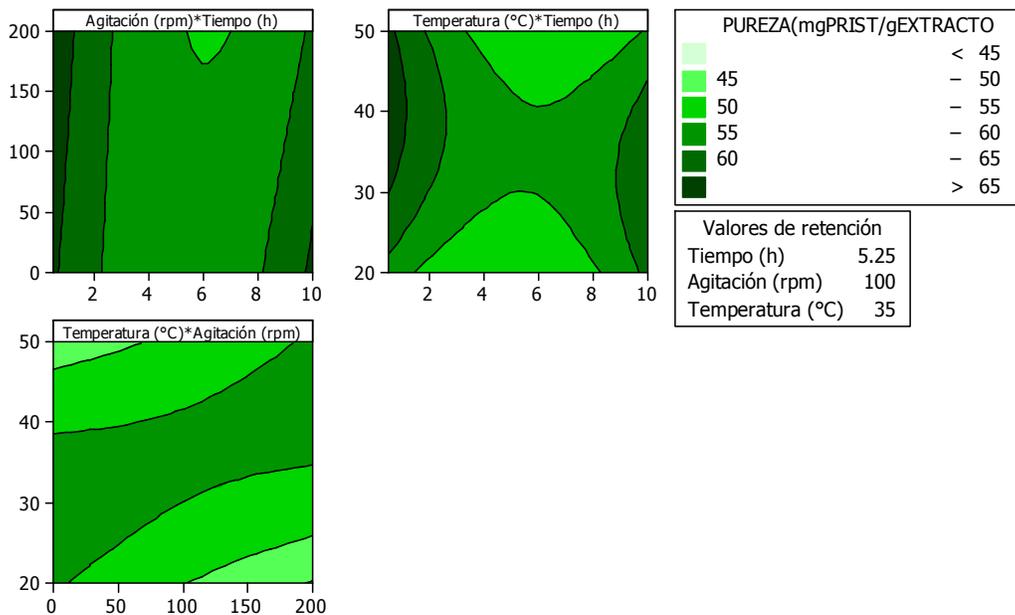


Figura 47. Superficies de respuesta y gráficas de contorno para pureza de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de raíz de *M. greggii*.

El optimizador del programa establece como valores óptimos de los factores 30 minutos de extracción, agitación máxima (200rpm) y 48.28°C, la deseabilidad en este caso está de acuerdo a lo pedido (figura 48).

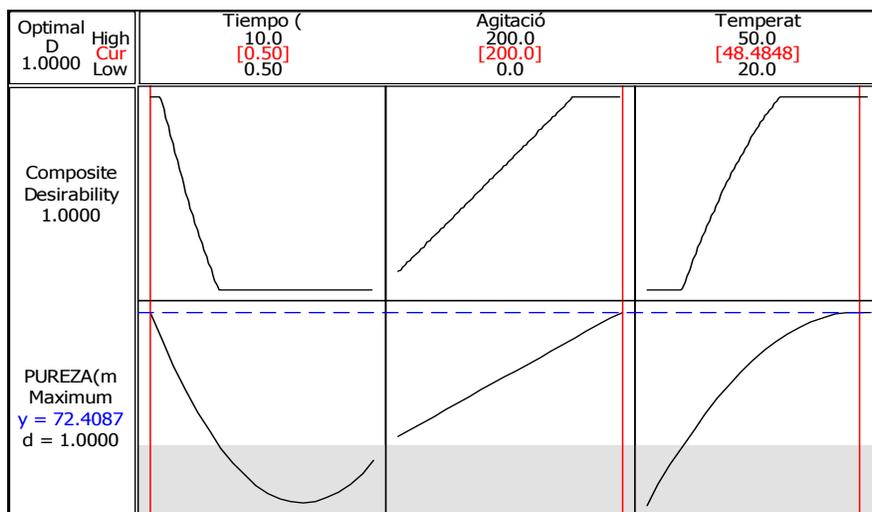
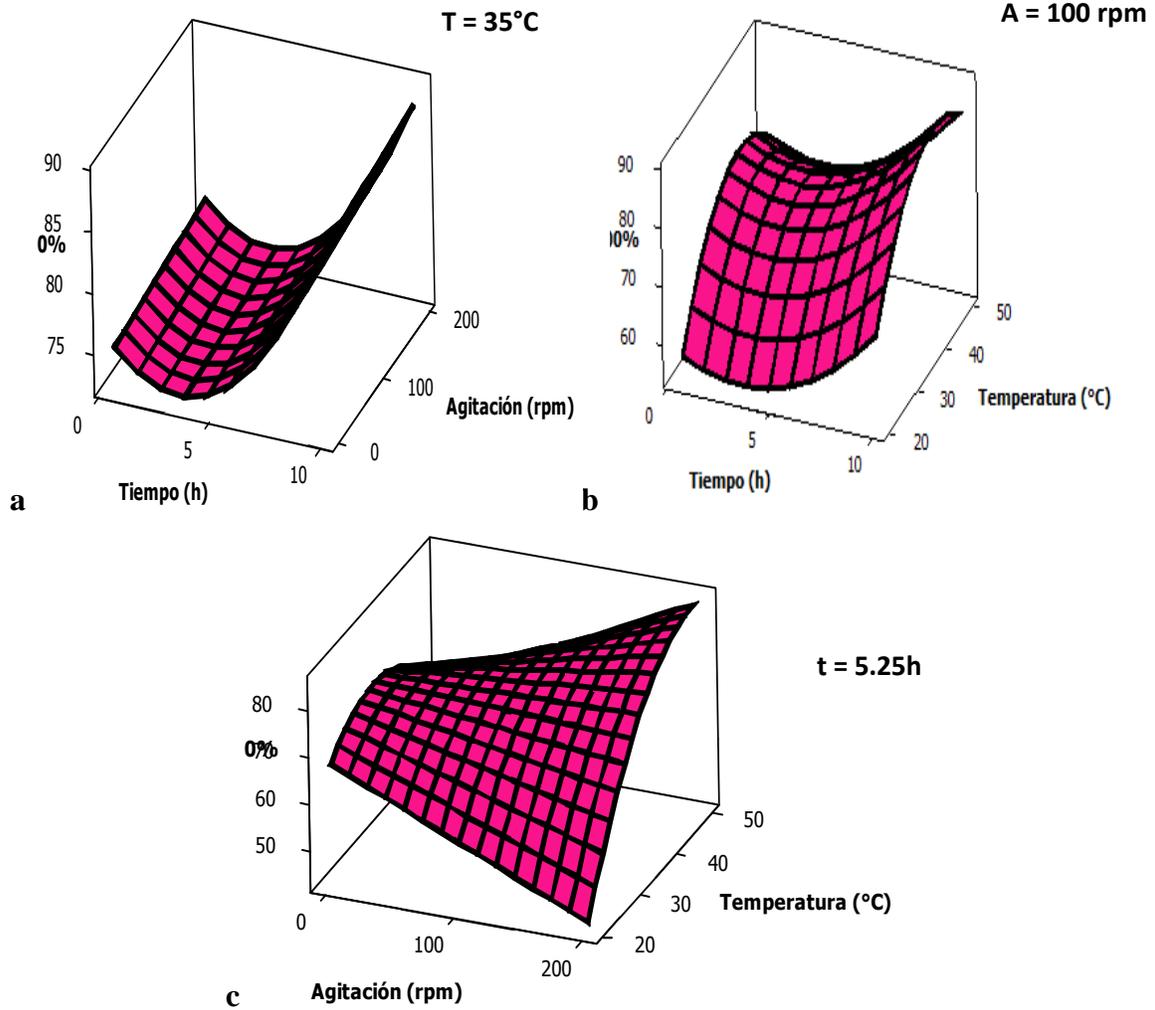


Figura 48. Respuesta de optimizador para pureza de extracto de raíz

Por otra parte, en el rendimiento del extracto de raíz, los resultados significativos (*anexo K*) fueron tiempo de extracción y temperatura y sólo una interacción resultó estar en el modelo, agitación-temperatura (figura 49). Se verificó la normalidad de los residuos y la varianza constante no encontrando desviaciones (*anexo L*). El porcentaje de variación de la variable de respuesta fue de 71.10% con respecto al modelo. En la gráfica a correspondiente a tiempo-agitación, es evidente que al iniciar la extracción con 0.5 h el tiempo causa una disminución del rendimiento y asciende en el intervalo de 5 a 10 h, si en determinado tiempo se modifica la agitación el rendimiento parece no alterarse. En la superficie de de la gráfica b, el comportamiento para paraboloides es menos pronunciado para el tiempo y la temperatura actúa de la misma forma, siendo óptimas las ubicadas entre los 40-50°C. En la interacción agitación-temperatura y como se observa en la gráfica de contorno correspondiente, a un tiempo fijo al incrementarse la agitación en el sistema el rendimiento puede disminuir si la temperatura empleada se aproxima a 20°C o puede mejorar cuando este factor se incrementa hasta 50°C, esto puede explicarse que la temperatura alta y agitación vigorosa favorecen la extracción sólido-líquido de pristimerina en corteza de raíz.



Gráfica de contorno de RENDTO(mgPRI vs. Temperatura , Agitación (r

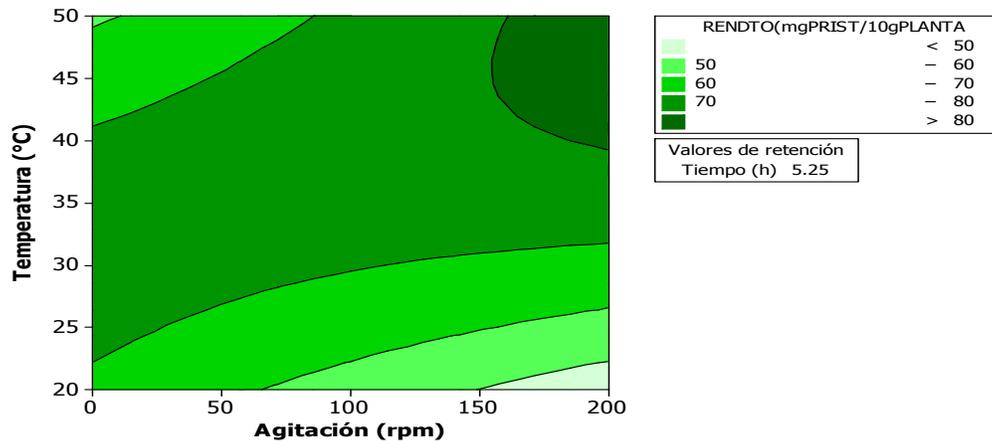


Figura 49. Superficies de respuesta y gráfica de contorno de interacción para rendimiento de pristimerina en función del tiempo de extracción, agitación y temperatura en extracto de raíz de *M. greggii*.

El máximo rendimiento 98.3808 (mg pristimerina/10g de planta) ocurre cuando las condiciones de extracción son 10 h, 200 rpm y 49.7 °C, con deseabilidad de 1.00 (figura 50), siendo desventaja la extensión del tiempo de extracción.

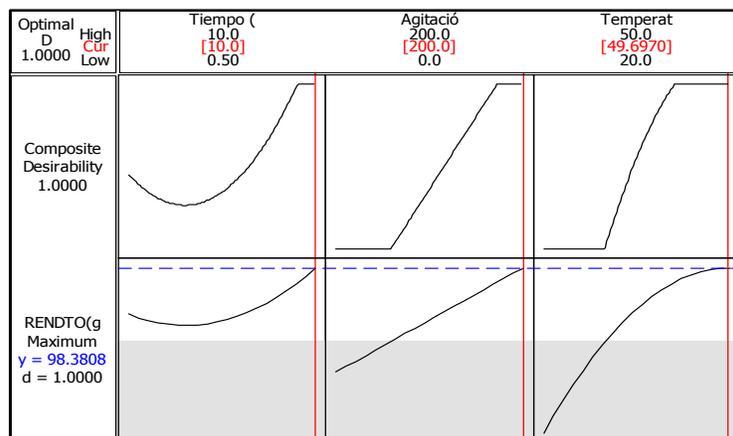


Figura 50. Respuesta de optimizador para rendimiento de extracto de raíz

Una optimización conjunta de la pureza (figura 51) y rendimiento del extracto de raíz conlleva a emplear como condiciones 30 minutos de extracción, 200 rpm en agitación y 49.7 °C. De esta manera podemos contar con un extracto de pureza aceptable y rendimiento adecuado sin tener que sacrificar la pureza y usar tiempos extenso para tener altos rendimientos.

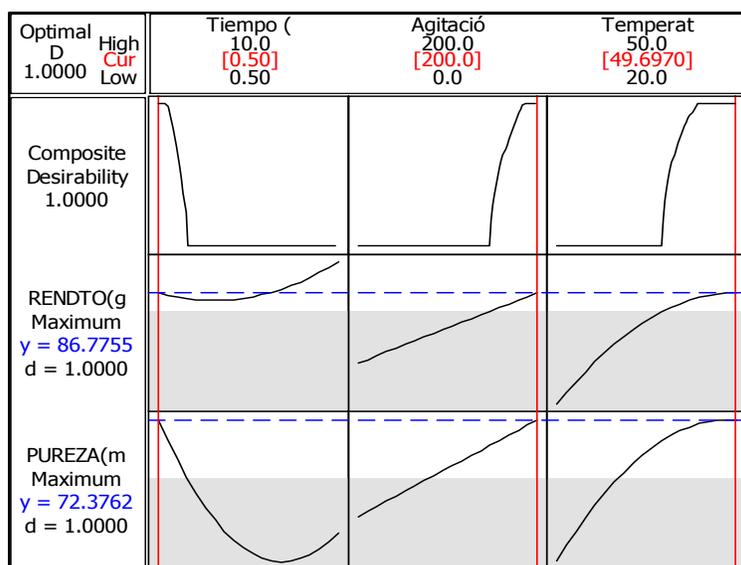


Figura 51. Respuesta de optimizador para pureza y rendimiento de extracto de raíz.

Una observación importante a discutir es que en los modelos para pureza y rendimiento tanto del extracto de tallo como de raíz se arrojó en los resultados de los análisis de varianza una significativa falta de ajuste en los modelos, realizando una investigación más exhausta se encontró que esta significancia de este término en el análisis puede deberse a la presencia de las réplicas no genuinas y al número mismo de réplicas empleadas, sin embargo no representa problema alguno a la aplicabilidad de los modelos (School of Public Health, 2012).

Adicionalmente a los análisis de medias presentados para pureza y rendimiento de ambos extractos, también se practicó un análisis de variación a los datos de desviación estándar por tratamiento, generando un modelo propio de la variación con el objetivo de minimizarla. Se buscó las condiciones óptimas para cada extracto minimizando la variación y maximizando pureza y rendimiento. Los resultados de esta sección no se presentan por motivos de extensión y se incluyen en el *anexo M*.

4.3 Aislamiento molecular de pristimerina

4.3.1 Cromatografía en columna de sephadex con extracto de corteza de raíz

La corteza de raíz de la planta E (127.3g) sometida a extracción sólido-líquido rindió 15.129 g de extracto total, el cual se empleó para la realización de estas columnas de sephadex.

Se colectaron 38 fracciones de 5 mL cada una operando la columna a una velocidad de elución de aproximadamente 1mL/min. En la figura 52 se muestra que el comportamiento de la elución de pristimerina tuvo la forma de una campana. 8 de las fracciones colectadas presentaron un índice de purificación superior a la unidad lo que significa que superaron la pureza inicial de pristimerina que poseía el extracto y la columna se encuentra purificando al incrementar la pureza de pristimerina en fracciones respecto a la pureza inicial. De estas 8 fracciones, 4 tuvieron índice de purificación entre 1 y 2 y el resto de fracciones alcanzaron índices de purificación superiores a 2. En la misma gráfica

se indica el porcentaje de recuperación de pristimerina a través de las fracciones colectadas en la columna. Las fracciones con índice de purificación mayor a 2 brindan una recuperación de pristimerina alimentada del 28.28 %, mientras que las fracciones con índices entre 1 y 2 acumulan un 45.32 % de pristimerina y las fracciones con índice entre 1 y 0.5 recuperan 25.26 % de pristimerina. Cualitativamente las fracciones con purezas mayores a la unidad presentaron una coloración entre rojo y naranja intenso (*anexo B*), las fracciones con índices mayores a 2 eran naranjas y tenían un aspecto sólido.

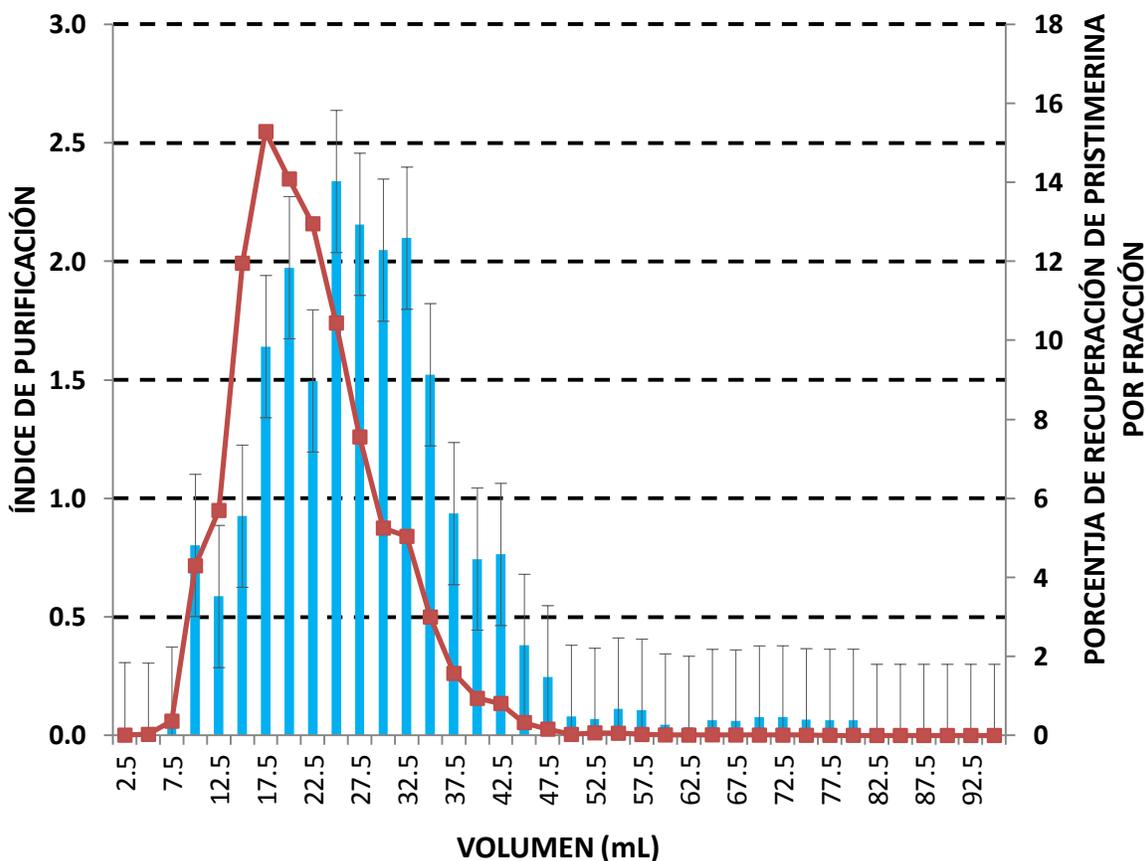


Figura 52. Índice de pureza y porcentaje de recuperación de pristimerina en fracciones de columna de sephadex con extracto de corteza de raíz.

La variación observada en las fracciones de pristimerina se adjudica a la dificultad en el control de la velocidad de la fase móvil, y se sugiere una regulación más constante, porque según Patnaik (2004) la velocidad lineal de la fase móvil se encuentra relacionada

con la resolución y eficiencia de la separación en la columna cromatográfica y por consecuencia con la reproducibilidad.

En la literatura sobre el aislamiento de pristimerina en los trabajos de Nuñez (2004) y Gutiérrez, *et al* (2007) se empleó la columna cromatográfica de sephadex como primera etapa de separación para los extractos de raíz de *Crossopetalum uragoga* y *Maytenus ilicifolia*, respectivamente. En estas técnicas no se especifican las dimensiones de las columnas, relación entre extracto-soporte, condiciones de elución ni purezas alcanzadas, por lo cual no es posible establecer comparación entre los parámetros usados y el grado de purificación en las fracciones obtenidas.

4.3.2 Separación líquido-líquido

La elección de la composición del sistema Arizona adecuado para la separación líquido-líquido de las fracciones agrupadas se basó en la tonalidad de la coloración naranja de las dos fases formadas (orgánica y acuosa), se optó por aquellas 3 composiciones donde la distribución colorimétrica fuese similar en ambas fases, esto se observó en el tercer, cuarto y quinto tubos de la prueba (composiciones S, T y U), mientras que en las primeras dos extracciones (composiciones P y O) el compuesto se localizó en la fase superior, en las últimas extracciones (composiciones V, W, X, Y y Z) la tonalidad más intensa se halló en la fase inferior.

Estas composiciones seleccionadas se hallan contempladas dentro de los sistemas de solventes poco polares o hidrófobos (Lu, *et al*, 2009) y están en coincidencia con el carácter hidrófobo que se atribuye a la molécula de pristimerina (The Chapman And Hall Natural Products, 2011)

Los resultados del escalamiento de las composiciones efectuadas se muestran en la siguiente tabla

Tabla 11. Coeficientes de partición, pureza y porcentaje de recuperación de pristimerina en las fases de las composiciones evaluadas en la separación líquido-líquido

COMPOSICIÓN	K _D	FASE	PUREZA	% RECUPERACIÓN DE PRISTIMERINA
			(mg Pristimerina/g fase)	
S	2.496	Acuosa	1.946	32.86
		Orgánica	4.206	67.13
T	2.274	Acuosa	1.918	34.04
		Orgánica	3.378	65.95
U	3.001	Acuosa	1.740	23.16
		Orgánica	3.305	76.83

En esta tabla se registraron coeficientes de partición de pristimerina de las 3 composiciones, los cuales poseen valores cercanos a 3, el coeficiente obtenido se halla entre 0.5 y 5 como se recomienda para la realización de una separación líquido-líquido. Las purezas obtenidas para las fases orgánicas demuestran un incremento de la pureza con respecto a la muestra inicial antes de la extracción cuya pureza promedio fue de 2.2 mg de pristimerina/g de fracción.

El porcentaje de recuperación de pristimerina con estas composiciones para la fase orgánica se halla entre el 66 y 77%, si se realizaran al menos 3 extracciones líquido-líquido sucesivas el porcentaje de recuperación total de pristimerina estaría entre 96.0 y 98.7%, y la pureza se incrementaría en un intervalo de 1.5 a 2 veces la pureza de la fracción antes de las extracciones dependiendo la composición usada (S, T, U).

4.3.3 Propuesta de proceso de extracción y aislamiento de pristimerina

Con los resultados obtenidos se propone el siguiente procedimiento de extracción y aislamiento de pristimerina (figuras 53A y 53B) a partir de la planta *Mortonia greggii*. En la figura 53A se indica el proceso propuesto para la extracción de pristimerina. Se parte de la planta, la cual se corta y separa en órganos y se deja secar por completo para eliminar la humedad por 24h y en una incubadora a 40°C de acuerdo a literatura. Se retira la corteza y

se somete a molienda por separado al tallo y a la raíz. Para efectos de balance de materia se determinó utilizar 1.7 Kg de raíz de la cual se obtienen 60.5 g de corteza de raíz de una colecta realizada en el mes enero (por el mayor contenido de pristimerina cuantificado) y 32 Kg de tallo para generar 100 g de corteza de tallo procedente de una colecta del mes de agosto. Cada una de las cortezas de estos órganos se coloca en una primera separación sólido-liquido dinámica bajo las condiciones óptimas correspondientes que se determinaron. El extracto se separa del material sólido por filtración y se evapora el solvente para rendir un extracto crudo. El material restante de tallo después de esta primera extracción se somete a dos extracciones estáticas sucesivas con solvente recuperado mientras al material de raíz se le practica una segunda extracción estática, es importante mencionar que el número de extracciones indicadas para cada una de las dos cortezas se fijó de acuerdo a los resultados de rendimiento y pureza encontrados en la pruebas de extracción. Con la cantidad de corteza mencionada se logra obtener 7.5 g de extracto de raíz en la primera extracción y 13.24 g de extracto de corteza de tallo contemplando tres extracciones sucesivas debido a que como se analizó en la prueba de solventes para tallo la pureza promedio del extracto no cambia con tres extracciones sucesivas. Los 2.8 g de la segunda extracción estática de raíz por tener una pureza inferior a la de la primera extracción debe someterse a estrategias alternativas para incrementar la pureza a 50 mg de pristimerina/g de extracto o más para iniciar la purificación por cromatografía en sephadex.

Para la conservación de dichos extractos se sugiere su almacenamiento en recipientes ámbar como protección frente a la luz y a una temperatura igual o inferior a 20°C.

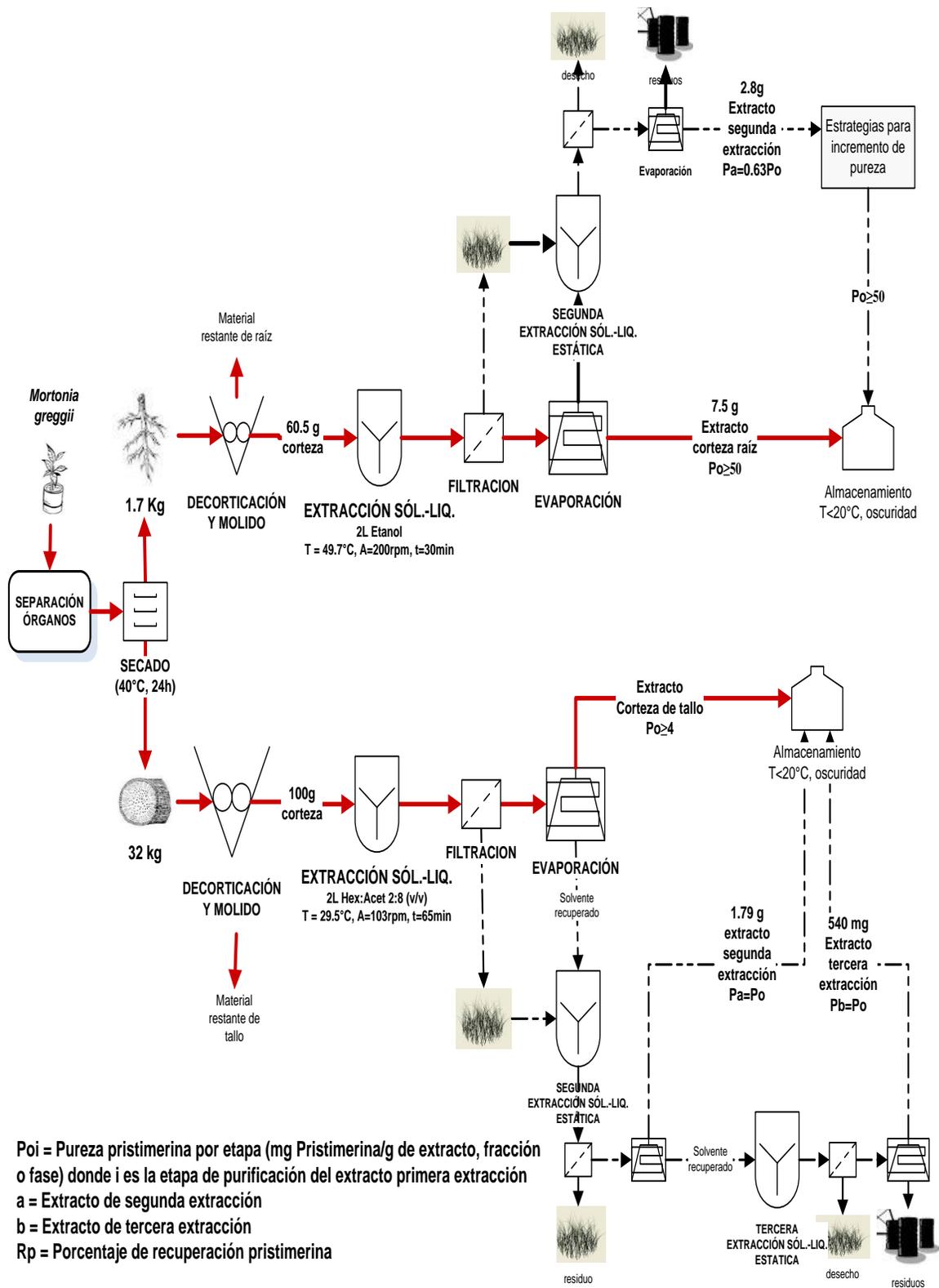


Figura 53A. Proceso de extracción propuesto para pristinimerina a partir de *Mortonia greggii*.

Considerando un extracto de raíz con pureza de 50 mg pristimerina/g de extracto se toman 2.5 g del mismo y se alimentan a una columna de sephadex LH-20 (figura 53B) bajo los parámetros de operación establecidos en metodología. En las fracciones con incremento de pureza del doble (100 mg/g) respecto a la inicial se recupera el 28 % de pristimerina, es decir, 35 mg con la pureza deseada para su purificación final por cromatografía de partición centrífuga (CPC). Las fracciones en el intervalo de índices de pureza entre 0.5 y menores a 2 ($0.5P_o \leq P_1 < 2P_o$) recuperan el 70% de pristimerina inicial con una pureza ponderada de 60.5 mg pristimerina/g de fracción, por lo cual es necesario su reagrupación y particionamiento en una relación fase acuosa-fase orgánica de 3:1 v/v para alcanzar el 98.7% de recuperación del compuesto y pureza de 121 mg/g (con la composición U, sistema Arizona). Sumando la masa de la fracción de pureza alta y la masa de la fase orgánica seca después de la evaporación de los solventes se tiene un 1g de muestra con pureza aproximada del 10%. Ensayando nuevamente al purificación con 2 lotes de 2.5 g de extracto de raíz se acumulan 3 g de material necesario para emplear el CPC y se purifican 364 mg de pristimerina a partir de los 7.5 g de extracto de la primera extracción.

En la cromatografía de partición centrífuga (CPC) se toma como referencia el trabajo de Gutiérrez, *et al* (2007) con escalamiento de las condiciones a un rotor con capacidad de 1L en lugar de 200 mL y uso de cualquiera de las 3 composiciones usadas en la separación líquido-líquido.

En tallo debido a las bajas purezas detectadas en el extracto y escasa recuperación con la columna de sephadex se opta por proponer la separación líquido-líquido con proporción de 15 volúmenes de fase acuosa por 1 volumen de fase orgánica y de esta forma conseguir purezas 32 veces mayores a partir de 13.24g de extracto de tallo con pureza inicial de 4 mg de pristimerina/g de extracto. Este proceso tendría que efectuarse 8 veces para sumar los 3 g necesarios para alimentar al CPC y ganar 396.2 mg de pristimerina. Como se observa la purificación en tallo se vuelve tediosa, requiere mayor cantidad de planta en comparación con la raíz, por lo cual es necesario buscar otras técnicas de purificación más eficaces.

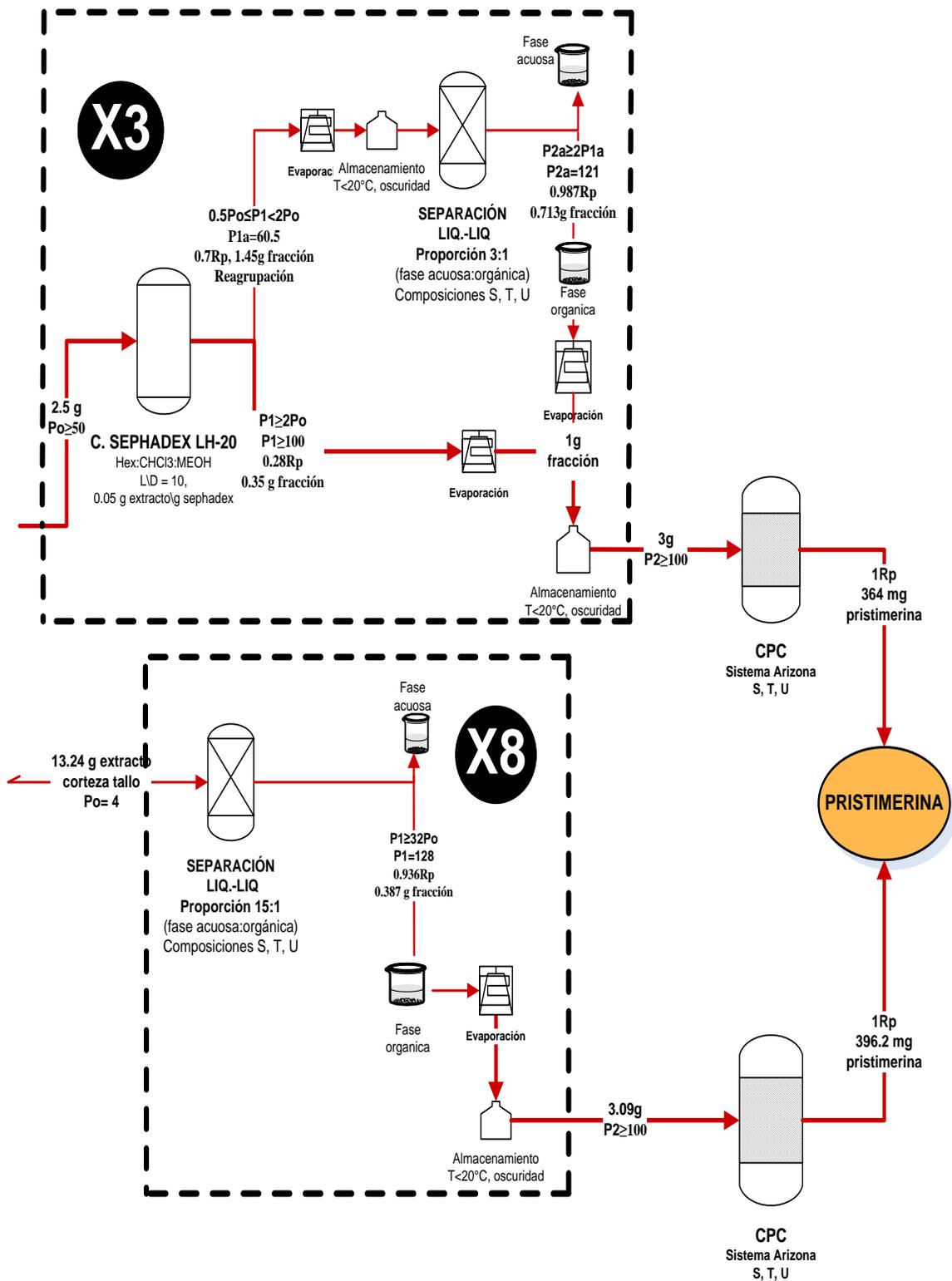


Figura 53B. Proceso de aislamiento propuesto para pristimerina a partir de *Mortonia greggii*.

V. CONCLUSIONES

A través de un método de análisis por HPLC-MS, HPLC-UV-Vis y microscopía óptica se identificó pristimerina en corteza de tallo y raíz en la planta *Mortonia greggii* y se descartó su presencia en hoja.

Se estimó la edad de la planta *Mortonia greggii* empleada para estos procesos de extracción y aislamiento de pristimerina con base en la observación de los anillos de crecimiento en tallo y se determinó tenía una edad de 9 años.

La evaluación del efecto de la fecha de colecta de dos diferentes meses (agosto y enero) en corteza de tallo y raíz en *Mortonia greggii* mostró que el mes de enero la cantidad de pristimerina en tallo fue 24.9% mayor a la existente en agosto y en raíz la cantidad en enero superó en 56.8% a la del mes de agosto a consecuencia del estrés ocasionado por las bajas temperaturas y escasez de agua de la temporada.

Se establecieron y optimizaron las condiciones de extracción de pristimerina para corteza de tallo y raíz en esta planta. En tallo se propuso emplear como sistema de solventes hexano:acetona 2:8 (v/v) hasta con tres extracciones sucesivas para lograr un rendimiento acumulado en extracción estática del 97.39 % sin perder la pureza del extracto. Se fijó una relación peso de tallo/volumen de solvente en 0.05 y la optimización en extracción dinámica para maximizar la pureza y el rendimiento de pristimerina en el extracto de tallo son un tiempo de extracción de 1h 5min 45.6 s, agitación a 103.0 rpm y temperatura a 29.7 °C. En raíz el sistema de solventes que mejor favorece el rendimiento y la pureza del extracto es etanol a una proporción de 0.05g de raíz/mL de solvente, se propone realizar hasta una segunda extracción estática para lograr un rendimiento acumulado de 85.74 % sin alterar la pureza significativamente. Las condiciones de optimización para la pureza y rendimiento en la extracción dinámica de pristimerina en el extracto de raíz son 30 minutos 200 rpm y 49.7 °C. De estas dos optimizaciones en extracto de corteza de tallo y raíz se proponen los respectivos modelos para predecir la pureza y rendimiento de pristimerina a determinadas condiciones.

La columna de sephadex para corteza de raíz generó fracciones con índices de pureza superiores a 2 y con recuperación del 28% de pristimerina en estas fracciones. Por la reproducibilidad lograda en esta columna de sephadex se sugiere iniciar la purificación de pristimerina a partir del extracto crudo de raíz. La velocidad de elución de la fase móvil es un factor importante para lograr la reproducibilidad de las columnas cromatográficas.

Se obtuvieron tres coeficientes de partición (2.49, 2.27, 3.00) para la pristimerina con las composiciones S, T y U del sistema Arizona y se logró incrementar al doble la pureza en las fracciones con esta separación líquido-líquido.

Con los resultados obtenidos se propuso un proceso de extracción y aislamiento de pristimerina. Este proceso propone una primera extracción dinámica para tallo y raíz después de la separación, decorticación y molido de estos órganos. Este extracto es fraccionado en raíz a través de una columna de sephadex y sus fracciones con índices de pureza entre 0.5 y 2 incrementan su pureza al doble después de una separación líquido-líquido y se termina de purificar por CPC. Se calculó recuperar 364 mg de pristimerina a partir de 60.5 g de corteza de tallo (1.7 Kg de raíz). En tallo se propuso realizar separación líquido-líquido con el extracto en la relación 15:1 (fase acuosa: fase orgánica) a partir del extracto de corteza de tallo para lograr una pureza 32 veces más alta y purificar por CPC 396.2 mg de pristimerina de 800 g de corteza de tallo (256 Kg de tallo).

VI. RECOMENDACIONES

Como continuación al presente trabajo de tesis se hacen las siguientes recomendaciones específicas:

- En la sección de extracción como trabajo complementario al desarrollado en los modelos de superficie de respuesta de la extracción de pristimerina en tallo y raíz se sugiere realizar un ensayo experimental por triplicado con las condiciones óptimas de los modelos de extracción y verificar la concordancia de los valores de las variables de respuesta (pureza y rendimiento) con respecto a los valores predichos por las ecuaciones correspondientes.
- Generar un modelo donde se contemple el efecto de la fecha de colecta sobre la pureza y rendimiento en el proceso de extracción de sólido-líquido de pristimerina. En el caso particular del cultivo vegetal viable para la producción de pristimerina, obtener también un modelo donde se contemple el efecto de uno o más estreses aplicados a los cultivos de la planta.
- En cuanto al aislamiento de pristimerina se sugiere repetir las columnas cromatográficas realizadas y estandarizar el método para lograr la reproducibilidad de las mismas.
- Realizar columnas cromatográficas utilizando otros soportes cromatográficos como la sílica enlazada modificada con grupos no polares.
- Continuar la purificación de pristimerina mediante cromatografía de partición centrífuga (CPC).

Otras sugerencias adicionales que se desean hacer con respecto a la temática de investigación son las siguientes:

- ✓ Se recomienda realizar el perfil fitoquímico y identificación y cuantificación de principales compuestos en la planta *Mortonia greggii*, con el objetivo de explicar el efecto de estos compuestos sobre el fenómeno de extracción realizado e indagar por la posible existencia de algunos otros metabolitos de interés farmacológico.

- ✓ Debido a la importancia y el costo que tiene la pristimerina actualmente como potencial medicamento anticáncer se sugiere llevar a cabo un bioensayo para evaluar la citotoxicidad y actividad anticancerígena del extracto de corteza de tallo y raíz de *Mortonia greggii*, como una alternativa terapéutica y económica.
- ✓ Como trabajo futuro se propone la caracterización biológica de *Mortonia greggii* desde los puntos de vista anatómico, fisiológico, ecológico y genético de la planta, con la finalidad de contar con mayor información para su explotación como posible biofábrica de pristimerina a largo plazo.

VII. REFERENCIAS

- Almarego, W. y Chai, C. (2009). *Purification of laboratory chemicals*. USA: Butterworth-Heinemann.
- Alvarenga, N., Velázquez, C. y Canela, N. (2001). Actividad biológica de compuestos aislados de la raíz de *Maytenus vitis-idaea* (Celastraceae). *Revista de Ciencia y Tecnología*, 1(3).
- Alvarenga, S. y Lombardi, J. (2010). Leaf anatomy as a contribution to the taxonomy of Salacioideae N. Hallé ex Thorne & Reveal (Celastraceae). *Plan Syst Evol.*, 289, 13-33.
- Amersham Biosciences (2002). Gel filtration. Principles and Methods. Reino Unido.
- Ankli, A., Heilmann, J., Heinrich, M. y Sticher, O. (2000). Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. *Phytochemistry*, 54, 531-537.
- Arciniégas, A., Ramirez, Ma., Pérez, A. y Romo, A. (2004). Anti-inflammatory constituents of *Mortonia greggii* Gray. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 59, 237-243
- Barwick, V (1997). Strategies for solvent selection – a literature review. *Trends in analytic chemistry*, 16(6), 293-309.
- Berthold, A., Hassoun, M. y Ruiz, M. (2005). Alkane effect in the Arizone liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal Bioanal Chem*, 383, 327-340.
- Bucic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M. y Velie, D. (2007). Study of solid.liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.

- Carvalho, P., Silva, D., Bolzani, V. y Furlan, M. (2005). Antioxidant quinonemethide triterpene from *Salacia campestris*. *Chemistry and Biodiversity*.2:367-372.
- Cayman Chemical (2011, 28 de septiembre). Pristimerin. Recuperado de <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/13621>
- De la Re, B. (2010). *Proceso de extracción y modificaciones químicas de ácido oleanólico de Phoradendron tomentosum y su uso para tratar cáncer*. (Tesis doctoral). Disponible en la base de datos Aprisa. (RC268.5.R4 2010).
- Dewick, P. (2009). *Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach*. Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Dirsch, V., Kiemer, A., Wagner, H. y Vollmar, A. (1997). The triterpenoid quinonemethide prisimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 336, 311-317.
- Everitt, J., Drawe, D. y Lonard, R. (2002). *Trees, shrubs & cacti of South Texas*. USA: Texas Tech University Press.
- Fundación Teletón (2012, 17 de abril). Estadísticas de cáncer en México y el mundo. Recuperado de <http://www.teleton.org.mx/programas/cancer/estadisticas-de-cancer-en-mexico/>.
- Gomes, J., Cardoso, C., Varanda, J., Fernández, M., Olea, N., Carlos, I. y Vilegas, W. (2010). Antitumoral, mutagenic and (anti)estrogenic activities of tingenone and pristimerin. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Phramacogn*, 21(6), 963-971.
- Gutiérrez, F., Estévez, A., Ravelo, A., Astudillo, L. y Zárate, R. (2007). Terpenoids from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *J. Nat. Prod.*, 70, 1049-1052.

- Haroldo, A., Siqueira, D., Morais, L., Silva, Vanderlan y Furlan, M. (2004). Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. *Phytochemistry*, 65, 1977-1982.
- Hickey, M. y King, C. (2007). One hundred of families of flowering plants. Reino Unido: Cambridge University Press.
- Ibartz, A. y Barbosa, G. (2005). Operaciones unitarias en la Ingeniería de Alimentos. España: Mundi-Prensa. Colección Tecnología de Alimentos.
- Integrated Taxonomic Information System (2012, 29 de febrero). *Mortonia greggii*. ITIS. Recuperado de <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> .
- Instituto Nacional del Cáncer (2011, 29 de diciembre).Cáncer. INC. Recuperado de <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2011, 4 de enero). Base de datos. Tomado de <http://www.inegi.org.mx/default.aspx?>.
- Khalid, S., Friedrichsen, G., Christensen, S., Tahir, A. y Satti, G. (2007). Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Arkivov*. Ix, 129-134.
- Kindt, T., Goldsby, R. y Osborne, B. (2007). *Inmunología de Kuby*. Corea: Mc Graw Hill.
- Lapornik, B., Prosek, M., Golc, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.

- Lehninger, A., Nelson, D. y Cox, M. (2008). *Lehninger, principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Linares, A., Hase, S., Vergara, M. y Resnik, S. (2010). Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: influence of temperature. *Journal of Food Engineering*, 97, 471-477.
- López, L. (2010). *Evaluación del índice quimiopreventivo de fitoquímicos aislados de plantas mexicanas en células de hepatoma murino*. (Tesis de maestría). ITESM, Monterrey, México.
- Lu, Y., Berthod, A., Hu, R., Ma, W. y Pan, Y. (2009). Screening of complex natural extracts by countercurrent chromatography using a parallel protocol. *Anal. Chem.*, 81(10), 4048-4059.
- Lu, Z., Jin, Y., Chen, C., Li, J., Cao, Q. y Pan, J. (2010). Pristimerin induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T3151 mutation by blocking NFκB signaling and depleting Bcr-Abl. *Molecular Cancer*, 9 (112),1-17.
- Luthria, D., Biswas, R. y Natarajan, S. (2007). Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*, 105, 325-333.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Venezuela: Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Markom, M., Hasan, M., Ramli, W., Singh, H. y Md, J. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52, 487-496.

- Martínez, M., Muñoz, M., Sánchez, C. y Rodríguez, L. (1988). Terpenoids from *Mortonia diffusa*. *Journal of Natural Products*. 51(4): 793-796.
- Martínez, M., Romo, A., Díaz, E., Jiménez, M. y Rodríguez, L. (1981). The sesquiterpenes constituents of *Mortonia hidalgensis*. *Phytochemistry*, 21(6), 1335-1338.
- McGarvey, D. y Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7, 1015-1026.
- Newman, D. y Cragg, G. (2010). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, A-Y.
- Nossack, A., Celeghini, R., Lancas, F. y Yariwake, J. (2004). HPLC-UV and LC-MS analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of “espinhereira santa” (*Maytenus aquifolium* Martius, *Celastraceae*) Leaves. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15(4), 582-586.
- Nuñez, M. (2004). *Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Maytenus chiapensis y Crossopetalum uragoga (Celastraceae)*. (Tesis doctoral). Ciencias y Tecnologías. Universidad de la Laguna, España.
- Organización Mundial de la Salud (2011, 26 de octubre). Cáncer. OMS. Recuperado de: (793<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>)
- Patnaik, P. (2007). *Dean's Analytical chemistry handbook*. USA: Mc Graw Hill.
- Quiang, D., Wang, H., Tian, X., Jun, H. y Kai, J. (2005). Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*. *Pest management Science*, 61, 85-90.
- Raven, P., Evert, R. y Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas*. Vol. 2. España: Reverté.

- Reyes, R., Jiménez, M., Cristóbal, E., Torres, L., Villavicencio, M., Pérez, B. y Mercado, R. (2003). Natural insecticides from *Hippocratea excelsa* and *Hippocratea celastroides*. *Economic Botany*, 57(1), 54-64.
- Richardson, A. (1995). Plants of the Rio Grande Delta. Hong Kong: University de Texas Press.
- Roberts, A., O'Brien, M. y Subak, G. (2003). Enciclopedia de la medicina ortomolecular. Nutriceúticos. España: Robin book.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. y Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.*, 295, 517-524.
- Rokita, S. (2009). Quinone methides. USA: Wiley.
- Rojo, M., Ríos, C., Padrón, J. y Palermo, J. (2010). Antiproliferative terpenoids and alkaloides from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. *Phytochemistry*, 71, 1741-1748.
- Salminen, A., Lahtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K. y Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65.
- Sarker, S., Latif, Z. y Gray, A. (2006). Natural products isolation. Methods in Biotechnology. USA: Humana Press.
- Schmidt S. y Launsby R. (1994). Understanding industrial designed experiments. USA: Air Academy Press.

School of Public Health, John Hopkins Blooming (2012, 19 de abril). Testing for Lack of fit. Statistic for Laboratory Scientist. Recuperado de <http://www.biostat.jhsph.edu/~iruczins/teaching/jf/ch6.pdf>.

Seigler, D. (2002). Plant secondary metabolism. USA: Kluwer Academic Publisher.

Servicio Meteorológico Nacional (2012, 4 de abril). Temperatura y precipitación, México, 2010. Recuperado de http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=77.

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia: Convenio Andrés Bello.

Sigma Aldrich (2011, 28 de septiembre). Pristimerin. Recuperado de http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=P0020|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.

Spivey, A., Weston, M. y Woodhead, S. (2002). Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, 31, 43-59.

Tiedemann, R., Schmindt, J., Keats, J., Shi, C., Zhuo, S., Palmer, S., Mao, X., Schimmer, A. y Stewart, A. (2009). Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF- κ B with antimyeloma activity in vitro and in vivo. *Blood journal*, 113(17), 4027-4037.

The Chapman And Hall Natural Products (2011, 10 de septiembre). Pristimerin. Recuperado de http://biblioteca.mty.itesm.mx/mty/bds/salta_bd.php?col_id=dofnp

Ulluari, P. (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido. Ecuador. ReCiTelA. Ecuador.

Universidad de Texas (2011, 15 de agosto). Texas Native Plant Database. Recuperado de <http://aggie-horticulture.tamu.edu/ornamentals/nativeshrubs/mortoniagreggii.htm>.

Wang, L. y Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*.17: 300-312.

Wu, C., Chan, M., Chen, W., Tsai, C., Chang, F. y Wu, Y. (2005). Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects in mitochondria. *Mol Cancer Ther.*, 4(8), 1277-1285.

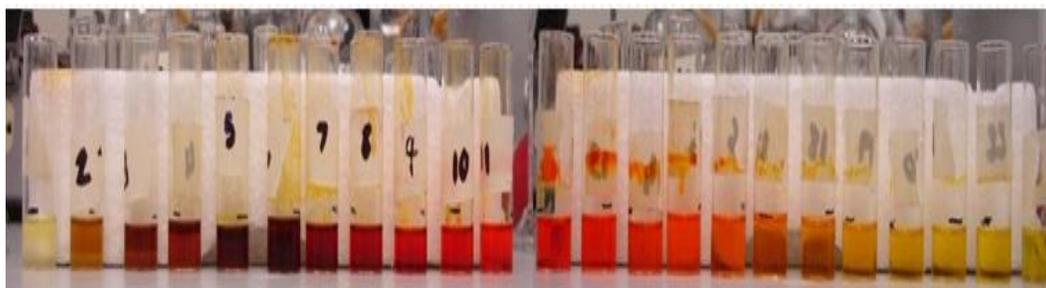
Yang, H., Landis, K., Lu, D., Yuan, P., Li, L., Prem, G., Yuan, X. y Duo, Q. (2008). Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 103, 234-244.

VIII. ANEXOS

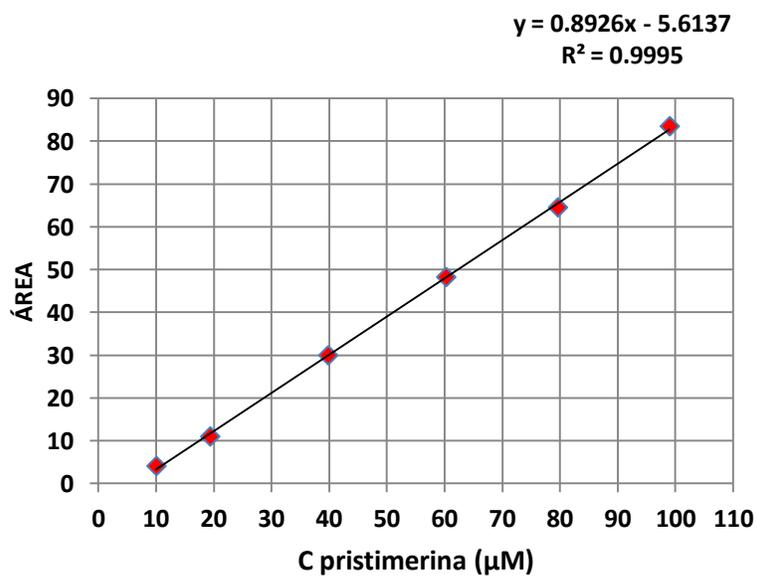
A. Planta *Mortonia greggii* en su hábitat



B. Fracciones (1-23) columna de sephadex corteza de raíz E (izquierda a derecha)



C. Curva de calibración de pristimerina



D. Análisis del efecto de la fecha de colecta sobre la cantidad de pristimerina (prueba de dos medias con varianzas desconocidas y diferentes)

Prueba T e IC de dos muestras: RENDTO(gPRIST/100gPLANTA)*100%, Temporada

T de dos muestras para RENDTO(gPRIST/100gPLANTA)*100%

		Media del		
		Error		
Temporada	N	Media	Desv.Est.	estándar
AGOSTO	3	10.193	0.768	0.44
ENERO	3	13.58	1.03	0.60

Diferencia = μ (AGOSTO) - μ (ENERO)

Estimado de la diferencia: -3.384

IC de 95% para la diferencia: (-5.750, -1.017)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -4.55 Valor P = 0.020 GL = 3

E. Análisis de varianza pureza prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para tallo

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for PUREZA (mg/g)

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3.99454	0.08486	47.072	0.000
Tiempo (h)	0.16163	0.05197	3.110	0.003
Agitación (rpm)	0.04455	0.05197	0.857	0.394
Temperatura (°C)	-0.02481	0.05197	-0.477	0.635
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0.44342	0.07649	-5.797	0.000
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	-0.87817	0.07649	-11.481	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0.41219	0.07649	-5.389	0.000

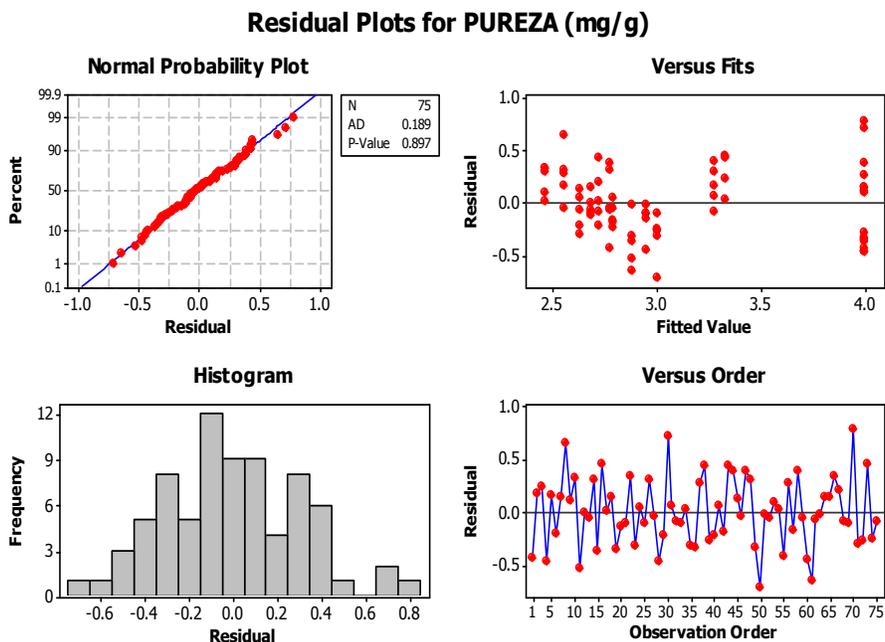
S = 0.328660 PRESS = 8.85386

R-Sq = 73.04% R-Sq(pred) = 67.50% R-Sq(adj) = 70.66%

Analysis of Variance for PUREZA (mg/g)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	19.8950	19.8950	3.3158	30.70	0.000
Linear	3	1.1490	1.1490	0.3830	3.55	0.19
Tiempo (h)	1	1.0450	1.0450	1.0450	9.67	0.003
Agitación (rpm)	1	0.0794	0.0794	0.0794	0.73	0.394
Temperatura (°C)	1	0.0246	0.0246	0.0246	0.23	0.635
Square	3	18.7461	18.7461	6.2487	57.85	0.000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	2.3031	3.6300	3.6300	33.61	0.000
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	1	13.3063	14.2371	14.2371	131.80	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	3.1367	3.1367	3.1367	29.04	0.000
Residual Error	68	7.3452	7.3452	0.1080		
Lack-of-Fit	6	2.7652	2.7652	0.4609	6.24	0.000
Pure Error	62	4.5800	4.5800	0.0739		
Total	74	27.2402				

F. Supuestos del análisis de varianza para pureza en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de tallo



G. Análisis de varianza rendimiento prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para tallo

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for RENDIMIENTO (mg/10g)

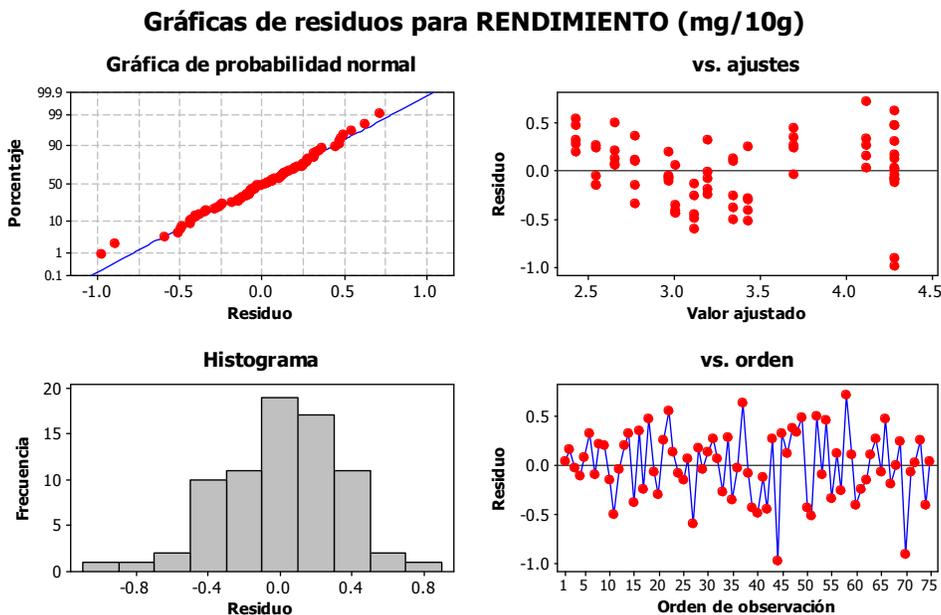
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	4.2840	0.09086	47.152	0.000
Tiempo (h)	0.3436	0.05564	6.176	0.000
Agitación (rpm)	0.1136	0.05564	2.041	0.045
Temperatura (°C)	0.2113	0.05564	3.798	0.000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	-0.3482	0.08190	-4.252	0.000
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	-1.0417	0.08190	-12.719	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-0.3681	0.08190	-4.494	0.000

S = 0.351886 PRESS = 10.1542
R-Sq = 77.94% R-Sq(pred) = 73.39% R-Sq(adj) = 75.99%

Analysis of Variance for RENDIMIENTO (mg/10g)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	29.7412	29.7412	4.9569	40.03	0.000
Linear	3	7.0252	7.0252	2.3417	18.91	0.000
Tiempo (h)	1	4.7230	4.7230	4.7230	38.14	0.000
Agitación (rpm)	1	0.5160	0.5160	0.5160	4.17	0.045
Temperatura (°C)	1	1.7862	1.7862	1.7862	14.43	0.000
Square	3	22.7159	22.7159	7.5720	61.15	0.000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	1.1436	2.2385	2.2385	18.08	0.000
Agitación (rpm)*Agitación (rpm)	1	19.0715	20.0328	20.0328	161.78	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	2.5008	2.5008	2.5008	20.20	0.000
Residual Error	68	8.4200	8.4200	0.1238		
Lack-of-Fit	6	3.3318	3.3318	0.5553	6.77	0.000
Pure Error	62	5.0882	5.0882	0.0821		
Total	74	38.1612				

H. Supuestos del análisis de rendimiento en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de tallo



I. Análisis de varianza pureza prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para raíz

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for PUREZA (mgPRIST/gEXTRACTO)

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	55.7219	0.9404	59.251	0.000
Tiempo (h)	-1.8141	0.6921	-2.621	0.011
Agitación (rpm)	-0.6132	0.6921	-0.886	0.379
Temperatura (°C)	0.6110	0.6921	0.883	0.381
Tiempo (h)*Tiempo (h)	9.5217	1.0158	9.374	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-4.9582	1.0158	-4.881	0.000
Tiempo (h)*Agitación (rpm)	-1.9579	0.9788	-2.000	0.050
Tiempo (h)*Temperatura (°C)	-3.4414	0.9788	-3.516	0.001
Agitación (rpm)*Temperatura (°C)	4.8614	0.9788	4.966	0.000

S = 4.37750 PRESS = 1568.84

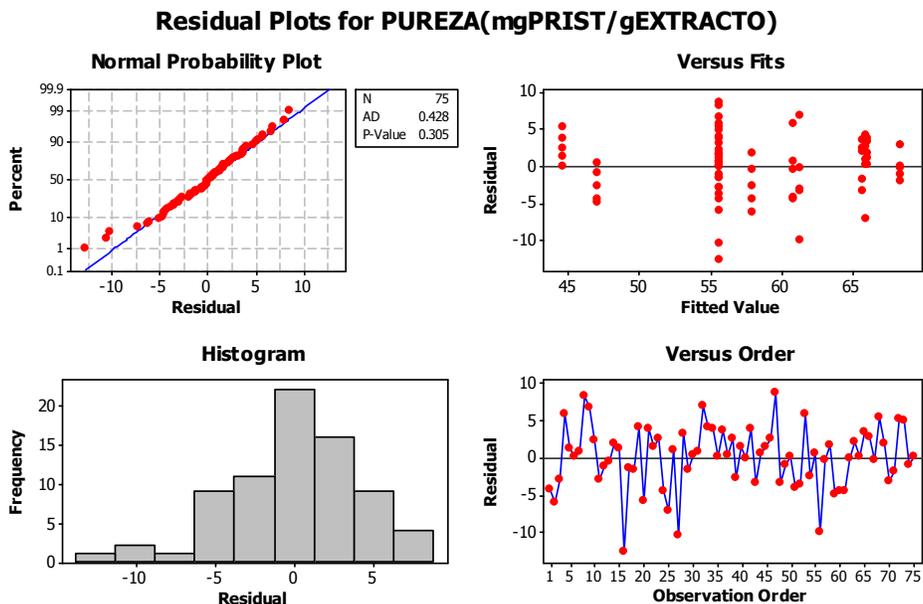
R-Sq = 71.83% R-Sq(pred) = 65.06% R-Sq(adj) = 68.42%

Analysis of Variance for PUREZA (mgPRIST/gEXTRACTO)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	8	3224.95	3224.95	403.12	21.04	0.000
Linear	3	161.61	161.61	53.87	2.81	0.046
Tiempo (h)	1	131.64	131.64	131.64	6.87	0.011
Agitación (rpm)	1	15.04	15.04	15.04	0.78	0.379
Temperatura (°C)	1	14.93	14.93	14.93	0.78	0.381
Square	2	2277.15	2277.15	1138.58	59.42	0.000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	1820.60	1683.73	1683.73	87.87	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	456.55	456.55	456.55	23.83	0.000
Interaction	3	786.19	786.19	262.06	13.68	0.000
Tiempo (h)*Agitación (rpm)	1	76.67	76.67	76.67	4.00	0.050

Tiempo (h)*Temperatura (°C)	1	236.87	236.87	236.87	12.36	0.001
Agitación (rpm)*Temperatura (°C)	1	472.66	472.66	472.66	24.67	0.000
Residual Error	66	1264.73	1264.73	19.16		
Lack-of-Fit	4	202.45	202.45	50.61	2.95	0.027
Pure Error	62	1062.28	1062.28	17.13		
Total	74	4489.68				

J. Supuestos del análisis de varianza para pureza en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de raíz



K. Análisis de varianza rendimiento prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura para raíz

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for RENDTO(mgPRIST/10gPLANTA)

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	74.3291	1.597	46.530	0.000
Tiempo (h)	5.8026	1.176	4.935	0.000
Agitación (rpm)	0.6540	1.176	0.556	0.580
Temperatura (°C)	8.0130	1.176	6.816	0.000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	7.4353	1.725	4.309	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	-10.4641	1.725	-6.065	0.000
Agitación (rpm)*Temperatura (°C)	12.6088	1.663	7.583	0.000

S = 7.43573 PRESS = 4409.65
R-Sq = 73.44% R-Sq(pred) = 68.85% R-Sq(adj) = 71.10%

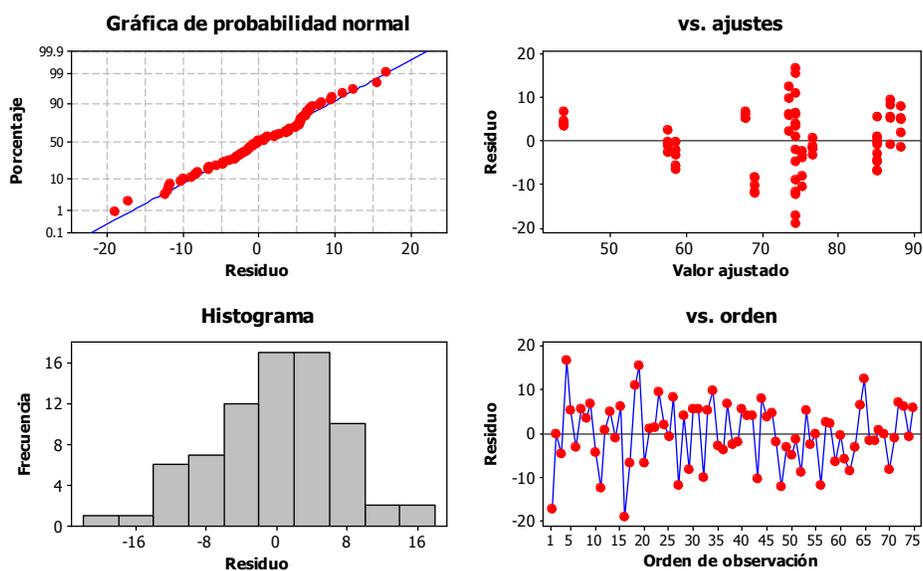
Analysis of Variance for RENDTO(mgPRIST/10gPLANTA)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	10395.3	10395.3	1732.54	31.34	0.000
Linear	3	3932.2	3932.2	1310.74	23.71	0.000

Tiempo (h)	1	1346.8	1346.8	1346.81	24.36	0.000
Agitación (rpm)	1	17.1	17.1	17.11	0.31	0.580
Temperatura (°C)	1	2568.3	2568.3	2568.30	46.45	0.000
Square	2	3283.4	3283.4	1641.69	29.69	0.000
Tiempo (h)*Tiempo (h)	1	1249.9	1026.7	1026.71	18.57	0.000
Temperatura (°C)*Temperatura (°C)	1	2033.5	2033.5	2033.51	36.78	0.000
Interaction	1	3179.7	3179.7	3179.66	57.51	0.000
Agitación (rpm)*Temperatura (°C)	1	3179.7	3179.7	3179.66	57.51	0.000
Residual Error	68	3759.7	3759.7	55.29		
Lack-of-Fit	6	1614.0	1614.0	269.00	7.77	0.000
Pure Error	62	2145.7	2145.7	34.61		
Total	74	14155.0				

L. Supuestos del análisis de varianza para rendimiento en prueba de tiempo de extracción, agitación y temperatura de raíz

Gráficas de residuos para RENDTO(mgPRIST/10gPLANTA)



M. ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN PRUEBA DE TIEMPO, TEMPERATURA Y AGITACIÓN

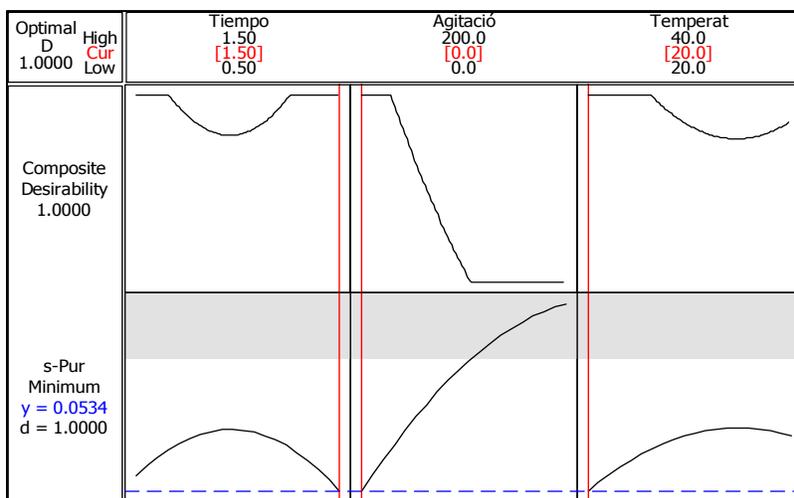
Para este análisis con los datos obtenidos para la pureza o rendimiento de pristimerina en la prueba 4, se calculó la desviación estándar por punto de diseño y se obtuvo su logaritmo natural, con estos datos se llevó a cabo el análisis de variación.

➤ TALLO

Modelo de variación para pureza de pristimerina:

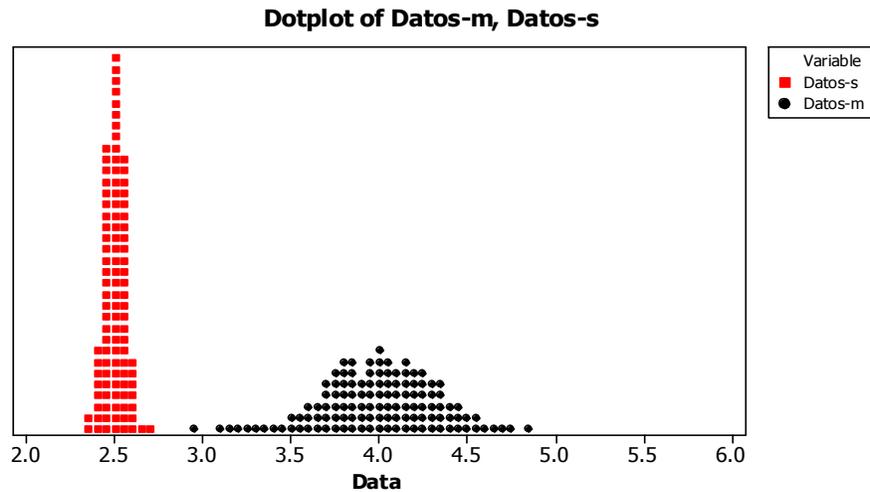
$$SP_{Pr} = -0.416703 + 0.455954t + 0.00248743A + 0.0223479T - 0.236496t^2 - 3.52933x10^{-6}A^2 - 3.21692x10^{-4}T^2 - 3.74760x10^{-5}AT$$

Para el rendimiento no se obtuvo modelo de variación dado a que ninguno de los factores afecta, Por tanto las condiciones óptimas de variación con respecto a la pureza son las indicadas por el optimizador. El valor de la pureza en este punto es 2.4027 mg/g extracto y de rendimiento es de 2.5448 (g pristimerina/100g planta)*100%.



Considerando las condiciones para máxima pureza y rendimiento generadas en el análisis de medias (1h 5min 45.6 s, agitación a 103.0 rpm y temperatura a 29.7 °C), $P_{Pr} = 4.0101$ mg/g extracto y $Rdt_{Pr} = 4.3329$ (mg/10g planta), la variación (S) con estos puntos sería $S_{PPr} = 0.2825$.

Como objetivos se tiene la maximización de la pureza y el rendimiento y la minimización de la variación, en este caso de la pureza que es la que se ve afectada. Se simulan dos poblaciones normales con 1000 a partir del óptimo de variación y el óptimo para medias.



Conclusión: En la distribución en rojo que representa las condiciones de variación se observa menor dispersión de los datos sin embargo la media de las variables de respuesta es bastante baja, mientras que en la distribución que representa las condiciones óptimas de la media, la media es más alta aunque haya mayor dispersión. Por tanto las condiciones óptimas sacrificando un poco la variación son: **1h 5min 45.6 s, agitación a 103.0 rpm y temperatura a 29.7 °C.**

➤ RAÍZ

Modelo de variación para pureza de pristimerina:

$$SP_{Pr} = 0.860454 + 0.602658t + 0.0134803T - 0.0114105Tt$$

Modelo de variación para rendimiento de pristimerina:

$$SRdt_{Pr} = 4.54597 + 1.00390t - 0.0800031A - 0.0356250T + 0.00229982TA$$

De donde:

SP_{Pr} = Desviación estándar para pureza de pristimerina

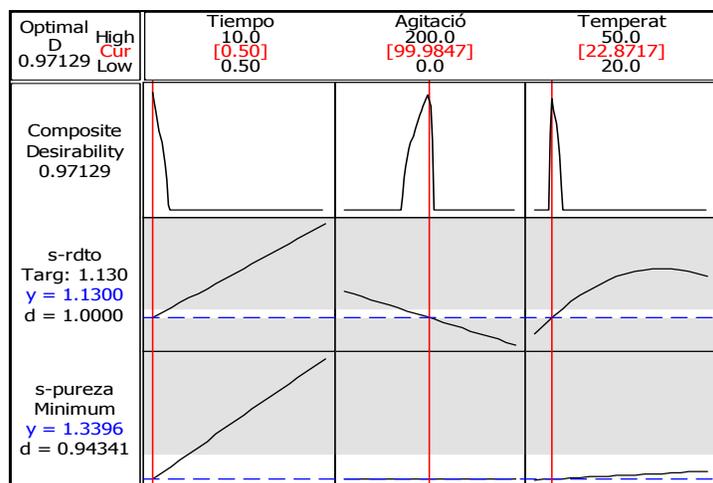
$SRdt_{Pr}$ = Desviación estándar para rendimiento de pristimerina

t = Tiempo (h)

A = Agitación (rpm)

T = Temperatura (°C)

Condiciones óptimas para reducir la variación en raíz



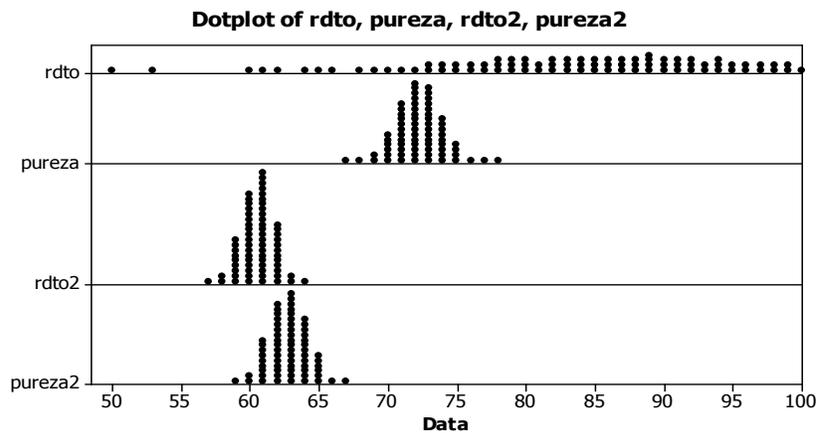
En estas condiciones óptimas para minimizar variación, los valores de las variables de respuesta son: P_{Pr} 60.6454 mg/g extracto y Rdt_{Pr} = 62.8365 (mg/10g planta).

Optimización conjunta medias y variación para la pureza y rendimiento en corteza de tallo

Recordando las condiciones óptimas en conjunto para la media de pureza y rendimiento de corteza de tallo: 30 minutos 200 rpm y 49.7 °C, P_{Pr} = 72.3762 mg/g extracto y Rdt_{Pr} = 86.7755 (mg/10g planta), la variación (S) con estos puntos sería S_{PPr} = 1.5505 S_{Rdt} = 8.8563.

Como objetivos deben de tenerse la maximización de la pureza y el rendimiento y la minimización de sus correspondientes variaciones. Por tanto, se simulan las siguientes distribuciones normales con 1000 datos:

- a) Medias de rendimiento 86.7 y de pureza 72.4 con respectivas desviaciones estándar 8.85 y 1.55
- b) Medias de rendimiento 60.6 y de pureza 62.8 con respectivas desviaciones estándar 1.13 y 1.34



Each symbol represents up to 16 observations.

Conclusión: Las mejores condiciones de extracción de los factores son aquellas para la distribución a, porque el rendimiento generado aunque posea gran variación es el mayor y del mismo modo favorece la pureza con respecto al inciso b. Por tanto las condiciones de extracción adecuadas para ambas variables de respuesta teniendo un poco de variación en el rendimiento son: 30 minutos 200 rpm y 49.7 °C.