



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Estudio Fitoquímico de las hojas de *Bursera fagaroides*”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA**

PRESENTA:

ISRAEL DOMÍNGUEZ VALLE

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LAURA PATRICIA ÁLVAREZ BERBER

CUERNAVACA, MORELOS

Mayo, 2022

# AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, a mi padre que, aunque hoy ya no se encuentra conmigo siempre me apoyó y me vio crecer día con día hasta su último respiro. A mi madre que hoy en día está conmigo y me da ánimos para avanzar cada día más.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos que me abrió las puertas y al Centro de Investigaciones Químicas y a todos sus docentes que me enseñaron y me forjaron lo que hoy en día sé y hago.

Al Laboratorio LANEM.

A mi asesora la Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, que me dio la oportunidad de trabajar en este proyecto y me ayudo cuando lo necesite, también con ella a todo el laboratorio 321 del CIQ.

No menos importante y un agradecimiento infinito a la persona que estuvo conmigo en todo momento, la persona que me dio fuerzas y regaños cuando pensaba que ya no podía más: Karen Nohemi Tenorio Carnalla

Por último, a mis compañeros de la generación 2016 a todos aquellos con los que disfrute un momento, una plática, el ayudarnos mutuamente hasta terminar la carrera.

# Resumen

México se ha caracterizado por el gran uso de medicina tradicional, durante varios siglos en diferentes regiones los pobladores han tomado provecho de plantas con actividad medicinal en infusiones, ungüentos o simplemente en la comida que elaboran. Una de las especies en la que nos centramos en este trabajo es *Bursera fagaroides* (*B. fagaroides*), un árbol o arbusto que crece en la mayor parte del Estado de Morelos. La familia Burseraceae, a la cual pertenece esta especie, comprende alrededor de 87 especies, distribuidas principalmente en territorio mexicano desde el norte de Sonora hasta el sur de Yucatán. Además, se caracteriza por vivir en laderas profundas y precarias de agua. Muchas de sus especies, conocidas con el nombre genérico de copal, se han usado desde tiempos precolombinos en ceremonias religiosas y para el tratamiento de diversos padecimientos.

En la medicina tradicional mexicana, *B. fagaroides* es utilizada para el tratamiento de tumores, granos y afecciones estomacales. Diferentes estudios han demostrado que la corteza de esta especie produce una resina amarilla, constituida principalmente por lignanos de tipo aril tetralino con actividad citotóxica *in vitro* y antitumoral en diferentes estudios *in vivo*. En este trabajo estudiamos la fitoquímica del extracto metanólico de las hojas de *B. fagaroides*, con la finalidad de demostrar la existencia de los lignanos, que hasta el momento se han reportado en los estudios de la corteza.

Estudios de viabilidad celular del extracto metanólico de las hojas de *B. fagaroides* demuestran que si existe una inhibición de líneas celulares de cáncer hepático (Hep3B), próstata (PC3) y cérvico uterino (HeLa).

El fraccionamiento cromatográfico preliminar del extracto metanólico permitió identificar al éter metílico de 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina-A, el lignano más abundante en la corteza y con actividad antitumoral prometedora, junto con otros dos lignanos minoritarios que requieren de mayor purificación para establecer su identidad. Este estudio además indicó que existen otros compuestos de tipo lignano y flavonoides

en el extracto. Esto resulta relevante para la obtención de estos compuestos en las hojas sin dañar al árbol mediante su descortezación.

# Contenido

AGRADECIMIENTOS .....	II
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE ESPECTROS .....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 <i>Bursera fagaroides</i> .....	4
2.2 Lignanos.....	8
2.2.1. Lignanos. ....	8
2.2.2. Clasificación de lignanos.....	11
2.2.3. Mecanismo de acción de los lignanos.....	12
2.2.4. Biosíntesis.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo General .....	21
4.2 Objetivos específicos .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Obtención del material vegetal.....	22
5.2 Preparación del material vegetal, maceración y extracción. ....	23
5.3 Evaluación citotóxica de los extractos (metanol, hexano, diclorometano) 23	
5.4 Purificación del extracto Metanólico.....	25
5.4.1 Purificación de fracción IDV5-1.....	27
5.4.2 Purificación de fracción IDV5-2.....	28
5.4.3 Purificación de fracción IDV5-3.....	29
5.4.4 Purificación de fracción IDV5-4.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32

6.1. Actividad citotóxica y antiproliferativa.....	32
6.2. Purificación del extracto Metanólico de las hojas de <i>Bursera fagaroides</i> ....	35
6.3. Análisis de los compuestos obtenidos por medio de RMN. ....	40
7. CONCLUSIONES .....	55
8. PERSPECTIVAS .....	57
9. BIBLIOGRAFÍA.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Total, de casos de cáncer y los tipos presentes en México 2018.	1
Figura 2.	Ejemplar de <i>B. fagaroides</i> . Tomado de: <a href="http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023-Plantas/Plantas/ORGR0059%20Bursera%20fagaroides.jpg">http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023-Plantas/Plantas/ORGR0059%20Bursera%20fagaroides.jpg</a> . nfo 06 de Junio 2021 14:24 hrs.	4
Figura 3.	Lignanos aislados de <i>B. fagaroides</i> de tipo ariltetralina lactona.	7
Figura 4.	Biosíntesis de fenilpropanoides precursores de lignanos.	10
Figura 5.	Esqueletos cíclicos de lignanos.	11
Figura 6.	La estructura de un microtúbulo (c) formado por subunidades heterodímeras de $\alpha$ -tubulina y $\beta$ -tubulina.	13
Figura 7.	Estructura del ácido shikimico.	14
Figura 8.	Derivados del ácido cinámico y sistemas diméricos que se pueden formar con las estructuras en resonancia.	16
Figura 9.	Biosíntesis de lignanos.	18
Figura 10.	Boucher original de la recolección de material vegetal.	22
Figura 11.	Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos obtenidos de las hojas de <i>B. fagaroides</i> .	24
Figura 12.	Molécula de MTS.	33
Figura 13.	Esquema de purificación del extracto metanolico de las hojas de <i>B. fagaroides</i> .	36
Figura 14.	Cromatografía en capa fina de las fracciones IDV4-3 a IDV4-9 obtenidas de la cromatografía del extracto metanólico, utilizando las referencias R1= Acetilpodofilotoxina y R2= éter metílico de 5'- desmetoxi $\beta$ -peltatina-A en un sistema de elución 9:1 Diclorometano/Metanol.	37

Figura 15.	Moléculas referencias para la cromatografía en capa fina R1=Acetilpodofilotoxina "izquierda" y R2= Éter metílico de 5'- desmetoxi $\beta$ -peltatina-A "derecha".	37
Figura 16.	CCF de las fracciones IDV4-3 (F2) e IDV4-4 (F3) con los lignanos de referencia R1 y R2.	38
Figura 17.	CCF de fracciones recolectadas de la cromatografía de IDV4-3 e IDV4-4.	39
Figura 18.	CCF de las fracciones menos polares fracción IDV5-1.	39
Figura 19.	Expansión de la zona de $\delta$ 5.7-8.1 del espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto IDV-7-1	41
Figura 20.	Expansión de la zona de $\delta$ 1.9 a $\delta$ 4.7 del espectro de RMN <sup>1</sup> H de IDV-06.	42
Figura 21.	Análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas de la purificación de IDV5-2.	43
Figura 22.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de burseranina tomada de: (Sepúlveda, 2012).	44
Figura 23.	Expansión de la región de $\delta$ 6.2 a $\delta$ 8.0 del espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de IDV8-1.	45
Figura 24.	Expansión de la región de $\delta$ 5.6 a $\delta$ 6.2 del espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de IDV8-1.	46
Figura 25.	Compuesto de burseranina.	47
Figura 26.	RMN 400MHz de compuesto 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina-A- metil éter tomada de: (Sepúlveda, 2012).	49
Figura 27.	Expansión de la región de $\delta$ 3.7 a $\delta$ 4.0 del espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de IDV8-03.	50
Figura 28.	RMN 400 MHz de compuesto Desoxipodofilotoxina Tomada de: (Sepúlveda, 2012).	51
Figura 29.	Expansión de la región $\delta$ 3.6 a $\delta$ 4.0 del espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de IDV8-03.	52



- Figura 30. Expansión de la región  $\delta$  5.8 a  $\delta$  6.0 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  52  
(200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.
- Figura 31. Expansión de la región  $\delta$  2.7 a  $\delta$  3.1 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  53  
(200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.
- Figura 32. Expansión de la región  $\delta$  6.3 a  $\delta$  6.7 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  54  
(200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Peso final y disolvente de cada uno de los extractos utilizados para la evaluación citotóxica.	23
Tabla 2.	Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de <i>B. fagaroides</i> .	25
Tabla 3.	Grupo de fracciones obtenidas del extracto metanólico.	26
Tabla 4.	Purificación de las fracciones IDV 4-3,4.	27
Tabla 5.	Reunión de las fracciones obtenidas por la purificación de las muestras IDV 4-3,4.	27
Tabla 6.	Purificación de la fracción IDV 5-1.	28
Tabla 7.	Fracciones obtenidas de IDV 5-2.	28
Tabla 8.	Grupo de fracciones obtenidas de IDV5-2	29
Tabla 9.	Fracciones obtenidas de IDV5-3.	30
Tabla 10.	Grupo de fracciones obtenidas de IDV5-3.	30
Tabla 11.	Fracciones obtenidas de IDV5-4.	31
Tabla 12.	Grupo de fracciones obtenidas de IDV5-4.	31
Tabla 13.	Fracciones obtenidas por purificación en cromatografía en Columna.	32

## ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1.	<sup>1</sup> H RMN 200MHz (CDCl <sub>3</sub> ) de compuesto obtenido IDV-7-1 (LAB11-06)	40
Espectro 2.	<sup>1</sup> H RMN 200MHz (CDCl <sub>3</sub> ) de compuesto obtenido IDV8-1 (Lab11-04)	44
Espectro 3.	<sup>1</sup> H RMN 200MHz (CDCl <sub>3</sub> ) de compuesto obtenido IDV-8-3 (Lab11-05)	48

## Lista de Abreviaturas

$\sigma$	Desviación estándar
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\delta$	Desplazamiento químico
%inh	Porcentaje de inhibición
%viab	Porcentaje de viabilidad
<i>B. fagaroides</i>	<i>Bursera fagaroides</i>
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCF	cromatografía en capa fina
$\text{CDCl}_3$	Cloroformo deuterado
CoA	Coenzima A
DCM	Diclorometano
DFMO	Difluorometilornitina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Etc	Etcétera
Fig	Figura
g	Gramo
h	Hora
HeLa	Cáncer cervicouterino
Hep3B	Carcinoma hepatocelular
Hex	Hexano
HF6	Células de cáncer de colon
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HSV-1	Virus de herpes simple tipo 1
$\text{IC}_{50}$	índice de concentración promedio
KB	Células de cáncer nasofaríngeo
kg	Kilogramo
m	Metro
MCF-7	Células de cáncer de mama

MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MTS	3-(4,5) Dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
nm	Nanómetros
ODC	Ornitina descarboxilasa
OH	Grupo hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAL	Fenilalanina amoniaco liasa
PBS	Tampón fosfato salino
PAs	Poliaminas
PC3	Próstata
Pu	Putresina
Rf	Rate factor
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
TAL	Tirosina amoniaco liasa
UV	Ultravioleta

# 1. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades que ha crecido durante los últimos años es el cáncer. Se trata de un padecimiento multifactorial, que, si bien existen algunos con tendencia familiar (hereditarios), la mayoría están influenciados por factores externos como los alimenticios, obesidad, tabaquismo, alcoholismo, infecciones virales o bacterianas, exposición solar, y poluciones, entre otras (Samuel, 2017).

El cáncer ocupa el segundo lugar en causas de muerte en el mundo; en el 2015 ocasionó cerca de 8.8 millones de muertes. Aproximadamente una de cada seis defunciones se dio por esta enfermedad.

Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reveló que los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son: pulmonar con 1.69 millones, hepático 788 mil, colorrectal 774 mil, gástrico 754 mil y mamario 571 mil.

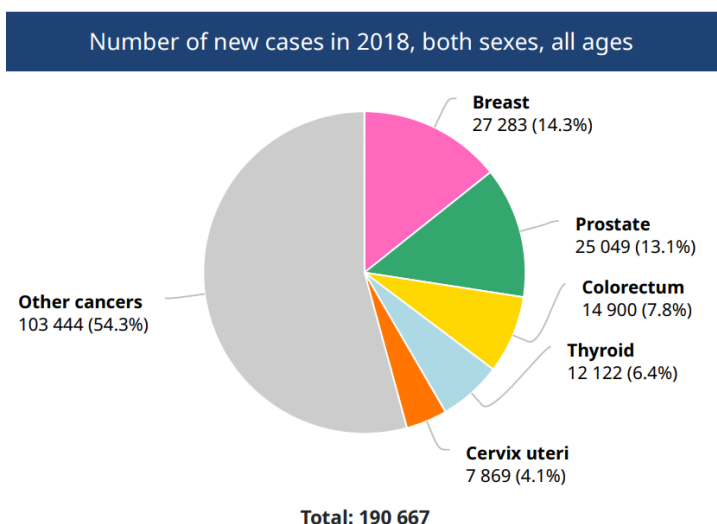


Figura 1. Total de casos de cáncer y los tipos presentes en México 2018. Tomado de: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

De acuerdo con Fernando Aldaco y colaboradores (2012), en México, la primera causa de muerte en mujeres

entre los 30 a 59 años es el cáncer, mientras que entre los 15 a 29 años es la segunda causa. En los hombres de 30 años y mayores, los tumores malignos son la tercera causa. Sin embargo, existe un gran desabasto de información en nuestro país y los únicos datos que se tienen son estimaciones.

La plataforma Globocan, que nos permite tener una idea del impacto del cáncer en diferentes países, nos reporta que en el año 2018 el número de casos de esta

enfermedad fue de 190 mil 667 totales, con un 44.9% de hombres y un 55.1% de casos en mujeres (Fig. 1). Es por esto que se requiere un mayor número de médicos, enfermeras y paramédicos, así como de infraestructura para poder establecer de inicio el diagnóstico con procedimientos muchas veces invasivos y molestos, tratamientos con cirugía, radioterapia, quimioterapia y otros manejos sistémicos hasta los cuidados paliativos (Samuel, 2017).

Derivado de lo anterior, nos lleva a buscar otros mecanismos terapéuticos. Aproximadamente el 65% de los agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de cáncer provienen de productos naturales o son sintetizados a partir de ellos, por lo que las plantas representan una fuente potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos (Antunez Mojica, 2017).

Uno de esos productos naturales son los lignanos, que son una gran familia de metabolitos secundarios biosintetizados en plantas a través de la vía del ácido shikímico, y representan una clase importante de compuestos de estudios de investigación sobre el cáncer (Teponno & Kusari, 2016) (Antúnez-Mojica, 2019).

La podofilotoxina es un compuesto de lignanos inicialmente aislado de *Podophyllum peltatum*, una planta que ha sido utilizada en la medicina tradicional. Sin embargo, en el último siglo, diferentes modificaciones en su estructura química dieron como resultado el desarrollo del fármaco semisintético epipodofilotoxina “etopósido”. Este compuesto es menos tóxico que podofilotoxina y se utiliza como fármaco contra varios tipos de cáncer, como el de pulmón, ovario y testículo, así como el linfoma (Omar Aristeo Peña-Morá, 2016).

Varias especies de *Bursera* se utilizan para combatir diversos problemas de salud, siendo que tradicionalmente se les atribuyen propiedades medicinales que incluyen aliviar el dolor, la inflamación y el reumatismo, y pueden ayudar a tratar enfermedades como resfriados, tumores de piel, pólipos y enfermedades venéreas (Acevedo, Nuñez, González-Maya, CardosoTaketa, & Villarreal, 2015). Esta planta se caracteriza por la producción de resinas que exudan del tronco y de las hojas que proporcionan una defensa química contra herbívoros especializados (Becerra, Venable, Evans, & Bowers, 2001).

Durante la última década se han investigado varios tipos de árboles del género *Bursera* con actividad antiinflamatoria y antitumoral, de las cuales se obtuvieron lignanos de tipo ariltetralina con prometedores resultados como lo son: el éster metílico de 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina-A-metil éter, sin embargo, estas moléculas solo se han estudiado en la corteza y los tallos de los árboles, por lo que presenta un problema para obtenerlos. De acuerdo con la literatura, se han logrado aislar 11 lignanos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *B. fagaroides* los cuales presentaron actividad citotóxica y antitumoral lo cual puede servir como base hacia nuevos medicamentos antitumorales (Andrés M. Rojas-Sepúlveda, 2012).

Se pretende demostrar la presencia o ausencia de lignanos citotóxicos en las hojas de *B. fagaroides* para una posible aplicación terapéutica.





*B. bicolor*, *B. bipinnata*, *B. copallifera*, *B. fagaroides*, *B. morelensis*, etc. (Hernández-Pérez, 2011).

La resina vegetal se define principalmente como “una mezcla liposoluble de terpenoides volátiles y no volátiles y/o compuestos secundarios fenólicos que: (A) generalmente se secretan en estructuras especializadas ubicadas internamente o en la superficie de la planta y (B) de importancia potencial en las interacciones ecológicas” (Langenheim, 2003).

*B. fagaroides* o “fragante *Bursera*”, popularmente conocido como aceitillo, copal, cuajote amarillo y jiote (nombre náhuatl) (Giulia Gigliarelli, 2015), es el miembro en el cual nos enfocaremos en este estudio que ha llamado la atención por sus propiedades y cualidades de actividad biológica. Se usa para aliviar la inflamación, los tumores de piel y las verrugas, y es quizás la especie de *Bursera* más estudiada en términos de su química y efectos biológicos.

Sin embargo, también se le atribuyen varios usos antiguos y tradicionales. La gente mesoamericana lo utilizaba con diferentes propósitos. En primer lugar, se consideró comida para los dioses, además se usaba como incienso durante las ceremonias, aglutinante mezclado con pigmentos para pintar, etc.

El humo del copal ha sido utilizado para curar el dolor de cabeza y para limpiar el cuerpo después de haber estado expuesto a una persona enferma (Hernandez & Ochoterena, 1943). El pueblo nahua usaba el copal molido y disuelto en agua para tratar la diarrea y como cataplasma antiinflamatoria (Orta-Amaro, 2007). En la ciudad de Oaxaca, el copal de *B. fagaroides* se utiliza para preparar infusiones para tratar problemas de estómago y como antiinflamatorio (Morales-Serna, y otros, 2013).

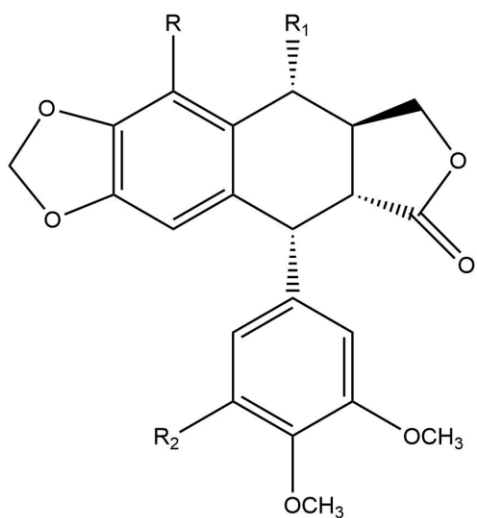
El primer caso de estudio se remonta a 1969 donde de manera biodirigida, se reporta la actividad biológica del extracto de cloroformo en carcinoma Walker 256. Posteriormente se aislaron dos compuestos del tipo ariltetralinlactona, identificados como  $\beta$ -peltatin-A-metil éter (**1**) y 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatin-A-metil éter (**2**) (Fig. 3) (Bianchi, 1969).

Posteriormente, en 1998 se realizó el estudio del extracto etanólico (70%) de la corteza de *B. fagaroides*, donde se evaluó la actividad citotóxica y antitumoral en linfoma murino L5178Y. La administración oral dio lugar a un 8% de los ratones libres de tumor después de 60 días, mientras que la administración intraperitoneal mostró un 26% de sobrevivencia a una dosis de 100 mg/kg/día durante 15 días (Puebla P. A. M., 1998).

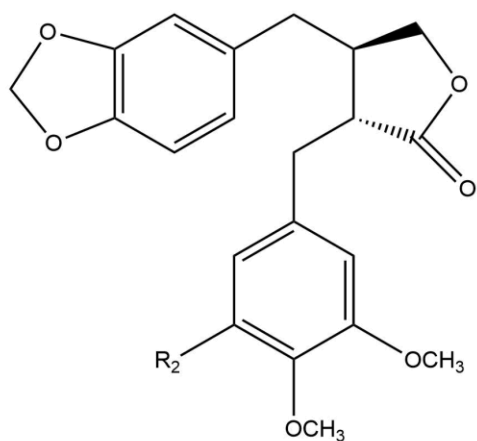
Para el 2008, se estudió el efecto del extracto acuoso de *Bursera fagaroides* y Difluorometilornitina (DFMO), aplicados de forma individual y combinados, sobre los tejidos sanos en el modelo de linfoma murino L5178Y y específicamente sobre el metabolismo de las poliaminas (PAs), Putresina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm). Mediante cromatografía de intercambio iónico se determinaron los niveles de Pu en orina como indicadores de la evolución del tumor, mientras por radioinmunoensayo se cuantificó la actividad de la ODC renal. Los resultados obtenidos sugieren que no se combine la ingestión de algún tipo de té o brebaje preparado con dicha planta cuando se administre DFMO, dado su efecto estimulador del desarrollo tumoral, contrario al efecto anticancerígeno del extracto hidroalcohólico de la misma planta. (Reynoso, 2008)

De un estudio químico-bio-dirigido realizado al extracto hidroalcohólico de la corteza de *B. fagaroides* se aislaron siete lignanos del tipo de la podofilotoxina, identificados como: éter metílico de  $\beta$ -petatina-A (1), éter metílico de 5'-desmetoxi- $\beta$ -petatina-A (2), podofilotoxina (3), desmetoxyateina (4), desoxipodofilotoxina (5), burseranina (6) y acetilpodofilotoxina (7), los cuales mostraron una potente actividad citotóxica (Fig. 3) (Antunez Mojica, 2017).

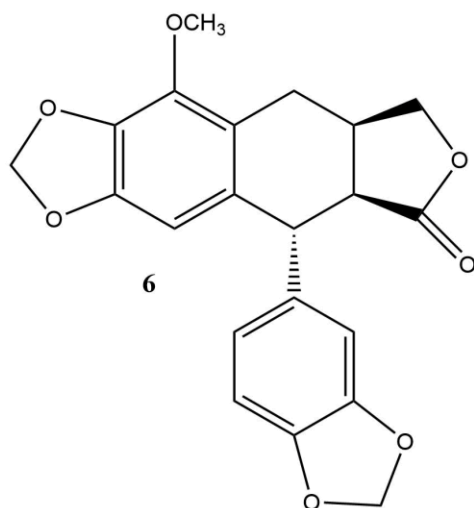
Fue en 2018 cuando otros estudios demostraron que es capaz de suprimir la replicación del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) en células HeLa en un ensayo in vitro. El lignano Yateína (8) (Fig. 3) mostró un efecto inhibitorio sobre la replicación de HSV-1 y se dieron cuenta que dependía de la concentración con un valor de IC50 de  $30.6 \pm 5.5 \mu\text{M}$  (Maria Carla Marcotullio, 2018).



- |   |                     |                      |                                   |
|---|---------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1 | R= OCH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> = H   | R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> |
| 2 | R= OCH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> = H   | R <sub>2</sub> = H                |
| 3 | R= H                | R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> |
| 5 | R= H                | R <sub>1</sub> = H   | R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> |
| 7 | R= H                | R <sub>1</sub> = OAc | R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> |



- |   |     |                    |                                  |
|---|-----|--------------------|----------------------------------|
| 4 | R=H | R <sub>1</sub> = H | R <sub>2</sub> =H                |
| 8 | R=H | R <sub>1</sub> = H | R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> |



6

Figura 3: Lignanos aislados de *B. fagaroides* de tipo ariltetralina lactona

## 2.2 Lignanos

### 2.2.1. Lignanos.

Los lignanos comprenden una clase de productos vegetales naturales que se derivan del ácido cinámico y que están relacionados bioquímicamente con el metabolismo de la fenilalanina.

En 1927 Robinson reconoció una característica común de muchos productos naturales, una unidad de  $C_6C_3$  (un esqueleto de propilbenceno).

Haworth, propuso que la clase de compuestos derivados de una resina con estructura  $C_6C_3$ , debería llamarse lignanos. La nomenclatura de la diversidad de gamas de estructuras clasificadas como lignanos dependían en gran medida de nombres triviales y, si era necesario, de la numeración adecuada derivada del nombre sistemático (Moss, 2000).

Sin embargo, para que éstos se originen se necesitan moléculas base precursoras de lignanos. En primer lugar, tenemos la eliminación de amoniaco de la cadena lateral para generar el ácido *trans*-E-cinámico, siendo que en el caso de la fenilalanina sería el ácido cinámico, mientras que para la tirosina produciría ácido-4-cumárico a partir de una enzima Fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y Tirosina amoniaco liasa (TAL), respectivamente.

Las especies que no transforman la tirosina en ácido-4-cumárico sintetizan este compuesto por hidroxilación directa del ácido cinámico, en una reacción dependiente del citocromo P-450. Otros ácidos cinámicos se obtienen mediante reacciones adicionales de hidroxilación y metilación, creando secuencialmente patrones de sustitución típicos de los metabolitos de la vía del shikimato (posición *orto*).

La metilación es catalizada por una enzima metiltransferasa de amplia especificidad.

Posteriormente, la reducción de ácidos cinámicos a través de ésteres de coenzima A y aldehídos conducirán a los correspondientes alcoholes, precursores de lignanos. Las unidades más comunes son los alcoholes coniferílico, sinapílico y cumarílico. (Fig. 4) (Nicola, 2014) (Dewick, 2009).

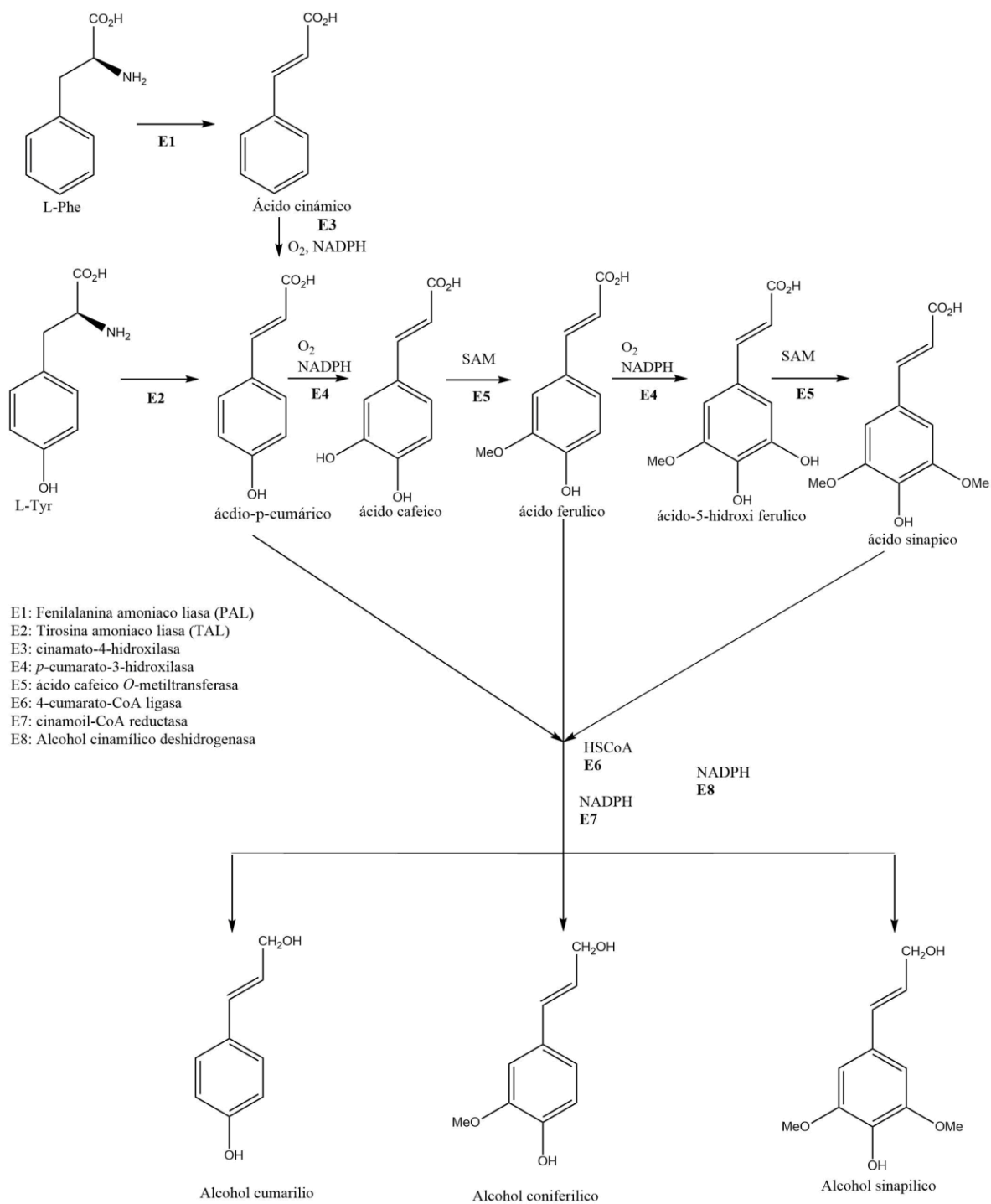


Figura 4: Biosíntesis de Fenilpropanoides precursores de lignanos

### **2.2.2. Clasificación de lignanos.**

De acuerdo con su clasificación se pueden dividir en dos grupos: lignanos simples y ciclolignanos.

Lignanos simples: se caracterizan por tener únicamente la unión C8-C8' de la cadena lateral. Además, se clasifican en ocho subgrupos que se basan en la incorporación del átomo de oxígeno al esqueleto ciclado: furofurano, furano, dibencilbutano, dibencilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzociclooctadieno y dibencilbutirolactol (Fig. 5) (T, 2003).



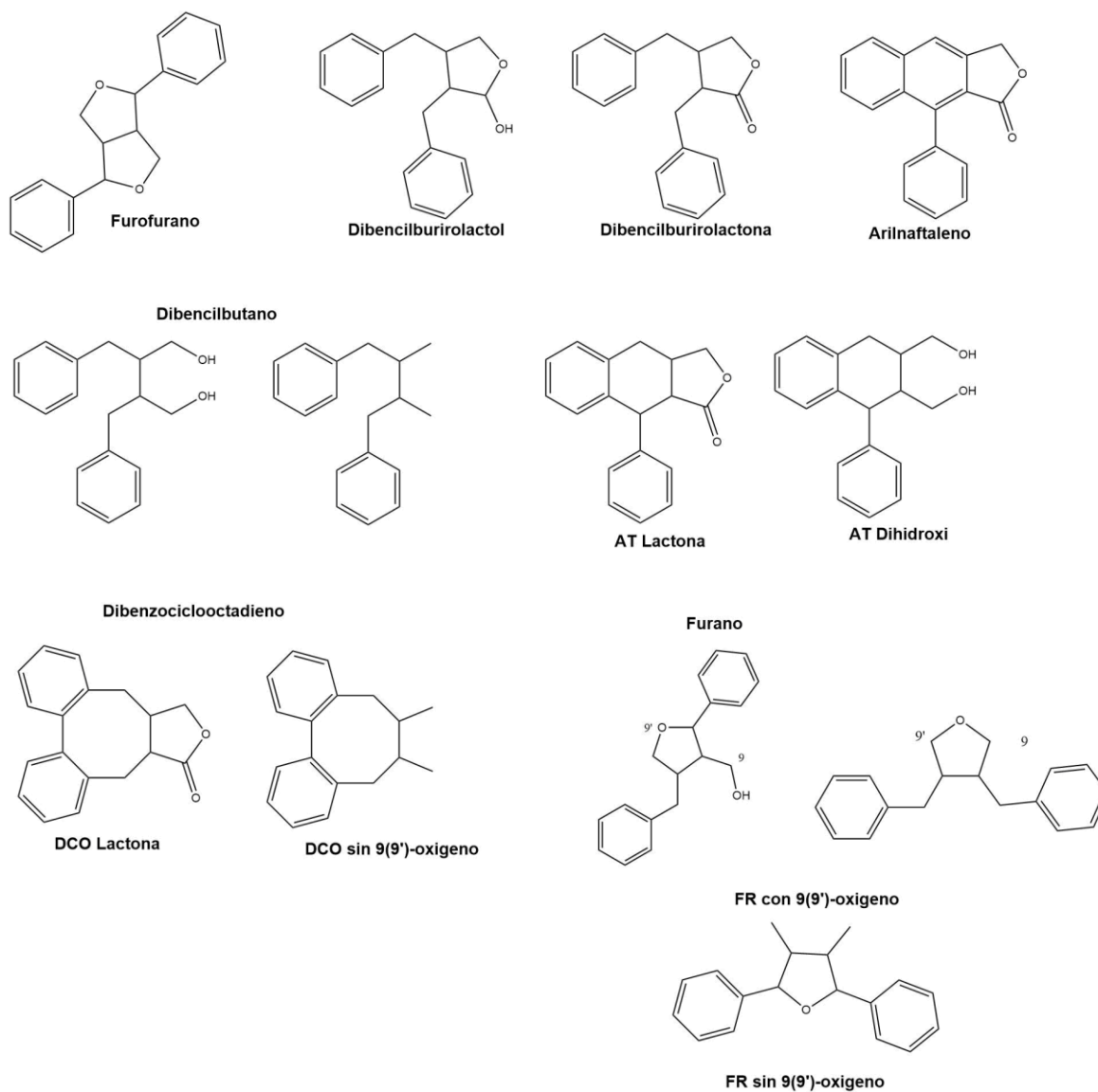


Figura 5: Esqueletos cíclicos de lignanos

### 2.2.3. Mecanismo de acción de los lignanos.

Al igual que los flavonoides, los lignanos tienen una débil actividad estrogénica y compiten con los compuestos estrogénicos normales, impidiendo el crecimiento tumoral (Chasquibol, 2003). Esto indica que los países en donde se consumen vegetales con una gran cantidad de lignanos tienen un índice más bajo de incidencias de cáncer, además, se ha demostrado que tienen otras actividades farmacológicas, como: citotóxicos, antimetabólicas, antivirales, daño sobre ácidos

nucleicos, inhibidores enzimáticos, efectos catárticos, actividad sobre el sistema nervioso central (a través de la inhibición de la cAMP fosfodiesterasa), efectos de protección contra hepatoxinas (con la inhibición de oxidasas de función mixta), y más recientemente actividad anticonceptiva (Ayres D.C. and Loike, 1990) (Rojas, 2012).

En 1946, estudios confirmaron a la podofilina como un potente agente antimitótico comparable con colchicina, lo que sugiere que sus mecanismos de acción son similares e involucran la dinámica de organización del huso mitótico (Rey, 1946).

Otras acciones de los lignanos están relacionadas con las enfermedades cardiovasculares y efectos antioxidantes (Duncan, Phipps, & Kurzer, 2003).

La podofilotoxina se une a la tubulina, la subunidad monomérica fundamental de los microtúbulos, tan fuertemente como la colchicina (Wilson, 1967). Los microtúbulos son tubos huecos con 13 subunidades de tubulinas por vuelta del microtúbulo enlazados por interacciones no covalentes, que es crucial para la organización y movimiento de los organelos (transporte intracelular). (Fig. 6)

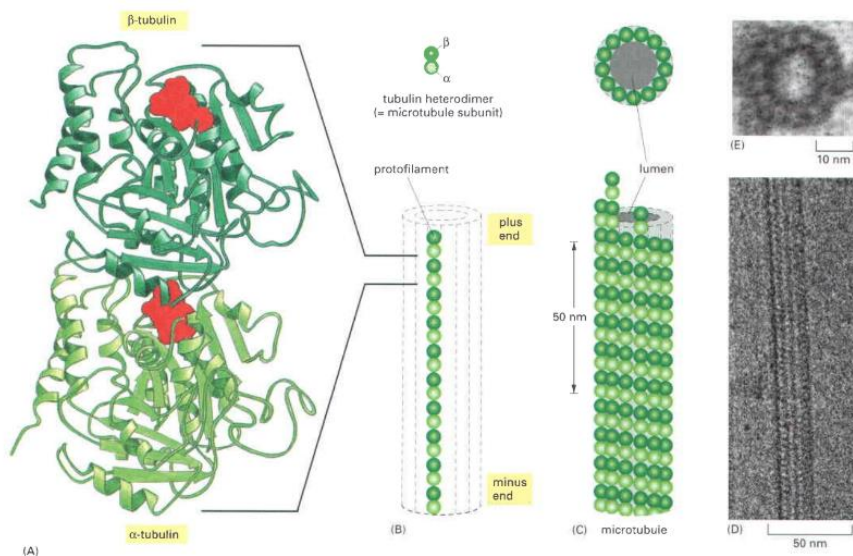


Figura 6: La estructura de un microtúbulo c formado por subunidades heterodímeras de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Tomada de: (Bruce Alberts, 2008)

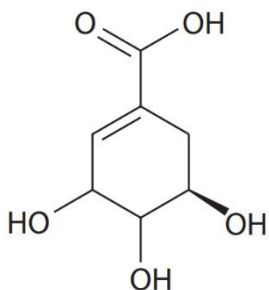


Figura 7: Estructura del ácido Shikímico

El ácido shikímico (Fig. 7) es el precursor de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), además, conduce a una gran diversidad de compuestos fenólicos, como los flavonoides, taninos, ligninas y lignanos. Esta ruta metabólica es utilizada por plantas, bacterias, algas y entre otros para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

Los policétidos generalmente se biosintetizan a través de la condensación descarboxilativa de unidades derivadas y extendidas de malonil-CoA, creada por un proceso conocido como condensación de Claisen. La reacción de condensación permite la formación de enlaces carbono-carbono. La reacción ocurre entre dos ésteres (o en algunos casos entre un carbonilo y un éster). Cuando la reacción tiene lugar en condiciones básicas, se forma un  $\beta$ -cetoéster (o una  $\beta$ -dicetona) (Nicola, 2014).

#### 2.2.4. Biosíntesis.

Los compuestos fenólicos producidos en la naturaleza pueden derivar de diferentes rutas metabólicas, una de las más importantes que producen compuestos fenólicos es la ruta del ácido shikímico.

En la (Fig. 9) podemos observar las reacciones químicas que ocurren en la ruta del shikimato para la biosíntesis de lignanos.

Esta familia de productos naturales, como ya se ha mencionado con los lignanos, poseen diversas e importantes actividades biológicas y propiedades farmacológicas.

En el inicio hablamos de las unidades más comunes que son tres tipos de alcoholes Fenilpropanoides. La oxidación de estos alcoholes permite la deslocalización del electrón desapareado, dando formas de resonancia en las que el electrón libre reside en las posiciones *orto* y *para* para la función del oxígeno.

El emparejamiento de radicales de estructuras en resonancia puede proporcionar una gama de sistemas diméricos, que son susceptibles al ataque nucleofílico de

grupos hidroxilo (OH) en el mismo sistema, o por moléculas de agua externas. Por lo tanto, los monómeros de alcohol coniferílico pueden acoplarse, generando enlaces como: guaiacilglicerol éter  $\beta$ -coniferil (enlace  $\beta$ -ariléter), alcohol deshidrodiconiferílico (enlace fenilcumarán) y pinoresinol (enlace resinol). Estos dímeros pueden reaccionar por mecanismos similares para producir un polímero de lignina que contiene una serie heterogénea de enlaces intermoleculares, como se ve en los diversos dímeros. Los materiales diméricos también se encuentran en la naturaleza y se denominan lignanos.

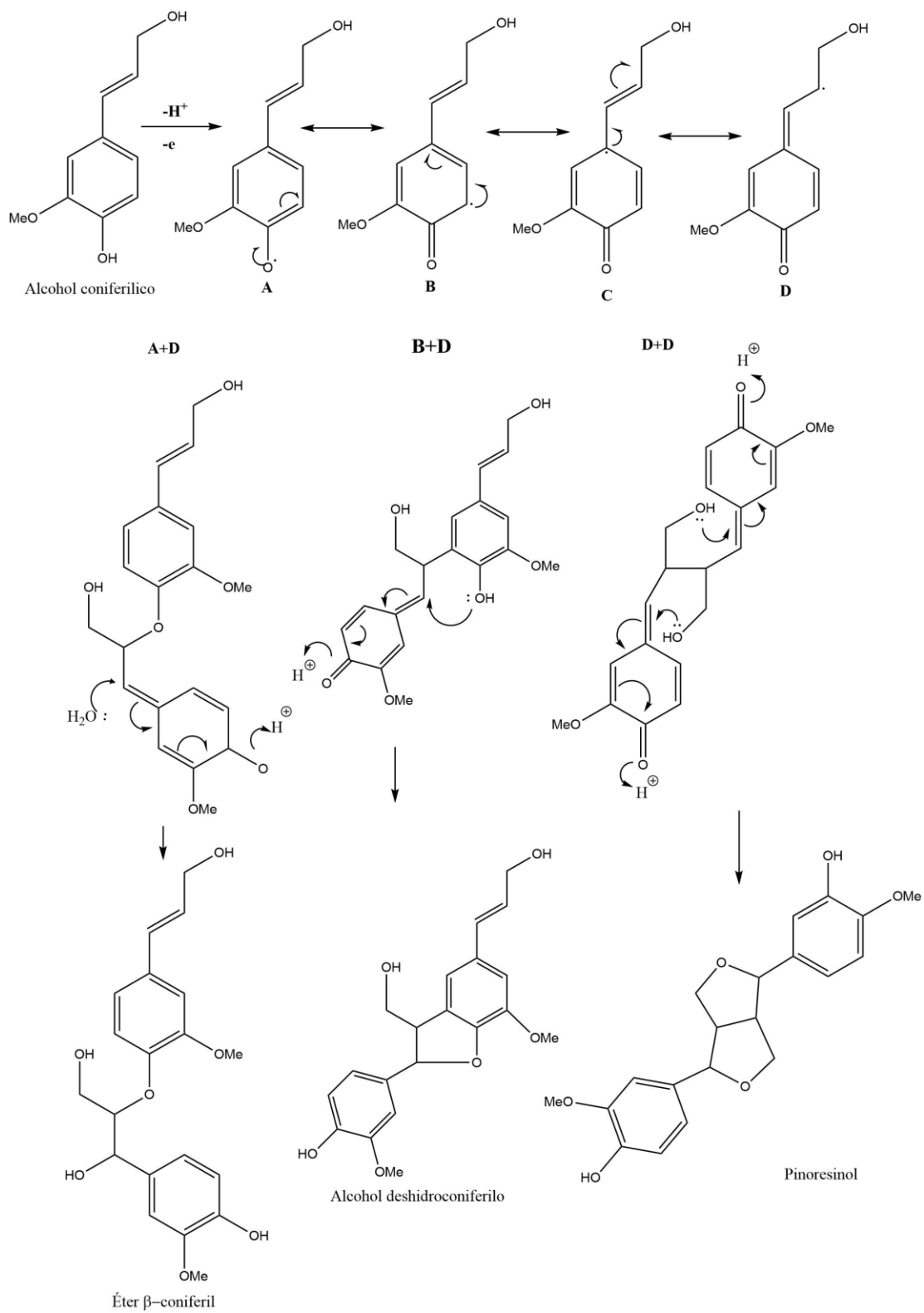


Figura 8: Derivados del ácido cinámico y sistemas diméricos que se pueden formar con las estructuras en resonancia.

Cuando ocurre una mayor ciclación y otras modificaciones se pueden crear una amplia gama de lignanos de tipos estructurales muy diferentes. Uno de los lignanos naturales más importantes que tiene una actividad biológica útil es la podofilotoxina, una ariltetralina lactona, que se deriva del alcohol coniferílico a través de las dibencilbutirolactonas matairesinol y yateína.

Se sabe que el matairesinol surge por apertura reductora de los anillos de furano del pinoresinol, seguida de oxidaciones sucesivas para producir primero un lactol y luego una lactona. El patrón de sustitución en los dos anillos aromáticos se construye más durante la ruta, es decir, matairesinol → yateína, y no surge por el acoplamiento inicial de dos residuos de alcohol cinámico diferentes. El anillo trisustituido se elabora antes que el sistema de anillo metilendioxi. Este último grupo se encuentra en muchos productos naturales derivados del shikimato y está formado por una reacción oxidativa en un patrón *orto*-hidroximetoxi.

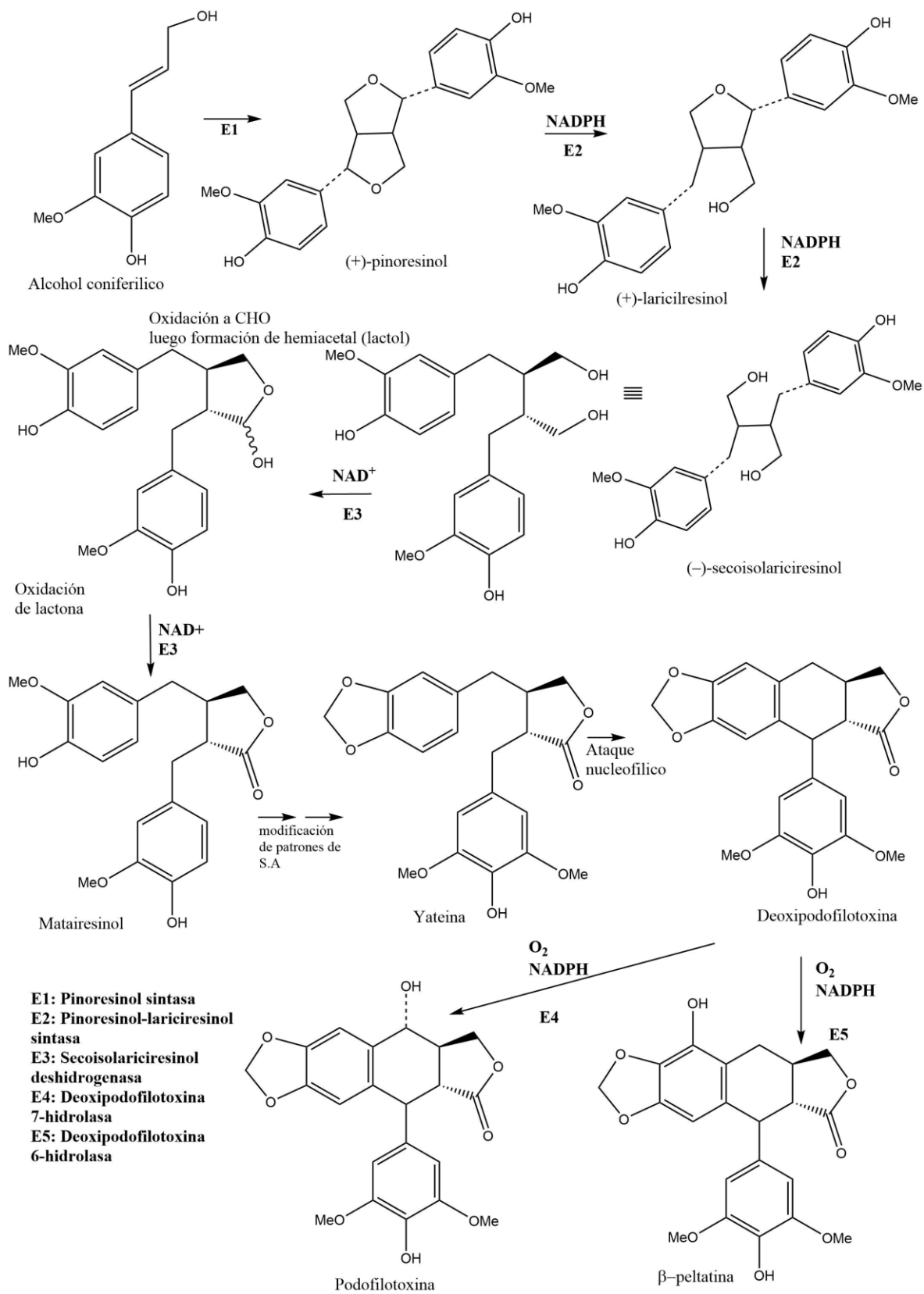


Figura 9: biosíntesis de lignanos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México, existe gran variedad de plantas que desde antes de la conquista se utilizaban como alimentos, insecticidas o para algún uso medicinal. Éstas pueden llegar a tener propiedades curativas y su preparación es de una manera muy sencilla, en forma de infusión o ungüentos para aliviar diversos malestares como dolor, fiebre, vómitos, náuseas, inflamaciones, etc.

La mayoría de las especias de *Bursera* a las que se le han reportado la presencia de lignanos son utilizadas por la población mexicana. A ellas, se les atribuyen propiedades medicinales para aliviar la inflamación, resfriados, tumores, enfermedades venéreas, dolor, entre algunas otras. *Bursera fagaroides* es un árbol endémico de México que crece en temporadas de lluvia desde el Norte en los estados de Sonora y Durango, hasta el Centro y Sur del país pasando por el Estado de Morelos; con una gran influencia sobre la población ya que se ocupa como anticancerígeno y para ceremonias religiosas.

Dentro de la literatura podemos encontrar que una maceración alcohólica de la corteza de este árbol permite obtener distintos metabolitos secundarios de tipo lignanos, provenientes de la ruta del ácido shikímico, a los cuales se atribuyen a una gran actividad antitumoral por estudios farmacológicos realizados, sin embargo, uno de los problemas que se presenta es el rendimiento muy bajo y la alta toxicidad de estos como lo vemos con la podofilotoxina.

Los estudios realizados a esta planta han dado lugar al aislamiento y caracterización de 10 lignanos de tipo podofilotoxina (ariltetralin lignanos) (Antúnez-Mojica, 2019), los cuales han sido sometidos a diferentes estudios farmacológicos con la finalidad de determinar sus efectos citotóxicos y antitumorales (Chasquibol, 2003). De entre estos lignanos destaca el metil éter de la 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina A (**2**), el cual presentó un efecto citotóxico significativo contra diferentes líneas celulares (Rojas, 2012) (Antunez Mojica, 2017) y demostró tener menor toxicidad contra embriones de pez cebra usados como modelo *in vivo* en la evaluación.



Debido a que estos compuestos fueron encontrados en la corteza de *B. fagaroides*, el aislamiento de una mayor cantidad de (2) para complementar su evaluación biológica resulta en daño severo a la planta, por lo que es prioritario buscarlo en otras partes de la planta, como las hojas.

Además, cabe destacar que los ensayos de la actividad citotóxica mostrados en diferentes líneas celulares como lo son KB (nasofaríngeo), HF-6 (colon), MCF-7 (mama) y PC-3 (próstata) solo se han realizado con extractos hidroalcohólicos de la corteza del árbol de *B. fagaroides*, dando buenos resultados de entre las 48 a 72 horas (Andrés M. Rojas-Sepúlveda, 2012).

Por lo tanto, en este trabajo se llevará a cabo el estudio fitoquímico de las hojas de *B. fagaroides* para determinar la presencia de estos lignanos. Además, se realizará la evaluación citotóxica en diferentes líneas celulares para demostrar su porcentaje de inhibición para algunos posibles extractos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Establecer mediante un estudio fitoquímico la presencia o ausencia de lignanos citotóxicos en las hojas de *B. fagaroides*.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1) Fraccionar mediante métodos cromatográficos el extracto metanólico de las hojas.
- 2) Purificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas.
- 3) Obtener los datos espectroscópicos de los compuestos aislados puros.
- 4) Analizar e interpretar los datos espectroscópicos y proponer estructuras de cada metabolito.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención del material vegetal

Ejemplares de *Bursera fagaroides (kunth) Engl.* fueron colectados en la reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, el 21 de septiembre del año 2017, por el Mtro. Fidel Ocampo Bautista e identificado por el Mtro. Gabriel Flores Franco. El material fue depositado en el herbario HUMO del CIByC de la UAEM, con el folio **35891**.

De acuerdo con el Voucher:

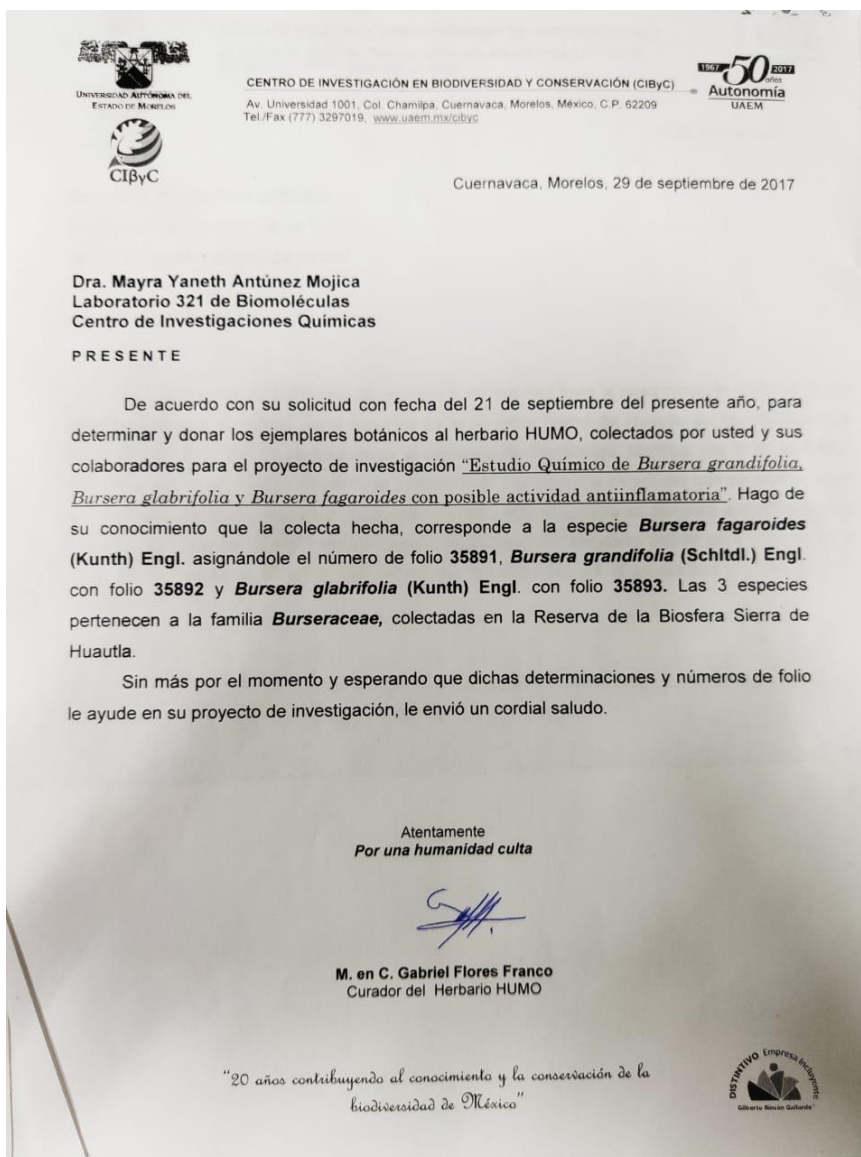


Figura 10: Boucher original de la recolección de material vegetal

## **5.2 Preparación del material vegetal, maceración y extracción.**

Las hojas de *B. fagaroides* (590 gramos) se dejaron secar a temperatura ambiente; posteriormente se molieron y se extrajeron a temperatura ambiente mediante maceración, usando diferentes disolventes orgánicos de polaridad ascendente (*n*-hexano, diclorometano, metanol), durante 72 horas.

Los extractos obtenidos fueron evaporados a presión reducida con ayuda de rotaevaporador, obteniendo las siguientes cantidades:

**TABLA 1: PESO FINAL Y DISOLVENTE DE CADA UNO DE LOS EXTRACTOS UTILIZADOS PARA LA EVALUACIÓN CITOTÓXICA.**

<b>Disolvente</b>	<b>Peso final del extracto (g)</b>
<i>n</i> -Hexano	13.35
Diclorometano	13.59
Metanol	42.79

Cabe recalcar que cada extracción se hizo por triplicado por 72 horas una vez que se decantaba el disolvente, se volvía a macerar.

## **5.3 Evaluación citotóxica de los extractos (metanol, hexano, diclorometano)**

Las muestras fueron evaluadas para su efecto citotóxico frente a células humanas de cáncer hepático (Hep3B), próstata (PC-3) y cervicouterino (HeLa), mediante el método de viabilidad celular por MTS, y utilizando al Taxotere® como fármaco de referencia (Figura 11). Este estudio fue realizado por la Dra. Leticia González Maya, investigadora de la Facultad de Farmacia, UAEM.

Para la evaluación citotóxica, se realizó un ensayo de viabilidad celular por reducción de MTS. En un vial eppendorf se agregó 100 mg de cada uno de los extractos de las hojas de *B. fagaroides* y se solubilizaron con 1 mL de

dimetilsulfóxido (DMSO); primeramente, se decantó el medio de las células a ocupar, se lavaron con PBS y se enjuagaron con Tripsina más EDTA, una vez enjuagadas se les añadió Tripsina y EDTA y se incubaron de 5 a 15 minutos como máximo, se retiró la Tripsina y las células se resuspendieron en medio de cultivo para proseguir al conteo de éstas. Se verificó la viabilidad con azul de Tripiano.

En una placa de pozos, se adicionó PBS sobre la periferia y se colocaron las células en los pozos de en medio, 3 mil células/pozo y se procedió a incubar por 24 horas a 37°C. Una vez pasado este tiempo se procedió a poner el tratamiento a una concentración de 1 mg/mL y se volvió a incubar con condiciones controladas (37°C con una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas para las células PC-3 y Hep3B y un tiempo de incubación de 72 horas para las células HeLa.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a observar las células al microscopio, se decantó el medio y se adiciono el indicador de viabilidad. Para este caso se ocupó MTS, del cual se añadieron 20µl a cada pozo por dos horas.

Pasado ese tiempo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de Elisa a 490 nm.

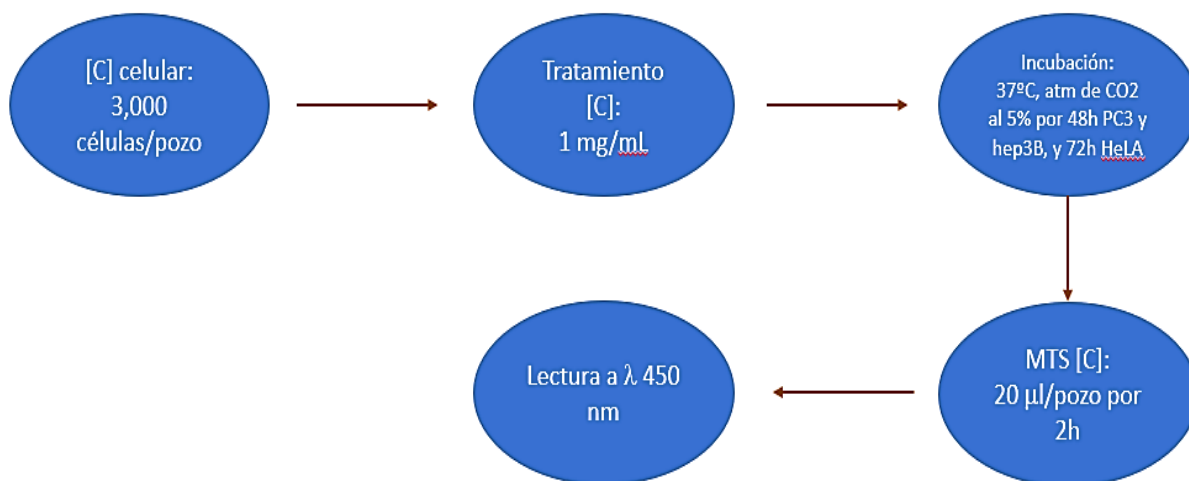


Figura 11: Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos obtenidos de las hojas de *B. fagaroides*.

#### 5.4 Purificación del extracto Metanólico.

Para esta primera etapa se utilizaron 41.79 g de extracto metanólico de *B. fagaroides*, los cuales fueron sometidos a cromatografía en columna para separar los compuestos presentes. Se utilizaron 60.00g de Sílice para absorción y 820.40 g de Sílice para la columna, se recolectaron fracciones de 500 mL. Las proporciones de eluyente se describen en la siguiente tabla.

**TABLA 2: FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *B. FAGAROIDES*.**

FRACCIONES	PROPORCIÓN	ELUYENTE
1-6	90:10	<i>n</i> -Hexano/Acetona
7-14	80:20	<i>n</i> -Hexano/Acetona
15-22	70:30	<i>n</i> -Hexano/Acetona
23-30	60:40	<i>n</i> -Hexano/Acetona
31-38	50:50	<i>n</i> -Hexano/Acetona
39-46	40:60	<i>n</i> -Hexano/Acetona
47-48	30:70	<i>n</i> -Hexano/Acetona
49-52	80:20	DCM/MeOH
53-56	70:30	DCM/MeOH
57-60	60:40	DCM/MeOH
61-64	50:50	DCM/MeOH
65	0:100	DCM/MeOH

Posterior a las fracciones se realizó cromatografía en capa fina para ver la separación de compuestos y poderlas reunir de acuerdo con el R<sub>f</sub> que presentaba en cada placa, que fueron reveladas con sulfato sérico y se reunieron de la siguiente forma:

**TABLA 3: GRUPO DE FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO METANÓLICO.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA</b>	<b>VIAL</b>
1-6	CCF 8:2 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-1
7-11	CCF 8:2 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-2
12-15	CCF 7:3 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-3
16-22	CCF 7:3 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-4
23-26	CCF 6:4 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-5
27-29	CCF 6:4 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-6
30-38	CCF 5:5 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-7
39-43	CCF 4:6 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-8
44-48	CCF 3:7 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-9
49-52	CCF 2:8 <i>n</i> -Hex/Acetona	IDV4-10

Las fracciones 27 a 29 resultaron tener una coloración fluorescente azul en UV-366 que se colectaron en el vial IDV4-6.

Se volvió a realizar una cromatografía en capa fina de los 10 viales y se reunieron los viales IDV4-8 e IDV-9.

Se colocaron las dos primeras referencias menos polares R1 y R2 en las fracciones recolectadas desde IDV4-3 a IDV4-9 en un sistema 9:1 DCM/MeOH.

Para las fracciones IDV4-3 e IDV4-4 se volvió a sacar una CCF con un sistema 97:3 DCM/MeOH. Se reunieron las fracciones para purificar por medio de cromatografía en columna en fase normal, el peso del extracto fue de 0.832g el cual fue nombrado como IDV4-3,4.

**TABLA 4: PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES IDV4-3,4.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>PROPORCIÓN</b>	<b>ELUYENTE</b>
1-20	100:0	DCM/MeOH
21-29	99:01	DCM/MeOH
30-38	95:05	DCM/MeOH
39	90:10	DCM/MeOH

Las fracciones se recolectaron de la siguiente manera:

**TABLA 5: REUNIÓN DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR LA PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS IDV4-3,4.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA</b>	<b>VIAL</b>
3-10	100:00 DCM/MeOH	IDV5-1
11-26	98:02 DCM/MeOH	IDV5-2
27-31	97:03 DCM/MeOH	IDV5-3
32-35	96:04 DCM/MeOH	IDV5-4

Estas fracciones se volvieron a ver con las referencias R1 y R2 en CCF con un sistema 97:03 DCM/MeOH.

Posteriormente se procedió a la purificación mediante cromatografía en columna de cada una de las fracciones obtenidas anteriormente.

#### **5.4.1 Purificación de fracción IDV5-1**

La fracción IDV5-1, obtenida con 100:00 DCM/MeOH del fraccionamiento inicial del extracto metanólico con un peso inicial de 24.4mg, fue purificada mediante cromatografía en columna, utilizando 5.00 g de sílice gel y un gradiente de Diclorometano/Acetona como sistema de elución. En la tabla 6 se resume este proceso cromatográfico.



**TABLA 6: PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IDV5-1.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>PROPORCIÓN</b>	<b>ELUYENTE</b>
1-10	98:2	DCM/Acetona
11-20	97:3	DCM/Acetona
21-30	96:4	DCM/Acetona
31-40	95:5	DCM/Acetona

El compuesto de interés se obtuvo en las fracciones 1 a 18. Las fracciones posteriores se desecharon por no contener compuestos.

Se reunieron las fracciones 1 a 18 y se recolectaron como la fracción **IDV7-1**, en la cual resultó un compuesto verde que pesó 15.9 mg. Se registró en RMN a la fracción (**LAB11-06**), preparando la muestra a una concentración de 3.5mg/mL en CDCl<sub>3</sub>.

#### **5.4.2 Purificación de fracción IDV5-2**

La fracción IDV5-2, obtenida con 98:02 DCM/MeOH del fraccionamiento inicial del extracto metanólico con un peso de 27.3 mg, fue purificada mediante cromatografía en columna, utilizando 5.00 g de sílice gel y un gradiente de Diclorometano/Acetona como sistema de elución. En la tabla 7 se resume este proceso cromatográfico.

**TABLA 7: FRACCIONES OBTENIDAS DE IDV5-2.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>PROPORCIÓN</b>	<b>ELUYENTE</b>
1-10	99:01	DCM/Acetona
11-20	98:02	DCM/Acetona
21-30	97:03	DCM/Acetona
31-40	96:04	DCM/Acetona
41-50	98:02	DCM/MeOH
51-60	96:04	DCM/MeOH
61-70	100	MeOH

Las fracciones fueron agrupadas de la siguiente manera de acuerdo con su similitud en CCF:

**TABLA 8: GRUPO DE FRACCIONES OBTENIDAS DE IDV5-2.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA</b>	<b>VIAL</b>
9-14	100 DCM	IDV8-01
15	100 DCM	IDV8-02
16-20	98:02 DCM/Acetona	IDV8-03

Las fracciones IDV8-01 (1.7 mg) e IDV8-03 (3.3 mg) fueron analizadas por RMN<sup>1</sup>H. (Las fracciones fueron etiquetadas como: **IDV8-01 → LA11-04 e ID8-03 → la11-05** para el análisis de RMN).

#### **5.4.3 Purificación de fracción IDV5-3**

La fracción IDV5-3, que se obtuvo con el sistema 97:03 DCM/MeOH del fraccionamiento inicial del extracto metanólico con un peso inicial de 36 mg, fue purificada mediante cromatografía en columna, utilizando 6.00 g de sílice gel y un gradiente de Diclorometano/Acetona como sistema de elución. En la tabla 9 se resume este proceso cromatográfico.

Cromatografía en columna con sistema 97:03 DCM/Acetona en gradiente.

**TABLA 9: FRACCIONES OBTENIDAS DE IDV5-3.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>PROPORCIÓN</b>	<b>ELUYENTE</b>
1-10	97:03	DCM/Acetona
11-20	96:04	DCM/Acetona
21-25	95:05	DCM/Acetona
26-30	94:06	DCM/Acetona
31-35	93:07	DCM/Acetona
36-40	100	DCM
41-45	98:02	DCM/MeOH
46-50	96:04	DCM/MeOH
51-55	94:06	DCM/MeOH
56-60	92:08	DCM/MeOH
61-70	100	MeOH

Después de fraccionar el vial IDV5-3 se procedió a hacer la recolección de las fracciones y se pesó cada una de las fracciones.

**TABLA 10: GRUPO DE FRACCIONES OBTENIDAS DE IDV5-3.**

<b>FRACCIONES</b>	<b>CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA</b>	<b>VIAL</b>	<b>PESO</b>
13-19	98:02 DCM/Acetona	IDV9-1	1 mg
20-22	98:02 DCM/Acetona	IDV9-2	4.5 mg
23-26	98:02 DCM/Acetona	IDV9-3	6.2 mg
27-37	97:03 DCM/Acetona	IDV9-4	8.9 mg
38-44	96:04 DCM/Acetona	IDV9-5	0.1 mg
45-51	96:04 DCM/Acetona	IDV9-6	6.7 mg
52-70	8:2 DCM/MeOH	IDV9-7	2.6 mg

La fracción IDV9-3 quedo pendiente de mandar a RMN.

#### 5.4.4 Purificación de fracción IDV5-4

La fracción IDV5-4, obtenida con el sistema 96:04 DCM/MeOH del fraccionamiento inicial del extracto metanólico con un peso inicial de 260 mg, fue purificada mediante cromatografía en columna, se utilizaron 14 g de sílice gel y un gradiente de Diclorometano/Metanol para la elucidación de los compuestos. En la tabla 11 se resume este proceso cromatográfico.

**TABLA 11: FRACCIONES OBTENIDAS DE IDV5-4.**

FRACCIONES	PROPORCIÓN	ELUYENTE
1-6	100:0	DCM/MeOH
7-12	99:01	DCM/MeOH
13-18	98:02	DCM/MeOH
19-24	97:03	DCM/MeOH
25-30	96:04	DCM/MeOH
31-36	95:05	DCM/MeOH
37-40	00:100	DCM/MeOH

Las fracciones obtenidas de IDV5-4 se reunieron obteniendo tres grupos de fracciones (tabla 12).

**TABLA 12: GRUPO DE FRACCIONES OBTENIDAS DE IDV5-4.**

FRACCIONES	CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	VIAL
13-17	95:05 DCM/MeOH	IDV10-1
18-22	95:05 DCM/MeOH	IDV10-2
23-25	94:06 DCM/MeOH	IDV10-3

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez terminado el proceso de purificación por cromatografía en columna con sistemas de gradientes empezando con disolventes menos polares a más polares, las fracciones obtenidas tenían un color verde fuerte, con olores muy característicos del copal, además, de ser compuestos cerosos que se pegaban en el fondo del vial.

Las fracciones obtenidas que se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear y sus pesos, fueron las siguientes:

**TABLA 13: FRACCIONES OBTENIDAS POR PURIFICACIÓN EN CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.**

FRACCIÓN	RMN	PESO OBTENIDO
IDV7-01	LAB11-06	15.9 mg
IDV8-01	LAB11-04	1.7 mg
IDV8-03	LAB11-05	3.5 mg

### 6.1. Actividad citotóxica y antiproliferativa

Los extractos de *n*-hexano, diclorometano y metanol obtenidos de las hojas de *B. fagaroides* se evaluaron preliminarmente a la concentración de 1 mg/mL para determinar su efecto citotóxico frente a células de cáncer hepático (Hep3B), próstata (PC3) y cérvico uterino (HeLa), mediante el método de viabilidad por MTS “3-(4,5)Dimetiltiliazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio” (Figura 12).

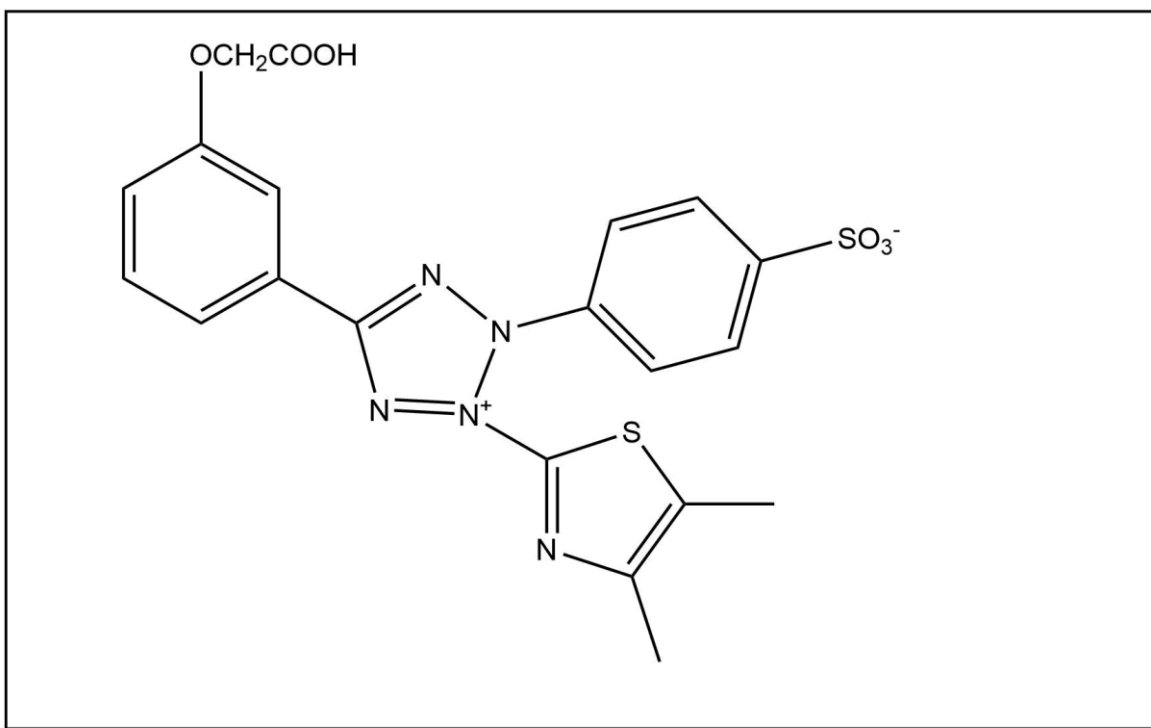


Figura 12: molécula de MTS.

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos.

TABLA 14: % DE INHIBICIÓN DE EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE *B. FAGAROIDES*

v	Hep3B		PC3		HeLa	
	%viab	% inh	%viab	% inh	%viab	% inh
MeOH	74.21 ± 2.66	25.79 ±	53.64 ±	46.36 ±	43.25 ±	56.75 ±
		2.66	4.92	4.92	7.68	7.68
Hexano	74.96 ± 6.36	25.04 ±	89.13 ±	10.87 ±	41.66 ±	58.34 ±
		6.36	2.96	2.96	4.08	4.08
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84.85 ± 2.60	15.15 ±	88.32 ±	11.32 ±	50.93 ±	49.07 ±
		2.60	3.24	3.24	2.29	2.29

\*Como control positivo (+) se utilizó Taxotere®

**[IC<sub>50</sub>] TAXOL**

<b>PC3</b>	12 nM
<b>HEP3B</b>	38.6 nM
<b>HELA</b>	5.6 nM

Como se puede observar, en el ensayo de viabilidad celular de los diferentes extractos que se hicieron con las hojas de *B. fagaroides*, se obtuvieron buenas respuestas inhibitorias frente a las tres líneas celulares en las que se hizo el estudio, siendo el extracto metanólico el que tuvo un mayor porcentaje de inhibición para todas las líneas celulares, pero con mayor porcentaje a las células HeLa (cervicouterino) con un 56.75% de inhibición.

Es de notarse que en la línea celular PC3 es donde más diferencia se puede observar con los tres extractos; como vemos, en el extracto metanólico el porcentaje de inhibición es de 46.36%, mientras que para el hexanico y el diclorometano el porcentaje de inhibición es de 10.87% y 11.32% respectivamente.

Las células Hep3B (hígado) fueron las menos sensibles a los extractos, aunque el mayor porcentaje fue de 25.79% con el extracto metanólico. No se descarta que se pudiera encontrar alguna sustancia efectiva contra estas células, ya que el extracto consiste en una mezcla compleja de compuestos que pudieran estar enmascarando el efecto de algunos de ellos.

Cabe destacar que hasta el momento no se han reportado datos de la actividad citotóxica de extracto de las hojas, ya que todos los estudios que se han realizado han sido de la corteza y tallos de *B. fagaroides*. Para poder comparar la actividad citotóxica de las hojas con la reportada para el extracto metanólico de la corteza, se requiere obtener la IC<sub>50</sub> del extracto obtenido de las hojas.

Como sabemos, el cáncer de mama se ha convertido en uno de los problemas más importantes, ya que el 25% de las pacientes lo padecen y en 2016 Peña-Moran y colaboradores hicieron un estudio del análisis de citotoxicidad de podofilotoxina

natural de *Bursera fagaroides*, en donde hallaron que con diferentes concentraciones de Podofilotoxina detenían la proliferación celular de diferentes líneas de cáncer de mama.

Se ha reportado que diferentes compuestos de tipo lignano presentaron actividad citotóxica dependiente de la dosis con un intervalo IC50 = 0.011-7.22  $\mu$ M (Omar Aristeo Peña-Morá, 2016), por lo que podemos decir con certeza que nuestros resultados son satisfactorios con los realizados en la corteza en 2016.

## **6.2. Purificación del extracto Metanólico de las hojas de *Bursera fagaroides*.**

El fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de las hojas de *B. fagaroides* se resume en el esquema de fraccionamiento de la Figura 13. El fraccionamiento cromatográfico primario del extracto (41.7 g), utilizando gradientes de polaridad creciente de *n*-hexano y DCM-MeOH, proporcionó 65 fracciones de 500 mL cada una. Estas fracciones se agruparon en 9 grupos, identificados como IDV4-1-9 (Tabla 02, ver parte experimental), de acuerdo con su similitud en cromatografía en capa fina (CCF).



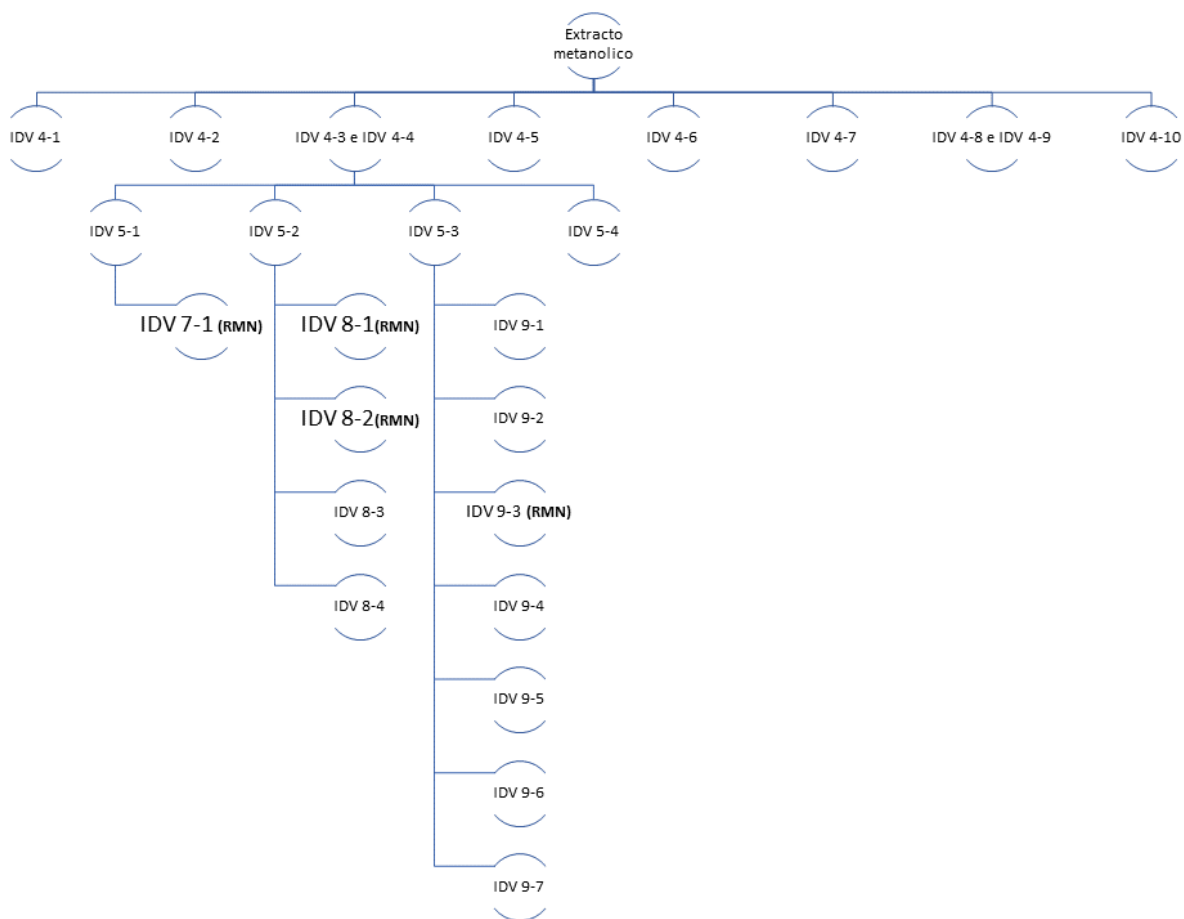


Figura 13: Esquema de purificación del extracto metanolico de las hojas de *B. fagaroides*

Estas fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina, utilizando muestras auténticas de los lignanos acetilpodofilotoxina y el éter metílico de la 5<sup>1</sup>-desmetoxi  $\beta$ -peltatina-A aislados anteriormente de la corteza (Figura 14). Este análisis permitió identificar que las fracciones IDV4-3 e IDV4-4, que mostraron constituyentes con R<sub>f</sub> similar al de las muestras de referencia (Figura 15), por lo que fueron agrupadas y se procedió a su purificación por cromatografía en columna.

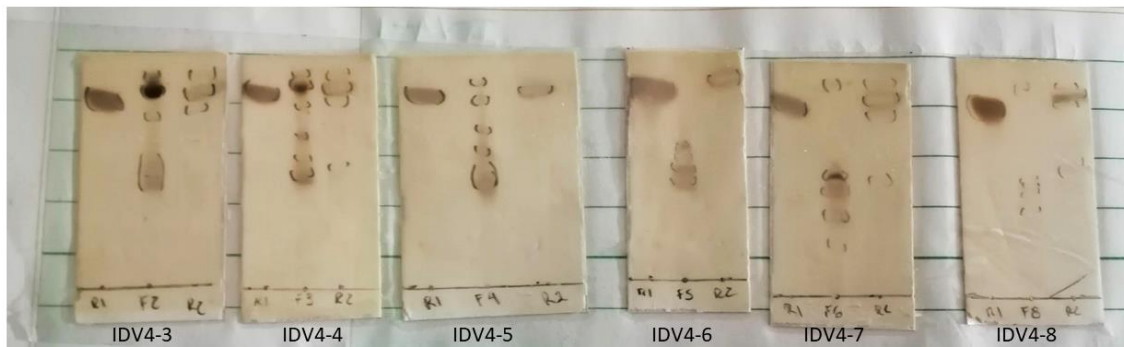


Figura 14: Cromatografía en capa fina de las fracciones IDV4-3 a IDV4-9 obtenidas de la cromatografía del extracto metanólico, utilizando las referencias R1= Acetilpodofilotoxina y R2= éter metílico de 5'-desmetoxi β-peltatina-A en un sistema de elución 9:1 Diclorometano/Metanol

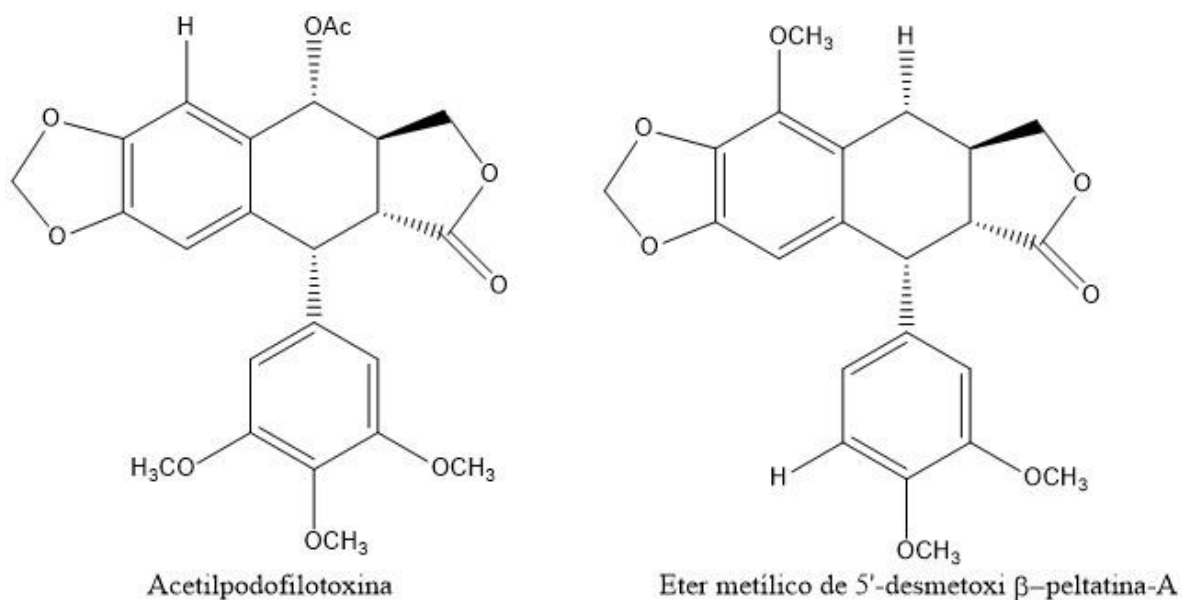


Figura 15: Moléculas referencias para la cromatografía en capa fina R1=Acetilpodofilotoxina "izquierda" y R2= Éter metílico de 5'-desmetoxi β-peltatina-A "derecha"

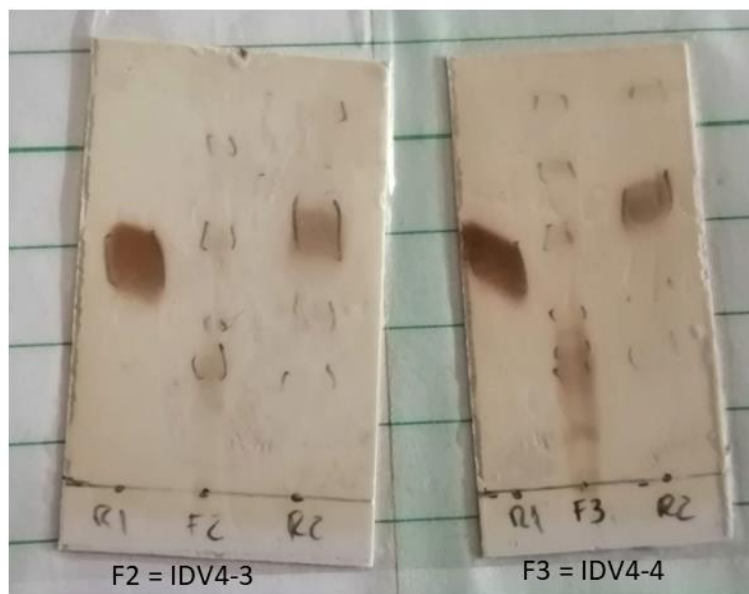


Figura 16: CCF de las fracciones IDV4-3 (F2) e IDV4-4 (F3) con los lignanos de referencia R1 y R2

El análisis cromatográfico de las fracciones IDV4-3 e IDV4-4 (0.83 g) se realizó utilizando una columna de vidrio empacada con sílice gel, eluyendo con un gradiente de DCM-MeOH. Las fracciones menos polares (Fr 3-10, IDV5-1) mostraron en CCF (Figura 16) una mancha homogénea visible a la luz UV, por lo que se purificaron mediante columna cromatográfica, utilizando como eluyente un gradiente de DCM-acetona. De este fraccionamiento, las fracciones menos polares (1-18) mostraron una sustancia homogénea en CCF (Figura 17). La reunión de estas fracciones permitió la obtención de 15.9 mg de un compuesto ceroso de color verde etiquetado como IDV7-1 (LAB-06).

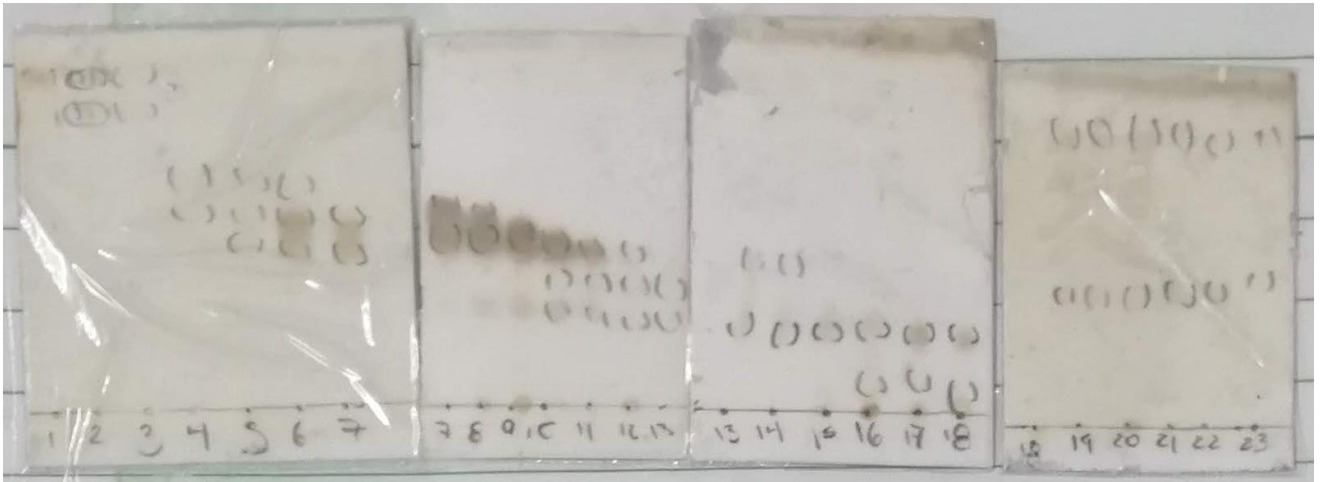


Figura 17: CCF de fracciones recolectadas de la cromatografía de IDV4-3 e IDV4-4.

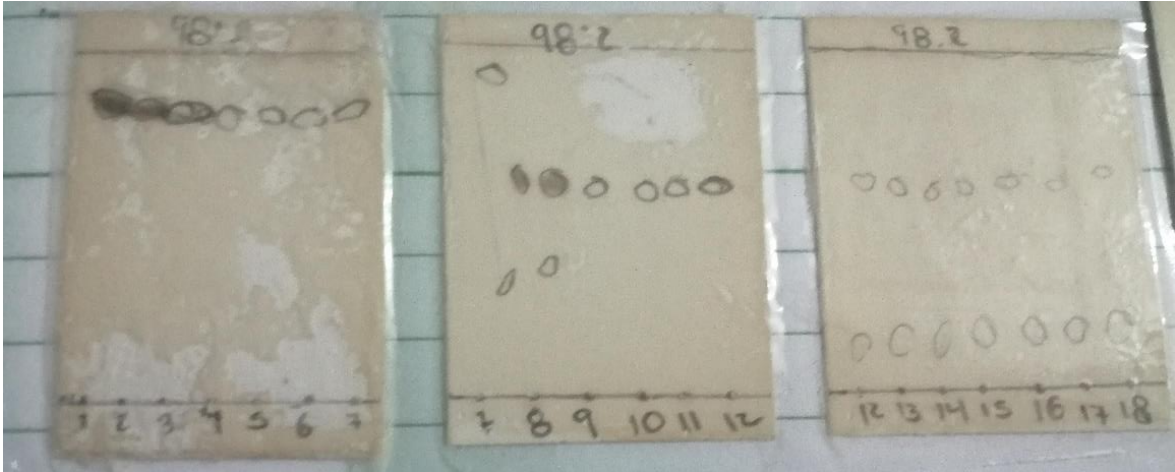
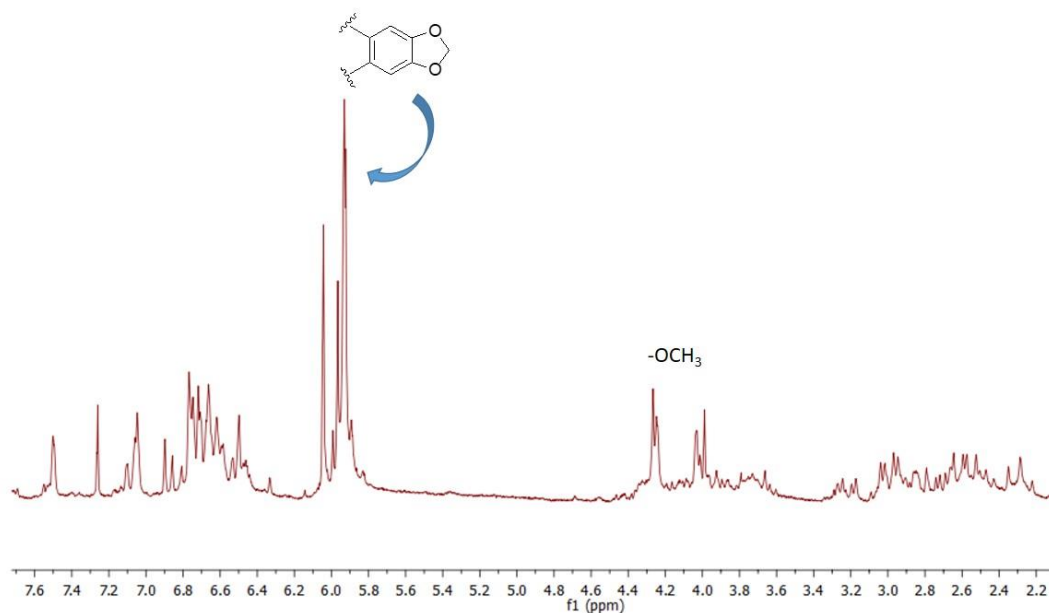


Figura 18: CCF de las fracciones menos polares fracción IDV5-1.

### 6.3. Análisis de los compuestos obtenidos por medio de RMN.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  perteneciente al fraccionamiento IDV7-1 (Espectro 1) mostró señales características de un lignano del tipo aril tetralino; sin embargo, se puede observar que se trata de una mezcla de compuestos, ya que entre  $\delta$  5.90 y  $\delta$  6.04 se observan varias señales correspondientes a grupos metilendioxi unidos a un anillo aromático característicos de los lignanos ariltetralina encontrados en *B. fagaroides*. Entre  $\delta$  4.00 y  $\delta$  4.30, se observan señales que se asignan a grupos metoxilo unidos también a anillos aromáticos.



Espectro 1.  $^1\text{H}$  RMN 200MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de compuesto obtenido IDV-7-1 (LAB11-06)

En este caso, se observan cuando menos cuatro señales características de grupos metilendioxi ( $\delta$  5.92,  $\delta$  5.93,  $\delta$  5.96 y  $\delta$  6.04) lo que establece la existencia de una mezcla de cuando menos cuatro compuestos (Figura 19). Así mismo, en el espectro se observan señales características de los protones aromáticos de los anillos B y E del esqueleto del lignano. En la Figura 19 se observa la expansión de esta zona del espectro, en donde se aprecian las señales en  $\delta$  6.58 (s, 2H), 6.72 (m, 3H), 6.88 (d, 1H), 7.07 (d, 2H), 7.50 (s, 1H), asignadas a los anillos aromáticos.

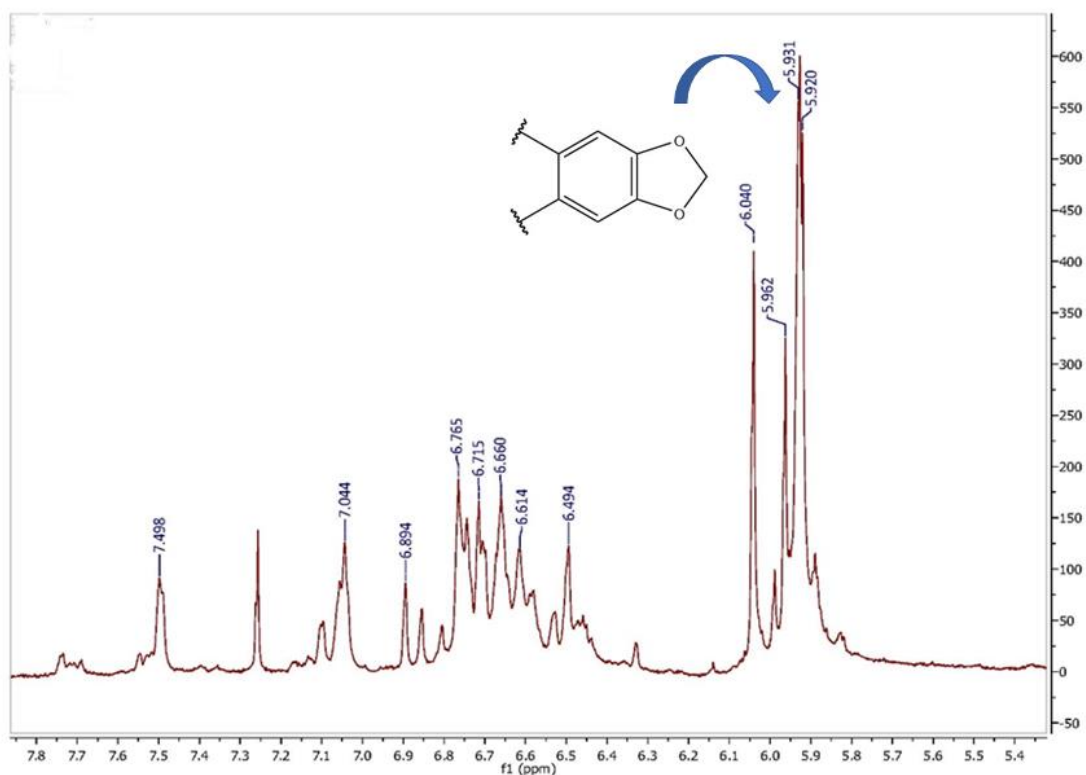


Figura 19: Expansión de la zona de  $\delta$  5.7-8.1 del espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto IDV-7-1.

Las señales en  $\delta$  3.98,  $\delta$  4.03,  $\delta$  4.23 y  $\delta$  4.26 corresponden a metoxilos que estarían ubicados en los anillos A y E del lignano; sin embargo, por tratarse de un compuesto no purificado, es difícil establecer su asignación adecuada. Finalmente, las señales multiplete centradas en  $\delta$  2.57,  $\delta$  2.99 y  $\delta$  3.22 se asignan a los protones alifáticos de los anillos C y D (Figura 20).

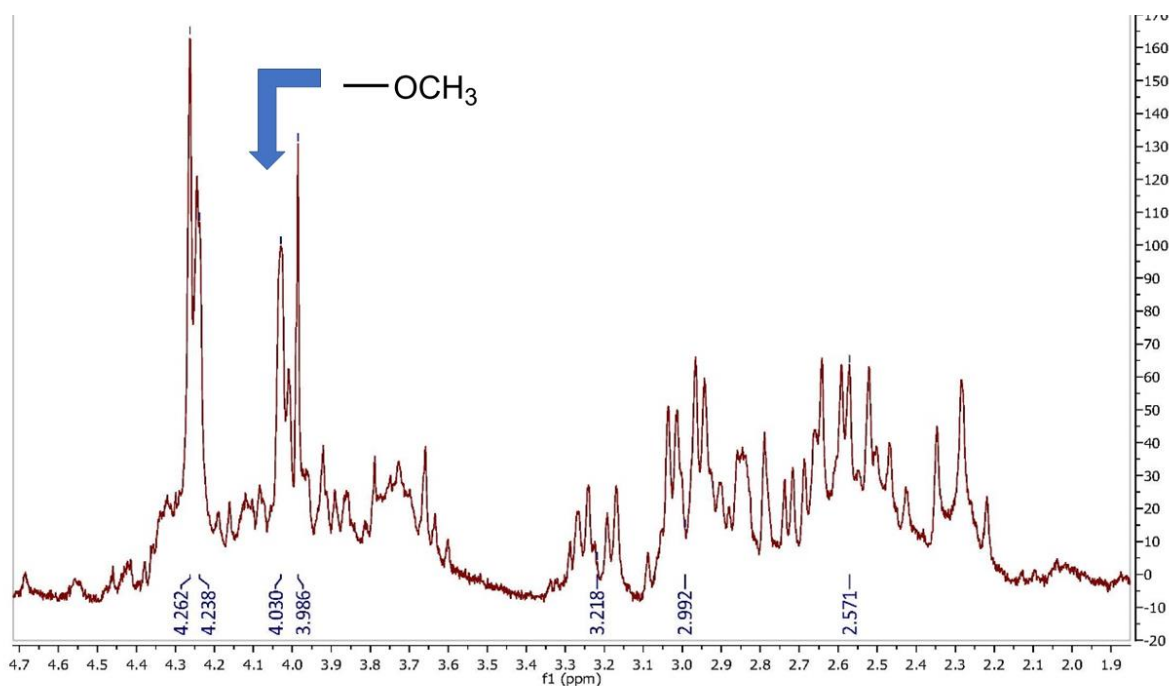


Figura 20: Expansión de la zona de  $\delta$  1.9 a  $\delta$  4.7 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de IDV-06.

El análisis preliminar permite establecer que este compuesto es una mezcla de aril tetralin lignanos que requiere purificación posterior para su correcta elucidación. Cabe mencionar que en el análisis por CCF, esta mezcla muestra una sola mancha homogénea, por lo que se requerirá utilizar la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) para su purificación. Esta técnica ya fue usada con anterioridad para resolver mezclas de este tipo en la corteza como lo indica (Andrés M. Rojas-Sepúlveda, 2012).

La purificación de la segunda fracción (IDV5-2) de la cromatografía principal, eluída con un sistema de DCM-MeOH 98:2, fue sometida a análisis cromatográfico en columna abierta de sílice gel, utilizando un gradiente de DCM-acetona, obteniendo 3 grupos de fracciones. La Figura 21 ilustra el análisis por CCF de estas fracciones.



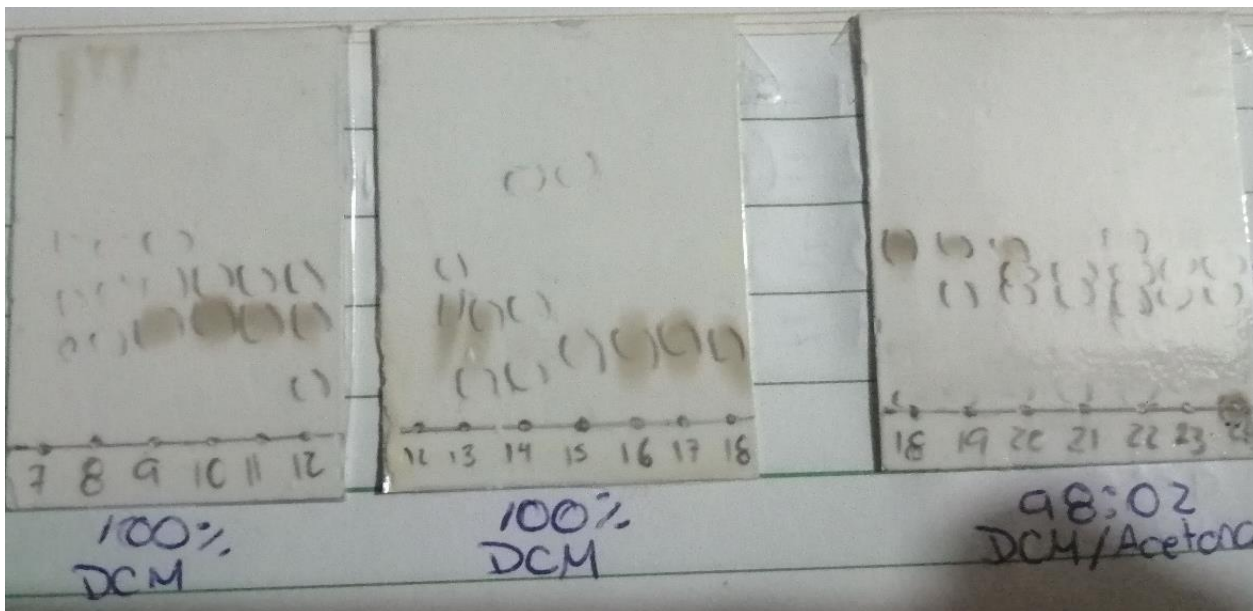
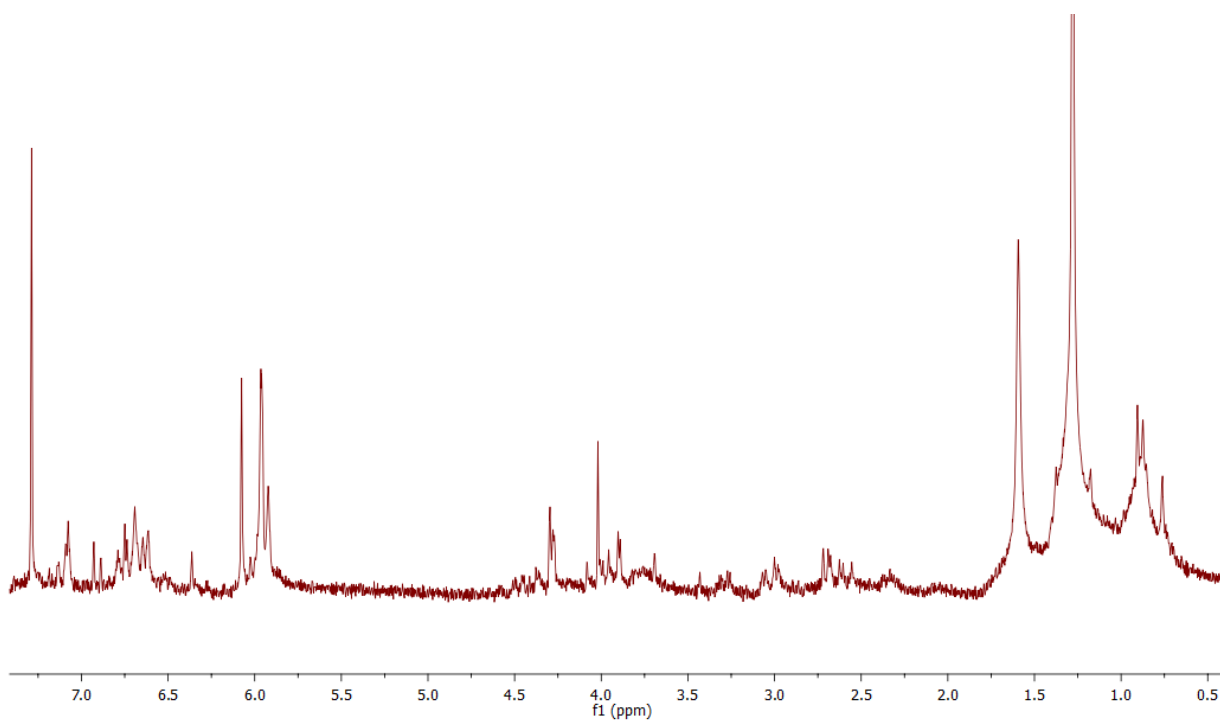


Figura 21: Análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas de la purificación de IDV5-2.

Las fracciones menos polares 9-14 mostraron una mancha homogénea en CCF (Figura 21), por lo que se reunieron, obteniendo 2 mg de un residuo ceroso Fracción LAB11-04. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de este compuesto (Espectro 2) mostró, al igual que para el compuesto anteriormente discutido (IDV-7-1), las señales características de un lignano (Rojas-Sepulveda et al, 2012).





Espectro 2:  $^1\text{H}$  RMN 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de compuesto obtenido IDV8-1 (LAB11-04).

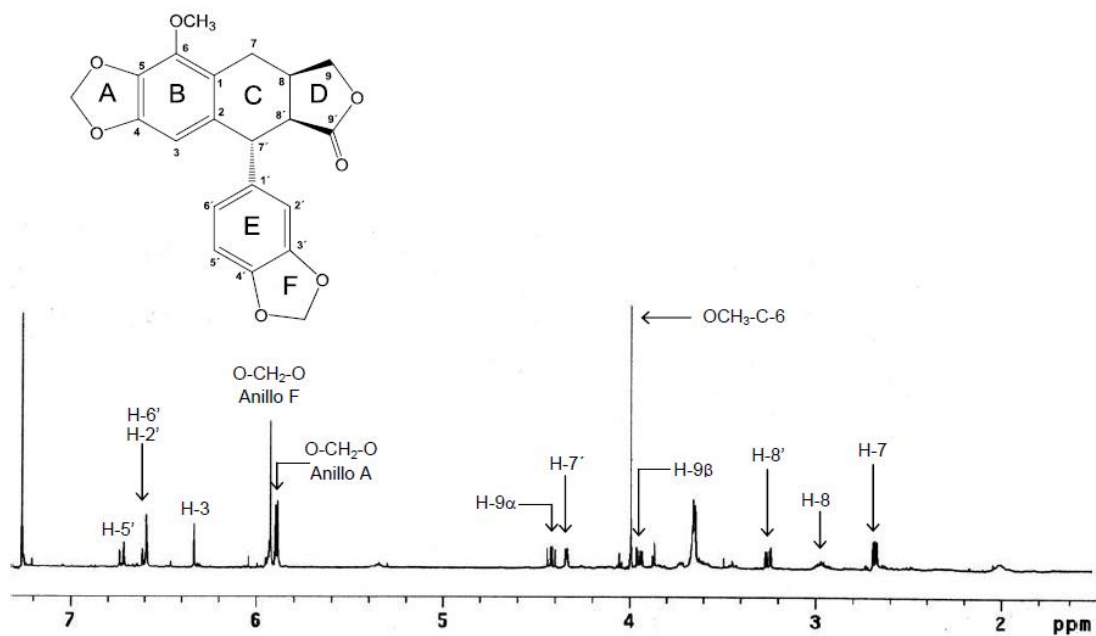


Figura 22: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de burseranina Tomada de: (Sepúlveda, 2012).

En la región de  $\delta$  6.3 a  $\delta$  7.5, se observa una gran cantidad de señales asignables a protones aromáticos; al comparar este espectro con el de la burseranina, obtenida anteriormente por Rojas-Sepúlveda de la corteza (Figura 22), es posible identificar las señales para H-5' en  $\delta$  6.87, H-2' y H-6' en  $\delta$  6.66, y H-3 en  $\delta$  6.32 (Figura 23). Como puede observarse, estas señales se encuentran superpuestas con muchas otras, lo que indica que se trata de una mezcla compleja de compuestos, en la que la burseranina puede estar presente debido a su similitud en el Rf con el informado. Lo mismo ocurre al analizar la región del espectro  $\delta$  5.8 a  $\delta$  6.1, donde aparecen las señales de los grupos metilendioxi (Figura 24). La expansión de la zona evidencia principalmente la presencia de dos grupos de señales; una en  $\delta$  6.04, asignada a un metilendioxi unido al anillo F, y el otro, en  $\delta$  5.92, que se asigna a un metilendioxi unido al anillo B del esqueleto de lignano. La señal a  $\delta$  6.04 permite establecer que el compuesto mayoritario de la mezcla contiene un metilendioxi en el anillo F, como la burseranina, aislada anteriormente de esta especie.

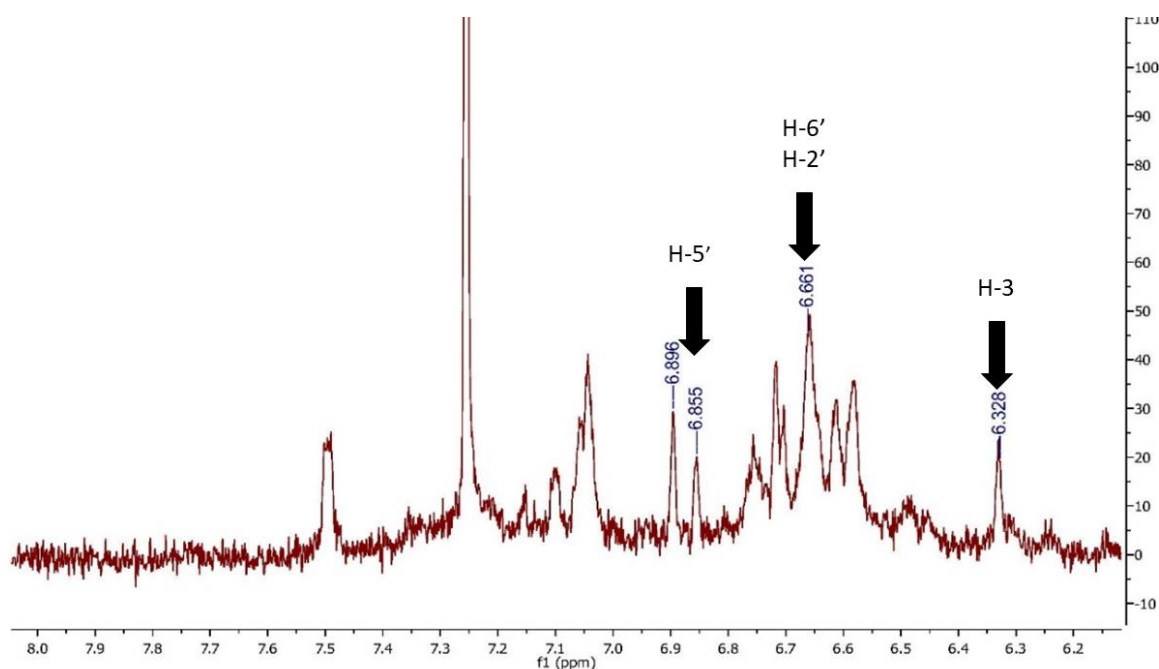


Figura 23: Expansión de la región de  $\delta$  6.2 a  $\delta$  8.0 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-1.

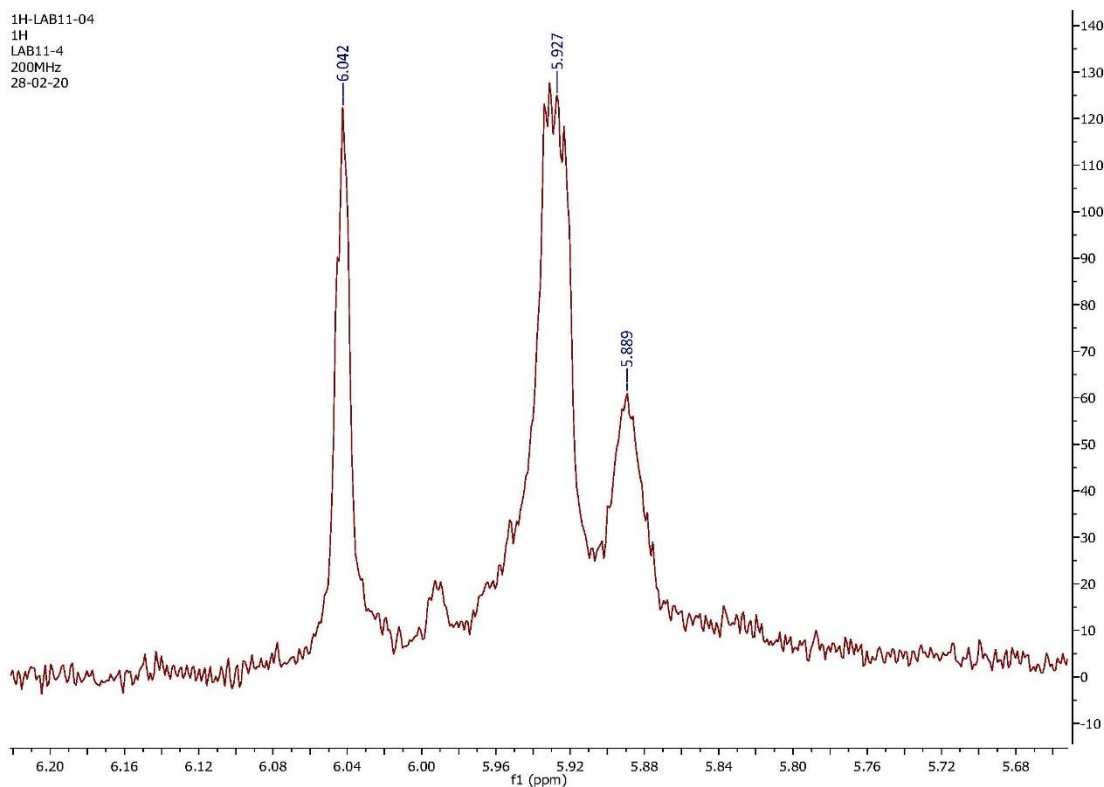


Figura 24: Expansión de la región de  $\delta$  5.6 a  $\delta$  6.2 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-1.

Así mismo, en  $\delta$  4.0 aparece una señal singulete asignable a un metoxilo unido a anillo aromático. De igual manera, es posible observar otras señales más pequeñas correspondientes a las otras moléculas de la mezcla. El resto de las señales de la región entre  $\delta$  2.5 y  $\delta$  4.3, corresponden a los protones alifáticos H-7, H-7', H-8, H-8' y H-9.

Las evidencias espectroscópicas aquí discutidas indican que la identidad de este compuesto es de la burseranina (Figura 25). Desafortunadamente, no contamos con alguna muestra auténtica de este compuesto para poder realizar una comparación directa, además del hecho de que el compuesto aislado se encuentra impuro, y se requiere llevar a cabo su purificación para establecer su identidad inequívocamente.

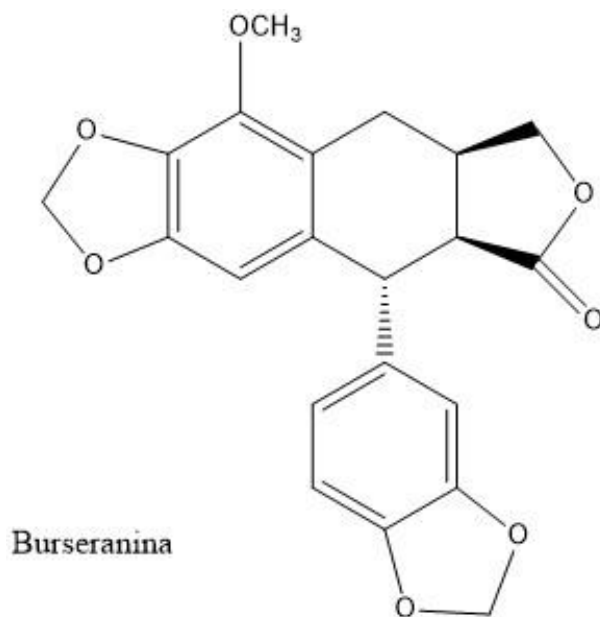
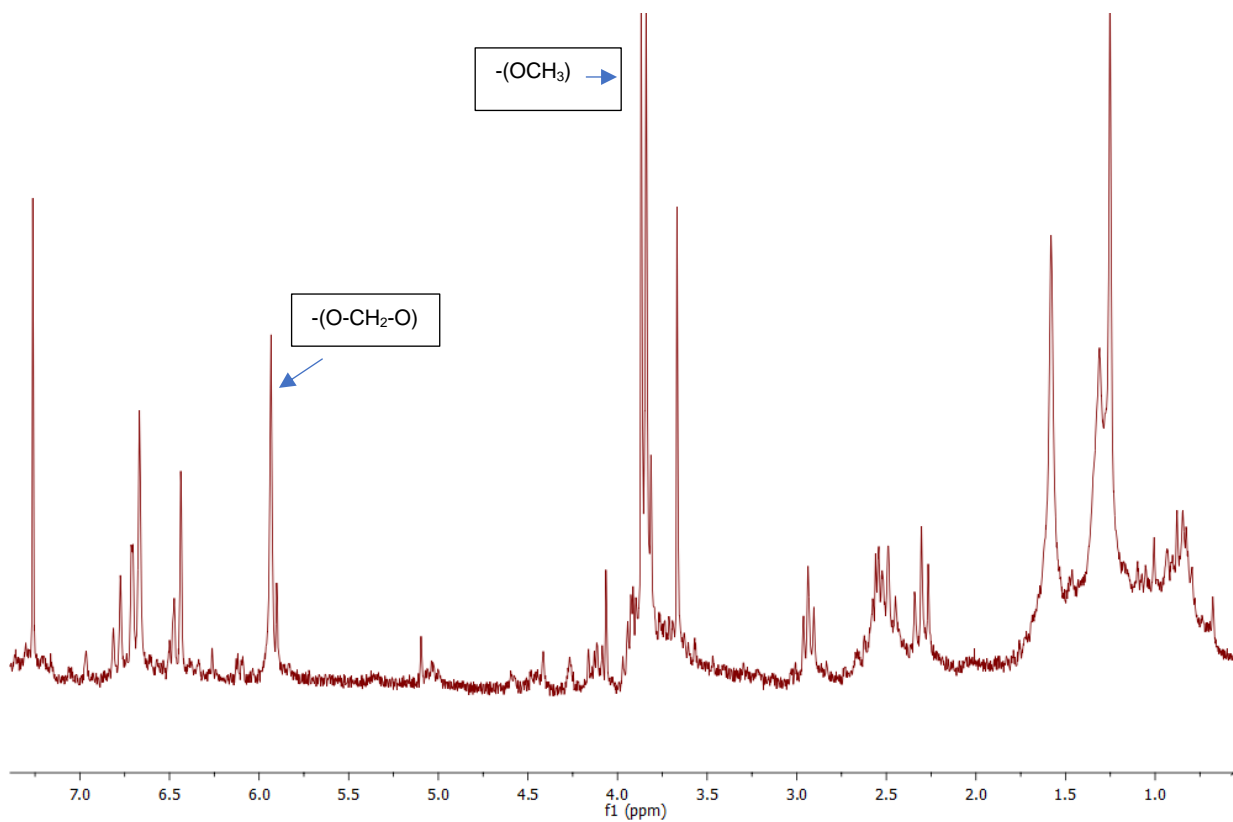


Figura 25: Compuesto de Burseranina

El análisis cromatográfico de la fracción IDV5-2 (Figura 21) indica que la fracción 15 se encuentra pura, y muestra coincidencia con el R<sub>f</sub> del éter metílico de la 5'-desmetoxi-β-peltatina-A, por lo que el residuo de aspecto ceroso y color verde fue analizado mediante RMN <sup>1</sup>H (Espectro 3).



Espectro 3:  $^1\text{H}$  RMN 200MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de compuesto obtenido IDV8-03 (LAB11-05).

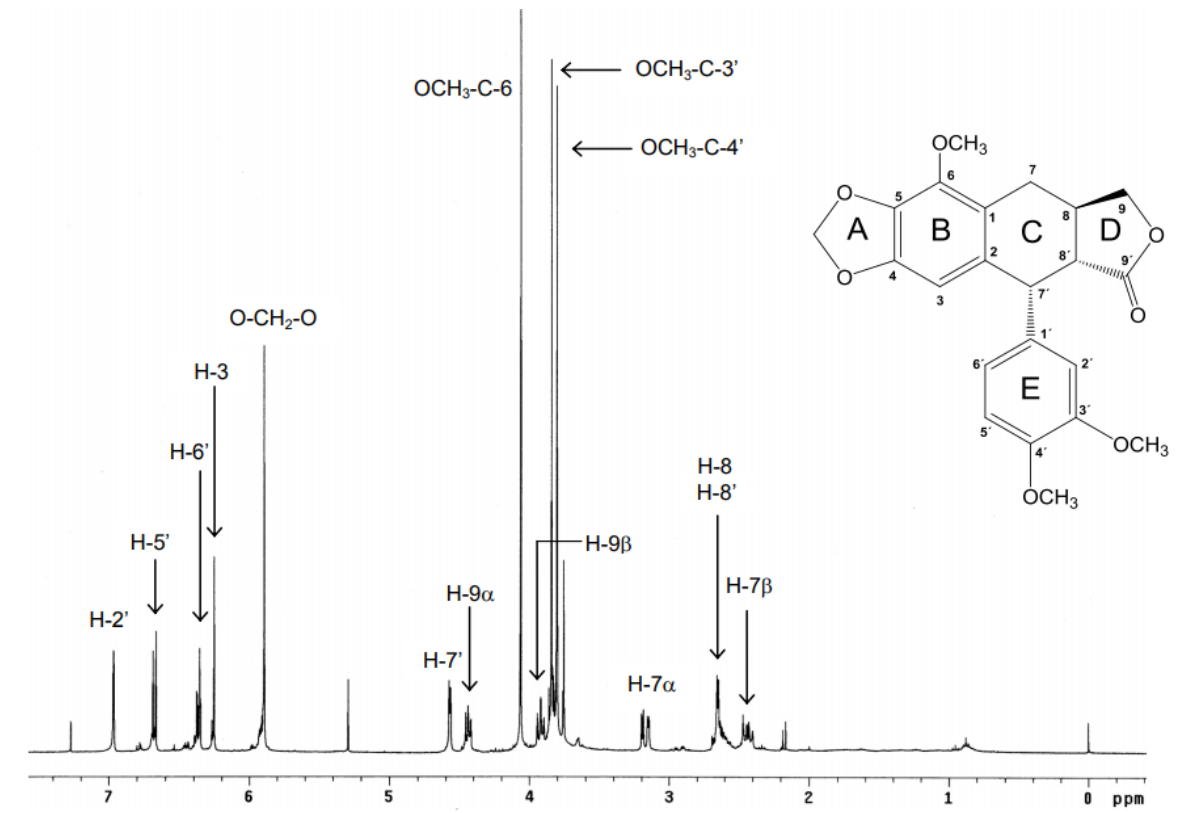


Figura 26: RMN 400MHz de compuesto 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina-A-metil éter Tomada de: (Sepúlveda, 2012).

En la Figura 26 se muestra el espectro obtenido por (Rojas, 2012) de la molécula 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina-A-metileter, la cual parece tener algunas similitudes en las bandas más significativas como lo son los 2 grupos metoxilos (O-CH<sub>3</sub>) con un desplazamiento de  $\delta$  3.84 y  $\delta$  3.86, en las posiciones 3' y 4' correspondientes al anillo E del lignano (Figura 27).

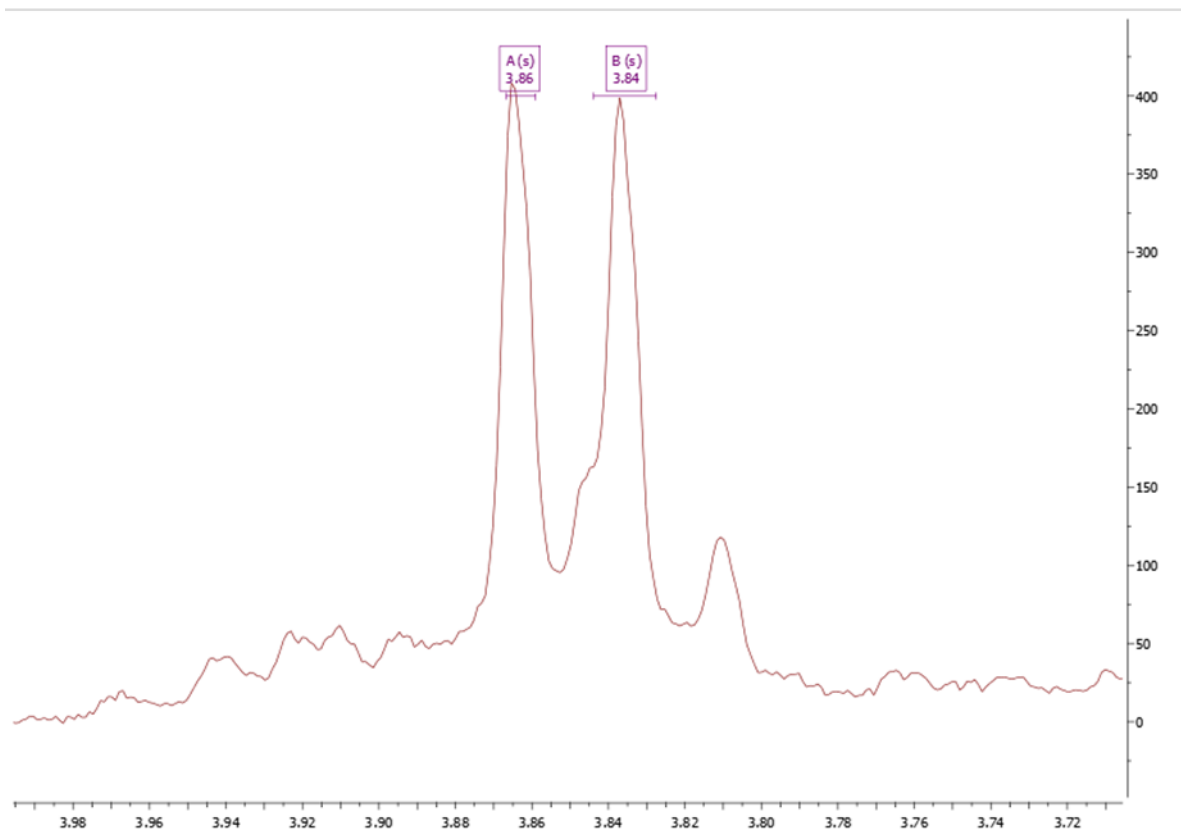


Figura 27: Expansión de la región de  $\delta$  3.70 a  $\delta$  4.00 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.

Así mismo podemos ver la señal en campo bajo con desplazamiento de  $\delta$  5.93 (O-CH<sub>2</sub>-O) del anillo A. Sin embargo, no existe información clara de algunas señales faltantes para poder asignar una estructura molecular definida, como la señal del grupo metoxilo del anillo B y algunas señales de hidrogeno que no se logra definir con claridad su integración. Esto podría deberse a algunas impurezas y ceras que aún están junto con el compuesto. En corteza se encontró que el éter metílico de la 5'-desmetoxi  $\beta$ -peltatina A se encuentra mezclada con 5' desmetoxidesoxipodofilotoxina, por lo que es probable que tengamos el mismo tipo de mezcla. Es importante destacar que la separación de esta mezcla fue posible utilizando HPLC de fase reversa (Andrés M. Rojas-Sepúlveda, 2012).

Sin embargo, también existe una similitud con el compuesto aislado por Rojas-Sepúlveda (desoxipodofilotoxina) (Fig. 28), ya que en un desplazamiento entre  $\delta$  3.70 y  $\delta$  3.90 podemos observar las señales características correspondientes a metoxilos OCH<sub>3</sub>-3', OCH<sub>3</sub>-5' y OCH<sub>3</sub>-4' (Fig. 29).

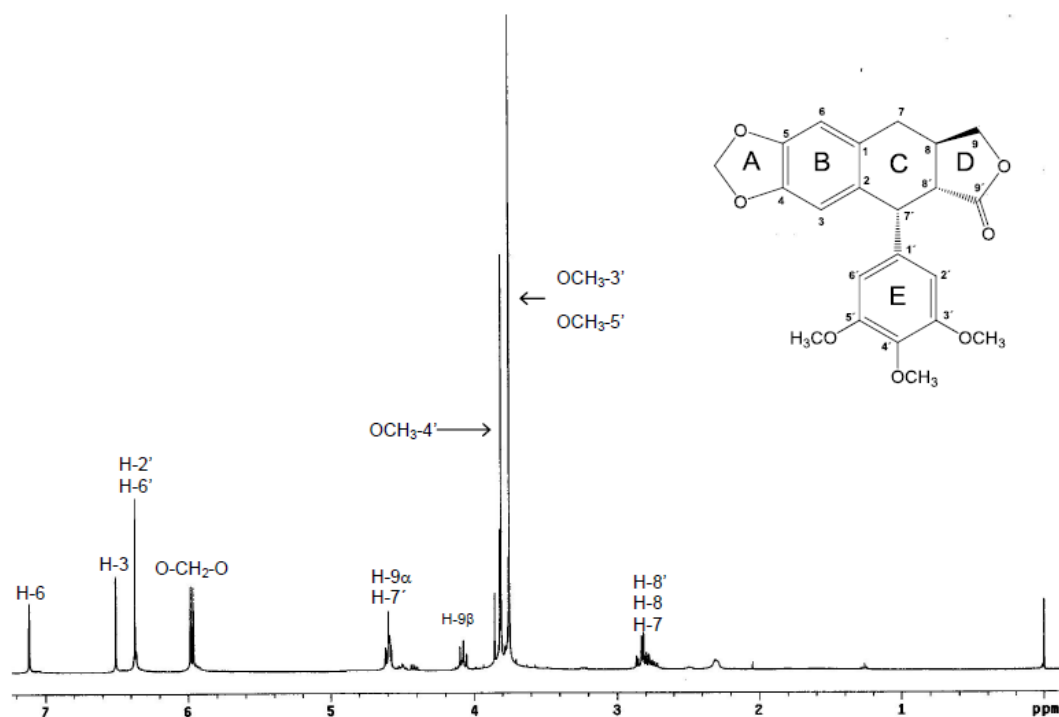


Figura 28: RMN 400MHz de compuesto Desoxipodofilotoxina Tomada de: (Sepúlveda, 2012).

Podemos visualizar una señal correspondiente a un metilendioxi en un desplazamiento  $\delta$  5.90 del anillo A Fig. 30, y las señales  $\delta$  2.90 corresponderían a los hidrógenos H-8', H-8 y H-7 Fig. 31, la señal  $\delta$  4.10 correspondería al hidrógeno H-9 $\beta$ , se observa una señal similar  $\delta$  4.50 del hidrógeno H-9 $\alpha$  y H-7' y las señales  $\delta$  6.40 y  $\delta$  6.70 correspondientes a los hidrógenos H-2', H-6' y H-3 respectivamente Fig. 32.



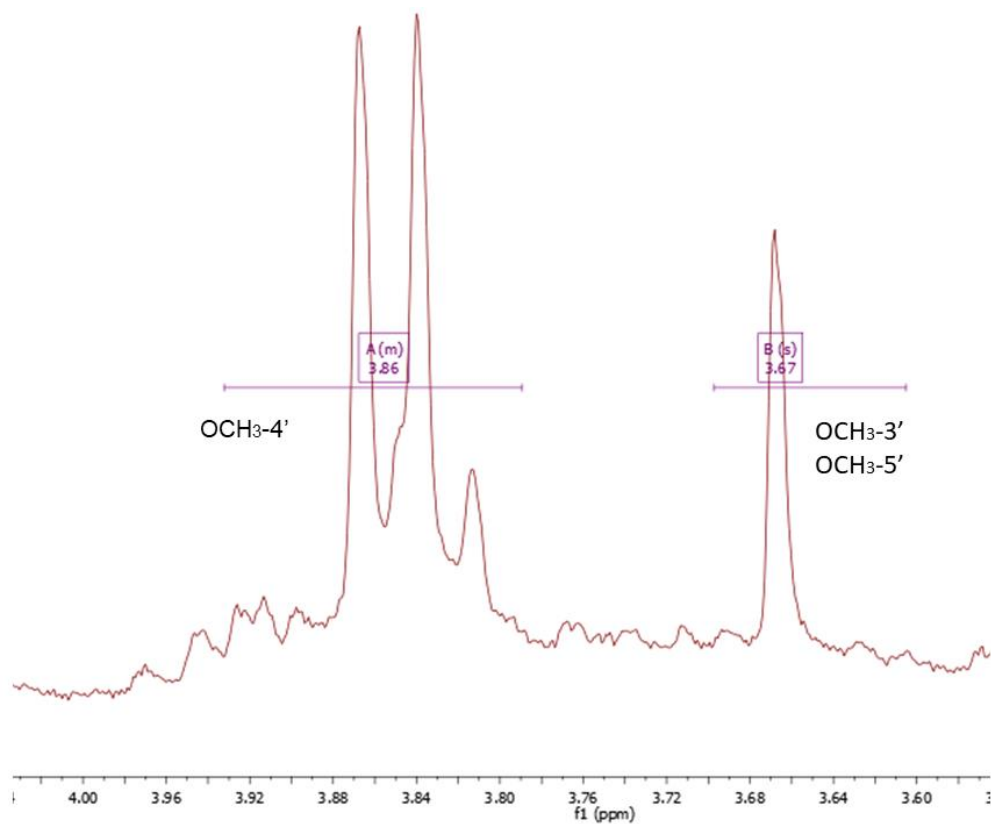


Figura 29: Expansión de la región  $\delta$  3.6 a  $\delta$  4.0 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.

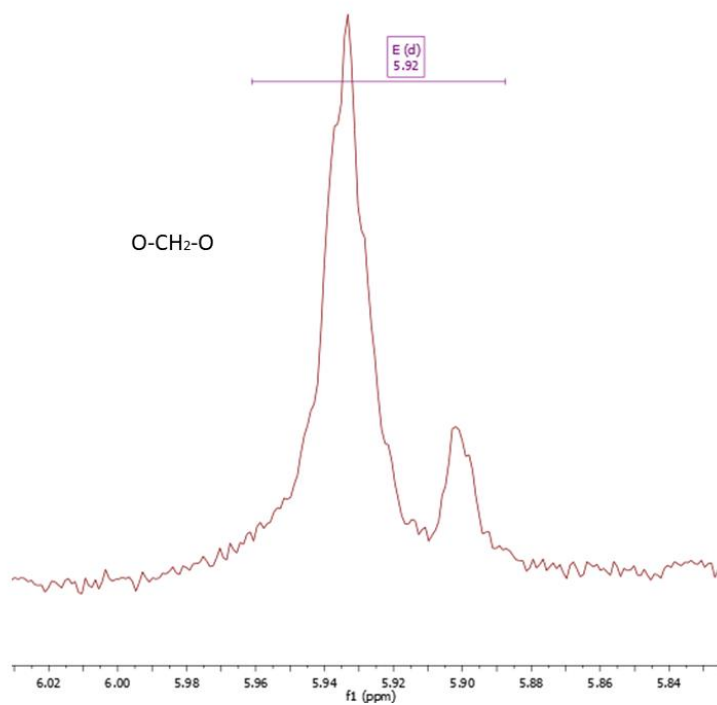


Figura 10: Expansión de la región  $\delta$  5.8 a  $\delta$  6.0 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.

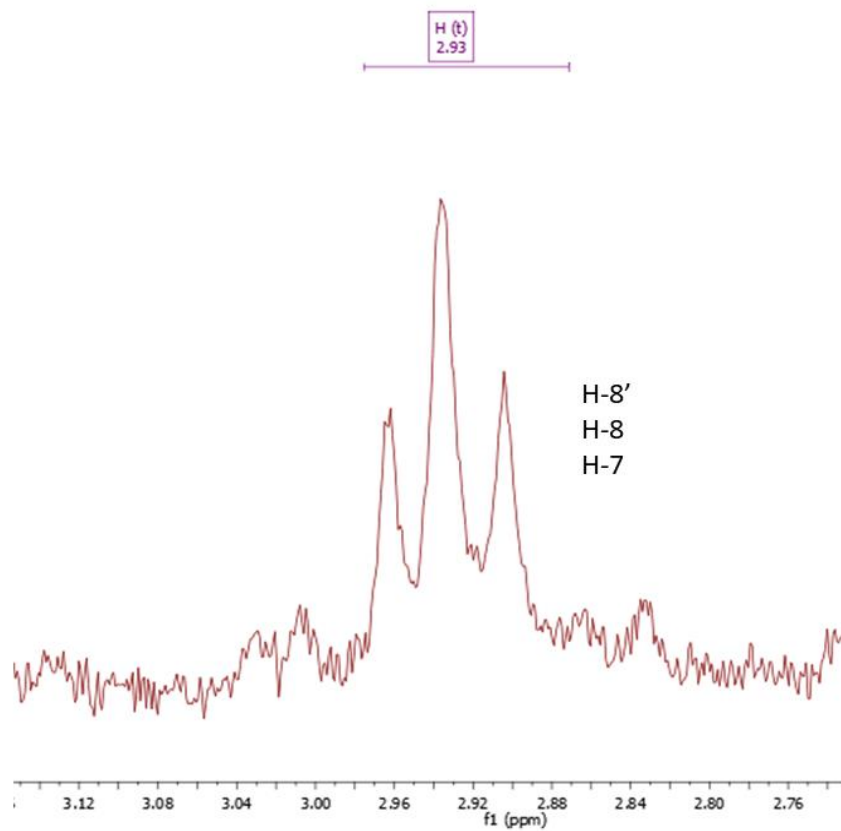


Figura 11: Expansión de la región  $\delta$  2.7 a  $\delta$  3.1 del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de IDV8-03.

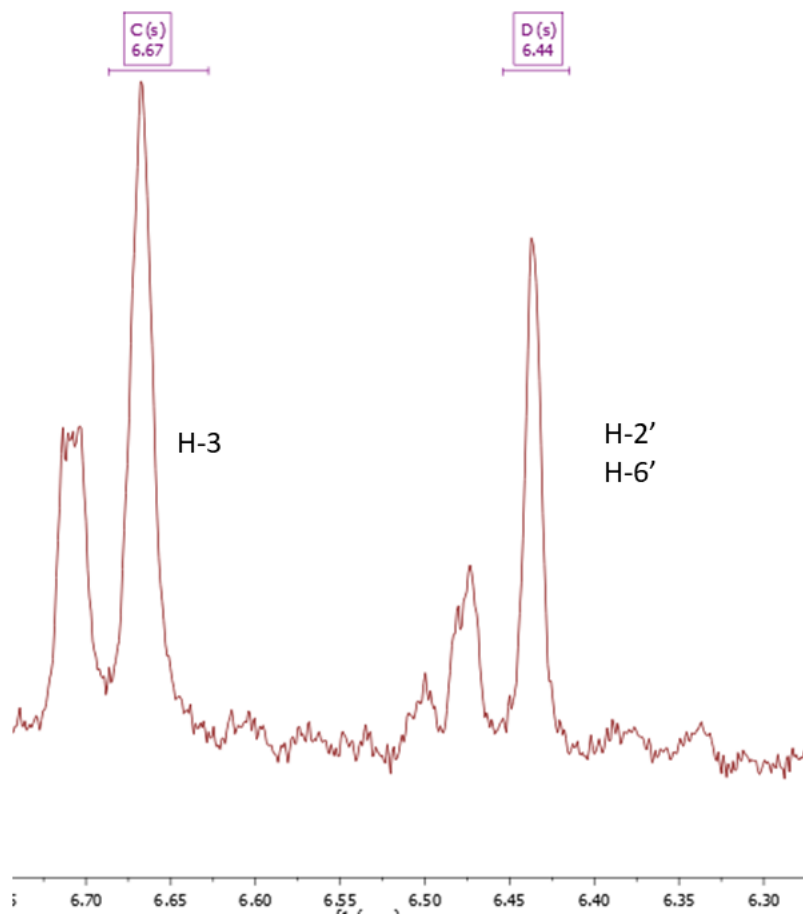


Figura 12: Expansión de la región  $\delta$  6.3 a  $\delta$  6.7 del espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de IDV8-03.

## 7. CONCLUSIONES

Hasta el momento se han logrado aislar de manera satisfactoria 3 compuestos, (IDV8-1) LAB11-4, LAB11-5 (IDV8-2) y LAB11-6 (IDV7-1). Estos compuestos fueron obtenidos de fracciones procedentes de recromatografías de grupos de ellas, que se originaron de la cromatografía principal realizada al extracto metanólico, por lo que tienen impurezas que deben ser eliminadas para establecer la identidad inequívoca de los compuestos. Los compuestos IDV8-1 e IDV8-2 fueron tentativamente caracterizados como burseranina y metil éter de la 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina-A, de acuerdo con las evidencias espectroscópicas en RMN  $^1\text{H}$ , y a su similitud en  $R_f$  con muestras auténticas disponibles en el laboratorio. Todas las fracciones que se han obtenido hasta este momento presentan impurezas y además se han obtenido como ceras color verde bandera, las cuales se pueden purificar mediante HPLC, como se describe en la literatura consultada.

Los extractos de *n*-hexano, diclorometano y metanol obtenidos de las hojas de *B. fagaroides* mostraron efecto citotóxico importante frente a células de cáncer cervicouterino (HeLa), próstata (PC3) y hepático (Hep3B). Las células presentaron mayor sensibilidad frente al extracto metanólico, aunque aún es necesario determinar la  $\text{IC}_{50}$  para poder llevar a cabo una comparación directa con el efecto citotóxico de los extractos obtenidos de la corteza. Se puede observar que los extractos de las hojas se comportan de manera similar a los extractos de la corteza, en donde el extracto metanólico presenta la mayor actividad citotóxica. El análisis fitoquímico preliminar realizado en este trabajo permite concluir que el extracto metanólico de las hojas contiene varios lignanos, de los cuales al menos dos, la burseranina y el éter metílico de la 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina A, se encuentran también en la corteza.

Es importante destacar que el éter metílico de la 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina A es uno de los lignanos mayoritarios presentes en la corteza, además de que estudios de biología y reconocimiento moleculares por RMN, indicaron que este compuesto presenta citotoxicidad, con una  $\text{CI}_{50}$  de orden nano molar, lo cual indica un efecto citotóxico importante en diferentes líneas celulares, incluida PC3 (Mayra Antúñez-

Mojica, 2016). Así mismo, se demostró que, mediante la unión con tubulina, desencadena la despolimerización de microtúbulos. Los microtúbulos juegan un papel primordial en la mitosis de las células. Entre sus funciones principales destacan la de formar el huso mitótico y participar en la división celular, específicamente en la alineación y separación de los cromosomas (mitosis). Asimismo, mantienen la forma de la célula y participan en el transporte intercelular (William N. Hait, 2007)

La principal contribución de este trabajo es el haber demostrado la presencia del éter metílico de la 5'-desmetoxi  $\beta$ -peltatina A en las hojas de *B. fagaroides*. Es claro que la presencia de esta molécula tan importante en las hojas permitirá continuar con su estudio sin dañar las escasas poblaciones existentes de esta planta medicinal mexicana.

## 8. PERSPECTIVAS

Purificar por medio de HPLC las fracciones obtenidas para definir con claridad su estructura molecular.

Purificar por cromatografía en columna las fracciones obtenidas del extracto metanólico para obtener más cantidad de los compuestos que se lograron identificar, y hacer más pruebas para tener mayor claridad de si existe algún otro compuesto de tipo lignano.

En caso de que existiera la presencia de algún compuesto nuevo de tipo lignano que no esté descrito en el extracto de corteza, comparar su actividad biológica con otros compuestos activos de *B. fagaroides* ya evaluados.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, M., Nuñez, P., González-Maya, L., CardosoTaketa, A., & Villarreal, M. (2015). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of *Bursera* species from Mexico. *J. Clin. Toxicol.*, 1-8.
2. Aldaco-Sarvide, F. P.-P.-S.-T. (2012). Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *Gamo*, 371-379.
3. Andrés M. Rojas-Sepúlveda, M. M.-S.-V. (2012). Cytotoxic Podophyllotoxin Type-Lignans from the Steam Bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*, 9506-9519.
4. Antunez Mojica, M. Y. (2017). *Estudios de reconocimiento molecular de ariltetralin lignanos naturales para establecer su mecanismo de acción como agentes antimitóticos*. Cuernavaca Morelos: Tesis de Doctorado UAEM.
5. Antúnez-Mojica, M. R.-S.-S.-M.-V. (2019). Lignans from *Bursera fagaroides* Affect In Vivo Cell Behavior by Disturbing the Tubulin Cytoskeleton in Zebrafish Embryos. *Molecules*, 24(1), 8.
6. Ayres D.C. and Loike, D. (1990). *Lignans : chemical, biological and clinical properties*. New York, USA: Cambridge University Press; 1Ed.
7. Becerra, J., Venable, D., Evans, P., & Bowers, W. (2001). Interactions between chemical and mechanical defenses. *Am. Zool.*, 865–876.
8. Bianchi, E. S. (1969). Antitumor agents from *Bursera fagaroides* (Burseraceae)  $\beta$ -peltatin-A-methylether and 5'-demethoxy- $\beta$ -peltatin-A-methylether . *Tetrahedron Letters*, 2759-2762.
9. Bruce Alberts, (. A. (2008). *Molecular biology of the cell*. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

10. Bullock, L. (1936). Notes on the Mexican species of the genus *Bursera*. *Bull. Misc. Inf. Kew*, 347–387.
11. Chasquibol, N. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química e Ingeniería*, 8-12.
12. Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products A biosynthetic approach*. Reino Unido: Wiley.
13. Duncan, A. M., Phipps, W. R., & Kurzer, M. R. (2003). Phyto-oestrogens. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 253-271.
14. Giulia Gigliarelli, J. X. (2015). Chemical Composition and Biological Activities of Fragrant Mexican Copal (*Bursera* spp.). *Molecules*, 22383–22394.
15. Hernandez, F., & Ochoterena, I. (1943). *Historia de Las Plantas de Nueva Espana*. Ciudad de México, México: Imprenta Universitaria.
16. Hernández-Pérez, E. G.-E. (2011). Distribución del género *Bursera* en el estado de Morelos, México y su relación con el clima. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(3), 964-976.
17. Langenheim, J. (2003). *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany*. Oregon, US: Timber Press.
18. Maria Carla Marcotullio, M. C. (2018). An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera* spp. *Molecules*, 23(8).
19. Mayra Antúnez-Mojica, J. R.-S.-H.-B. (2016). Structural and Biochemical Characterization of the Interaction of Tubulin with Potent Natural Analogues of Podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*, 2113-2121.



20. Morales-Serna, J., Cruz-Galicia, E., Garcia-Rios, E., Madrigal, D., Gavino, R., Cardenas, J., & Salmon, M. (2013). Three new diarylbutane lignans from the resin of *Bursera fagaroides*. *Nat. Prod.* , 824-829.
21. Moss, G. P. (2000). Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and applied chemistry* , 1493-1523.
22. Nicola, R. C. (2014). *Natural Products Chemistry sources, separations, and structures*. New York: CRC Press.
23. Omar Aristeo Peña-Morá, M. L.-B.-A.-L. (2016). Análisis de citotoxicidad, recuperación posterior al tratamiento y selectividad de podofilotoxinas de origen natural de *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* en líneas celulares de cáncer de mama. *Molecules*, 1013.
24. Orta-Amaro, M. (2007). *Copal: Microestructura, Composición y Algunas Propiedades Relevantes*. Ciudad de México, México: Instituto Politecnico Nacional. Tesis Doctoral.
25. Peña-Morán, O. A.-B.-A.-L. (2016). Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines. *Molecules*, 1013.
26. Puebla P. A. M., H. R. (1998). Cytotoxic and Antitumour Activity from *Bursera fagaroides* Ethanol Extract in Mice with L5178Y Lymphoma. . *Phytotherapy Research*, 545–548.
27. Rey, M. y. (1946). La similitud del efecto de la podofilina y la colchicina y su uso en el tratamiento de los condilomas acuminados. *Science*, 104 (2698), 244-245.
28. Reynoso, R. D. (2008). Difluorometil ornitina y el extracto acuoso de *Bursera fagaroides* en el modelo de linfoma murino L5178 y en ratones Balb/C: comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. *Rev. Salud Anim.* , 128-132.

29. Rojas, S. A. (2012). *Búsqueda de metabolitos con actividad citotóxica y antitumoral en Bursera fagaroides var. fagaroides y Bursera morelensis, y evaluación de su efecto como inhibidores del ciclo celular en el modelo de pez cebra*. Cuernavaca, Morelos: Tesis de Doctorado. UAEM.
30. Rzedowski, J. L. (2005). Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana* 70, 85-111.
31. Samuel, R. R. (2017). *Oncología general para profesionales de la salud de primer contacto*. Ciudad de Mexico: Permanyer México.
32. T, U. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem*, 2:371–390.
33. Teponno, R., & Kusari, S. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat. Prod. Rep.* , 1044–1092.
34. William N. Hait, E. R. (2007). Tubulin Targeting Agents. *Update on cancer therapeutics*, 1-18.
35. Wilson, L. y. (1967). Los eventos bioquímicos de la mitosis. II La unión in vivo e in vitro de colchicina en embriones de saltamontes y su posible relación con la inhibición de la mitosis. *Biochemistry*, 6 (10), 3126-3135.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **DOMÍNGUEZ VALLE ISRAEL** con número de matrícula **20164004197** cuyo título es:

**“Estudio fitoquímico de las hojas de *Bursera fagaroides*”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA**.

Cuernavaca, Mor a 05 de abril de 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. MA. YOLANDA RIOS GOMEZ**  
**DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA**  
**DRA. LAURA PATRICIA ÁLVAREZ BERBER**  
**DR. ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ**  
**MTRA. SILVIA MARQUINA BAHENA**

**PRESIDENTE**  
**SECRETARIO**  
**VOCAL**  
**PRIMER SUPLENTE**  
**SEGUNDO SUPLENTE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**SILVIA MARQUINA BAHENA | Fecha:2022-04-05 10:22:45 | Firmante**

mJ6ZgUt3YX2O1b3qfAHIA2S2Dhr1NluM8x4c+P1zSazy6AYmz60iJBdN27C+z4ojlZT23eGXVxZUElaJjh4eSlbsY0Uyd0NJTJhDbAj9bMNGjY6mCkxm5ChuGaEDSTdaXCRgAfdWOf15xOQvcZtAfttXuyg/JgUGKU1ZGROAv5rXopqyA774D5BaRCgaa2QuJ8RhdVVB8npneiryezBY4fCnz39Gzzb86DxFUXwNhwgChV9m235iu42+6zgmro/13f9eP2QtDVB5sX2GGMAh8lzTurBNGf/coyehB8wWbctM0kJBsiGjEPBnLZl3r6V6ukv5UjHvDn9jMDb7X2m8w==

**LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2022-04-05 10:48:59 | Firmante**

DtlvpBnCKCn4I7QLcR2bHqdN5Bgn4LaVFjTWSWETd6m0GO3upawya/cdVGTp4Dlww3jwCDUkOi2oGdYYaLWHMeOH+P3OEI5AjukboVvtk8K4VDjjkU/2ib062wmgMmCHNUym54K0jNjuZnfmLhudftDFBtdNd6ebvrUoXTzlwYc7fG/s+aJASdWt7C36RRC+R91u8ydrFOxgTg468MLFUNOSjITMnImZsMfULR4+ZEn2wxP7a1rftCkb7/9YziJu5AISf5YQzhCIG868A/n1BlveksYj/cXca5nTuqMsk8rK2RHGPGbu6ulq3TuyambMqxH42XHF6KQdjikge2Dg==

**ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2022-04-05 11:20:23 | Firmante**

K5cGWBjUBtj4TUlyVbJLlK8B4ljjQnRQjHUPx8/KOjVMFjsS36VsM5YhvmHGFtLnoJTbmloyO9392uvW5MzHEgDURDZtGdq0a+szq0QB6p+w/9T9/HzHU1bB19+jo1wJYRNn9j5uMlhjLSXRIFITQv7/d5RAyqXpAdNSUf38SL7uaObaRIAkylk0Zv8gCAO2Uqh2oe9UKqOWL98Ft+fS5WX3Z+QsApK94IRJrXcODhjQ5LDFoqsN6S65/gjF3Uyiat15qf/4uOhVv/5C3b1CtLgVll2g6TxiPIEFhqrKyPUnlS1deRpXzU0iWzjgM3MH3bwRH0wKBT9H68qAqFAyq==

**MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2022-04-05 17:01:01 | Firmante**

SiJ2HNPCNYTh9EHgsYf9/KglQgHXj5w9w6AfdL2Np8JtZHUpgfo15VmxFDEbHyquHzeVtSAHYWMkgRC5pfJ1m7m1Vlz+TrEI5i4blbbEB+dbZQTqtcfL88MctbidVABXFCMNg8bJvJjVhK5S+xMeD1aep0B+ehheQmpIPwgBkBY81n6WN4MrWR74DZfBva66rXoTrh9DWWPEBiSCq8Viz68mxvGhgJk6M7mDjnt/ZQEJv+LIM8mLa2FHsJgBgC2v94CFKzGqDrJb20InUKUNLxol9Yu0qkFG16ooX0DSbUKH2R8kgQB+4aNMXxFyDTSTDnYHBKHXijKYFC0aQ==

**ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2022-04-06 15:38:00 | Firmante**

PHAAJ/hxpd0ypR3dy/zl4pgOXiZtlutjUT9n/pEl8xTIHIXD7ablQqiyvyW5Chaox9QcRYMWWiI5A6EobUSwShcS5gdQ62hd8Zi+YLYGyhgkNCIQL0KjaazYGeaoP7F79ETZgn10ZmfbCESjk2eZDyXFruLzMGsnOHDLCkq0UNIAzgxuJGFzLPlarbDMx/qKuMoM9oIbUYjyY9T06Sh17n2zKHxj0M0xdQjLuIUuE5+FHITpg3KjKQdErLZt/LTLYSsx1o535oikNFomnhyDIE1rx/dx0bOBEfc+H9BrejQP07x+9MI8MN740KvnrucclW+C+Z6JqH+XmKgf4J4ZJw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**aPESUg47V**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4AC5AFBHzSh9EdQdCV7OSCdKqComzLrH>

