



Revista Colombiana de Química
ISSN: 0120-2804
ISSN: 2357-3791
rcolquim_fcbog@unal.edu.co
Universidad Nacional de Colombia
Colombia

Método preparativo para la obtención de ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*

Ludeña Huaman, Michael Azael

Método preparativo para la obtención de ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*

Revista Colombiana de Química, vol. 47, núm. 1, 2018

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309055254002>

DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n1.65375>

Los contenidos se distribuyen con la licencia Creative Commons 4.0, que permite a los usuarios copiar, distribuir, adaptar y comunicar públicamente, con cualquier propósito siempre y cuando se reconozcan los créditos de la obra.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

Método preparativo para la obtención de ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*

Preparative method to obtain ursolic acid from *Clinopodium revolutum*

Método preparativo para a obtenção do ácido ursólico a partir de *Clinopodium revolutum*

Michael Azael Ludeña Huaman

Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú

a20156473@pucp.edu.pe

DOI: [https://doi.org/10.15446/](https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v47n1.65375)

rev.colomb.quim.v47n1.65375

Redalyc: [https://www.redalyc.org/articulo.oa?](https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309055254002)

id=309055254002

Recepción: 31 Mayo 2017

Aprobación: 28 Julio 2017

RESUMEN:

En este trabajo se propuso un método para obtener ácido ursólico (AU) de manera fácil, rápida y económica teniendo como materia prima la planta medicinal *Clinopodium revolutum* endémica del Perú, conocida y comercializada con el nombre de *flor de arena* o *té indio*. La técnica de recristalización selectiva que se empleó resultó ser eficiente debido a que se obtuvo cristales de AU sin la necesidad de métodos cromatográficos de purificación ni el uso de solventes tóxicos. La pureza determinada por HPLC es mayor a 95%. Así, la flor de arena se convierte en una importante biofuente de este compuesto.

PALABRAS CLAVE: Lamiaceae, triterpeno, recristalización, purificación, Perú.

ABSTRACT:

A method to obtain ursolic acid (UA) in an easy, fast, and economical way was proposed, having as raw material the medicinal plant *Clinopodium revolutum* from Peru. This plant is known and marketed as *flor de arena* or *té indio*. The selective recrystallization technique used was efficient due to UA crystals were obtained without the need for chromatographic purification methods neither the use of toxic solvents. The purity determined by HPLC is greater than 95%. Thus, the *flor de arena* becomes an important biosource of this compound.

KEYWORDS: Lamiaceae, triterpene, recrystallization, purification, Peru.

RESUMO:

Este trabalho apresenta um método para a obtenção de ácido ursólico (AU) de forma fácil, rápida e barata tendo como matéria prima a planta medicinal *Clinopodium revolutum* endêmica do Perú, conhecida e comercializada pelo nome de *flor de arena* ou *té indio*. A técnica seletiva de recristalização resultou ser eficiente, devido os cristais da AU foram obtidos sem a necessidade de métodos cromatográficos de purificação nem a utilização de solventes tóxicos. A pureza determinada pela HPLC é superior a 95%. Assim, a *flor de arena* torna-se uma biofonte importante deste composto.

PALAVRAS-CHAVE: Lamiaceae, triterpeno, recristalização, purificação, Perú.

INTRODUCCIÓN

La flor de arena es una planta del género *Clinopodium* de la familia Lamiaceae, endémica de la región andina norperuana (1) y las herboristerías del Perú la comercializan como un producto excelente para el tratamiento del hígado, cálculos vesiculares, eliminación de ácido úrico y problemas del riñón. Muchas de estas propiedades son atribuidas a los metabolitos secundarios conocidos como triterpenos, ampliamente distribuidos en las plantas de la familia Lamiaceae. El ácido ursólico (AU) es el principal triterpeno en

NOTAS DE AUTOR

a20156473@pucp.edu.pe

la flor de arena; esta molécula ha mostrado, entre otras, actividad antioxidante (2), anti-microbial (3), gastroprotectora (4), anti-inflamatoria y analgésica (5).

El AU ($C_{30}H_{48}O_3$), es un compuesto ópticamente activo y cuenta con una estructura considerablemente complicada de diez centros quirales. Debido a estas características, no ha podido ser sintetizado aún y solo se ha obtenido por extracción y purificación a partir de productos naturales.

Así mismo, el ácido oleanólico (AO) es un isómero estructural muy similar al AU (Figura 1) y, a menudo, ambos están presentes simultáneamente en la misma planta como agliconas de saponinas o como ácidos libres (6). La purificación de AU se ve interferida por este isómero debido a la similitud estructural y a sus estrechas propiedades fisicoquímicas que complican la purificación; esto se refleja, por ejemplo, en el elevado costo del AU. Por tanto, en un estudio a escala para la obtención de AU y una producción económica y accesible, se hace necesario encontrar un método de separación más favorable al método cromatográfico de contracorriente propuesta por Frighetto *et al.* (7) y al de cromatografía en columna propuesta por Amzad y Zhari (8).

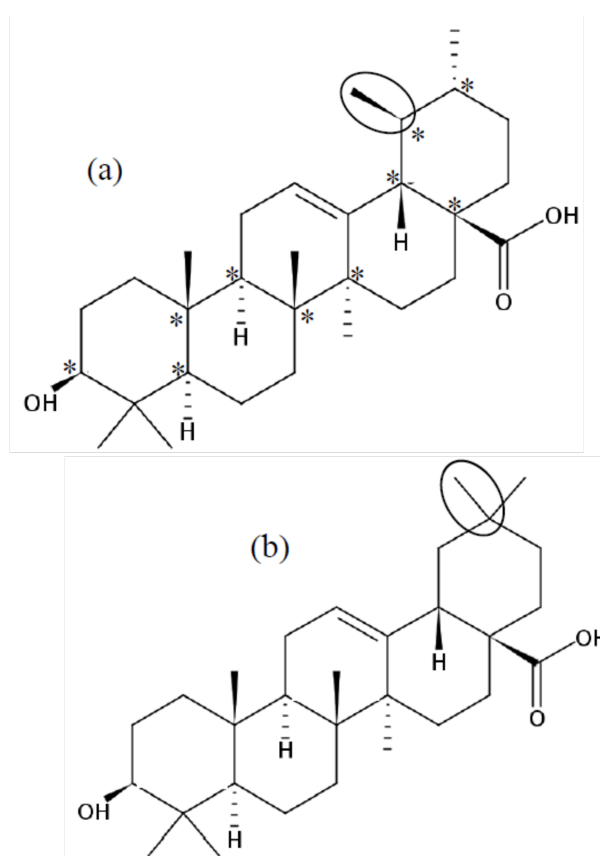


Figura 1. Estructura del ácido ursólico (a) y ácido oleanólico (b).

FIGURA 1

Estructura del ácido ursólico (a) y ácido oleanólico (b).

El objetivo de la presente investigación fue obtener AU de una manera fácil, rápida y económica a partir de la especie *Clinopodium revolutum* conocida comercialmente como *flor de arena* y aprovechando la baja proporción de AU:AO (4,5:1) (9). Se utilizó la técnica de recrystalización selectiva para enriquecer la solución con AU o para reducir la cantidad de AO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y productos químicos

El material vegetal fue recolectado en el Departamento de Huánuco-Perú en enero de 2016. Se depositó un espécimen de comprobante en el Herbarium Truxillense (HUT-58329) identificado por el Botánico Eric Rodríguez - Universidad Nacional de Trujillo. Las hojas secas de flor de arena no se trituran para la extracción sino que se trabajó con las hojas secas intactas, con dimensiones ≤ 1 mm. Los reactivos químicos utilizados etanol (Merck, Alemania) y acetonitrilo (Merck, Alemania) fueron de grado HPLC y hexano (Merck, Alemania) junto con acetato de etilo (Merck, Alemania) fueron de grado analítico.

Instrumentos

La concentración de los extractos se realizó con un rotaevaporador BUCHI R-215. El análisis por HPLC se realizó con un equipo UltiMate 3000 (Thermo Fischer Scientific) con detector DAD, columna Lichrospher RP_{C18} (Phenomenex) de 250 x 4,6 mm x 5 μ m. El espectro IR fue registrado (disco de KBr) en un equipo Nicolet™ 380 FT- IR. El espectro de 1H y ^{13}C fue registrado en un equipo BRUKER Ascend™ 500 MHz con consola AVANCE III HD; se utilizó DMSO- d_6 (Merck, Alemania) como solvente y TMS (Merck, Alemania) como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) son reportados en ppm.

Proceso de purificación de ácido ursólico

Los trabajos realizados por Fan *et al.* (10 , 11) sobre la solubilidad de AO y AU fueron imprescindibles a la hora de la elección del solvente de recristalización. El proceso de purificación se inició con 15 g de hojas secas de flor de arena. El diagrama de flujo de la Figura 2 muestra el proceso detallado de la purificación de AU. La pureza se determinó mediante HPLC, para lo cual se usó un método isocrático con una fase móvil de acetonitrilo : agua (80:20) a una velocidad de flujo de 1 mL/min, la muestra eluida fue detectada a 209 nm (12).

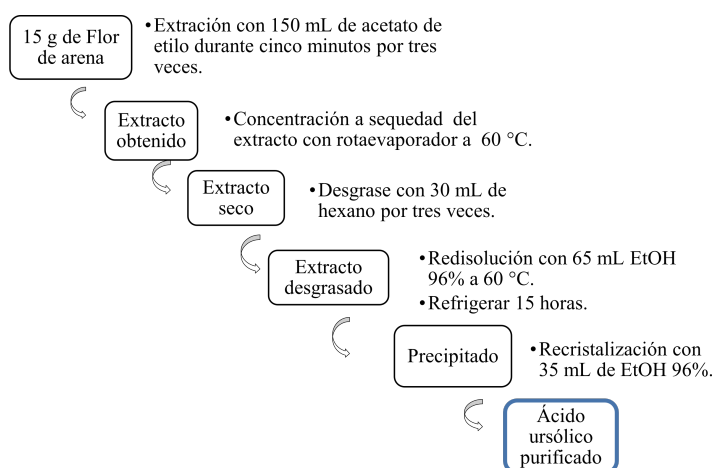


Figura 2. Proceso de purificación de ácido ursólico.

FIGURA 2
Proceso de purificación de ácido ursólico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de AU

La extracción por inmersión en acetato de etilo fue reportado como un proceso efectivo debido a la selectiva y rápida extracción de triterpenos (13 , 14 , 15). El resultado del primer proceso de extracción que se inició con 15,0000 g de hojas secas de flor de arena, se obtuvo 1,3604 g de extracto, luego se desengrasó y se redisolvió en etanol de 96% a 60 °C, después de mantenerlo en refrigeración se obtuvo 0,4398 g de precipitado, se recrystalizó y se obtuvieron 0,1113 g de cristales de ácido ursólico, en la Figura 3 se puede observar la fotografía digital de los cristales.



Figura 3. Fotografía digital de los cristales de AU obtenido.

FIGURA 3

Fotografía digital de los cristales de AU obtenido.

La pureza estimada por HPLC resultó ser de 95,5000%. En la Figura 4 se muestra el cromatograma realizado con un modo de elución isocrático acetonitrilo : agua (80:20), volumen de inyección 5 μ L, velocidad de flujo 1 mL/min, detección 209 nm y a una temperatura de 30 °C.

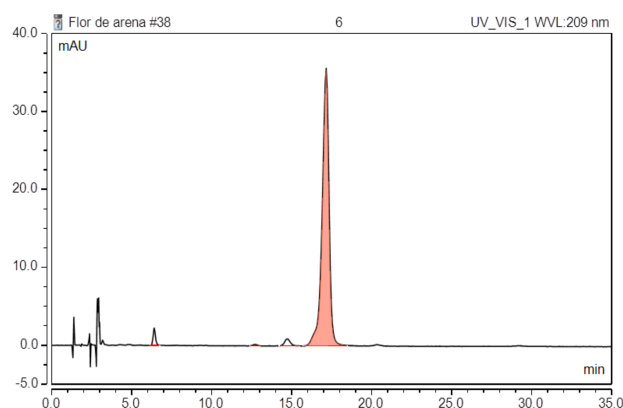


Figura 4. Cromatograma de los cristales de ácido ursólico (t.r = 17,16 min) obtenido utilizando una fase móvil de acetonitrilo : agua (80:20), velocidad de flujo 1mL/min y detección a 209 nm.

FIGURA 4

Cromatograma de los cristales de ácido ursólico $t_r = 17.16$ min obtenido utilizando una fase móvil de acetonitrilo : agua 80:20, velocidad de flujo 1mL/min y detección a 209 nm.

Con el objetivo de comprobar la reproducibilidad del método se realizó el trabajo de la misma manera por triplicado. La Tabla 1 muestra el resumen de los resultados obtenidos en el proceso de purificación del AU.

TABLA 1.
Resultados del proceso de purificación de AU

n	Cantidad (g)	% de rendimiento (g/g)	% de pureza del AU (HPLC)
1	0,1113	0,7420	95,5000
2	0,1182	0,7880	95,4300
3	0,1154	0,7690	95,5700
media	0,1150	0,7663	95,5000
DE	0,0028	0,0189	0,0572

DE: Desviación Estándar

Comparando los resultados con otros ya reportados (16 , 17 , 18), los obtenidos en este trabajo de investigación resultan ser mejores por el hecho de eliminar el uso de solventes tóxicos y no requerir el uso de columna cromatográfica preparativa de silica gel. Si bien es cierto que el rendimiento es menor comparado a los resultados obtenidos por Fan *et al.* (19), también es cierto que el método propuesto es más fácil, no requiere el uso de equipos de ultrasonido ni de pre tratamientos de la muestra. Además de ser un método fácil es también rápido: aproximadamente en dos días se obtienen los cristales de AU.

Caracterización

El espectro IR obtenido (Figura 5) muestra las señales esperadas para los grupos funcionales del compuesto AU. Así, a 3442 cm^{-1} se tiene una señal que es característica del grupo OH, a 1698 cm^{-1} la del C=C, a 1716 cm^{-1} la del C=O del ácido carboxílico, en el intervalo $1460\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ la huella dactilar y a $2870\text{-}2975\text{ cm}^{-1}$ los enlaces C-H.

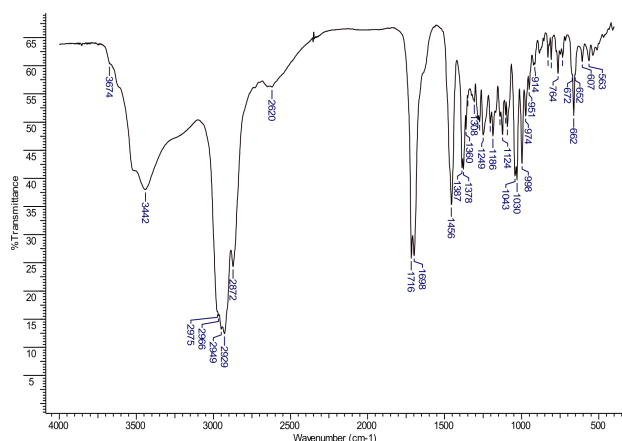


Figura 5. Espectro IR del ácido ursólico purificado a partir de hojas secas de flor de arena.

FIGURA 5

Espectro IR del ácido ursólico purificado a partir de hojas secas de flor de arena.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C confirman la estructura del AU. En la Figura 6 se observa la estructura y el espectro de ^1H -RMN. Como se esperaba, resultó un espectro complejo por la cantidad de protones que se acoplan y multipletes solapados. Se pueden destacar algunas señales características como las de COO-H (s, # 11,93), O-H (d, # 4,28) y de los protones del carbono 6C (m, # 3,01) y 13C (t, # 5,13).

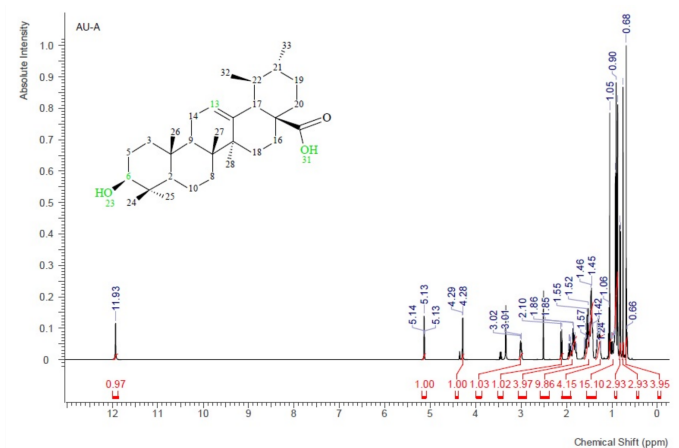


Figura 6. Estructura y espectro ^1H -RMN (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS) de los cristales de ácido ursólico obtenido.

FIGURA 6

Estructura y espectro ^1H RMN b500 MHz4 DMSO-d_6 TMS3 de los cristales de ácido ursólico obtenido.

En la Figura 7 se observa el espectro de ^{13}C -RMN. Para identificar el tipo y la cantidad de carbonos diferentes se utilizaron los espectros DEPT 45 (Figura 8), DEPT 90 (Figura 9) y DEPT 135 (Figura 10).

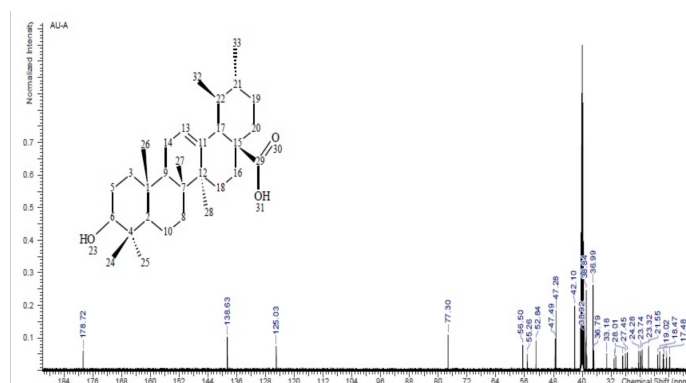


Figura 7. Espectro de ^{13}C -RMN (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS) de los cristales de ácido ursólico obtenido.

FIGURA 7

Espectro de ^{13}C RMN b500 MHz4 DMSO9d6 TMS3 de los cristales de ácido ursólico obtenido.

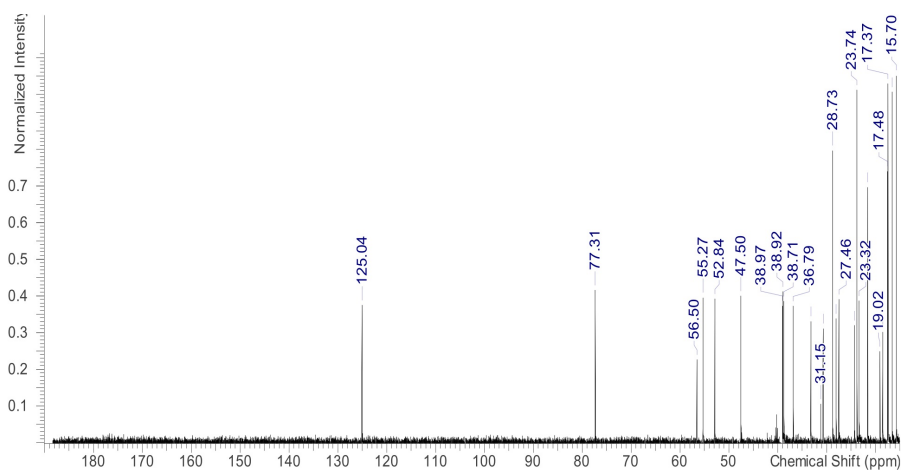


Figura 8. Espectro DEPT 45 (500 MHz, DMSO-d_6 , TMS) de los cristales de ácido ursólico obtenido.

FIGURA 8

Espectro DEPT 45 b500 MHz4 DMSO9d6 TMS3 de los cristales de ácido ursólico obtenido.

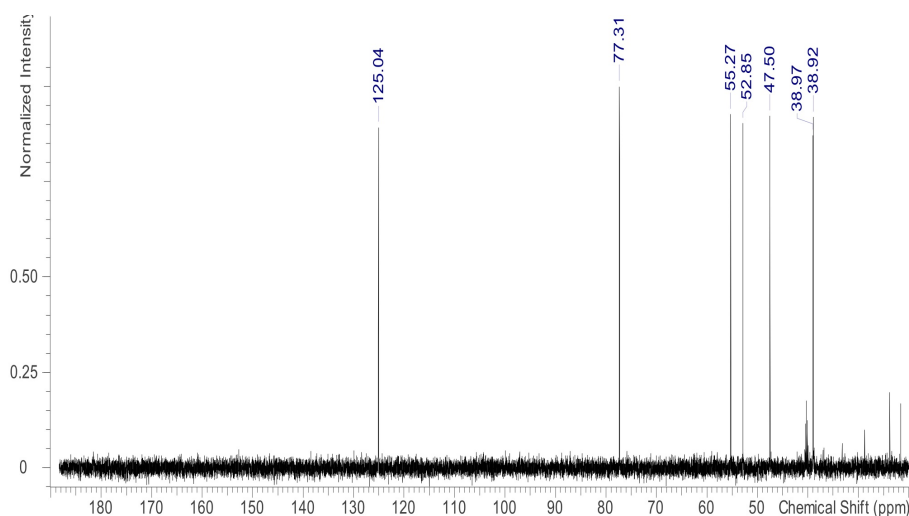


Figura 9. Espectro DEPT 90 (500 MHz, DMSO- d_6 TMS) de los cristales de ácido ursólico obtenido.

FIGURA 9

Espectro DEPT 90 b500 MHz4 DMSO9d6 TMS3 de los cristales de ácido ursólico obtenido.

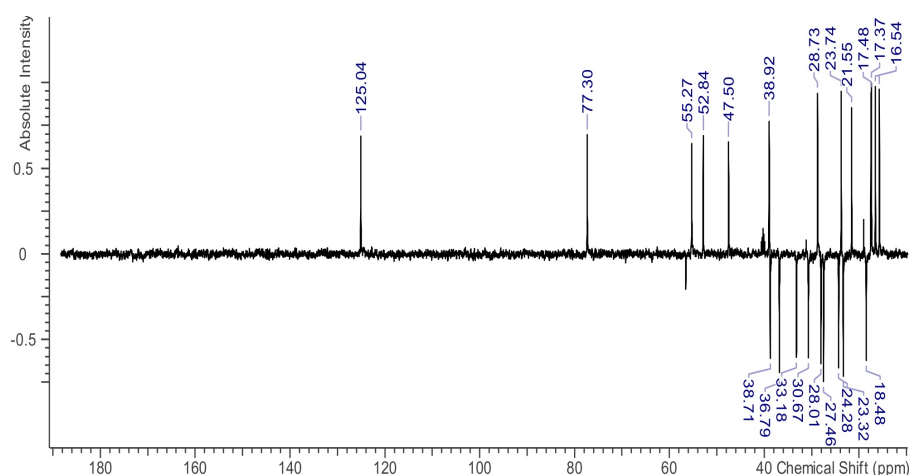


Figura 10. Espectro DEPT 135 (500 MHz, DMSO- d_6 TMS) de los cristales de ácido ursólico obtenido.

FIGURA 10

Espectro DEPT 135 b500 MHz4 DMSO9d6 TMS3 de los cristales de ácido ursólico obtenido.

Comparando los espectros de la Figura 7 y 8, se observan las ausencias de siete señales (# 178,72; # 138,63; # 47,28; # 42,1; # 39,57; # 38,84 y # 36,99) que corresponden a carbonos cuaternarios (C). En el espectro DEPT 90 las siete señales (# 125,04; # 77,30; # 55,27; # 52,84; # 47,50; # 38,97 y # 38,92) corresponden a carbonos terciarios (CH). En el espectro DEPT 135 las señales positivas corresponden a los carbonos primarios (CH_3) y terciarios (CH); las señales negativas corresponden a los carbonos secundarios (CH_2).

Se encontraron nueve señales (# 38,71; # 36,79; # 33,18; # 30,18; # 28,01; # 27,46; # 24,46; # 23,32 y # 18,48) en la zona negativa, que corresponden a los carbonos secundarios. En la zona positiva se encontraron 14 señales, de las cuales siete corresponden a los carbonos terciarios que se identificaron en el espectro DEPT 90 y las otras siete (# 28,73; # 23,74; # 21,55; # 17,48; # 17,37; # 16,54 y # 15,70) corresponden a los carbonos primarios. En total se identificaron 30 carbonos, lo que concuerda con la estructura del AU.

Se realizó una comparación con las señales del espectro de ^{13}C obtenido y los reportados en la literatura los datos se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2
Valores obtenidos de ^{13}C -RMN (ppm) y el reportado por Uddin et al. (20).

Nº de Carbono	Tipo de C	Uddin \square (^{13}C)	Obtenido \square (^{13}C)
1	C	37,40	36,99
2	CH	55,80	55,27
3	CH ₂	38,40	38,71
4	C	38,40	38,84
5	CH ₂	28,10	27,46
6	CH	78,10	77,30
7	C	40,00	39,57
8	CH ₂	33,60	33,18
9	CH	48,30	47,50
10	CH ₂	18,80	18,48
11	C	139,70	138,63
12	C	42,50	42,1
13	CH	125,60	125,04
14	CH ₂	23,60	23,32
15	C	48,00	47,28
16	CH ₂	24,90	24,46
17	CH	53,50	52,84
18	CH ₂	28,70	28,01
19	CH ₂	31,10	30,18
20	CH ₂	37,30	36,79
21	CH	39,10	38,92
22	CH	39,50	38,97
24	CH ₃	28,80	28,73
25	CH ₃	15,70	15,70
26	CH ₃	16,60	16,54
27	CH ₃	17,40	17,48
28	CH ₃	23,80	23,74
29	C	180,00	178,72
32	CH ₃	17,50	17,37
33	CH ₃	21,40	21,55

Con los valores de la Tabla 2 se graficó la correlación ^{13}C -RMN (ppm) de los desplazamientos químicos obtenidos y el reportado por Uddin (Figura 11)

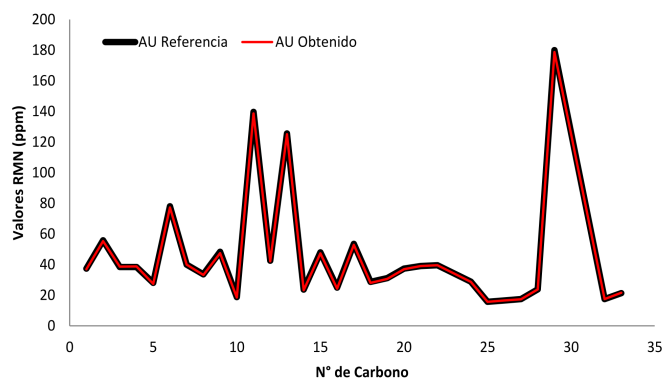


Figura 11. Correlación gráfica de los desplazamientos químicos de ^{13}C de los cristales de ácido ursólico obtenido y el de la referencia reportada por Uddin et al. (20).

FIGURA 11

Correlación gráfica de los desplazamientos químicos de ^{13}C de los cristales de ácido ursólico obtenido y el de la referencia reportada por Uddin et al. (20).

La Figura 11 muestra una perfecta correlación gráfica entre los datos obtenidos y los de la literatura. Esto confirma que los cristales obtenidos son efectivamente AU.

CONCLUSIÓN

Tras la ejecución del proyecto se logró desarrollar un método de recristalización selectiva para obtener cristales de ácido ursólico de pureza mayor a 95% (HPLC) con un rendimiento de 0,742% (g/g) sin la necesidad de métodos cromatográficos preparativos con silica gel, ni uso de solventes tóxicos. Lo anterior convierte este método en uno fácil, rápido, económico y verde. Adicionalmente, los resultados muestran que la flor de arena es una biofuente para la obtención de ácido ursólico.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias a la facilidad otorgada de trabajar en el laboratorio que dirige la Dra. Juana Robles Caycho, docente de la Escuela Profesional de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú y el apoyo económico de CONCYTEC.

REFERENCIAS

1. Mostacero León, J.; Mejía Coico, F. *Fanerógamas del Perú: taxonomía, utilidad y ecogeografía*. Trujillo, Perú: CONCYTEC. 2009.
2. Kashyap, D.; Tuli HS, S. AK. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* **2016**, *13*, 146-201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>.
3. Mallavadhani, U.V.; Mahapatra A, J. K, Reddy PS. Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1576–1579. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1576>.
4. Rodríguez, J. A.; Astudillo, L.; Schmeda-Hirschmann, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacol Res.* **2003**, *48*, 291–294. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00155-5).

5. Vasconcelos L., M. A.; Royo, V. A.; Ferreira, D. S.; Miller-Crotti, A. E.; Andrade-e Silva, M. L.; Carvalho, J. C. et al. In vivo Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Z. Naturforschung C*. 2014, 61, 477–482. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2006-7-803>.
6. Janicsák, G.; Veres, K.; Zoltán-Kakasy, A.; Máthé, I. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 2006, 34, 392–396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.12.004>.
7. Frighetto, N.; Welendorf, R. M.; Silva, A. M. P.; Nakamura, M. J.; Siani, A. C. Application of counter-current chromatography in the purification of ursolic acid from leaves of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Rev Bras Farmacognosia*. 2005, 15, 338–343. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400015>.
8. Hossain, M. A.; Ismail, Z. Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arab J Chem*. 2013, 6, 295–298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.10.009>.
9. Flores, C. A.; Curie, B. C.; Quispe, A. L.; Quispe, R. I.; Huaman, M. L.; Rodríguez, E. F. Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico en tres especies peruanas de *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Menthae). *Arnaldoa*. 2016, 23, 333–350. DOI: <https://doi.org/10.22497/249>.
10. Fan, J. P.; Kong, T.; Zhang, L.; Tong, S.; Tian, Z. Y. Duan, Y. H. et al. Solubilities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Four Solvents from (283.2 to 329.7) K. *J Chem Eng Data*. 2011, 56, 2723–2725. DOI: <https://doi.org/10.1021/je101309a>.
11. Fan, J. P.; Kong, T.; Zhang, X. H.; Zhang, L.; Tong, S.; Tian, Z. Y. et al. Solubilities of oleanolic acid and ursolic acid in (ethanol + water) mixed solvents from T = (292.2 to 328.2) K. *J Chem Thermodyn*. 2012, 47, 372–375. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2011.11.017>.
12. Srivastava, P.; Kasoju, N.; Bora, U.; Chaturvedi, R. Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in In vitro cell cultures of *Lantana camara* L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 2011, 15, 1038–1046. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0054-7>.
13. Ma, C. M.; Cai, S. Q.; Cui, J. R.; Wang, R. Q.; Tu, P. F.; Hattori, M. et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. 2005, 40, 582–589. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.01.001>.
14. Martelanc, M.; Vovk, I.; Simonovska, B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2009, 1216, 6662–6670. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.038>.
15. Martelanc, M.; Naumoska, K.; Vovk, I. Determination of common triterpenoids and phytosterols in vegetable waxes by HPTLC—densitometry and HPTLC—image analysis. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2016, 39, 312–321. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1165576>.
16. Yamaguchi, H.; Noshita, T.; Kidachi, Y.; Umetsu, H.; Hayashi, M.; Komiyama, K. et al. Isolation of Ursolic Acid from Apple Peels and Its Specific Efficacy as a Potent Antitumor Agent. *J Health Sci*. 2008, 54, 654–660. DOI: <https://doi.org/10.1248/jhs.54.654>.
17. Frighetto, R. T.; Welendorf, R. M.; Nigro, E. N.; Frighetto, N.; Siani, A. C. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chem*. 2008, 106, 767–771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.003>.
18. He, X.; Liu, R. H. Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. *J. Agric. Food Chem*. 2007, 55, 4366–4370. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf063563o>.
19. Fan, J. P.; Liao, D. D.; Zhang, X. H. Ultrasonic assisted extraction of ursolic acid from apple pomace: A novel and facile technique. *Sep. Sci. Technol*. 2016, 51, 1344–1350. DOI: <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1165253>.
20. Uddin, G. H.; Siddiqui, B. S.; Alam, M.; Sadat, A.; Ahmad, A.; Uddin, A. Chemical constituents and phytotoxicity of solvent extracted fractions of stem bark of *Grewia optiva* Drummond ex Burret. *Middle-East J. Sci. Res*. 2011, 8, 85–91.

ENLACE ALTERNATIVO

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/65375> (html)