

# Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit

**Anselmo Enrique Ferrer Hernández,\* Margarita Hernández Escalona,\* Carlos Serafín Pérez Martínez,\*\* Mario Basterrechea Rey,\*\*\* Víctor Ramón Fuentes Fiallo\*\*\*\* y Mabel Torres Ferrer.\*\*\*\*\***

Departamento de Bioorgánica, Universidade do Rondonia, Brasil. \*Departamento de Macromoléculas, Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Cuba. \*\*Departamento de Química Física, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Cuba. \*\*\*Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Cuba. \*\*\*\*Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Ministerio de la Agricultura de Cuba. \*\*\*\*\*Farmácia Manipulação Valfarma, Porto Velho - RO, Brasil.

Recibido: 20 de diciembre de 2005. Aceptado: 21 de febrero de 2007.

Palabras clave: ácido ursólico, *Cestrum laurifolium*, proceso de extracción.  
Key words: ursolic acid, *Cestrum laurifolium*, extraction process.

**RESUMEN.** El ácido ursólico ha mostrado una variada actividad biológica, se ha comprobado su potencial como anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano y antiviral, además, ha sido empleado como agente emulsionante en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimentos, todo lo cual hace a esta sustancia muy interesante. Este ácido ha sido aislado de dos especies del género *Cestrum*, el cual aparece en Cuba representado por 15 especies de las cuales siete son endémicas y por lo tanto, es una amplia fuente por estudiar con el objetivo de determinar la presencia o no del ácido ursólico en ella. Se realizó el estudio de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit, especie que se encuentra en diferentes regiones de Cuba. El material vegetal seco y pulverizado fue sometido a un proceso de extracción con etanol. El extracto alcohólico obtenido se concentró a presión reducida, se diluyó con agua y posteriormente se extrajo con una mezcla benceno - éter [1 : 1 (v/v)]. La fase bencénica se concentró y el crudo obtenido fue fraccionado por cromatografía de columna empleando óxido de aluminio, se usó como fase móvil una mezcla de cloroformo - acetato de etilo [80 : 20 (v/v)] y a partir de las fracciones de la 55 a la 84 se aisló un producto que al ser recristalizado en cloroformo rindió un sólido blanco con temperatura de fusión de 284 a 285° C y rendimiento de 1,55 %. Para la confirmación estructural de este compuesto se sintetizó un derivado y ambos se caracterizaron mediante las técnicas espectroscópicas [Infrarrojo, Masas, Resonancia Magnética Nuclear de carbono]. La sustancia aislada se identificó como ácido ursólico.

**ABSTRACT.** Ursolic acid has shown a wide biological activity, its potential as anticarcinogenic, anti-inflammatory, anti-microbial and antiviral has been proven, also, it has been used as emulsifying agent in pharmaceuticals, cosmetics and foods preparations all of that makes to this substance very interesting. This acid has been isolated from two species of the *Cestrum* genus, which appears in Cuba represented by 15 species of which seven are endemics and therefore it is a wide source to study with the objective of determining the presence or not of ursolic acid. The study of *Cestrum laurifolium* L'Herit leaves was carried out, species that is in different regions of Cuba. The dry and powdered vegetable material was submitted to an extraction process with ethanol. The obtained alcoholic extract was concentrated at reduced pressure, then it was diluted with water and later on it was extracted with benzene-ether [1 : 1 (v/v)].

The benzene phase was concentrated and the obtained crude was fractioned by chromatographic column using neutral aluminium oxide, as mobile phase a mixture of chloroform-ethyl acetate [80 : 20 (v/v)] was used and starting from the fractions for 55 to 84 a product was isolated. It was crystallized from chloroform achieving a white solid with a melting temperature of 284 to 285° C and 1.55 % of yield. For the structural confirmation of this compound a derivative was synthesized and the compounds were characterized by means of the spectroscopic techniques (infrared, Mass, nuclear magnetic resonance of carbon). The isolated substance was identified as ursolic acid.

## INTRODUCCIÓN

El ácido ursólico también conocido como urson, prunol, micromerol y malol [ácido (3β)-3-hidroxi-urs-12-en-28-oico] es una sapogenina triterpénica pentacíclica que puede aparecer en forma de aglicona o de ácido libre (Fig. 1).

Durante mucho tiempo se consideró que el ácido ursólico y sus sales de sodio y potasio eran inactivos desde el punto de vista farmacológico y solamente se empleaban como

### \*Correspondencia:

Dr. Anselmo Enrique Ferrer Hernández  
Departamento de Bioorgánica, Universidade do Rondonia, Brasil.  
Correo electrónico: [ansenrique@yahoo.es](mailto:ansenrique@yahoo.es)

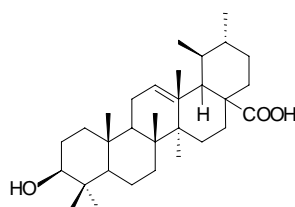


Fig. 1. Estructura del ácido ursólico.

agentes emulsionantes en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimentos,<sup>1-4</sup> sin embargo, estudios científicos han demostrado que esta sustancia posee actividad anticarcinogénica (cáncer de piel fundamentalmente),<sup>5-7</sup> antiinflamatoria,<sup>8-10</sup> antimicrobiana,<sup>11-12</sup> antiviral,<sup>13</sup> hepatoprotectora, antiulcerativa y puede ser usada tanto sistémicamente<sup>11</sup> como en aplicaciones tópicas.<sup>14,15</sup> Otros estudios han demostrado que el ácido ursólico posee una potente actividad inhibidora de la degradación enzimática de la acetilcolina,<sup>16</sup> además de muy baja toxicidad aguda y crónica, lo que lo hace muy interesante, por otra parte, su isómero, conocido como ácido oleanólico [ácido (3 $\beta$ )-3-hidroxi-olean-12-en-28-oico] posee igual actividad farmacológica. Recientemente, se comprobó la actividad cardiotónica y antiarrítmica de ambos isómeros.<sup>17</sup>

El ácido ursólico ha sido aislado de numerosas especies con diversos orígenes filogenéticos formando parte fundamentalmente de la cera que recubre frutos y hojas,<sup>1,2</sup> entre las familias en las que ha sido reportada su presencia está la familia Solanaceae,<sup>18</sup> de ella han sido estudiadas dos especies del género *Cestrum*: el *Cestrum parqui* LHerit<sup>19</sup> y el *Cestrum diurnum* L.<sup>20</sup> Este género se encuentra en Cuba representado por 15 especies de las cuales siete son endémicas<sup>21</sup> por lo que constituye una amplia fuente por estudiar.

Por todo lo anteriormente expuesto, se decidió investigar la presencia o no del ácido ursólico en las hojas del *Cestrum laurifolium* LHerit, conocida como galán de día de sabana y que se encuentra en bosques y arroyos de la región oriental de Cuba y las provincias de Villa Clara y Pinar del Río.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las hojas del *Cestrum laurifolium* LHerit fueron colectadas en la Estación Experimental de Plantas Medicinales de Topes de Collante en la provincia de Sancti Spiritus en la región central de Cuba. (Número de Herbario de la Estación Experimental de Plantas Medicinales "Juan Tomás Roig": 4 199).

En el proceso de extracción y separación se usaron etanol comercial (re-distilado), benceno ( $\geq 99,5$  %, Merck), éter etílico ( $\geq 99,5$  %, Merck), cloroformo ( $\geq 99$  %, Merck), acetato de etilo ( $\geq 99,5$  %, Merck), sulfato de sodio anhidro ( $\geq 99$  %, Merck) y óxido de aluminio neutro, Act. II (p. cromatografía, Merck), los reactivos en la obtención del derivado fueron metanol seco ( $\geq 99,5$  %, Merck), diazometano (98 %, BDH), ácido acético (99,8 %, BDH) y n-hexano ( $\geq 99$  %, Merck). En la caracterización espectroscópica se empleó bromuro de potasio (Spectrosol, BDH), deuterio-cloroformo (Spectrosol, BDH) y TMS (Uvasol, Merck) mientras que el seguimiento por cromatografía de capa delgada se usó gel de sílice 60F<sub>254</sub> (BDH), vainillina ( $\geq 99$  %, Merck) y ácido perclórico (60 %, Merck).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Proceso de extracción del ácido ursólico

Las hojas recolectadas de *Cestrum laurifolium* se trocearon y se sometieron a proceso de secado, primero a temperatura ambiente en lugar fresco y aireado de 48 a 72 h y posteriormente en estufa con temperatura entre 40 y 50 °C por 48 h, el material vegetal seco se molió hasta polvo fino (80 mallas) en un molino refrigerado con agua, con lo que se obtuvo un rendimiento final de 250 g. A continuación, se empleó el método descrito por Wall y col.<sup>22</sup> el polvo se maceró en etanol 95 % por 24 h y luego, se extrajo por reflujo con etanol al 95 % durante seis horas. Este proceso se repitió cuatro veces. Los extractos alcohólicos se unieron y concentraron a presión reducida hasta aproximadamente un litro. A la disolución anterior se le añadió igual cantidad de agua y se sometió a proceso de extracción con una mezcla de benceno-éter etílico [1 : 1 (v/v)].

El extracto bencénico obtenido se lavó varias veces con agua y se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, luego se concentró a presión reducida hasta sirope. El crudo se purificó por cromatografía de columna que se preparó por vía húmeda, empleando óxido de aluminio neutro de actividad II como fase estacionaria y como fase móvil, una mezcla de cloroformo-acetato de etilo en concentraciones variables, con lo que se logró el aislamiento de un compuesto que se caracterizó a través de la determinación del punto de fusión, cromatografía de capa delgada, técnicas espectroscópicas y la preparación de un derivado.

## Síntesis de un derivado por esterificación

Se disolvieron 500 mg del compuesto anteriormente aislado, purificado en 50 mL de metanol seco. La disolución se colocó en un baño con hielo y se le añadió lentamente diazometano, hasta que cesó el desprendimiento de nitrógeno. Posteriormente se le agregaron unas gotas de ácido acético. El producto se concentró y recristalizó de una mezcla de acetato de etilo - n-hexano. El derivado se caracterizó a través de la determinación del punto de fusión, cromatografía de capa delgada y técnicas espectroscópicas.

## Caracterización físico química

Las temperaturas de fusión del compuesto aislado y su derivado sintetizado se determinaron en un equipo FRANK Kunster (RDA) y fueron corregidas. Los espectros IR fueron registrados en pastillas de KBr, empleando un equipo Carl Zeiss Specord 75 IR. Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro JEOL-JMS-DX-300 con ionización electrónica a 70 eV y los espectros RMN <sup>13</sup>C fueron registrados en un espectrógrafo JEOL-FX 90 Q, a 22,5 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente y TMS como estándar interno. La determinación del número de hidrógenos unidos a cada carbono se determinó mediante la técnica INEPT.

El seguimiento de la separación por cromatografía de columna y del proceso de síntesis del derivado fue realizado por cromatografía de placa delgada empleando gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (espesor: 0,25 mm). Como fase móvil se usó una mezcla de cloroformo - acetato de etilo [50 : 50 (v/v)]. Las placas se revelaron asperjándolas con el reactivo de vainillina 2 % en ácido perclórico 50 % y luego, calentándolas a 120 °C en una estufa por 3 ó 5 min .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Proceso de extracción

El proceso de extracción de las hojas se complicó por la gran cantidad de pigmentos que fueron removidos del material vegetal con el uso de un disolvente como el etanol, por lo que el proceso de separación y purificación fue difícil. Bakker y col.<sup>23</sup> realizaron un estudio para evaluar la eficiencia de diferentes disolventes en la extracción de ácidos triterpénicos a partir de *Plantago major*, ellos no recomiendan la extracción de estas sustancias de la parte foliar de las plantas con

metanol, precisamente por la gran cantidad de clorofila que es extraída con este disolvente y sí, el uso de cloroformo, diclorometano, tolueno y una mezcla cloroformo-metanol [2:1 (v/v)]. Baricevic y col.<sup>15</sup> también utilizaron cloroformo como disolvente de extracción, sin embargo, otros han usado con este objetivo tanto el metanol<sup>6,24,25</sup> como el etanol.<sup>26,27</sup>

Al eluir la columna cromatográfica con cloroformo - acetato de etilo [80 : 20 (v/v)] y a partir de las fracciones 55 a la 84 fue aislado un compuesto que fue recrystalizado de cloroformo y que rindió un sólido blanco con rendimiento de 1,55 % y temperatura de fusión de 284 a 285 °C. En cromatografía de capa delgada empleando como fase móvil una mezcla de cloroformo-acetato de etilo [50 : 50 (v/v)] el compuesto aislado mostró un Rf = 0,20.

Para su identificación se emplearon las técnicas espectroscópicas de

IR, Masas (Figuras 2 y 3), las principales señales de los espectros obtenidos se reportan a continuación.

En IR fueron detectadas las señales correspondientes a la vibración del grupo hidroxilo ( $\nu_{OH}$ ) en  $3450\text{ cm}^{-1}$ , la del grupo carbonilo del ácido carboxílico ( $\nu_{C=O}$ ) en  $1695\text{ cm}^{-1}$  y la característica del grupo C-O del hidroxilo ( $\nu_{C-O}$ ) en  $1020\text{ cm}^{-1}$ . El espectro de masas mostró un pico intenso correspondiente al ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  de 456 D, el cual correspondió a la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ . El pico base correspondió a la  $m/z$  de 248 D, que es típico para  $\alpha$  y  $\beta$ -triterpenos, otros fragmentos detectados fueron los de  $m/z$  438, 423, 410, 300, 203, 189, 133, 119, 105, 81, 69, 55 y 41. Todos estos datos espectroscópicos y la temperatura de fusión del compuesto coincidieron perfectamente con los reportados por diferentes autores para el ácido ursólico.<sup>24</sup>

### Síntesis de derivado por esterificación

La esterificación es el método más recurrido para la obtención de derivados con el objetivo de confirmar la presencia de sustancias carboxílicas y esta ha sido empleada por varios autores.<sup>23,29</sup> para comprobar la presencia de ácido ursólico que es el compuesto que se sospechó haber aislado. Se emprendió entonces la síntesis del ursolato de metilo (Fig. 4) que adicionalmente presenta una solubilidad apropiada para el registro del espectro de RMN-<sup>13</sup>C.

Este método también ha sido utilizado para facilitar la separación de los ácidos triterpénicos oleanólico y ursólico durante el proceso de extracción.<sup>25,30</sup> David y col.<sup>25</sup> realizaron la metilación directa de las fracciones que contenían ambos triterpenos con diazometano generado *in situ*. Los derivados así obtenidos fueron posteriormente separados y purificados por cromatografía de columna.

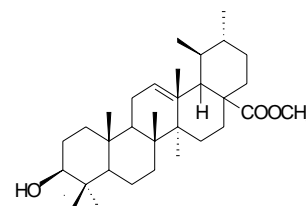


Fig. 4. Estructura del ursolato de metilo.

En el caso bajo estudio, al proceder con la esterificación del producto aislado, se obtuvo como derivado un sólido con temperatura de fusión de 112 a 114 °C. Este compuesto en cromatografía de capa delgada, empleando gel de sílice 60 F<sub>254</sub> y fase

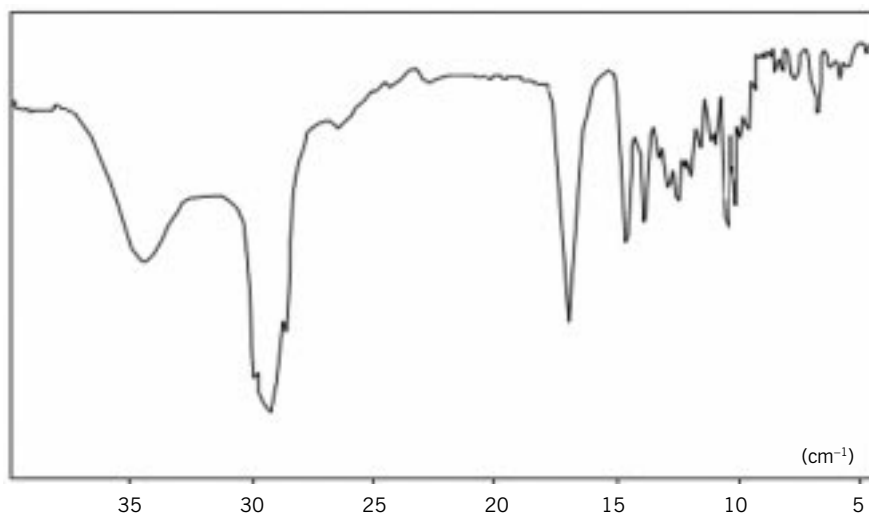


Fig. 2. Espectro IR del ácido ursólico.

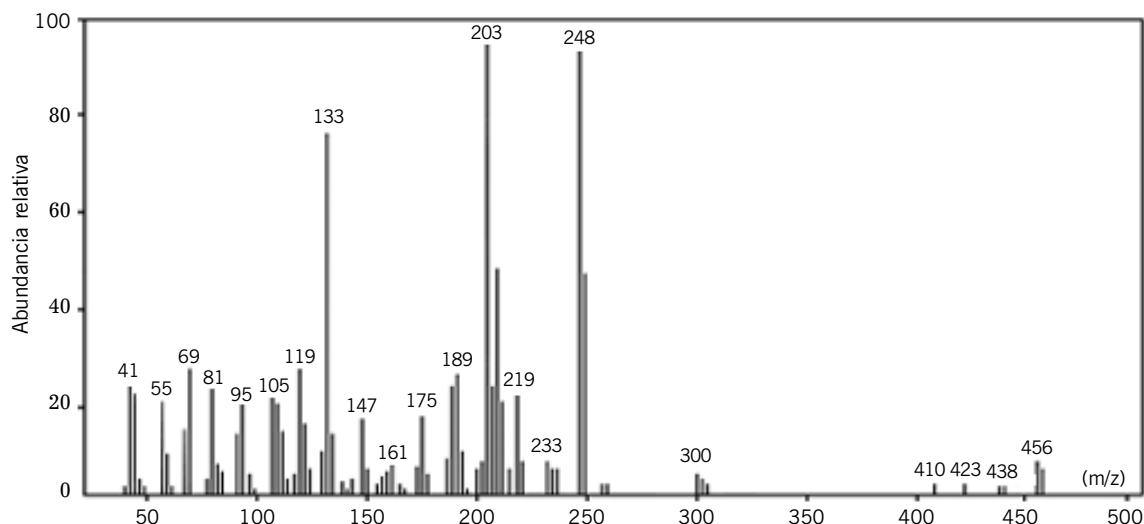


Fig. 3. Espectro de masas del ácido ursólico.

móvil cloroformo - metanol [95 : 5 (v/v)] mostró un Rf = 0,67.

El compuesto obtenido fue caracterizado empleando las técnicas

espectroscópicas de IR, Masas, RMN <sup>13</sup>C (Figuras 5 a 7). Las principales señales de los espectros obtenidos se reportan a continuación.

En IR fueron detectadas las señales correspondientes a la vibración del grupo hidroxilo ( $\nu_{OH}$ ) entre 3 450 y 3 300  $cm^{-1}$ , la característica del carboxilato ( $\nu_{C=O}$ ) en 1 700  $cm^{-1}$ , la del grupo C-O del hidroxilo secundario ( $\nu_{C-O}$ ) en 1 010  $cm^{-1}$  y una nueva señal en 1 200  $cm^{-1}$  correspondiente al grupo éster ( $\nu_{COO}$ ). En el espectro de masas se encontró un pico intenso correspondiente al ión molecular ( $M^+$ ) a una m/z de 470 D, el cual correspondió a la fórmula molecular  $C_{31}H_{50}O_3$  y que confirmó la introducción del grupo metilo. Las demás señales mostraron una gran similitud con las obtenidas y anteriormente reportadas para el compuesto aislado. Los desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C del ursolato de metilo fueron  $C_1$  33,0;

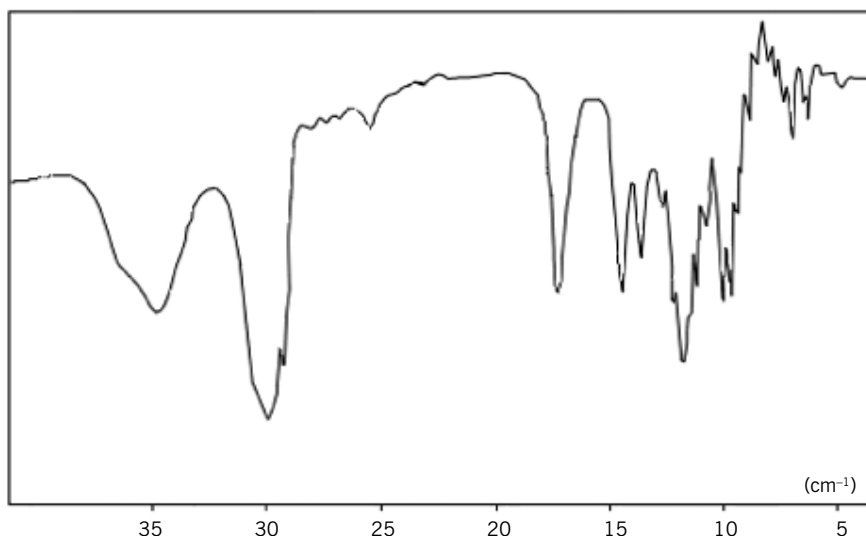


Fig. 5. Espectro IR del ursolato de metilo.

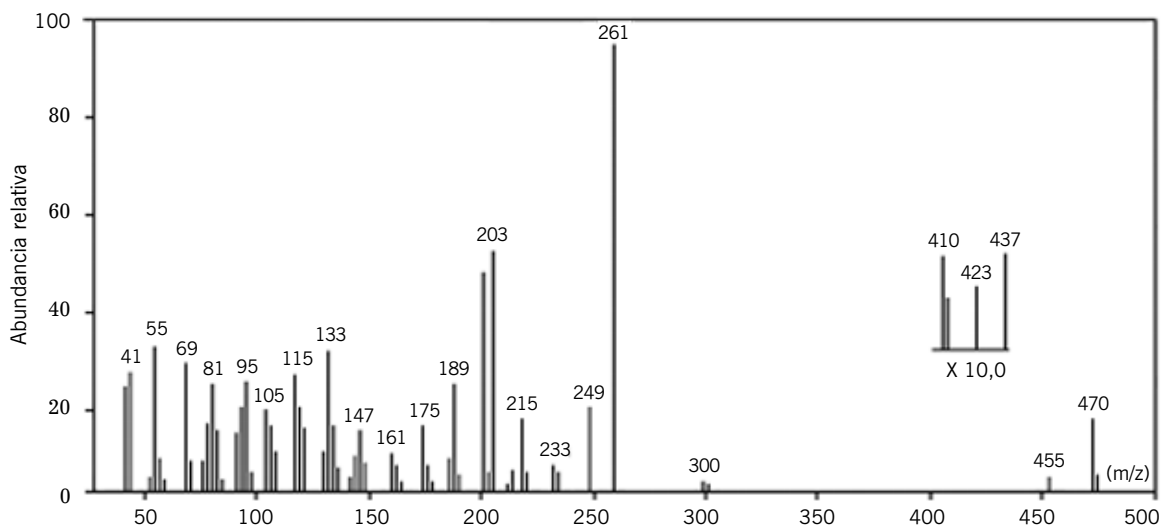


Fig. 6. Espectro de masas del ursolato de metilo.

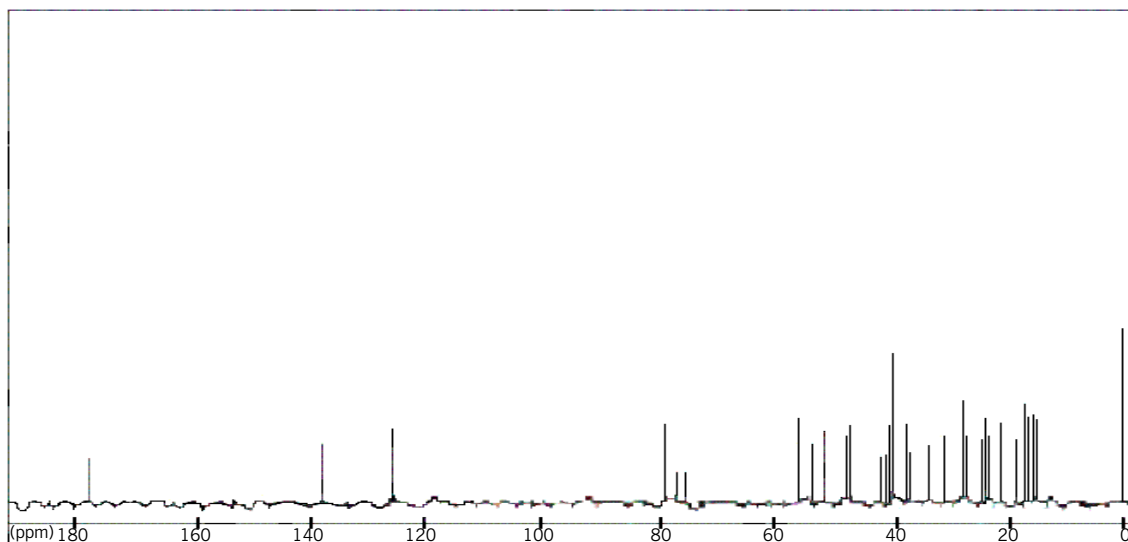


Fig. 7. Espectro RMN <sup>13</sup>C del ursolato de metilo.

C<sub>2</sub> 27,3; C<sub>3</sub> 78,8; C<sub>4</sub> 38,8; C<sub>5</sub> 55,1; C<sub>6</sub> 18,4; C<sub>7</sub> 37,2; C<sub>8</sub> 39,5; C<sub>9</sub> 47,5; C<sub>10</sub> 37,0; C<sub>11</sub> 23,4; C<sub>12</sub> 125,3; C<sub>13</sub> 138,0; C<sub>14</sub> 42,0; C<sub>15</sub> 28,1; C<sub>16</sub> 24,3; C<sub>17</sub> 48,2; C<sub>18</sub> 52,8; C<sub>19</sub> 39,1; C<sub>20</sub> 38,8; C<sub>21</sub> 30,7; C<sub>22</sub> 36,7; C<sub>23</sub> 28,3; C<sub>24</sub> 15,6; C<sub>25</sub> 15,7; C<sub>26</sub> 16,9; C<sub>27</sub> 23,7; C<sub>28</sub> 177,7; C<sub>29</sub> 16,9; C<sub>30</sub> 21,3 y O-CH<sub>3</sub> 51,3. Con estos datos registrados de RMN <sup>13</sup>C además de poder confirmar las señales de correspondientes a los C-29 y C-30 se pudo observar la presencia de una nueva señal, en este caso, correspondiente al carbono del grupo metilo introducido por esterificación. Al comparar los datos espectroscópicos y la temperatura de fusión del compuesto con los reportados para el ursolato de metilo<sup>25,28,30</sup> se pudo comprobar que todos eran consistentes con estos.

Después de analizar toda la información obtenida se pudo concluir que el compuesto aislado del extracto de las hojas de la especie *Cestrum laurifolium* L'Herit era el ácido ursólico. Por otra parte, al comparar el rendimiento obtenido con los reportados para otras especies tales como *Coffea arabica* (0,05 % en hojas),<sup>29</sup> *Salvia officinalis* (2,1 % en hojas y 1 % en ramas),<sup>27</sup> *Ocimum sanctum* (2,0 a 2,5 %), *Salvia tribola* y *Rosmarinus officinalis* (1 % en hojas y planta completa,<sup>31</sup> se pudo afirmar que se encuentra en cantidades aceptables para el uso de esta especie como fuente de ácido ursólico.

## CONCLUSIONES

Se logró aislar de las hojas del *Cestrum laurifolium* L'Herit una saponina triterpénica pentacíclica, la cual fue identificada mediante el uso de las técnicas espectroscópicas de IR, Masas y RMN <sup>13</sup>C y la determinación de los R<sub>f</sub> y temperaturas de fusión como ácido ursólico. Para confirmar este resultado también se obtuvo un derivado del compuesto por esterificación, el cual se caracterizó usando las técnicas señaladas anteriormente y se identificó como ursolato de metilo.

El rendimiento obtenido mediante el proceso de extracción empleado es aceptable para considerar el uso de esta especie como fuente de ácido ursólico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Muhammed M. and Nujoma Y. Ursolic acid, its importance in skin & hair beautification and protection. <http://www.ursolicacid.com/>, 1999. (Consultado: 13 de enero de 2007.)
- Leung A. Y. and Foster S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics. 2nd Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 57, 1996.
- Granger S. and Scott I. Skin care compositions containing a polycyclic triterpene carboxylic acid and a retinoid. Unites States Patent No. 5 723 139, 1998.
- Katsuo M., Hiroki T., Norio F., Yasutomo N. and Yukiko Y. Photo-aging inhibitor and dermal agent for external use. Japanese Patent No. 09143050, 1997.
- Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S. and Aggarwal B.B. Ursolic acid inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation. **Cancer Research**, **63**, 4375, 2003.
- Huang M.T., Ho C.T., Wuang Z.Y., Ferraro T., Luo Y.R., Stauber K., Ma W., Georgiadis C., Laskin J.D. and Conney A.H. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Research**, **54**, 701, 1994.
- Subbaramaiah K., Michaluart P., Sporn M.B. and Dannenberg A.J. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. **Cancer Research**, **60**, 2399, 2000.
- Reico M.C., Giner R., Terencio M., Sanz M. and Rios J. Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*. **Planta Medica**, **57**, A56, 1991.
- Reingbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P. and Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. **J. Nat. Prod.**, **61**, 1212, 1998.
- Safayhi H., Rall B., Sailer E. and Ammon H. Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. **J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **281**, 460, 1997.
- Liu J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **J. of Ethnopharmacology**, **49**, 57, 1995.
- Kowalewski Z., Kortus M., Edzia W. and Koniar H. Antibiotic action of beta-ursolic acid. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, **24**, 115, 1976.
- De Tommasi N., De Simone F., and Pizza C. Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties. **J. Nat. Prod.**, **55**, 1067, 1992.
- Ishida M., Okubo T., Koshimizu K., Daito H., Tokuda H., Kin T., Yamamoto T. and Yamazaki N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **JP 0217, 121[9017, 121]**.
- Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A. and Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, **75**, 125, 2001.
- Chung Y.K., Heo H.J., Kim E.K., Kim H.K., Huh T.L., Lim Y.H., Kim S.K. and Shin D.H. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. **Mol. Cell**, **11**, 137, 2001.
- Samora L., Shode F.O. and Mipando M. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acid, methyl maslinic acid and uvaol. **Phyto-medicin**, **11**, 121, 2004.
- Watson L. and Dallwitz M. J. The families of flowering plants: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. [V: July 29th 2006.] <http://delta-intkey.com/angio/>, 1992. (Consultado: 13 de enero de 2007.)
- Silva M., Mancinelli P. and Cheul M. Chemical study of *Cestrum parqui*. **J. Pharm. Sci.**, **51**, 289, 1962.
- Chakravarti R.N., Datta S. and Mitra M.N. Tigogenin and ursolic acid from *Cestrum diurnum* Linn. **Experientia**, **20**, 200, 1964.
- Fuentes Fiallo V.R. Consideraciones sobre la familia *Solanaceae* en Cuba. **Rev. Jardín Botánico**, **IX**, 35, 1988.
- Wall M.D., Eddy C.R., McClellan M.L. and Klump M.E. Detection and estimation of steroidal saponins in plant tissue. **Anal. Chem.**, **24**, 1337, 1952.
- Bakker M., Baas W., Sijm D. and Kollöffel C. Extraction and identification of leaf wax of *Lactuca sativa* and *Plantago major*. **Phytochemistry**, **47**, 1489, 1998.
- Hamzah A.S. and Lajis N.Hj. Chemical constituents of *Hedyotis herbacea*. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (AR-BEC), Article II, 6 pp, May, 1998.
- David J.P., da Silva E.F., de Moura D. L., Da Silva M.L., Guedes M.L.S., Assunção R. de J. e David J.M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Quim. Nova**, **24**, 730, 2001.
- Pauletti P.M., Araújo A.R., Bolzani V. da S., Young M.C.M. Triterpenos de *Styrax camporum* (Styracaceae). **Quim. Nova**, **25**, 349, 2002.
- Brieskorn C.H. and Schlumprecht L. Constituents of *Salvia officinalis*. VIII. Isolation of ursolic acid. **Arch. Pharm.**, **284**, 239, 1951.
- Seo S., Tomita Y. and Tori K. Carbon-13 NMR spectra of URS-12-ENES and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. **Tetrahedron Lett.**, **1**, 7-10, 1975.
- Waller G.R., Jurzysta M., Karns T.K.B. and Geno P.W. Isolation and Identification of ursolic acid from *Coffea arabica* L. (Coffee) leaves. <http://www.asic-cafe.org/html/sectionfra.php?code=chb&number=14> (Consultado: 13 de enero de 2007.)
- Seo S., Tomita Y. and Tori K. Biosynthesis of oleanene - and ursene - type triterpenes from [4-<sup>13</sup>C] mevalonolactone and [1, 2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara. **J. Am. Chem. Soc.**, **103**, 2075, 1981.
- Dharmananda S. Reducing inflammation with diet and supplements: The story of Eicosanoid inhibition. General Review. Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon, EEUU. <http://www.itmonline.org/arts/lox.htm>, 2003. (Consultado: 13 de enero de 2007.)