



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RESINA DE  
*Bursera simaruba* (PALO MULATO)”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUZ MARINA CAMPOS SOTO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006.**

No. ADO H71253

CLAS 15

022.331

1180



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RESINA DE  
*Bursera simaruba* (PALO MULATO)”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
PRESENTA**

**LUZ MARINA CAMPOS SOTO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

**SINODALES**

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA**  
DIRECTORA

\_\_\_\_\_

**Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

Agradezco su apoyo a mis papás,

A mis hermanos Manuel y Adrián,

A mi abuelita

A Alfredo

A mis amigos y amigas

Agradezco su apoyo a la Dra. Alejandra Rojas M.

Al Dr. Fausto Rivero de la UNAM

A mis sinodales Dr. César Ibarra y el Dr. Moustapha Bah

Y al Dr. Alexandre Taketa por su colaboración

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Información taxonómica del género <i>Bursera</i>	3
II.2 Estudios fitoquímicos realizados sobre especies del género <i>Bursera</i>	4
II.3 Estudios farmacológicos realizados sobre especies del género <i>Bursera</i>	10
II.4 Fundamento de la técnica cromatográfica	14
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
V.1 Materiales	20
V.1.1 Material vegetal	20
V.1.2 Obtención del extracto de acetato de etilo (AcOEt) de la resina de <i>Bursera simaruba</i>	20
V.1.3 Análisis cromatográficos	20
V.2 Métodos	21
V.2.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt de la resina de <i>B. simaruba</i> y separación por columna abierta de los metabolitos secundarios mayoritarios	21
V.2.2 Purificación	21
V.2.3 Elucidación estructural	21

V.3 Ensayos Biológicos	21
V.3.1 Ensayo hemolítico	21
VI. RESULTADOS	23
VI.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt de la resina de <i>B. simaruba</i> y separación por columna abierta de los metabolitos secundarios mayoritarios	23
VI.2 Purificación de los metabolitos secundarios BS1 y BS3	25
VI.2.1 Purificación de BS1 a partir de la fracción primaria F5	25
VI.2.2 Purificación de BS3 a partir de la fracción primaria F8	26
VI.3 Elucidación estructural	27
VI.3.1 Elucidación estructural de BS1	27
VI.3.2 Elucidación estructural de BS3	32
VI.4 Ensayos biológicos	35
VI.4.1 Ensayo Hemolítico	35
VII. DISCUSIÓN	36
VII.1 Elucidación estructural de BS1	37
VII.2 Elucidación estructural de BS3	38
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. BIBLIOGRAFÍA	42

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Información taxonómica sobre <i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg	4
2	Estructuras químicas de los compuestos aislados en especies del género <i>Bursera</i>	8
3	Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.	20
4	Preparación de muestras para el ensayo hemolítico	22
5	Fraccionamiento, mediante cromatografía en columna abierta, del extracto de AcOEt de <i>B. simaruba</i>	24
6	Resultados del ensayo hemolítico	35
7	Datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para la lupenona	- 39



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Detalle de la exfoliación del tronco del árbol <i>Bursera simaruba</i>	5
2	Interacciones dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno	16
3	Extracción y fraccionamiento primario del extracto total AcOEt de la resina de <i>B. simaruba</i>	23
4	Cromatoplaqueta de las fracciones primarias F5, F7 Y F8 y sus metabolitos secundarios BS1, BS2 y BS3	25
5	Cromatoplaqueta de la purificación del compuesto BS1 a partir de F5	26
6	Cromatoplaqueta de la purificación del compuesto BS3 a partir de F8	27
7	Cromatograma por cromatografía de gases, de la fracción primaria F5 en el que se muestra el pico correspondiente al compuesto BS1	28
8	Espectro de masas de BS1	29
9	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de BS1	30
10	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de BS1	31
11	Aislamiento y purificación de la lupenona, (1R,3aR,4S,5aR,7aR,11aR,-11bR,13aR,13bR)-1-Isopropenil-3a,5a,5b,8,8,hexametil-eicosahidro-ciclopenta[a] crisen-9-ona) presente en la fracción F-5 de la resina de <i>B. simaruba</i>	32
12	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de BS3	33
13	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de BS3	34
14	Obtención de la resina del árbol de <i>B. simaruba</i>	36

## RESUMEN

*Bursera simaruba* (L.) Sarg. (Burceraceae) es un árbol comúnmente distribuido en el trópico y es utilizado en la medicina tradicional de México para tratar diversas afecciones. En la medicina tradicional yucateca, esta resina se emplea, de forma tópica, para aliviar las quemaduras de los corales de fuego (*Millepora sp*). A la fecha se desconoce cuales son los compuestos responsables del efecto farmacológico que se le atribuye a la resina para curar las lesiones ocasionadas por los corales de fuego y también se desconoce su mecanismo de acción. En este contexto, se planteó el presente proyecto de tesis que tuvo por objeto realizar el estudio fitoquímico de la resina de *Bursera simaruba*, con la finalidad de purificar sus principales metabolitos secundarios. A fin de cumplir este objetivo general, en primer término se preparó el extracto de AcOEt de la resina, el cual se fraccionó mediante una cromatografía en columna, obteniéndose 21 fracciones primarias, de las cuales se seleccionaron F5, F7 y F8. A partir de estas fracciones se purificaron tres metabolitos secundarios (BS1, BS2 y BS3). En la presente tesis se llevó a cabo la elucidación estructural de dos de estos compuestos, los cuales presentaban un esqueleto triterpénico de tipo lupano, uno de ellos fue identificado como la (1R,3aR,4S,5aR,7aR,11aR,11bR,13aR,13bR)-1-Isopropenil3a,5a,5b,8,8,hexametil-eicosahidro-ciclopenta[a]crisen-9-ona (lupenona) y el otro como el lupeol. De manera adicional, en el ensayo para determinar la influencia de la resina sobre la actividad hemolítica inducida por el extracto acuoso de *M. complanata*, se encontró que la resina de *B. simaruba* no inhibe dicho efecto. El presente trabajo de tesis condujo a la purificación e identificación de dos triterpenos, uno de ellos, la lupenona, representa un compuesto novedoso en el género *Bursera*. La resina de *B. simaruba* no contiene metabolitos secundarios que inhiban la hemólisis producida por *M. complanata*, de tal manera que el efecto benéfico presentado por la resina de esta especie vegetal para el tratamiento de las lesiones ocasionadas por los corales de fuego, se debe a la presencia de compuestos no identificados cuyo mecanismo de acción debe ser investigado.

## I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), a nivel mundial, sólo 17 países son considerados como megadiversos, ya que en conjunto albergan entre el 60 y 70% de la biodiversidad total del planeta. México pertenece a esta selecta categoría, porque ocupa el cuarto lugar en el mundo en riqueza vegetal, dado que alberga el 10% de la diversidad terrestre del planeta. Además, nuestro país que se distingue por tener una elevada proporción de especies endémicas: 40% de las plantas y más del 17% de especies de vertebrados. Debido a esta riqueza florística, la diversidad de plantas medicinales en México es muy abundante y su uso está ampliamente difundido, tanto en las comunidades rurales como en las urbanas.

El género *Bursera* (Burseraceae) comprende alrededor de un centenar de especies de árboles cuya distribución se extiende desde el extremo sur de los Estados Unidos de Norteamérica, hasta Venezuela, Perú y el Sur de Brasil, incluyendo también áreas insulares de las Revillagigedo, las Antillas y las Galápagos. El mayor número de especies de este género se concentra en México, en donde se encuentran más de 100 especies distribuidas principalmente en la gran Depresión del Río Balsas, que comprende una parte importante de los Estados de Oaxaca, Puebla, Guerrero, Morelos, México y Michoacán.

*Bursera simaruba* es un árbol originario de México y habita en climas cálido, semicálido y templado. Sus ramas, la flor, el fruto y la resina se usan con fines medicinales. Esta última se utiliza también como sustituto de la goma arábiga.

En algunos lugares del interior de nuestro país, la resina se usa para cicatrizar heridas, en la extracción de tórsalos (larvas de moscas), como repelente contra insectos y para quemarla como incienso. En el sureste mexicano se utiliza para curar las lesiones ocasionadas por los corales de fuego (*Millepora sp.*), los cuales son organismos ampliamente distribuidos en los arrecifes coralinos del Caribe. Adicionalmente, la resina fresca se aplica en las llagas producidas por la sustancia tóxica del árbol del chechem (*Chamaedorea tepejilote*).

Los estudios realizados sobre especies del género *Bursera* son escasos. De manera particular, a partir de la resina de *B. simaruba* se han purificado la picropoligamaína, un lignano con actividad citotóxica y algunos triterpenos derivados del lupano. A partir de la corteza se aisló un flavonoide con actividad antihemorrágica y se demostró que las hojas contienen metil- $\beta$ -peltatina A. Con respecto a estudios farmacológicos se ha encontrado que los extractos orgánicos de las hojas y la corteza de *B. simaruba* presentan un efecto antiinflamatorio, en tanto que los extractos de las hojas y las ramas tienen propiedades antibacterianas.

A pesar de que se han realizado algunos estudios sobre la resina de este árbol, a la fecha se desconoce cuales son los compuestos responsables del efecto farmacológico que se le atribuye para curar las lesiones ocasionadas por los corales de fuego y también se desconoce el mecanismo de acción, mediante el cual los compuestos bioactivos presentes en la resina ejercen su acción curativa. En este contexto se planteó el presente proyecto de tesis que tuvo por objeto realizar el estudio fitoquímico de la resina de *B. simaruba*, con la finalidad de purificar sus principales metabolitos secundarios. De manera adicional, se determinó si los compuestos purificados inhiben el efecto hemolítico provocado por el extracto acuoso preparado a partir de *Millepora complanata*.

Para la realización del estudio fitoquímico se emplearon métodos cromatográficos que incluyeron cromatografía en columna y cromatografía en capa fina. La elucidación estructural de los compuestos purificados se realizó, mediante el empleo de diversas técnicas espectroscópicas y espectrométricas. La evaluación del efecto inhibitorio producido por los compuestos puros sobre la hemólisis inducida por el extracto acuoso de *M. complanata* se determinó mediante un método espectrofotométrico.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Información taxonómica del género *Bursera*

La familia Burseraceae comprende 16 géneros y 500 especies que incluyen arbustos y árboles tropicales con depósitos de secreción de gomas, resinas y aceites (esquizógenos). Muchas de las especies de este género se localizan en el nordeste de África, Arabia y América tropical. Las hojas de estas plantas, son alternas y compuestas y están provistas de glándulas. Poseen canales de oleo-resina en el líber y a veces en la médula. *Commiphora*, *Boswellia*, *Bursera* y *Canarium* son los géneros más representativos de esta familia. Entre los productos más conocidos provenientes de especies de esta familia se encuentran la mirra, el incienso, el elemi americano y la almendra de Java (Evans, 1991).

El género *Bursera* comprende cerca de 80 especies distribuidas en zonas tropicales de Latinoamérica y Sudamérica. Algunas de sus especies son: *glabra* (Jacq.) Triana & Planch., *grandifolia* (Schltdl.) Engl., *graveolens* (Kunth) Triana & Planch., *howellii* Standl., *permollis* Standl. & Steyer., *schlechtendalii* Engl., *simaruba* (L.) Sarg., *standleyana* L. O. Williams & Cuatrec y *tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch. Algunas especies de este género son usadas como incienso y en la medicina tradicional (Nakanishi y col., 2005).

El árbol de *B. simaruba* (L.) Sarg. tiene de 25 a 30 m de altura, sus hojas, que miden de 15 a 30 cm de largo, son alternas, imparipinnadas y poseen los pulvínulos engrosados. Las flores de este árbol son verde-amarillentas, con inflorescencias unisexuadas. Sus frutos son cápsulas drupáceas, de 0.6 a 0.5 cm de largo, elipsoidales y de color pardo-rojizas al madurar. El tronco posee una corteza que forma placas papiráceas, irregulares y que produce una savia resinosa, aromática. En el Cuadro 1 se describe la información taxonómica relacionada con *B. simaruba* (Zamora, 1999).

En la medicina popular, la infusión de la corteza de *B. simaruba* (Figura 1) se utiliza para adelgazar o en el tratamiento de úlceras estomacales, sin embargo, el proceso de ebullición provoca la liberación de taninos que pueden tener efectos tóxicos. Adicionalmente, la planta se ha empleado para aliviar dolores de espalda y estómago, para tratar mordeduras de serpiente, y en el tratamiento de diversas afecciones que incluyen: debilidad, disentería, enterorragia, fiebre, gangrena, hernias, impotencia, obesidad, erupciones, reumatismo, inflamaciones, enfermedades venéreas, llagas, fiebre amarilla, nefritis, cistitis, tumores, cálculos renales, diarrea y cáncer gástrico. Esta especie también se ha utilizado como afrodisíaca, depilatoria, diaforética, diurética, expectorante, purgativa, galactogoga, antiséptica y repelente de insectos (Zamora, 1999).

Cuadro 1. Información taxonómica sobre *B. simaruba* (L.) Sarg

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum :</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida(Dic.)
<b>Orden :</b>	Sapindales
<b>Familia:</b>	Burseraceae
<b>Nombre científico:</b>	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg
<b>Nombres comunes:</b>	Indio desnudo, palo mulato, caraña, jiñote, jiñocuave y chaca.

## II.2 Estudios fitoquímicos realizados sobre especies del género *Bursera*

Muchas plantas del género *Bursera* (Burseraceae) son de relevancia en la medicina tradicional mexicana y tienen múltiples usos domésticos en la región central de México, en donde se encuentran cerca de 70 especies endémicas, de las cuales 18 crecen abundantemente. Algunas especies son muy relevantes en el sistema local etnobotánico, debido a sus cualidades aromáticas y a su aplicación

etnomédica contra diarrea, fiebre, gingivitis, resfriado y sarampión (Hernández y col., 2005).

Muchas especies, tales como *B. ariensis*, producen exudados que contienen derivados de lignanos, y otras como *B. delpechiana* contienen triterpenos, mientras otros miembros del género *Bursera* producen flavonoides glicosilados (Hernández y col., 2005).



Figura 1. Detalle de la exfoliación del tronco del árbol *B. simaruba*

Muchas especies de la familia Burseraceae deben su valor económico al contenido de aceites esenciales, terpenos, esteroides y lignanos presentes en sus resinas (Peraza y col., 1995). Los triterpenos de esta familia pueden ser clasificados en cuatro tipos que incluyen: lupanos, ursanos, oleanos y eufano-tirucalanos (Peraza y col., 1995).

Recientes investigaciones sobre los constituyentes químicos de las diferentes especies del género *Bursera* han dado como resultado el aislamiento de triterpenos, bi-lignanos, lignanos del tipo de las podofilotoxinas y flavonoides (Peraza y Peña, 1992).

Las especies *B. suntui* Toledo y *B. kerberi* Engler han sido objeto de estudios fitoquímicos, realizados en nuestro país. La primera es un árbol pequeño de 2-3 m de altura, que tiene una corteza marrón rojiza oscura y crece en bosques tropicales secos localizados en el Oeste de México. Por otra parte, *B. kerberi* es un árbol de crecimiento rápido y de tamaño mediano, que mide de 6 a 14 m de altura y que crece abundantemente en los bosques tropicales del oeste y centro de México. Las ramas de esta especie son usadas para hacer cercas para casas, puesto que tienen la capacidad de rebrotar y tienden a echar raíz, para luego madurarse. Cuando ambas especies son dañadas, sus tejidos producen de inmediato una copiosa emisión de fluidos (Hernández y col., 2005).

El estudio fitoquímico realizado sobre *B. suntui* condujo al aislamiento de cuatro nuevos productos naturales, derivados del verticilano: el (+)-verticila-3,7-dien-12,20-diol (I), el (+)-20-acetato de verticila-3,7-dien-12,20-diol (II), el (+)-verticila-3,7,12(18)-trieno (III), el (-)-verticila-4(20),7,11-trieno (IV) y el (1S,3E,7E11S,12S)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol (V), cuyas estructuras se muestran en el Cuadro 2 (Hernández y col., 2005) .

Con relación a *B. kerberi*, el estudio fitoquímico de esta especie permitió la purificación de un nuevo derivado de verticilano, el (1S,3E,7E11S,12R)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol (VI), además de los compuestos III a IV, que se presentan en el Cuadro 2 (Hernández y col., 2005). Es importante mencionar que los derivados de verticilano, como los compuestos purificados de *B. suntui* y *B. kerberi*, constituyen un grupo relevante de diterpenos, cuyo esqueleto hidrocarbonado parece ser el precursor biogénico de los taxanos. De hecho, en un trabajo reciente se propuso



que el mecanismo de ciclización de un intermediario verticilano, a través de un carbocatión del tipo verticilen-12-il, es uno de los pasos claves en la biosíntesis de los taxanos (Jin y col., 2005).

El estudio fitoquímico biodirigido de la raíz de *B. tonkinensis* Guillaum condujo al aislamiento de 12 compuestos, de los cuales 3 resultaron ser nuevos metabolitos secundarios: el burselignano (VII), el bursefenilpropano (VIII) y el burseneolignano (IX). Se purificaron también compuestos ya conocidos como el (+)-isolariciresinol (X), el 5-metoxi-(+)-isolariciresinol (XI) y la 4'-dimetil-desoxipodofilotoxina (XII), ésta última con actividad citotóxica (ver Cuadro 2) (Jutiviboonsuk, 2005).

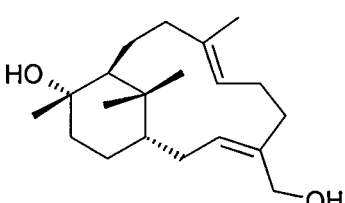
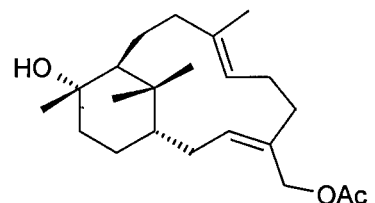
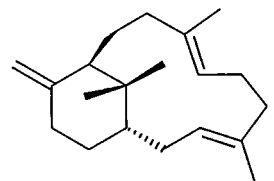
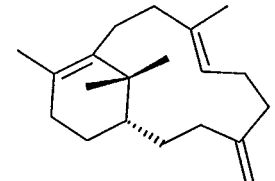
Con respecto a *B. graveolens*, a partir de sus hojas se purificó el 3'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido de luteolina y tres de sus derivados acilados, además de cuatro flavonoides glicosilados (Nakanishi y col., 2002). Posteriormente, se aislaron la picropoligamaína (XIII) y la burseranina (XIV), un lignano del tipo de la podofilotoxina, las cuales se muestran en el Cuadro 2 (Nakanishi y col., 2005).

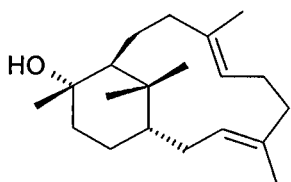
*B. simaruba* (L.) Sarg es otra de las especies del género *Bursera* que se ha investigado en México. Esta planta es un árbol comúnmente distribuido en el trópico, las decocciones de las hojas y de la corteza son utilizadas en la medicina tradicional yucateca para aliviar la dermatitis causada por la resina de *Metopium brownei* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae) y las lesiones provocadas por sustancias tóxicas producidas por el árbol del chechem (*Chamaedorea tepejilote*) (Peraza y Peña, 1992). En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), se realizó el estudio fitoquímico de la resina de la planta, el cual permitió el aislamiento de la elemicina y el amirenol. Durante este estudio se demostró que el extracto clorofórmico de la resina de *B. simaruba* tiene actividad citotóxica sobre el crustáceo *Artemia salina*. A partir de este extracto se purificó, mediante sucesivas cromatografías, la picropoligamaína (XIII) (Peraza y Peña, 1992), un lignano previamente aislado de la resina de *Commiphora incisa* (Burseraceae).

Adicionalmente, a partir de la resina, se purificó el lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,23-diol (XV), un nuevo triterpeno de tipo lupano, y los triterpenos ya conocidos: el lupeol (XVI) , el epilupeol, el epiglutinol, la  $\alpha$ -amirina y la  $\beta$ -amirina (Peraza y col., 1995).

En otro estudio se purificó un flavonoide (XVII) a partir del extracto de acetato de etilo de la corteza de *B. simaruba*. En tanto que, a partir del extracto acuoso de la corteza se identificaron taninos condensados. En este mismo trabajo se purificó la metil- $\beta$ -peltatina A (XVIII) a partir del extracto hexánico de las hojas (ver Cuadro 2) (Castro y col., 1999).

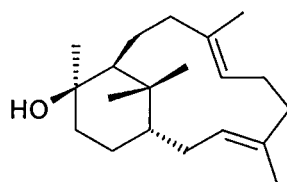
Cuadro 2. Estructuras químicas de los compuestos aislados en especies del género *Bursera*.

 <p style="text-align: center;"><b>I</b></p> <p style="text-align: center;">(+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol</p>	 <p style="text-align: center;"><b>II</b></p> <p style="text-align: center;">20 acetato (+)-verticilan-3,7-dien-12,20-diol</p>
 <p style="text-align: center;"><b>III</b></p> <p style="text-align: center;">(+)-verticilan-3,7,12(18)-triene</p>	 <p style="text-align: center;"><b>IV</b></p> <p style="text-align: center;">(-)-verticilan-4(20),7,11-triene</p>



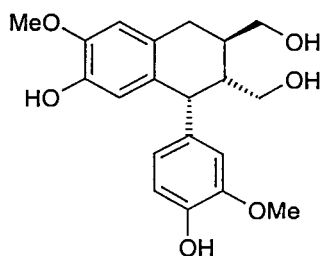
V

(1S,3E,7E,11S,12S)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol



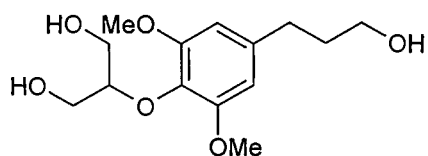
VI

(1S,3E,7E,11S,12R)-(+)-verticilan-3,7-dien-12-ol



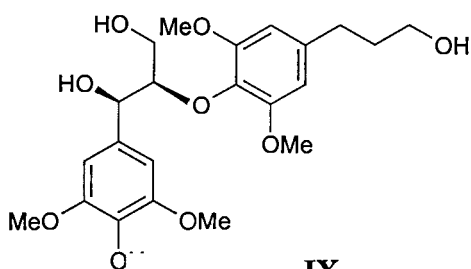
VII

Burselignano



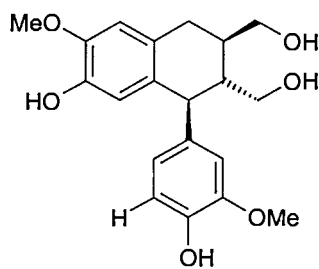
VIII

Bursefenilpropano



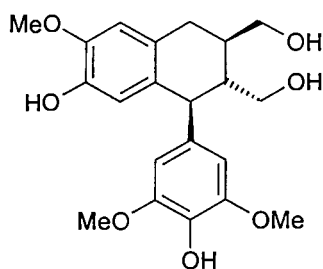
IX

Burseneolignano



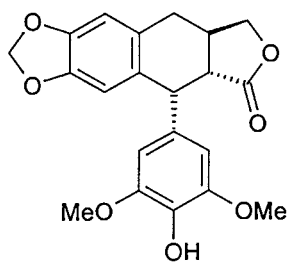
X

(+)-isolariciresinol



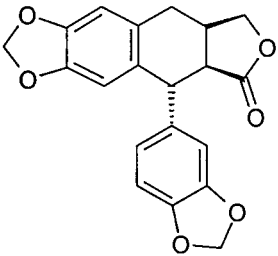
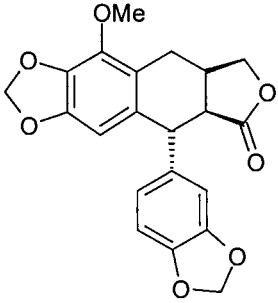
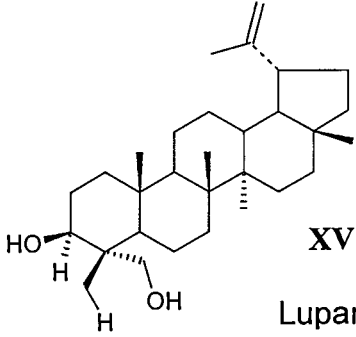
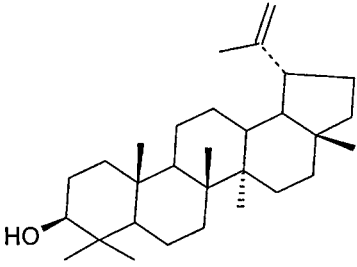
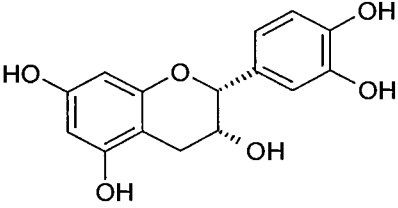
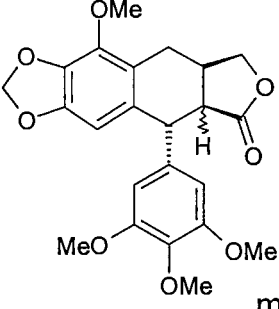
XI

5-metoxi-(+)-isolariciresinol



XII

4'-dimetildeso-podofilotoxina

 <p style="text-align: center;"><b>XIII</b></p> <p style="text-align: center;">Picropoligamaína</p>	 <p style="text-align: center;"><b>XIV</b></p> <p style="text-align: center;">Burseranina</p>
 <p style="text-align: center;"><b>XV</b></p> <p style="text-align: center;">Lupano</p>	 <p style="text-align: center;"><b>XVI</b></p> <p style="text-align: center;">Lupeol</p>
 <p style="text-align: center;"><b>XVII</b></p> <p style="text-align: center;">5,6,3',4'-tetrahydroxi- flavanol</p>	 <p style="text-align: center;"><b>XVIII</b></p> <p style="text-align: center;">metil-β-peltatina A</p>

### II.3 Estudios farmacológicos realizados sobre especies del género *Bursera*

Se ha demostrado que las especies de la familia Burseraceae contienen compuestos con actividad antiinflamatoria (Dowiejua y col., 1993). De manera particular, las especies del género *Bursera* han sido objeto de estudios farmacológicos, en los que se ha demostrado que los extractos crudos y algunos

de los metabolitos secundarios purificados a partir de especies de este género presentan diversas actividades farmacológicas, tales como actividad antiinflamatoria, citotóxica, antibacteriana y antihemorrágica (Camporese y col., 2003; Nakanishi y col., 2005 y Jutiviboonsuk, A., 2005; *inter allia*).

El extracto de diclorometano preparado a partir de las raíces de *B. tonkinensis*, presenta actividad citotóxica contra células KB (carcinoma de epidermis de la boca) con una concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de 4.1 µg/ml (Jutiviboonsuk, A., 2005). A partir de este extracto, se purificó el principio activo que resultó ser la 4'-dimetil-desoxi-podofilotoxina (XII), la cual presentó un efecto citotóxico significativo contra las líneas celulares KB, Col2 (colon) y LNCaP (próstata) (Jutiviboonsuk, 2005).

A partir de *B. graveolens* se purificaron la burseranina (XIV) y la picropoligamaína (XIII), ambos compuestos con actividad citotóxica significativa. La picropoligamaína mostró potencial citotóxico en cuatro líneas celulares, A-549 (pulmón), MCF-7 (pecho), HT-29 (colon) y HT1080 (células de fibrosarcoma) (Nakanishi y col., 2005).

Por otra parte, en un estudio fitoquímico biodirigido realizado sobre la especie *B. simaruba*, utilizando el bioensayo de *A. salina* para monitorear la actividad farmacológica, se purificó también la picropoligamaína, la cual presentó una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) contra *A. salina* de 52.2 ppm. Se evaluó también la actividad citotóxica de este compuesto sobre tres líneas celulares tumorales humanas, A-549 (pulmón), MCF-7 (pecho) y HT-29 (colon), y se demostró que tiene una actividad comparable a la de la adriamicina (Peraza y Peña, 1992). Con relación al efecto citotóxico producido por los ligandos purificados a partir de *B. tonkinensis*, *B. graveolens* y *B. simaruba*, es importante hacer notar que estos compuestos son análogos estructurales de la podofilotoxina, precursor en la semisíntesis del taxol, uno de los fármacos más utilizados en la actualidad para el tratamiento de cáncer de ovario, de mama, de pulmón, de próstata y de

estómago (Kikkawa y col., 2006; Dang, 2006 y Massarelli, 2006; *inter allia*). Los lignanos además, poseen otro tipo de efectos biológicos que incluyen actividad antimicótica (Erdemoglu, 2004) y antiviral (Castroy col., 2003; Uchide y col., 2005; Kuo y col., 2005; *inter allia*). Debido a la diversa gama de acciones biológicas que presentan estos compuestos, especialmente debido a su gran eficacia como agentes citotóxicos, en la actualidad se están investigando nuevos métodos de síntesis (You, 2005) y biotecnológicos (Ji y col., 2006) para la producción más efectiva de lignanos biológicamente activos.

En otros estudios farmacológicos realizados sobre *B. simaruba*, se demostró que el extracto hexánico preparado a partir de las hojas inhibe el desarrollo de *Escherichia coli* y *Pseudomona ferruginosa*. Uno de los compuestos purificados de esta planta, el lupeol (XVIII) también mostró actividad *in vitro* contra bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas pyocyanea*) y gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* y *Bacillus subtilis*) (Camporese y col., 2003). Adicionalmente, se ha reportado que el extracto metanólico de las hojas, las ramas y los vástagos tienen efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En el caso de los extractos de las hojas y las ramas, los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron  $>1024 \mu\text{g/ml}$  para *E. coli* y  $8 \mu\text{g/ml}$  para *S. aureus*. En tanto que el extracto metanólico de los vástagos presentó también una CMI  $>1024 \mu\text{g/ml}$  para *E. coli* y una CMI  $=64 \mu\text{g/ml}$  para *S. aureus* (Yasunaka y col., 2005). Otra especie del género *Bursera* a la cual se le ha demostrado actividad antibacterial es la *B. odorata* que inhibe significativamente el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* (Hernández, 2005). Las actividades antimicrobianas presentadas por plantas del género *Bursera* sustentan su uso en la medicina tradicional de México y Centro América para curar heridas profundas y superficiales (Camporese y col., 2003).

Con respecto a la evaluación del efecto antiinflamatorio que se les atribuye a varias especies del género *Bursera*, sólo *B. simaruba* ha sido objeto de estudios

farmacológicos. Esta especie es muy utilizada en México y Centro América para aliviar afecciones cutáneas que presentan un componente inflamatorio, tales como dolores, erupciones y quemaduras. También en el continente africano, particularmente en Nigeria, la corteza de *B. simaruba* se utiliza sola o mezclada con aloe (*Aloe vera*), vitamina E y caléndula (*Calendula officinalis*) para hacer una eficaz crema tópica, útil para tratar soriasis, eccema, mordeduras de insectos y hongos en la piel. En este país africano se efectuó un estudio doble-ciego conducido en el Jos University Teaching Hospital, a ocho pacientes con eccema crónico y con dermatitis, caracterizada por inflamación, comezón e hiperpigmentación. En este trabajo se demostró que la aplicación de una preparación de la corteza de *B. simaruba*, dos veces al día por un periodo de 3 semanas, genera una remisión completa de los síntomas en todos los pacientes (Noguera y col., 2004). En otra investigación, se encontró que los extractos preparados a partir de la corteza de *B. simaruba*, utilizando disolventes de diferente polaridad, tienen efectos antiinflamatorios significativos (Sosa y col., 2002). Las hojas de esta planta, al parecer también contienen compuestos antiinflamatorios, ya que se ha demostrado que el extracto hexánico de las hojas alivia los edemas inducidos por carragenina en las orejas de ratones, cuando se aplica tópicamente. Así mismo, la administración oral de este extracto inhibe la inflamación inducida en ratas. En este mismo trabajo se encontró que la actividad antiinflamatoria presentada por el extracto hexánico de las hojas se concentraba en una fracción cromatográfica, cuyo componente mayoritario era la metil- $\beta$ -peltatina A (IX) (ver Cuadro 2), lo cual sugiere que este compuesto podría ser uno de los principios activos responsables de la actividad antiinflamatoria de *B. simaruba* (Castro y col., 1999).

*B. simaruba* se utiliza también en la medicina tradicional yucateca para curar las quemaduras de los corales de fuego, organismos del género *Millepora* (*Phylum: Cnidaria*), que se encuentran regularmente en los arrecifes coralinos de los mares tropicales (Lewis, 1989). Se ha descrito que el contacto con organismos de este género produce severas lesiones en la piel que incluyen quemaduras, eritema y

una erupción que dura varios días (Hashimoto, 1979). A la fecha se desconoce cual es la naturaleza química y el mecanismo de acción de las toxinas producidas por estos cnidarios, ya que las investigaciones relacionadas con especies de este género son muy escasas. Se sabe, por ejemplo, que los extractos crudos de *M. tenera* y *M. alcicornis* son letales para ratones y poseen actividad hemolítica y demonecrótica (Wittle y col., 1974). También, se ha demostrado que el extracto acuoso de *M. complanata* produce un efecto hemolítico, estimula las contracciones espontáneas del íleon de cobayo (Rojas y col., 2002) y aumenta el tono del músculo liso arterial de rata. Con base en esta información, resulta factible pensar que la resina de *B. simaruba* contiene compuestos que contrarrestan alguno de los efectos presentados por los extractos de los hidrocerales. De hecho se ha comprobado que el extracto de AcOEt preparado con la corteza de *B. simaruba* inhibe la hemorragia inducida en ratones por la inyección intradérmica del veneno de la víbora *Bothrops asper*. A partir de este extracto se purificó un flavonoide, que se piensa que es el responsable del efecto antihemorrágico (Castro y col., 1999).

#### II.4 Fundamento de las técnicas cromatográficas

La cromatografía se define como una técnica o método físico de separación basado en las diferentes velocidades con que se mueven los solutos disueltos en un disolvente llamado eluyente (fase móvil), a través de un medio estacionario o fijo. Los componentes a separar se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria. Como los componentes de la mezcla presentan diferente tendencia a permanecer en cualquiera de las fases, la separación se da por el movimiento de la fase móvil en relación con la estacionaria y es resultado de la distribución de las sustancias entre las dos fases. Las moléculas que son solubles en la fase móvil serán eluidas más rápido que las que son más solubles en la fase estacionaria y que tienden a quedar retenidas. En resumen la cromatografía se fundamenta en la separación diferenciada de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria, sólida o líquida, y la fase móvil, líquida o gaseosa (Valcarcel, 1990).



Los fenómenos responsables de los procesos de retención y separación son la adsorción y la absorción. La adsorción se refiere a la fijación o retención de un compuesto entre la superficie de las dos fases y se relaciona con fuerzas químicas y físicas que dependen de la naturaleza química de la sustancia adsorbida, de la temperatura, la naturaleza del absorbente y la concentración. La absorción involucra la retención de un compuesto en un material y depende de la tendencia que tiene el este compuesto a formar una mezcla o a reaccionar químicamente con el material absorbente (Valcarcel, 1990).

En la cromatografía de adsorción existe lo que se conoce como "fase normal" y "fase reversa". En la fase normal, la fase móvil es un disolvente no polar (hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc) y la fase estacionaria es polar (generalmente sílica). Por otra parte, en la fase reversa, la fase móvil es un disolvente polar (agua, soluciones "amortiguadoras de pH", acetonitrilo, metanol, etc.) y la fase estacionaria es nopolar (generalmente sílica conjugada con cadenas hidrocarbonadas de 8 y 18 átomos de carbono [C8 y C18]) (Valcarcel, 1990).

La cromatografía en columna es usada para separar mezclas complejas de compuestos. En esta técnica se empaca una columna de vidrio vertical con un adsorbente junto con un disolvente apropiado, con el cual se planea iniciar la elusión de la columna. La muestra se aplica en la parte superior de la columna y posteriormente, se eluye la fase móvil a través de la columna para separar los diferentes componentes de la mezcla. Los componentes de la mezcla en la columna están sometidos a dos fuerzas opuestas: la del disolvente que tiende a disolver los compuestos y la del adsorbente que tiene la tendencia a adsorberlos. De tal manera que la disolución y la adsorción constituyen un proceso de equilibrio, en el que algunas moléculas de la muestra son adsorbidas y otras dejan el adsorbente para ser eluidas por el disolvente, solo para ser re-absorbidas un poco más abajo en la columna. Un compuesto, que es altamente soluble en el disolvente, pero que no se adsorbe fuertemente, se mueve a través de la columna

relativamente rápido. Por otro lado, un compuesto que es más fuertemente atraído por el adsorbente se mueve a través de la columna de manera más lenta. (Fessenden, 1998).

Debido a las diferencias en las velocidades a las cuales los compuestos se mueven a través del adsorbente en la columna, la mezcla de compuestos se separa en bandas, cada compuesto formando su propia banda que se mueve a través de la columna a su propia velocidad. Las bandas son finalmente eluidas y recolectadas por la parte inferior de la columna, de manera individual (Fessenden, 1998).

El proceso de adsorción se origina en las atracciones intermoleculares que existen entre las moléculas del adsorbente y las moléculas presentes en una mezcla. Estas atracciones intermoleculares incluyen interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno, las cuales se ilustran en la Figura 2 (Fessenden, 1998).

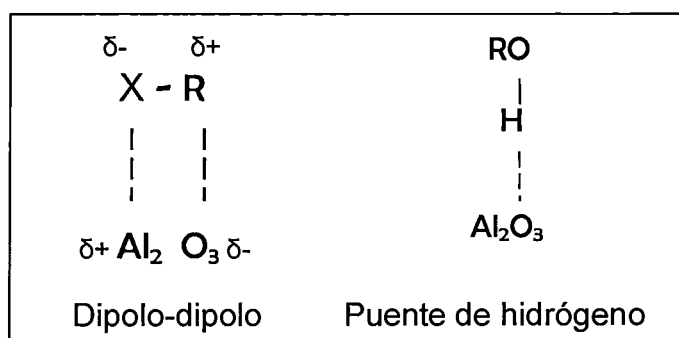


Figura 2. Interacciones dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno.

Diferentes tipos de adsorbentes atraen diferentes tipos de moléculas. Un adsorbente altamente polar adsorbe fuertemente moléculas polares, pero no tiene mucha atracción por moléculas no polares, como los hidrocarburos. Por esta razón, en una fase móvil polar, los compuestos no polares comúnmente son eluidos primero y los compuestos más polares tardan más tiempo en eluir. Debido a que las diversas fases estacionarias difieren en su poder adsorbente, la forma de escoger

una determinada fase estacionaria para una separación por cromatografía en columna, depende en gran medida del tipo de compuestos que se van a separar. Los adsorbentes más usados en cromatografía, en orden de menor a mayor poder de adsorción para moléculas polares, son: la alúmina, el carbón activado, el silicato de magnesio, la sílica gel, los carbonatos inorgánicos, la celulosa y la sucrosa (Valcarcel, 1990).

Generalmente, los disolventes más utilizados en cromatografía, son compuestos orgánicos. Estos también pueden ser adsorbidos por el adsorbente de la columna y competir con los componentes de la muestra por una posición. Sin embargo, los disolventes no polares no son tan altamente atraídos por el adsorbente como lo son otros compuestos orgánicos. La acción de un disolvente o de una serie de disolventes, puede ser usada para aumentar la efectividad de la separación. En una cromatografía de fase normal, se empieza por eluir la columna con el disolvente menos polar y se continúa aumentando la polaridad, hasta llegar a un disolvente muy polar. Los disolventes más empleados en cromatografía en columna, de menor a mayor polaridad, son: el éter de petróleo, el hexano, el benceno, el diclorometano, el éter dietílico, el acetato de etilo, la acetona, el metanol y el ácido acético (Fessenden, 1998). Las limitaciones clásicas en cromatografía en columna abierta son: separaciones lentas, adsorción irreversible de solutos e incompatibilidad con partículas granulométricas pequeñas (Hostettmann y col., 1986).

En la cromatografía en columna abierta de fase normal se utiliza 1 g de sílica gel por cada 30 mg de muestra, siempre y cuando los compuestos en la mezcla tengan valores de  $R_f$  muy diferentes entre sí. Cuando los compuestos tienen valores de  $R_f$  similares, se utilizan 10 mg de muestra por 1 g de soporte. En casos especiales, por ejemplo cuando se quieren separar mezclas de terpenos hidrocarbonados y terpenos oxidados presentes en aceites esenciales, se recomienda aplicar 1 g de aceite esencial por cada 10 g de sílica gel (Hostettmann y col., 1986).

### III. HIPÓTESIS

La resina de *Bursera simaruba* contiene metabolitos secundarios, que inhiben la actividad hemolítica producida por el extracto acuoso de *Millepora complanata*.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Realizar el estudio fitoquímico de la resina de *Bursera simaruba*, con el objeto de aislar los principales metabolitos secundarios y determinar si los compuestos purificados inhiben el efecto hemolítico inducido por el extracto acuoso de *Millepora complanata*.

### IV.2 Específicos

- Preparar el extracto de acetato de etilo (AcOEt) de la resina de *Bursera simaruba*.
- Realizar el fraccionamiento del extracto por métodos cromatográficos.
- Efectuar la separación y purificación de los principales metabolitos secundarios.
- Realizar la identificación de los compuestos aislados, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar si el extracto y los compuestos puros inhiben el efecto hemolítico inducido por el extracto acuoso de *Millepora complanata*.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Material vegetal

La resina fue recolectada en junio del 2005 a partir del árbol de *B. simaruba* en Cancún Quintana Roo, México, por el Dr. Enrique Lozano Álvarez de la Unidad Académica "Puerto Morelos" ICMYL-UNAM.

#### V.1.2 Obtención del extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba*.

El extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba*, se preparó vía maceración, durante una semana, a partir de 20.36 g de la resina. El extracto resultante se concentró al vacío.

Para la realización del ensayo hemolítico se preparó el extracto acuoso, disolviendo directamente la resina (12.12 mg) en 1000 µl de agua desionizada.

#### V.1.3 Análisis cromatográficos

Para efectuar la cromatografía en columna abierta se utilizó gel de sílice Kiesegel 60 Merck (0.2 a 0.5 mm, 30-70 mesh). Los análisis cromatográficos en capa fina (ccf) se efectuaron en placas de aluminio de gel sílica (sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck) de 20 x 20 cm, utilizando varios sistemas de elusión y sulfato cérico como agente cromógeno (Cuadro 3).

Cuadro 3. Agentes cromógenos utilizados para los análisis de ccf .

Agente revelador	Composición	Referencia
Sulfato cérico	Sulfato amoniacal 12.0g	Stahl, 1969
	Acido sulfúrico concentrado 22.5ml	
	Hielo picado 350.0g	
Vainillina	Vainillina 10.0 g	Stahl, 1969
	Ácido sulfúrico 10.0ml	

## V.2 Métodos

### V.2.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba* y separación por columna abierta de los metabolitos secundarios mayoritarios

Se utilizaron 92.52 g de sílica gel para la columna, de los cuales 12.78 g de sílica (10% de la sílica total), se desactivaron con agua destilada y se mezclaron con el extracto de AcOEt de la resina. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de Hexano:AcOEt en diferentes proporciones. Se recolectaron las fracciones y se reunieron por similitud cromatográfica.

### V.2.2 Purificación

La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna usando fases estacionarias que incluyeron sílica gel y C<sub>18</sub>.

### V.2.3 Elucidación estructural

Se utilizó RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y espectrometría de masas para la elucidación de las estructuras químicas de los metabolitos secundarios purificados.

## V.3 Ensayos biológicos

### V.3.1. Ensayo hemolítico

Se indujo hemólisis con un extracto acuoso de *M. complanata* (1.8 µg/ml), para observar si el extracto acuoso de *B. simaruba* (1000 µg/ml) inhibe el efecto hemolítico. Esto se realizó de la siguiente manera: se lavaron eritrocitos de sangre fresca de rata (275 - 325 g) varias veces en una solución de Alsever (pH de 6 a 6.5; 120 mM D-glucosa, 30 mM citrato de sodio, 7 mM NaCl y 2 mM ácido cítrico). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 µl de una suspensión de eritrocitos al 1% en solución de Alsever y la cantidad requerida de muestra a evaluar, los tubos se llevaron a un volumen de 1 ml con solución de Alsever, ver Cuadro 4.

Cuadro 4. Preparación de muestras para el ensayo hemolítico

Muestra	Suspensión de eritrocitos al 1%	Concentración de muestra ( $\mu\text{g/ml}$ )	Solución de Alsever
Control 0% hemólisis	50 $\mu\text{l}$	-	950 $\mu\text{l}$ (de agua destilada)
Control 100% hemólisis	50 $\mu\text{l}$	-	950 $\mu\text{l}$
Extracto de <i>M. complanata</i> acuoso (A)	50 $\mu\text{l}$	1.8	945 $\mu\text{l}$
Resina de <i>B. simaruba</i> acuoso (B)	50 $\mu\text{l}$	1000	900 $\mu\text{l}$
A+B	50 $\mu\text{l}$	1.8 de A 1000 de B	895 $\mu\text{l}$

Las muestras así preparadas, primero se dejaron reposar por 21 horas a 4 °C y posteriormente, se incubaron durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a 2 500 rpm durante 4 minutos a 4 °C y el resultado de la hemólisis se evaluó mediante la liberación de hemoglobina, haciendo lecturas en un espectrofotómetro (Lambda Bio, Perkin Elmer Co.) a una longitud de onda de 415 nm. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de hemoglobina liberada comparado con la hemoglobina presente en la hemólisis total producida por la suspensión de las muestras de eritrocitos en agua desionizada, en lugar de la solución de Alsever. Una unidad hemolítica ( $\text{UH}_{50}$ ) se definió como la cantidad de proteína de muestra requerida para producir un 50 % de hemólisis.



## VI. RESULTADOS

VI.1 Fraccionamiento cromatográfico del extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba* y separación por columna abierta de los metabolitos secundarios mayoritarios

Se recolectaron 442 fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica, obteniéndose un total de 21 fracciones primarias. En la Figura 3 se resume el proceso de extracción y el fraccionamiento primario del extracto total de la resina de *B. simaruba*.

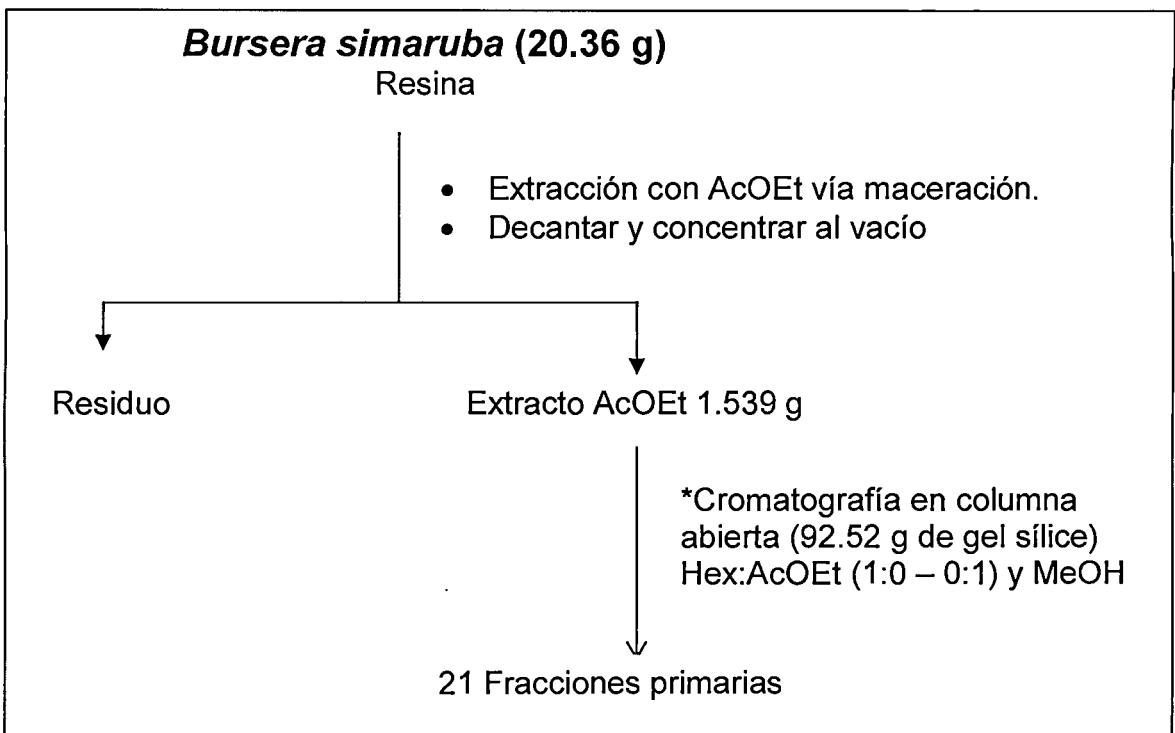


Figura 3. Extracción y fraccionamiento primario del extracto total AcOEt de la resina de *B. simaruba*.

En el Cuadro 5 se resume el fraccionamiento primario, mediante cromatografía en columna, del extracto total de la resina de *B. simaruba* y se

incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y las fracciones combinadas.

Cuadro 5. Fraccionamiento, mediante cromatografía en columna abierta, del extracto de AcOEt de *B. simaruba* .

<b>Eluyente</b>	<b>Proporción (%)</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Número de Fracciones</b>	<b>Fracciones combinadas</b>
Hex	100	1800	1-89	F1 (1-9) F2 (10-19)
Hex-AcOEt	98:20	300	90-110	F3 (20-37) F4 (38-42)
Hex-AcOEt	95:50	280	111-125	F5 (43-122) F6 (123-135)
Hex-AcOEt	90:10	1000	126-178	F7 (136-137) F8 (138-144)
Hex-AcOEt	85:15	2400	179-270	F9 (145-160) F10 (161-187)
Hex-AcOEt	80:20	400	291-310	F11 (188-200) F12 (201-205)
Hex-AcOEt	70:30	1000	311-356	F13 (206-237) F14 (238-261)
Hex-AcOEt	60:40	400	357-376	F15 (262-294) F16 (295-314)
Hex-AcOEt	50:50	800	377-418	F17 (315-324) F18 (325-330)
AcOEt	100	300	419-432	F19 (331-349) F20 (350-387)
MeOH	100	180	433-442	F21 (388-442)

A partir de las fracciones primarias F5, F7 y F8, se separaron 3 metabolitos secundarios que se denominaron BS1, BS2 y BS3. En la Figura 4 se muestra la cromatografía en capa fina en la que se observan las fracciones que contienen los 3 compuestos separados.

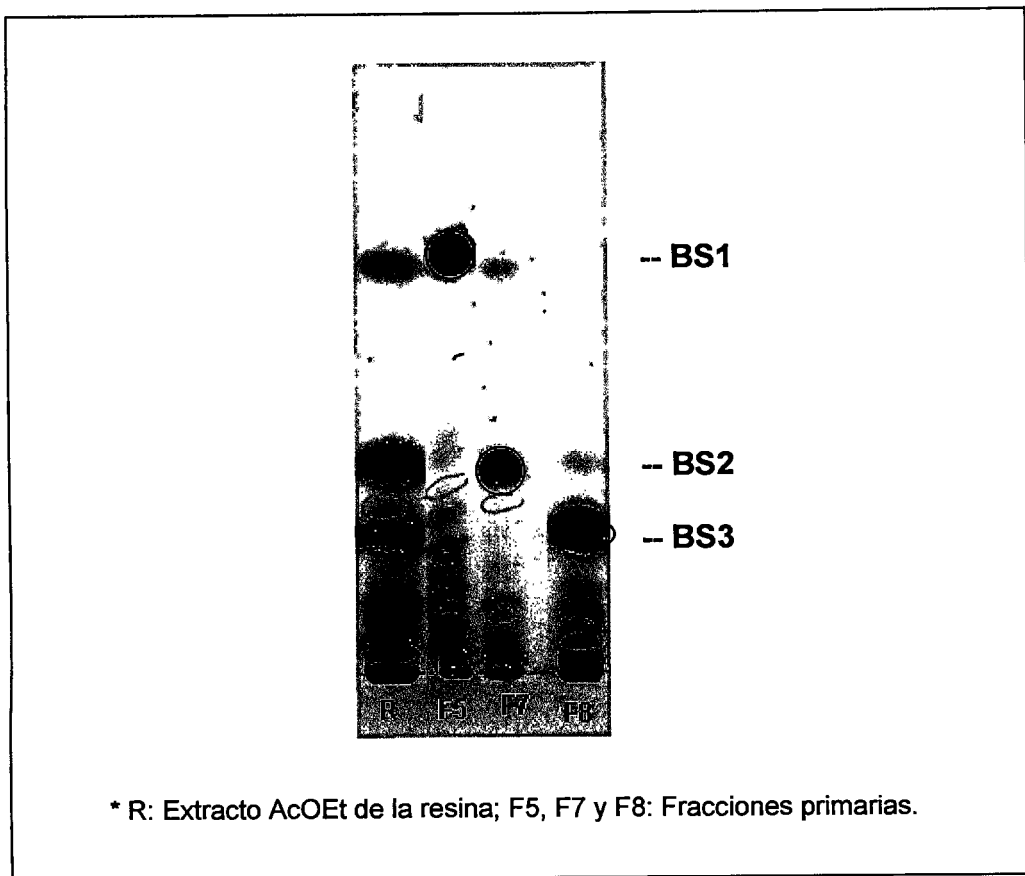


Figura 4. Cromatopla de las fracciones primarias F5, F7 Y F8 y sus metabolitos secundarios BS1, BS2 y BS3.

## VI.2 Purificación de los metabolitos secundarios BS1 y BS3.

### VI.2.1 Purificación de BS1 a partir de la fracción primaria F5

La fracción F5 se sometió a un fraccionamiento secundario a fin de purificar el compuesto mayoritario de la fracción, que se denominó BS1. La purificación de

este compuesto se realizó por cromatografía en columna, obteniéndose 60 mg de BS1 que se obtuvo en forma de un polvo blanco amorfo, con un punto de fusión de 170-172°C. En la Figura 5 se muestra la cromatografía en capa fina que muestra la purificación de BS1.

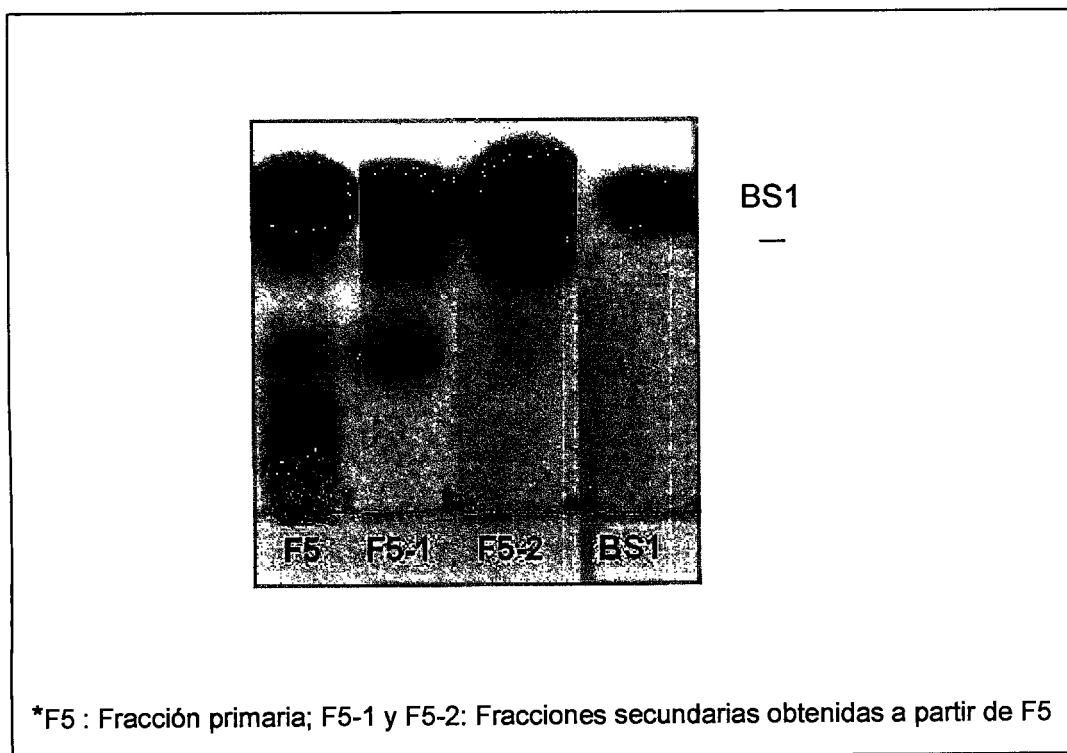


Figura 5. Cromatoplaqueta de la purificación del compuesto BS1 a partir de F5

#### VI.2.2 Purificación de BS3 a partir de la fracción primaria F8

La fracción F8 se sometió a un fraccionamiento secundario a fin de purificar el compuesto mayoritario de la fracción, que se denominó BS3. La purificación de este compuesto se realizó por cromatografía en columna, obteniéndose 5 mg de BS3, el cual es un polvo blanco con punto de fusión de 107 –109 °C . En la Figura 6 se muestra la cromatografía en capa fina correspondiente a la purificación de BS3.

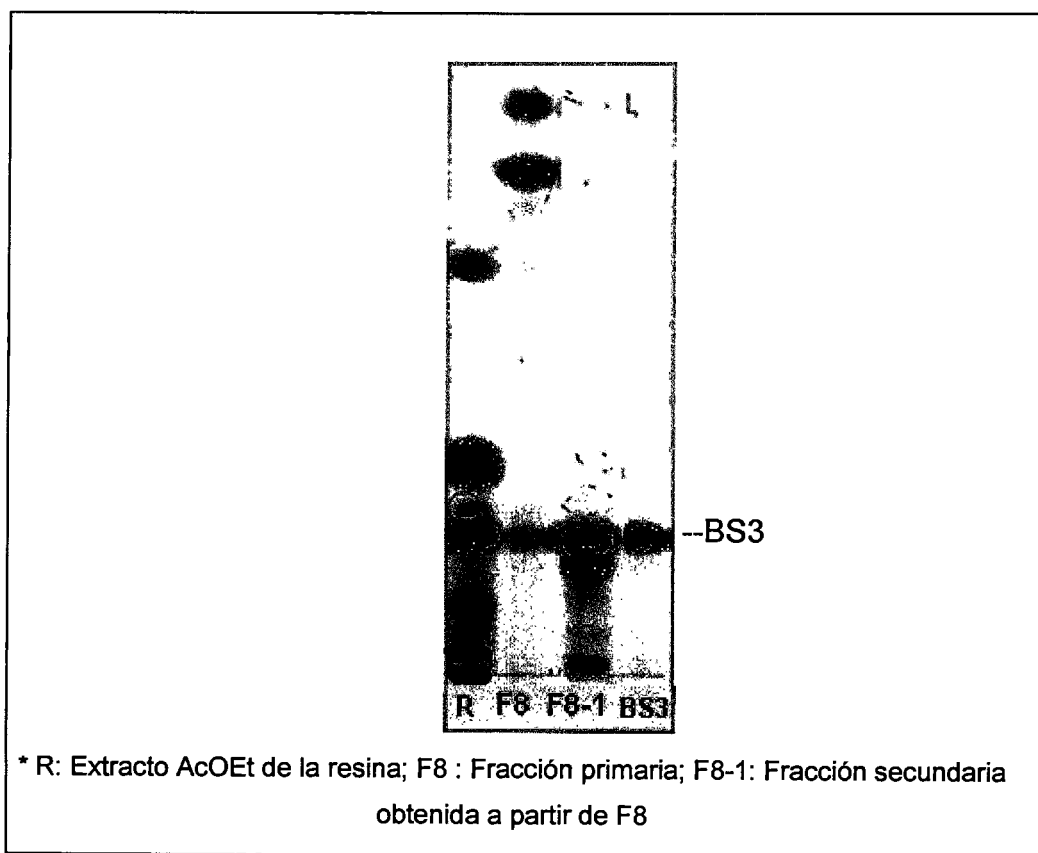


Figura 6. Cromatoplaqueta de la purificación del compuesto BS3 a partir de F8.

### VI.3 Elucidación estructural.

#### VI.3.1 Elucidación estructural de BS1

La elucidación estructural de BS1, aislado a partir de la fracción F5 de la resina de *B. simaruba* se realizó mediante espectrometría de masas y RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ). En la Figura 7 se muestra el cromatograma obtenido, mediante cromatografía de gases, de la fracción primaria F5 en el que se muestra el pico correspondiente al compuesto BS1. En la Figura 8 se muestra el espectro de masas de BS1 y las Figuras 9 y 10 corresponden a los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN, respectivamente. En la Figura 11 se muestra la estructura molecular del compuesto BS1.

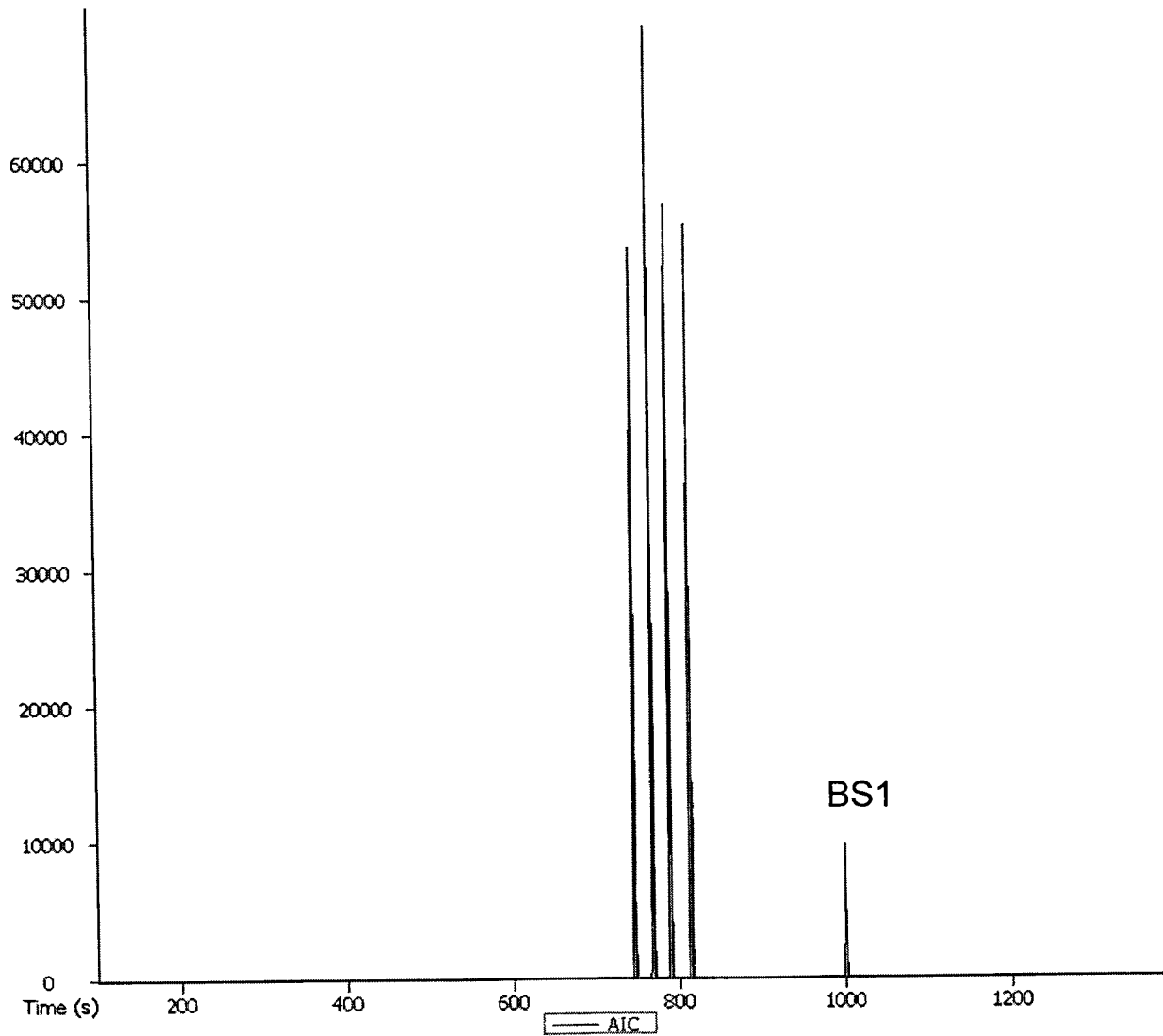


Figura 7. Cromatograma (por cromatógrafo de gases), de la fracción primaria F5 en el que se muestra el pico correspondiente al compuesto BS1.

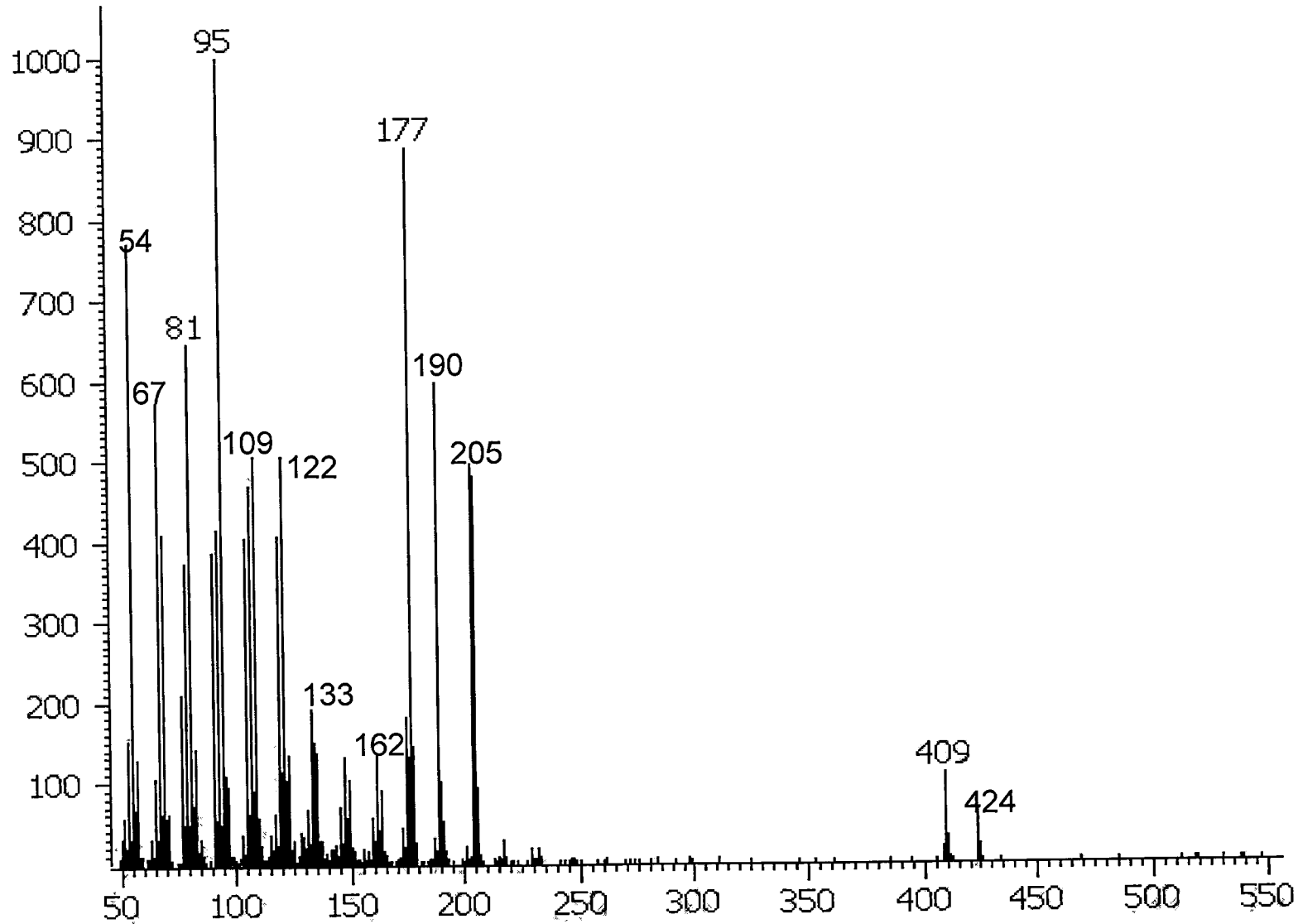


Figura 8. Espectro de masas de BS1.

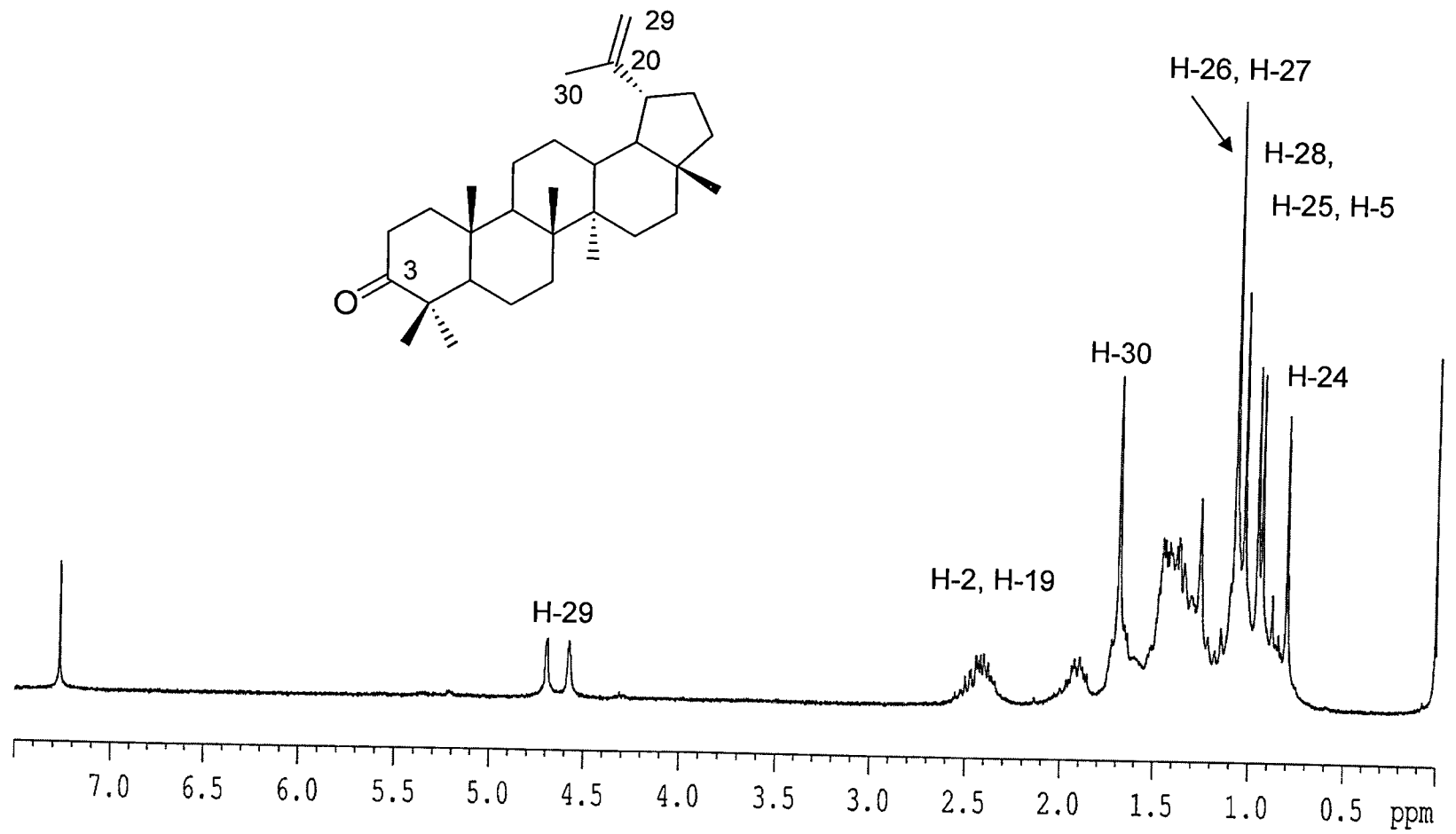


Figura 9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de BS1



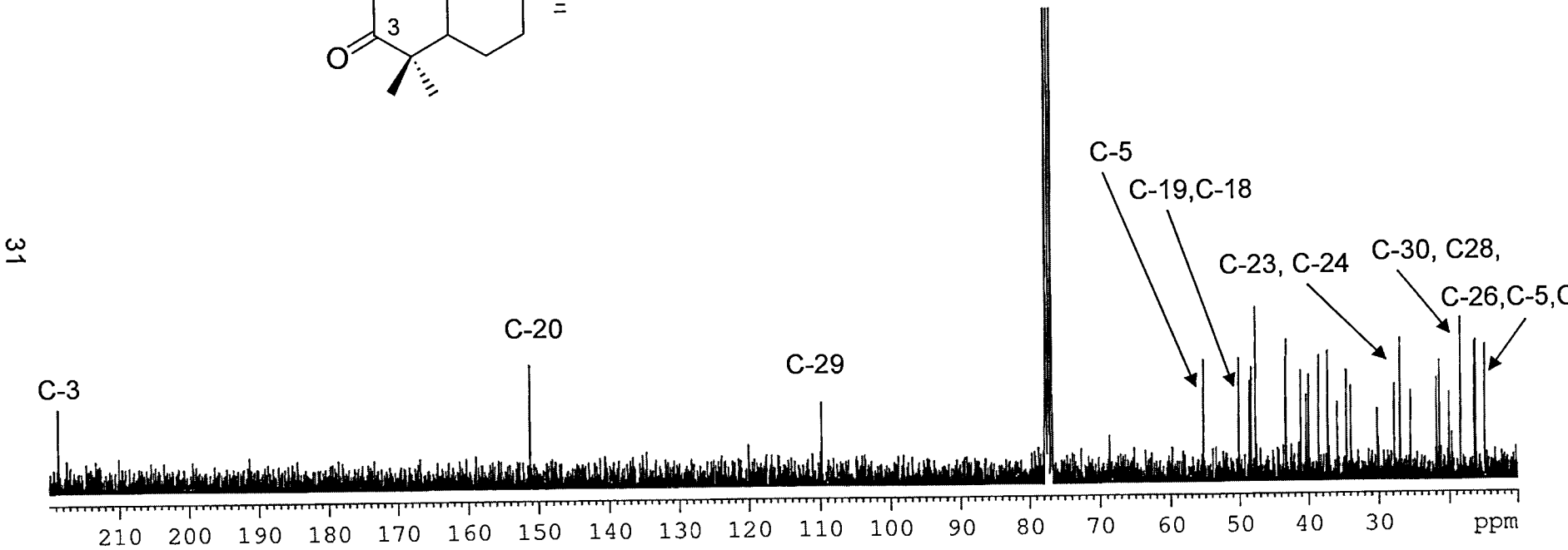
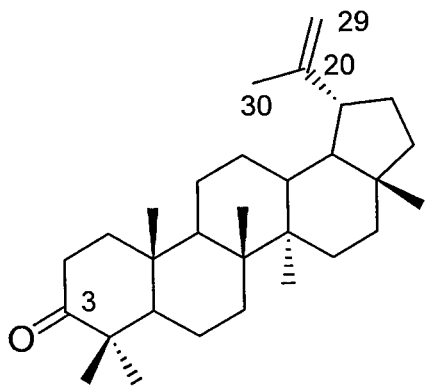


Figura 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de BS1

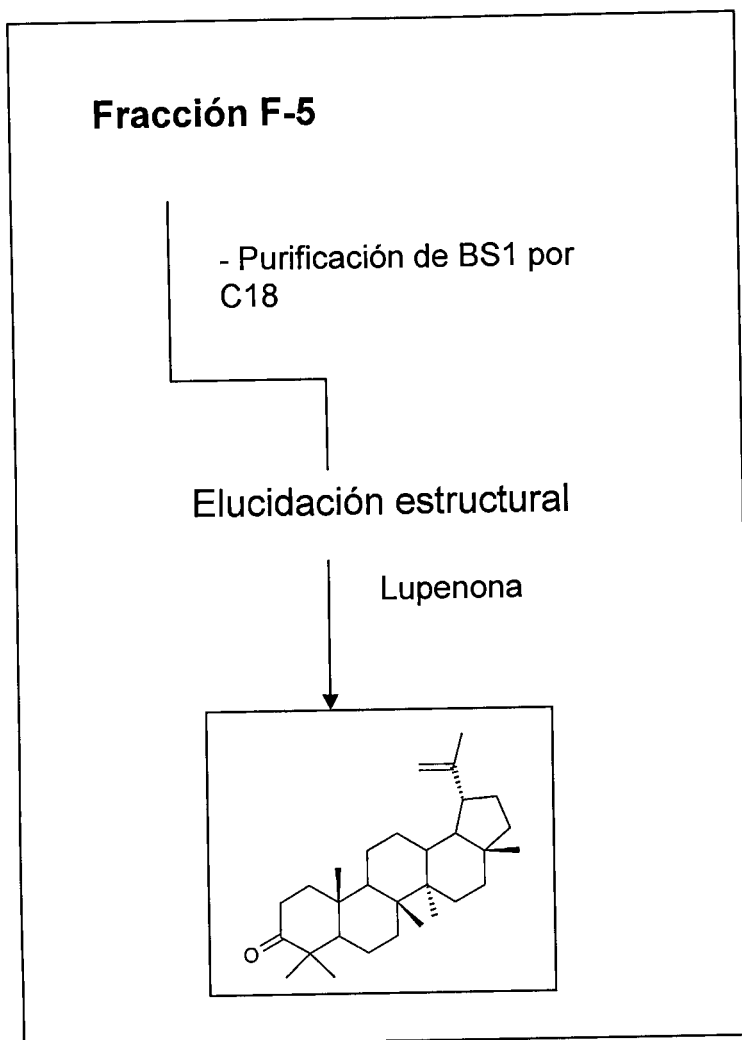


Figura 11. Aislamiento y purificación de la lupenona, (1R,3aR,4S,5aR,7aR,11aR,-11bR,13aR,13bR)-1-Isopropenil-3a,5a,5b,8,8,hexametil-eicosahidro-ciclopenta[a]crisen-9-ona) presente en la fracción F-5 de la resina de *B. simaruba*.

### VI.3.2 Elucidación estructural de BS3

La elucidación estructural de BS3, aislado a partir de la fracción F8 de la resina de *B. simaruba*, se realizó mediante RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).

En la Figura 12 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de BS3 y en la Figura 13 el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN.

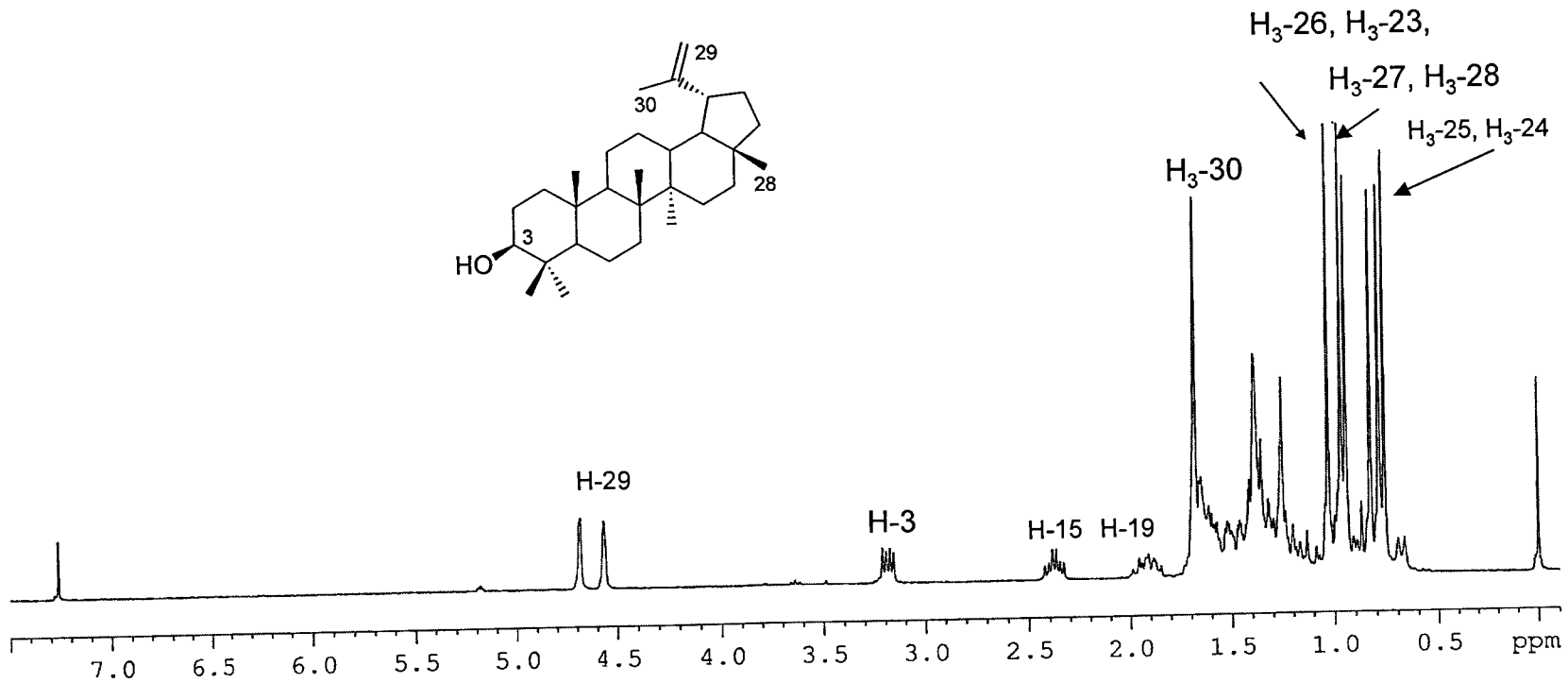


Figura 12. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de BS3

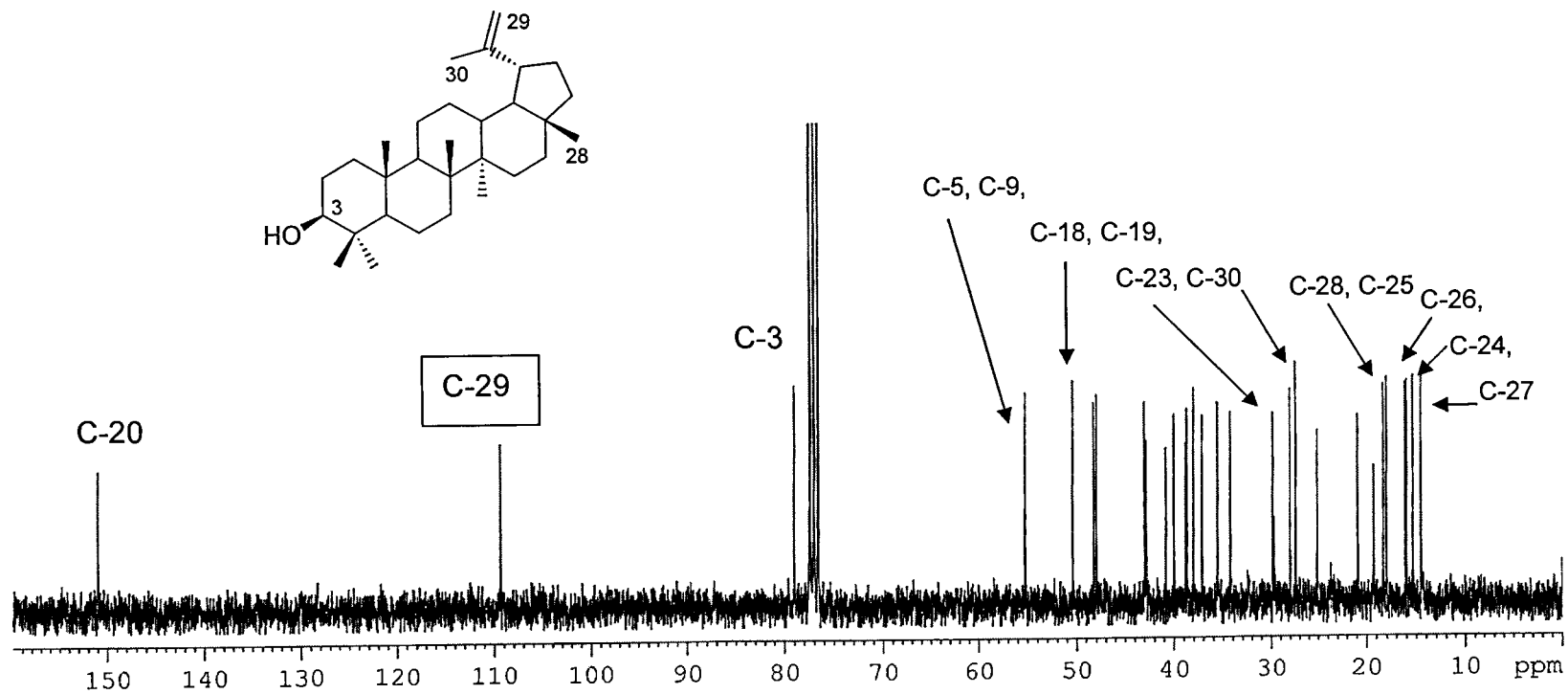


Figura 13. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de BS3

## VI.4. Ensayos Biológicos

### VI.4.1 Ensayo hemolítico

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos a partir de la evaluación del efecto del extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba* sobre la hemólisis inducida por el extracto acuoso de *M. complanata*. En dicho Cuadro se muestra el porcentaje de hemólisis producido por cada una de las muestras, las cuales fueron: el extracto acuoso de *M. complanata*, el extracto acuoso de la resina de *B. simaruba* y una combinación de ambos, para comprobar si hay o no inhibición de la hemólisis inducida por el extracto de *M. complanata*.

Cuadro 6. Resultados del ensayo hemolítico

Muestra	Absorbancia promedio	% de hemólisis
Control 0% hemólisis	0.168	0 %
Control 100% hemólisis	0.908	100 %
Extracto de <i>M. complanata</i> acuoso (A) 1.8 µg/ml	0.563	* 53.10 % ± 8.47
Resina de <i>B. simaruba</i> acuoso (B) 1000 µg/ml	0.177	1.22 % ± 1.30
A+B A: 1.8 µg/ml B: 1000 µg/ml	0.543	* 50.77 % ± 5.48

Los valores están expresados en medias ± S.D.; n = 4 ; p = 0.05

- Las medias mostradas no son significativamente diferentes.

## VII. DISCUSIÓN

*B. simaruba*, comúnmente conocida como palo mulato, es un árbol distribuido en zonas tropicales de Latinoamérica y Sudamérica. Particularmente, la resina de este árbol se emplea para curar diversas lesiones de la piel. En la medicina tradicional de Yucatán la resina se emplea, de forma tópica, para curar las quemaduras de los corales de fuego (*Millepora sp.*). Los estudios químicos y/o farmacológicos sobre *B. simaruba* son escasos y han demostrado que esta planta contiene lignanos con actividad citotóxica y antiinflamatoria, un terpeno con efecto antimicrobiano y un flavonoide con actividad antihemorrágica. Sin embargo a la fecha se desconocen cuales son los compuestos responsables del efecto farmacológico que se le atribuye a la resina del árbol para curar las lesiones ocasionadas por los corales de fuego, y también se desconoce el mecanismo de acción mediante el cual, los compuestos bioactivos presentes en la resina ejercen su acción curativa. Por este motivo en el presente trabajo se realizó el estudio fitoquímico del extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba*.

El primer paso en la secuencia metodológica consistió en la obtención de la resina, mediante incisiones realizadas en el tronco del árbol, a partir de las cuales emana lentamente (ver Figura 14). La resina, de color café, es sumamente viscosa lo cual dificulta en gran medida su recolección, razón por la cual este proceso es muy lento.



Figura 14. Obtención de la resina del árbol de *B. simaruba*.

Una vez obtenida la resina se procedió a la preparación del extracto orgánico, empleando como disolvente de extracción el AcOEt. Este disolvente se seleccionó con el objeto de extraer compuestos de polaridad baja e intermedia. El extracto se sometió a un fraccionamiento cromatográfico, mediante cromatografía de adsorción en columna de "fase normal" en la que la fase estacionaria fue sílica gel. Este procedimiento condujo a la obtención de 21 fracciones primarias (F1-F21), de las cuales se seleccionaron tres (F5, F7 y F8), que fueron las que presentaron menor complejidad en la cromatografía en capa fina y mostraron la presencia de tres compuestos mayoritarios. En esta tesis se presenta la purificación y la elucidación estructural de dos de los compuestos mayoritarios: BS1 y BS3 obtenidos a partir de F5 y F8, respectivamente.

#### VII.1 Elucidación estructural de BS1

El cromatograma de F5, obtenido mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Figura 7) mostró la presencia de cinco compuestos con tiempos de retención (*tr*) de: 767.54 s, 767.54 s, 788.84 s, 813.04 s y 999.79 s, entre los cuales se encuentra BS1 (*tr* = 999.79 s). El patrón de fragmentación, obtenido mediante análisis por espectrometría de masas, mostró que estos compuestos son de naturaleza terpenoide.

BS1 presenta una rotación óptica de  $[\alpha]_D +46^\circ$  (*c* 0.20, CHCl<sub>3</sub>). Su fórmula molecular se determinó como C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O a partir del ión molecular obtenido mediante espectrometría de masas de impacto electrónico de alta resolución (EMIE-AR), con una relación masa/carga (*m/z*) de 424.3699 (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, 424.3705). El patrón de fragmentación muestra picos a las siguientes *m/z*: 409 (8.1), 205 (50), 190 (60.1), 177 (88.6), 175 (18.7), 162 (13.9), 148(13.6), 133(19.6), 123(14.2), 122(50.6), 119(41.1), 109(50.9), 108(47.5), 105(40.5), 95(100), 94(41.8), 91(38.9), 82(14.8), 81(65.2), 79(37.3), 76(21.5), 68(41.1), 67(57.6), 57(13.5), 54(77.2) y 52(15.8). Los fragmentos más significativos son 205, 190, 177, 122, 109, 95, 81, 67 y 54 *m/e*, característicos de fragmentos de compuestos triterpénicos de esqueleto lupano ( Budzikiewicz y col. 1963).

El espectro de resonancia magnética nuclear protónica de hidrógeno,  $^1\text{H}$  RMN (Figura 9) mostró las absorbancias características para siete grupos metilo en  $\delta$  1.69 (3H, s, H<sub>3</sub>-30), 1.08 (6H, s, H<sub>3</sub>-23, H<sub>3</sub>-26), 1.03 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 0.96 (3H, s, H<sub>3</sub>-28), 0.93 (3H, s, H<sub>3</sub>-25), and 0.80 (3H, s, H<sub>3</sub>-24) y dos protones olefínicos en  $\delta$  4.69 (1H, s, H-29) y 4.58 (1H, s, H-29). En congruencia con la fórmula molecular propuesta y con los datos obtenidos a partir del espectro de  $^1\text{H}$  RMN, el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 10) del compuesto BS1 mostró señales para 30 carbonos, incluyendo aquellas correspondientes a los grupos metilo en  $\delta$  26.6 (C-23), 21.0 (C-24), 19.3 (C-30), 17.8 (C-28), 15.9 (C-26), 15.8 (C-25) y 14.5 (C-27); dos carbonos olefínicos en  $\delta$  150.9 (C-20) y 109.4 (C-29), y la absorbancia característica para un grupo carbonilo de cetona en  $\delta$  218.3 (C-3) (Mahato y Kundu, 1994). Con base en las evidencias obtenidas a partir del análisis de los datos espectrométricos y espectroscópicos, se determinó que la estructura de BS1 corresponde a un triterpeno pentacíclico, con un grupo carbonilo en C-3 y un exometileno. El compuesto se identificó como la (1R,3aR,4S,5aR,7aR,11aR,-11bR,13aR,13bR)-1-Isopropenil-a,5a,5b,8,8,hexametil-eicosahidro-ciclopenta[a] crisen-9-ona), conocida comúnmente como lupenona. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas obtenidas en el presente trabajo para este compuesto, coinciden con las reportadas en la literatura (Sholochin *et al.*, 1980; Prashant y Krupadanam, 1993). En el Cuadro 7 se muestran los datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para la lupenona.

## VII.2 Elucidación estructural de BS3

El compuesto BS3 presentó una rotación óptica de  $[\alpha]_D +26^\circ$  (c 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ). El espectro de resonancia magnética nuclear ( $\text{RMN}^1\text{-H}$ ) (Figura 12) muestra las señales diagnósticas para siete grupos metilo en  $\delta$  1.68 (3H, s, H<sub>3</sub>-30), 1.03 (3H, s, H<sub>3</sub>-26), 0.97 (3H, s, H<sub>3</sub>-23), 0.94 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 0.83 (3H, s, H<sub>3</sub>-28), 0.79 (3H, s, H<sub>3</sub>-25), y 0.76 (3H, s, H<sub>3</sub>-24). Resonancias para un metino oxigenado en  $\delta$  3.19 (1H, m) y para dos protones olefínicos en  $\delta$  4.68 (1H, s) y 4.57 (1H, s). En congruencia



con los datos descritos para el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 13) del compuesto BS3 muestra señales para 30 carbonos, incluyendo aquellos que corresponden a los grupos metilo en  $\delta$  29.7 (C-23), 19.3 (C-30), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 15.4 (C-24), y 14.6 (C-27), dos carbonos olefinicos en  $\delta$  150.9 (C-20) y 109.3 (C-29), y una señal asignable a un metino oxigenado en  $\delta$  79.02 (C-3). Con base en las evidencias descritas anteriormente, el compuesto BS3 se identificó como el lupeol. Los valores de las constantes espectroscópicas del compuesto BS3 corresponden con las descritas previamente en la literatura.

Cuadro 7. Datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos para la lupenona

<b>RMN de <sup>1</sup>H (250 MHz; CDCl<sub>3</sub>)</b>	<b><math>\delta</math></b>	<b>Mult.</b>	<b>H</b>
	0.80	s (3H)	H <sub>3</sub> -24
	0.93	s (3H)	H <sub>3</sub> -25
	0.96	s (3H)	H <sub>3</sub> -28
	1.03	s (3H)	H <sub>3</sub> -27
	1.08	s (6H)	H <sub>3</sub> -26, H <sub>3</sub> -23
	1.69	s (3H)	H <sub>3</sub> -30
	4.58	s (1H)	H-29
	4.69	s (1H)	H <sub>3</sub> -29
<b>RMN de <sup>13</sup>C (62,89 MHz; CDCl<sub>3</sub>)</b>	<b>C</b>	<b><math>\delta</math></b>	
	3	218.3	
	20	150.9	
	23	26.6	
	24	21.0	
	25	15.8	
	26	15.9	
	27	14.5	
	28	17.8	
	29	109.4	
	30	19.3	

El lupeol, purificado e identificado en el presente trabajo ya había sido previamente aislado a partir de la resina de *B. simaruba* (Peraza *et al.*, 1995). Sin embargo, la lupenona no se había aislado con anterioridad en ninguna especie del género *Bursera*. De tal forma que esta tesis constituye el primer reporte de la purificación de lupenona en una planta de este género.

Por otra parte, con relación a la determinación del efecto del extracto de AcOEt de la resina de *B. simaruba* sobre la hemólisis inducida por el extracto acuoso de *M. complanata*. En el presente trabajo se demostró que la resina no modifica el efecto hemolítico producido por el hidrocoral. Este resultado sugiere que la resina de la planta no contiene metabolitos secundarios que pudieran contrarrestar éste efecto tóxico producido por los corales de fuego.

Debido a que la identidad química de los compuestos responsables del efecto benéfico presentado por la resina de *B. simaruba* para el tratamiento de las lesiones ocasionadas por las especies del género *Millepora* se desconoce a la fecha, es importante continuar con el estudio químico y farmacológico de esta planta con el objeto de purificar y caracterizar los compuestos bioactivos responsables de los efectos farmacológicos que se le atribuyen a esta especie para curar las lesiones producidas por los corales de fuego.

## VIII. CONCLUSIONES

- El estudio fitoquímico de la resina de *B. simaruba* demostró que el extracto de AcOEt contiene principalmente metabolitos secundarios de naturaleza triterpénica
- Los triterpenos purificados de la resina son compuestos pentacíclicos con núcleo lupano.
- Uno de los metabolitos secundarios purificados a partir de la resina fue la (1R,3aR,4S,5aR,7aR,11aR,-11bR,13aR,13bR)-1-Isopropenil-3a,5a,5b,8,8, hexametil-eicosahidro-ciclopenta[a]crisen-9-ona, conocida comúnmente como lupenona
- Otro de los metabolitos fue identificado como el lupeol.
- Este trabajo constituye el primer reporte de la presencia de la lupenona en una especie del género *Bursera*.
- La resina de *B. simaruba* no inhibió la hemólisis producida por el extracto acuoso de *M. complanata*.
- La identidad química de los compuestos responsables del efecto benéfico presentado por la resina de esta planta para el tratamiento de las lesiones ocasionadas por los corales de fuego, se desconoce a la fecha. También se desconoce el mecanismo de acción de dichos compuestos.
- Es importante continuar con el estudio químico y farmacológico de esta especie con el objeto de purificar y caracterizar los compuestos bioactivos responsables de los efectos farmacológicos que se le atribuyen a esta especie para curar las lesiones producidas por los corales de fuego

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Budzikiewicz, H., Wilson, J.M. y Djerassi, C., 1963.** Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. Pentacyclic Triterpenes. Journal American Chemistry Society: Vol 85: 3688-3699.
- Camporese, A., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Morselino, N., De Simona, F. y Tubazo, A. 2003.** Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belice (Central America). Journal of Ethnopharmacology:Vol.87:103-107.
- Castro, O., Gutiérrez, J.M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M. y Umaña, E. 1999.** Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales, Revista de Biología Tropical:Vol.47:605-611.
- Dang, C. T., 2006,** Drug treatments for adjuvant chemotherapy in breast cancer: recent trials and future directions. Expert Review of Anticancer Therapy: Vol. 6: 427-436.
- Duwiejua, M., Zeitlin, I. J., Waterman, P.G., Chapman, J., Mahango, G. J. y Provan, G. J., 1993.** Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae, Planta Médica:Vol.59:12-6.
- Erdemoglu, N., Sener, B. y Choundhary, Ml., 2004.** Bioactivity of lignans from *Taxus baccata*. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences: Vol. 59: 494-498.
- Evans, W.C., Farmacognosia, ED. Interamericana-Mc Graw Hill, 13 ed., 1991,** México, df. , 205-206.
- Fessenden, R. J. y Fessenden, J.S., 1998.** Techniques and Experiments for Organic Chemistry. 6ª ed., Willard Grant Press, Boston: 105-108.
- Ji, Y., Bi, J. N., Yan, B. y Zhu, XD. 2006.** Taxol- producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, Chinese Journal of Biotechnology: Vol. 22: 1-6.
- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Teng, G., Ma, C., Van HUNG, N., Cuong, N. M., Bunyapraphatsara, N., y Soejarto, D.D. 2005.** Bioactives constituents from roots of *Bursera tonkinesis*. Journal of Phytochemistry: Vol.66:2745-2751.

- Hashimoto, Y., 1979.** Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1-151.
- Hernández, J. D., Román, L.U., Cerda, C.M. y Nathan, P.J. 2005.** Verticillane derivatives from *Bursera suntui* and *Bursera kerberi*. Journal of Natural Products: Vol.68:1598-1602.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M. y Marston, A., Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation., Th. Müntzer, Berlin, 1986**
- Jin, Y., Williamns, D. C., Croteau, R. y Coates, R. M., 2005.** Taxadiene synthase-catalyzed cyclization of 6-fluorogeranyl diphosphate to 7-fluorovercillenes. Journal American Chemistry Society: Vol. 127:7834-7842.
- Kikkawa, F., Nawa, A., Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, K. y Nomura, S., 2006.** Advances in treatment of epithelial ovarian cancer. Nagoya Journal of Medical Science: Vol. 68: 19-26.
- Lewis, J., 1989.** Coral Reefs ecosystems, 4ta ed. Academic Press, Londres: 127.
- Mahato, S. y Kundu A., 1994.** <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- a compilations ans some salient features. Phytochemistry: Vol. 37: 1517-1575.
- Massarelli, E., y Herbst R. S., 2006,** Use of novel second-line targeted therapies in non-small cell lung cancer. Seminars in Oncology: Vol. 33: 9-16.
- Nakanishi, T., Inatomi, Y., Murata, H., Shigeta, K., Iida, N., Inada, A., Murata J., 2002.** Phytochemical study on American plants I. Two new phenol glucosides, together with known biflavones and diterpene, from leaves of *Juniperus occidentalis* Hook. Chemical Pharmaceutical Bulletin: Vol. 10: 1358-1361.
- Nakanishi, T., Inatomi, Y., Murata, H., Shigeta, K., Iida, N., Inada, A., Murata J., Pérez, M.A., Inhuma, M., Tanaka, T., Tajina, S., y Oku N. 2005.** A new and known cytotoxic aryltretalin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. Chemical Pharmaceutical Bulletin: Vol. 53:229-231.
- Peraza, S. R. y Peña, L.M. 1992.** Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. Journal of Natural Products: Vol. 55: 1768-1771.
- Peraza, S. R., Salazar N.E. y Peña, L.M. 1995.** A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. Journal of Natural Products: Vol. 58: 271-274.

- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J. I., Fergrino, A. y Heimer de la Cotera, E. 2002.** Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *M. complanata*, *Toxicon*: Vol. 40: 777-785
- Stahl, E. 1969.** Thin layer chromatography. Academic Press Inc. New York.
- Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altiner, G. y Tubazo, A. 2002.** Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology* :Vol. 81: 211-215.
- Valcarcel, M y Gómez, A., 1990.** Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté. Barcelona: 335-336, 597-613.
- Vahadilla, A. P., Littell, R., Krasner, C. y Duska, L. R. , 2006.** Treatment of uterine papillary serous carcinoma with platinum-based chemotherapy and paclitaxel. *International journal of gynecological cancer*: Vol. 16: 267-272.
- Wittle, L y Wheeler, C., 1974.** Toxic and immunological proprieties of stinging coral toxin. *Toxicon*:Vol. 12: 487-493.
- Yasunaka, K., Fumiko, A., Nagayama, A., Hokabe, H., Lozada, Lucio, López, E., Estrada, M., Aguilar, A. y Reyes, R. 2005.** Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 97: 293-299.
- You, Y. 2005.** Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. *Current pharmaceutical design*: Vol. 11: 1695-1717.
- Zamora, N.; González J. y Poveda, L. J. 1999.** Árboles y Arbustos del Bosque Seco de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica.