



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Actividad antiinflamatoria y antihistamínica
de los triterpenos aislados de
Bursera cuneata

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN FARMACIA
PRESENTA
MAGDALA ZULEMA FIGUEROA SUÁREZ

BAJO LA CO-DIRECCIÓN DE:

Dra. Verónica Rodríguez López
Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa

Cuernavaca, Morelos 2019



El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio-12 de Farmacognosia y Química de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la co-dirección de la Dra. Verónica Rodríguez López y del Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa.



Las evaluaciones de actividad antihistamínica se realizaron en colaboración con el laboratorio de Neurofarmacología del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte.



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado a través de la beca con número de registro 1633060 durante los tres años de doctorado en Farmacia. El financiamiento de este proyecto fue concedido por CONACyT SEP-2004-CO2-47266/A-1, 56431, 82851, 80980, LN232693 y PROMEP-Redes.

I	ABSTRACT	1
II	RESUMEN	2
III	INTRODUCCIÓN	3
IV	ANTECEDENTES	6
	4.1 Inflamación	6
	4.1.1 Fases de la reacción inflamatoria	7
	4.1.2 Mediadores de la inflamación	9
	4.2 Terapia antiinflamatoria	13
	4.2.1 Antiinflamatorios glucocorticoides	13
	4.2.2 Antiinflamatorios no esteroides	16
	4.2.3 Compuestos antiinflamatorios de origen natural	18
	4.3 Familia Burseraceae	23
	4.3.1 Descripción Botánica	25
	4.3.2 Distribución en México	25
	4.3.3 Taxonomía	25
	4.3.4 Estudios químicos y farmacológicos de la sección Bullockia	27
	4.4 <i>Bursera cuneata</i>	30
	4.4.1 Descripción Botánica	31
	4.4.2 Usos tradicionales	33
	4.4.3 Estudios químicos y farmacológicos de <i>Bursera cuneata</i>	33
V	JUSTIFICACIÓN	34
VI	HIPÓTESIS	36
VII	OBJETIVO GENERAL	37
VIII	OBJETIVOS PARTICULARES	38
IX	METODOLOGÍA	39
	9.1 Material vegetal	39
	9.2 Obtención de extractos	39
	9.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	39



9.4 Fraccionamiento Primario	42
9.5 Fraccionamiento Secundario	42
9.6 β -sitosterol (1) y α -amirina (2)	42
9.7 Ácido ursólico (3)	43
9.8 Ácido morónico (4)	43
9.9 Elucidación estructural	43
9.10 Modelo <i>in vivo</i> de edema inducido en oreja de ratón con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA).	43
9.11 Cuantificación de histamina por Cromatografía de alta resolución.	44
9.12 Análisis Estadístico	45
X. RESULTADOS	46
10.1 Identificación de <i>Bursera cuneata</i>	46
10.2 Obtención de extractos orgánicos de <i>Bursera cuneata</i>	46
10.3 Fraccionamiento del extracto diclorometánico de <i>Bursera cuneata</i>	46
10.4 Aislamiento de compuestos	47
10.5 Identificación de compuestos	47
10.5.1 β -sitosterol (1)	48
10.5.2 α -amirina (2)	51
10.5.3 Ácido morónico (3)	53
10.5.4 Ácido ursólico	56
10.6 Porcentaje de inhibición	58
10.6.1 Extractos	58
10.6.2 Fraccionamiento primario	59
10.6.2.1 Fraccionamiento secundario de FS-3	60
10.7 Actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de <i>B. cuneata</i> .	61
10.8 Dosis inhibidora media (ID ₅₀) del ácido morónico (3)	62



10.9 Actividad antihistamínica de los compuestos aislados de <i>B. cuneata</i> .	63
10.9.1 Dosis inhibidora media (ID ₅₀) del ácido morónico (3)	64
DISCUSIÓN	65
XI. CONCLUSIÓN	71
XII. PERSPECTIVAS	73
XIII. REFERENCIA	74
XIV. PUBLICACIONES	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Células inflamatorias y sus mediadores.....	8
Tabla 2. Mediadores primarios de origen celular.	10
Tabla 3. Mediadores secundarios de origen celular.	11
Tabla 4. Mediadores primarios de origen humoral.....	12
Tabla 5. Glucocorticoides agrupados de acuerdo a su estructura química...	15
Tabla 6. AINE agrupados de acuerdo a su estructura química.....	18
Tabla 7. Triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria.....	22
Tabla.8 β -sitosterol (1). Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz).....	50
Tabla 9. α -amirina (2). Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz).....	52
Tabla 10. Ácido morónico (3). Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz).....	49
Tabla 11. Ácido ursólico (4). Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz).....	57
Tabla 12. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos de <i>B. cuneata</i> a una dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.....	58
Tabla 13. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos de <i>B. cuneata</i> a una dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.....	59
Tabla 14. Evaluación del efecto antiinflamatorio de FS-3 a una dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.....	60
Tabla 15. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.....	61
Tabla 16. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.	63

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Dosis inhibitoria media (DI₅₀) de la actividad antiinflamatoria del ácido morónico (3).....	62
Gráfica 2. Dosis inhibitoria media (DI₅₀) de la actividad antihistamínica del ácido morónico (3).....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la Inflamación según su duración de tiempo.....	6
Figura 2. <i>Bursera cuneata</i>	30
Figura 3. Distribución de <i>B. cuneata</i> en Morelos.....	32
Figura 4. Aislamiento biodirigido.....	41
Figura 5. Triterpenos pentacíclicos con mayor actividad antiinflamatoria por sus estructuras químicas.....	67
Figura 6. Comparación de las estructuras químicas de ácido oleanónico (5) y ácido morónico (3) y su influencia para la actividad antiinflamatoria.....	68

LISTA DE COMPUESTOS

- β-sitosterol (**1**)
- α-amirina (**2**)
- Ácido morónico (**3**)
- Ácido ursólico (**4**)

LISTA DE ANEXOS

Espectro 1. RMN ¹ H de β-sitosterol CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	81
Espectro 2. RMN ¹ H de β-sitosterol CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	82
Espectro 3. RMN ¹³ C de β-sitosterol CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	83
Espectro 4. RMN ¹³ C de β-sitosterol CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	84
Espectro 5. RMN ¹ H de α-amirina CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	85
Espectro 6. RMN ¹ H de α-amirina CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	85
Espectro 7. RMN ¹ H de Ácido morónico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	86
Espectro 8. RMN ¹ H de Ácido morónico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	87
Espectro 9. RMN ¹³ C de Ácido morónico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	88
Espectro 10. RMN ¹³ C DEPT Ácido morónico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	89
Espectro 11. RMN ¹³ C DEPT Ácido morónico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	80
Espectro 12. RMN ¹³ C DEPT Ácido morónico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	91
Espectro 13. RMN ¹ H de Ácido ursólico CDCl ₃ . 400 MHz, δ (ppm).....	92

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AINE	Antitinflamatorios no esteroideo
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
BK	Bradicinina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
Cf	Concentración final
COX -1	Ciclooxigenasa 1
COX -2	Ciclooxigenasa 2
DAD	Detector de fotodiodos
DAG	Diacilglicerol
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetil sulfóxido
FLA2	Fosfolipasa 2
L	Litros
Mg	Miligramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PKC	Proteína cinasa C
PMN	Polimorfonucleares
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
°C	Grados Celsius

I. ABSTRACT

Many of the inflammatory diseases are becoming common in the aging society throughout the world. The clinical use of anti-inflammatory drugs suffers from the disadvantages of side effects and high cost of treatment. Traditional medicines and natural products offer a great hope for the search of bioactive lead compounds to the development of drugs to treat inflammatory diseases. Since ancient times traditional medicines and phytopharmaceuticals have been used for the treatment of inflammatory injuries and other disorders. *Bursera cuneata* (Schlecht.), Burseraceae, has been used in Mexican traditional medicine to treat conditions associated with inflammation processes. The objective of this study was to isolate compounds with anti-inflammatory and antihistaminic activities from the plant by a bioassay-guided fractionation. The dichloromethane extract was found to have the highest anti-inflammatory effect (89.1 + 2.2%) over the hexanic (53.3 + 1.2%) and methanolic (77.4 + 1.8%) extracts. FS-3 fraction obtained from the dichloromethane extract showed the highest anti-inflammatory activity and afforded the triterpenes β -sitosterol (1), α -amyrin (2), moronic acid (3), and ursolic acid (4). All compounds showed significant activity in comparison to indomethacin (39.8 + 0.8%), at 0.1 mg / mouse ear. However, moronic acid displayed the highest inhibitory effect (68.1 + 1.3%). Additionally, the histamine presented in the TPA treated mouse ear tissue was quantified. Ursolic acid (72.2 + 1.7%) and moronic acid (73.3 + 1.1 %) showed the highest antihistaminic activity. In conclusion, the results of the present study validated the use of *B. cuneata* in folk medicine for the treatment of inflammatory diseases.

Muchas de las enfermedades inflamatorias se están volviendo comunes en todo el mundo y se relacionan con el envejecimiento de la sociedad. Los fármacos antiinflamatorios utilizados clínicamente tienen la desventaja de efectos secundarios y alto costo de tratamiento. Alternativas a estos medicamentos son las medicinas tradicionales y los productos naturales, que ofrecen una gran esperanza en la identificación de compuestos bioactivos para el desarrollo de medicamentos utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Desde la antigüedad los medicamentos tradicionales y fitofarmacéuticos son utilizados para el tratamiento de los trastornos inflamatorios. *Bursera cuneata* (Schlecht.), Burseraceae, se ha utilizado en la medicina tradicional mexicana para tratar condiciones asociadas con procesos inflamatorios. El objetivo de este estudio fue aislar compuestos con actividad antiinflamatoria y antihistamínica mediante un fraccionamiento biodirigido. El extracto diclorometánico (89.1 + 2.2%) mostró mayor actividad antiinflamatoria que los extractos hexánico (53.3 + 1.2%) y metanólico (77.4 + 1.8%). De la fracción FS-3, obtenida del extracto diclorometánico, se aislaron cuatro compuestos que fueron identificados como β -sitosterol (1), α -amirina (2), ácido ursólico (3) y ácido morónico (4). Todos los compuestos presentaron actividad antiinflamatoria en comparación con indometacina (39.8 + 0.8%), a 0.1 mg / por oreja. Cabe resaltar que el ácido morónico (68.1 + 1.3%) fue el que presentó la mayor actividad. Adicionalmente se cuantificó histamina en el tejido de oreja tratado previamente con TPA. El ácido ursólico (72.2 + 1.7%) y el ácido morónico (73.3 + 1.1 %) mostraron la actividad antihistamínica más alta. Los resultados de este estudio validan el uso de *B. cuneata* en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

III. INTRODUCCIÓN

En la lucha contra la enfermedad y el dolor, tan antigua como la historia de la humanidad, el hombre ha tratado siempre de mejorar su calidad de vida y retrasar la muerte, recurriendo a todos los medios a su alcance y aplicando, por tanto, los conocimientos que sobre la naturaleza ha ido adquiriendo.

El papel que la Medicina Natural ha desempeñado en esta batalla ha sido siempre fundamental, en un principio como origen único de recursos terapéuticos, para pasar posteriormente a ser la fuente de inspiración de los compuestos de síntesis.

Con el desarrollo de la síntesis los laboratorios empezaron a producir moléculas cada vez más complejas. Sustancias que anteriormente solo podían obtenerse a partir de fuentes naturales ahora ya son obtenidas por semisíntesis o síntesis total. Además, se desarrollaron modificaciones estructurales a moléculas de origen natural, incrementando así su actividad biológica; de esta forma los medicamentos de origen sintético fueron desplazando a las plantas medicinales.

Sin embargo, a partir de la década del 70 en el mundo comienza a producirse un incremento del consumo de medicamentos de origen natural, sobre todo producidos a partir de plantas medicinales; los países que incrementaron el consumo fueron Hungría, Bulgaria, Yugoslavia y Polonia, entre otros (Fleurentin J. y Pelt J. 1990). Dentro de las causas del auge obtenido por los medicamentos naturales están: 1) El renacer del interés por la naturaleza y todo lo natural; 2) El sentimiento de urgencia por la desaparición de la tradición de pueblos Indígenas; 3) Los medicamentos modernos son a menudo muy costosos y no están al alcance de todos. Con base en estos hechos, la OMS ha impulsado la documentación y

evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, abriendo las puertas al diálogo entre la medicina tradicional y la moderna.



México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y variaciones climáticas. En particular, posee una gran variedad de plantas útiles para el hombre: plantas que producen medicinas, combustibles, vestimenta, refugio, o satisfacen necesidades culturales. En México se han identificado y registrado 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total mundial); la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en un 5% de las especies; esto marca un campo de estudio importante CONABIO, 2018.

Una infinidad de procesos patológicos cursan con síntomas inflamatorios, y debido al carácter incapacitante de los mismos, es importante el descubrimiento de nuevos principios activos de origen natural, paliativos o curativos de dicha sintomatología. El proceso inflamatorio es una respuesta del organismo ante un estímulo. La misma tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica cambios vasculares, eventos celulares y la producción de mediadores químicos de la inflamación.

La influencia de los mediadores químicos sobre el proceso inflamatorio es un tema de intenso estudio. Los mediadores se originan del plasma o de las células, la mayor parte de ellos realizan su actividad biológica mediante unión a receptores. Un mediador químico puede actuar sobre uno o múltiple tipos de células dianas, siendo que la duración de su acción es corta y la mayor parte de ellos pueden producir efectos perjudiciales. Uno de los mediadores más importantes hasta el momento es la histamina.

Un amplio grupo de los metabolitos secundarios como los terpenos, fenoles, flavonoides y esteroides, que se encuentran distribuidos en las plantas, poseen actividad antiinflamatoria debido a la inhibición o reducción de estos mediadores químicos. Al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria.

Los dos grupos de medicamentos más utilizados para la ayuda de estos procesos son los glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos. Estos medicamentos, por su mecanismo de acción, pueden producir efectos no deseables en el organismo. Dado que esto es inevitable, nos vemos en la necesidad de encontrar nuevos compuestos con mejor potencia y con menos efectos adversos. El grupo de la Dra. Verónica Rodríguez, en el Laboratorio-12 de la Facultad de Farmacia-UAEM, ha implementado una línea de investigación dedicada al estudio de plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias.

4.1 Inflamación

La **inflamación** es un proceso que se inicia a consecuencia de una lesión y termina con la destrucción permanente del tejido o con su curación. Los agentes desencadenantes de la respuesta inflamatoria son de naturaleza muy variada, pudiendo ser estímulos físicos, químicos, agresiones por seres vivos o agresiones inmunológicas. La respuesta inflamatoria da lugar a una sintomatología local, caracterizada por dolor, rubor, tumor y calor, acompañada de la incapacidad funcional del tejido afectado y a una reacción sistémica que conlleva al desarrollo de fiebre, leucocitosis y aumento en la concentración plasmática de determinadas proteínas. La reacción inflamatoria tiene como finalidad la defensa del organismo frente al agente causal y la restauración del tejido lesionado. Dependiendo del órgano afectado y del balance entre el agente inductor y la respuesta inflamatoria, el proceso inflamatorio puede dar lugar a la restauración completa del tejido lesionado, a su sustitución por un tejido cicatricial o al fracaso de la respuesta inflamatoria y la subsiguiente necrosis del proceso. Las consecuencias de dicho fracaso dependerán del órgano afectado (Delgado, et al. 2003).



Figura 1. Fases de la Inflamación según su duración de tiempo.

4.1.1 Fases de la reacción inflamatoria

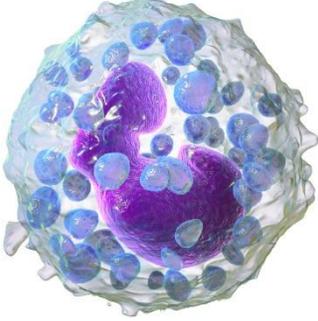
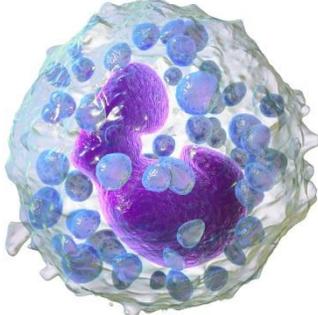
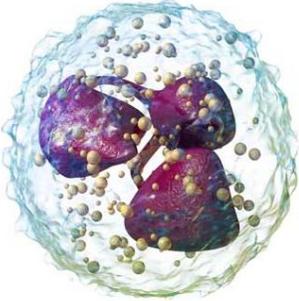
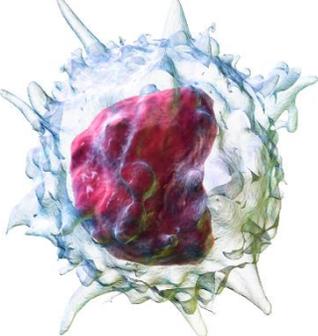
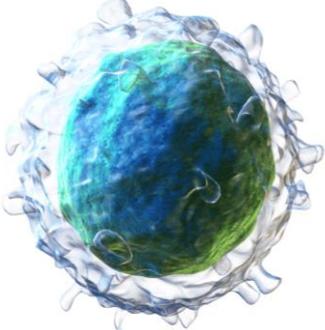


Para poder sistematizar los acontecimientos que tienen lugar durante la inflamación, se puede dividir la respuesta inflamatoria en varias fases: **fase inicial**, **fase vascular**, **fase celular** y **fase de reconstrucción de los tejidos afectados**.

En la **fase inicial** al interactuar el estímulo dañino con los tejidos se induce la liberación de gran cantidad de **mediadores**, unos ya preformados en los tejidos como la histamina, y otros que se sintetizan y se liberan como resultado de esta interacción como es el caso de los derivados del ácido araquidónico (AA) (prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs)), factor agregante plaquetario (PAF) y radicales libres de oxígeno. Al actuar los mediadores citados sobre los vasos sanguíneos se inicia la **fase vascular**. Esta fase consiste fundamentalmente en una vasodilatación, subsiguiente aumento de la circulación seguido de enlentecimiento y estasis de la sangre, aumento de la permeabilidad capilar y exudación del líquido vascular. El líquido exudado contiene gran cantidad de mediadores de la inflamación que actúan sobre las células vecinas y sobre los vasos. Se inician en este momento tres cascadas enzimáticas: el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación. Cuando se produce la estasis vascular y consiguiente extravasación pasan a los tejidos vecinos *células hemáticas* que junto a los mastocitos ya existentes en los tejidos inician la **fase celular**. Toda reacción inflamatoria desemboca en una necrosis tisular más o menos importante. La reconstrucción de los tejidos depende de la cantidad

Tabla 1. Células inflamatorias y sus mediadores (Robbins, 2013)



Primarios	Secundarios
<p style="text-align: center;">De mastocitos</p> <p>Histamina Heparina IL-8 (CXC8) Eoataxina Eicosanoides PAF Adenosina Proteasa</p> 	<p style="text-align: center;">De mastocitos</p> <p>Leucotrienos Prostaglandinas Metabolitos del O₂ y N.</p> 
<p style="text-align: center;">De PMN</p> <p>Elastasa Colagenasa Lactoferrin PAF Quimioquinas Catepsina G</p> 	<p style="text-align: center;">De macrófagos</p> <p>TNF IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 Prostaglandinas Leucotrienos</p> 
<p style="text-align: center;">De las plaquetas</p> <p>PF-4 FACTS, quimiotácticos para: PMN, Eos, LS enzimas lisosomales Serotonina Microparticulas</p> 	<p style="text-align: center;">De linfócitos</p> <p>IL-2, IL-5, IL-6, IL-17, IL-23 IFNγ</p> 
<p style="text-align: center;">De células endoteliales</p> <p>IL-8 IL-6 IL-33</p> 	<p style="text-align: center;">De fibroblastos</p> <p>IL-6, IL-8, IFNγ</p> 

de pérdida de tejido durante el proceso inflamatorio, de la capacidad de proliferación del tejido afectado y de la persistencia o repetición del agente lesivo. Puede ocurrir que la inflamación desaparezca sin dejar rastro (curación) o si los tejidos han sido lesionados (citotoxicidad, supuración...), queda un tejido cicatrizado que puede tener graves consecuencias patológicas para la función en determinados órganos como el ojo (Robbins 2010).

4.1.2 Mediadores de la inflamación

Las reacciones inmediatas o de fase aguda que siguen a la agresión y que pretenden la separación y la restauración de la homeostasis constituyen el fenómeno inflamatorio. Estas reacciones se inician en el lugar de la agresión, aunque determinan mediante mediadores, una respuesta generalizada. Aunque forman un entramado muy complejo, con fines didácticos, los mediadores suelen agruparse en primarios y secundarios. Son muchos, cumplen diferentes funciones, son producidos por las distintas células del sistema inmune y por activación de sistemas enzimáticos. Los mediadores primarios se encuentran presintetizados en las células y son rápidamente secretados cuando se inicia un proceso inflamatorio. Los secundarios requieren un proceso de transcripción y traducción que tarda varias horas en desarrollarse.

Tabla 2. Mediadores primarios de origen celular (Abbas, 2015)

Célula	Mediador	Función
PMNs	Elastasa y colagenasa	Degradan la matriz extracelular para facilitar la movilización dentro de los tejidos, de las diferentes células que son llamadas a participar en los mecanismos de defensa.
Mastocito	Histamina	Es uno de los mediadores de inflamación de más rápida acción. Es vasodilatadora, aumenta la permeabilidad capilar e induce la broncoconstricción, aumenta el peristaltismo intestinal, participa en la embriogénesis, hematopoyesis y cicatrización de heridas.
Mastocito	Proteoglucanos	Los más importantes son los sulfatos de heparán, entre los cuales está la heparina, que actúa como antiinflamatoria por un doble mecanismo, bloquean las selectinas L y P y estimulan, en el hígado, la producción de histaminasa, para desactivar la histamina.
Mastocito	Quimiocinas	Las principales son: eotaxina, tetrapéptido ácido, cuya principal función es la de atraer eosinófilos al sitio de la inflamación; factor quimiotáctico y activador de los neutrófilos, conocido como IL-8 o CXCL8, que atrae hacia el endotelio capilar a los PMNs, CCL2, CCL7 y CCL12 que atraen a los macrófagos; y la CCL5 que atrae a los basófilos.
Plaquetas	Derivados de plaquetas	Factores quimiotácticos para PMNs, eosinófilos y linfocitos; varias enzimas lisosomales que participan en la defensa contra patógenos; y micropartículas que intervienen en la inmunopatología de la artritis reumatoide. En algunas especies animales producen serotonina.

Tabla 3. Mediadores secundarios de origen celular (Hernández, 2013)



Célula	Mediador	Función
Mastocito	Eicosanoides	Incluyen prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, ácido hidroxieicosatetranoico y epóxidos, generan una reactividad vascular anómala con vasodilatación y extravasación, características del fenómeno inflamatorio.
Macrófago	Derivados de macrófagos	En la fase aguda de la inflamación se generan TNF e ILs 1, 6, 8 y 12. El TNF se encarga de reforzar la acción de la IL-1 β como pirógeno endógeno, y de incrementar en el endotelio vascular, la producción de quimiocinas y la expresión de moléculas de adherencia para los polimorfonucleares.
Células del hígado	Proteínas de la fase aguda	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína C reactiva: Tiene algunas de las funciones de los Acs, pero sin especificidad antigénica. Se une a la fosfatilcolina presente en la membrana de muchos microorganismos y, actuando como opsonina, los hace susceptibles a la acción del complemento y a la fagocitosis. • Fibrinógeno. Genera la fibrina, que rodea y aísla a los microorganismos. • Proteína A sérica del amiloide. Molécula que en los procesos crónicos autoinmunes se deposita en diferentes órganos. • Lectina ligadora de manosa. Facilita el reconocimiento de la manosa, uno de los PAMPs de muchos microorganismos.
Linfocitos T	Derivados de linfocitos T	Genera un gran número de citocinas, las principales desde el punto de vista de la inflamación son las IL-2, IL-5, IL-6, IFN γ , IL-17 e IL-23. La IL-6 es uno de los pirógenos endógenos, que actúan sobre células del centro termorregulador en el hipotálamo anterior.

Tabla 4. Mediadores primarios de origen humoral (Abbas, 2015)

Mediador	Función
Complemento	<p>Su activación da lugar a la producción de C4a, C3a y C5a, moléculas de gran actividad biológica y que se conocen como anafilotoxinas. Son “hormonas con efecto local”. Aumentan la permeabilidad capilar, facilitan la degranulación de los mastocito y la liberación de los mediadores primarios que ellos tienen almacenados en su citoplasma.</p>
Cininas	<p>En condiciones normales se encuentran en el plasma kininógenos, moléculas que en casos de inflamación, son activados por la kalicreína, que a su vez es activada por pro ductos derivados de daño tisular, como colágeno, cartílago, componentes de las membranas basales, endotoxinas y factor Hageman o XII del sistema de la coagulación, activación que da origen a bradikinina y kalicreína, sustancias de gran actividad biológica que aumentan la permeabilidad vascular, inducen vasodilatación, producen dolor y en algunas circunstancias, activan el sistema del complemento.</p>
Coagulación y fibrinólisis	<p>Las citoquinas proinflamatorias, IL-1β, TNF e IL-6, activan el sistema de la coagulación que, de no ser oportunamente controlado, genera daño vascular y coagulopatía intravascular diseminada. Cuando el proceso de la coagulación ha cumplido su función de evitar la pérdida de sangre, se inicia su desactivación para evitar que la coagulación se generalice, desactivación que la inicia una proteína muy potente como anticoagulante, la proteína C, (diferente a la proteína C reactiva) que es activada por la trombina. Simultáneamente se activa el proceso de la fibrinólisis para destruir el coágulo y normalizar el flujo sanguíneo.</p>

Terapia antiinflamatoria

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios: los glucocorticoides y los no esteroideos (AINEs).

4.1.2 Antiinflamatorios glucocorticoides

Los glucocorticoides son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal esencial para la adaptación al estrés físico o emocional (Rodríguez et al., 2015). A los glucocorticoides suelen atribuírseles dos mecanismos: uno genómico, lento, con latencia y persistencia del efecto por horas-meses, y otro no genómico, rápido, de inicio y persistencia fugaces. El primero se debe a proteínas modificadoras de la transcripción génica pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares; el segundo a moléculas diferentes poco caracterizadas (Hernández et al, 1998).

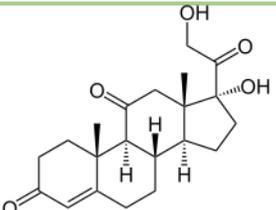
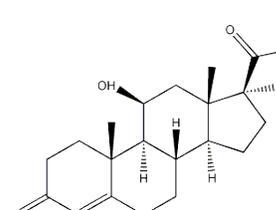
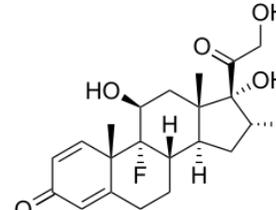
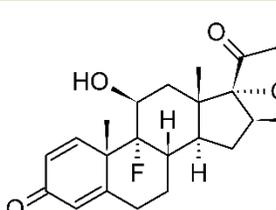
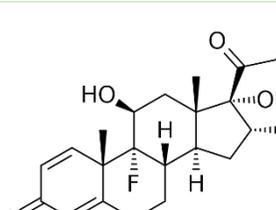
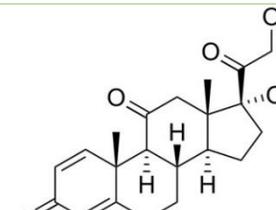
Los efectos antiinflamatorio, antialérgico e inmunosupresor constituyen la base terapéutica y se deben a la inhibición de:

- Producción y secreción de citocinas proinflamatorias como interleucina IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófágicas (GM-CSF), por interferencia directa sobre las cascadas y mecanismos genómicos.
- Acumulación de macrófagos y neutrófilos en focos inflamatorios, por reprimir la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales y la síntesis del activador de plasminógeno.

- Síntesis y liberación de autacoides y de enzimas lisosomales en las reacciones de fase aguda.
- Degranulación y respuesta de los mastocitos a la IgE.
- Expansión clonal y citotoxicidad espontánea mediada por células T.

Los glucocorticoides son los antiinflamatorios más eficaces; son las únicas drogas activas en todas las etapas y en todo tipo de reacción alérgica, y son efectivos inmunosupresores. Sin embargo, también favorecen la diseminación de infecciones y por ello deben reservarse para aquellos casos en que otros fármacos son probadamente ineficaces o están contraindicados. Nuevas evidencias indican que los corticoides son más inmunorreguladores que inmunosupresores pues no anulan la secreción de ciertas citocinas (IL-4, factor estimulante de colonias macrofágicas y factor de crecimiento transformante- β); aumentan la expresión de correceptores para casi todas las citocinas (subunidad gp130) y optimizan el curso temporal de la respuesta de los linfocitos T a la IL-2. Esto señala la importante interrelación entre el HPA y el sistema inmune; los glucocorticoides son protectores de las consecuencias de una respuesta inflamatoria indiscriminada sobre el organismo. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros (Gómez, et al. 2011).

Tabla 5. Glucocorticoides agrupados de acuerdo a su estructura química (Buckley et al., 2014)

Fármacos	Potencia antiinflamatoria	Duración de acción	Estructura Química
Cortisona	0.80	corta	
Hidrocortisona	1	corta	
Dexametasona	25	prolongada	
Betametasona	25	prolongada	
Tramcinolona	5	intermedia	
Prednisona	4	intermedia	

Corta = 6-12 horas; intermedia = 12-36 horas; prolongada = 36-72 horas.

4.2.2 Antiinflamatorios no esteroides

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) son probablemente el grupo de fármacos más frecuentemente prescritos en todo el mundo. Se estima que en nuestro país los consumen anualmente más de 5 millones de personas, de las que un 30-40% son mayores de 65 años. A pesar de las diferencias químicas y estructurales entre ellos, comparten en grado diverso las propiedades analgésica, antiinflamatoria y antipirética, lo que los convierte, junto con los opioides, en uno de los pilares básicos del tratamiento analgésico actual.

La mayoría de las manifestaciones de la respuesta inflamatoria pasan por la activación de la ciclooxigenasa (COX), un complejo enzimático que cataliza la transformación del ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, a partir de los cuales se sintetizan diferentes eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) que participan activamente en la génesis, amplificación y desarrollo del proceso inflamatorio.

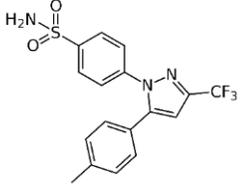
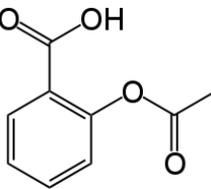
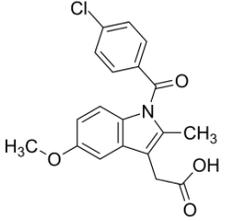
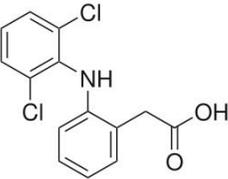
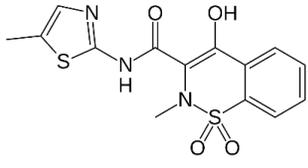
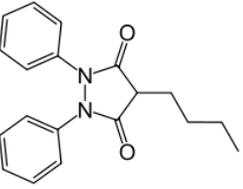
Todos los AINE tienen en común su mecanismo de acción: la mayoría de ellos actúa inhibiendo de forma estereoespecífica y competitiva la enzima ciclooxigenasa (COX). Algunos de ellos lo hacen de forma reversible, mientras que otros lo hacen de forma irreversible destruyendo la capacidad catalítica de la enzima que no podrá ser recuperada hasta que la célula sintetice sus nuevas moléculas. Cuanto más potente es la inhibición de la COX, mejor efecto antiinflamatorio. No obstante, la ciclooxigenasa es una enzima ubicua, presente en casi todas las células, siendo necesaria su mediación en la producción de ciertas prostaglandinas no inflamatorias que permitirán el correcto funcionamiento de muchos órganos y sistemas. La acción antiinflamatoria es variable dependiendo de su espectro de acción, del tipo de

proceso inflamatorio, de su acción inhibidora de la ciclooxigenasa y de su acción amortiguadora de otras respuestas celulares independientes de su acción anti-COX. Así, la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos bloquea las actividades vasodilatadoras y quimiotáctica, interfiriendo en la fase inicial de la inflamación. Pero los AINE interfieren también en las diversas funciones de los neutrófilos, las células más abundantes y que desempeñan un papel más relevante en las fases agudas de los procesos inflamatorios. El problema derivado del uso de este tipo de fármacos es que la gran mayoría de los AINE actualmente disponibles en el mercado poseen una acción inespecífica, es decir, inhiben de forma no selectiva la actividad enzimática de ambas isoformas o, en todo caso, en mayor medida la COX -1, lo que da lugar a la aparición de los efectos indeseables característicos de este grupo de fármacos. Excepciones singulares a la acción de este tipo de fármacos no selectivos la constituyen: nabumetona, nimesulida y meloxicam que muestran cierta afinidad, aunque no absoluta, por la COX -2. Entre los primeros AINE comercializados con un perfil antagonista selectivo de la COX -2 está el llamado grupo de los coxibs (celcoxib, rofecoxib, valdecoxib y parecoxib). Contrariamente a lo que se podría pensar, la administración de este grupo de fármacos no está exenta de riesgos, ya que esta enzima es también constitutiva en células del riñón, cerebro y aparato reproductor y desempeña un papel importante en la reparación de algunos tejidos, además de actuar también como protector de la mucosa gastroduodenal.

El AINE prototipo es la aspirina y le acompañan una gran variedad de ácidos orgánicos, incluyendo derivados del ácido propanoico (como el ibuprofeno y naproxeno), derivados del ácido acético (como la indometacina) y

ácidos enólicos (como el piroxicam), todos competidores con el ácido araquidónico por el sitio activo de la ciclooxigenasa (Tabla 6).

Tabla 6. AINE agrupados de acuerdo a su estructura química (Robles et al., 2016).

<p>Inhibidores Selectivos de COX-2</p>	<p>Celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib</p>	
<p>Salicilatos</p>	<p>Ácido acetilsalicílico, salsalato, diflunisal, fosfosal, acetilato de lisina</p>	
<p>Derivados indolacéticos</p>	<p>Indometacina, tolmetín, sulindaco, acemetacina</p>	
<p>Derivados Arilacéticos</p>	<p>Diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona</p>	
<p>Oxicanes</p>	<p>Tenoxicam Meloxicam Piroxicam</p>	
<p>Fenilbutazona</p>	<p>Fenilbutazona</p>	

4.2.3 Compuestos antiinflamatorios de origen natural

Existen muchos trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Setty y Sigal, 2005; Gautam y Jachak, 2009; Jang, et al. 2011; Wang, et al. 2013). Los productos naturales o compuestos derivados de productos naturales representan una gran diversidad estructural, que no se ve comúnmente en compuestos sintéticos. De los 1184 productos químicos nuevos reportados durante 1981 a 2006, el 60% se deriva de productos naturales (OMS, 2008). Por lo tanto, los productos naturales juegan un papel dominante en el descubrimiento de pistas para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades humanas. Productos naturales (y medicamentos) ofrecen una gran esperanza en la identificación de compuestos bioactivos y su desarrollo en drogas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

1.2.1. Triterpenos pentacíclicos y sus derivados: Propiedades antiinflamatorias y relacionadas.

Durante la última década se han publicado aproximadamente 700 artículos científicos sobre triterpenos pentacíclicos, especialmente sobre aquellos derivados del ácido oleanólico (Connolly, 2000; Calixto et al., 2003; Liu, 2005; Dzuback, 2006; Brinker et al., 2007; Yu et al., 2007). Estas investigaciones no incluyen solamente el aislamiento y la purificación de estos triterpenoides a partir de diversas fuentes vegetales, sino también modificaciones químicas de los mismos para obtener

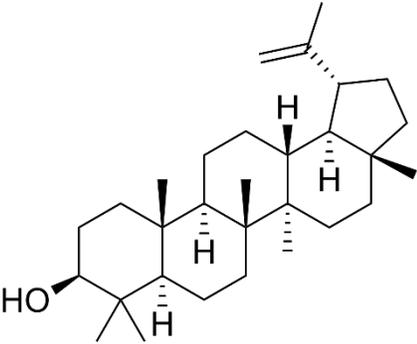
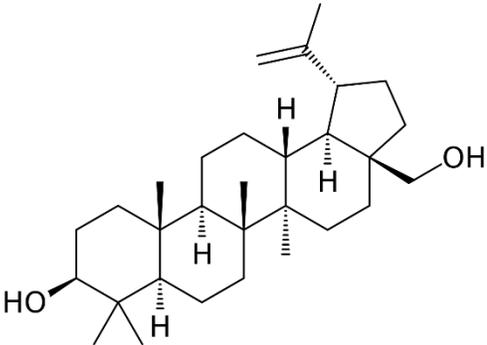
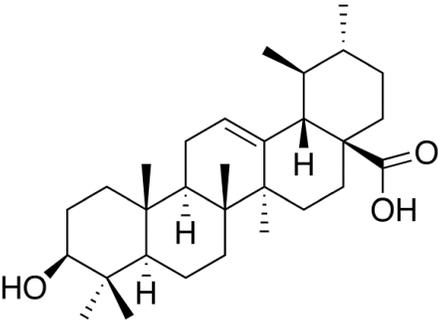
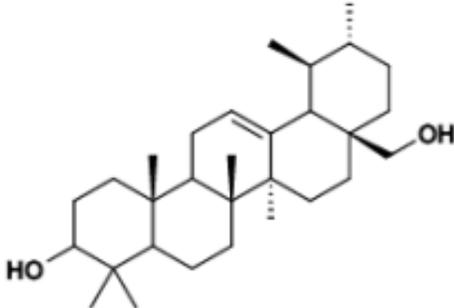
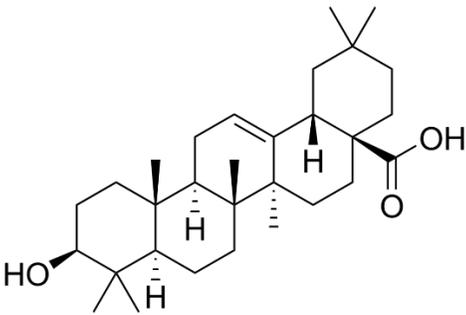
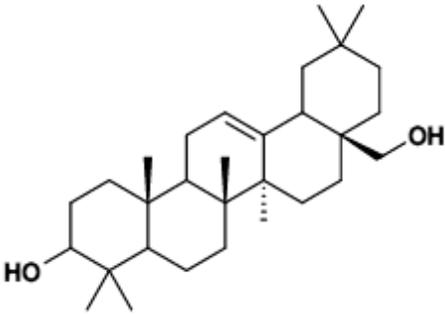
derivados más efectivos en diversas actividades farmacológicas. Una de las más estudiadas la actividad antiinflamatoria, debido a que está estrechamente relacionada con patologías con alta incidencia en la población mundial actual, tales como la artritis reumatoide y el cáncer, entre otras (Singh et al., 1992; Banno et al., 2004; Zhang et al., 2005). En la actualidad se busca obtener derivados de hemisíntesis a partir de triterpenoides pentacíclicos más potentes como antiinflamatorios, con menos reacciones adversas y una óptima biodisponibilidad (Farina et al., 1998; Cheng et al., 2005).

En diversos estudios se ha demostrado que, por ejemplo, el ácido oleanólico tiene actividad antiinflamatoria importante evaluada en ensayos in vivo en los que se indujo inflamación dérmica con AA o TPA en orejas de ratón (Singh et al., 1992; Recio et al., 1995; Banno et al., 2004; Liu, 1995; Aguirre et al., 2006); incluso, en uno de estos trabajos, el ácido triterpénico resultó ser más activo que la indometacina usada como fármaco de referencia (Banno et al., 2004). Además se demostró que el ácido oleanólico inhibe las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) que intervienen en el proceso inflamatorio (Brinker et al., 2007). Más recientemente se ha observado que a bajas concentraciones (menores de 3 μM) inhibe la producción de NO y de la PGE2 (Wu et al., 2004). Basándose en estos resultados se han preparado derivados de hemisíntesis del ácido oleanólico empleando diferentes vías y probando conjuntamente su actividad antiinflamatoria in vitro. En uno de estos estudios se investigó una serie de derivados como inhibidores de la producción de NO (Honda et al., 2000a). Como resultado se obtuvieron e identificaron nuevos derivados del ácido oleanólico con funcionalidad 1-en-3-ona, entre los que se destacaron el ácido 3-oxoolean-1,12-dien-28-oico (Figura 7 a) y los sustituidos

además en el C-2 del anillo A con grupos carboxilo, como se muestra en la Figura 7. Estos mostraron una gran actividad inhibitoria ($CI_{50} = 0,01-0,1 \mu M$) de la producción de NO inducida por INF- γ en macrófagos de ratas. De éstos fue el más potente el derivado del ácido 2-carboxi-3-oxoolean-1,12-dien-28-oico (Figura 7b), el cual tuvo una potencia similar a la hidrocortisona empleada como fármaco de referencia ($CI_{50} = 0,1 \mu M$). Cabe señalar que la actividad inhibitoria de estos nuevos triterpenos no fue bloqueada por un fármaco antagonista de glucocorticoides, lo que sugiere que su acción sobre la iNOS no está mediada por la interacción con el receptor de estas hormonas.

Otro ejemplo interesante, que ha sido ampliamente estudiado, es el ácido 2-ciano-3,12- dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) el cual presenta una potente actividad antiinflamatoria por el mecanismo de inhibición de la iNOS y de la COX-2 (Suh et al., 1998; Liu, 2005) e inhibe la proliferación de varias líneas celulares de tumores en humanos (Favaloro et al., 2002). En este derivado la modificación conjunta de los anillos A y C aumenta la potencia antiinflamatoria aproximadamente 10.000 veces con respecto al ácido oleanólico (Honda et al., 2000b) (Figura 8).

Tabla 7. Triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria

<p style="text-align: center;">Lupeol</p>  <p>The structure of Lupeol is a pentacyclic triterpene. It features a five-ring core with a hydroxyl group at C-3, a methyl group at C-13, and a vinyl group at C-19. The stereochemistry is defined by wedged bonds for the hydroxyl group at C-3 and the methyl groups at C-13 and C-14, and dashed bonds for the hydrogens at C-5, C-8, C-9, and C-10.</p>	<p style="text-align: center;">Butolin</p>  <p>The structure of Butolin is a pentacyclic triterpene. It features a five-ring core with hydroxyl groups at C-3 and C-28, a methyl group at C-13, and a vinyl group at C-19. The stereochemistry is defined by wedged bonds for the hydroxyl groups at C-3 and C-28, and the methyl groups at C-13 and C-14, and dashed bonds for the hydrogens at C-5, C-8, C-9, and C-10.</p>
<p style="text-align: center;">Ácido ursólico</p>  <p>The structure of Ácido ursólico is a pentacyclic triterpene. It features a five-ring core with a hydroxyl group at C-3, a methyl group at C-13, and a carboxylic acid group at C-28. The stereochemistry is defined by wedged bonds for the hydroxyl group at C-3 and the methyl groups at C-13 and C-14, and dashed bonds for the hydrogens at C-5, C-8, C-9, and C-10.</p>	<p style="text-align: center;">UEaol</p>  <p>The structure of UEaol is a pentacyclic triterpene. It features a five-ring core with hydroxyl groups at C-3 and C-28, a methyl group at C-13, and a vinyl group at C-19. The stereochemistry is defined by wedged bonds for the hydroxyl groups at C-3 and C-28, and the methyl groups at C-13 and C-14, and dashed bonds for the hydrogens at C-5, C-8, C-9, and C-10.</p>
<p style="text-align: center;">Ácido oleanólico</p>  <p>The structure of Ácido oleanólico is a pentacyclic triterpene. It features a five-ring core with a hydroxyl group at C-3, a methyl group at C-13, and a carboxylic acid group at C-28. The stereochemistry is defined by wedged bonds for the hydroxyl group at C-3 and the methyl groups at C-13 and C-14, and dashed bonds for the hydrogens at C-5, C-8, C-9, and C-10.</p>	<p style="text-align: center;">Eritrodiol</p>  <p>The structure of Eritrodiol is a pentacyclic triterpene. It features a five-ring core with hydroxyl groups at C-3 and C-28, a methyl group at C-13, and a vinyl group at C-19. The stereochemistry is defined by wedged bonds for the hydroxyl groups at C-3 and C-28, and the methyl groups at C-13 and C-14, and dashed bonds for the hydrogens at C-5, C-8, C-9, and C-10.</p>

4.3 Familia Burseraceae

«Hay otros árboles de los cuales mana aquella resina blanca que se llama copal, que es el incienso que ofrecían a sus dioses. Mucho de ello se vende ahora en los tiánquez, porque es muy bueno para muchas cosas y es medicinal»

Fray Bernardino de Sahagún (1585).

En México, la importancia de los aromas como purificadores rituales del aire se recoge en numerosos documentos, entre ellos el Códice Badiano, escrito apenas 30 años después de la conquista por dos alumnos indígenas del Colegio de Santa Cruz de Tlaltelolco en la Ciudad de México por el médico Martín de la Cruz y el traductor Juan Badiano. Entre las fórmulas y los elementos terapéuticos citados en este documento figuran, con frecuencia, hojas y flores aromáticas y los perfumes que desprendían. Entre las hojas aromáticas más apreciadas figuran las de varias especies de alisos (*Alnus sp.*), las del oyamel (*Abies religiosa*) y las del árbol de la niebla (*Pinus ayacahuite*). Sin embargo, la planta aromática por excelencia es, sin duda alguna, el **copal**, un término genérico en lengua náhuatl —el idioma de los aztecas, entre otras etnias— que designa una serie de árboles y arbustos, la mayoría de ellos de la familia Burserácea, cuya resina se utilizaba y se utiliza todavía como incienso. La importancia del **copal** para los aztecas queda bien reflejada en estas palabras del cronista Francisco López de Gómara (1511- 1566): *«Perfumaban los ídolos con hierbas, flores, polvos y resinas; pero el mejor humo y el más común es el que llaman copalli, que se parece al incienso»*. Cinco siglos después del derrumbe de las civilizaciones azteca y maya, el copal continúa siendo utilizado por

numerosas etnias mexicanas. Por ejemplo, por los actuales mixtecos de Guerrero, cuando sacrifican animales durante sus espectaculares ritos de la lluvia. O también por las comunidades mayas del sur de México, cuyos copaleros extraen el copal blanco y el negro —la diferencia de color se debe a modos de preparación distintos— de varias especies de burseráceas, entre ellas *Bursera excelsa* y *B. jorulensis*. Al igual que los antiguos mayas y aztecas, los actuales indígenas del estado de Chiapas utilizan el copal con fines medicinales contra las diarreas, las lombrices intestinales y los dolores de cabeza, para remediar los daños musculares y para despejar la nariz de mucosidades y facilitar la respiración. En otras regiones de México, como por ejemplo Oaxaca, se continúa usando el copal de *Protium copal*, una Burserácea que crece en las selvas altas perennifolias de altitud media y que en épocas del imperio azteca se cultivaba en pequeños bosques, en la península de Yucatán. El abundante uso del copal que hacían los mexicas para adorar y aplacar a sus dioses nos recuerda la importancia que para ellos revestía la religión en todos los aspectos de la vida, incluido el de la salud y de la enfermedad. Varios dioses aztecas tenían, según se creía, el poder de provocar enfermedades. De tal forma que los distintos copales eran usados para contrarrestarlas, algunos ejemplos son el mizquioxochicopalli (*Bursera linanoe*) era usado para los dolores de cabeza, estrangulación de útero, y las enfermedades de causa fría o húmeda. Su resina en agua tibia se bebía en ayunas y después de comer, para ayudar a las úlceras o hinchazones de postema. El Copalquahuitlpatlahuac (*Bursera copallifera*) era usada para detener la disentería y el flujo de sangre. El copalli (*Bursera* sp.), con su goma aplicada en la piel cura picaduras de insectos, también era usado como expectorante y purgante. Finalmente el copalquauhxiolt (*Bursera microphylla*) se usaba para las diarreas.

4.3.1 Descripción Botánica

La familia Burseraceae está conformada por unos 20 géneros y cerca de 680 especies, distribuidas en las regiones calientes del mundo, con mayor diversidad en América tropical, en el norte y en el sur de África y en Malasia (Harley & Daly 1996, Rzedowski & Guevara 1992). Ésta se distingue por ser la familia del incienso y la mirra, con árboles y arbustos que pueden alcanzar los 40 metros de altura. Tienen un característico olor a incienso "trementina" producido por canales resiníferos que se ubican principalmente en cortezas y ramas (Cuatrecasas 1957).

4.3.2 Distribución en México

En México, las selvas caducifolias (o bosques tropicales caducifolios) ocupan alrededor del ocho por ciento del área total del territorio. Ellas albergan una gran parte de la biodiversidad florística del país, en la que sobresalen los cuajjotes, copales, torotes o palos mulatos, que son especies que pertenecen al género *Bursera*.

El género *Bursera* está constituido por cerca de 100 especies que se distribuyen desde el suroeste de los EUA y el extremo sur de Florida, pasando por México y América Central, hasta el noroeste de América del sur, en el Golfo de Guayaquil, sobre el Pacífico y del Golfo de Venezuela, sobre la costa Caribeña; algunas especies habitan los archipiélagos de las Antillas, Revillagigedo y las Galápagos. De ellas, 84 especies habitan naturalmente en México, de las cuales, 80 están *exclusivamente en las selvas mexicanas*. Es la familia de plantas mexicanas con

mayor porcentaje de especies endémicas (95%). Su mayor riqueza y abundancia se encuentra a lo largo de las selvas bajas caducifolias de la vertiente del Pacífico, particularmente en la cuenca del río Balsas donde se concentran cerca de 50 especies, varias de ellas endémicas a esa cuenca o parte de ella. Dentro de la cuenca alta del río Balsas incluye el estado de Puebla, los estados de México, la zona montañosa de Guerrero y Morelos.

4.3.3 Taxonomía sección *Bullockia*

La taxonomía del género *Bursera* ha sido abordada por Engler (1883), Bullock (1936), McVaugh y Rzedowski (1965), Rzedowski y Kruse (1979), Toledo (1984) y Andrés y Espinosa (2002), con base en la distribución de caracteres morfológicos; Andrés (2001) incorporó algunos caracteres anatómicos de hoja y pecíolo, así como de arquitectura foliar; mientras que Becerra (2003) propuso un arreglo filogenético con base en secuencias de DNA nuclear ribosomal.

En general, todos los estudios coinciden en la existencia de dos grupos monofiléticos principales que corresponden a las dos secciones propuestas por McVaugh y Rzedowski (1965), *Bursera* sección *Bursera* y *Bursera* sección *Bullockia*.

La sección *Bursera* tiene a su vez tres grupos importantes: 1) el complejo *B. simaruba* (Daly, 1993); 2) reconocido antes por Toledo (1984) como 'mulatos' y cuya distribución es circum-caribeña; 3) el grupo *B. inaguensis*, cuya distribución es estrictamente antillana (Cuba, Jamaica, Española y Bahamas); y los 'cuajjotes'

(Toledo, 1984) conformado por tres subgrupos (Becerra, 2003), a) *B. fragilis*, b) *B. microphylla* y c) *B. fagaroides*, todos ellos distribuidos de forma predominante sobre la vertiente del Pacífico mexicano.

Dentro de la **sección Bullockia** se reconocen dos grupos bien definidos, con base en rasgos morfológicos. El *primero* incluye a especies con fruto cuya semilla ovoide está casi completamente cubierta por un ariloide, salvo una pequeña área apical desnuda, de color negro; los sépalos son libres y frecuentemente se trata de especies cuyo exudado se endurece al contacto con el aire. Este grupo se distribuye sobre la vertiente del pacífico desde Colombia (*B. tomentosa*, incluyendo su vertiente caribeña) hasta Sonora, en México. El *segundo* grupo incluye a especies de frutos con semilla lenticular asimétrica, parcialmente cubierta por el ariloide (en la base y los cantos); los sépalos son fusionados y el exudado es frecuentemente aceitoso. Este grupo es el de distribución más amplia dentro de *Bursera*, abarca también de forma preferencial la vertiente del Pacífico desde el Golfo de Guayaquil (Ecuador) hasta el Cabo, península de Baja California (México), así como los archipiélagos de las Galápagos (*B. malacophylla*) y de las Revillagigedo (*B. nesopola*); la presencia de este grupo en las Antillas (*B. graveolens* en Cuba) puede ser introducida.

En general, los arboles de esta sección son llamados *copales*, derivado de la palabra “*copalli*” de la lengua náhuatl, llamada así por su aromática resina usada como incienso, la cual, es producida por muchas de las especies de esta sección.

Las burseras de la sección *Bullockia* tienen larga historia de uso en México con valores culturales significativos, tanto ceremoniales como medicinales, como ya se han mencionado en el apartado de usos tradicionales de esta tesis.

4.3.4 Estudios químicos y farmacológicos de la sección *Bullockia*

Un amplio grupo de los metabolitos que se encuentran distribuidos en la sección *Bullockia* poseen actividad antiinflamatoria entre los que se encuentran principalmente los monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos, como se presenta a continuación.

El aceite esencial de hojas y tallos de *Bursera graveolens* (familia Burseraceae) fue analizado mediante la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y GC-MS. Los constituyentes mayoritarios encontrados en el aceite de hojas fueron limoneno (48.3%), óxido de cariofileno (13.6%) y trans-cariofileno (8.1%). El aceite de los tallos se constituyó principalmente por limoneno (42.1%), mirceno (19.8%) y mentofurano (14.7%). Los compuestos Z- β -ocimeno (14.3%) y mentofurano presentes en el aceite de tallos no fueron encontrados en el aceite de hojas.

Por otro lado, se han encontrado compuestos monoterpénicos en ocho especies de Burseras, como en *B. lancifolia*, *B. rzedowski*, *B. schlechtendalii*, *B. morelensi*, *B. copallifera*, *B. vejar-vasquezii*, *B. ariensis* y *B. biflora*; estos compuestos terpenoides son reportados como biocidas y su efecto tóxico puede ser atribuido a un mecanismo de inhibición competitiva reversible por la acetilcolinesterasa, al ocupar el sitio hidrofóbico del centro activo de la enzima (Obeng-Ofori & Amiteye, 2005).

Especies de la familia de las Burseras son productoras de resinas y exudados ricos en sustancias aromáticas, las cuales son empleadas en la industria de la perfumería, así como en la producción de barnices (Pernet, 1972), y como remedios medicinales (Oliveira et al., 2004). Extractos acuosos de resinas de algunas especies han presentado actividad inmunoestimulante (Delaveau et al., 1980) y antiinflamatoria (Dowiejua et al., 1993; Haribal et al., 1985). Por otra parte, el extracto clorofórmico de *B. fagaroides* demostró tener actividad antitumoral frente a carcinoma intramuscular de Walter (Bianchi et al., 2002), mientras que *Bursera copallifera* (D.C) Bullock, conocida comúnmente como “copal” (Dorado et al., 2005), se utiliza en el tratamiento de bronquitis, tos, cura golpes internos, mata gusanos (oral y tópico) (Argueta, 1994). Por su parte, *Bursera grandifolia*, también llamada tradicionalmente como palo mulato y té azteca, es utilizada etnomédicamente para problemas respiratorios, como bronquitis, influenza, tosferina y en infecciones de pulmón (Monroy & Castillo, 2000). En la Universidad de Arizona se aislaron tres compuestos con actividad antitumoral a partir del extracto clorofórmico de *B. fagaroides*: β -peptatina, α -metileter y 5'-desmetoxi- β -peltatitna α -metiléter (Bianchi, 2002). Un estudio mostró que de hojas de *B. graveolens* se purificaron terpenos, flavonoles y esteroles, todos ellos glicosidados (Nakanishi, 2003). De los tallos de la misma especie se aislaron compuestos de tipo lignano y triterpénico (Nakanishi, 2005).

4.4 *Bursera cuneata* (Schldl.) Engl



Figura 2. Partes aéreas de *Bursera cuneata*.

Taxonomía

- Plantas Reino Plantae
 - Plantas vasculares Clase Tracheophyta
 - Plantas con flores Filo Magnoliophyta
 - Magnolias, margaritas y parientes (dicotiledóneas) Clase Magnoliopsida
 - Mangos, copales, maples y parientes Orden Sapindales
 - Copales y cuajotes Familia Burseraceae
 - Copales y cuajotes Género *Bursera*
 - *Bursera* sección
 - *Bursera cuneata* Especie

4.4.1 Aspectos Botánicos

Árbol (o a veces arbusto) dioico, hasta de 10 m de alto, resinoso y con aroma agradable al estrujarse, tomentoso en sus partes verdes; tronco hasta de 40 cm de diámetro, con corteza gris o gris-rojiza, no exfoliante, las ramillas lignificadas francamente rojizas, glabras; hojas con (3) 5 a 9 (13) foliolos, peciolo de 1 a 3 cm de largo, tomentoso-pubérulo, el raquis angosta a anchamente alado, foliolos sésiles o con peciólulos hasta de 3 mm de largo, oblongos a lanceolados, elípticos u ovados, el terminal a veces oblanceolado, de (1) 2 a 6.5 cm de largo y (0.5) 0.7 a 2.3 cm de ancho, los del par inferior a menudo mucho más pequeños que los demás, por lo general agudos en el ápice, obtusos a cuneados en la base, margen toscamente aserrado, los dientes (6) 10 a 30 de cada lado, desiguales, algunos escotados en el ápice, con (6) 10 a 18 pares de nervaduras laterales distalmente bifurcadas o a veces más profusamente ramificadas, impresas en el haz, prominentes en el envés, de textura coriácea, conspicuamente reticulado-venosos, sobre todo en el haz que tiene aspecto manifiestamente rugoso, el haz verde, los pelos originándose de una base ampuliforme, el envés densamente blanquecino-grisáceo-tomentoso; inflorescencias en forma de panículas abiertas, originándose en los ápices de ramas cortas o lateralmente en ramas largas, catafilos oblongos a angostamente triangulares, de 3 a 15 mm de largo, tomentosos en ambas caras, deciduos; las flores masculinas numerosas en panículas hasta de 8 cm de largo y 4 cm de ancho, hirsuto-tomentosas, pedicelos hasta de 4 mm de largo, bracteolas subuladas, de ± 2 mm de largo; flores tetrámeras, lóbulos del cáliz linear-triangulares, de 2 a 4 mm de largo, hirsuto-pubérulos, pétalos blanquecinos, oblongos, de 2.5 a 4 mm de largo, hirsuto-pubérulos por fuera, más o menos

cuculados; estambres todos aproximadamente al mismo nivel o bien 4 más largos alternando con 4 más cortos, filamentos de 1.2 a 1.8 mm de largo, anteras ovado-oblongas, de 0.6 a 0.8 mm de largo; las inflorescencias femeninas similares a las masculinas, pero sólo de 1 a 2 cm de largo, sus flores también similares, anteras de los estaminodios de ± 0.5 mm de largo, ovario bilocular, glabro; infrutescencias sobre pedúnculos hasta de 7 cm de largo, "drupa" bivalvada, verde o rojiza, ovoide, algo comprimida, de 7 a 12 mm de largo, a menudo puntiaguda en el ápice, glabra, rodeada en la base por el cáliz persistente, el hueso recubierto casi totalmente por un pseudoarilo anaranjado o amarillento (de un lado un poco más grande que del otro), la parte descubierta negra.

Las especies se distribuyen en un intervalo altitudinal de 800 a 2 800 m; se presentan en sitios con temperatura mínima relativamente baja ($5-10^{\circ}$ C) y más húmedos. Florece de abril a julio. Permanece con follaje de abril a noviembre. Es endémica de la parte centro-sur de México: Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, México, Morelos, Puebla y Guerrero.



Figura 3. Distribución de *B. cuneata* en Morelos (Hernandez-López, 2011).

4.4.2 Usos tradicionales

La especie *Bursera cuneata* (Schlecht.) Engl., comúnmente conocido como: copal, copalillo, cuerecatzundi, cuerica-tzunda, cuiricatzunda (lengua purépecha), es una especie del género *Bursera*, sección *Bullockia*.

Bursera cuneata, se considera como planta de naturaleza caliente en la medicina tradicional mexicana. Las *hojas* se usan para problemas de piel, como desinfectante de heridas, quemaduras o cicatrizante. Para padecimientos respiratorios como la tos, el asma y dolor y enfriamiento de pecho. También se usa para bajar la temperatura, torceduras, fríos y reumas. La *resina quemada* en sahumerios, se emplea en el ritual para las “limpias” y para curar otras enfermedades culturales como “el mal de ojo” y para “el aire”. El cocimiento de la *corteza* se toma para disentería, catarro constipado y como antigripal.

4.4.3 Estudios químicos y farmacológicos de *Bursera cuneata*

Estudios previos de la resina de *B. cuneata* describen la existencia de monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos pentacíclicos con esqueleto de tipo ursano y oleano, incluyendo α -amirina (de la Cruz-Canizares et al., 2005). De los estudios farmacológicos no se encontró nada.

La actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios.

En los últimos años ha sido creciente la cantidad de publicaciones e investigaciones alrededor de la comprensión de los mecanismos y de las moléculas involucradas en el proceso inflamatorio. El entendimiento de cómo el proceso inflamatorio es activado y como es contenido son elementos claves para desarrollar estrategias para bloquear o reducir la respuesta inflamatoria.

Ahora bien, dentro del contexto de los productos naturales antiinflamatorios, la medicina tradicional se ha utilizado para tratar y cuidar a pacientes con enfermedades que conllevan a procesos inflamatorios. En este sentido, la medicina tradicional en la actualidad es ampliamente usada en el mundo; por ejemplo, en África su uso está por encima de 80%, en China alrededor del 40%, mientras que en Asia y América Latina, las poblaciones continúan usando la medicina tradicional, como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales (OMS 2015)

El género *Bursera* comprende alrededor de 80 especies en México y 17 en Morelos. Estas plantas producen un extenso número de metabolitos entre los que destacan los terpenos. Un gran número de estos compuestos han sido estudiados farmacológicamente, encontrándose actividad anticancerígena y antiinflamatoria. Asimismo, se han reportado varios de los mecanismos por medio de los cuales estos triterpenos ejercen su acción antiinflamatoria, entre los que destacan la inhibición de enzimas involucradas en la producción de eicosanoides como las

ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y la fosfolipasa A2 (FLA2); la inhibición de la liberación de citoquinas, histamina y serotonina; y la interacción con algunas serina/treonina quinasas (Recio, 2008).

La especie *Bursera cuneata*, objeto de estudio fue seleccionada de acuerdo a su uso etnomédico y quimiotaxonómico del género, que se caracteriza por la presencia de metabolitos con propiedades citotóxicas, antioxidantes y antiinflamatorias. Este estudio fitoquímico biodirigido pretende profundizar en el conocimiento científico de dicha especie, la cual es utilizada desde tiempos prehispánicos. Sin embargo no existe evidencia de su posible potencial antiinflamatorio y antihistamínico, siendo este último estrechamente relacionado al uso que se le da a esta especie en la Medicina tradicional.

Bursera cuneata presenta compuestos con actividad antiinflamatoria y antihistamínica.

Aislar compuestos con actividad antiinflamatoria y antihistamínica de *B. cuneata* mediante un estudio biodirigido.

1. Obtener los extractos orgánicos de la hojas y tallos de *B. cuneata* mediante maceración con los disolventes de hexano, diclorometano y metanol.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos mediante el modelo *in vivo* de edema inducido en oreja de ratón con acetato-12-0-tetradecanoilforbol.
3. Fraccionar el extracto orgánico de mayor actividad mediante cromatografía en columna abierta.
4. Evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones primarias del extracto más activo mediante el modelo *in vivo* de edema de ratón con TPA.
5. Realizar un fraccionamiento secundario de las fracciones primarias más activas por cromatografía en columna abierta.
6. Evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones secundarias mediante el modelo *in vivo* de edema de ratón con TPA.
7. Aislar y purificar los compuestos presentes en las fracciones secundarias más activas por cromatografía en columna abierta.
8. Identificar los compuestos puros por métodos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear.
9. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos puros mediante el modelo *in vivo* de edema de ratón con TPA.
10. Determinar la actividad antihistamínica de los compuestos puros mediante su cuantificación por CLAR.

9.1 Material vegetal

Se recolectaron 600 g de las partes aéreas (hojas y tallos) de *B. cuneata* en la localidad de Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca Morelos a la altura del 67 km sobre la Carretera Federal Cuernavaca- México, en abril del 2011. Una muestra de herbario fue depositada en el Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIBYC) de la UAEM para su identificación.

9.2 Obtención de extractos

Para la obtención de los extractos, las partes aéreas (hojas y tallos) se secaron a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente se molieron con un molino eléctrico (Pulvex). Para la obtención de los extractos se utilizaron solventes de diferente polaridad (hexano, diclorometano y metanol), en una proporción de 1 g planta/5 mL, por 72 horas y por triplicado. En todos los casos se filtró y concentró en un rotaevaporador Büchi R-200® a una temperatura menor a 40°C para obtener los extractos crudos.

9.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de gel de sílice (silicagel 60 H x W 20 cm x 20 cm con indicador fluorescente 254 nm) y varios sistemas de elución (hexano: acetato de etilo). Se observó primero con luz ultravioleta (onda corta/onda larga) y como

agentes cromógeno se utilizó sulfato cérico (12 g sulfato cérico, 22.2 ml H₂SO₄ concentrado, 350 g de hielo - Stahl, 1969). Las fracciones con similitud cromatográfica se reunieron en una sola.

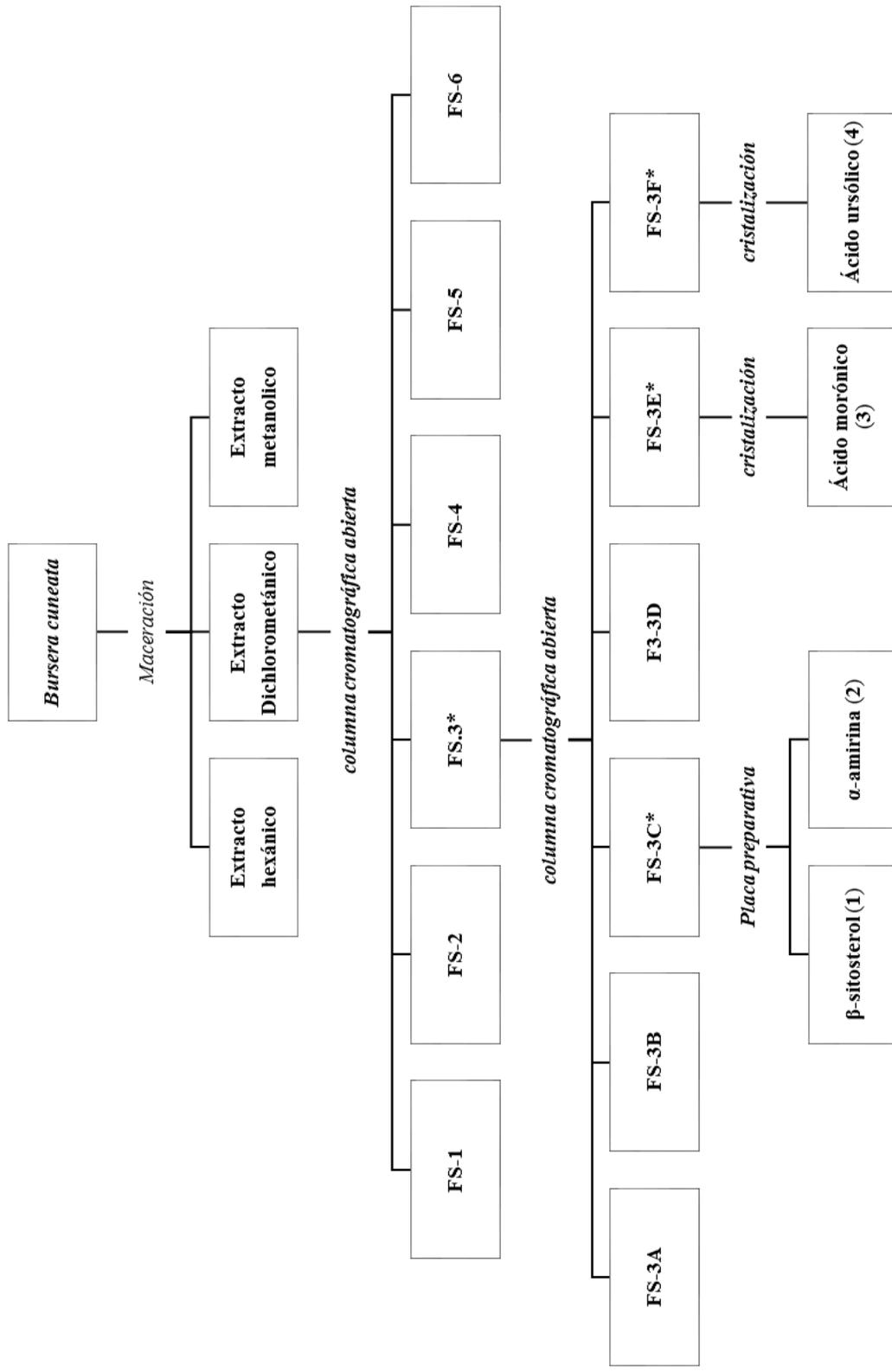


Figura 4. Aislamiento biodirigido

9.4 Fraccionamiento Primario

Para el fraccionamiento primario del extracto diclorometánico se realizó una cromatografía en columna abierta (CCA) y se ocupó como fase estacionaria silicagel, malla (0,2-0,5 mm, 1:20, p/p), como fase móvil una mezcla binaria de hexano: acetato de etilo (8:2), con una elución isocrática y un lavado final con metanol 100%. Se obtuvieron fracciones de 50 mL.

9.5 Fraccionamiento Secundario

Para el fraccionamiento secundario de la fracción FS-3 se realizó una CCA y se ocupó como fase estacionaria silicagel, malla (0,2-0,5 mm, 1:20, p/p), como fase móvil una mezcla binaria de hexano: acetato de etilo (9:1), la elución fue isocrática, con un lavado final con metanol 100%. Se obtuvieron fracciones de 25 ml.

9.6 β -sitosterol (1) y α -amirina (2)

Para la obtención de los compuestos β -sitosterol y α -amirina obtenidos de la fracción FS-3C se realizó una CCA y se ocupó como fase estacionaria silicagel 60 malla gel (70–230 μ m, 1:20, p/p), como fase móvil una mezcla binaria de hexano: acetato de etilo (95:5), la elución fue isocrática, con un lavado final con metanol 100%. Se obtuvieron fracciones de 10 ml, que fueron purificadas mediante CCF preparativa, empleando una fase móvil de acetato de etilo:hexano, 8:2.

9.7 Ácido ursólico (3)

El ácido ursólico fue obtenido de la fracción FS-3E precipitado de forma espontánea, se hicieron lavados con metanol para su recristalización.

9.8 Ácido morónico (4)

El ácido morónico obtenido de la fracción FS-3F se precipitó de forma espontánea, se hicieron lavados con metanol para su recristalización.

9.9 Elucidación estructural

En un aparato Fisher-Jones se midieron los puntos de fusión para todos compuestos, se reportan sin corregir.

Los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C en sus modalidades 1D y 2D se determinaron en un instrumento Varian Unity Inova de 200 y 400 MHz, utilizando cloroformo deuterado como disolvente.

9.10 Modelo *in vivo* de edema inducido en oreja de ratón con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA).

Se siguió la técnica descrita por de Young (1989) modificada por Payá (1993). En este modelo de inflamación aguda se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con pesos entre 25 y 30 g. Una vez recibidos, se trabajó bajo condiciones estandarizadas: temperatura 22 ± 3 ° C, fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial y agua *ad libitum*. Los extractos, fracciones y compuestos se

evaluaron a una dosis de 0.1 mg/por oreja de ratón, y se utilizó una $n = 4$ por cada concentración. Se aplicó de forma tópica 10 μL de una solución de TPA (0.25 mg/mL) disuelto en acetona en cada una de las orejas. Después de 10 minutos transcurridos, se aplicó en la oreja derecha 20 μL de la solución problema (extracto, fracción, compuesto) y en la oreja izquierda 20 μL del vehículo utilizado. Esto se hizo para cada uno de las concentraciones de los diferentes extractos. Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar una muestra de 8 mm de diámetro de ambas orejas por horadación. El fármaco de referencia utilizado fue indometacina en las mismas concentraciones que nuestra muestra. La inhibición del edema se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Por ciento de inhibición} = \frac{wTPA - wmuestra}{wTPA} \times 100$$

En donde: $wTPA$ fue el peso del edema inducido por TPA solo y $wmuestra$ fue el peso del edema inducido por TPA con el tratamiento de la muestra.

Para la determinación de la Dosis Efectiva media (DE_{50}) se evaluaron cuatro concentraciones (0.03, 0.1, 0.3, 0.5 mg/oreja).

9.11 Cuantificación de histamina por Cromatografía de alta resolución.

La concentración de histamina presente en las orejas tratadas en el ensayo de TPA se cuantificó por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), marca Merck Hitachi, con un detector de fluorescencia que se controló a 350nm de

excitación y 450 nm de longitud de onda de emisión (Ext. 350, Em. 340); la inyección fue manual. Se utilizó una columna RP-18 (13cm de largo, 5 μ m) como fase estacionaria.

La muestra fue previamente derivatizada con OPA (o-ftaldialdehído); el gradiente fue isocrático; la fase consistió en 40% de acetonitrilo en buffer de fosfato monobásico de sodio 50mM a un flujo de 0.7ml/min.

La derivatización de la muestra fue por el método modificado de Rice *et. al.*, 1975. El reactivo del OPA se preparó 10 mg en 1 ml de metanol.

Muestra: se mezclaron 16.9 μ l de muestra + 232.5 μ l agua grado HPLC + 50 μ l de NaOH 0.1N. Se esperó 1min de reacción, siendo que la muestra estuvo protegida de la luz. Transcurrido el minuto se agregaron 12.5 μ l de OPA y se dejó transcurrir 4 minutos de reacción, que se detuvo con 25 μ L de HCl 3N.

Para la cuantificación de histamina se realizó una curva estándar de concentración en ácido tricloroacético al 10%.

9.12 Análisis Estadístico

Los resultados están expresados como la media aritmética \pm error estándar. El análisis estadístico ha sido realizado mediante el ensayo de varianza ANOVA seguido de la prueba de. Los valores de p inferiores a 0,05 (*) se consideran significativos y los de p inferiores a 0,01 muy significativos (**).

10.1 Identificación de *Bursera cuneata*

La identificación de la especie *Bursera cuneata* estuvo a cargo del Biólogo Gabriel Franco, se le asignó el número de vaucher 10680 para agregarlo a la colección de Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIBYC) de la Universidad Autónoma del estado de Morelos.

10.2 Obtención de extractos orgánicos de *Bursera cuneata*

Las hojas y tallos secos pulverizados (600 g) de *Bursera cuneata* se extrajeron con solventes de menor a mayor polaridad empezando con hexano, posteriormente con diclorometano y finalmente con metanol a temperatura ambiente (1g/5mL) por 72 horas, en triplicado cada solvente. Los extractos se concentraron hasta sequedad, obteniendo residuos secos de: 4.9 g para el extracto hexánico; 8.7 g para el diclorometánico y 9.1 g para el metanólico.

10.3 Fraccionamiento del extracto diclorometánico de *Bursera cuneata*

El extracto diclorometánico obtenido se fraccionó directamente mediante cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando hexano: acetato de etilo (9:1) como fase móvil (6 x 500 mL). Una vez analizadas mediante CCF las diferentes fracciones, éstas se reunificaron por similitud cromatográfica en 5, que se denominaron FS-1 (2.4 g), FS-2 (0.9 g), FS-3 (1.9 g), FS-4 (1.6 g), and FS-5 (1.5 g).

10.3.1 Fraccionamiento secundario de la fracción activa FS-3 del extracto diclorometánico

La fracción FS-3 (1.9 g) se sometió a un fraccionamiento mediante CCA utilizando silicagel H (230–400 mesh) (1:20, w/w) como fase estacionaria un gradiente de hexano y acetato de etilo en proporciones de 4:1 a 0:1. Las fracciones obtenidas se reunificaron por similitud cromatográfica en un total de 6 fracciones de 25 mL, denominadas: FS-3A (100.3 mg), FS-3B (392.3 mg), FS-3C (313.2 mg), FS-3D (192.3 mg), FS-3E (381.3 mg), y FS-3F (241.5 mg).

10.4 Aislamiento de compuestos

La fracción **FS-3C** (313.2 mg) se cromatografió por CCA (30 × 1.0 cm) usando silica gel (70–230 mesh) (1:20, w/w) como fase estacionaria y una mezcla de hexano-acetato de etilo en una proporción 8:2 como fase móvil, obteniéndose un total de 20 subfracciones de 10 mL. De la subfracción 7-10 (210 mL) se obtuvo una mezcla de compuestos, los cuales fueron separados por una placa preparativa y denominados **MZ-1** (27.8 mg) y **MZ-2** (24.2 mg).

La fracción **FS-3E** (381.3 mg) se le realizó una cristalización en acetona aislando un polvo cristalino blanco que se denominó **MZ-3** (48.6 mg).

La fracción **FS-3F** (241.5 mg) se le realizó una cristalización usando a mezcla de metanol y acetato de etilo (1:1) aislando un polvo cristalino blanco que se denominó **MZ-4** (33.3 mg mg).

10.5 Identificación de compuestos

10.5.1 β -sitosterol (1)

El compuesto **MZ-1** se identificó por medios físicos, cromatográficos y espectroscópicos como el β -sitosterol (1, 27.8 mg; p.f. 134- 135°C).

La CCF comparativa entre el estándar de β -sitosterol y **MZ-1**, con una fase móvil hexano:acetato de etilo (85:15), indicó que ambos compuestos presentaron las mismas características cromatográficas: un Rf: 0.54, ausencia de muestra bajo la lámpara de luz U.V. debido a la ausencia de enlaces conjugados capaces de absorber energía en dicho rango por parte de esta molécula; y al ser revelada con sulfato cérico amoniacal presentó una mancha del mismo color.

Para confirmar la estructura del compuesto, se analizan las señales del espectro de RMN ^1H observadas en el espectro 2 y el espectro de RMN ^{13}C observadas en el espectro 4, cuyos valores de RMN fueron recopilados en la Tabla 8. En el espectro RMN ^1H se observa un perfil característico para compuestos esteroidales, con señales intensas a campo alto. La serie de señales desplazadas en este campo del espectro de RMN ^1H se asocian a la presencia de seis metilos: δ 1.02 singulete (3H, CH₃, H-19), δ 0.93 doblete (3H, CH₃, J=6.4 Hz, H-21), dos señales a δ 0.86 doblete,

Tabla.8 Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz).

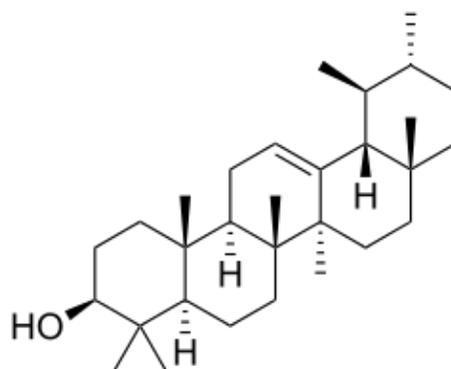
Posición	^{13}C	^1H
1	37.5	1.47
2	31.9	1.56
3	72.0	3.52 (1H, ddd, J=15.4, 10.5, 4.8 Hz),
4	42.5	2.28
5	140.9	-
6	121.9	5.36 (t,1H J= 6.4 Hz)
7	32.1	2.03
8	32.1	1.67
9	50.3	1.49
10	36.7	-
11	21.3	1.52
12	39.9	1.49
13	42.6	-
14	56.9	1.50
15	26.3	1.60
16	28.5	1.84
17	56.3	1.49
18	11.3	0.68
19	19.2	1.02
20	34.2	1.64
21	26.3	0.93 (d,3H J= 6.4 Hz)
22	36.5	0.88
23	23.3	1.04
24	12.2	1.50
25	46.1	1.65
26	20.1	0.86 (t,3H J= 7.2 Hz)
27	19.6	0.86 (t,3H J= 7.2 Hz)
28	19.0	1.04
29	12.0	0.82 (d,3H J= 6.4 Hz)
30	-	2.0

10.5.2 α -amirina (2)

El compuesto **MZ-2**, al igual que el compuesto anterior, se identificó por medios físicos, cromatográficos y espectroscópicos como el α -amirina (**2**, 24.2 mg; p.f. 184-186 °C; Rf: 0.50, CH₂Cl₂: MeOH 9:1)

La CCF comparativa entre el estándar de α -amirina y **MZ-2**, con una fase móvil CH₂Cl₂: MeOH (9:1) mostró que ambos compuestos tienen las mismas características: un Rf: 0.50, ausencia de muestra bajo la lámpara de luz U.V. y al ser revelada con sulfato cérico amoniaco una banda del mismo color.

Para confirmar la estructura del compuesto, se analizan las señales de de RMN ¹H observadas en el espectro **5** y el de RMN ¹³C observadas en el espectro **6**, recopiladas en la Tabla 9. El compuesto **MZ-2**, a diferencia del anterior, es un triterpeno pentacíclico, en el espectro de RMN-¹H muestra una señal a 5.17 (t, J= 3.6) y se obtuvo otra a 3.12 (1H, dd J= 11.2 y 4.3) que es la característica de los triterpenos con un 3-OH y que ha de asignarse al protón axial H-3. Se observaron además seis señales intensas que corresponden a metilos atribuidos a un esqueleto ursano. Los espectros de los compuestos **MZ-2** han sido registrados en CDCl₃ (400 MHz) y los valores obtenidos coinciden con los citados por Olafsson et al. (1997).



α -amirina (**2**)

Tabla.8 Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz).

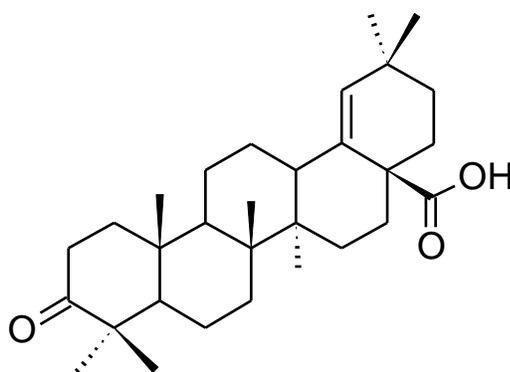
Posición	^{13}C	^1H
1	38.2	
2	28.2	
3	76.8	3.12 (1H, dd J= 11.2 y 4.3)
4	38.8	
5	54.8	0.67 (d, J=11.2)
6	18.0	
7	32.7	
8	40.0	
9	47.1	
10	36.7	
11	22.9	
12	124.5	5.17 (t, J= 3.6)
13	138.2	
14	41.6	
15	27.2	1.94 (td, J=4.5; 13.5 H)
16	25.6	1.76 (td, J=5.0; 13.5 H)
17	33.7	
18	59.4	
19	389.4	
20	39.1	
21	30.4	
22	41.5	
23	28.1	0.93(s)
24	15.9	0.74(s)
25	15.9	0.71(s)
26	16.9	0.86(s)
27	23.3	1.10(s)
28	28.6	0.94
29	17.9	0.83 (d, J= 6.0 Hz)
30	21.1	0.72 (d, J= 7.0 Hz)

10.5.2 Ácido morónico (3)

El compuesto **MZ-3**, se identificó por medios físicos, cromatográficos y espectroscópicos como el ácido morónico (**3**, 48.4 mg; m.p. 210-211 °C; Rf: 0.72, AcetOH: MeOH 8:2).

Para confirmar la estructura del ácido morónico (**3**), se analizaron las señales del espectro de RMN ^1H observadas en el espectro **8** y el espectro de RMN ^{13}C observadas en el espectro **9** y recopiladas en la Tabla 10. El ácido morónico (**3**), se obtuvo como cristales incoloros. Su espectro de ^1H NMR muestra señales correspondientes a siete metilos terciarios (δH 1.08, 1.03, 1.02, 1.00, 0.97, 0.94, 0.79), un protón olefínico (δH 5.16, s), y un grupo oximetileno (δH 3.43, d $J = 11.2$ Hz; 3, 97, d $J = 11.2$ Hz). Su espectro de ^{13}C RMN mostró señales para 30 carbonos, incluyendo una cetona (δC 221.5), un carboxilo (δC 179.5), un doble enlace (δC 133.5 y 136.6); los otros 25 carbonos tenían cambios químicos de δC 14.8 a 55.2. Sobre la base de ^1H . Se determinaron los espectros de ^1H COSY, HMQC y HMBC, 1 ser un triterpenoide de tipo oleanano con un doble enlace (C-18), un grupo oximetileno (C-23) y un carboxilo Grupo (C-28) (Figura 1). El espectro de ^{13}C RMN de 1 fue similar a la del ácido morónico (6). Por lo tanto, la estructura planar de 1. Se determinó que era ácido 23-hidroximorónico. En el 2D Espectro NOESY de 1,

un protón oximetileno (δ H 3.97) correlacionada con C-25 (δ H 0.89), y tanto el oximetileno Los protones (δ H 3.43 y 3.97) mostraron correlaciones con C-24 (δ H 1.27) (Figura 2). Así, la estructura fue asignada como Ácido morónico (3).



Ácido morónico (3)

Tabla 10. Datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C y de RMN ^1H realizado en CH_3OD (400 MHz)

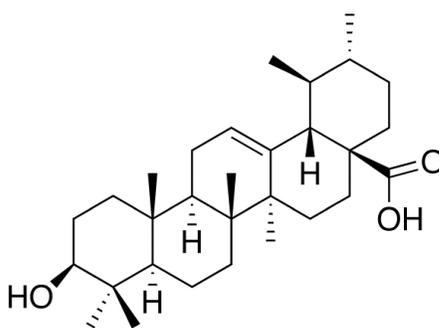
Posición	^{13}C	^1H
1	39.7	
2	33.8	
3	221.5	3.43, d J= 11.2 Hz; 3, 97, d J= 11.2 Hz
4	47.1	
5	54.7	0.67 (d, 1H J= 11.6 Hz)
6	19.5	
7	32.2	
8	40.0	
9	47.7	
10	36.9	
11	21.3	
12	25.5	
13	41.3	
14	42.4	
15	29.2	1.94 (td, 1H J= 13.5, 4.5, Hz)
16	33.6	1.76 (td, 1H J= 5.0, 13.5 Hz)
17	47.7	
18	136.6	5.17 (t, 1H J= 3.6 Hz)
19	133.5	
20	31.9	
21	33.3	
22	26.7	1.85 (td, 1H J= 3.0, 7.0 Hz)
23	20.8	0.93 (s)
24	16.6	0.74(s)
25	15.6	0.73(s)
26	14.8	0.89(s)
27	23.2	1.01(s)
28	179.5	0.94(s)
29	30.4	0.85(s)
30	29.4	0.73(s)

10.5.4 Ácido ursólico

El compuesto **MZ-4**, se identificó por medios físicos, cromatográficos y espectroscópicos como el ácido ursólico (**4**, 24.2 mg; p.f. 184-186 °C; Rf: 0.50, Hexano: Acetato de Etilo 7:3)

La CCF comparativa entre el estándar de ácido ursólico y **MZ-4**, con una fase móvil Hexano: Acetato de Etilo 7:3 tienen las mismas características ambas un Rf: 0.50, ausencia de muestra bajo la lámpara de luz U.V. y al ser revelada con sulfato cerico amoniacal una mancha del mismo color.

Para confirmar la estructura del compuesto, se analizan las señales del espectro de RMN ^1H observadas en el espectro **12** y el espectro de RMN ^{13}C observadas en el espectro **13** y recopiladas en la Tabla 11. 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 O-H (d, δ 4.17) y de los protones del carbono C6 (m, δ 3.3) y ^{13}C (t, δ 5.23).



Ácido ursólico (**4**)

Tabla 11. Datos obtenidos en el espectro de RMN C¹³ y de RMN H¹ realizado en CH₃OD (400 Mz)

Posición	¹³ C	¹ H
1	36.99	
2	55,27	
3	38.71	3.16 (dd, 1H J= 5.1 Hz)
4	38.87	
5	27.47	0.67 (d, 1H J= 11.6 Hz)
6	77.30	
7	39.57	
8	33.18	
9	47.50	
10	18.48	
11	138.63	
12	42.1	5.06 (t, 1H J= 3.2 Hz)
13	125.04	
14	42.0	
15	127.2	1.94 (td, 1H J= 13.5,4.5, Hz)
16	26.6	1.76 (td, 1H J= 5.0, 13.5 Hz)
17	23.7	
18	49.0	
19	24.6	
20	53.6	
21	28.2	
22	31.5	1.85 (td, 1H J= 3.0, 7.0 Hz)
23	38.1	0.93 (s)
24	39.6	0.74(s)
25	39.6	0.73(s)
26	28.8	0.89(s)
27	15.2	1.01(s)
28	16.1	0.94(s)
29	17.4	0.85(s)
30	23.4	0.73(s)

10.6 Porcentaje de inhibición de edema auricular

El ensayo utilizado para determinar la actividad antiinflamatoria fue el edema inducido en oreja de ratón por TPA. Este ensayo permitió monitoriar la actividad biológica de los extractos, fracciones y compuestos aislados, empleando la concentración de 0.1 mg/oreja de ratón. A continuación se presentan los resultados obtenidos de este ensayo.

10.6.1 Evaluación de los extractos

En la Tabla 12 se reportan los porcentajes de inhibición de las orejas tratadas con los extractos orgánicos. Se puede observar que todos los extractos mostraron actividad antiinflamatoria con respecto al fármaco control (Indometacina) y que de los tres extractos evaluados el diclorometánico (89.1 ± 2.2 %) es el que presentó la mayor actividad.

Tabla 12. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos de *B. cuneata* a una dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.

Extracto/Compuesto	% de Inhibición
Hexánico	53.3 ± 1.2
Diclorometanico	89.1 ± 2.2
Metanólico	77.4 ± 1.8
Indometacina	41.5 ± 0.8

Los extractos y la indometacina fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media \pm S.E.M. $n=4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

10.6.2 Fraccionamiento primario

Una vez que se obtuvieron los resultados de las actividades de los extractos orgánicos se decidió fraccionar el extracto diclorometánico de *B. cuneata*, esto con la finalidad de identificar los compuestos activos. Los resultados demostraron actividad antiinflamatoria en todas las fracciones dado que sus porcentajes de inhibiciones fueron superiores a la obtenida en el control indometacina, siendo la fracción **FS-3** (85.1 ± 1.8 %) la más activa, ver **Tabla 2**.

Tabla 13. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos de *B. cuneata* a una dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.

Muestra	% de Inhibición
FS-1	66
FS-2	55
FS-3	85.1 ± 1.8
FS-4	44
FS-5	34
FS-6	25
Indometacina	41.5 ± 0.8

Los extractos fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media \pm S.E.M. $n = 4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

10.6.2.1 Fraccionamiento secundario de FS-3

Del fraccionamiento secundario de **FS-3** ($85.1 \pm 1.8\%$), se obtuvieron seis fracciones (FS-3A a FS-3F), las cuales al ser evaluadas mostraron una importante actividad antiinflamatoria tres de ellas (FS-3C, FS-3E y FS-3F) respecto al fármaco control indometacina.

Tabla 14. Evaluación del efecto antiinflamatorio de FS-3 a una dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.

Fracción	% de inhibición
FS-3A	66
FS-3B	55
FS-3C	77.8 ± 0.8
FS-3D	44
FS-3E	72.8 ± 1.4
FS-3F	78.8 ± 0.7
Indometacina	41.5 ± 0.8

Los extractos fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media \pm S.E.M. $n= 4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

10.7 Actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *B. cuneata*

Los compuestos obtenidos de las fracciones FS-3C, FS-3E y FS-3F fueron: β -sitosterol (1) y α -amirina (2) de la primera fracción, ácido morónico (3) de la segunda y ácido ursólico (4) de la tercera, en ese orden.

Todos los compuestos mostraron actividad por arriba del fármaco control, cabe resaltar que el compuesto con mayor efecto antiinflamatorio fue el ácido morónico (3).

Tabla 15. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos obtenidos de la fracción FS-3 a dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.

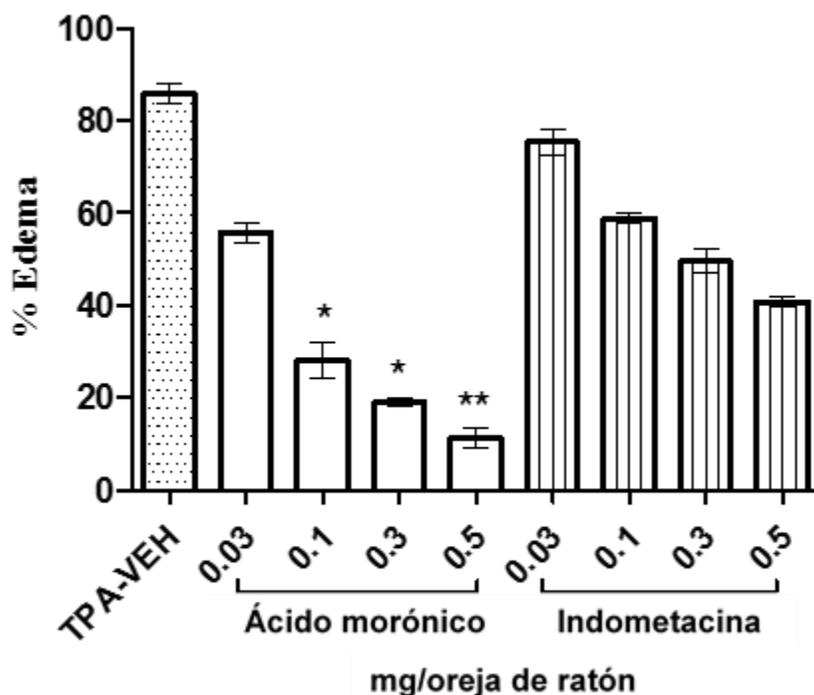
compuestos	% de inhibición
β -sitosterol (1)	45.1 \pm 1.8
α -amirina (2)	44.9 \pm 1.2
Ácido morónico (3)	73.3% \pm 1.1
Ácido ursólico (4)	57.2% \pm 1.7
Indometacina	41.5 \pm 0.8

Los extractos fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media \pm S.E.M. $n=4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

10.8 Dosis inhibidora media (DI₅₀) de la actividad antiedematogénica del ácido morónico (3)

El análisis de la curva de concentración-respuesta establece que el ácido morónico (3) inhibió la inflamación inducida por TPA de una manera dependiente de la concentración. La actividad principal se obtuvo con la mayor concentración utilizada (0.5 mg/oreja) y presentó un E_{max} de 90.10% ± 0.6 y un DI₅₀ de 0.09 mg/oreja (Fig. 3A).

Gráfica 1. Dosis inhibitoria media (DI₅₀) de la actividad antiinflamatoria del ácido morónico (3)



Los extractos fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media ± S.E.M. $n = 4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

10.9 Actividad antihistamínica de los compuestos aislados de *B. cuneata*.

Los tejidos de oreja tratados con TPA y con los compuestos puros (1-4) se sometieron a cuantificación de histamina usando un análisis de HPLC. Todos los compuestos disminuyeron los niveles de histamina a una dosis de 0.1 mg/oreja, que fue similar al de la indometacina (Tabla 1). Los compuestos más activos fueron el ácido morónico (3) con $73.3\% \pm 1.1$ y el ácido ursólico (4) con $57.2\% \pm 1.7$ a concentraciones de 0.1 mg/oreja; en comparación con la indometacina ($33.8 \pm 0.8\%$), siendo que el ácido morónico fue casi dos veces más potente.

Tabla 16. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos dosis de 0.1 mg/oreja de ratón.

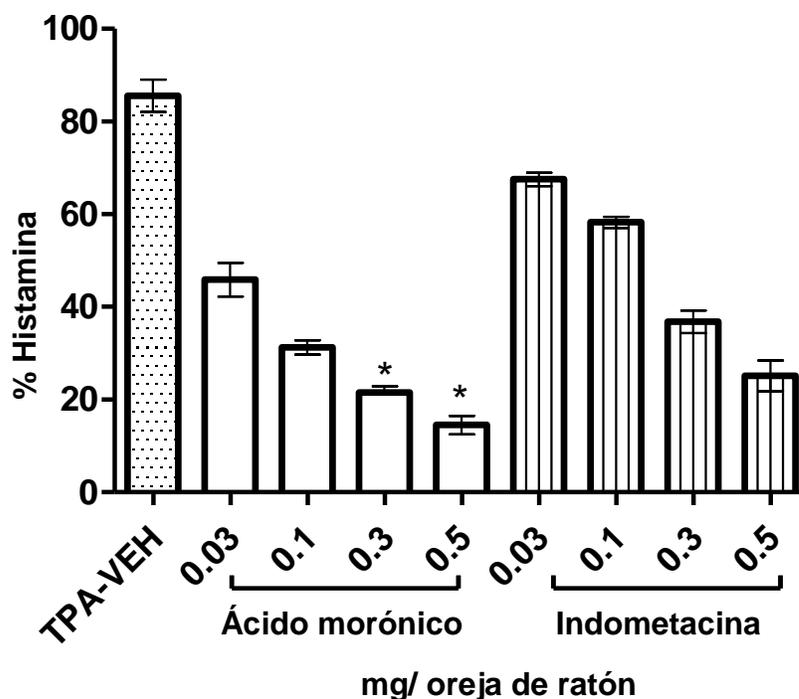
Muestra	% Inhibición de histamina
β -sitosterol (1)	55.1 ± 1.5
α -amirina (2)	47.9 ± 0.9
ácido morónico (3)	73.3 ± 1.1
ácido ursólico (4)	$57.2\% \pm 1.7$
Indometacina	33.8 ± 0.8

Los extractos y el control indometacina fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media \pm S.E.M. $n=4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

10.9.1 Dosis inhibidora media (DI_{50}) de la actividad antihistamínica del ácido morónico (3).

El análisis de la curva de concentración-respuesta de la actividad antihistamínica establece que el ácido morónico (3) inhibió la histamina de una manera dependiente de la concentración, siendo que la actividad principal se obtuvo con la mayor concentración utilizada (0.5 mg / oreja) y que presentó un E_{max} de $90.10\% \pm 0.6$ y un DI_{50} de 0.09 mg/oreja (Gráfica 2).

Gráfica 2. Dosis inhibitoria media (DI_{50}) de la actividad antihistamínica del ácido morónico (3).



Los extractos y el control indometacina fueron administrados tópicamente. Los datos muestran la media \pm S.E.M. $n = 4$ animales. * p , 0.05 and ** p , 0.01 con respecto al grupo control analizados por el test de Tukey.

Un gran número de enfermedades inflamatorias se hacen comunes en la sociedad adulta en todo el mundo, como artritis reumatoide, cáncer, inflamación intestinal, de las más importantes. Los medicamentos antiinflamatorios empleados en la clínica tienen la desventaja de efectos secundarios y del alto costo de tratamiento. Como alternativas contamos con las medicinas tradicionales y productos naturales. En los últimos 20 años la familia Burserácea ha cobrado gran interés en el mundo debido a sus propiedades farmacológicas, destacando la actividad antiinflamatoria de sus resinas aromáticas (Dowiejua, 1993; Poehland, 1987). Los compuestos obtenidos y responsables de esta actividad pertenecen diferentes a clases químicas tales como flavonoides, terpenos, alcaloides y lignanos.

En México, existen alrededor de 100 especies del género *Bursera* y 30 especies dentro del estado de Morelos, siendo una de ellas *B. cuneata* comúnmente llamada copal, los copales sección *Bullockia* como *B. cuneata* son utilizadas por sus propiedades medicinales desde épocas muy antiguas y que actualmente continúan empleándose en la medicina tradicional para

El estudio biodirigido de *B. cuaneata* se realizó mediante el método *in vivo* de edema de oreja inducido con TPA, a dosis de 0.1 mg/oreja. Este ensayo es un método ampliamente utilizado para evaluar sustancias con posible actividad antiinflamatoria, ya que es capaz de disparar los mecanismos del proceso inflamatorio agudo de forma similar a la observada en la clínica (Di Rosa y col., 1971; García y col., 1973 y Vinegar y col., 1968).

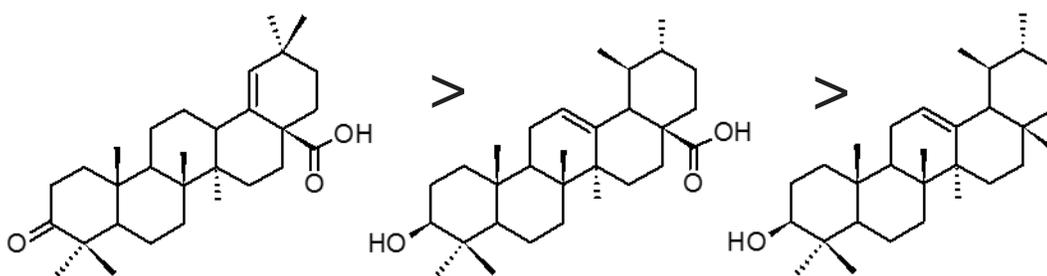
El estudio biodirigido de los extractos obtenidos de *B. cuneata* demuestra que los tres extractos fueron activos en comparación con la indometacina, siendo el extracto diclorometánico el más activo y el hexanánico el de menor actividad. Dado que el extracto diclorometánico fue el extracto más activo se decidió realizar su fraccionamiento, con la fracción más activa **FS-3**. El fraccionamiento secundario de **FS-3** nos llevó a aislar cuatro compuestos: un esteroide (1) y tres triterpenos pentacíclicos (2-4), siendo de estos últimos, dos con esqueleto tipo ursano (2 y 4) y uno con un esqueleto oleanano (3). El ácido morónico fue el más abundante (12.1%) y en menor proporción fueron el ácido ursólico (4, 6.5%), β -sitosterol (1, 4.7%) y α -amirina (2, 3.2%), en ese orden. Los compuestos 1, 2 y 4 fueron previamente identificados en el género *Bursera* (Navarro et al., 2001), pero el ácido morónico (3) es la primera vez que se reporta.

Todos los compuestos aislados (1-4) disminuyeron el edema inducido por TPA, a dosis de 0.1 mg/oreja y presentaron mayor actividad que el control positivo (Tabla 1). Una revisión exhaustiva en la literatura sobre las propiedades antiinflamatorias de los compuestos aislados reveló que los compuestos (1-4), en este modelo murino, fueron reportados previamente por Carretero et al., 2007; Navarro et al., 2001 y Bannoa et al., 2004 y Yasukawa et al., 2012, respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los descritos previamente.

En el ensayo de TPA, se observa que el ácido morónico (3) fue el compuesto más activo, seguido por el ácido ursólico (4), el β -sitosterol (1) y la α -amirina (2). Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente por Honda (Honda et al., 2000) en sus estudios relación estructura-actividad (SAR), en donde se utilizaron

compuestos con esqueletos ursano y oleanano, demostrando lo siguiente: **a)** el esqueleto tipo oleanano es más activo que el esqueleto de ursano; **b)** la presencia de un grupo ceto en **C-3** y grupos carboxilo en **C-17** en el esqueleto tipo oleanano aumenta la actividad antiinflamatoria; y **c)** un aumento en el número de grupos funcionales oxigenados aumenta el efecto (**Fig. 4**).

Además, podríamos agregar un punto final a esta lista, sugiriendo que la presencia de un doble enlace en el **anillo E** en la posición C-18 y C-19 aumenta la actividad



a) Tipo oleanano

b) Grupo ceto en C-3

c) Grupo carboxilo en

a) Tipo ursano

b) Grupo carboxilo en
C-17

a) Tipo ursano

Fig. 4. Triterpenos pentacíclicos con mayor actividad antiinflamatoria por sus estructuras químicas.

antiinflamatoria en este ensayo (**Fig. 5**). Esto se puede fundamentar al comparar los resultados obtenidos por Ginner et al., 2000 del ácido oleanónico (**5**) y los obtenidos en nuestro estudio del ácido morónico (**3**), ambos probados en el ensayo de TPA a una dosis de 0.5 mg/oreja. La actividad del ácido morónico (**3**) fue mejor que del ácido oleanónico, y la única diferencia entre sus estructuras químicas es la presencia de un doble enlace en el carbono C-18 y C-19 (**Fig. 6**). Sin embargo, esto tendría que ser demostrado experimentalmente.

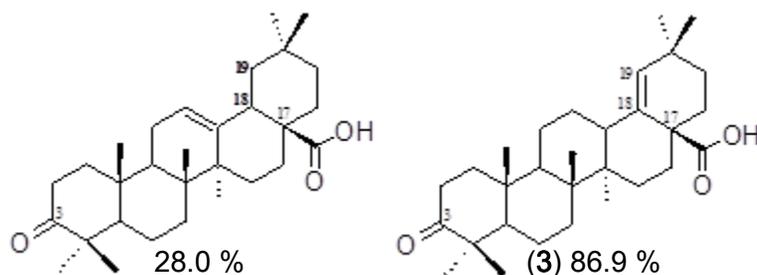


Figura 6. Comparación de las estructuras químicas de ácido oleanónico y ácido morónico y su influencia para la actividad antiinflamatoria.

En las últimas décadas ha aumentado el interés en el estudio de farmacológico de los triterpenos, dado que en algunas especies vegetales son los principales responsables de la actividad antiinflamatoria. Una búsqueda exhaustiva en la literatura arroja que el ácido ursólico (4) es uno de los compuestos más estudiados con un resultado de no menos de 520 actividades biológicas, dentro de las más importantes, como un potente agente antiinflamatorio. En modelos de inflamación aguda, tales como el edema de la oreja de ratón inducido por propiolato de etilfenilo (EPP), así como en el edema de la pata de rata inducido por la carragenina, este terpeno ha exhibido actividad inhibitoria de la formación del edema (Recio y col., 1995a; Recio y col., 1995b). Este compuesto no sólo inhibe la elastasa en los leucocitos humanos, sino además la actividad de la 5-lipoxigenasa y de la ciclooxigenasa (Safayhi y col., 1997; Najid y col., 1992). La α -amirina ha resultado poseer muy interesante actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda por carragenina, así como inhibidos de COX-1 y COX-2 y NO.

Para el caso de α -amirina (1), ampliamente distribuida en la naturaleza, ésta inhibe las enzimas involucradas en la producción de eicosanoides, como COX-1, COX-2 y PLA₂, así como la inhibición de NO. En el caso del β -sitosterol (2), se sabe que inhibe la infiltración de leucocitos (Navarro et al., 2001), y en el caso del ácido ursólico (4), se reporta que la actividad antiinflamatoria de esta molécula se lleva a cabo mediante la inhibición de las vías COX, 5-lipoxigenasa y elastasa (Safayhi et al., 1997; Najid et al., 1992). Sin embargo, según nuestro conocimiento, en el caso del ácido morónico (3), se encontró de una actividad vasorrelajante por inhibición de las enzimas eNOS que redujo la producción de NO (Rios et al., 2012).

Además, evaluamos los efectos de estos triterpenos naturales en la inhibición de la histamina. Se observó un alto nivel de histamina en las orejas tratados con TPA para la inducción de la inflamación. Un tratamiento previo tópico de ácido morónico (3) y ursólico (4) afectó profundamente los niveles de histamina, seguido de β -sitosterol (1) y α -amirina (2). Estudios previos muestran que los compuestos α -amirina (2) y ácido ursólico (4) inhiben la liberación de histamina a partir de mastocitos de rata inducida por el compuesto inhibidor 40/80 (Na-Ra et al., 2014; Tsuruga et al., 1991). Además, el β -sitosterol (1) reduce los niveles de histamina en el suero de ratones NC/Nga tratados con DNFB Oliveira et al., 2004. Para el ácido morónico (3), este es el primer informe que demuestra su efecto en la disminución de los niveles de histamina. El ensayo de TPA no sólo nos permitió cuantificar la histamina, sino que también sugirió que el ácido morónico actuó como un estabilizador de los mastocitos, dado que la histamina presente en este modelo *in vivo* proviene principalmente de los mastocitos (Cook et al., 2011). Si el ácido morónico previniera la desgranulación de los mastocitos, no sólo inhibiría la

liberación de histamina, sino que también evitaría la liberación de otros metabolitos, como PG2, leucotrienos, citosinas y el factor de crecimiento. Este efecto dual aporta beneficios, primero, al prevenir las manifestaciones de la inflamación alérgica causada por la histamina y, segundo, al prevenir los eventos de la cascada de la inflamación debido a la inhibición de los eventos mediados por las citoquinas u otros metabolitos derivados de los mastocitos en las células proximales. Se habrá que realizar experimentos *in vitro* para corroborar esta hipótesis.

Nuestros hallazgos respaldan el uso tradicional de *B. cuneata*, que es rica en triterpenos pentacíclicos, para inducir actividades antiinflamatorias y antihistamínicas para el tratamiento de procesos inflamatorios.

- ✓ La hipótesis resultó correcta puesto que se aislaron compuestos antiinflamatorios y antihistamínicos de las partes aéreas de *B. cuneata*.
- ✓ Todos los extractos (diclorometánico $89.1 \pm 2.2\%$, hexánico $53.3 \pm 1.2\%$ y metanólico $77.4 \pm 1.8\%$) mostraron actividad antiinflamatoria, en comparación a la indometacina ($39.8 \pm 0.8\%$).
- ✓ El extracto diclorometánico ($89.1 \pm 2.2\%$) indicó una actividad antiinflamatoria mayor a los otros dos extractos y a la indometacina ($39.8 \pm 0.8\%$).
- ✓ De la fracción más activa (FS-3) del extracto diclorometánico se aislaron 4 compuestos identificados como β -sitosterol (1), α -amirina (2), ácido ursólico (3) y ácido morónico (4).
- ✓ Todos los compuestos mostraron actividad antiinflamatoria sobre el modelo *in vivo* de edema inducido en oreja de ratón: β -sitosterol ($45.1 \pm 1.8\%$), α -amirina ($44.9 \pm 1.2\%$), ácido morónico (68.1 ± 1.3) y ácido ursólico ($61.6 \pm 2.1\%$), en comparación con la indometacina ($39.8 \pm 0.8\%$).
- ✓ El ácido morónico (3) fue el compuesto que presentó mayor actividad antiinflamatoria entre los compuestos.

- ✓ Todos los compuestos mostraron mayor actividad antihistamínica (β -sitosterol ($55.1 \pm 1.5 \%$), α -amirina ($47.9 \pm 0.9\%$), ácido morónico ($73.3 \pm 1.1 \%$) y ácido ursólico ($72.2 \pm 1.7 \%$) en comparación con la indometacina ($33.8 \pm 0.8 \%$).

- ✓ El ácido ursólico y el ácido morónico fueron los compuestos que presentaron mayor actividad antihistamínica entre los compuestos.

- ✓ La actividad antiinflamatoria y antihistamínica del extracto diclorometánico se debe a la presencia de los compuestos β -sitosterol (1), α -amirina (2), ácido morónico (3) y ácido ursólico (4). Dichas moléculas son parte del contenido metabólico responsable de la actividad antiinflamatoria y antihistamínica que se le atribuye a las hojas y tallos de *B. cuneata* en la Medicina Tradicional Mexicana, por lo que este estudio fitoquímico biodirigido contribuye a generar las bases científicas para la obtención de estructuras y fuentes novedosas con potencial antiinflamatorio y antihistamínico.

- ✓ Del extracto diclorometánico de *B. Cuneata* :
 - Aislar los compuestos de las fracciones primarias FS-3A; FS-B; FS-3D del extracto diclorometánico, dado que también presentan actividad antiinflamatoria.
 - De los compuestos encontrados ver las sinergias dentro de las actividades antiinflamatoria y antihistamínica.
 - Del ácido morónico (3):
 - ver el posible mecanismo de acción por otras vías tales como: IL-6, TNF α , COX-1, COX-2 Etc.
 - Determinar la toxicidad (DL₅₀)
 - Elaboración de una formulación tópica.
 - Realizar la síntesis de nuevas moléculas, a partir de los triterpenos reportados en este trabajo de investigación, para la producción de nuevos fármacos o posibles mejoras en los ya existentes.

- ✓ De los otros extractos de *B. Cuneata*:
 - Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico, dado que también presentó actividad antiinflamatoria.

- Argueta A. L., and Cano M. R. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Bannoa, N., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Tabata, K., Nakamura, Y., Nishimura, R., Kimura, Y., Suzuki, T. 2006. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal Ethnopharmacology*, 107, 249–253.
- Binet, I., and Wood, K. J. 2003. In Vivo Models of Inflammation. In: Winyard P.G., Willoughby D.A. (eds) *Inflammation Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 225. Humana Press
- Carretero, M. E., López-Pérez, J. L., Abad, M. J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel. A. and Noguera P, B. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fraction from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 11-15.
- Case, R. J., Tucker, A. O., Maciarelllo, M. J., Wheeler, K. A. 2003. Chemistry and Ethnobotany of Commercial Incense Copals, Copal Blanco, Copal Oro, and Copal Negro, of North America. *Economic Botany*, 57, 189–202.

- Cook, E. B., Stahl, J. L., Barney, N. P., and Graziano, F. M. 2004. Mechanisms of Antihistamines and Mast Cell Stabilizers in Ocular Allergic Inflammation. *Medicinal Chemistry Reviews*, 1, 333-347.
- De la Cruz-Canizares, Juana., Domenech-Carbo, María-Teresa., Gimeno-Adelantado, Jose-Vicente., Mateo-Castro, Rufino., and Bosch-Reig, Francisco. 2005. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1093, 177–194.
- Gautam, R., and Jachak, S. M. 2009. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. *Medicinal Research Reviews*, 29 (5), 767-820.
- Giner-Larza, E. M., Manez, S., Recio, M. C., Giner, R.M., Prieto, J.M., Cerda-Nicolas, M., Rios, J. L. 2001. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Europe Journal Pharmacology*, 428, 137–143.
- Gouygou, J. P., Sinquin, C. and Durand, P. 1987. High Pressure Liquid Chromatography Determination of Histamine in Fish. *Journal of food Science*, 52 (4), 925-927.

- Hernández, Esther. 1996. Vocabulario en lengua castellana y mexicana de fray Alonso de Molina: Estudio de los indigenismos léxicos y registro de las voces españolas internas. Editorial CSIC - CSIC Press. p. 91. ISBN 9788400075996.
- Monroy, C., and Castillo, P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. México: Centro de Investigaciones Biológicas/Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Najid, A., Simon A, Cook, J., Chable, H., Delage, C., Chulia, A., and Rigaud, M. 1992. Characterization of ursolic acid as a lipooxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. FEBS Letters. 299: 213-217.
- Navarro, A., De las Heras, B., and Villar, A. 2001. Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 24(5) 470—473.
- Oliveira, F. A., Lima-Junior, R., Cordeiro, C. P., Wilcare, M., Vieira-Junior, G., M. Chaves, Mariana H., Almeida, Fernanda R.C., Silva, Flavia A. Santos, Regilane M., and Rao, Vietla S.N. 2004. Pentacyclic triterpenoids, α , β -amyryns, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 78 719-725.

- Recio, M., Giner, R. M., Mañes, S., Ríos, L. 1995. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Medica*, 61:182-185.
- Romero-Estrada, A., Maldonado-Magaña, A., González-Christen, J., Marquina- Bahena, S., Garduño-Ramírez, M. L., Rodríguez-López, V., and Alvarez, L. 2016. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera* 16, 422.
- Rios, M. Y., López-Martínez, S, López-Vallejo, F., Medina-Franco, J. L., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vazquez J. G., Hidalgo-Figueroa, S., Hernández-Abreu O., Estrada-Soto E. S. 2012. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: Ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia*, 83, 1023–1029
- Safayhi, H., Rall, B., Sailer, E., and Ammon, H. 1997. Inhibition of Boswellic acids of human leucocyte elastase. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 281, 460-463.
- Tsuruga, T., Chun Y.T., Ebizuka, Y. Y., Sankawa, U. 1991. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 39:3276-3278.

- Yasukawa, K., Yu, S. Y., Tsutsumi, S., Kurokawa, M., and Park, Y. K. 2012 Inhibitory Effects of Brazilian Propolis on Tumor Promotion in Two-Stage Mouse Skin Carcinogenesis. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 2, 71-76.

La presente tesis generó las siguientes publicaciones

Solicitud de patente: Forma Farmacéutica con Actividad Antihistamínica, Autores: Magdala Zulema Figueroa Suárez., Alexandre T. Toshirrico C., María del Carmen Gutiérrez V. Verónica Rodríguez López. Junio 21-2018.

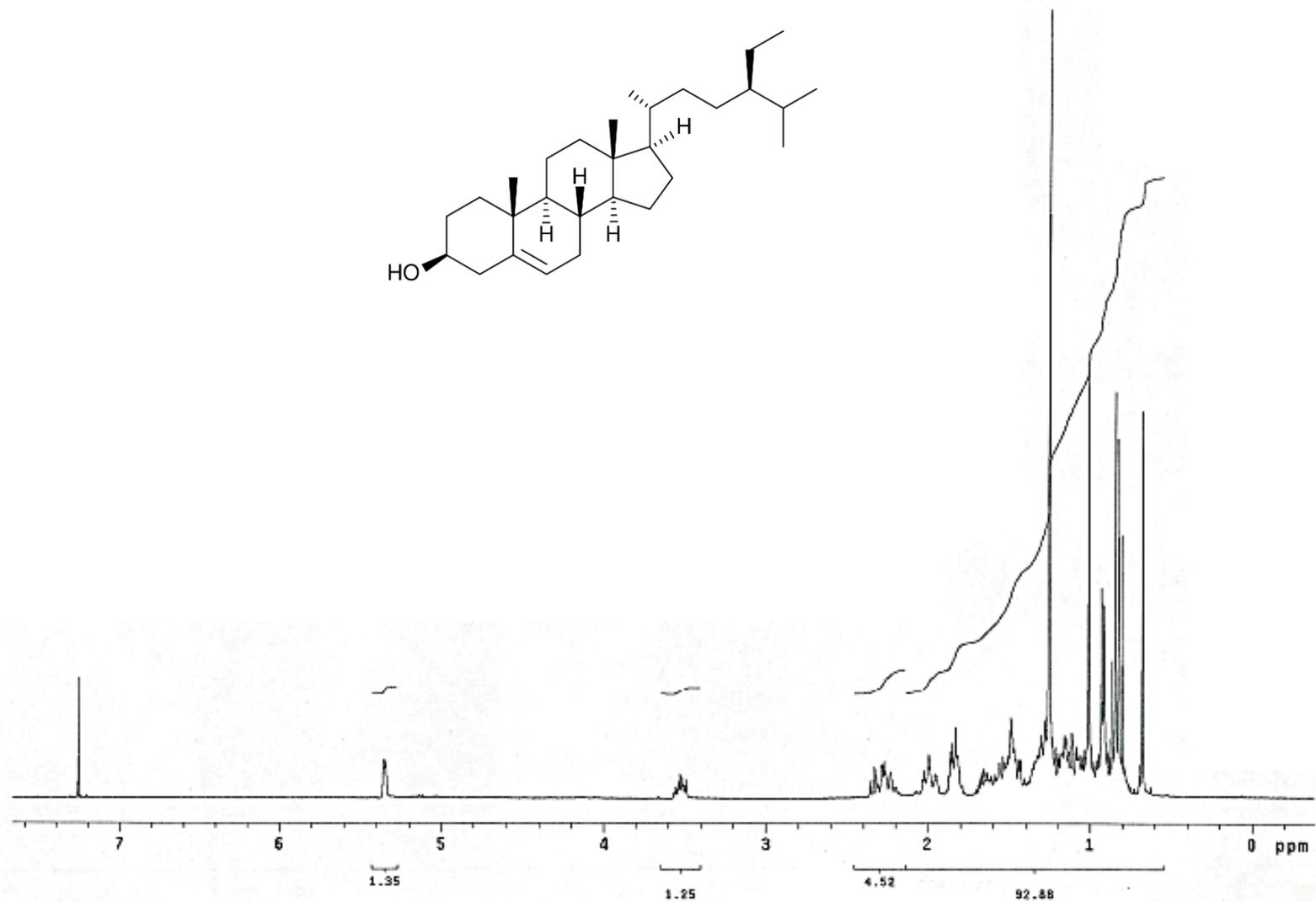
Artículo: Anti-inflammatory and antihistaminic activity of triterpenoids isolated from *Bursera cuneata* (Schldl.) Engl. Magdala Zulema Figueroa Suárez, Alexandre Taketa, Judith González Christen, Maria del Carmen Gutiérrez., Verónica Rodríguez López. Journal Ethnopharmacology. Enviado.

Los resultados generados a partir de este proyecto se presentaron en los siguientes foros:

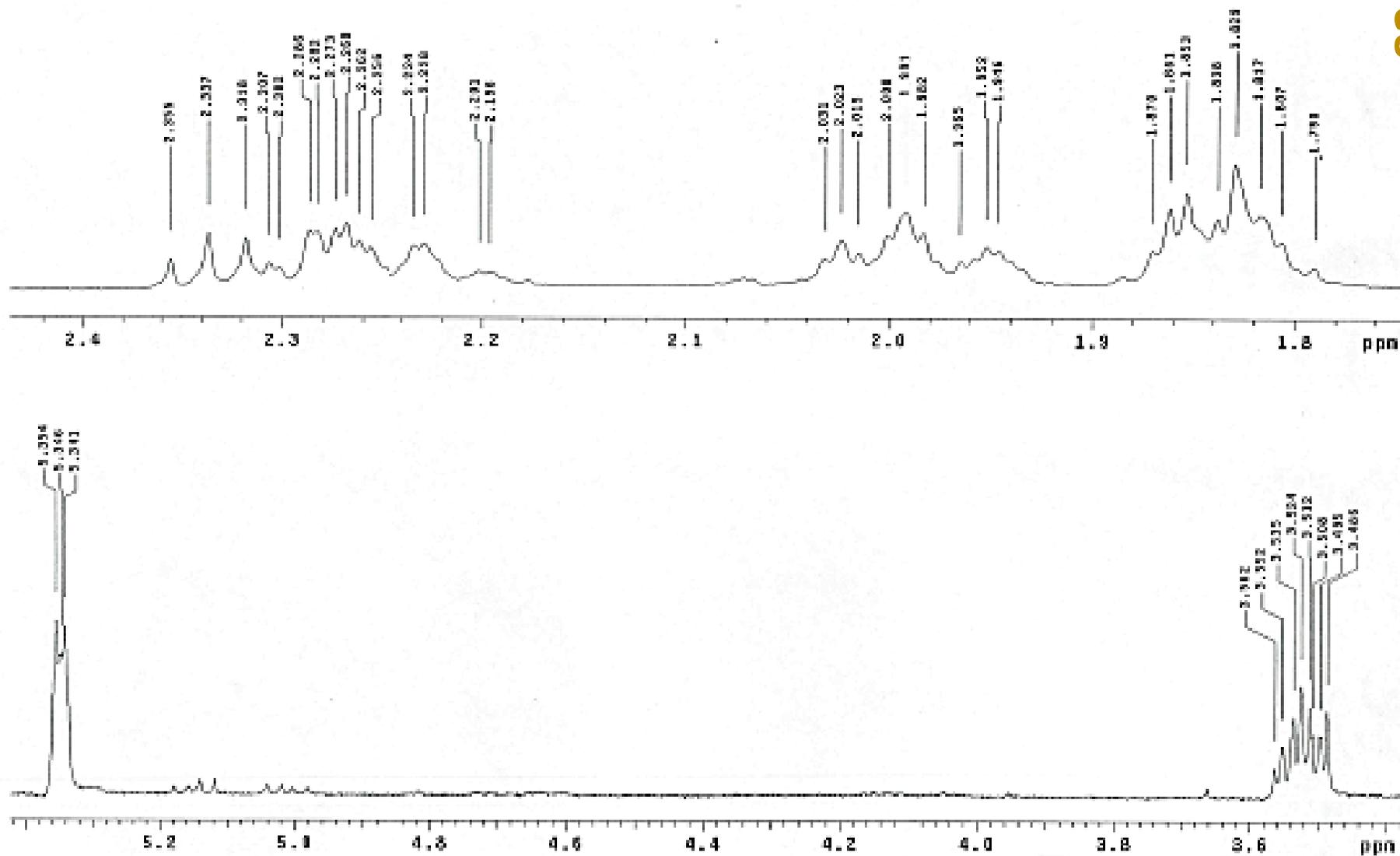
Jornada Farmacéutica 2011 y Octavo Encuentro De Estudiantes De Farmacia Del 1 al 2 de Diciembre del 2011, UAEM, Cuernavaca, Morelos. Aislamiento de Compuestos con actividad antiinflamatoria de las especies *Bursera cuneata* y *Bursera ariensis*.

Actividad antiinflamatoria de partes aéreas de *Bursera cuneata*. Figueroa S. Magdala Zulema, Cardoso T. Alexandre Toshirrico, Rodríguez L. Verónica. 9° Reunión Internacional de investigación de Productos Naturales, Dra. Luisa Urania Román Marín. Mineral de la reforma, Hidalgo del 29 al 31 de Mayo del 2013.

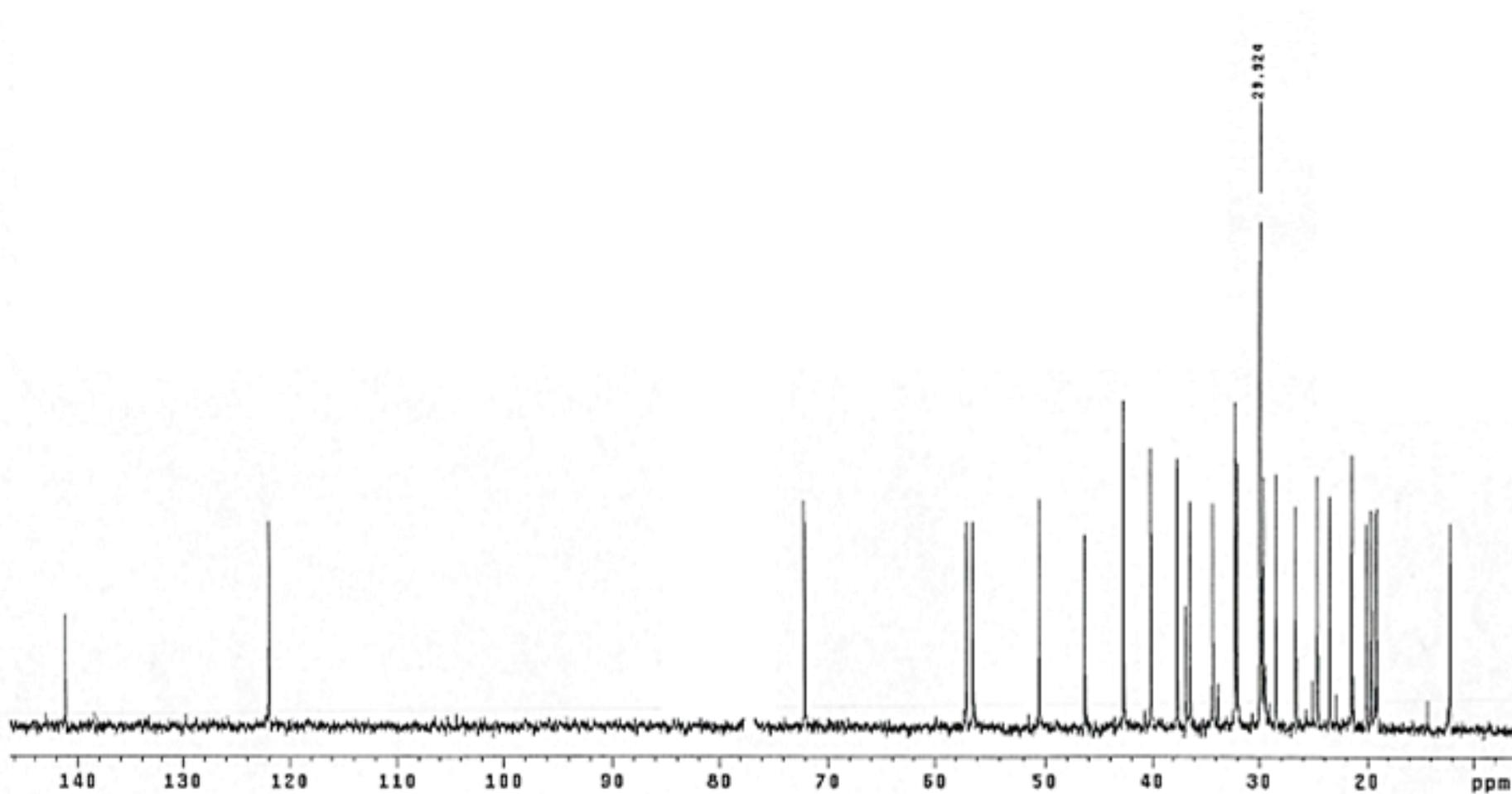
Triterpenos con actividad antiinflamatoria aislados de *Bursera cuneata*. Figueroa S. Magdala Zulema., Cardoso T. Alexandre Toshirrico, Rodríguez L. Verónica. XLVI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y V Internacional de Ciencias Farmacéuticas 2013, que se llevará a cabo del 27 al 30 de Octubre del presente año en la ciudad de Cancún, Quintana Roo.



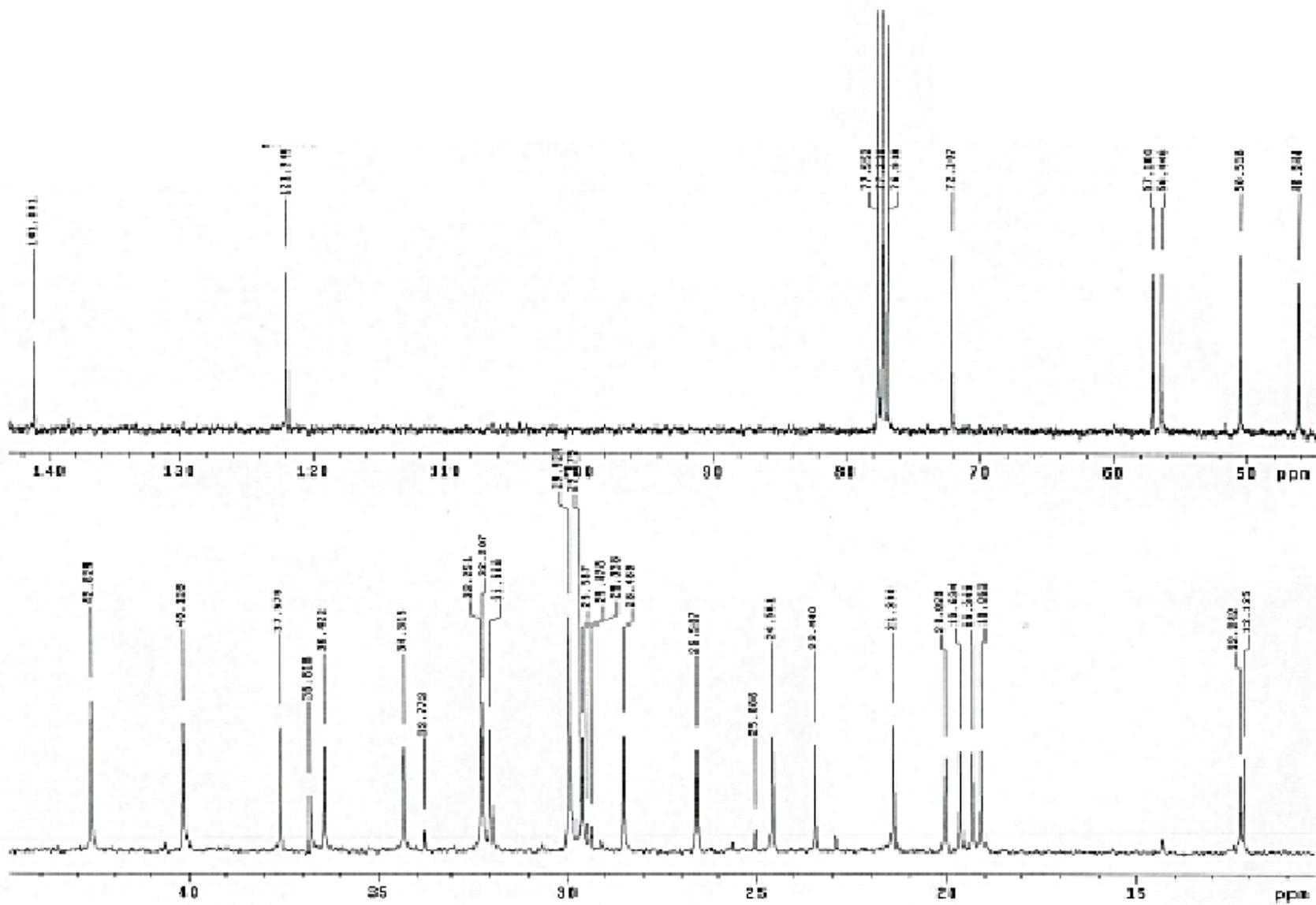
Espectro 1. RMN H^1 de β -sitosterol CDCl_3 . 400 MHz, δ (ppm)



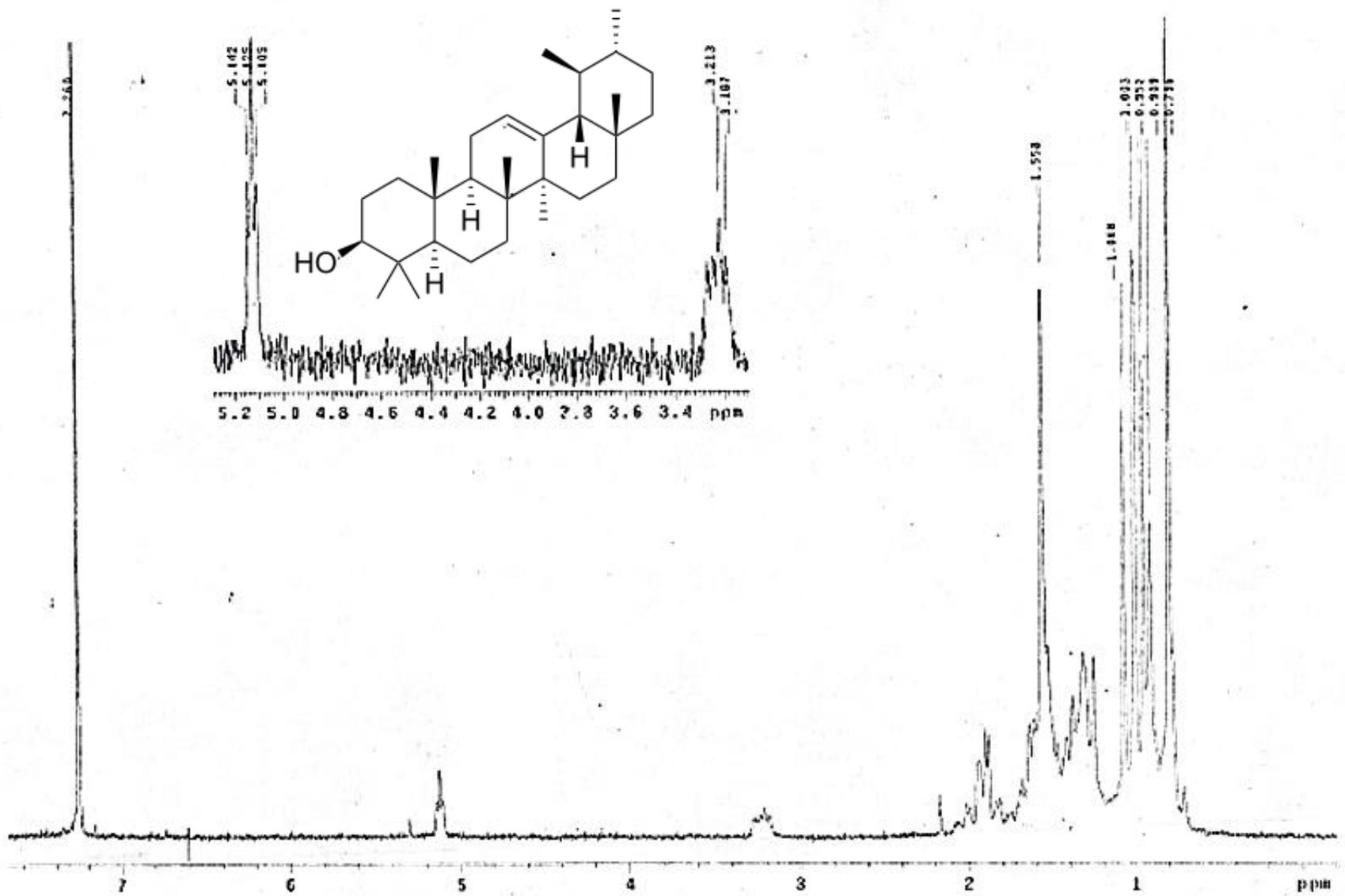
Espectro 2. RMN H¹ de β-sitosterol CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



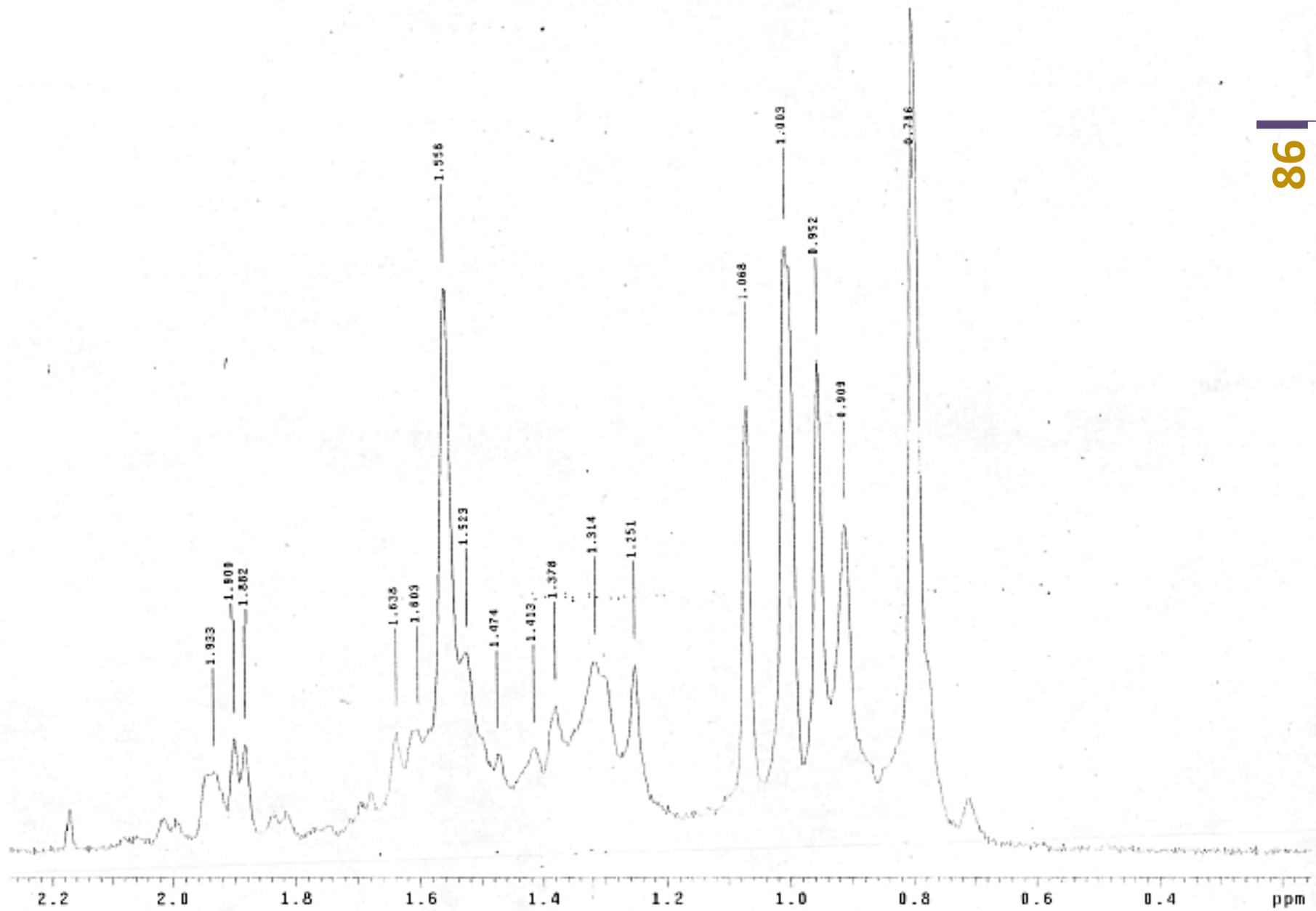
Espectro 3. RMN C^{13} de β -sitosterol CDCl_3 . 400 MHz, δ (ppm)



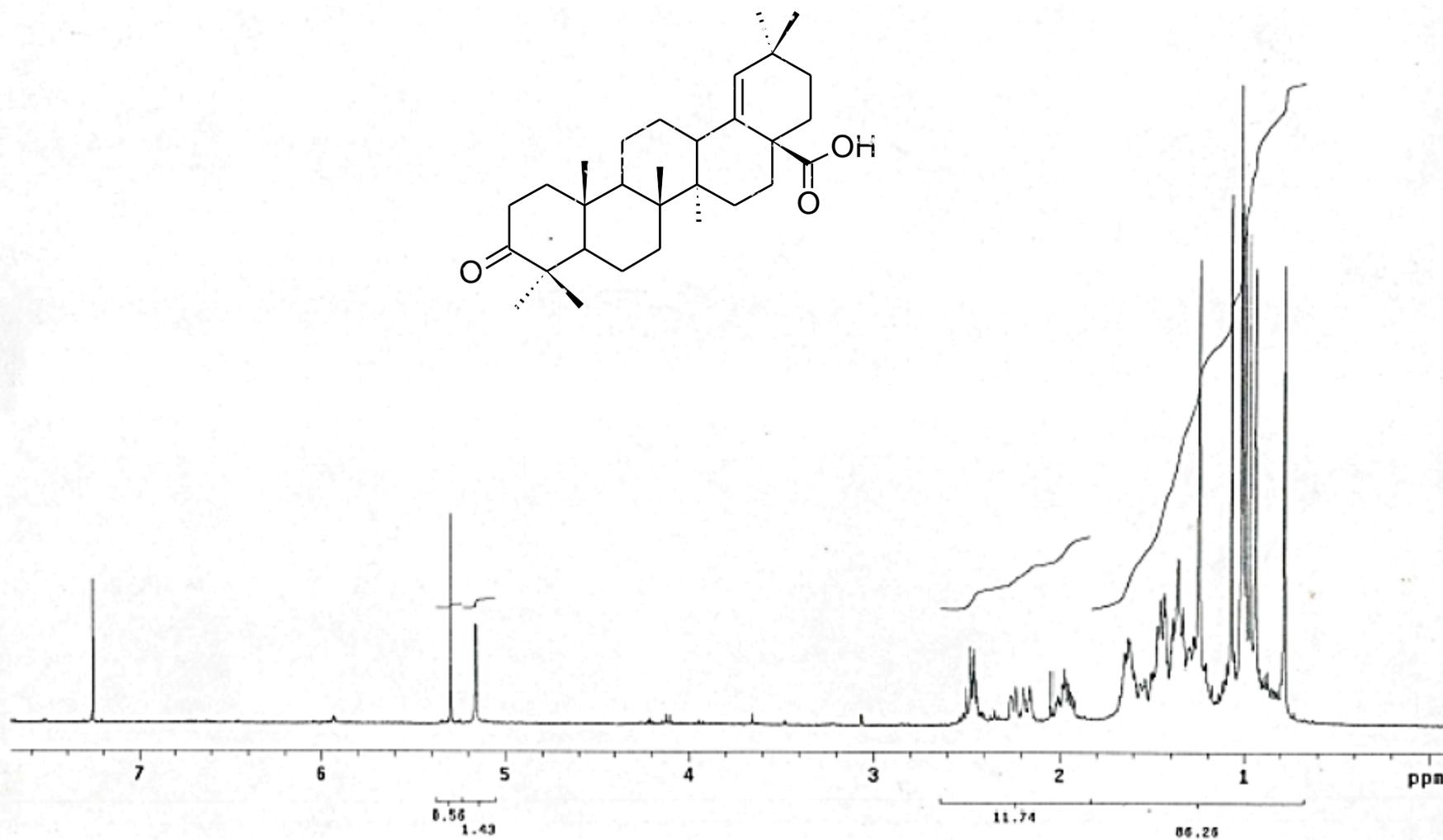
Espectro 4. RMN C¹³ de β-sitosterol CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



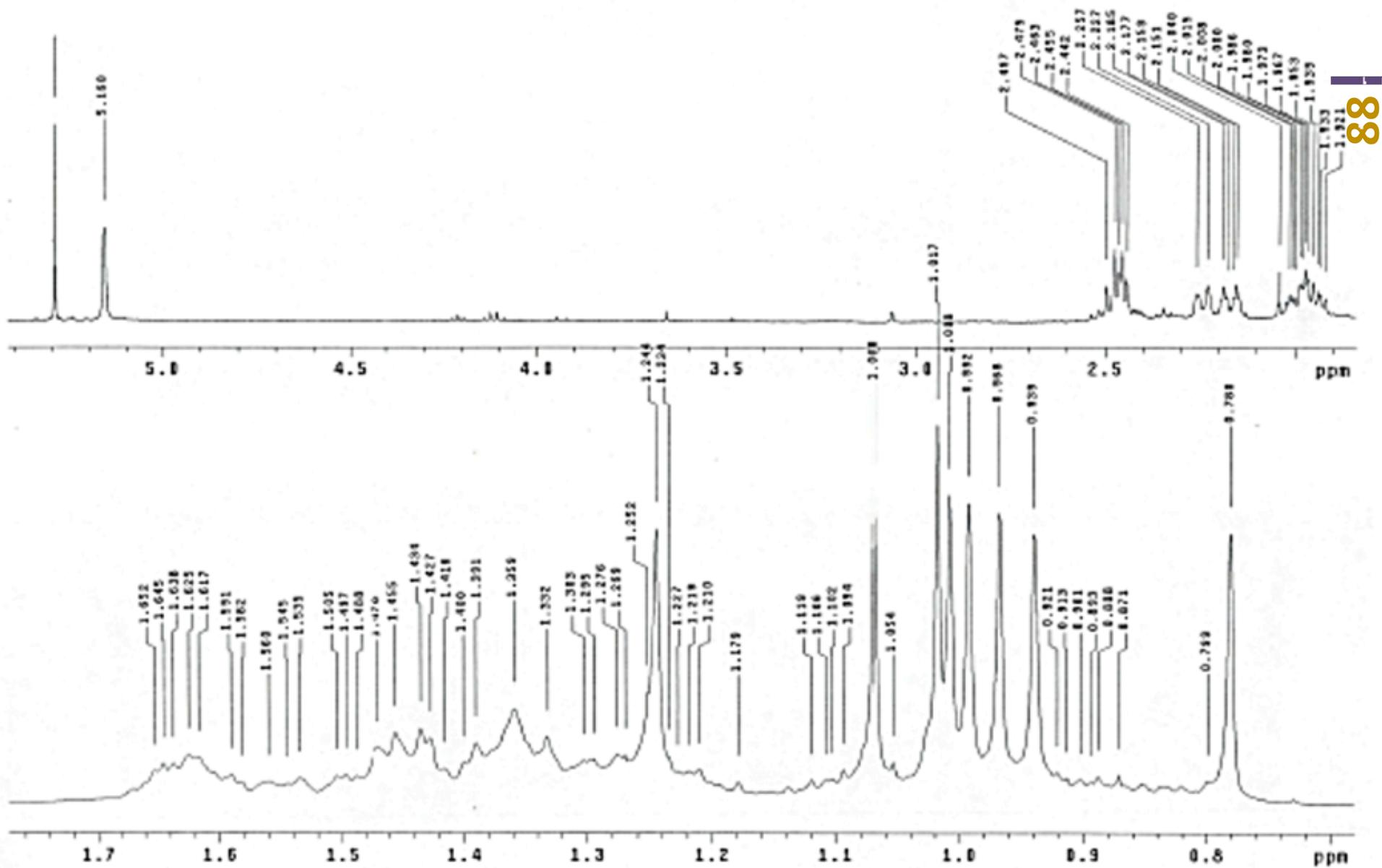
Espectro 5. RMN H¹ de α-amirina CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



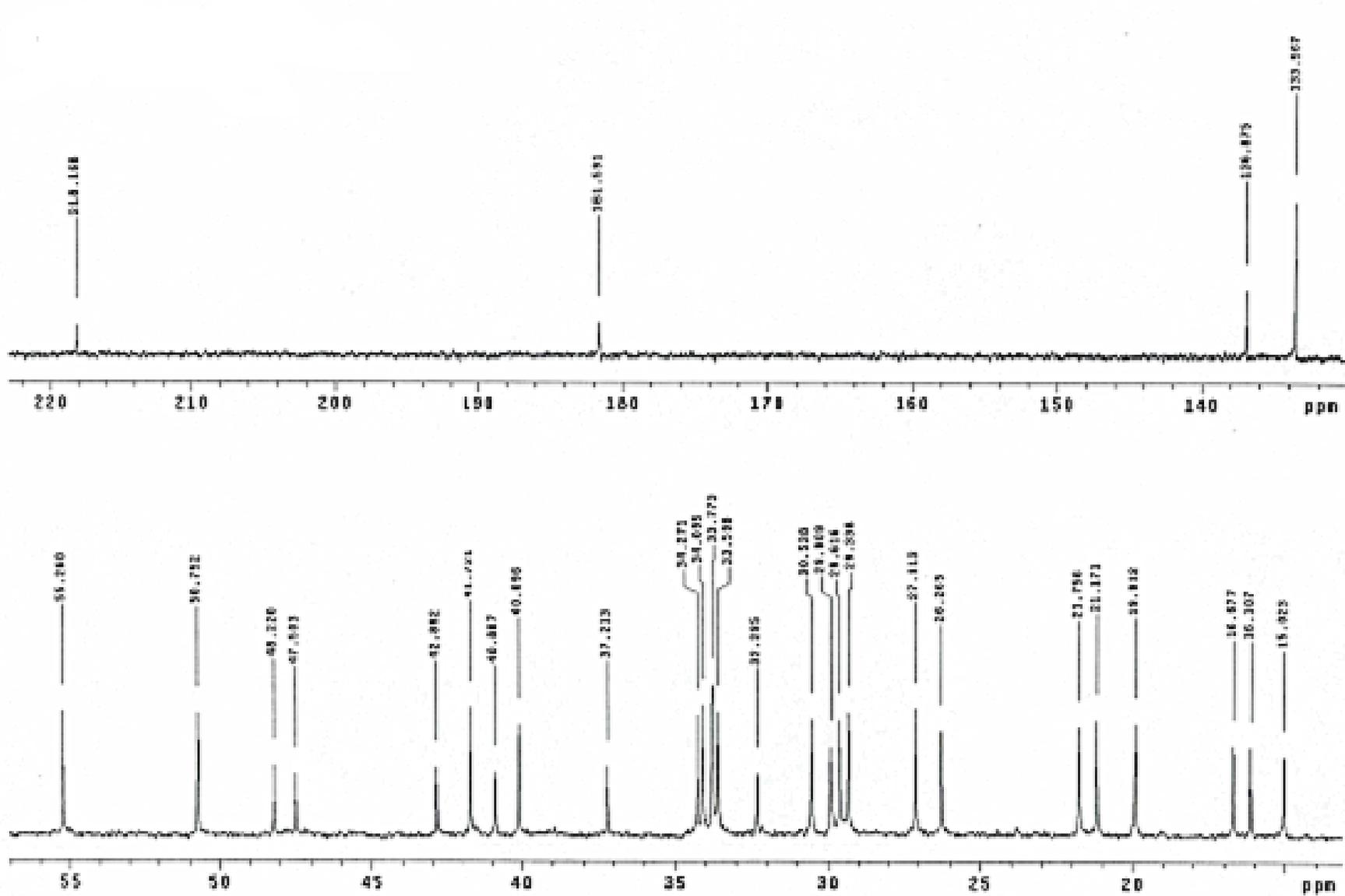
Espectro 6. RMN H¹ de α-amirina CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



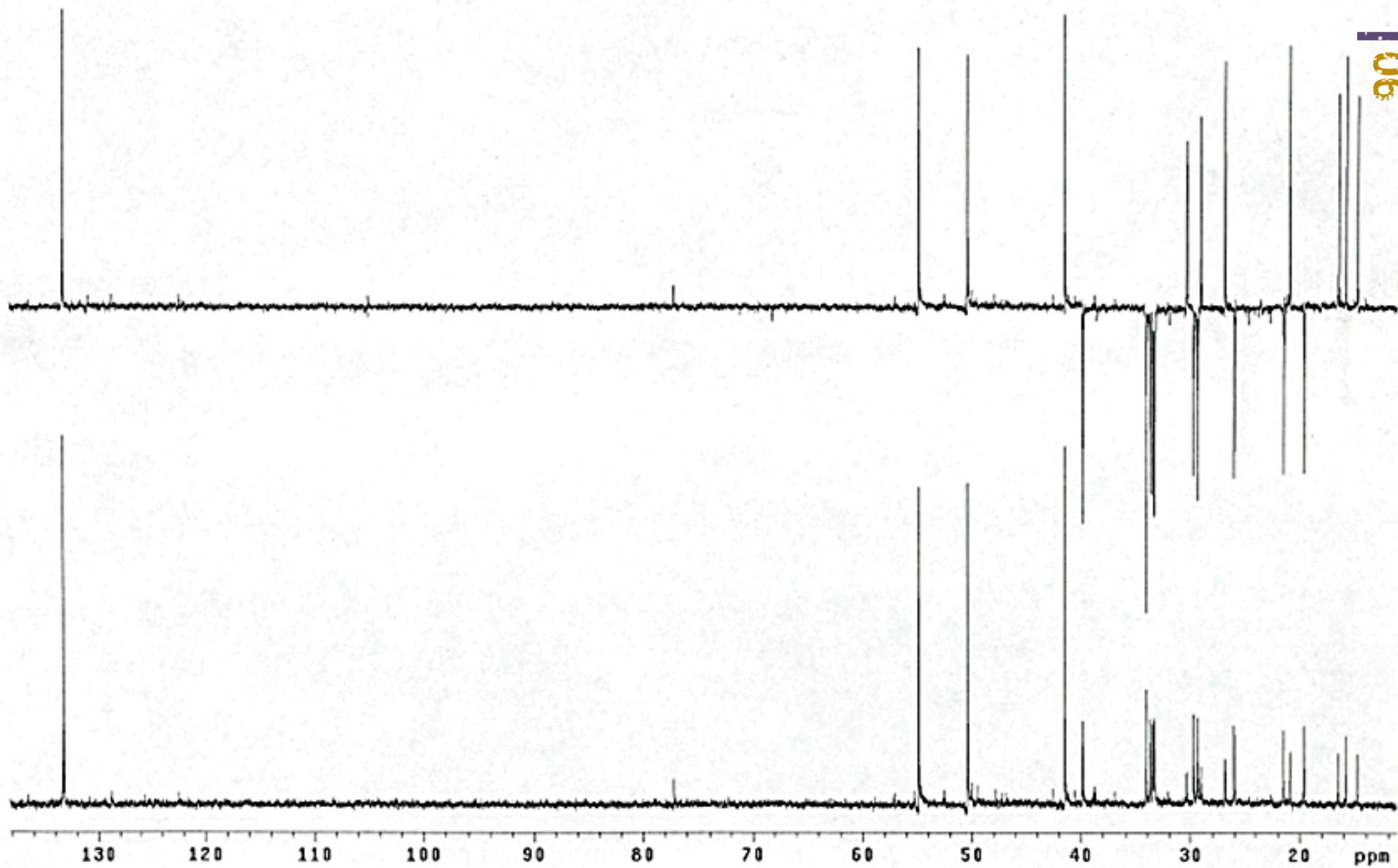
Espectro 7. RMN H¹ de Ácido morónico CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



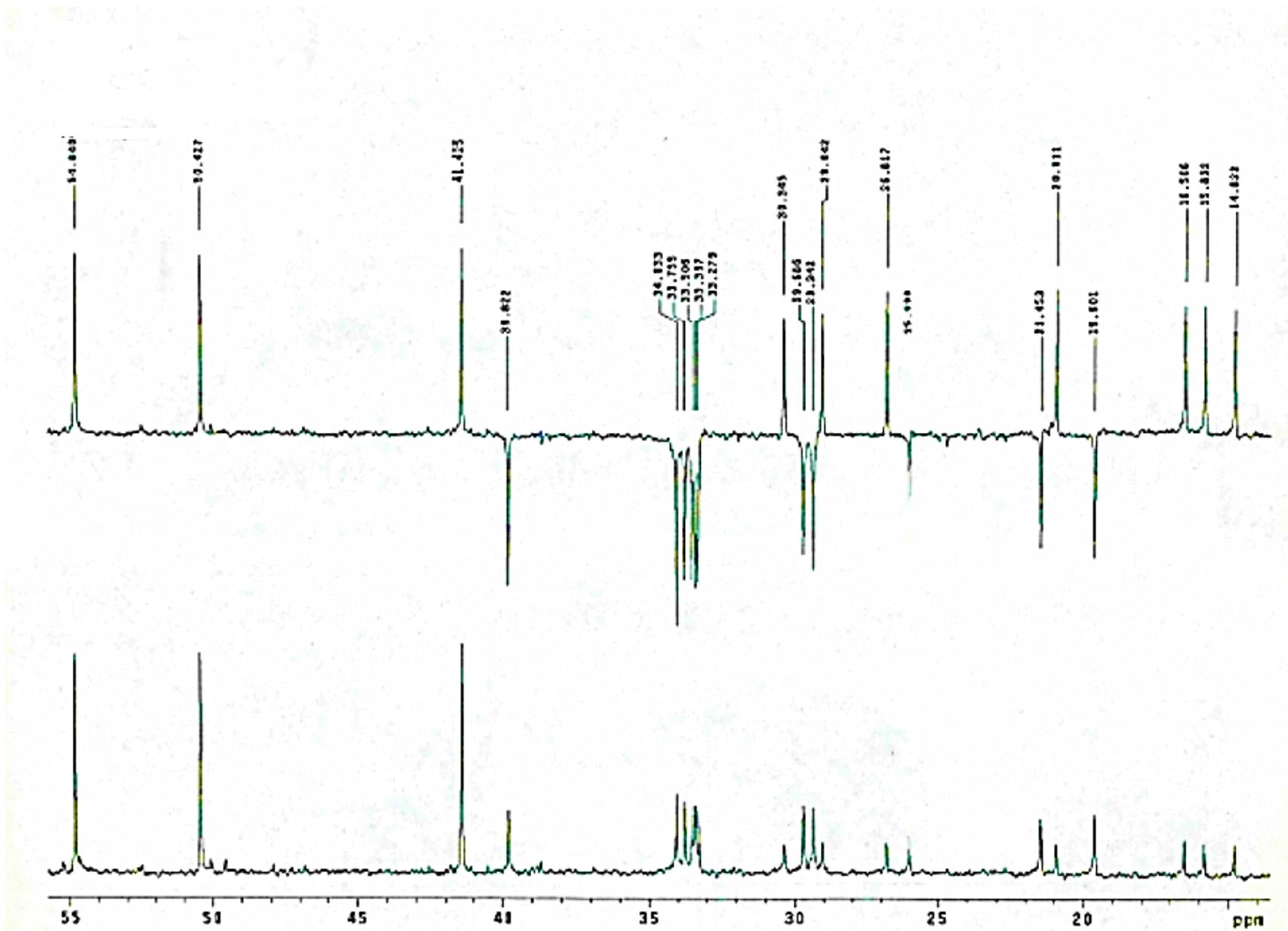
Espectro 8. RMN H¹ de Ácido morónico CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



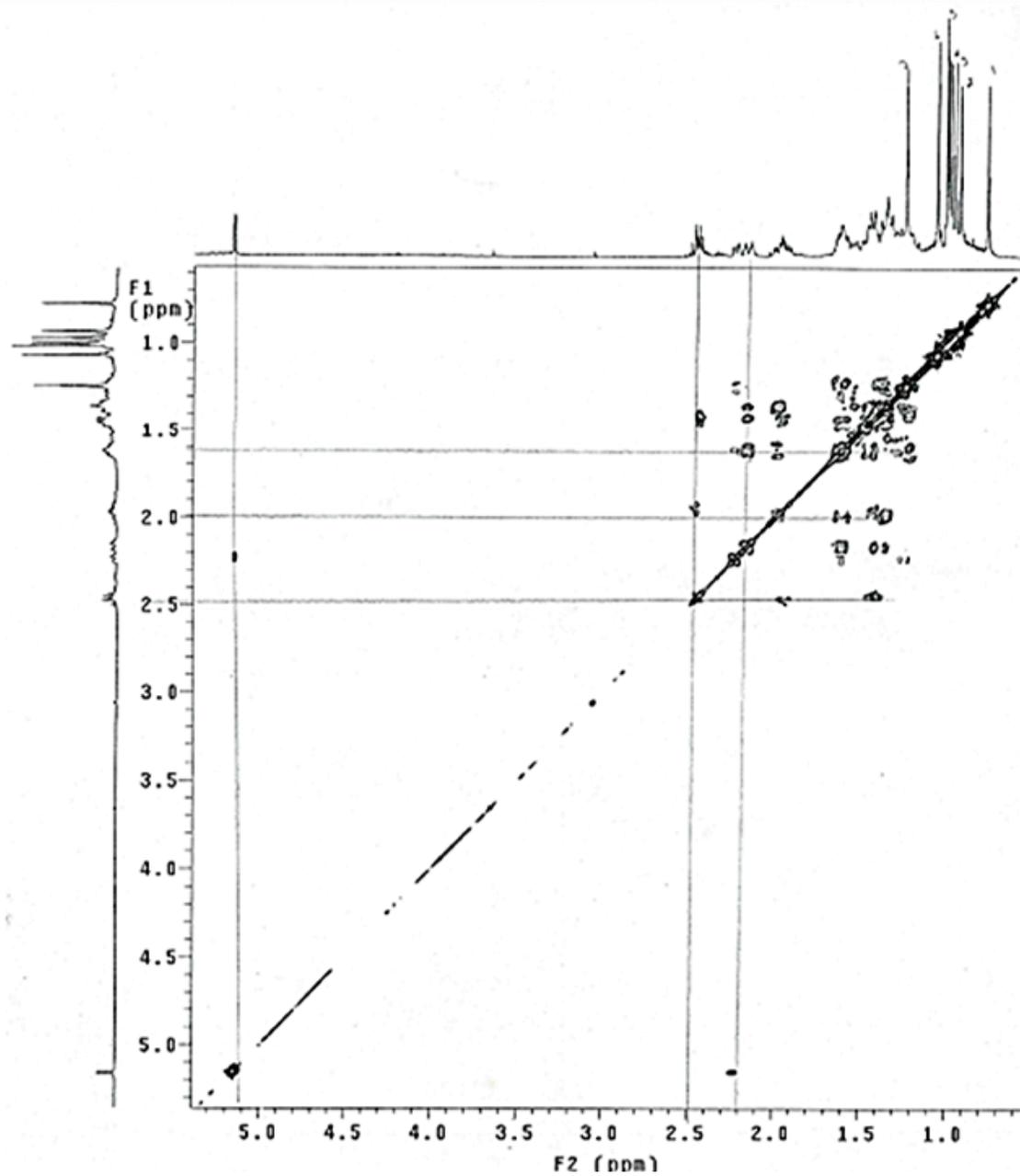
Espectro 9. RMN C¹³ de Ácido morónico CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



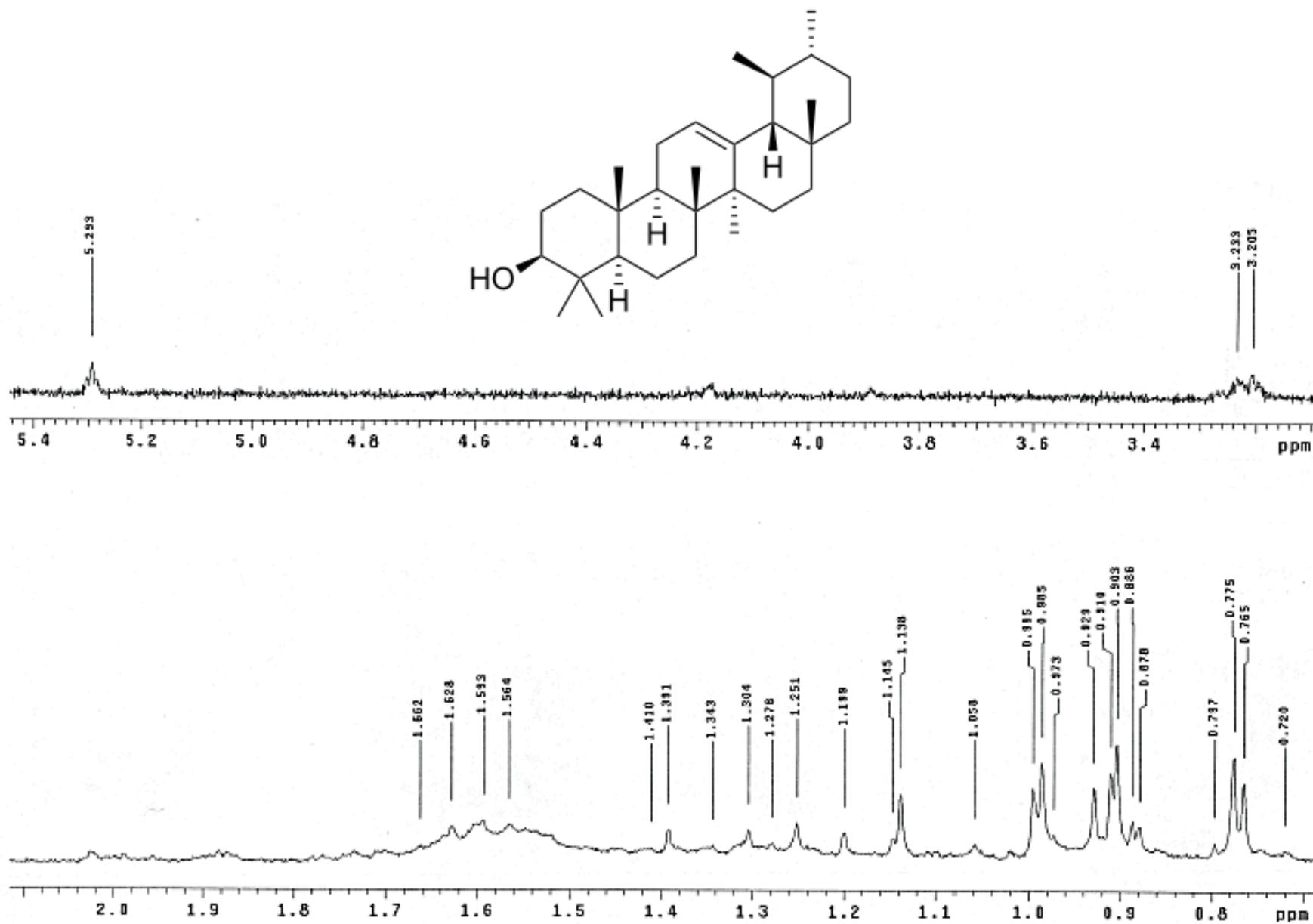
Espectro 10. RMN C¹³ DEPT Ácido morónico CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



Espectro 11. RMN C^{13} DEPT Ácido moronico CDCl_3 . 400 MHz, δ (ppm)



Espectro 12. RMN C¹³ DEPT Ácido morónico CDCl₃. 400 MHz, δ (ppm)



Espectro 13. RMN H^1 de Ácido ursólico CDCl_3 , 400 MHz, δ (ppm)

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Magdala Zulema Figueroa Suárez

Título de la tesis: " Actividad Antiinflamatoria y antihistamínica de los triterpenos
aislados de *Bursera cuneata*.

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia
 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Firma del miembro del jurado

30-Enero-19

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Magdala Zulema Figueroa Suárez

Título de la tesis: " Actividad Antiinflamatoria y antihistamínica de los triterpenos
aislados de *Bursera cuneata*.

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia
 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Dr. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
Firma del miembro del jurado

06-Marzo-19
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Magdala Zulema Figueroa Suárez

Título de la tesis: "Actividad antiinflamatoria y
antihistamínica de los triterpenos aislados
de *Bursera cuneata*""

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

08/febrero/2019.
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Magdala Zulema Figueroa Suárez

Título de la tesis: " Actividad Antiinflamatoria y antihistamínica de los triterpenos
aislados de *Bursera cuneata*.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Dra. Judith González Christen
Firma del miembro del jurado

06-Marzo-19
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: M.F. MAGDALA ZULEMA FIGUEROA SUAREZ

Título de la tesis: "ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIHISTAMINICA
DE LOS TRITERPENOS AISLADOS DE *Berbera cuneata*."

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

30-01-2019
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Magdala Zulema Figueroa Suárez

Título de la tesis: " Actividad Antiinflamatoria y antihistamínica de los triterpenos
aislados de *Bursera cuneata*.

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia
 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Firma del miembro del jurado

30-Enero-19

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Magdalena Zulema Figueroa Suárez

Título de la tesis: "Actividad antiinflamatoria y antihistamínica
de los triterpenos aislados de *Bursera cuneata*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Ismael León Rivera

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

10 Febrero 2019

Fecha