



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“Composición química preliminar y actividad antiinflamatoria
in vitro del extracto de diclorometano de las hojas de *Bursera
grandifolia*”**

T E S I S

Para obtener el título de:
INGENIERO QUÍMICO

Presenta:
DIANA MARLEN GALLARDO NIETO

Director de tesis:
DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA

Cuernavaca, Morelos.

Mayo, 2021.

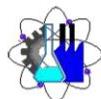


Este trabajo fue realizado en el laboratorio 321 de Química de Productos Naturales, del Centro de Investigaciones Químicas, IICBA de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) bajo la dirección de la Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica.

La actividad biológica (viabilidad celular y secreción de ON) fue realizada en el cuarto de cultivo de la facultad de Farmacia de la UAEM en colaboración con el Dr. Antonio Romero Estrada.

La cromatografía de gases acoplada a masas y la extracción mediante líquidos supercríticos fue realizada en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) proyecto 294406 y de infraestructura 254145.





Cuernavaca, Mor., a 29 de abril de 2021

M.C. SILVIA MARQUINA BAHENA
DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER
DRA. MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA
DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS
DR. IVÁN OMAR ROMERO ESTUDILLO

PRESENTE

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** del trabajo de: **TESIS**

Titulado:

“Composición química preliminar y actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto de diclorometano de las hojas de *Bursera grandifolia*”

Que presenta (el) o (la) **C. DIANA MARLEN GALLARDO NIETO**

Del programa educativo de: **INGENIERÍA QUÍMICA**

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA

Se anexa firma electrónica

DICTAMEN

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
PRESENTE

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	M.C. SILVIA MARQUINA BAHENA	
	DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER	
	DRA. MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA	
	DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS	
	DR. IVÁN OMAR ROMERO ESTUDILLO	

El voto del comité es aprobatorio, se anexan firmas electrónicas

VALH/fmg

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

VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ | Fecha:2021-05-03 15:43:41 | Firmante

OvOETdaYi9bO4logEBRozIH1N+O57YAhRrp4rCgeKsPcG0zhYBS6Zko9Da/REz/08jOul1tYWomkMctqmc0Cj5XmWsKihWkCS1aLBSFlrz+UvdRE1nj24bflGPPIV2433IH2/awERuheLbKvY9Cp0XB1gW/zTV1hm15qGllLPuumtCtWJNJocmNyRG8iilkhEeOaFg+VYeTp0jgQkQd9JqVZyYG8mknPfnluMozGj2HK49v6ZAGPDaFHUCO9ZNs2foLrZOkaGB2e37tkgQuGCZHkSLV1fH+5eSoids1LXIJuAv/N7FC9u8cWg1sWgxJCx3wdvzjgZF9UqIQY236A==

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



leS2MB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/w34s0wJd0YiPgcBjqQ8MuvKVdNcfM8vr>



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

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2021-05-03 21:26:13 | Firmante

UNykwYXoyZppzNYqUG+VFndH8elZcFCCCWy/Rq41msNt3KNU3vI0jhu6vw8QZtPjPVRkB5Aa5ir3KhKJgliWW7ST1VDluWJcnIHEfYrCjpb12vCIOGNXGvKSK1VVpn37M3YB//qNC+Fvh6MQVgvdZicBkV4DkVnF8jGRgO5mPjXkK2hHHvUSDAzHAke7Ock9myzzfS+jG+OHv9e0LdsadGWrb6aYaxKigIF9UjWefFPDaTTy5R+oI5MLHVS6BWFo9E3b6T+hvBZp6B03A0j7R3gAXDBKMCPnSsmFXQStSKhUGFi2skykNjqH474pXQKz6Z+LgrhzedldygSy9InOQ==

MARIANA SANCHEZ RAMOS | Fecha:2021-05-03 21:29:41 | Firmante

nT4a1/IOY+7Mje8qjVxmFGYDcbPkSlxacRfZm5sECWJdPioM/9yHuZJId4JFPJq1ysSnFBtBTfzNdOO+zsomy/9M6md2Ugbks30Ir4dv7qi25kazmKIMVrihYwWYIC++eVPEr2Mk512uMpl4ymJBbGzJ/iX7fV63e7ew+EReyo8PtVvk5mpe31+ucGmfcl5PNWD7zpq/+vJJaCPGuAjpAJDjpOx3cDkej0HnLzqnonr5rS7AvSB9NRjRm0zKj8MtxSBovstuWFX2ztjn6CTqisOc3TWOwuw4+seCZirhoXqN3Nw+nm9CQzPODj8uxmk0taNuXnrrBucGpqs74i+Q==

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2021-05-03 23:04:44 | Firmante

enMhJNYHA+dszMpyQLQqJD1Z1+2OLULmJpZq21x+cmkraXj954ksfE0/Gvm13Gc0SQqvBmtkoQncETOE1LMGaiO63EsYq0JTEWDZFGMRNTfQcLN05TWlCUFoek34TKRxudQHvGz7+K8JL0sLjGSxztH75K030/qYLTfJDOJsneWxgJugwyOSWNVsJ+7dUIAKpeYsBlIgi3q0iyZZo6HfR1MSHsJej6aqSA40ZT0Cio/OFSROQNO0ipFzQw1morm70GrGSCKkWJhg3b8EmyOMFtU+xSW9zXVJZaSJ0jDBpC8YU5Hhoj6V2MoYeioty/URaPuNQNO0DMB7UoK+6e4Mw==

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2021-05-04 10:59:47 | Firmante

V00Ek1hqqxaNLKXg7NVy8fQCqTqUT9uzyb4oYHs701fxOK0ZMuRwtPEXM6xX+rjnhAi7Z2zbSw5VXshp7PY7uO8BxtKUzXZCSEPFahqK5nYiR+YA9pT/E5vU1Fn6YLQkrhc0wkIxN8NpmbgxdRFEJQJolu4gezVSD1mBDaEKppDN3n7JTJXojv5oEoz+HDTFouEv/weS3mAu4FKBIQfQsQum+XuUFMGsN6zdfSOMgLL9/KT6/5oy377AxZKf3OBmKe1+QCIZiW2Q9ZoK7Yq0m18wuTr4KqsARMU7zYvNM1RMS2fJ3mlouSFguLXdI6WLVrJOppDNwm1kR+4i1OcqA==

SILVIA MARQUINA BAHENA | Fecha:2021-05-04 11:01:30 | Firmante

S1wweDM/YdhcVNFIRcRvRw7hvO8XPIVAK12ykfHgYq3Msbu5OZnOniEBRDbcv10dqnIAFi85hW9rAx4nmjrILGRQ2SPdhmZFRNT3+p277ODUH4yONcd3oZBPjLNf6dyshaSxtjhFKV5EZVWbgqjVFn/QuKbkideH6fw1E62rsAltPyJ7T XosXwH9GeJTx6j5as6fRo7FO3fheNTKmrBmrbOLTIeol+xdDH7qINbeJ22Eg2fo4CC8orwy19BnpgfIdpSKy2Azz5GoRThe2P9fKjKqJHPWMrWuTBxz1d0XYCKnzmxcxwU3Zqm+J9qSSQp3dW/SuNV5w78Uuq4yngULXvw==



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

GwWYmB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Gn2qc2zaP1D3MMyBTb2i0Esx0lzUD2LM>



Dedicatorias

A mis padres que sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida profesional. Mamá gracias por estar a mi lado en esta etapa, el apoyo moral y entusiasmo que me brindaste para seguir adelante en mis propósitos; papá gracias por el tiempo, por compartir tus experiencias, conocimientos y consejos, por tu amor. Los amo con todo mi corazón y siempre viviré eternamente agradecida de cuanto han hecho por mí.

Dedico esta tesis a cada una de las personas que amo y admiro, las cuales han sido parte fundamental en mi vida, el motor para salir adelante y mi fortaleza para hacer este sueño posible, pero sobre todo doy gracias a Dios por ser mi guía en esta travesía día con día.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, a través de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por permitirme formar parte de tan honorable Institución.

A mis maestros, por su paciencia y todas sus invaluable enseñanzas que me permitieron forjarme como profesional.

A la doctora Mayra Yaneth Antúnez Mojica, por compartir sus conocimientos, por su apoyo técnico y académico, por su comprensión y confianza, que sin su instrucción profesional no habría sido posible este trabajo.

Índice

Índice.....	3
Índice de esquemas.....	5
Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	6
Lista de abreviaturas.....	7
Resumen.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Medicina tradicional.....	2
2.2 Familia Burseraceae en México.....	4
2.3 Antecedentes del género <i>Bursera</i>	6
2.3.1 Distribución del género <i>Bursera</i>	6
2.3.2 Clasificación y química del género <i>Busera</i>	9
2.4 <i>Bursera grandifolia</i>	11
2.4.1 Estudios químico-farmacológicos de <i>Bursera grandifolia</i>	14
2.5 Terpenoides y triterpenos.....	15
2.6 Inflamación.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos.....	23
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	24
6.1. Técnicas cromatográficas.....	24
6.2 Técnicas de elucidación.....	24
6.3 Material vegetal.....	25
6.4 Obtención del extracto de diclorometano de <i>Bursera grandifolia</i>	25
6.5 Fraccionamiento primario.....	25
6.6 Análisis químico de la fracción MGN-01-1.....	26
6.7 Recromatografía de MGN-01-2.....	26
6.8 Recromatografía de MGN-01-4.....	28

6.8.1 Purificación de la fracción Rb mediante extracción de fase sólida (SPE)	28
6.8.2 Purificación de la fracción Rb-2 por HPLC	29
6.9 Recromatografía de MGN-01-5	30
6.10 Evaluación antiinflamatoria <i>in vitro</i> del extracto por inhibición de ON	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1 Análisis CG-EM de la fracción MGN01-01	34
7.2 Análisis de la mezcla de lupeol (14) y α -amirina (19)	36
7.3 Elucidación estructural del lupeol (14)	37
7.3.1 Comparación química de lupeol (14) y su epímero (18)	38
7.4 Elucidación estructural de α -amirina (19)	40
7.5 Elucidación estructura de 1,3-lupandiol (20)	41
7.6 Actividad antiinflamatoria del extracto	43
8. CONCLUSIONES	45
9. REFERENCIAS	46
10. ANEXOS	53
10.1 Espectros	53
10.2 Lista de estructuras	58

Índice de esquemas

Esquema	Nombre	Página
Esquema 1.	Biosíntesis general de terpenoides.	17
Esquema 2.	Síntesis general de ON.	19
Esquema 3.	Diagrama de fraccionamiento del extracto diclorometano de <i>B. grandifolia</i> .	33

Índice de figuras

Figura	Nombre	Página
Figura 1.	Ejemplos de especies vegetales contempladas en monografías oficiales de la FEUM.	3
Figura 2.	Distribución geográfica de la familia Burseraceae en el mundo.	5
Figura 3.	Diversidad conocida de <i>Bursera</i> por estados de la República Mexicana.	6
Figura 4.	Árbol de <i>Bursera grandifolia</i> .	12
Figura 5.	Corteza de <i>B. grandifolia</i> .	13
Figura 6.	Otras partes de <i>B. grandifolia</i> .	13
Figura 7.	Cromatograma obtenido por análisis CG-EM de resina de <i>B. grandifolia</i> .	15
Figura 8.	Proceso de inflamación.	19
Figura 9.	Estructura química de β -sitosterol (17).	27
Figura 10.	Estructura química de 3-epilupeol (18).	27
Figura 11.	Estructura química de lupeol (14).	29
Figura 12.	Estructura química de α -amirina (19).	30
Figura 13.	Estructura química de 1,3-lupandiol (20).	31
Figura 14.	Expansión de cronograma de gases de MGN01-01.	34
Figura 15.	Cromatograma de la mezcla de MGN-17-04 HPLC-DAD C18, λ 210.	36
Figura 16.	Anillo E del lupeol (14), expansiones de H-29 β y H-29 α y expansión H-3.	37
Figura 17.	lupeol (14), 3-epilupeol (18), Contantes de acoplamiento del anillo A de lupeol (14), Contantes de acoplamiento del anillo A del 3-epilupeol (18).	39
Figura 18.	Expansión de ^1H señales correspondientes a los metilos.	40
Figura 19.	A) Anillo A de la α -amirina (19), B) expansión de ^1H de δ 3.19 señal doble de doble.	41
Figura 20.	A) Expansión de ^1H de δ 3.23 y 3.34 ppm correspondientes a H-1 y H-3. B) Anillo A de 1,3-lupandiol (20).	42

Figura 21. Expansión de ^1H RMN de las señales correspondientes a los metilos C-23 a C-28 y C-30.

42

Índice de tablas

Tabla	Nombre	Página
Tabla 1.	Taxonomía de familia Burseraceae.	4
Tabla 2.	Especies de <i>Bursera</i> registradas de los estados de la República Mexicana.	7
Tabla 3.	Taxonomía de la especie <i>Bursera grandifolia</i> .	11
Tabla 4.	Efecto antihelmíntico <i>H. contortu</i> por <i>B. grandifolia</i> .	14
Tabla 5.	Clase de terpenos en la naturaleza.	16
Tabla 6.	Fraccionamiento primario de <i>Bursera grandifolia</i> .	25
Tabla 7.	Condiciones de HPLC para purificación de Rb-2.	29
Tabla 8.	Compuestos detectados por CG-EM de la fracción menos polar MGN01-01.	35
Tabla 9.	Inhibición de ON en Macrófagos RAW 264.7	43

Lista de abreviaturas

Abreviación	Significado
µm	Microgramos
¹³ C	Carbono 13
¹ H	Protón
Å	Ángstrom
a. C.	Antes de Cristo
acetil CoA	Acetil coenzima A
AcOEt	Acetato de etilo
Ags.	Aguascalientes
AINEs	Agentes Antiinflamatorios No Esteroideos
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. aptera</i>	<i>Bursera aptera</i>
<i>B. arborea</i>	<i>Bursera arborea</i>
<i>B. ariensis</i>	<i>Bursera ariensis</i>
<i>B. asplenifolia</i>	<i>Bursera asplenifolia</i>
<i>B. attenuata</i>	<i>Bursera attenuata</i>
<i>B. bicolor</i>	<i>Bursera bicolor</i>
<i>B. bipinnata</i>	<i>Bursera bipinnata</i>
<i>B. copallifera</i>	<i>Bursera copallifera</i>
<i>B. cuneata</i>	<i>Bursera cuneata</i>
<i>B. discolor</i>	<i>Bursera discolor</i>
<i>B. fagaroides</i>	<i>Bursera fagaroides</i>
<i>B. fagaroides</i>	<i>Bursera fagaroides</i>
<i>B. grandifolia</i>	<i>Bursera grandifolia</i>
<i>B. hildebrandtii</i>	<i>Bursera hildebrandtii</i>
<i>B. instabilis</i>	<i>Bursera instabilis</i>
<i>B. lancifolia</i>	<i>Bursera lancifolia</i>
<i>B. longipes</i>	<i>Bursera longipes</i>
<i>B. microphylla</i>	<i>Bursera microphylla</i>
<i>B. morelensis</i>	<i>Bursera morelensis</i>
<i>B. schlechtendalii</i>	<i>Bursera schlechtendalii</i>
<i>B. simaruba</i>	<i>Bursera simaruba</i>
<i>B. trifoliolata</i>	<i>Bursera trifoliolata</i>
<i>B. trimera</i>	<i>Bursera trimera</i>
B.C.	Baja California
B.C.S.	Baja California Sur
<i>C. monstrosa</i>	<i>Commiphora monstrosa</i>
<i>C. simplicifolia</i>	<i>Commiphora simplicifolia</i>

<i>C. virgata</i>	<i>Commiphora virgata</i>
Camp.	Campeche
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDMX	Ciudad de México
CG-EM	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas
Chih.	Chihuahua
Chis.	Chiapas
cm	Centímetros
Coah.	Coahuila
Col.	Colima
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COS7	Línea celular de control
COX-2	Ciclooxigenasa 2
d	Doblete
dd	Doble de Dobles
Dgo.	Durango
et al.,	Y otros
Etc.	Etcétera
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FM	Fórmula Molecular
g	Gramos
g/mol	Gramos por mol
Gro.	Guerrero
Gto.	Guanajuato
HCT15	Línea celular de colon humano
Hex	Hexano
Hgo.	Hidalgo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
hr	Horas
HUMO	Herbario de la Universidad de Morelos
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Jal.	Jalisco
K562	Línea celular de leucemia mielógena
kg	Kilogramos
M ⁺	Masa carga
m	Metros
m	Multiplete
MCF7	Línea celular de carcinoma de mama

MeOH	Metanol
Méx.	México
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
Mich.	Michoacán
mL	Mililitros
Mor.	Morelos
MTS	Ensayo de viabilidad celular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N.L.	Nuevo León
Nay.	Nayarit
nm	Nanómetros
Oax.	Oaxaca
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PC3	Línea celular de carcinoma prostático
p.f.	Punto de fusión
PM	Peso molecular
Pue.	Puebla
Q.R.	Quintana Roo
Qro.	Querétaro
R.f.	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<i>S. Mombin L</i>	<i>Spondias Mombin</i>
S.L.P.	San Luis Potosí
SPE	Extracción de fase sólida
Sin.	Sinaloa
SKLU1	Línea celular de carcinoma de pulmón
Son.	Sonora
Tab.	Tabasco
Tamps.	Tamaulipas
Tlax.	Tlaxcala
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tiempo de retención
U251	Línea celular de glioblastoma
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UV	Ultravioleta
Ver.	Veracruz
Yuc.	Yucatán
Zac.	Zacatecas
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda

Resumen

Bursera grandifolia (*B. grandifolia*) es una especie vegetal con corteza exfoliante considerada como cuajote, su distribución abarca gran parte de la costa del pacífico de México y es utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar padecimientos respiratorios, como bronquitis, influenza, tosferina y en infecciones de pulmón. Sin embargo, los estudios fitoquímicos y farmacológicos relacionados con su actividad antiinflamatoria son escasos.

Señalado lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue realizar un estudio fitoquímico y evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto de diclorometano obtenido de las hojas de *B. grandifolia* colectadas en el estado de Morelos cuyo rendimiento fue de 1.36%.

El extracto de diclorometano se fraccionó haciendo uso de la técnica de cromatografía en columna (CC) utilizando disolventes orgánicos de polaridad ascendente, el trabajo cromatográfico permitió obtener 6 grupos de fracciones, de acuerdo al monitoreo por cromatografía en capa fina se decidió continuar el proceso de purificación con las primeras 5 fracciones. La fracción menos polar se analizó por cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) observando 16 picos con tiempos de retención (Tr) en un rango de 15 a 38 min. De acuerdo con la biblioteca del equipo se identificaron cinco ácidos grasos, un sesquiterpeno y vitamina E, cuatro triterpenos pentacíclicos: lupeol (**14**), lupenona (**13**), β -amirina (**12**), β -amirinona (**11**) como productos principales. De las fracciones posteriores se identificó el esteroide β -sitosterol (**17**); los triterpenos de esqueleto lupano: 3-epilupeol (**18**), lupeol (**14**) y 1,3-lupandiol (**20**); y uno de tipo ursano, α -amirina (**19**), estos fueron analizados por ¹H-RMN.

Finalmente, la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto de diclorometano se llevó a cabo midiendo la inhibición de óxido nítrico en macrófagos murinos RAW 264.7, teniendo como resultado una baja CI_{50} de $15.26 \pm 0.88 \mu\text{g/mL}$.

Con base a lo anterior, el análisis fitoquímico y la evaluación antiinflamatoria permitió establecer, por un lado, el contenido químico presente en las hojas de *B. grandifolia* y establecer la participación de sus componentes principales en el efecto biológico mostrado por el extracto.

1. INTRODUCCIÓN

La medicina natural ha sido utilizada por la humanidad desde sus orígenes y constituye una fuente potencial para el estudio de compuestos naturales con propiedades antiinflamatorias resultante de la presencia de flavonoides y monoterpenos, el empleo de estos productos naturales, así como sus derivados ha tenido gran impacto en la vida humana ya que estos son usados como fármacos en enfermedades y padecimiento relacionados con la inflamación.

Por otra parte, México siendo el quinto país con mayor biodiversidad del mundo (Villaseñor et al., 2014), alberga alrededor de 22, 259 especies vegetales, sin embargo, aún existe gran ignorancia sobre el desarrollo, aplicación y distribución de estas especies.

El género *Bursera* forma parte de las plantas medicinales de uso popular en México, su distribución se sitúa desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica, pero abunda notablemente en la vertiente del pacífico de México, en donde se pueden encontrar alrededor de 84 especies, de las cuales 80 son endémicas (Becerra, J. 2005), sus cualidades biológicas se atribuyen a la variedad de metabolitos secundarios de tipo diterpenos, triterpenos, esteroides y lignanos principalmente (Canales et al., 2005; Carretero et al., 2008; Serrano et al., 2012; Carrera et al., 2014; Messina et al., 2015). Específicamente el estado de Morelos cuenta con 17 de estas especies, entre las que destaca la especie *B. grandifolia*. Algunos estudios hacen alusión a que *B. grandifolia* es utilizada de manera medicinal para problemas respiratorios, como bronquitis, influenza, tosferina y en infecciones de pulmón, además de ser empleada en la elaboración de incienso, barniz, ungüentos y tintas litográficas (Bullock, A. 1936; Martínez, M. 1959; Monroy et al., 2000).

Este trabajo de investigación está orientado al estudio químico de la especie *B. grandifolia* cuyos resultados contribuirán al conocimiento de su contenido fitoquímico, así como la evaluación de la actividad antiinflamatoria con la finalidad de validar el uso popular que se le atribuye.

2. ANTECEDENTES

2.1 Medicina tradicional

La medicina tradicional es parte del acervo cultural de la humanidad desde épocas prehispánicas, es la forma más antigua de estudios médicos que ha conocido el hombre. Al respecto, la medicina natural, también es conocida como medicina botánica, fitoterapia o medicina herbaria basada en el uso de plantas medicinales y es utilizada por el hombre para tratar diversas enfermedades. Una planta medicinal tiene la capacidad de prevenir y/o curar enfermedades de carácter humano a partir de metabolitos secundarios, conocidos como principios activos, que son característicos de cada especie, los cuales le brindan propiedades analgésicas, antiinflamatorias, entre otras (Cabrera, J. 2014).

La historia de la medicina herbolaria tiene sus orígenes desde el inicio de la historia del ser humano sobre la tierra, al tener contacto con la naturaleza fue desarrollando ciertas costumbres y adquiriendo experiencias mediante ingesta accidental o voluntaria de algunas especies de vegetales y plantas. Gran parte de la historia de la medicina tradicional se engloba en algunos textos antiguos, en Pen Taso (2.800 a. C.) que cita plantas conocidas como el alcanfor y el ginseng (Cruz, S. 2007).

En cuanto a la reglamentación la Organización Mundial de la Salud (OMS) no sólo reconoce la importancia de las terapias tradicionales y su alcance en el ámbito mundial, sino que incluso ha creado una oficina de medicinas tradicionales, destacando que siguen poco normalizadas. En México como parte de la regulación del uso de fármacos y herbolaria mexicana se emplea la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Su origen se remonta a la época prehispánica donde a algunos habitantes se les dio la tarea de organizar las características y usos de sus prácticas curativas, en 1821 se publica el Formulario Magistral y Memorial Farmacéutico de Garssicourt, considerado como el antecedente directo de una farmacopea nacional, en consecuencia en 1846 se crea la primera Farmacopea Mexicana redactada por la Academia Farmacéutica de la capital de la República, la cual pretendía armonizar la práctica farmacéutica en todo el territorio aunque su uso de no fue obligatorio en todo el territorio nacional, debido a que la legislación sanitaria era prácticamente inexistente (Farmacopea Mexicana, 2020; Schifter et al., 2009).

Por su parte, la Farmacopea Mexicana en relación de productos de origen vegetal rebasan los 450, de las especies compendiadas abundan los sudoríficos (como la dulcamara), los sedantes o narcóticos, (como el acónito o el estramonio), los tónicos fuertes (como el ahuehuate y la almáciga), los eméticos (como el azafrancillo), laxantes, estimulantes, diuréticos y una gran variedad de hierbas aromáticas. Así en 1974 la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, cambia su nombre por Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Por otro lado las monografías oficiales de la FEUM (2008) comprende especies vegetales como: Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.), Canela [*Cinnamomum cassia* (Nees)], Boldo hoja (*Peamus boldus* Molina), Ajenjo hierba (*Artemisia absinthium* L.), Jamaica flor (*Hibiscus sabdariffa* L.), Manzanilla flor (*Matricaria Recutita* L.), Anís de estrella semilla (*Illicum verum* Hokker), Hierbabuena hojas (*Mentha x piperita* L.), Hinojo amargo fruto (*Foeniculum vulgare* Mill.), (figura 1) entre otras (Schifter et al., 2009), además existen otras especies vegetales que no se encuentran contempladas en esta edición tales como el peyote (*Lophophora williamsii*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringes*), tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* Benth) orégano (*Lippia graveolens*) entre otras.



Figura 1. Algunas especies vegetales contempladas en monografías oficiales de la FEUM (2008).

Cabe señalar que, en México, las plantas medicinales contribuyen a uno de los principales recursos terapéuticos suburbanos donde los servicios de atención médica son escasos (García et al., 2012). Así mismo el territorio nacional existe una gran diversidad de especies vegetales de origen tropical de las cuales 5,000 de ellas son usadas como medicinales y que dada la diversidad vegetal podrían llegar a ser hasta 20,000 (Mittermeier et al., 2011).

Por otra parte, el estado de Morelos se ha caracterizado por tener gran riqueza y diversidad vegetal con abundante flora medicinal tanto nativa como introducida debido principalmente a sus climas y abundantes mantos acuíferos, a pesar de solo ocupar el 0.2% de la superficie del territorio, es notable por los aspectos botánicos relacionado a la medicina (Osuna et al., 2005), Monroy et al., 2004 realizaron un análisis de plantas útiles en el Estado de Morelos, recopilando información de los años 1979 a 2001, donde se examinó la riqueza y frecuencia en el uso de diversas familias, géneros y especies. En consecuencia, se encontraron 608 especies pertenecientes a 400 géneros y 128 familias, destacando por dominancia cultural las familias Fabaceae, Asteraceae y Burseraceae y los géneros Ficus, Ipomoea y Citrus, así mismo, las especies más dominantes culturalmente *Persea americana* Mill. y *Psidium guajava* L.

2.2 Familia Burseraceae en México

La familia Burseraceae tiene 18 géneros y al menos de 12,000 especies, principalmente plantas productoras de resinas, estas especies aromáticas forman parte de diferentes generos según su taxonomía (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía de familia Burseraceae.

Clasificación taxonomica	Reino Vegetal
	Division Angiospermae
	Clase Magnoliopsida
	Orden Sapindales
	Familia Burseraceae

Dentro de los 18 géneros que comprende la familia Burseraceae, los géneros más diversos y prolíficos son: *Bursera*, *Cannarium*, *Commiphora* y *Protium*; y los endémicos del continente americano son: *Bursera*, *Crepidospermum*, *Hemicrepidospermum*, *Paraprotium*, *Tetragastris* y *Trattinickia*. Trazando la distribución geográfica (figura 2), se han encontrado especies en las regiones tropicales del norte y sur de África y en Malasia (Medina, R. 2008; Ruiz et al., 2000). También, se encuentran distribuidas en el continente americano, extendiéndose desde el suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos (Rzedowski, J. 2004).

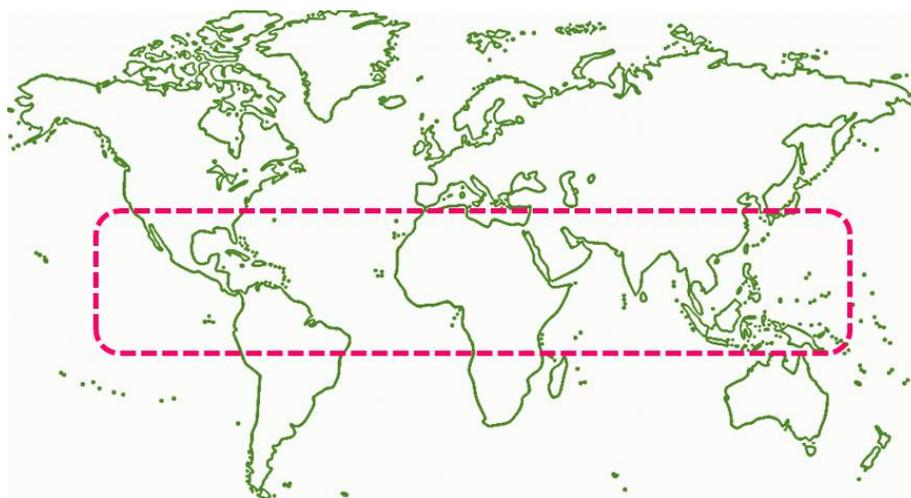


Figura 2. Distribución geográfica de la familia Burseraceae en el mundo.

Por otro lado, la familia Burseraceae se caracteriza por estar conformada de árboles y arbustos provistos de oleorresinas, constantemente canales resiníferos y balsamíferos en la corteza y flores pequeñas (Biodiversidad mexicana, 2020; Cuatrecasas, J. 1957; Ruiz et al., 2000).

Muchas especies de la familia Burseraceae son conocidas e importantes por producir resinas, las cuales son ricas en aceites esenciales, usadas en ceremonias religiosas, en cosmetología, en perfumería, así como para objetivos artísticos y en la medicina popular (Suarez et al., 1982). Estas oleorresinas son sustancias compuestas de terpenoides, algunos componentes volátiles son frecuentemente diterpenos y triterpenos además, de compuestos fenólicos tales como flavonoides, cumarinas y varios lignanos (Khalid, S. 1983; Siani et al., 1999; De la Cruz et al., 2005).

2.3 Antecedentes del género *Bursera*

2.3.1 Distribución del género *Bursera*

El género *Bursera* tiene poco más de 100 especies, la mayoría de estas plantas son árboles que miden entre los 4-12 m y arbustos de entre 1-3 m de altura, su copa generalmente es más ancha que alta (Biodiversidad Mexicana, 2020; Rzedowski et al., 1992). Está distribuido desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica, pero concentrando notablemente su diversidad en la vertiente del pacífico de México, específicamente en las selvas caducifolias, en algunos estados como Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, como se muestra en la Figura 3.

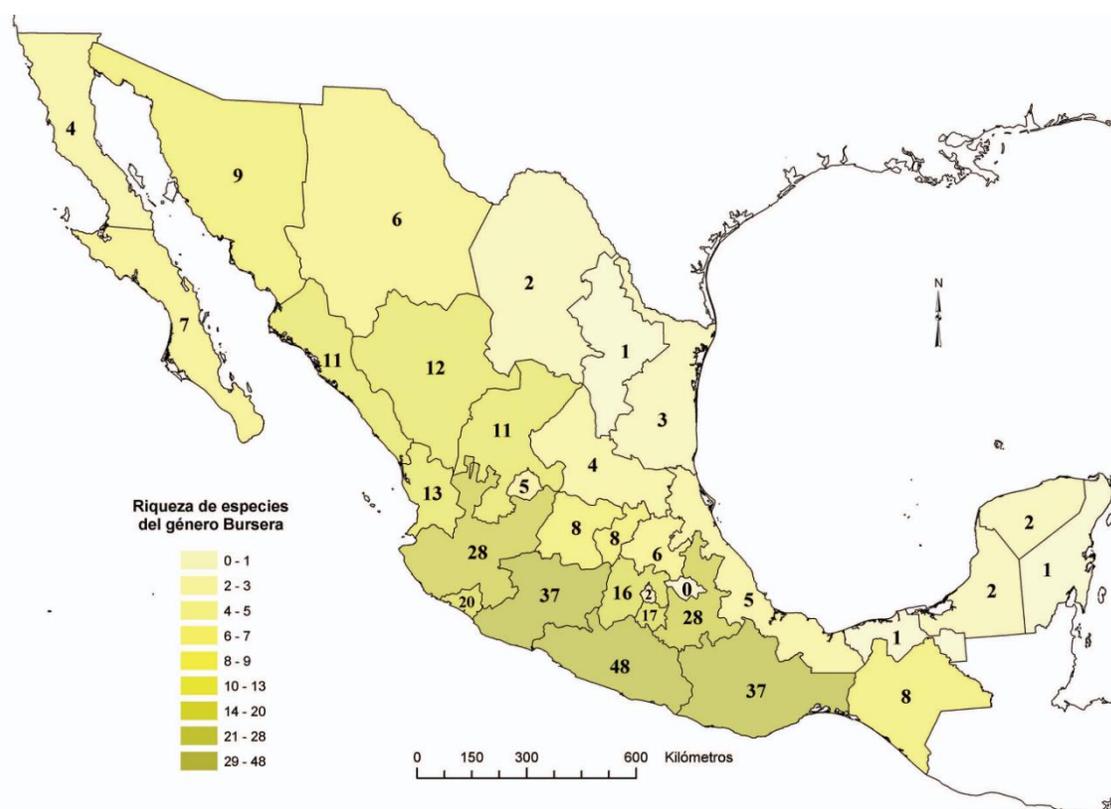


Figura 3. Diversidad conocida de *Bursera* por estados de la República Mexicana. (Tomado de Rzedowski et al., 2005).

De esta manera el estado de Guerrero cuenta con 48 especies siendo el territorio más rico en términos de la variedad conocida de componentes de *Bursera*; le siguen en importancia Michoacán, Oaxaca, Jalisco y Puebla con 38, 38, 28 y 28 especies respectivamente (Rzedowski et al., 2005).

En la Tabla 2 se enlistan las especies que se encuentran en cada estado del país. El estado de Morelos cuenta con 17 especies del género *Bursera* (Rzendowski et al., 2005), entre los cuales destaca *B. grandifolia* por sus propiedades etnomedicinas, su amplia distribución así como su limitado desarrollo y aplicación en el área tecnológica.

Tabla 2. Especies de *Bursera* registradas en los estados de la República Mexicana (tomada de Rzendowski et al., 2005).

Estado	Número	Especies encontradas
Ags.	5	<i>T. acuminata</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. penicillata</i> .
B.C.	4	<i>B. epinnata</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. hindsiana</i> , <i>B. microphylla</i> .
B.C.S.	7	<i>B. cerasifolia</i> , <i>B. epinnata</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. filicifolia</i> , <i>B. hindsiana</i> , <i>B. laxiflora</i> , <i>B. microphylla</i> .
Camp.	2	<i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Chis.	8	<i>B. ariensis</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. graveolens</i> , <i>B. heteresthes</i> , <i>B. longicuspis</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Chih.	6	<i>B. fagaroides</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. laxiflora</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. stenophylla</i> .
Coah.	2	<i>B. fagaroides</i> , <i>B. schlechtendalii</i> .
Col.	20	<i>T. acuminata</i> , <i>B. arborea</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. citronella</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. denticulata</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. epinnata</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. heteresthes</i> , <i>B. instabilis</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. macvaughiana</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. sarcopoda</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
CDMX	2	<i>B. cuneata</i> , <i>B. fagaroides</i> .
Dgo.	12	<i>B. arborea</i> , <i>B. attenuata</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. stenophylla</i> .
Gto.	8	<i>B. bipinnata</i> , <i>B. cuneata</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. galeottiana</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. simaruba</i> .
Gro.	48	<i>T. acuminata</i> , <i>B. aptera</i> , <i>B. arborea</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. bicolor</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. bolivarii</i> , <i>B. bonetii</i> , <i>B. chemapodicta</i> , <i>B. citronella</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. coyucensis</i> , <i>B. crenata</i> , <i>B. cuneata</i> , <i>B. denticulata</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. fragrantissima</i> , <i>B. galeottiana</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. heteresthes</i> , <i>B. hintonii</i> , <i>B. infernialis</i> , <i>B. instabilis</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. krusei</i> , <i>B. lancifolia</i> , <i>B. linanoe</i> , <i>B. longipes</i> , <i>B. martae</i> , <i>B. mirandae</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. paradoxa</i> , <i>B. rzedowskii</i> , <i>B. sarcopoda</i> , <i>B. sarukhanii</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. submoniliformis</i> , <i>B. suntui</i> , <i>B. tecomaca</i> , <i>B. trifoliolata</i> , <i>B. trimera</i> , <i>B. vejarvazquezii</i> , <i>B. velutina</i> , <i>B. xochipalensis</i> .
Jal.	28	<i>T. acuminata</i> , <i>B. arborea</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. citronella</i> , <i>B. confusa</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. crenata</i> , <i>B. denticulata</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. heteresthes</i> , <i>B. infernialis</i> , <i>B. instabilis</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. macvaughiana</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. palaciosii</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. ribana</i> , <i>B. sarcopoda</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. subtrifoliata</i> , <i>B. trimera</i> , <i>B. vazquezyanesii</i> .
Méx.	16	<i>T. acuminata</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. bicolor</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. cuneata</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. grandifolia</i> ,

		<i>B. heteresthes</i> , <i>B. hintonii</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. trifoliolata</i> , <i>B. trimera</i> , <i>B. velutina</i> .
Mich.	37	<i>T. acuminata</i> , <i>B. arborea</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. bicolor</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. citronella</i> , <i>B. confusa</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. coyucensis</i> , <i>B. crenata</i> , <i>B. cuneata</i> , <i>B. denticulata</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. fragrantissima</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. heteresthes</i> , <i>B. hintonii</i> , <i>B. infernidialis</i> , <i>B. instabilis</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. occulta</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. paradoxa</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. ribana</i> , <i>B. sarcopoda</i> , <i>B. sarukhanii</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. staphyleoides</i> , <i>B. submoniliformis</i> , <i>B. trifoliolata</i> , <i>B. trimera</i> , <i>B. velutina</i> .
Mor.	17	<i>B. aptera</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. bicolor</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. cuneata</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. lancifolia</i> , <i>B. linanoe</i> , <i>B. longipes</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. submoniliformis</i> , <i>B. vejarvazquezii</i> .
Nay.	13	<i>T. acuminata</i> , <i>B. arborea</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. attenuata</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. simaruba</i> .
N.L.	1	<i>B. fagaroides</i> .
Oax.	37	<i>B. altijuga</i> , <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. aspleniifolia</i> , <i>B. bicolor</i> , <i>B. biflora</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. bolivarii</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. esparzae</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. galeottiana</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. graveolens</i> , <i>B. heliae</i> , <i>B. heteresthes</i> , <i>B. hintonii</i> , <i>B. instabilis</i> , <i>B. isthmica</i> , <i>B. krusei</i> , <i>B. lancifolia</i> , <i>B. laurihuertae</i> , <i>B. linanoe</i> , <i>B. longipes</i> , <i>B. mirandae</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. pontiveteris</i> , <i>B. sarcopoda</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. submoniliformis</i> , <i>B. vejarvazquezii</i> , <i>B. xochipalensis</i> .
Hgo.	6	<i>B. cuneata</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. medranoana</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Pue.	28	<i>B. altijuga</i> , <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> , <i>B. ariensis</i> , <i>B. aspleniifolia</i> , <i>B. bicolor</i> , <i>B. biflora</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. bolivarii</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. cuneata</i> , <i>B. discolor</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. galeottiana</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. lancifolia</i> , <i>B. linanoe</i> , <i>B. longipes</i> , <i>B. mirandae</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. pontiveteris</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. submoniliformis</i> , <i>B. vejarvazquezii</i> , <i>B. xochipalensis</i> .
Qro.	8	<i>B. cuneata</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. galeottiana</i> , <i>B. lancifolia</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Q.R.	1	<i>B. simaruba</i> .
S.L.P.	4	<i>B. fagaroides</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Sin.	11	<i>B. arborea</i> , <i>B. attenuata</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. laxiflora</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. stenophylla</i> .
Son.	9	<i>B. fagaroides</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. hindsiana</i> , <i>B. laxiflora</i> , <i>B. microphylla</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. simaruba</i> , <i>B. stenophylla</i> .
Tab.	1	<i>B. simaruba</i> .
Tamps.	3	<i>B. fagaroides</i> , <i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Tlax.	0	-----
Ver.	5	<i>B. bipinnata</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. graveolens</i> , <i>B. simaruba</i> .
Yuc.	2	<i>B. schlechtendalii</i> , <i>B. simaruba</i> .
Zac.	11	<i>T. acuminata</i> , <i>B. bipinnata</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. fagaroides</i> , <i>B. grandifolia</i> , <i>B. kerberi</i> , <i>B. multifolia</i> , <i>B. multijuga</i> , <i>B. palmeri</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. schlechtendalii</i> .

2.3.2 Clasificación y química del género *Bursera*

El género *Bursera* ha sido clasificado de acuerdo con las características de su corteza en dos grupos naturales o secciones descritos a continuación y detallados en el en el listado Especies de *Bursera* relación taxonómica (página siguiente) (Becerra et al., 1999; McVaugh et al., 1965):

1. Subgénero *Elaphrium* (previamente conocido como *Bullockia*), conocidos como capulillo, copal, copalillo; donde que incluye especies con corteza lisa, no exfoliante, frutos bivalvados, ovario bilocular, flores tetrámeras o pentámeras y hojas muy aromáticas, (la corteza no pelada). En esta sección, hay copales reconocidos, tales como: *B. copallifera* y *B. glabrifolia*, siendo este último, el grupo de distribución más amplia dentro de *Bursera* (Antúnez, M. 2012; Biodiversidad mexicana, 2020).
2. Subgénero *Bursera*, conocidos como mulatos, cuajotes o papelillos; presentan corteza exfoliante en hojas como de papel (corteza pelada) color rojo, frutos trivalvados, ovario trilocular, flores trímeras y pentámeras, hojas poco aromáticas, troncos coloridos (Rzedowski et al., 1979, Antúnez, M. 2012, Rzedowski et al., 2005).

A continuación, se describen las especies de *Bursera* en relación taxonómica:

I. Burseraceae

a. *Bursera*

i. Sección *Elaphrium (Bullockia) (Copales)*

1. Copales con grupos cubiertos por pseudoaril
 - a. *B. asplenifolia*
 - b. *B. bicolor*
 - c. *B. bipinnata*
 - d. *B. copallifera*
 - e. *B. cuneata*
2. Commiphora
 - a. *C. monstrosa*
 - b. *C. simplicifolia*
 - c. *C. virgata*
3. Boswellia
 - a. *B. hildebrandtii*
4. Terebinthus
 - a. *T. acuminata*
5. Anacardiaceae
 - a. Spondias
 - i. *S. Mombin*

ii. Sección *Bursera (Cuajjotes)*

1. Grupo Mulatos
 - a. *B. arborea*
 - b. *B. attenuata*
 - c. *B. grandifolia*
 - d. *B. longipes*
 - e. *B. instabilis*
 - f. *B. simaruba*
2. Grupo Cuajjotes rojos
 - a. *B. lancifolia*
 - b. *B. microphylla*
 - c. *B. morelensis*
 - d. *B. schlechtendalii*
 - e. *B. trifoliolata*
 - f. *B. trimera*
3. Grupo Cuajjotes amarillos
 - a. *B. aptera*
 - b. *B. ariensis*
 - c. *B. discolor*
 - d. *B. fagaroides*
 - e. *B. fagaroides*

En cuanto a la química del género *Bursera*, a pesar de ser taxonómicamente poco estudiado tiene características bien definidas entre las que se destaca su particular aroma al estrujarse, las notas pinaceas que despiden las hojas características de los terpenos: α -pineno, β -felandreno, limoneno, careno (Badui, S. 2006). Otro rasgo de la especie *Bursera*, son productoras de aceites esenciales del grupo de los terpenos, que a menudo proporcionan a las plantas intensos y variados aromas, tales aromas permiten clasificar claramente entre si las diversas especies que conviven en una determinada localidad (Rzedowski, J. 2004). Además, debido a la condición resinosa que poseen algunas de sus especies tienen gran relevancia en la medicina tradicional mexicana y en sus múltiples usos domésticos, es distinguida debido a sus cualidades aromáticas y a su aplicación etnomédica contra diarrea, fiebre, gingivitis, resfriado y sarampión, así mismo, es usada para curaciones y heridas de tipo externo como cicatrizante, así como para enfermedades respiratorias, de manera que estas especies se caracterizan por biosintetizar principalmente metabolitos secundarios de tipo flavonoides, lignanos y terpenos, por esta razón muchas especies del género *Bursera* han sido objeto de estudio mostrando tener notable actividad biológica como antimicrobiana, antiinflamatoria, antibacterial y citotóxicas (Rojas, A. 2012, Antúnez, M. 2012).

2.4 *Bursera grandifolia*

Bursera grandifolia (Schltdl.) Engl., es un árbol cuyo nombre común, cuajote blanco, traducido del *náhuatl* como “chicopun”, también es conocido como “palo mulato” y “té azteca”, debido a que es la especie de *Bursera* con las hojas más grandes igualmente es conocida como “papelillo hojas grandes”. Su clasificación taxonómica se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Taxonomía de la especie *Bursera grandifolia*.

Clasificación taxonomica	Reino: Plantae
	Filo: Tracheophyta
	Subfilo: Angiospermae
	Clase: Magnoliopsida
	Orden: Sapindales
	Familia: Burseraceae
	Género: <i>Bursera</i>
	Especie: <i>Bursera grandifolia</i>

Este cuajote es utilizado etnomédicamente para problemas respiratorios, como bronquitis, influenza, tosferina y en infecciones de pulmón. Con respecto a su importancia económica, la especie *B. grandifolia* produce una resina que es utilizada en la elaboración de incienso, barniz, ungüentos y tintas litográficas (Bullock, A. 1936; Martínez, M. 1959; Monroy et al., 2000).

Es una especie que se encuentra distribuida geográficamente desde el noreste de México hasta la costa de Guerrero, más específicamente en los estados de Chihuahua, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Sinaloa, Sonora y Zacatecas, así como en las cuencas del Santiago (Rzendowski et al., 2005).

En México y Centroamérica este conjunto está integrado por árboles (Figura 4) poco resinosos y aromáticos, con troncos de corteza exfoliante roja o rojiza (ocasiones café o anaranjada) según el transcurso de la temporada la corteza sufre una exfoliación inicialmente con una coloración rojiza (Figura 5, a), dando paso al inicio de la caída de la corteza (Figura 5, b), seguida del desprendimiento total de la misma, dejando ver la coloración oscura (Figura 5, c).

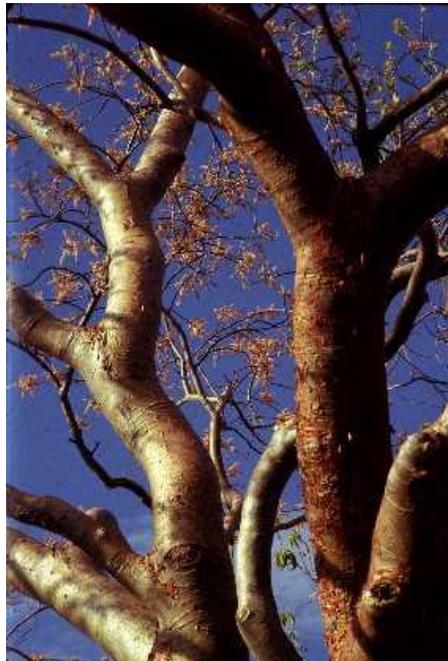


Figura 4. Árbol de *Bursera grandifolia*.

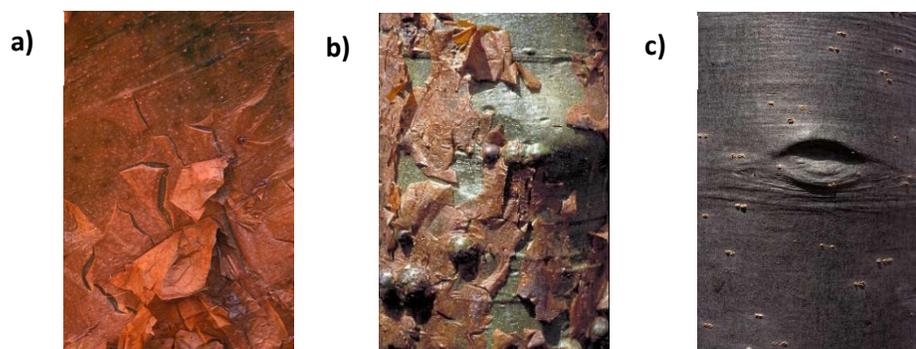


Figura 5. Corteza de *B. grandifolia* a) Al comenzar a pelarse, b) A mitad de su cascara y c) Después del pelado.

Así mismo, *B. grandifolia* son árboles de entre 5 a 7 m de altura; ramas rojizas; con hojas de magnitud de 4 a 8.5 y 3 a 5.8 cm, *B. grandifolia* se ubican entre las especies de *Bursera* con hojas más grandes (Figura 6, a), cuando normalmente estas no rebasan los 2.5 cm en otros ejemplares del género, además tienen flores blancas y muy pequeñas dispuestas en racimos (Figura 6, b); frutos negros cuando maduros, de 9 mm de largo; con 1 a 2 semillas (Rzedowski, J. 2004; Rzedowski et al., 2007).

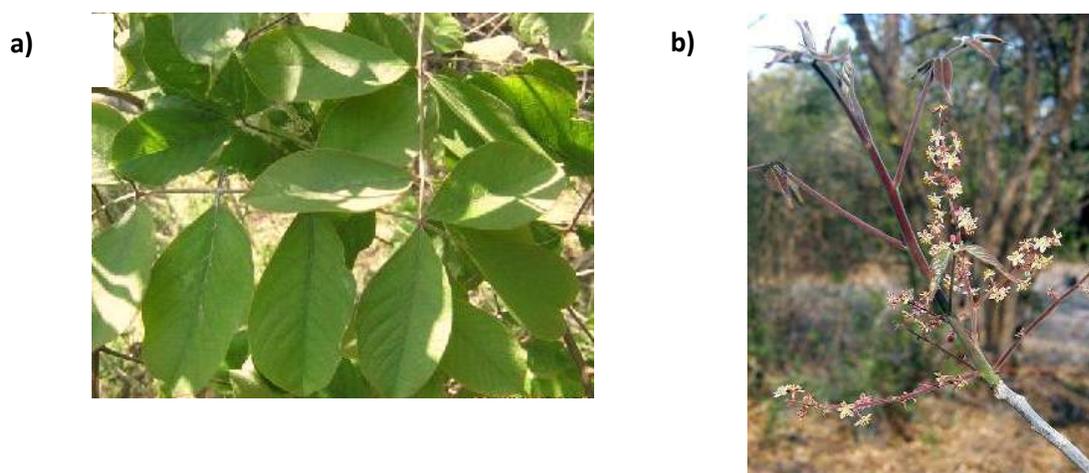


Figura 6. a) Hojas y b) Flores de la especie *B. grandifolia*.

2.4.1 Estudios químico-farmacológicos de *Bursera grandifolia*

Hasta el momento sólo existen cuatro reportes para *B. grandifolia*. Primero en 2008 López U. y colaboradores, realizaron un estudio *in vitro* antihelmíntico contra *Haemonchus contortus* de veinte especies de extractos de plantas medicinales colectadas en el estado de Morelos. Entre esas especies de plantas se evaluó *B. grandifolia*. A partir de tallos y hojas se obtuvieron 7 extractos siguiendo un orden de menor a mayor polaridad de disolventes: *n*-hexano, acetona, etanol y metanol. Particularmente para *B. grandifolia* las evaluaciones se llevaron a cabo a 24, 48 y 72 hr (Tabla 4). Los resultados mostraron una inhibición entre 2-87 %. La mortalidad más alta se observó con el extracto metanólico de los tallos de *B. grandifolia*, observándose un 87.33 % de inhibición contra *H. contortus* a las 72 hr.

Tabla 4. Efecto antihelmíntico *H. contortus* por *B. grandifolia*.

Parte <i>B. grandifolia</i>	Disolvente	Eficiencia (%)		
		24 h	48 h	72 h
Hojas	Hexano	20.67	8	41
Hojas	Acetona	18	3	14
Hojas	Metanol	12.33	0	48
Tallos	Hexano	7	4.33	3
Tallos	Etanol	9.33	0	76.33
Tallos	Metanol	2.66	0	87.33
Tallos	Acetona	1.66	4.33	1

Posteriormente Velázquez F. y colaboradores en el año 2009, estudiaron el extracto de cloroformo de las hojas de *B. grandifolia*, colectada en el estado de Jalisco, lograron aislar al metabolito fenacetina, un acetoaminofenol caracterizado por RMN.

Después en 2014 por Gómez L. y colaboradores estudiaron a composición molecular e identificación triterpenica de ocho tipos de resinas del género *Bursera* entre ellas la resina de la especie *B. grandifolia* empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-EM). En el cromatograma de la resina *B. grandifolia* (Figura 7) se observa: 3-epi- β -amirina (I), 3-epi- α -amirina (II), 3-epi-lupeol (III), β -amirinona (IV) y α -amirinona (VI) además, otros compuestos presentes (Figura 7).

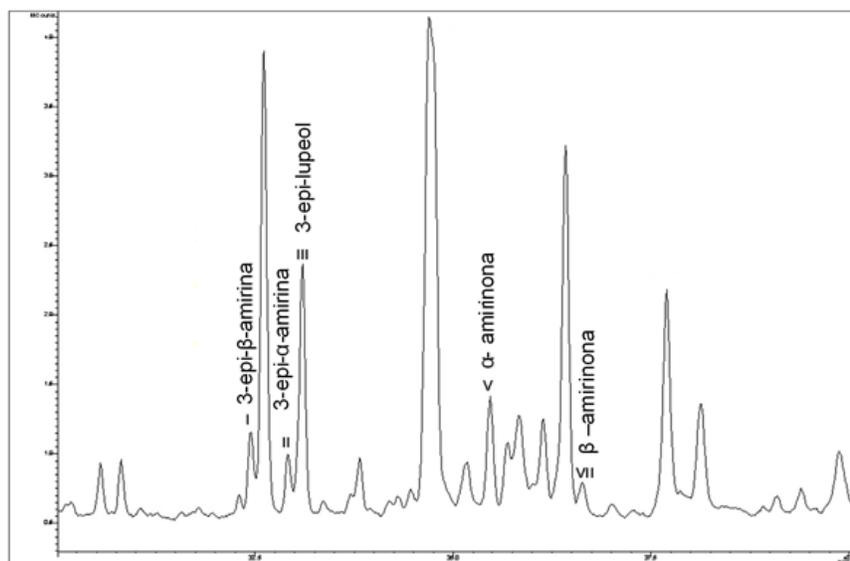


Figura 7. Cromatograma obtenido por análisis CG-EM de resina de *B. grandifolia*.

El último y más reciente estudio, se publicó en marzo de 2020 por Sánchez M. y colaboradores, de manera general identificaron triterpenos de tipo amirina y lupeol así como lignanos. Por otro lado, evaluó la actividad citotóxica el extracto de diclorometano de la corteza de *B. grandifolia* sobre siete líneas celulares de carcinoma con los siguientes resultados de porcentaje de inhibición: U251 (glioblastoma) con 80 %, PC3 (próstata) con 73 %, K562 (leucemia mielógena) con 75 %, HCT15 (colorrectal) con 79 %, MCF7 (mama) con 61 %, SKLU1 (pulmón) con 85 % y COS7 como control de línea celular no cancerosa con un 64 % de inhibición. Siendo más activo contra la línea de carcinoma pulmonar SKLU1.

2.5 Terpenoides y triterpenos

Las plantas producen una amplia gama de compuestos orgánicos que no poseen roles reconocidos en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación, (metabolito secundario), generalmente se halla sólo en una especie o en un grupo de especies taxonómicamente relacionadas (Taiz et al., 2002). En consecuencia, el hombre ha hecho uso de los metabolitos secundarios con diversos propósitos, entre los que puede mencionarse saborizantes, colorantes, fragancias, insecticidas, narcóticos medicinales y adictivas además de cosméticos.

La clasificación de los metabolitos secundarios se puede dar según la actividad farmacológica, se pueden encontrar los siguientes grupos: glicósidos cardiotónicos,

analgésicos, narcóticos, antibióticos, hormonas, análogos a prostaglandinas y otros (Salisbury et al., 1992; Pedrozo, J. 2004).

De manera que dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los terpenoides o también llamados terpenos, los cuales son un grupo de compuestos derivados de la ruta biosintética mevalonato y fosfato de desoxyxilulosa, son derivados de monómero de isopreno de cinco átomos de carbono con fórmula general $(C_5)_n$, donde n son los monómeros de isopreno, clasificados en: monoterpenos $(C_5)_2$, sesquiterpenos $(C_5)_3$, diterpenos $(C_5)_4$, triterpenos $(C_5)_6$ y así sucesivamente según (Badui, S. 2006) (Tabla 5).

Tabla 5. Clase de terpenos en la naturaleza (Badui, S. 2006).

Terpenoide	Unidades de isopreno C_5	Formula condensada	Ejemplo
Monoterpeno	2	$C_{10}H_{16}$	Citral, limoneno
Sesquiterpeno	3	$C_{15}H_{24}$	Farnesol, β -sinesal
Diterpeno	4	$C_{20}H_{32}$	Fitol, vitamina A
Triterpeno	6	$C_{30}H_{48}$	Lupeol, esteroides
Tetraterpeno	8	$C_{40}H_{64}$	Carotenoides
Politerpeno	Varios cientos	Varios miles	Caucho

Por consiguiente, los triterpenos se pueden clasificar principalmente en tetracíclicos con cuatro ciclos y pentacíclicos con cinco ciclos:

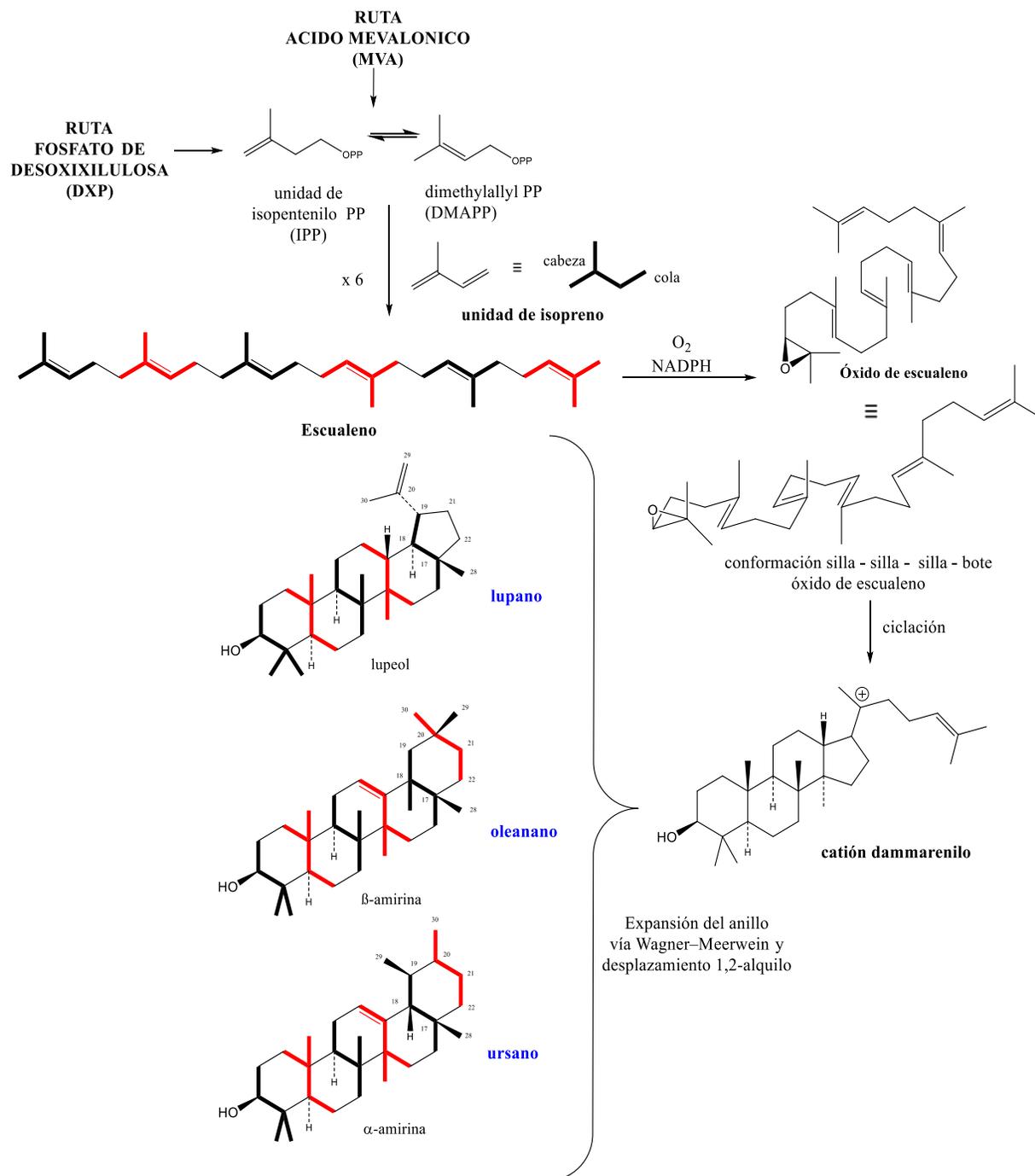
1. Tetracíclicos:

- a. Euphano
- b. Tirucalano

2. Pentacíclico:

- c. Lupano
- d. Ursano
- e. Oleanano

Específicamente, la ruta biosintética de los triterpenos se da a partir de 6 unidades de isopreno para integrar el esqueleto del escualeno, posteriormente se lleva a cabo su oxidación con O_2 y NADPH en la primera unidad de isopreno. Paso seguido, el escualeno oxidado se acomoda conformacionalmente en tres sillas y un bote para formar el catión damarenilo. Este a su vez se organiza en un sistema pentacíclico por la ciclación del último doble enlace, dando lugar al esqueleto de lupeilo (lupano). La expansión del lupeilo por migración de enlace, da como resultado al sistema oleanilo (oleanano); y al mismo tiempo, la migración del metilo del carbono 20 al carbono 19 da lugar al ursanilo (ursano) (Esquema 1, Dewick 2012).



Esquema 1. Biosíntesis general de terpenoides.

2.6 Inflamación

La inflamación es la alteración patológica caracterizada por trastornos circulatorios de la sangre y frecuentemente por aumento de calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor. Algunos estímulos externos provenientes de infecciones o de daño propio generan como consecuencia inflamación, por lo general una respuesta inflamatoria inducida por estímulos externos origina una inflamación aguda, específicamente para casos de inflamación persistente o enfermedades autoinmunes si no se resuelve puede tornarse inflamación crónica, además existen estímulos de origen interno (provenientes de una disfunción del tejido) que son capaces de iniciar una respuesta inflamatoria.

Algunos ejemplos de enfermedades donde la inflamación juega un papel patogénico importante son: artritis reumatoide, asma, colitis ulcerosa, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, osteoartritis, vasculitis, además de enfermedades de origen infeccioso en las que la inflamación contribuye en la patología tanto tóxica como bacteriana: enfermedad de Chagas, Gastritis por *H. pylori*, Lepra (forma tuberculoide), tuberculosis, por otros agentes patógenos como virus: hepatitis C, neumonía viral; y algunas otras de origen diverso en las que la fibrosis postinflamatoria es una causa principal de patología: cirrosis hepática (alcohólica o vírica), fibrosis pulmonar idiopática, etc. (Barreno, P. 2008).

Así mismo, la inflamación es una reacción defensiva de un organismo ante una lesión, que surge con el fin de aislar y destruir al agente dañino y reparar el tejido conectivo u órgano dañado. Por lo que se refiere al tejido conectivo se define como un conjunto de tejidos muy diversos, que comparten la función de 'relleno', ocupando los espacios entre otros tejidos y órganos, además de cumplir como sostén del organismo, constituye el soporte material del cuerpo, el cual al tener una alteración por algún estímulo externo sufre una formación patológica en el tejido (Figura 8, a), conocida como fibrosis, ocasionando un aumento en la producción de células en un órgano o tejido, dando pie a la formación de un granuloma (inflamación) (Figura 8, b). Es así como en el proceso de inflamación se involucran los sistemas vascular e inmune, ocasionando síntomas generales como eritema, calor, hinchazón, dolor y pérdida funcional. Por último en el proceso de recuperación los macrófagos y neutrófilos (fagocitos) destruyen los restos celulares y bacterias presentes (Figura 8, c). (Tejido conectivo, 2020, Rojas, A. 2012).

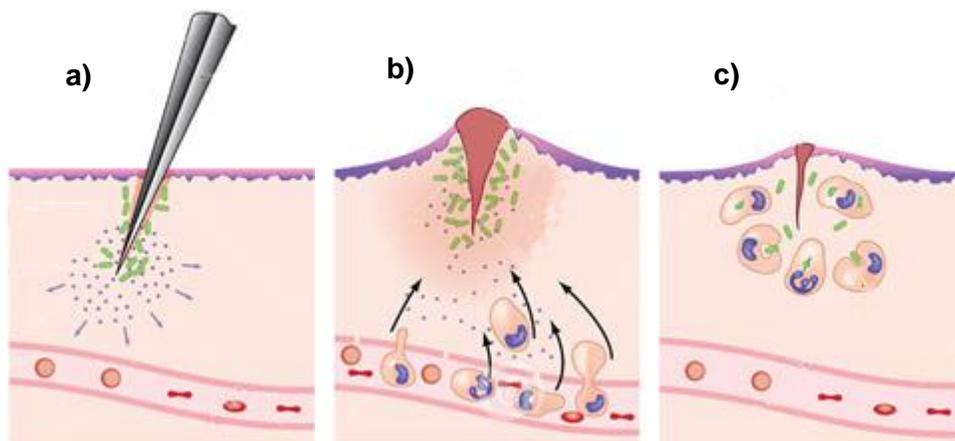
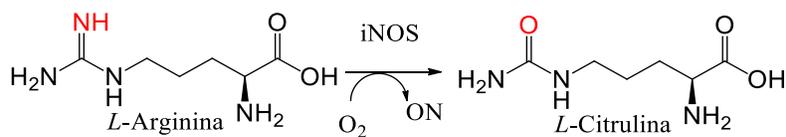


Figura 8. Proceso de inflamación. a) Lesión tisular; liberación de señales químicas como histamina (Hormona que actúa como un potente dilatador de los vasos sanguíneos y de los capilares y provoca la contracción de la musculatura lisa), b) Inflamación; dilatación y filtración incrementada de los vasos sanguíneos locales; migración de fagocitos a la zona, c) Tejido en recuperación (figura tomada de la red).

Existen varios mediadores del proceso inflamatorio, dentro de ellos se encuentra el radical libre Óxido nítrico (ON), el cual es un mediador proinflamatorio participante en la mayoría de los procesos fisiológicos del cuerpo, capaz de propagarse a través de las membranas celulares por su acción inmuno regulatoria con efecto vasodilatador (Kaplan et al., 1989; Kubes et al., 1991). Diversas investigaciones se enfocan al ON por su efecto t en el proceso de inflamación (García et al., 1998; Ruibal et al., 2004; Guinand et al., 2004). En esta tesis se estudia la inhibición del ON como un ensayo *in vitro* antiinflamatorio.

El ON se desprende en la reacción de la formación de *L*-citrulina a partir del aminoácido *L*-arginina, esta reacción catalizada por la enzima Óxido Nítrico-Sintasa (iNOS) (Esquema 2) (Marletta, MA.1993).



Esquema 2. Síntesis general de Óxido Nítrico (ON).

En cuanto a la búsqueda de fármacos antiinflamatorios, se han buscado diversos compuestos para mitigar la respuesta inflamatoria, dentro de estos se encuentran los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES), fármacos utilizados como agentes terapéuticos para el tratamiento del dolor y la inflamación. Algunos ejemplos son, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno y piroxicam que inhiben enzimas tipo COX-1 y COX-2 (enzimas que aceleran la formación de sustancias que causan inflamación y dolor en diferentes grados) (Rojas, A. 2012).

Con respecto a productos naturales antiinflamatorios en la medicina tradicional, se ha hecho una serie de investigaciones relacionadas en la búsqueda de compuestos con actividad antiinflamatoria en donde se puede mencionar moléculas como los triterpenos, estructuras con efecto terapéutico antiinflamatorio propuestos como una alternativa en la búsqueda de compuestos que tienen actividad biológica específica provenientes de especies vegetales. El género *Bursera* se han encontrado diversos fitoquímicos con actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*, los cuales se discuten en resultados.

3. JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional mexicana sigue siendo una gran referencia para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos y para el tratamiento de diversos padecimientos que implican dolor e inflamación, lo cual está relacionado con una gran cantidad de padecimientos y enfermedades que aquejan la mayor parte de la población mundial; tales como hipertensión arterial, diabetes, colitis, asma bronquial, síndrome premenstrual.

En este sentido la inflamación es una respuesta a alguna alteración patológica y la búsqueda de fitoquímicos bioactivos a partir de plantas medicinales siguen siendo de gran importancia el estudio de distintas especies vegetales de nuestro país, que permitan encontrar compuestos que ayuden a reducir, controlar y eliminar la inflamación.

En relación con lo anterior, el género *Bursera* está ampliamente distribuido a lo largo del territorio nacional y presenta un importante potencial farmacológico. En específico la especie *Bursera grandifolia* es utilizada etnomédicamente para problemas respiratorios, como bronquitis, influenza, tosferina y en infecciones de pulmón.

Dicha especie ha sido poco explorada en cuanto a su contenido metabólico; por lo tanto, los resultados de este trabajo contribuirán al contenido fitoquímico de *B. grandifolia*, así como la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos del tipo triterpeno son los metabolitos secundarios más abundantes en el extractos de diclorometano de hojas de *Bursera grandifolia* y su relevante evaluación biológica antiinflamatoria respalda su uso etnomédico de la especie.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar el estudio químico preliminar del extracto de diclorometano de hojas de *Bursera grandifolia* colectada en el estado de Morelos y determinar su efecto antiinflamatorio.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener el extracto de diclorometano de hojas de *Bursera grandifolia*.
2. Aislar y purificar metabolitos secundarios presentes en el extracto.
3. Caracterizar los metabolitos secundarios mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), así como Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).
4. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto diclorometánico mediante la inhibición de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7
5. Contribuir al contenido fitoquímico de la especie vegetal.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Técnicas cromatográficas

Los metabolitos secundarios se aislaron por cromatografía en columna (CC) utilizando como fase fija sílica normal con malla 60-200 Å y gel sílice flash con malla 230-400 Å que se empacó en columnas de vidrio de diámetros y longitudes según la cantidad de muestra a purificar (Taber, 1981). Como fase móvil se utilizaron las mezclas de disolventes orgánicos de polaridad creciente: hexano-AcOEt, CH₂Cl₂-MeOH. Así mismo se utilizó extracción en fase sólida utilizando cartuchos C-18 (5 g, 120 µm, 20 mL, No. Parte 14256023 Agilent).

Por otro lado, para el monitoreo de CC se usó cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 F254, utilizando como revelador sulfato cérico amoniacal (NH₄)₄Ce(SO₄) al 1% en H₂SO₄ 2N, así mismo, mediante el uso de una lámpara de luz UV (λ 254 nm y λ 366 nm) se visualizaron aquellos compuestos que contenían grupos cromóforos (dobles enlaces conjugados y anillos aromáticos).

6.2 Técnicas de elucidación

Las fracciones de baja polaridad fueron analizadas mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) en un Cromatógrafo de Gases Agilent Technology 6890 acoplado a un detector de masas 5973N. Los cromatogramas fueron analizados en la Biblioteca NIST versión 1.7^a.

La caracterización de los compuestos puros y mezclas fueron realizadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ¹H en equipos de 200 MHz (Varían Mercury), 400 MHz (Varían Mercury Plus), 600 MHz (Bruker), utilizando disolventes deuterados (CDCl₃, MeOd₄) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

6.3 Material vegetal

Las hojas de *Bursera grandifolia* (*B. grandifolia*) fueron colectadas en la reserva ecológica de la Sierra de Huautla, a la altura de Tilzapotla ubicada en el sur del estado de Morelos, entre los límites de Puebla y Guerrero. La identificación taxonómica fue realizada por el Biólogo Fidel Ocampo y una muestra botánica fue depositada en el herbario HUMO de la UAEM registrada con número de Voucher 35892 *Bursera grandifolia* (Sctdl.) Engl.

6.4 Obtención del extracto de diclorometano de *Bursera grandifolia*

Las hojas de *B. grandifolia* se dejaron secar a temperatura ambiente y bajo sombra obteniendo 0.646 kg las cuales fueron pulverizadas en una licuadora convencional.

Para obtener el extracto de diclorometano primeramente el material vegetal se maceró con hexano (72 hr por triplicado) y después con diclorometano en las mismas condiciones. El extracto de CH₂Cl₂ fue concentrado mediante destilación a presión reducida utilizando un rotaevaporador y finalmente se obtuvo un rendimiento de 1.36 % (8.83 g) respecto a las hojas secas.

6.5 Fraccionamiento primario

De los 8.83 g del extracto de diclorometano de aspecto verde oscuro, se tomaron 100 mg para su evaluación biológica y el resto se sometió a fraccionamiento en CC sobre gel de sílice fase normal (60-200 malla). La elución se inició con un gradiente de *n*-hexano-AcOEt-MeOH incrementando su polaridad (100:00:00 → 00:00:100) y se obtuvieron 90 fracciones de 150 mL cada una y se agruparon según su similitud en CCF (Tabla 6).

Tabla 6. Fraccionamiento primario de *Bursera grandifolia*.

Clave	Fase móvil (%)	Fracciones Reunidas	Peso (g)	Rendimiento (%)*
MGN-01-1	100 Hexano → 90:10 Hex:AcOEt	1-25	2.47	0.38
MGN-01-2	80:20 Hex:AcOEt	26-38	1.07	0.16
MGN-01-3	70:30 Hex:AcOEt	39-46	0.76	0.12
MGN-01-4	60:40 Hex:AcOEt	47-55	1.32	0.20
MGN-01-5	60:40 Hex:AcOEt	56-63	1.04	0.16
MGN-01-6	50:50 Hex:AcOEt, 100 AcOEt, 100 MeOH	64-90	2.17	0.33

*rendimiento respecto a las hojas secas.

6.6 Análisis químico de la fracción MGN-01-1

Se tomó una muestra de 1 mg de la fracción MGN01-1 (2.47 g) y se disolvió en 1 mL de hexano; para ser analizada por CG-EM en un Cromatógrafo de Gases Agilent Technology 6890 acoplado a un detector de masas 5973N. Los cromatogramas fueron analizados en la Biblioteca NIST versión 1.7^a, identificando ácidos grasos saturados y triterpenos pentacíclicos: óxido de cariofileno (**1**) ($M^+ = 220$), 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (**2**) ($M^+ = 268$), ácido hexadecanoico metil ester (**3**) ($M^+ = 270$), 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (**4**) ($M^+ = 278$), ácido hexadecanoico étil ester (**5**) ($M^+ = 284$), ácido octadecanoico metil ester (**6**) ($M^+ = 298$), 1-hexacosanol (**7**) ($M^+ = 382$), 1,30-triacontanediol (**8**) ($M^+ = 454$), vitamina E (**9**) ($M^+ = 430$), ciclooctacosan (**10**) ($M^+ = 392$), β -amirinona (**11**) ($M^+ = 424$), β -amirina (**12**) ($M^+ = 426$), Lup-20(29)-en-3-ona (**13**) ($M^+ = 424$), Lupeol (**14**) ($M^+ = 426$), estigmast-4-en-3-ona (**15**) ($M^+ = 412$), fitol (**16**) ($M^+ = 296$).

6.7 Recromatografía de MGN-01-2

La fracción MGN-01-2 (1.07 g) se sometió a purificación mediante el proceso de fraccionamiento en CC sobre gel de sílice fase normal (230-400 malla). Se eluyó con un gradiente de *n*-Hexano:AcOEt (100:00 \rightarrow 95:05), los eluatos fueron colectados de 50 mL cada uno, obteniendo un total de 101 eluatos, los cuales se agruparon según su similitud en CCF. De esta cromatografía se lograron purificar una mezcla de triterpenos (0.16 g), β -sitosterol (0.6 g) (**17**) (Figura 9) que se obtuvo como cristales cristalinos identificado por ¹H-RMN (comparado con datos reportados en la literatura (Sai et al., 2012) y además 3-epilupeol (**18**) (1.5 mg) (Figura 10) también identificado por ¹H-RMN (comparado con datos reportados en la literatura (Castro et al., 2019)).

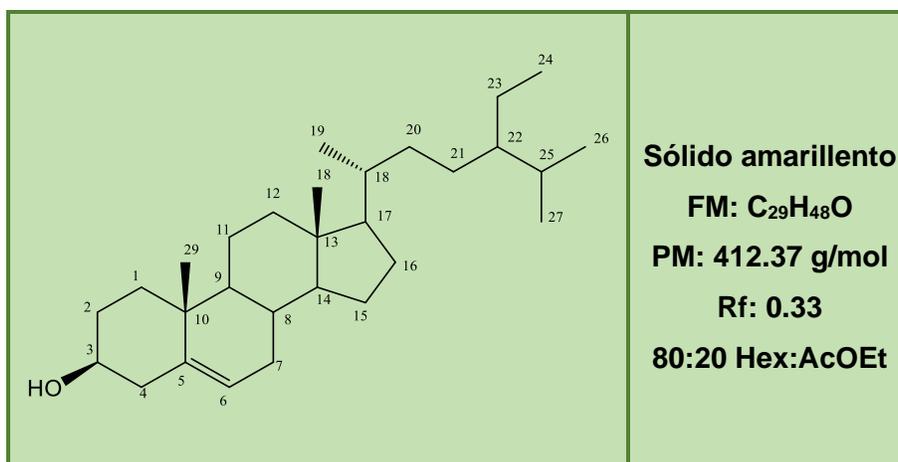


Figura 9. β -sitosterol (**17**).

RMN ¹H de β -sitosterol (**17**) (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.34 (d, 1H, J = 4.94 Hz, H-6), 3.52 (m, 1H, H-3), 1.0 (s, 3H, H-29), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, H-19), 0.84 (t, 3H, J = 7.5 Hz, H-24), 0.82 (d, 3H, J = 6.4 Hz, H-26), 0.81 (d, 3H, J = 6.7 Hz, H-27), 0.67 (s, 3H, H-28).

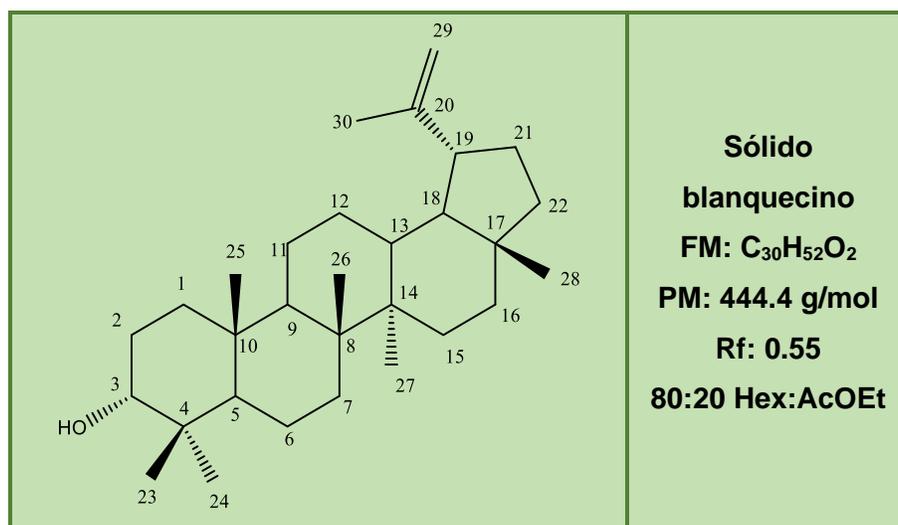


Figura 10. 3-epilupeol (**18**).

RMN ¹H de 3-epilupeol (**18**) (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.66 (d, 1H, H-29 β), 4.54 (d, 1H, H-29 α), 3.41 (dd, J = 11.6, 4.3 Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 1H, H-19), 1.83 (m, 1H, H-21), 1.66 (s, 3H, H-30), 1.24 (s, 3H, H-25), 1.03 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-24), 0.78 (s, 3H, H-28), 0.73 (s, 3H, H-26).

6.8 Recromatografía de MGN-01-4

La fracción MGN-01-4 (1.32 g) se sometió a purificación mediante el proceso de fraccionamiento en CC sobre gel de sílice fase normal (230-400 malla). La columna se eluyó con un gradiente de *n*-Hex:AcOEt (95:05: → 70:30) colectándose eluatos de 25 mL cada una, de las cuales se obtuvieron 72 fracciones, los cuales se agruparon según su similitud en CCF en tres reuniones: Ra, Rb y Rc, posteriormente para su distinción fueron sometidas nuevamente a CCF y se determinó que la fracción Rb (0.72 g) se purificó, dejando a las fracciones Ra y Rc para su posterior análisis.

6.8.1 Purificación de la fracción Rb mediante extracción de fase sólida (SPE)

La reunión Rb (0.72 g) se sometió a purificación mediante SPE con la ayuda de un cartucho HF Bond Elut C18 (fase reversa). Se activó el cartucho con MeOH y eluyó con H₂O:MeO:C₂H₅N (100:00:00 → 00:00:100) del cual se obtuvieron eluatos de 25 mL cada una, dichas fracciones se agruparon según su similitud en CCF en tres reuniones (Rb-1, Rb-2 y Rb-3). De esta cromatografía se logró observar que la reunión Rb-2 (0.440 g), presentó un solo R_f en CCF de 0.5 cm (80:20, Hex:AcOEt), dicho R_f coincidió con el reportado para α-amirina (**19**). Sin embargo, al analizarla por ¹H RMN, se observó que se trataba de una mezcla de al menos dos triterpenos.

6.8.2 Purificación de la fracción Rb-2 por HPLC

Debido a la complejidad para separar de la mezcla de triterpenos Rb-2 por CC, se decidió purificar una parte de esta por HPLC bajo las condiciones descritas en la Tabla 7. Esto se llevó a cabo con la ayuda del Dr. Alfonso Miranda Molina LANEM-CIQ.

Tabla 7. Condiciones de HPLC para purificación de Rb-2.

Fase estacionaria	Columna Superspher-100 RP18 LiChroCART 125x4 mm
Sistema de elución	95:05 Acetonitrilo:MeOH
Flujo	1.0 mL/min
Concentración	3.4 mg/mL
Inyección	20 μ L
Tiempo de corrida	30 min
Detector	DAD a 210 nm
Temperatura	40 °C
Colector	Automático

Como resultado se lograron distinguir 3 picos ($T_r = 11.87, 16.31$ y 18.28 min) que al analizar por $^1\text{H-RMN}$, se determinó que el primer pico se trataba de lupeol (**14**) (Castro et al., 2019) (Figura 11), el segundo se identificó como α -amirina (**19**) (Antúnez et al., 2012) (Figura 12) y el último quedó pendiente por identificar.

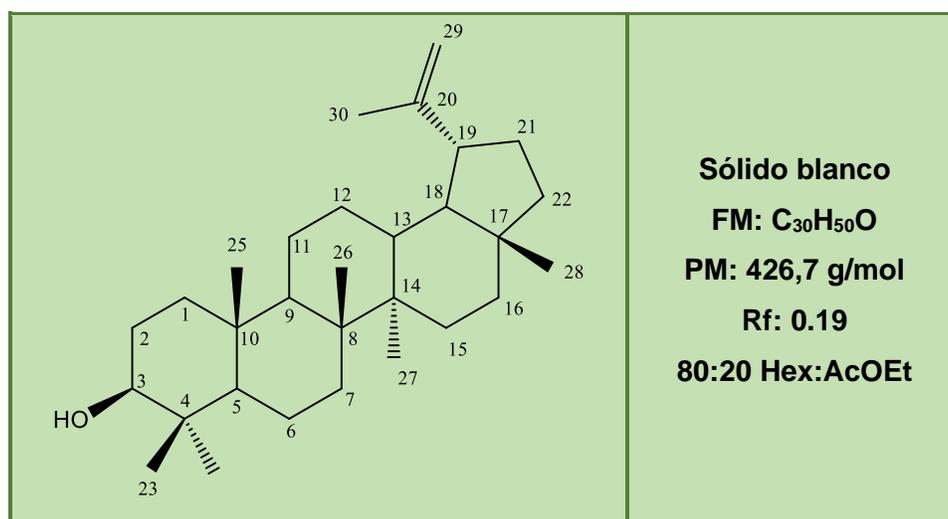


Figura 11. Lupeol (**14**).

RMN ^1H de lupeol (**14**) (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.53 (d, 1H, H-29 β), 4.41 (d, 1H, H-29 α), 3.31 (dd, $J = 11.5, 5 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 2.37 (m, 1H, H-19), 1.90 (m, 1H, H-21), 1.68 (s, 3H, H-30), 1.04 (s, 3H, H-25), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-24), 0.83 (s, 3H, H-28), 0.79 (s, 3H, H-26).

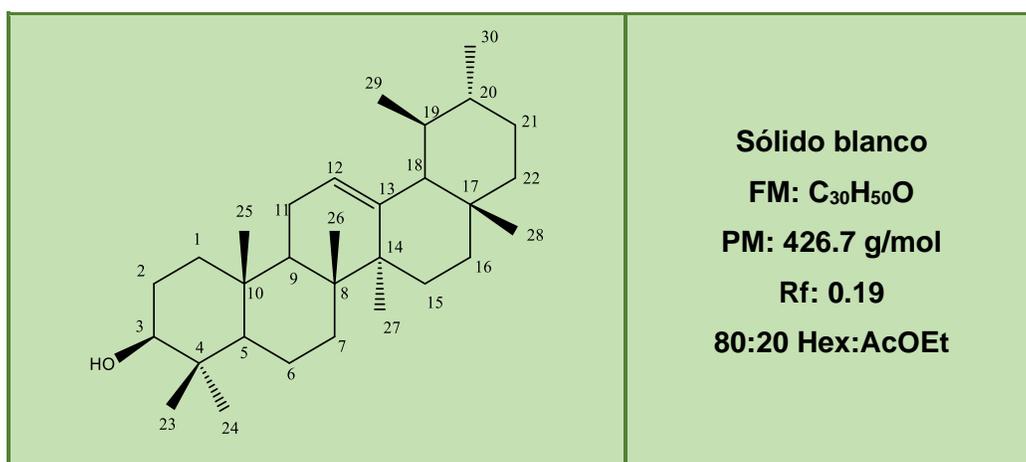


Figura 12. α -amirina (**19**).

RMN ^1H de α -amirina (**19**) (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.11 (t, 1H, H-12), 3.20 (dd ($J = 11.56, 5.42 \text{ Hz}$), 1H, H-3), 1.05 (s, 1H, H-27), 0.98 (d, 1H, H-29), 0.92 (s, 1H, H-26), 0.88 (s, 1H, H-23), 0.84 (s, 1H, H-25), 0.80 (s, 1H, H-24), 0.77 (d, 1H, H-30), 0.76 (s, 1H, H-28).

6.9 Recromatografía de MGN-01-5

La fracción MGN-01-5 (1.0468 g) se sometió a purificación mediante el proceso de fraccionamiento en CC sobre gel de sílice fase normal (230-400 malla). Le eluyó de manera isocrática con CH_2Cl_2 como fase móvil, obteniéndose 44 fracciones de 50 mL, se agruparon según su similitud en CCF. De este fraccionamiento se obtuvo el lupeol (**14**) y el 1,3-lupandiol (**20**) (Figura 13) (alrededor de 1 mg) dicho compuesto se obtuvo como un sólido y fue comparado con datos descritos en literatura (Puapairoj et al., 2005).

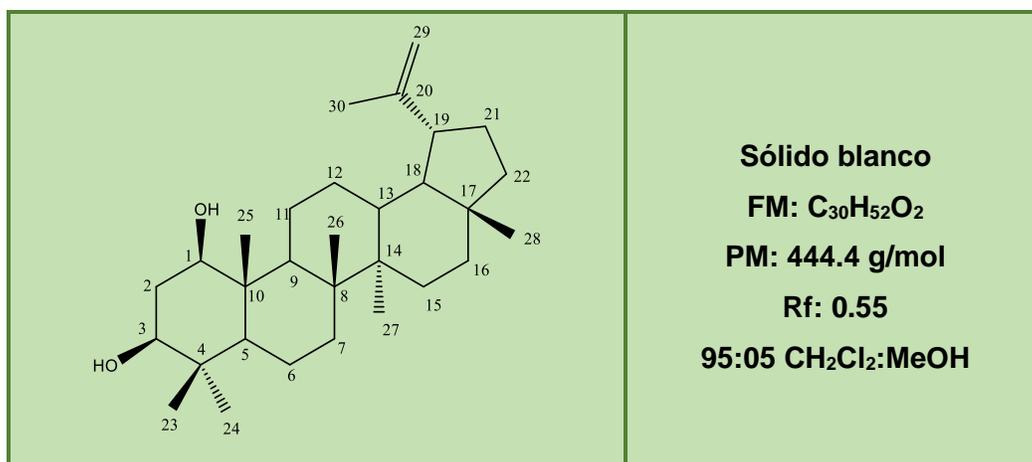


Figura 13. 1,3-lupandiol (**20**).

RMN ¹H de 1,3-lupandiol (**20**) (CDCl₃, 600 MHz): δ 4.66 (d, 1H, H-29β), 4.54 (d, 1H, H-29α), 3.41 (dd, *J* = 11.6, 4.3 Hz, 1H, H-3), 3.23 (dd, *J* = 11.8, 4.3 Hz, 1H, H-1), 2.36 (m, 1H, H-19), 1.83 (m, 1H, H-21), 1.66 (s, 3H, H-30), 1.24 (s, 3H, H-25), 1.03 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-24), 0.78 (s, 3H, H-28), 0.73 (s, 3H, H-26).

RMN ¹³C de 1,3-lupandiol (**20**) (CDCl₃, 151 MHz): δ 151.18, 109.83, 79.10, 75.82, 69.10, 53.18, 51.51, 48.42, 48.01, 43.64, 43.02, 41.42, 40.07, 38.98, 38.19, 37.55, 35.56, 34.31, 29.72, 27.89, 27.58, 25.02, 23.90, 22.96, 18.06, 16.46, 15.00, 14.47, 14.17, 12.13, 11.09.

6.10 Evaluación antiinflamatoria *in vitro* del extracto por inhibición de ON

La evaluación de la inhibición de ON del extracto de diclorometano de *B. grandifolia* fue llevada a cabo bajo la colaboración del Dr. Antonio Romero de la Universidad deGuadalajara y se siguió la metodología descrita por Romero et al., 2016.

En cuanto a la evaluación de viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de MTS se utilizó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (Tib-71™ de ATCC), el extracto de diclorometano, de *B. grandifolia* fue suministrado a diferentes concentraciones (5 - 40 µg/mL), en vehículo (DMSO, 0.21%, v/v) y etopósido (40 µg/mL) que sirvió como control positivo.

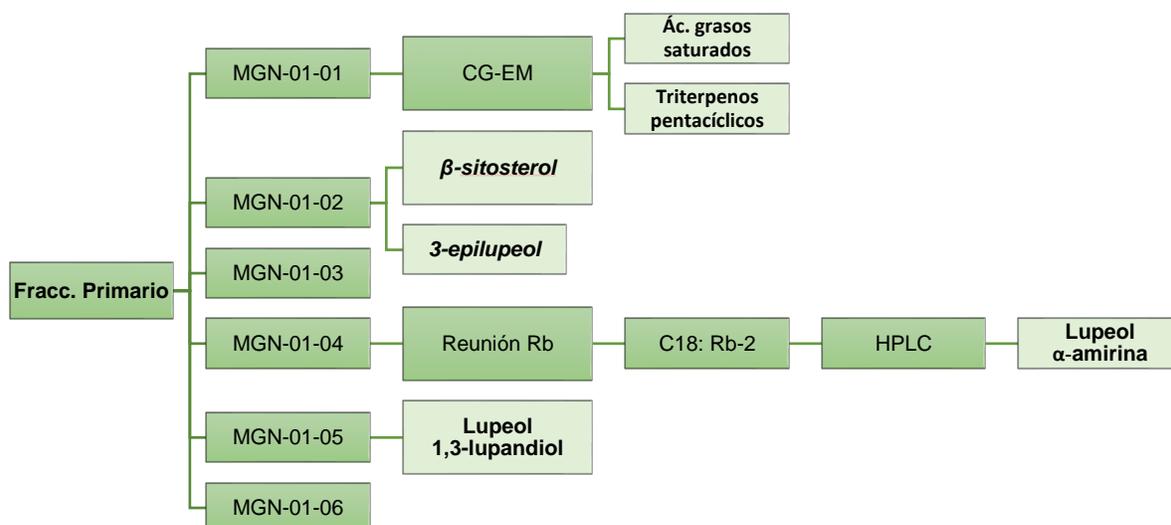
Posteriormente para la evaluación de óxido nítrico las células RAW 264.7 fueron tratadas con la concentración a la cuál mostraron viabilidad celular (DMSO, 0.21%, v/v) e indometacina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que sirvió como control positivo, se aplicó el estímulo proinflamatorio LPS a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los sobrenadantes libres de células y se usaron en fresco para la cuantificación de ON.

Los sobrenadantes celulares se utilizaron para la determinación de óxido nítrico con la reacción de Griess. En una placa nueva de 96 pozos se mezclaron 50 μL de cada sobrenadante con 100 μL de reactivo Griess [50 μL de sulfanilamida al 1% y 50 μL de *N*-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato al 0.1% en solución de ácido fosfórico al 2.5%] y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica se midió a 540 nm (DO_{540}) en un lector de placas de ELISA y se calculó la concentración de nitrito en las muestras mediante comparación con la DO_{540} de una curva estándar de NaNO_2 preparada en medio de cultivo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El esquema 3 resume el trabajo fitoquímico del extracto de diclorometano de hojas de *B. grandifolia*. Del fraccionamiento del extracto se obtuvieron seis grupos de fracciones por CC. De manera general, la fracción MGN-01-01 fue sometida a CG-EM identificando principalmente ácidos grasos saturados y triterpenos pentacíclicos; la fracción MGN-01-02 se purificó mediante CC logrando purificar una mezcla de triterpenos: β -sitosterol (**17**) y 3-epilupeol (**18**) identificados por $^1\text{H-RMN}$; la fracción MGN-01-04 fue sometida a CC, obteniendo 3 fracciones: Ra, Rb y Rc, de las cuales solo Rb fue sometida nuevamente a purificación mediante SEP obteniendo 3 fracciones: Rb-1, Rb-2 y Rb-3, de las cuales Rb-2 fue purificada por HPLC identificando: lupeol (**14**) y α -amirina (**19**) por último MGN-01-05 se sometió a purificación mediante CC obteniendo lupeol (**14**) y el 1,3-lupandiol (**20**). En conjuntos se encontraron ácidos grasos, esteroides y terpenoides de tipo lupano y ursano, descritos en las siguientes secciones. Finalmente, las fracciones MGN-01-03 y MGN-01-06 quedan pendientes para su posterior análisis.

Esquema 3. Diagrama de fraccionamiento del extracto diclorometano de *B. grandifolia*.



7.1 Análisis CG-EM de la fracción MGN01-01

La fracción (MGN01-01) de aspecto ceroso, se analizó por CG-EM de acuerdo con las especificaciones descritas en la sección de metodología. De manera general, en el cromatograma se observan picos entre 15 - 38 min (Figura 14).

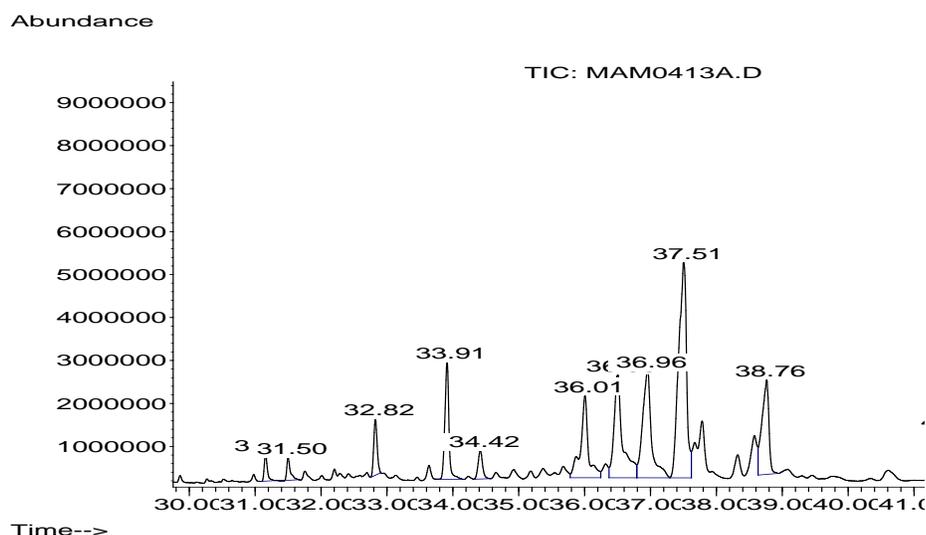
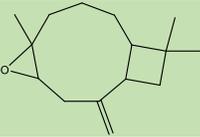
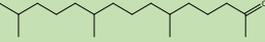
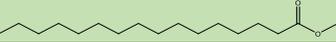
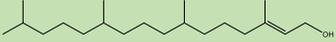
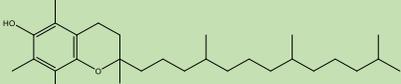
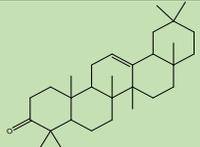
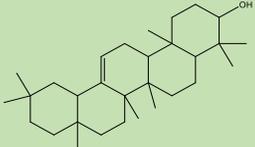
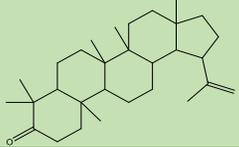
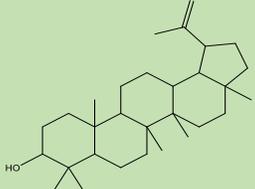
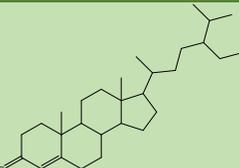


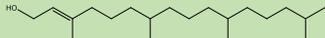
Figura 14. Expansión de cromatograma de gases de MGN01-01 Tr 30- 40.

En la Tabla 8, se muestran los compuestos detectados Tr, % de abundancia relativa y M⁺ (Masa carga)). Los resultados mostraron cinco ácidos grasos esterificados (**2, 3, 4, 5, 6**), dos alcoholes hidrocarbonados (**7, 8**), vitamina E (**9**), fitol (**16**) y cuatro triterpenos de mayor abundancia: lupeol (**14**) (25%), lupenona (**13**) (14%), β-amirina (**12**) (13 %) y β-amirinona (**11**) (9.3 %), distintos autores (Antúnez, M. 2012; Carrera et al., 2014; Carretero et al., 2008; De la Cruz et al., 2005; Gomez et al., 2014; Messina et al., 2015; Rojas, A. 2012; Romero et al., 2016) han descrito el contenido fitoquímico de diversas especies de *Bursera* tales como: *Bursera vejar-vazquezii*, *Bursera simaruba*, *Bursera microphylla*, *Bursera fagaroides*, *Bursera morelensis* y *Bursera copallifera*, señalando el notable contenido de compuestos de tipo triterpenico como los metabolitos secundarios más abundantes derivados de sus resinas, hojas, flores, tallos y raíces de dichas especies.

De acuerdo con lo descrito en este trabajo, el extracto presenta un notable contenido de triterpenos tales como β-amirinona (**11**), β-amirina (**12**) lupenona (**13**), lupeol (**14**), 3-epilupeol (**18**), 1,3-lupandiol (**20**) y α-amirina (**19**). En este contexto, este tipo de triterpenos han sido reportados como importantes antiinflamatorios (Miranda et al., 2000; Aragon et al., 2004; Puapairoj et al., 2005; Siddique et al., 2011; Gallo et al., 2009).

Tabla 8. Compuestos detectados por CG-EM de la fracción menos polar MGN01-01.

Nombre	Estructura	Tr (min)	% área	M ⁺
Óxido de Cariofileno (1)		15.064	1.255	220
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (2)		17.777	0.862	268
Ácido hexadecanoico, metil ester (3)		18.579	2.239	270
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (4)		19.242	1.193	278
Ácido hexadecanoico, etil ester (5)		20.398	0.481	284
Ácido octadecanoico, metil ester (6)		21.318	2.835	298
1-hexacosanol (7)		31.164	1.231	382
1-30-triacontanediol (8)		32.826, 34.422	1.812 1.845	454
Vitamina E (9)		32.826	2.835	430
Ciclooctacosan (10)		33.916	7.04	392
β -amirinona (11)		36.005	9.326	424
β -amirina (12)		36.504	13.097	426
Lup-20(29)-en-3-ona (13)		36.958	14.028	424
Lupeol (14)		37.509	25.156	426
Estigmast-4-en-3-ona (15)		38.764	9.693	412

Fitol (16)		20.49 41.58	0.418 5.244	296
------------	---	----------------	----------------	-----

7.2 Análisis de la mezcla de lupeol (14) y α -amirina (19)

Tal como se describió en la sección de metodología, la fracción MGN-01-04 fue identificada por CCF, con una sola mancha de Rf de 0.19 (mismo Rf del estándar α -amirina); sin embargo, al analizarla por ^1H RMN, se observó que se trataba de una mezcla de al menos dos triterpenos. Esta mezcla se decidió purificar por HPLC (ver sección 6.8.1). En el cromatograma obtenido (Figura 15) se identificaron 3 picos, y se analizaron los dos primeros más abundantes por RMN, el primero de ellos con Tr 11.84 min (1 mg) y el segundo con Tr 16.31 min (0.9 mg) identificados por ^1H RMN como lupeol (14) y α -amirina (19), respectivamente de los cuales se hablará en las siguientes secciones. El tercero quedó pendiente por analizar.

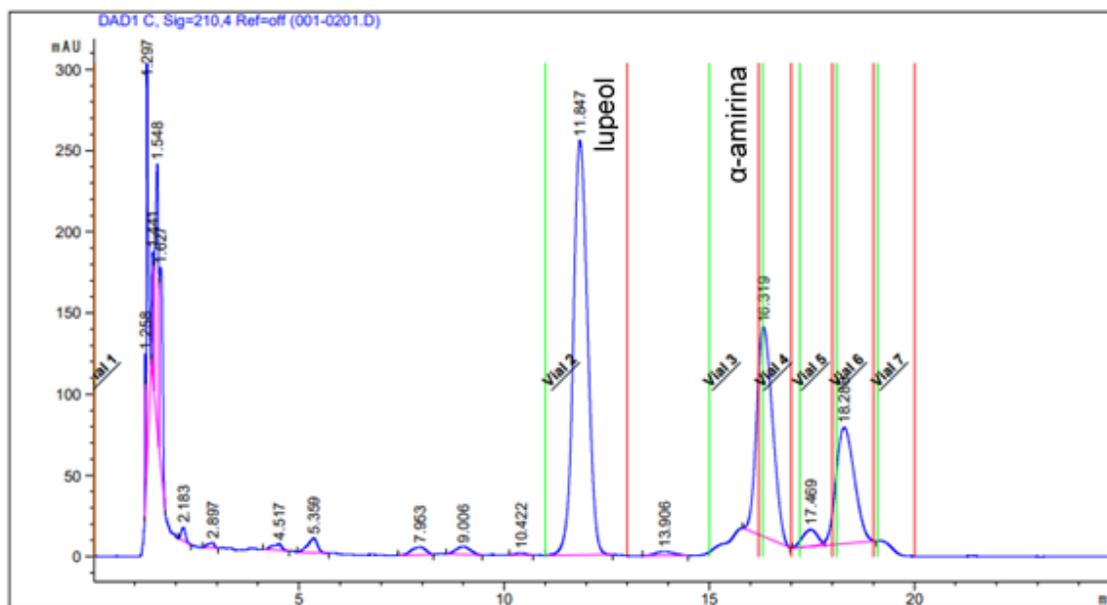


Figura 15. Cromatograma de la mezcla de triterpenos HPLC-DAD C18, λ 210.

Score \geq 80%, identificados de acuerdo con su espectro de masas de la biblioteca NIST

7.3 Elucidación estructural del lupeol (14)

El lupeol (14) se aisló como un sólido blanco cristalino, siendo uno de los compuestos más abundantes en el extracto de diclorometano. De acuerdo con su ruta biosintética, es un triterpeno pentacíclico de tipo lupano, en el cuál su anillo E es de 5 carbonos, con un isoprenilo en el carbono 19. Este tipo de terpenoides se caracteriza por poseer un doble enlace exocíclico en C-29 (Figura 16, A), donde H-29 β y H-29 α se observan en ^1H -RMN como dos señales dobles con $J_{\text{gem}} = 2.12 \text{ Hz}$ en δ 4.53 y 4.41 ppm (Figura 16, B), por otro lado, la señal característica para H-3 en δ 3.12 ppm aparece como dd $J = 4.51, 11.03 \text{ Hz}$, siendo la primera ax-ec y la segunda ax-ax (Figura 16, C).

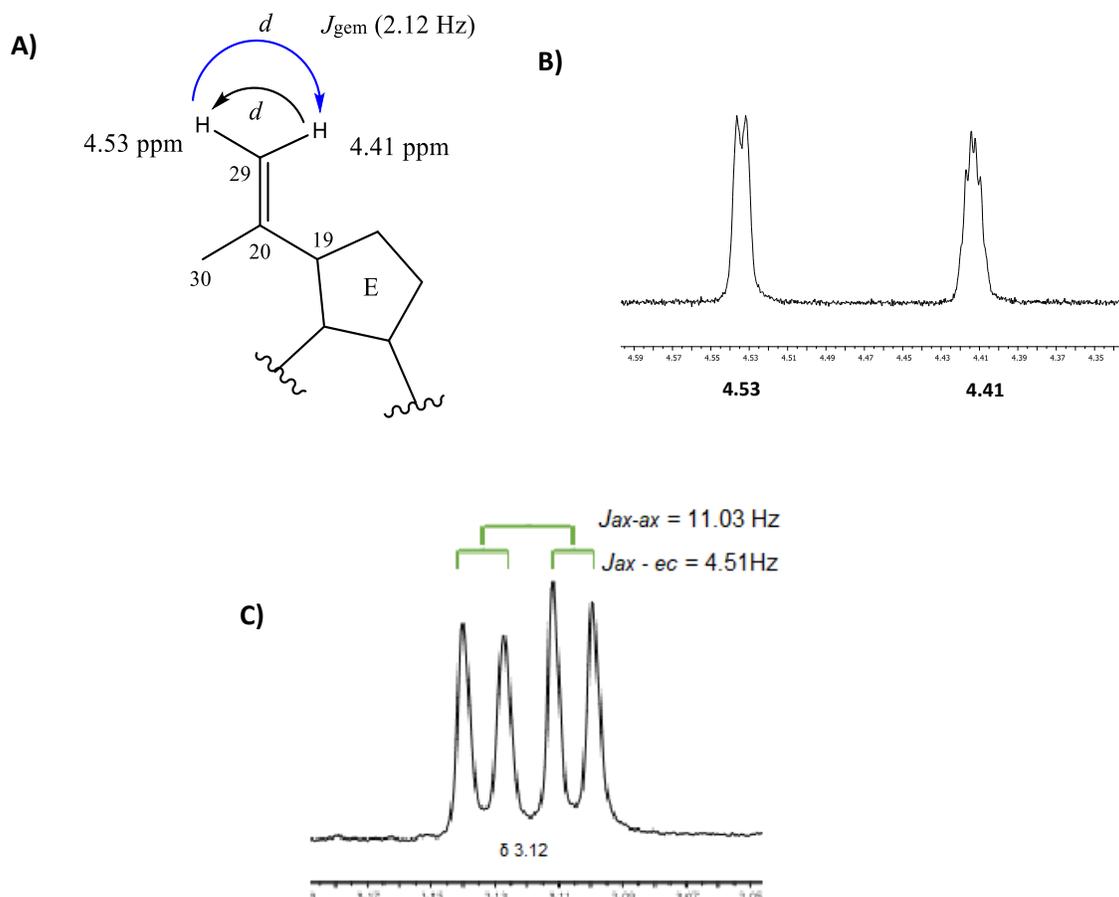
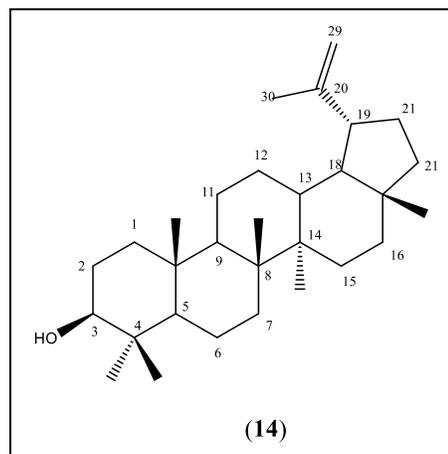


Figura 16. A) Anillo E del lupeol (14), B) expansión de ^1H de protones vinílicos H-29 β y H-29 α , C) expansión de ^1H correspondiente a H-3.

Así mismo se observa dos señales multiplete en δ 1.90 y 1.68, que integran cada una para un hidrogeno propias de los protones H-21 y H-30 respectivamente. Finalmente, a campo más alto entre δ 1.04-0.79 se observan seis señales simples con integración de tres hidrógenos cada una, correspondientes a los protones de los metilos C-23 - C-28 (espectro 1 anexos).

7.3.1 Comparación química de lupeol (**14**) y su epímero (**18**)

En cuanto al lupeol (**14**) y su epímero 3-epilupeol (**18**), la única diferencia estructural se encuentra en C-3, en donde las constantes de acoplamiento y desplazamiento químico de H-3 son diferentes (Castro et al., 2019). Respecto al desplazamiento químico, en espectro de ^1H de RMN, H-3 de **14** con δ 3.12, mientras que para **18**, se desplaza ligeramente a campo bajo a un δ 3.39, esto se debe al desapantallamiento del protón H-3 ecuatorial en la conformación de silla de un anillo de 6 carbonos (Figura 17, D).

Por otro lado, las constantes de acoplamiento para **14** $J_{ax-ec} = 5 \text{ Hz}$ y $J_{ax-ax} = 11.5 \text{ Hz}$ sugieren una configuración relativa *S* para el lupeol (**14**) (Figura 17 C) y para el epímero (**18**) $J_{ax-ec} = 5 \text{ Hz}$ y $J_{ec-ec} = 2.6 \text{ Hz}$ sugiriendo una configuración relativa *R* (Figura 17, D).

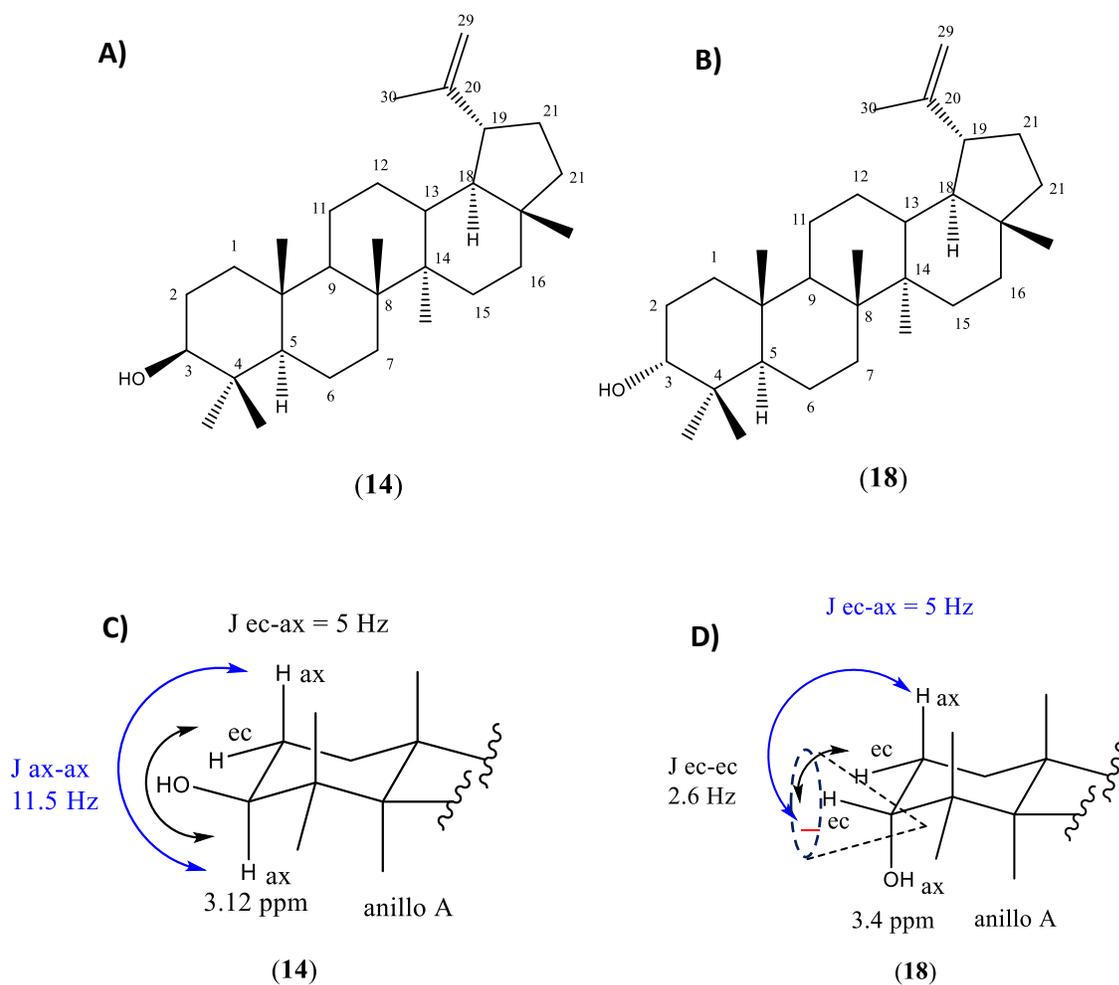


Figura 17. A) lupeol (**14**), B) 3-epilupeol (**18**), C) Contantes de acoplamiento del anillo A de lupeol (**14**), D) Contantes de acoplamiento del anillo A del 3-epilupeol (**18**).

7.4 Elucidación estructural de α -amirina (19)

La α -amirina (19) se aisló como un sólido blanco amorfo encontrado en la fracción MGN-01-04. 19 pertenece a la serie de triterpenos pentacíclicos de tipo ursano caracterizados por poseer un esqueleto base de cinco ciclohexanos, con un doble enlace en el anillo C en C-12 y C-13 y un metilo en los carbonos 19 y 20 respectivamente.

En RMN ^1H este tipo de terpenoides tienen la particularidad de observarse a campo alto dos señales dobles correspondientes a los metilos de C-29 y C-30 en δ 0.97 y 0.77 ppm respectivamente (espectro 2 anexos).

Asimismo, se observan otras seis señales simples correspondientes a los protones de los metilos de C-23 a C-28 (Figura 18), con integración de tres hidrógenos cada una δ 1.04, 0.92, 0.88, 0.84, 0.80, 0.76 ppm.

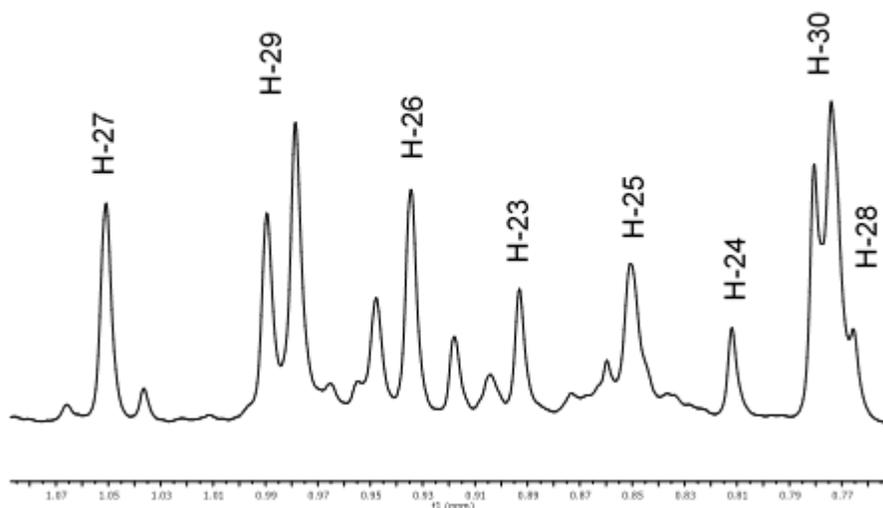
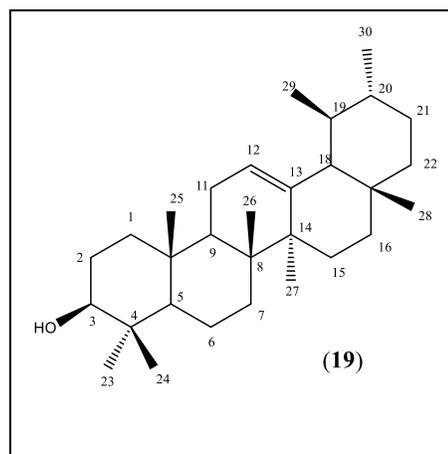


Figura 18. Expansión de ^1H señales correspondientes a los metilos.

Por otro lado, en la posición 3 se encuentra un protón unido a un grupo hidroxilo, lo cual se observa en un desplazamiento químico de δ 3.19 ppm como una señal doble de doble con $J_{ax-ax} = 11.65$ y $J_{ax-ec} = 5.42$ Hz (Figura 19).

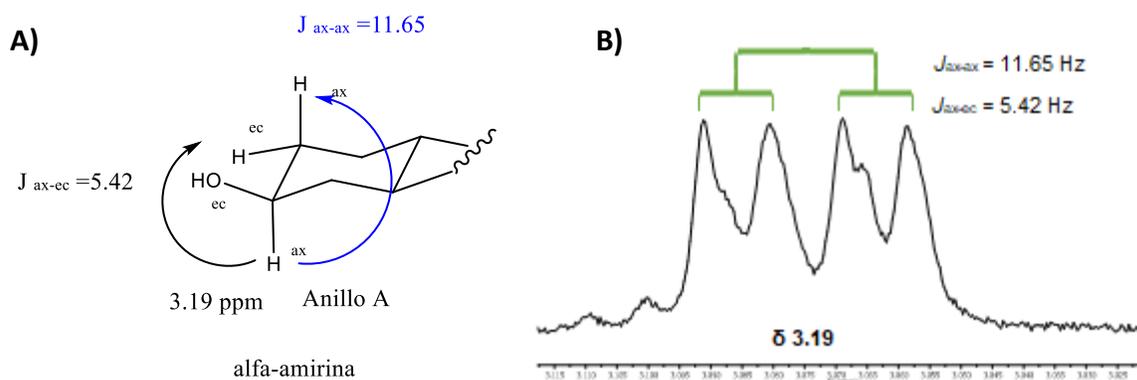
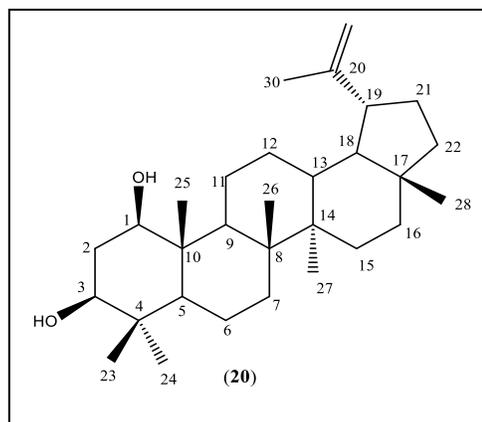


Figura 19. A) Anillo a del α -amirina (**19**), B) expansión de ^1H de δ 3.19 señal doble de doble.

Finalmente, el protón vinílico ubicado en C-12 se observa en δ 5.10 ppm como una señal doble de doble con $J = 3.40, 4.49$ Hz que se logra visualizar como una señal triple. Todas las señales de ^1H -RMN se establecieron de acuerdo con lo anteriormente reportado por Antúnez, M. 2012.

7.5 Elucidación estructura de 1,3-lupandiol (**20**)

El triterpeno más polar en esta tesis, fue identificado como 1,3 lupandiol (**20**), un sólido cristalino con muy poca abundancia (1 mg) y sin pureza total. De acuerdo con el análisis de ^1H -RMN se identifica como un triterpeno pentacíclico de tipo lupano; sin embargo, en su estructura posee dos hidroxilos en C-1 y C-3, lo que lo diferencia de lupeol (**14**) con un solo grupo hidroxilo en C-3.



Lo anterior mencionado se logró identificar debido a que en el espectro (espectro 3 anexos) de ^1H se observan dos señales base de oxígeno en δ 3.41 y 3.23 ppm (Figura 20, A), estas señales poseen una multiplicidad de doble de doble con $J_{ec-ax} = 4.4$ y 11.2 Hz y $J_{ec-ax} = 4.0$ y 11.5 Hz, respectivamente. Estas señales corresponden a los protones H-1 y H-3 (Figura 20, B), esto fue comparado con lo reportado previamente en la literatura (Puapairoj et al., 2005)

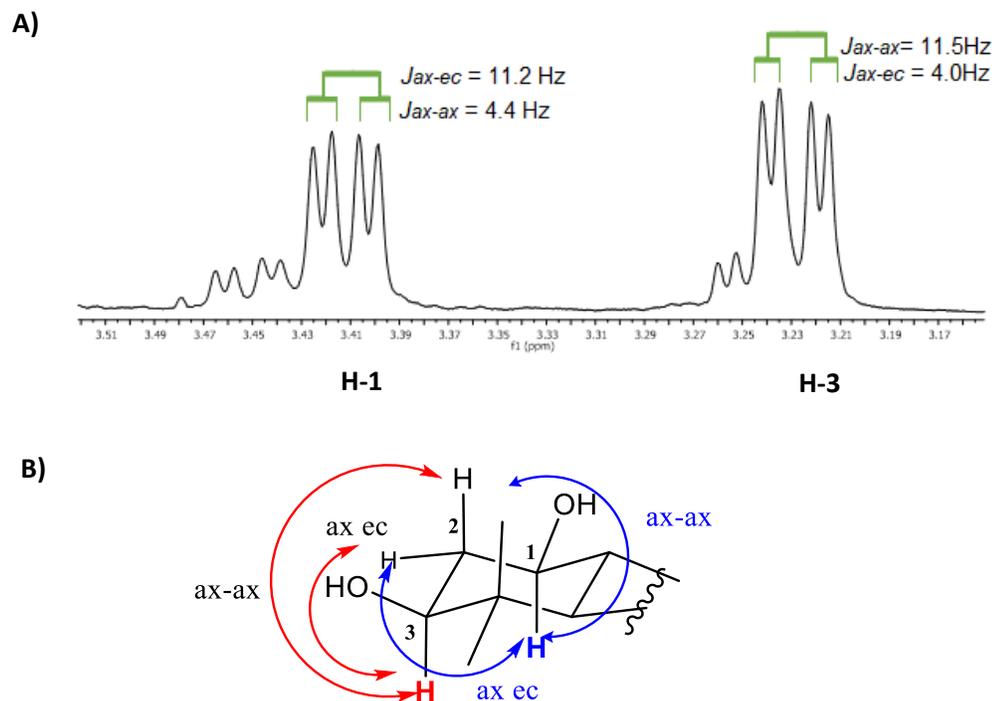


Figura 20. A) Expansión de ^1H de δ 3.23 y 3.34 ppm correspondientes a H-1 y H-3. B) Anillo A de 1,3 lupandiol (**20**).

En relación con los metilos C-23 - C-28 y C-30, al igual que **14** se observan siete señales simples que integran para 3 protones cada una, entre δ 1.66 y 0.73 (figura 21)

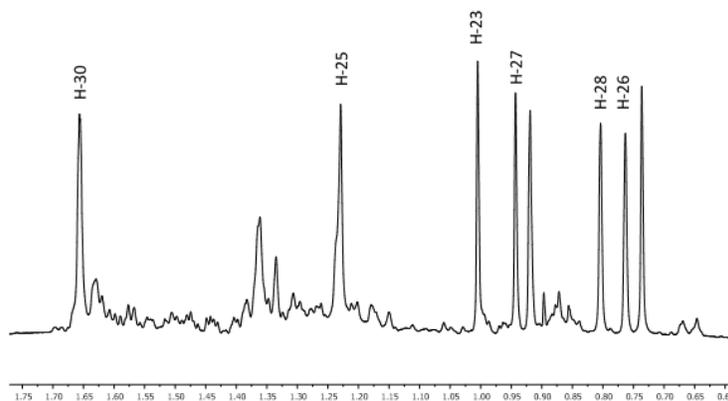


Figura 21. Expansión de ^1H RMN de las señales correspondientes a los metilos C-23 a C-28 y C-30.

Respecto al espectro de ^{13}C RMN (espectro 4 anexos) se pueden observar dos señales a campo bajo en δ 151.18, 109.83 que corresponden a los carbonos vinílicos C-20 y C-29, respectivamente. Por otro lado, los dos carbonos base de oxígeno se observan en δ 79.10 (C-1), 75.82 (C-3) (Puapairoj et al., 2005).

7.6 Actividad antiinflamatoria del extracto

El extracto de diclorometano de las hojas de *Bursera grandifolia* se evaluó *in vitro* por la inhibición del ON, mostrando una Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de 15.26 $\mu\text{g/mL}$, el cual resultó ser aproximadamente tres veces de mayor potencia que el control positivo Indometacina (Tabla 9).

Tabla 9. Inhibición de ON en Macrófagos RAW 264.7

Muestra	CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$]
E. diclorometano	15.26 \pm 0.88
Indometacina	54.69 \pm 10.3

*Ensayos realizados por triplicado a 30 $\mu\text{g/mL}$

De acuerdo con lo descrito en este trabajo, el extracto presenta un notable contenido de triterpenos tales como β -amirinona (**11**), β -amirina (**12**) lupenona (**13**), lupeol (**14**), 3-epilupeol (**18**), 1,3-lupandiol (**20**) y α -amirina (**19**). En este contexto, este tipo de triterpenos han sido reportados como importantes antiinflamatorios (Miranda et al., 2000; Aragon et al., 2004; Puapairoj et al., 2005; Siddique et al., 2011; Gallo et al., 2009).

Dentro de los triterpenos de mayor abundancia en este trabajo, fue el lupeol (**14**), este metabolito se ha encontrado en varios vegetales de consumo humano tales como tomate, zanahoria, té negro, entre otros. Además, tiene gran importancia farmacológica ayudando a combatir cáncer, y enfermedades estrechamente relacionadas con inflamación como lo es diabetes y artritis (Geetha et al., 2001; Siddique et al., 2011). Así mismo, Vasconcelos et al., 2008, describe la eficiencia de la administración de lupeol (**14**) en el tratamiento de asma bronquial, demostrando una atenuación de alteraciones de la inflamación alérgica de las vías respiratorias. Por otro lado, en 2018 Kasinathan, N. et al., reportaron que el compuesto **14** ayuda a regular las citocinas TNF- α e IL.

Otro compuesto de mayor abundancia en el extracto es la α -amirina (**19**) Miranda, A. et al en 2000 aislaron triterpenos de la corteza de *Himatanthus succuba* usado en la

medicina popular como remedio antiinflamatorio, evaluando farmacológicamente e identificando triterpenos de tipo lupeol (**14**), α -amirina (**19**) y cinamatos de lupeol, los cuales presentaron actividad antiinflamatoria al ser probadas en edemas de la pata de rata inducido por carragenina.

Aragon, G. et al., en 2004 con el objetivo de estudiar los efectos farmacológicos de una mezcla isomérica de dos triterpenos: α -amirina (**19**) y β -amirina (**12**) aislada de *Protium heptaphyllum* y mediante distintos modelos experimentales a nivel del Sistema Nervioso Central, concluyo que ambos compuestos poseen actividades analgésicas, antiinflamatorias (tanto cuando se usa profilácticamente como también terapéuticamente), sedantes, ansiolíticos y agentes antiplaquetarios.

Por otro lado, α -amirina (**19**) y β -amirina (**12**), mostraron ser agentes antiinflamatorios, reduciendo significativamente el edema causado por el TPA en orejas de ratón con porcentajes de inhibición de 68.8 y 77.5 respectivamente Matulevic et al 2016.

Otros triterpenos de este tipo de estructura han demostrado actividad inhibitoria *in vivo* en edema de ratón con % de inhibición importantes α -amirina (25.00 ± 1.81 , > 2.35), lupenona (57.25 ± 1.36 , 1.05), 3-epilupeol (66.39 ± 4.38 , 0.83). Estos mismos compuestos fueron evaluados *in vitro* con % de inhibición de ON α -amirina (93.65 ± 7.8 , 8.98), lupenona (96.82 ± 1.93 , 20.80), 3-epilupeilo (61.03 ± 7.44 , 43.31), Romero, A. 2017).

Finalmente, compuestos como lupeol (**14**), α -amirina (**19**) y β -amirina (**12**) han mostrado baja citotoxicidad en células sanas y actúan sinérgicamente cuando se utiliza en terapias combinadas (Gallo et al., 2009), tal podría ser el caso del extracto *B. granfolia* en donde podrían actuar en forma conjunta los triterpenos para inhibir el proceso de inflamación demostrado para el extracto $CI_{50} = 15.26 \mu\text{g/mL}$.

8. CONCLUSIONES

A partir de las hojas de *Bursera grandifolia* se obtuvo el extracto de diclorometano (CH_2Cl_2) con un rendimiento del 1.36 %. Su estudio químico permitió la identificación de 20 compuestos descritos principalmente como ácidos grasos (**2-8**), esteroides como el estigasterona (**15**), β -sitosterol (**17**), y triterpenos como β -amirinona (**11**), β -amirina (**12**), lupenona (**13**), 3-epilupeol (**18**), lupeol (**14**), α -amirina (**19**) y 1,3-lupandiol (**20**).

Los resultados relevantes de actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto de diclorometano de las hojas *B. grandifolia* cuya CI_{50} fue $15.26 \pm 0.88 \mu\text{g/mL}$, sugieren que la especie es capaz de intervenir en el proceso de inflamación de con la inhibición en la producción de óxido nítrico (NO), la amplia presencia de triterpenos en el extracto y los reportes farmacológicos de estos respaldan la actividad antiinflamatoria al extracto.

Asimismo, es la primera vez que se reporta un estudio fitoquímico del extracto diclorometánico de las hojas de *B. grandifolia* colectadas en el estado de Morelos; por lo cual contribuimos al contenido de fitoquímicos (principalmente triterpenos) de dicha especie vegetal.

Finalmente, el conjunto de los resultados químicos y de la actividad antiinflamatoria del extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de *B. grandifolia*, sustentan el uso etnomédico de la especie en la medicina tradicional mexicana.

9. REFERENCIAS

1. Angurel, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinares, I., Llor, N., Muñoz, D., Nicolás, E., Pérez, M., Dolors, M., Rosell, G., Seco, M., Velasco, D. (2009). Operaciones básicas en el Laboratorio de Química, Universidad de Barcelona.
2. Antúnez, M. (2012). *Estudio fitoquímico de Bursera vejar-vazquezii* (tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos.
3. Aragon, G., Glauce, V. (2004). *Actividad antiinflamatoria, antiagregante y efectos centrales de alfa y beta amirina de Protium Heptaphyllum Aubl March* (tesis de maestría). Facultad de Medicina, Universidad Federal de Ceará, Fortaleza.
4. Badui, S. (2006). Química de los alimentos Cuarta edición. México. Pearson Educación.
5. Becerra, J., Lawrence, D. (1999). Nuclear ribosomal ADN phylogeny and its implications for evolutionary trends in mexican *bursera* (burseraceae). *American Journal of Botany*, 86(7): 1047–1057.
6. Biodiversidad mexicana. (Recuperado el 10 de abril de 2020). En <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/copales/copales.html>
7. Bullock, A. (1936). Contribuciones a la flora de América tropical: XXVII. Notas sobre las especies mexicanas del género *Bursera*. *Boletín de información miscelánea (Royal Botanic Gardens, Kew)*, 1936 (6), 346-387.
8. Cabrera, J. (2014). Determinación de metabolitos secundarios en tres pteridofitos, plantas con interés medicinal.
9. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., De Vivar, AR, Avila, G., Duran, A. y Lira, R. (2005). Factor de consenso informante y actividad antibacteriana de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes de San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Revista de Etnofarmacología* , 97 (3), 429-439.
10. Chicopun *Bursera grandifolia*. (Recuperado el 15 de abril de 2020). En <https://www.naturalista.mx/taxa/283248-Bursera-grandifolia>.
11. Carrera, A., Rosas, R., Rodríguez, A., Canales, M., Román, A., Jiménez, R. (2014). Chemical composition and in vivo anti-inflammatory activity of *Bursera morelensis* Ramírez Essential Oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 758-768.
12. Carretero, M., López, L., Abad, J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., & Noguera, B. (2008). Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and

- fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 11-15.
13. Castro, J., Musso, F., Vetere, V., & Faraoni, B. (2019). Novel access to epilupeol through chemoselective hydrogenation of lupenone using platinum-based organotin catalysts. *Journal of Organometallic Chemistry*, 880, 333-340.
 14. Cruz, S. (2007). Más de 100 plantas medicinales en medicina popular canaria. *Las Palmas. Obra Social de La Caja de Canarias*.
 15. Cuatrecasas, J. (1957). Prima Flora Colombiana: 1. Burseracea. *Webbia*, 12(2), 375-441.
 16. De la Cruz, J., Doménech, T., Gimeno, V., Castro, M., & Bosch F. (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(1-2), 177-194.
 17. Taber, F. (1982). TLC mesh column chromatography. *The Journal of Organic Chemistry*, 47(7), 1351-1352.
 18. Espinosa, D. (2007). Catálogo de autoridades taxonómicas de la familia Burseraceae en México. Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, UNAM. Base de datos snib-conabio proyecto BS001. México.
 19. Espinosa, D., Llorente, J., & Morrone, J. (2006). Historical biogeographical patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *Journal of Biogeography*, 33(11), 1945-1958.
 20. Fibrosis (recuperado el 05 de octubre de 2020). En <https://www.lexico.com/es/definicion/fibrosis>.
 21. Gallo, B., & Sarachine, J. (2009). Actividades biológicas del lupeol. *En t. J. Biomed. Pharm. Sci*, 3 (1), 46-66.
 22. Barreno, P. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 102(1), 91-160.
 23. Gary, D. (2009). *Química analítica (6ta edición)*. University of Washington, Mc Graw Hill.
 24. García, J., Ramírez, B., Robles, G., Zañudo, J., Salcedo, A. & García, E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, (39), 29-44.

25. Geetha, T., Varalakshmi, P. (2001). Actividad antiinflamatoria de lupeol y linoleato de lupeol en ratas. *Revista de Etnofarmacología*, volumen 76, número 1, páginas 77-80.
26. Gomez, L., Mathe, C., Vieillescazes, C., Bucio, L., Belio, I., & Vega, R. (2014). Analysis of Mexican reference standards for *Bursera* spp. Resins by Gas ChromatographyMass Spectrometry and application to archaeological objects. *Journal of Archaeological Science*, 41, 679-690.
27. Investigación y conservación en el sur de Sonora, México. (Recuperado el 10 de abril de 2020). En https://www.desertmuseum.org/programs/altos_de_mesa_bursera.php
28. Kaplan, S., Billiar, T., Curran, D., Zdziarski, E., Simmons, L., Basford, RE. (1989). Inhibition of chemotaxis by N^G-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood*, 74 (6), 1885-1887.
29. Kasinathan, N., Subramaniya, B., Sivasithamparam, N. (2018). Regulación mediada por NF-κB / giro de la inflamación del colon por lupeol en la colitis inducida por sulfato de sodio dextrano en ratones. *Revista de alimentos funcionales*, volumen 41, páginas 240-249.
30. Khalid, S., (1983). Chemistry of the Burseraceae, Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Waterman and Grundon, Academic Press. London.
31. Kubes, P., Suzuki, M., & Granger, N. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 4651-4655.
32. Marletta, A. (1993). Nitric oxide synthase: structure and mechanism. *Journal of biological chemistry*, 268(17), 12231-12234.
33. Martinez, M. (1959). Las plantas medicinales en Mexico. Ed. Botas. México.
34. Matulevich, J., Gil, E., Ospina, L. (2016). Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de hojas, flores y frutos de *Bejaria Resinosa* Mutis ex L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 332-345.
35. McVaugh, R., & J. Rzedowski. (1965). Synopsis of the genus *Bursera* L. in western Mexico, with notes on the material of *Bursera* collected by Sessé & Mociño. *Kew Bulletin* 18: 317-361.
36. Mittermeier, R., Turner, W., Larsen, T. Brooks and C. Gascon. 2011. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: Zachos F.E., and J.C. Habel

- (eds). Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas. Springer, Heidelberg.
37. Lemos, R. (2008). Burseraceae. En: *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 66*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
 38. Messina, F., Curini, M., Di Sano, C., Zadra, C., Gigliarelli, G., Rascón, A., & Marcotullio, C. (2015). Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *Journal of natural products*, 78(5), 1184-1188.
 39. Miranda, A., Silva, J., Rezende, C., Neves, J., Parrini, S., Pinheiro, M., Cordeiro, M., Tamborini, E., Pinto, A. (2000). Actividades antiinflamatorias y analgésicas de los triterpenos que contienen látex de *Himatanthus sucuuba*. *Planta Med*, 66 (3): 284-286.
 40. Monroy, C., & Castillo, P. (2000). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biológicas. *Morelos, Universidad Autónoma del Estado de Morelos*. 216, 266.
 41. Monroy, C., & Monroy, R. (2004). Análisis preliminar de la dominancia cultural de las plantas útiles en el Estado de Morelos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, núm. 74, pp. 77-95.
 42. Nolasco, O. (2018). *Estudio fitoquímico de la actividad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectora de Hyptis mociniana (Benth)* (tesis de posgrado). Universidad nacional autónoma de México.
 43. Osuna, L., Tapia, M., & Aguilar, A. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*. Universidad de Barcelona
 44. Pavón, L., Jiménez, M., & Garcés, M. (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. México. Wolters Kluwer.
 45. Pedrozo, J. (2004). Productos Naturales Vegetales: Generalidades Químicas, Papel Biológico, Importancia Industrial. *Métodos de uso común en fitoquímica cuadernillos No 1 y No 3*. Grupo de Investigación Fitoquímica. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fe de Bogotá.
 46. Plantas Medicinales Mexicanas: de la tradición a la ciencia. (Recuperado el 01 de octubre de 2020) En <https://www.ciad.mx/notas/item/2151-plantas-medicinales-mexicanas-de-la-tradicion-a-la-ciencia>.

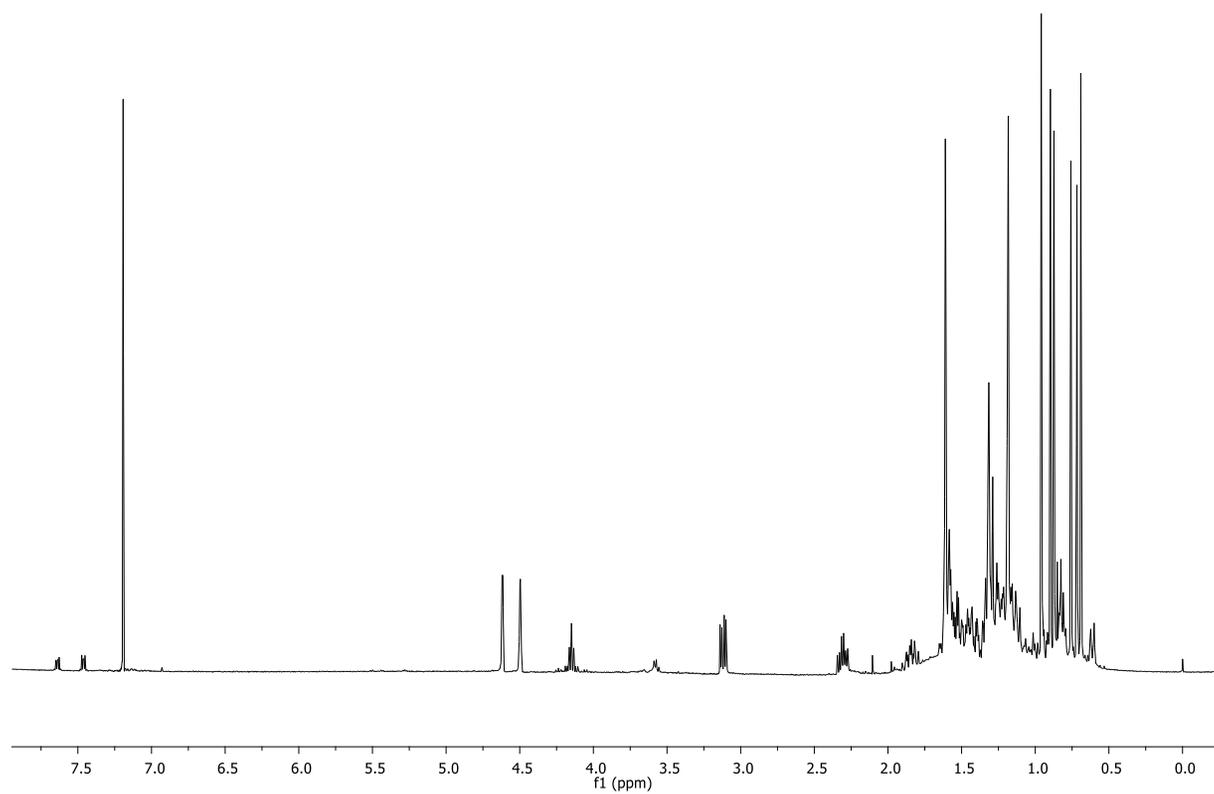
47. Puapairoj, P., Naengchomnong, W., Kijjoa, A., Pinto, M., Pedro, M., Nascimento, M. J., & Herz, W. (2005). Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta médica*, 71(03), 208-213.
48. Qué es la Farmacopea Mexicana. (Recuperado el 25 de octubre del 2020). En <https://www.farmacopea.org.mx/que-es-feum.php?m=2&sb=9&f=0>
49. Rojas, 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*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos.
50. Romero, A. (2017). *Estudio de triterpenos pentacíclicos modificados en el anillo A: Síntesis y evaluación de su efecto sobre la inflamación inducida in vivo e inhibición in vitro de la producción de óxido nítrico y de la actividad de las enzimas COX y PLA2*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos.
51. Romero, A., Maldonado, A., González, J., Marquina, S., Garduño, M., Rodríguez, V., & Alvarez, L. (2016). Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 1-10.
52. Ruiz, M., Susunaga, C. (2000). *Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens (burseraceae), frente a microorganismos como: Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium oxysporum, Trichoderma viride y Botrytis cinérea* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad. Santafé de Bogotá, D.C Javeriana.
53. Rzedowski, J., Guevara, F. (1992). Familia: Burseraceae. En: Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. Fascículo 3. Instituto de Ecología, A. C. Pátzcuaro.
54. Rzedowski, J., Kruse, H. (1979). Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxón* 28 (1/3): 103-116.
55. Rzedowski, J., Medina, R. & Calderon, G. (2007). Segunda restauración de *Bursera ovalifolia* y nombre nuevo para otro componente del complejo de *B. simaruba* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*, (81) 45-70.
56. Rzedowski, J., Medina, R., Calderón, G. (2004). Las especies de *Bursera* (burseraceae) en la cuenca superior del Río Papaloapan (México). *Acta Botanica Mexicana*, (66) 23-151.

57. Rzendowski J., Medina R. (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.
58. Sai, V., Chaturvedula, P., & Prakash, I. (2012) Isolation of Stigmasterol and β - Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International current pharmaceutical journal*, 1(9): 239 –242.
59. Salisbury, F., & Ross, C. (1992). *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericano. México. D. F.
60. Sánchez, B., León, I., Llanos, E., García, M., & Guevara, P. (2020). Cytotoxic activity and triterpenes content of nine Mexican species of *Bursera*. *Natural Product Research*, 1-5.
61. Schifter, L., Puerto, J., & Aceves, P. (2009). Las farmacopeas de México y Estados Unidos en el Nuevo Milenio: paralelismos y divergencias. . In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 75(4): 923-946.
62. Serrano, R., Vásquez, B., Segura, D., Anaya, L., Jimenez, M., Hernández, T., & Canales, M. (2012). Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México Implications for cutaneous wound healing. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(44), 5609-5615.
63. Siani, A., Ramos, M., Meneses, O., Ribeiro, R., Fernandez, E., Soares, R., Rosas, E., Susunaga, G., Guimaraes, A., Zoghbi, M. & Henriques, M. (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 57-69.
64. Siddique, H. R., & Saleem, M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life sciences*, 88(7-8), 285-293.
65. Suarez, G., Engleman, M. (1982). Estudio de los Canales Resiniferos de la Corteza de *Bursera Copallifera* y *Bursera Grandifolia*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 42: 41-54.
66. Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. Tercera edicion. *Sinauer Associates*, Inc., Publishers. Sunderland, USA.
67. Tejido conectivo (Recuperado el 05 de octubre de 2020). En <http://www.etitudela.com/profesores/rma/celula/04f7af9d5f0eaff01/04f7af9d5f0eb610b/04f7af9d5f0eb860f/#:~:text=Son%20un%20grupo%20de%20tejidos,el%20soporte%20material%20del%20cuerpo>

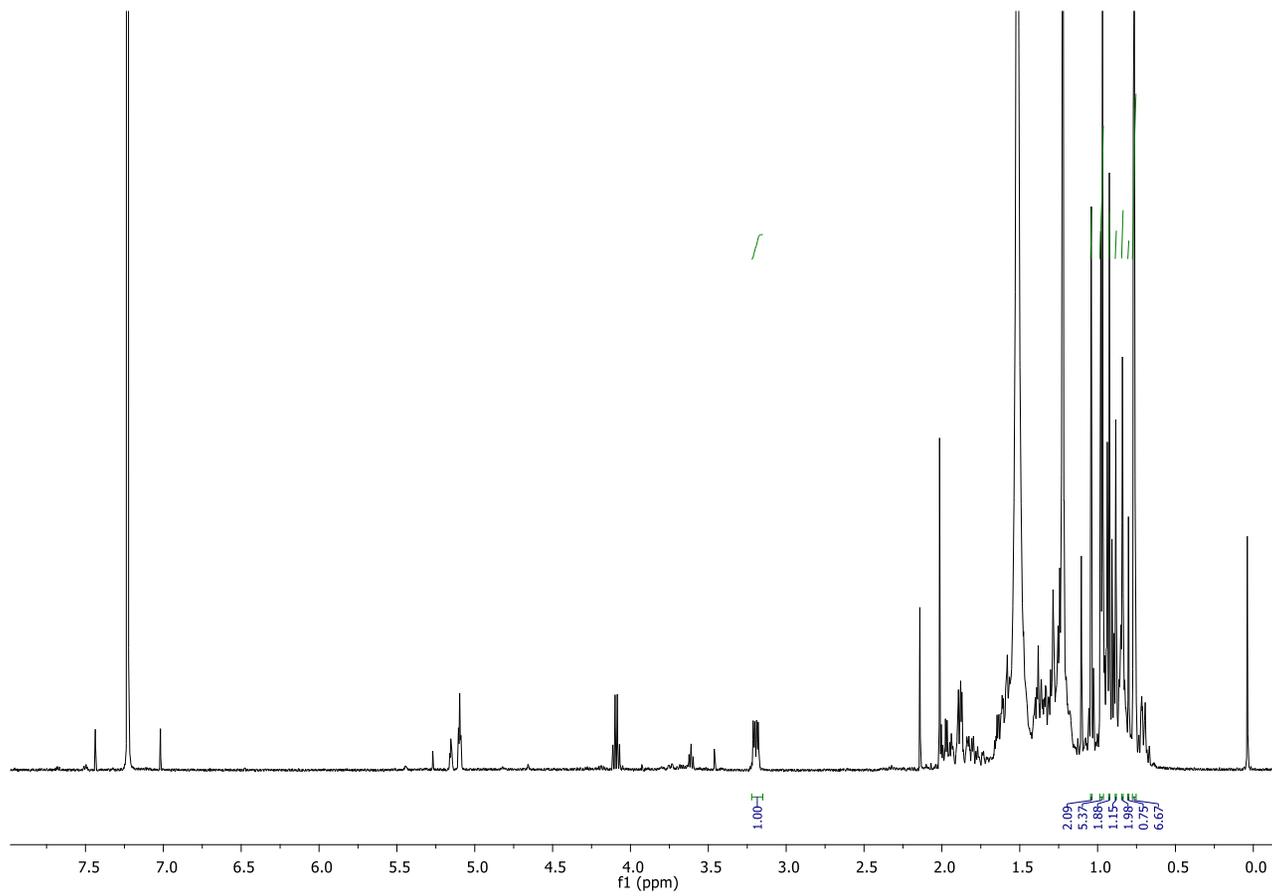
68. Vasconcelos, J., Teixeira, M., Barbosa, M., Lúcio, A., Almeida, J., de Queiroz, P., & Ribeiro, R. (2008). El lupeol triterpenoide atenúa la inflamación alérgica de las vías respiratorias en un modelo murino. *Inmunofarmacología internacional*, 8(9), 1216-1221.
69. Velázquez, F., Manríquez, R., Maya, L., Barrientos, L., & López, F. (2009). Phenacetin Isolated from *Bursera grandifolia*, Herbal Remedy with Antipyretic Properties. *Comunicaciones de productos naturales*, 4(11): 1575-6.
70. Villaseñor, J., & Ortiz, O. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División *Magnoliophyta*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, S134-S142.

10. ANEXOS

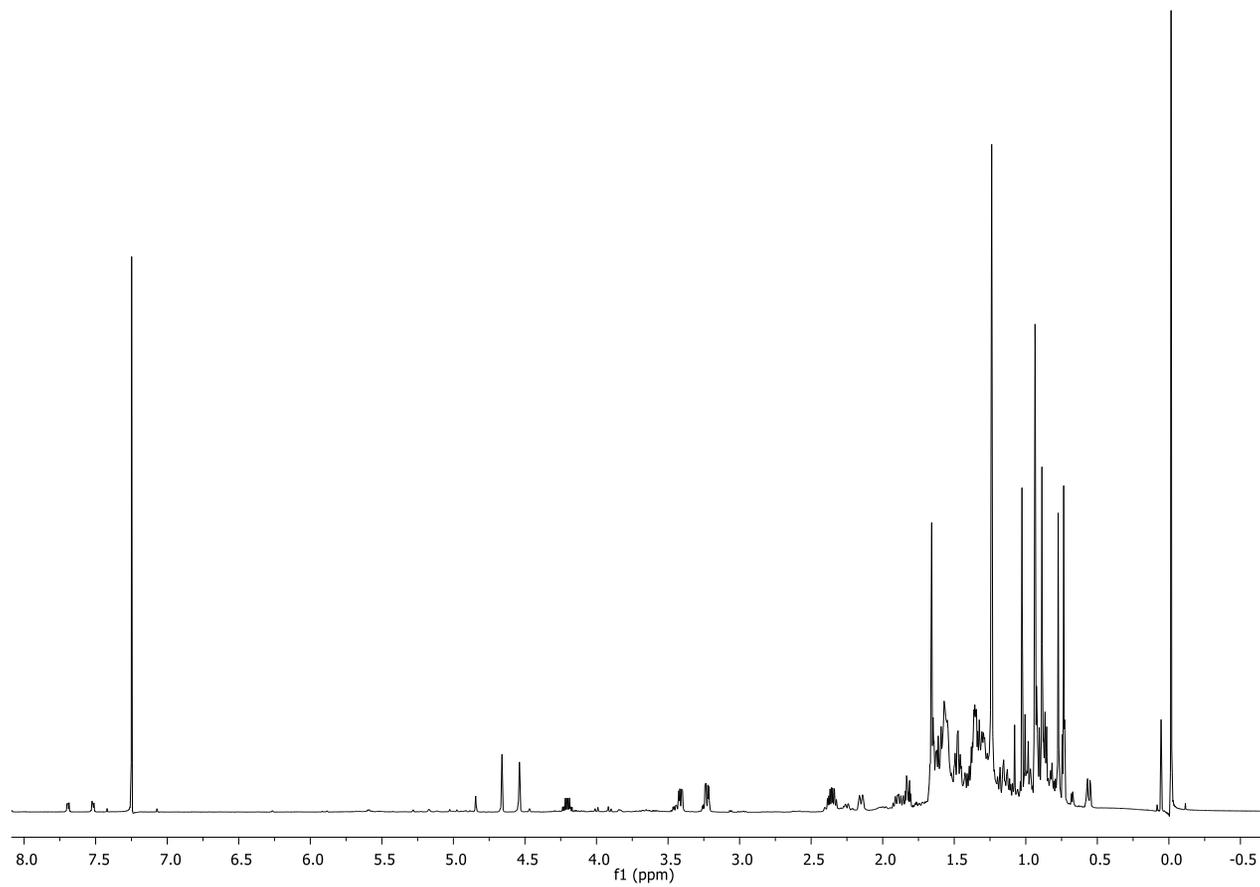
10.1 Espectros



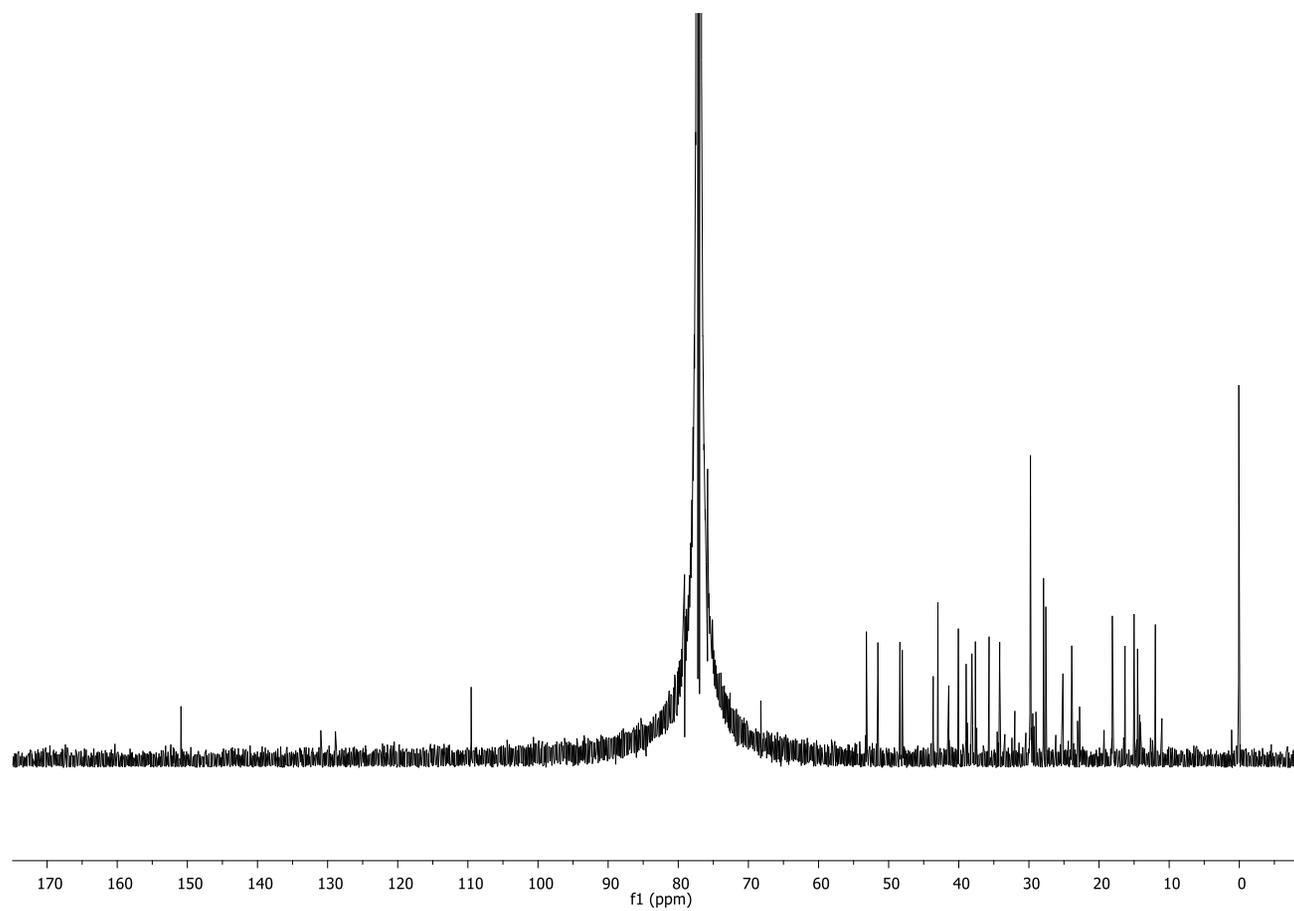
Espectro 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) lupeol (**14**).



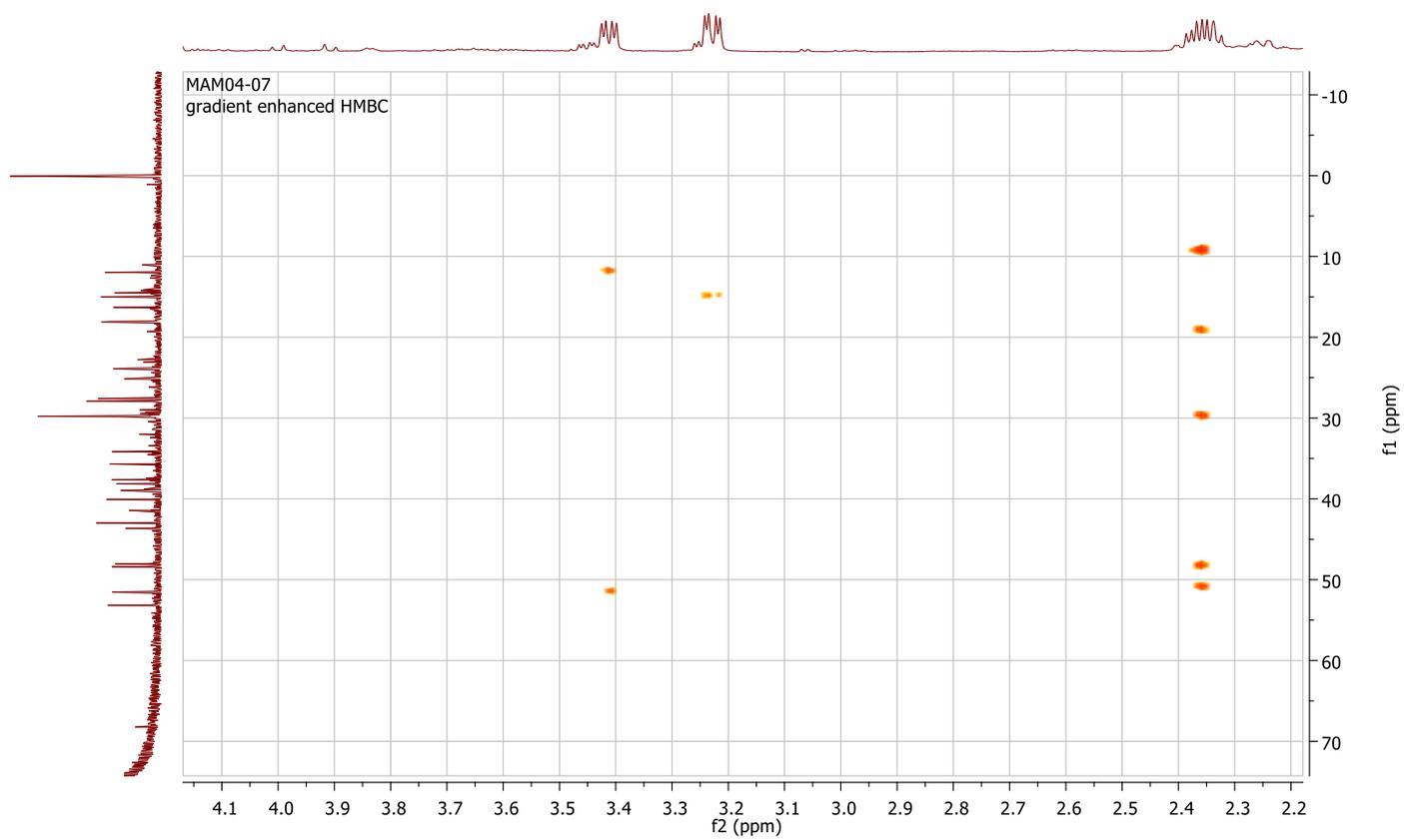
Espectro 2. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) α -amirina (19)



Espectro 3. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) 1,3-lupandiol (**18**).



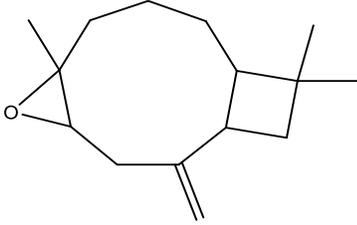
Espectro 4. ^{13}C RMN (175 MHz, CDCl_3) 1,3 lupandiol (**18**).



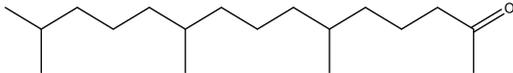
Espectro 5. HMBC RMN (175 MHz, CDCl₃) 1,3 lupandiol (18**).**

10.2 Lista de estructuras

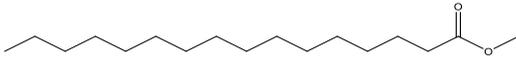
(1) Oxido de Cariofileno



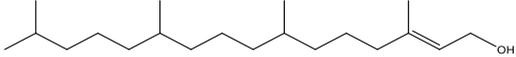
(2) Pentadecanona, 6,10,14-trimetil



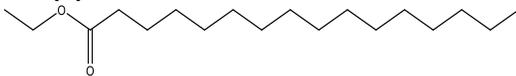
(3) Ácido hexadecanoico, metil ester



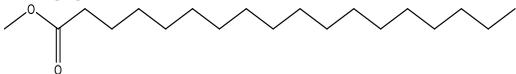
(4) 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol



(5) Ácido hexadecanoico, etil ester



(6) Ácido octadecanoico, metil ester



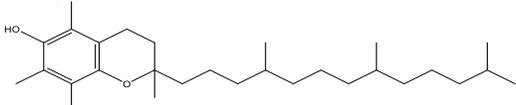
(7) 1-hexacosanol



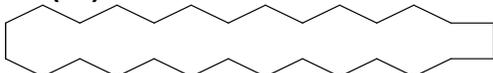
(8) 1-30-triacontanediol

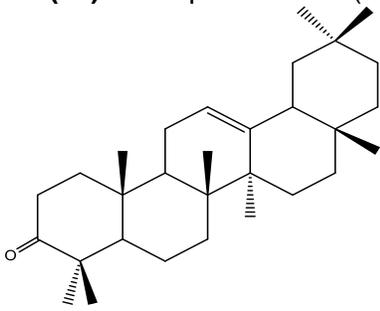
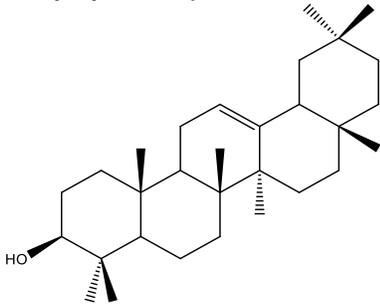
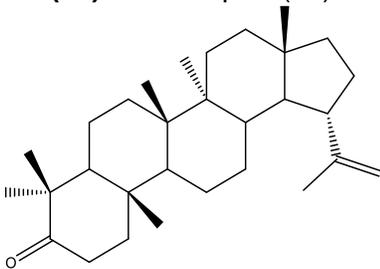
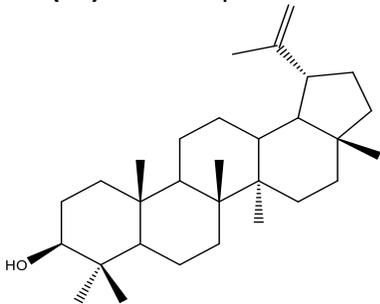


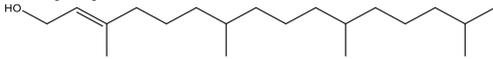
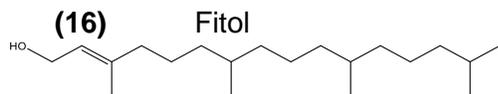
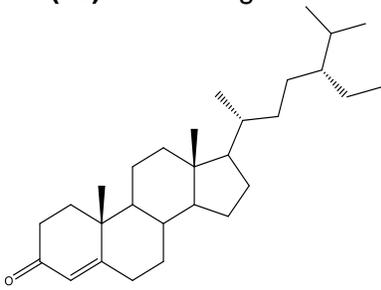
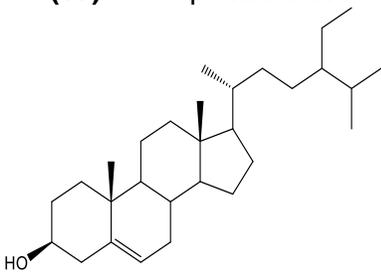
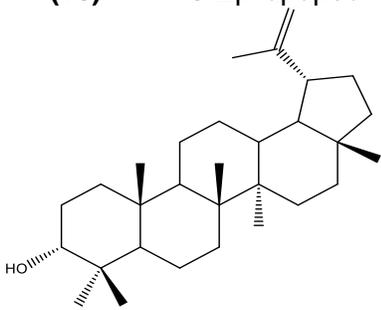
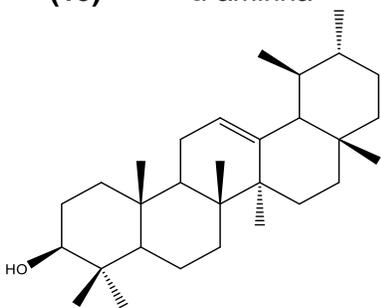
(9) Vitamina E



(10) Ciclooctacosan



(11) β -amirinona (11)**(12)** β -amirina**(13)** Lup-20(29)-en-3-ona**(14)** Lupeol

(15) Estigmast-4-en-3-ona**(17)** β -sitosterol**(18)** 3-Epilupupeol**(19)** α -amirina

(20)

1,3 lupandiol

