



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Estudio comparativo de la composición química y actividad
antiinflamatoria de los aceites esenciales de las resinas de *Bursera
copallifera* y *Bursera bipinnata*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA

PRESENTA:

Enrique Bezaleel Linares Espinoza

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **LINARES ESPINOZA ENRIQUE BEZALEEL** con número de matrícula **20144006904** cuyo título es:

“Estudio comparativo de la composición química y actividad antiinflamatoria de los aceites esenciales de las resinas de *Bursera copallifera* y *Bursera bipinnata*”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado en Diseño Molecular y Nanoquímica**.

Cuernavaca, Mor a 10 de diciembre del 2020

ATENTAMENTE
POR UNA HUMANIDAD CULTA

SE ADICIONA PÁGINA CON LAS EFIRMAS DE LOS SIGUIENTES:

DRA. LAURA PATRICIA ÁLVAREZ BERBER.
DR. MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR
DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2020-12-10 13:05:01 | Firmante

Q0Kb08HzKSIYUty5uZ/TTwLdMR2UnrftB/PXEVCrjJO83pQ7tOtoGTgmU1tuFGTDmMjX95LPgqAEOBLSfksTl0Kt5aM+rH89FCVK0EF5bRmX9//nZ0PJ7GulwYxZoafUT4pKDFIcp+J0FOM7S7lxE6AqFz4Yjw/iijeBpT4rwc413SUahXY20A0K+1Cjywxjdz59wl4w6KJ/Rv/ZfkkXJHJm8duNALEU91tTrl9Q2hel/JCsbNxxvH079v4W8wZ+UTdRP0zm1nOobCEgWbdeRI7O2x06ixxNWG2v+kseTF9re0qMLBIAC3Lr+N/WX0gkHYhqm+/4w73hIFqEw==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-12-10 13:09:51 | Firmante

AL5vTTqCxiH9dwgDBGH/ofNEh/iXILfhCHWDw6VH4toPs5MyYIneARrpJ2fWjSaSZ/gS1cCxq209ZPCbwHsfkNL16X8lhaCsEnw+RfDLSd7t684I3lqLEG9250YL1h5uwIDZWhhndEzgcx+6KOylScEnMPyPZjRNwzH+J3oSfOKvSUr7edleG7vkMn+C0OVFoZ05443wrGEtYOWNHGvb7JKwdVm1Lu9n0tkXBNFuGvXGha2yxxCdZLH2Ukbe4s1cPKmOO3YCRrPsnW3rYutT/grcKFL5yB7onL4plaLKRkuc5AxdflzQtb32RIPLVUAs9P8M75tBiwSgUNqaMC0w==

MARIO ALFONSO MURILLO TOVAR | Fecha:2020-12-10 13:15:08 | Firmante

N81UPw1du+jcSiCiJfypqF34QZbgKyy5JEBPFxg/j8BtqeXdjBEW611MVEN7AooaGG6+ianrR4x7Kjp69BYM7RxyMv71TPpeeHZb3omuWlj45j3sKlq6Lro+2UrrNBXnBFe6oXz0CKx2j9VM+dSFx9ISXKLBUzi2YN2/BsliCel56isiSoMZpdvqfNwYSjRX3b7A3SOI2mDd4E/7VXROHQFZpXiYo2ZsEdUn/UL79cR0USXbMJej+CDaSrDnka3can8nwwaKAvQKZAEXTV59mWBtIE4AIIKTF8YtietAgTZl0c/ud2f0FotCFIliTobR2uRibnQyF/3Juw==

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2020-12-10 13:28:41 | Firmante

KYi9xKHGv5RgMpStXHGog9CYGpT8Gh7KmHu6HBt3hrsAd9hlHGpC8piikyOugCooNvt1TupNOuShxMrJRZppA52ljgERzBawJTa838y9X44GkkI2S7t/4VyqNO+IX1n0weJW/IKOYhBWK1t6EapNg9o0ip0g/aOg6NWQ94seOWm5wyDpLSTqBAGwqW5L4q+t21UCAYYAfqa3XGhDkyBv/3gkeXF1Y5CnhJFo/JGfNJKhJXhJ7DsZKD5W2lxvK8A2zzfAgE7Ha2PMS6stNoYTJzGr2VYP+eZOBVzYgtPORHNCsen9LjrreLnCFzza11dLRuaYdklPfpALumV2skExg==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2020-12-10 13:45:15 | Firmante

iCLU1Av7ArL0bDMdfQbmcxTpbZ6hHiGmmZujcyL22jlcBrqgxin1MmXUONStwahI0I0lRlHk3hjmot8CgKv4cclAd1FgcDGefjqAgV7LyxYGCtLGR8VeL8+c5xpnCHAU2M64cyDcTKc6p7RZd56cYmsUefiEzxoEIXUFBeZxRxyZrx0FkrAa9OYGXie4mDdKzcvidi3Xpg2/zVrcw7W1dyxwXFxHRos8sWDO9N3i/WU4RFzFqH5D/CrKiY0aao2eMgx07/HWULE2Hv30fh5/jeOKDYBTxyt3ur0vUuTeie7fHON15JjtHsCgYqkjpMr7RKDasVf1NGrZAv+kKg==

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



d1RuJa

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/rmo1Ss7TevmtlZUWuk7QIXZ5kVTBzgam>



❖ **Agradecimientos**

- ✚ La mayor parte de lo que soy se lo debo a mi papá Moisés Linares Franco, sé que tu mayor sueño era ver titulado a alguno de tus hijos y aquí estoy, cumpliendo tu gran anhelo, tus horas trabajando, tu cansancio por lograr darme estudio ha valido la pena, sé que ahora estás en un lugar mejor mi ángel de la guarda, y desde donde estés te dedico este logro, gracias por seguir cuidando de mi desde el cielo, gracias por ser mi motivación, mi todo y mi motor para seguir adelante. Gracias por tu amor infinito #TeAmoHastaElCieloPapá.
- ✚ A mi mamá María de los Ángeles Espinoza Jiménez, mujer valiente, de ti aprendí a tomar valor para enfrentar mis propios miedos, de ti aprendo que el amor incondicional y real si existe, no hay palabras para expresar tu apoyo y nunca dejarme caer.
- ✚ A mis hermanos Lorena e Israel, por estar siempre conmigo, por apoyarme en cualquier momento, gran parte de este logro se los debo a ustedes.
- ✚ A mi familia, quienes me ayudaron a lo largo de mi carrera para poder culminarla y salir adelante.
- ✚ A mis compañeros del laboratorio 321 por recibirme de la mejor manera y apoyarme cuando lo necesitaba.
- ✚ A Araceli y América por sus consejos, ayuda y amistad brindada, por las diversas aventuras recorridas en nuestros proyectos de tesis.
- ✚ A mis amigos del laboratorio 323: Vianey Ruiz, Vianey de la Rosa, Daniela Patrón, Daniela Molina, Stephanie, Lili, Dulce, Yordin y Diana.
- ✚ A mis amigos de carrera: Abner, Regina, Gres, Cynthia, Fernando, Lupita, Erika, Mar y Mizael por su amistad y aventuras vividas durante la licenciatura.
- ✚ A mis amigos: Junior, Karla, Juan Carlos y Octavio por su amistad y ayuda incondicional, por dejarme ser yo mismo con ustedes sin temor a ser juzgado.
- ✚ Gracias Dra. Laura Patricia Álvarez Berber por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto en su laboratorio, por sus enseñanzas y su apoyo.
- ✚ A mi asesora de tesis la Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica por su paciencia, apoyo y entusiasmo, por darme una segunda oportunidad y creer en mí, no

tengo palabras para describir el agradecimiento que tengo contigo, continúa siendo una excelente asesora, llegarás muy lejos como investigadora. Simplemente gracias.

✚ Al Dr. Antonio Romero Estrada, gracias por enseñarme e instruirme en esta nueva área biológica de la que conocí gracias a ti, por tus consejos y por tu amistad.

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 Antunez 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 bajo la colaboración del 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.

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
μmol	Micromol
ADP	Adenosín difosfato
AeRbc	Aceite esencial resina <i>Bursera copallifera</i>
AeRbb	Aceite esencial resina <i>Bursera bipinnata</i>
ATP	Adenosín trifosfato
bar	Unidad de presión
B4	Leucotrieno B4
<i>B. bipinnata</i>	Bursera bipinnata
<i>B. copallifera</i>	Bursera copallifera
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
COASH	Coenzima A
CO ₂	Dióxido de carbono
COX1	Ciclooxigenasa 1
COX2	Ciclooxigenasa 2
C4	Leucotrieno C4
D	Dextrógiro
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro
DC	Células dendríticas
DE	Desviación estándar
DL ₅₀	Dosis letal media
DMAPP	pirofosfato de dimetilalilo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO ₅₄₀	Densidad óptica a 540nm
D4	Leucotrieno D4
E	Diastereómero E
<i>epi</i>	epímero
ETOP	Etopósido
E4	Leucotrieno E4
Fig	Figura
FPP	Farnesil pirofosfato
g	Gramos
g/L	Gramos sobre litros
g/mol	Gramos sobre mol
GPP	Geranil pirofosfato
h	Horas
H1	Receptor de histamina H1
H ₂ O	Agua

HT1080	Línea celular de fibrosarcoma HT1080
Hz	Hertz
IFN- γ	factor de necrosis tumoral gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
in	Pulgadas
INDO	Indometacina
IPP	pirofosfato de isopentenilo
KB	Células KB
L	Levógiro
Lbs	Libras
LOX	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
mg	Miligramos
Mich.	Michoacán
mL	Mililitros
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B	factor nuclear kappa-B
NK	Células "natural killer"
nm	Nanómetros
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
ON	Óxido nítrico
<i>p</i>	Sustitución <i>para</i>
PAMP	patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos
PC12	Línea celular de feocromocitoma PC12
PGE2	Prostaglandina PGE2
PGF2	Prostaglandina PGF2
PGI2	Prostaciclina PGI2
psi	Libra por pulgada cuadrada
R	Isómero R
RBb	Resina Bursera bipinnata
RBc	Resina Bursera copallifera
REBIOSH	Reserva de la biósfera sierra de Huautla
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas del oxígeno

s	Segundos
SBC	Selva baja caducifolia
SFB	Suero fetal bovino
Tαβ	Linfocitos Tαβ
Tγδ	Linfocitos Tγδ
TCR	Receptor de linfocitos T
TGA2	Tromboxano TGA2
TLR	Toll-like receptor
TLR-3	Receptor "Toll" 3
TLR-4	Receptor "Toll" 4
TLR-5	Receptor "Toll" 5
TLR-6	Receptor "Toll" 6
TLR-7	Receptor "Toll" 7
TLR-8	Receptor "Toll" 8
TLR-9	Receptor "Toll" 9
TLR-10	Receptor "Toll" 10
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TxA2	Tromboxano TxA2
V	Volts
Z	Diastereómero Z

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Copales	2
2.2 Género <i>Bursera</i>	4
2.2.1 Actividades biológicas de diferentes especies de <i>Bursera</i>	5
2.2.2 <i>Bursera</i> en el estado de Morelos	7
2.3 <i>Bursera bipinnata</i>	8
2.4 <i>Bursera copallifera</i>	10
2.5 Aceites esenciales	11
2.5.1 Métodos de extracción	13
2.5.2 Extracción supercrítica con CO ₂	13
2.5.3 Terpenos	15
2.6 Inflamación	22
2.6.1 Inmunidad innata y adaptativa	22
2.6.2 Células madre sanguíneas	23
2.6.3 Invasión microbiana	24
2.6.4 Receptores de reconocimiento de patrones (RRP): TLR LPS NOD	25
2.6.5 Células centinela	26
2.6.6 Moléculas vasoactivas	26
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 General	32
4.2 Específicos	32
5. METODOLOGÍA	33
5.1 Material vegetal	33
5.2 Extracción supercrítica con CO₂	33
5.3 Análisis por CG-EM	34

5.3.1 Preparación de muestras para cromatografía de gases	34
5.3.2 Especificaciones de cromatografía de gases	35
5.4 Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	35
5.4.1 Cultivo celular	36
5.4.2 Ensayo MTS para determinar la viabilidad celular.....	36
5.4.3 Tratamiento de los macrófagos con LPS.....	36
5.4.4 Determinación de la concentración de ON	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 Análisis químico de los aceites esenciales de <i>Bursera copallifera</i> 2015	38
6.2 Análisis químico de los aceites esenciales de <i>Bursera bipinnata</i> 2015.....	43
6.3 Análisis químico de los aceites esenciales de <i>Bursera bipinnata</i> 2019.....	49
6.4 Comparación química de los aceites esenciales de <i>B. bipinnata</i> colecta 2015 y 2019.....	52
6.5 Comparación química de los aceites esenciales de <i>Bursera bipinnata</i> y <i>Bursera copallifera</i> 2015	55
6.5.1 Monoterpenos y sesquiterpenos.....	59
6.5.2 Triterpenos	61
6.6 Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	62
6.6.1 Viabilidad celular	62
6.6.2 Evaluación Óxido Nítrico.....	63
6.7 Análisis del contenido metabólico vs actividad biológica	65
7. CONCLUSIONES	68
8. PERSPECTIVAS	70
9. BIBLIOGRAFÍA	71
10. ANEXOS.....	77
Anexo A. Protocolo de uso del extractor melloeX marca <i>Alegre Science</i>	77
Anexo B. Claves numéricas de los compuestos	80
Anexo C. Biblioteca de estructuras químicas.....	82
Anexo D. Efecto de las resinas y aceites esenciales sobre la producción de ON en macrófagos RAW 234.7 estimulados con LPS	89

Resumen

Bursera copallifera y *Bursera bipinnata* son las especies más representativas de los árboles de copal en México. De ellos emana una resina aromática conocida también como copal (del náhuatl *copalli*, que significa resina o incienso), con diversos usos ceremoniales y medicinales, tales como antiinflamatorios.

En la presente investigación, se estudiaron los aceites esenciales de las resinas de *B. copallifera* y *B. bipinnata* colectadas en 2015 (**RBc2015** y **RBb2015**), además de una colecta adicional para *B. bipinnata* en 2019 (**RBb2019**), todas ellas fueron colectadas en el estado de Morelos. Una vez obtenidas y solidificadas, fueron extraídos sus aceites esenciales, mediante un extractor de líquidos supercríticos con CO₂, los aceites obtenidos fueron analizados mediante CG-EM y evaluados *in vitro* para determinar su potencial inhibitorio sobre la producción de ON, un mediador del proceso inflamatorio.

Los resultados indicaron que en el aceite esencial de *B. copallifera* (**AeRBc2015**) se identificaron 14 monoterpenos siendo los mayoritarios **132** (29.511%), **133** (28.771%), **134** (7.237%) y 4 triterpenos pentacíclicos (**10, 12, 13, 135**).

En cuanto al aceite esencial de *B. bipinnata* (**AeRBb2015**) se identificaron 16 monoterpenos, siendo los mayoritarios **60** (15.54%), **98** (11.69%), **142** (9.24%) y 4 triterpenos pentacíclicos (**10, 12, 13, 135**). Finalmente, para la colecta de esta misma especie, pero del 2019 (**AeRBb2019**), se identificaron un total de 23 monoterpenos teniendo como mayoritarios a **132** (24.4%), **61** (8.275%), **158** (8.047%) y 4 triterpenos pentacíclicos (**10, 12, 13, 135**).

Con la finalidad de comprobar la eficacia de extracción de los aceites, se decidió analizar por CG-EM las resinas (**RBc2015, RBb2015 y RBb2019**) y los remanentes de las resinas después de la extracción. De manera global, se observó que, en los remanentes, se detectaron principalmente cuatro triterpenos mencionados anteriormente (~ 70%) y apenas se observó menos del 1.5 % de abundancia en monoterpenos, lo cual indicó la extracción casi total de los aceites esenciales.

Por otro lado, todas las resinas (**RBc2015**, **RBb2015** y **RBb2019**) y sus respectivos aceites (**AeRBc2015**, **AeRBb2015** y **AeRBb2019**) fueron evaluados *in vitro* en el modelo de inhibición de ON en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, con un previo análisis de viabilidad celular, esto con el fin de realizar un análisis comparativo de la actividad antiinflamatoria de las diferentes muestras evaluadas.

Los resultados mostraron un porcentaje de inhibición de 47.49 ± 1.43 , 51.65 ± 3.45 y 65.83 ± 8.53 para **RBb2015**, **RBc2015** **RBb2019**, respectivamente. Por otra parte, para los aceites esenciales **AeRBb2015**, **AeRBc2015**, **AeRBb2019** se obtuvo un porcentaje de inhibición del 75.44 ± 8.12 , 72.17 ± 1.82 y 37.43 ± 7.13 , respectivamente.

De manera general se obtuvieron aproximadamente un 20% más de inhibición de ON en los aceites esenciales en comparación con sus respectivas resinas, por lo que, se sugiere que la presencia de monoterpenos potencia la actividad antiinflamatoria.

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La inflamación se considera una respuesta de los tejidos a estímulos nocivos de origen externo, provenientes de infecciones o de daño del propio tejido. Dicho proceso está asociado a diversas patologías como dermatitis, artritis y enfermedades respiratorias, entre otras [García 2008]. Por lo que su estudio ha sido de interés para muchos grupos de investigación, incluyendo a algunos productos naturales derivados de especies vegetales como *Bursera*.

El género *Bursera* concentra cerca de 100 especies a lo largo del continente americano, de las cuales cerca de 80 están distribuidas en México, taxonómicamente se dividen en burseras y cuajotes. Las especies de *Bursera* son muy resinosas y sus resinas (copales) poseen un olor aromático muy característico a pino y limón. Dentro de las especies de copal se encuentran *Bursera copallifera* y *Bursera bipinnata*, distribuidas principalmente en Michoacán, Guerrero, Oaxaca Puebla y Morelos. Sus usos medicinales se han descrito con propiedades antiinflamatorias, para el uso en dolores dentales, así como calmante de dolores de cabeza provocados por la migraña [Montúfar 2015]. Estudios fitoquímicos previos realizados en nuestro grupo de investigación han encontrado una gran abundancia de compuestos no volátiles, principalmente de triterpenos de tipo lupano y ursano con importante actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, α -amirina, ácido ursólico, epilupeol, lupenona y acetato de epilupeol inhibieron la secreción de ON con valores de CI_{50} en el rango de 8.9 - 31 μ M y mostraron un % de inhibición en edema de ratón inducido por TPA de entre 25 – 66 %. [Romero 2018].

En este trabajo se realizó un estudio químico comparativo de los aceites esenciales de las resinas autenticadas de *B. bipinnata* y *B. copallifera* colectadas en el estado de Morelos. Con la finalidad de comparar la composición química y actividad antiinflamatoria *in vitro* de ambas especies.

2. ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1 Copales

Se conoce como copal a la resina producida por el copal y otros árboles de la familia *Burseracea*, la cual se utiliza principalmente como incienso y para fabricar barnices (del náhuatl de “*copalli*”, que significaba resina o incienso). Existen varios tipos de copal (**Figura 1**); el copal de piedra es la resina que emanan y se solidifica tornándose de color negro producida cuando algunos insectos, como gusanos, provocan heridas en la corteza de estos árboles. La mirra se conoce como los fragmentos desprendidos del tronco impregnados de resina como consecuencia de los cortes hechos para su extracción. El tecopal son estructuras pequeñas y redondeadas con piedra de hormiguero y resina de copal. Debido a la demanda de copal durante todo el año, los copales sintéticos han sido de gran ayuda en la religión católica principalmente, pues éste se puede conseguir todo el año y es muy económico comparado con las resinas naturales, el incienso de Castilla es el que más se utiliza en las ceremonias religiosas. El copal blanco es el que se extrae de los troncos, las personas dedicadas a este oficio van extrayendo las impurezas lo que resulta en que el costo de la resina sea más elevado [Purata 2008].

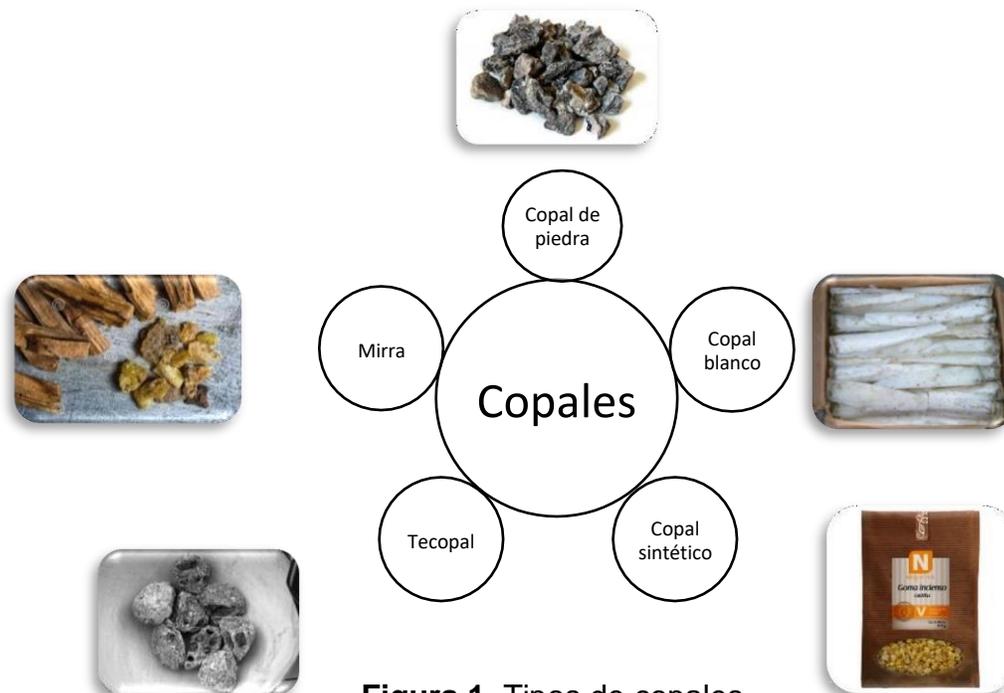


Figura 1. Tipos de copales.

Las resinas de los árboles del copal son utilizadas desde culturas prehispánicas, como comunicación debido a que al quemarse éstas desprenden un humo aromático y pensaban que era un puente de comunicación entre los dioses y el hombre, como medio de purificación de lugares y personas o lo que comúnmente conocemos como “limpias”, también se sigue utilizando en la actualidad en ceremonias religiosas y tradiciones como el “día de muertos” en México [Purata 2008].

Como uso medicinal, la resina se quemaba y se utilizaba como antiinflamatorio para torceduras, emplasto para fracturas, para dolor de dientes, bronquitis, enfermedades de la piel, enfermedades del frío y humedad. En el uso doméstico, la gente lo ha utilizado como barniz para recubrir sus trabajos y las culturas precolombinas lo utilizaban como pegamento para los mosaicos también para moldear figuras y ofrecerlos a sus dioses [Dorado Hypatia; Montúfar 2015; Lona 2004].

Es una gran actividad económica en muchos municipios, las personas que extraen la resina se hacen llamar “copaleros”, lo cual incluye una ardua labor, familias enteras se transportan a las serranías durante meses para la recolección del copal y así poder venderlo en los tianguis y ferias [Linares 2008; Montúfar 2015]. La extracción consiste en hacer cortes transversales con una navaja llamada “Quichala”, del tronco se amarra una hoja de encino que sirve de puente para que la resina caiga a una hoja de agave con un tapón al final de ésta llamado “zapatito” (hecho de estiércol de vaca, agua y arcilla) y tome la forma de barra para un mejor transporte a los diferentes municipios (**Figura 2**).

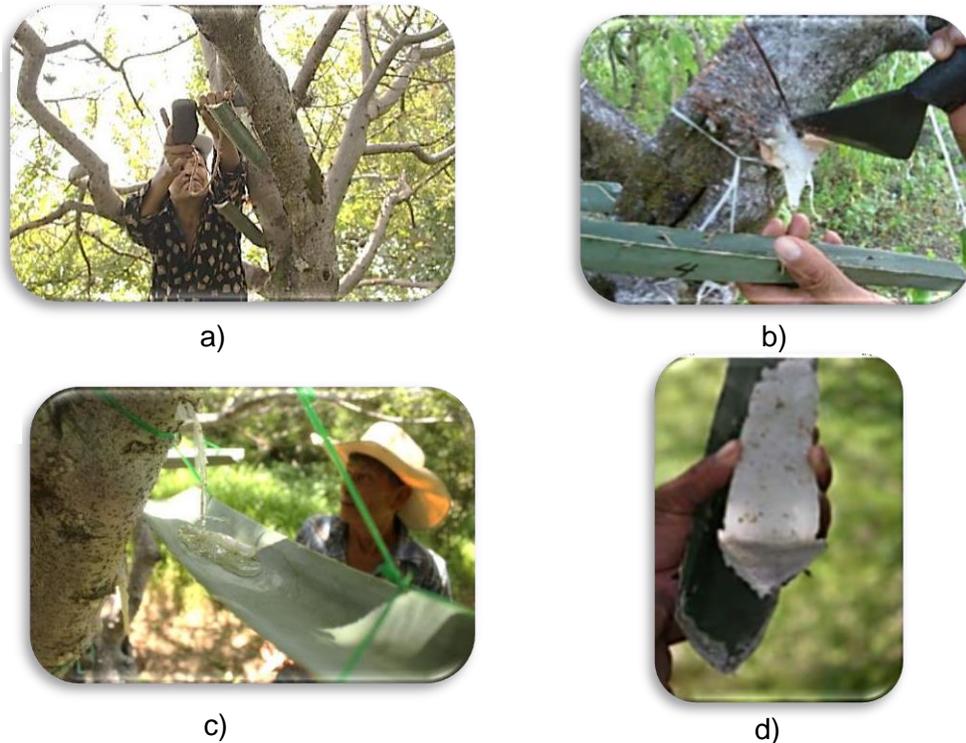


Figura 2. a) cortes en el árbol, b) extracción de resina, c) colecta de resina, d) resina solidificada de *Bursera bipinnata*.

Foto de: M. BIBC Fidel Ocampo.

2.2 Género *Bursera*

El género *Bursera* en México comprende un total de 84 especies distribuidas principalmente en los estados de Oaxaca, Guerrero, Puebla y Morelos, siendo como principal ecosistema la Selva baja caducifolia (SBC) de clima seco, donde los árboles y arbustos pierden sus hojas de octubre a mayo [Dorado HYPATIA].

A su vez, el género *Bursera* se divide en dos subgéneros: *Bullockia* y *Bursera* [Acta Botánica Mexicana 2004], la primera comprende a los cuajotes siendo su principal característica su corteza exfoliante y la segunda pertenecen los copales que por el contrario a los cuajotes mantienen una corteza no exfoliante (lisa) como se muestra en la **Figura 3**.

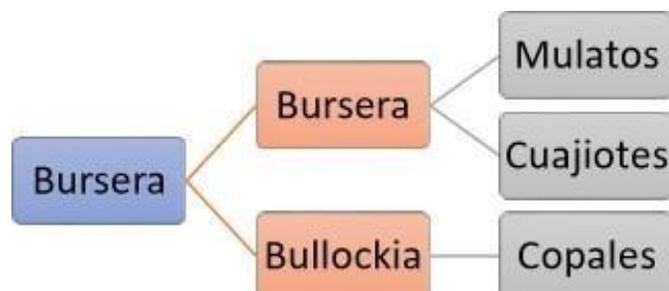
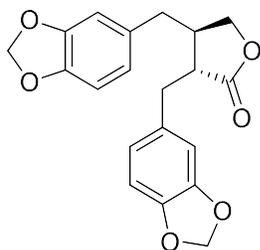


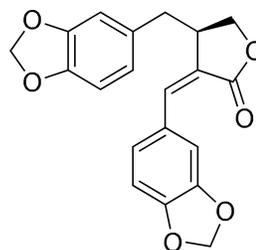
Figura 3. Subgéneros del género *Bursera*.

2.2.1 Actividades biológicas de diferentes especies de *Bursera*

Se han descrito varios estudios de distintas especies de *Bursera* entre los que se encuentran *Bursera citronella* descrito como antitusivo [Marcotullio 2018], además de dos lignanos aislados [Koulman 2003] llamados hinokinin (1) y savinin (2), siendo el primero reportado con actividades biológicas como antiinflamatorio, inmunopresivo, antibacterial, antiviral, antiespasmódico, antileucémico, antiproliferativo, neuroprotector, promotor de crecimiento de neuritas en células PC12 y antimicrobiano contra *Trypanosoma cruzi* [Marcotullio 2018].

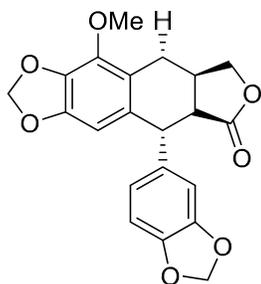


Hinokinin (1)

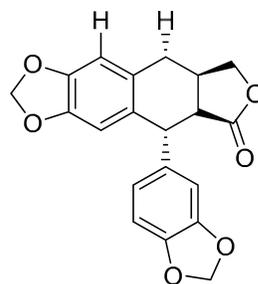


Savinin (2)

En *Bursera graveolens* del extracto metanólico de tallos se aislaron dos nuevos lignanos ariltetralin reportados como burseranin (3) y picropoligamain (4) con actividad citotóxica contra línea celular humana HT1080 fibrosarcoma [Nakanishi 2005]

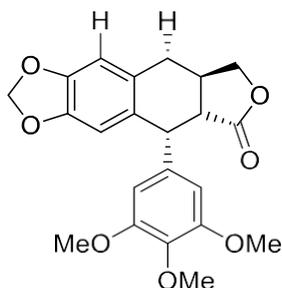


Burseranin (3)

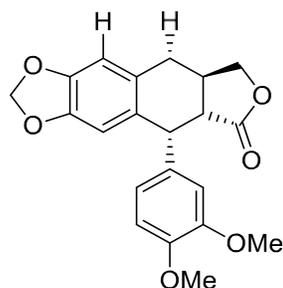


Picropoligamain (4)

En *Bursera morelensis* se ha determinado actividad antimicrobiana [Canales 2017] y propiedades antiinflamatorias de los aceites esenciales [Carrera 2014] así como la identificación de dos lignanos denominados deoxipodofilotoxina (5) [JOLAD 1977] y morelensin (6) siendo el último activo contra células cancerosas KB (Carcinoma epidermoide) [Marcotullio 2018].

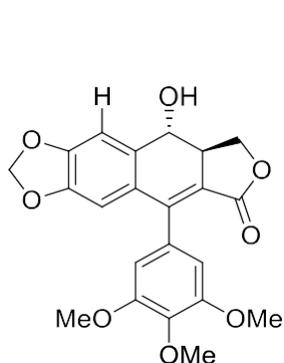


Deoxipodofilotoxina (5)

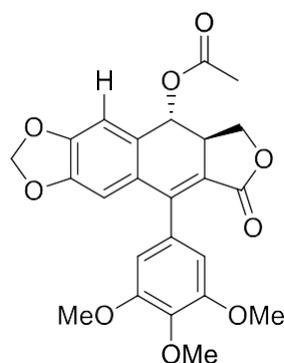


Morelensin (6)

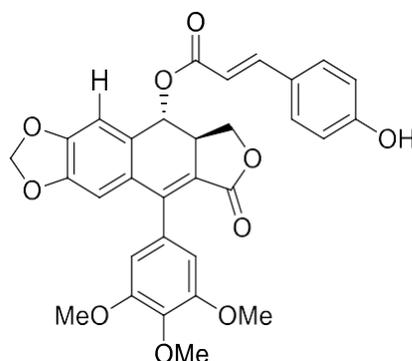
En *Bursera fagaroides* se determinó la actividad antimitótica y se aislaron los siguientes lignanos (7,8,9) de tipo aril hidroxinaftaleno. [Antunez 2016]



7'8'-deshidropodofilotoxina (7)



7'8'-deshidroacetilpodofilotoxina (8)

7'8'-dehidro *trans-p*-cumaroilpodofiloxina (9)

2.2.2 *Bursera* en el estado de Morelos

De las 84 especies de *Bursera* existentes en México, en el estado de Morelos abundan de 20 a 23 especies, 16 de ellas en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH), representando el 27% de las reportadas en nuestro país. Existen varias especies de *Bursera* distribuidas por todo el estado de Morelos [Dorado HYPATIA], en la **tabla 1** se reporta las especies de *Bursera* y el número de municipios donde abundan las mismas. Además, *Bursera copallifera* y *Bursera bipinnata* son las más importantes y las de mayor producción en resina [Dorado HYPATIA], siendo el objeto de estudio de esta investigación.

Tabla 1. Distribución de *Bursera* en los municipios del estado de Morelos.

Especie	Número de municipios
<i>Bursera copallifera</i>	24
<i>Bursera fagaroides</i>	24
<i>Bursera lancifolia</i>	17
<i>Bursera bipinnata</i>	15
<i>Bursera grandifolia</i>	15

En la **tabla 2** se reportan los municipios con mayor número de especies *Bursera* en el estado de Morelos, siendo Tlaquiltenango el que contiene el mayor número de especies.

Tabla 2. Número de especies *Bursera* en municipios del estado de Morelos.

Municipio	Número de especies
Tlaquitenango	18
Tepalcingo	13
Puente de Ixtla	11
Tepoztlán	10
Emiliano zapata	10
Jiutepec	8

Bursera copallifera y *Bursera bipinnata* crecen aproximadamente entre 3.0-12.0 metros de altura, el diámetro de sus troncos oscila entre los 35.0-50.0 centímetros, existen diferentes tipos de copal, algunos muestran hojas de tipo helecho (*B. bipinnata*) y su distribución en México es en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Zacatecas mientras que hay otra especie con hojas de tipo rosetas (*B. copallifera*), su distribución en México es en los estados Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Zacatecas [Medina 2008]. (**Fig. 4**). Estos árboles producen en su interior una resina aromática que al extraerla y solidificarse es lo que llamamos comúnmente “copal”



Figura 4. a) Hojas tipo helecho (*B. bipinnata*) y b) hojas tipo rosetas (*B. copallifera*) (de izquierda a derecha).

2.3 *Bursera bipinnata*

Existen alrededor de tres reportes en la literatura sobre *B. bipinnata*, que se describen a continuación Gómez y colaboradores examinaron un material

encontrado en objetos prehispánicos descubiertos en el Templo Mayor, para ello compararon ocho especies botánicas certificadas de resinas mexicanas mediante CG-EM, concluyendo que el material podría ser *bursera bipinnata* o *bursera stenophylla*. Los compuestos detectados en las resinas fueron triterpenos: lupeol (**10**), lupanona (**11**), α -amirina (**12**), β -amirina (**13**), α -amirona (**14**), β -amirona (**15**), 3-*epi*- α -amirina (**16**), 3-*epi*- β -amirina (**17**), *epi*-lupeol (**18**) y hacen énfasis en los múltiples estudios acerca de la propiedad antiinflamatoria que presentan este tipo de compuestos [Lucero 2014].

Por otra parte, Case y colaboradores estudiaron el aceite de tres copales comerciales detectando sesenta y ocho compuestos. El aceite esencial del copal blanco quienes reportan como probable origen *B. bipinnata*, tiene como compuesto mayoritario el copaeno (**19**) ($14.52 \pm 1.28\%$) y el D-germacreno (**20**) ($13.75 \pm 1.06\%$). De igual forma los demás inciensos son de origen probable [Case 2003].

Hernández y su grupo de investigación obtuvieron de las hojas de *Bursera ariensis*, *Bursera biflora*, *Bursera bipinnata*, *Bursera excelsa*, *Bursera hintonii* (Mich.) y *Bursera sarukhaniise* un sólido polvoso de color amarillo con punto de fusión ($192-194\text{ }^{\circ}\text{C}$) y mediante RMN ^1H en DMSO d_6 correspondió al 3-O- α -L-ramnopiranosido de miricetina (**21**) [Hernández 2002].

Un último estudio de González y colaboradores de *Bursera bipinnata* se evaluó la actividad antiinflamatoria de cinco triterpenos aislados de la resina: *epi*-Lupeol (**22**), Lupenona (**11**), Acetato de lupeol (**135**), α -amirina (**12**) y terpinen-2,5-diol (**24**) siendo *epi*-lupeol (**22**) el que presenta mayor porcentaje de inhibición de la inflamación mediante el ensayo in vivo TPA (**Tabla 3**) [González 2012, tesis licenciatura].

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la inflamación de los triterpenos aislados de la resina de *Bursera bipinnata*.

Muestra	% de inhibición de la inflamación
Resina	55.14 ± 3.85
<i>epi</i> -lupeol (22)	66.39 ± 4.38
Lupenona (11)	33.93 ± 1.98
Acetato de lupeol (135)	49.35 ± 3.6
α -amirina (12)	25.00 ± 1.81
Terpinen-2,5-diol (24)	18.9 ± 1.2
Indometacina (25)	91.35 ± 0.47

2.4 *Bursera copallifera*

En el 2015 Columba y colaboradores reportaron los porcentajes de inhibición de la inflamación de los extractos de diferentes partes de *Bursera copallifera* (hojas, tallos y corteza de tallos) de metanol, hidroalcohólico, diclorometano en edema de oreja de ratón inducido por TPA a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 mg/oreja, siendo el extracto de diclorometano de hojas el que mayor porcentaje obtuvo de inhibición, presentó un (55.4% de inhibición) a una dosis de 0.1 mg/oreja [Columba 2016].

En *Bursera copallifera* se determinó que los triterpenos *epi*-lupeol (18) y α -amirina (12) y sus derivados tienen alta actividad antiinflamatoria (Tabla 4) probadas en un modelo de inflamación inducida por TPA en oreja de ratón [Romero 2012, tesis maestría].

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la inflamación de los triterpenos de *Bursera copallifera*.

Compuesto	% inhibición de la inflamación
<i>Epi</i> -lupeol (18)	66.29 ± 4.38
α -amirina (12)	25.00 ± 1.81
Indometacina (25)	91.35 ± 0.47

Otro estudio del mismo grupo de investigación anterior realizó la semi-síntesis de compuestos derivados de α -amirina (12) y *epi*-lupeol (18), aislados de la

resina de *Bursera copallifera* para determinar la actividad antiinflamatoria en un modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón siendo 3,4-seco-ursan-12(13)-en-3,4 lactona (**26**) el que mayor DI_{50} obtuvo (0.73 $\mu\text{mol/oreja}$) con respecto al control indometacina (**25**) (0.68 $\mu\text{mol/oreja}$). También se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la secreción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7 a concentraciones no citotóxicas, entre ellos α -amirina (**12**), ácido ursólico (**27**), *epi*-lupeol (**18**) y oleanderolido (**28**), con valores de CI_{50} en el rango de 8.98-15.5 μM . Por otra parte, se realizó la cuantificación de una citoquina pro-inflamatoria denominada interleucina-6 (IL-6) siendo N-3,4-seco-urs-4(23),12(13)-dien-il-1-4'*R*-hidroxi-*L*-prolina metil éster (**29**) y N-3,4-seco-lupa-4(23) (**31**),20(29)-dienil-4'*R*-hidroxi-*L*-prolina metil éster (**32**) son los que inhibieron la producción de ON y la inhibición de IL-6. Por último, se evaluaron los compuestos α -amirinona (**14**), 3,4-seco-ursan-12(13)-en-3,4 lactona (**26**), 3,4-seco-urs-4(23),12(13)-dien-3-ol (**33**), N-3,4-seco-lupa-4(23) (**31**),20(29)-dienil-4'*R*-hidroxi-*L*-prolina metil éster (**32**), N-3,4-seco-lupa-4(23) (**31**),20(29)-dienil-4'*R*-hidroxi-*L*-prolina metil éster (**32**) y oleanderolido (**28**) en su inhibición del factor transcripcional NF- κ B, que participa en la síntesis de citocinas y enzimas como COX2 y iNOS, evitando la producción de prostaglandinas y de ON [Romero 2017, tesis de doctorado].

2.5 Aceites esenciales

Las plantas han sido utilizadas desde hace siglos como una fuente terapéutica para el alivio de muchos padecimientos, en específico, el olor característico de muchas de ellas se atribuye a la presencia de aceites esenciales, y son utilizados para el alivio de enfermedades inflamatorias, como aromaterapias, cosméticos, por mencionar algunas. Estos están compuestos de varios componentes químicos como hidrocarburos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos, fenoles y terpenos (monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos) siendo este último el de mayor importancia y abundancia. Son componentes muy volátiles y lipófilos, es decir, solubles en grasas y de alto índice de refracción [Martínez 2001; López 2014].

Los aceites esenciales se encuentran en cualquier parte de la planta, la **Tabla 5** muestra algunos ejemplos de plantas donde se extrajeron aceites esenciales, también se reporta el porcentaje de aceite yendo desde los 0.5-20% así como los compuestos mayoritarios y su uso como saborizantes [Dewick 2002; Başer 2011; Agarwal 2005].

Tabla 5. Ejemplos de plantas y sus compuestos mayoritarios (tomado y modificado Dewick 2002).

Aceite	Parte de la planta	% de aceite	Compuestos mayoritarios (%)	Usos
Clavo	Capullos flores secas	15-20	Eugenol (34) (75-90) Acetato de eugenilo (35) (10-15) cariofileno (36) (3)	Condimento, aromaterapia, antiséptico
Hinojo	Fruta madura	2-5	Anetol (37) (50-70) Fenchona (38) (10-20) Estragol (39) (3-20)	Condimento, aromaterapia, carminativo
Nuez moscada	Semillas	5-16	Sabineno (40) (17-28) α -pineno (41) (14-22) β -pineno (42) (9-15) Terpinen-4-ol (43) (6-9) Miristicina (44) (4-8) Elemicina (45) (2)	Condimento, aromaterapia, carminativo
Gaulteria	Hojas Ramas	0.7-1.5 0.2-0.6	Salicilato de metilo (46) (98)	Condimento, antiséptico, antirreumático.
Anís	Fruta madura	2-3	Anetol (37) (80-90) Estragol (39) (1-6)	Condimento, aromaterapia, carminativo
Anís estrella	Fruta madura	5-8	Anetol (37) (80-90) Estragol (39) (1-6)	Condimento, carminativo
Casia	Corteza seca, hojas	1-2	Cinamaldehído (47) (70-90) 2-metoxicinamaldehído (48) (12)	Condimento, carminativo
Corteza canela	Corteza seca	1-2	Cinamaldehído (47) (70-80) Eugenol (34) (1-13) Cinamil acetato (49) (3-4)	Saborizante, aromaterapia, carminativo
Hoja de canela	Hojas	0.5-0.7	Eugenol (34) (70-95)	Saborizante
Menta	Partes aéreas	0.3-1.2	Pulegona (50) (25-51) Mentona (51) (5-59)	Perfumería Cosméticos Farmacéutico Saborizante
Rosa de Castilla	Flores frescas	0.06-0.08	2-feniletanol (52) (69-81) Linalool (53) (1.5-3.3) Citronelol (54) (1.8-7.2)	Aromaterapia

Las plantas destinan energía y materia (carbono) para la biosíntesis de compuestos que no cumplen funciones primordiales, estos compuestos son los metabolitos secundarios y son biosintetizados a partir de la necesidad de sobrevivencia de la planta, siendo los aceites esenciales uno de los pertenecientes a estos metabolitos secundarios [Sepúlveda 2004].

2.5.1 Métodos de extracción

Existen varios métodos para obtener los aceites esenciales, algunos ejemplos son [Martínez 2001]:

- La expresión, donde se utiliza la fuerza mecánica, principalmente en la obtención de aceites de algunos cítricos como la naranja.
- Destilación con vapor de agua, en la que el material vegetal (en pequeños trozos) es introducido de una cámara inerte sometida a vapor de agua, las esencias son colectadas y separadas de la fase acuosa para su posterior utilización.
- Extracción con disolventes volátiles, donde el material es secado y con disolventes orgánicos como metanol, diclorometano por mencionar algunos son extraídos aceites esenciales, grasas y ceras.
- Enfleurage, donde principalmente flores se colocan en la superficie de una capa de aceite vegetal para la extracción de sus aceites esenciales.
- Líquidos supercríticos, siendo la que se está utilizando actualmente por sus diversas ventajas en la extracción de aceites esenciales. Se describe a continuación.

2.5.2 Extracción supercrítica con CO₂

La extracción por líquidos supercríticos está siendo utilizada hoy en día debido a sus grandes ventajas en la obtención de aceites esenciales entre otros compuestos químicos como la pureza del producto final, pues no se usan productos

químicos peligrosos y disolventes que puedan afectar o contaminar, el proceso de extracción es relativamente corto comparado con otros métodos, se realiza un química ecológico-amigable pues es un proceso limpio, seguro y sin impacto negativo al ambiente, debido a que no hay acceso al aire la materia prima no se oxida, es de bajo costo el CO₂ y tiene una eficiencia >90% [CannabiGold 2019]

Entre los extractores que se encuentran en el mercado, melloeX es un extractor que utiliza CO₂ líquido para la extracción botánica, el cual funciona bajo presión y es empleado para extraer aceites esenciales, aromas y fragancias. La **figura 5** se muestra los principios operativos. La fuente de CO₂ es el hielo seco (CO₂ sólido) sin embargo, el CO₂ no existe como líquido a presión atmosférica normal por lo cual se somete a un cambio, de sublimación a gas CO₂ (punto 1). Por lo tanto, se le agrega hielo seco (CO₂ sólido) a melloeX y se cierra para que se forme el gas CO₂ y así aumente la presión dentro del recipiente. El CO₂ a alta presión (800 psi o ~ 60 bar) es un gas (punto 2) y cuando el agua fría fluye a través del condensador, el gas CO₂ se convierte en CO₂ líquido, éste se impregna en el material vegetal, disolviendo los aceites y los extrae de forma natural [Alegre Science 2016]. Los aceites esenciales colectados después de la extracción pueden ser enviados a diferentes técnicas de separación e identificación como cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG-EM) para identificar los compuestos presentes en la muestra.

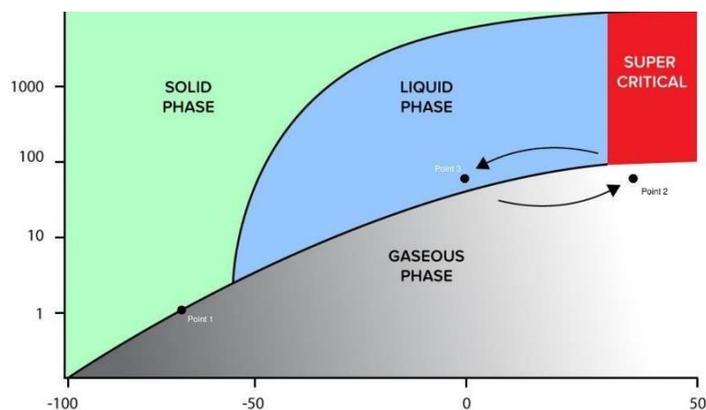


Figura 5. Diagrama de fases de CO₂.

2.5.3 Terpenos

Los terpenos son el grupo más grande de productos químicos encontrados de los aceites esenciales. Estos se producen a partir de la unión de unidades de isopreno (C_5H_8) **figura 6**, de ahí se biosintetizan numerosas moléculas de estructura química lineal o estructuras con uno o más anillos [de Groot 2016].

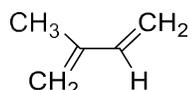


Figura 6. Unidad de isopreno.

De acuerdo con el número de unidades de isopreno en una molécula son denominados de diferente forma:

- Hemiterpenos son terpenos que contienen 5 carbonos.
- Monoterpenos son terpenos que contienen 10 carbonos y es derivado del geranilpirofosfato (GPP), y contiene dos unidades de isopreno.
- Sesquiterpenos: son terpenos que contienen 15 carbonos y es derivado de farnesilpirofosfato (FPP) y contiene tres unidades de isopreno.
- Diterpenos son terpenos que contienen 20 carbonos.
- Setreterpenos son terpenos que contienen 25 carbonos.
- Triterpenos son compuestos que contienen 30 carbonos.
- Tretaterpenos son compuestos que contienen 40 carbonos.

Todos los compuestos con unidades de isopreno mostradas anteriormente siguen la ruta metabólica del mevalonato: **figura7**. [Dewick 2002]

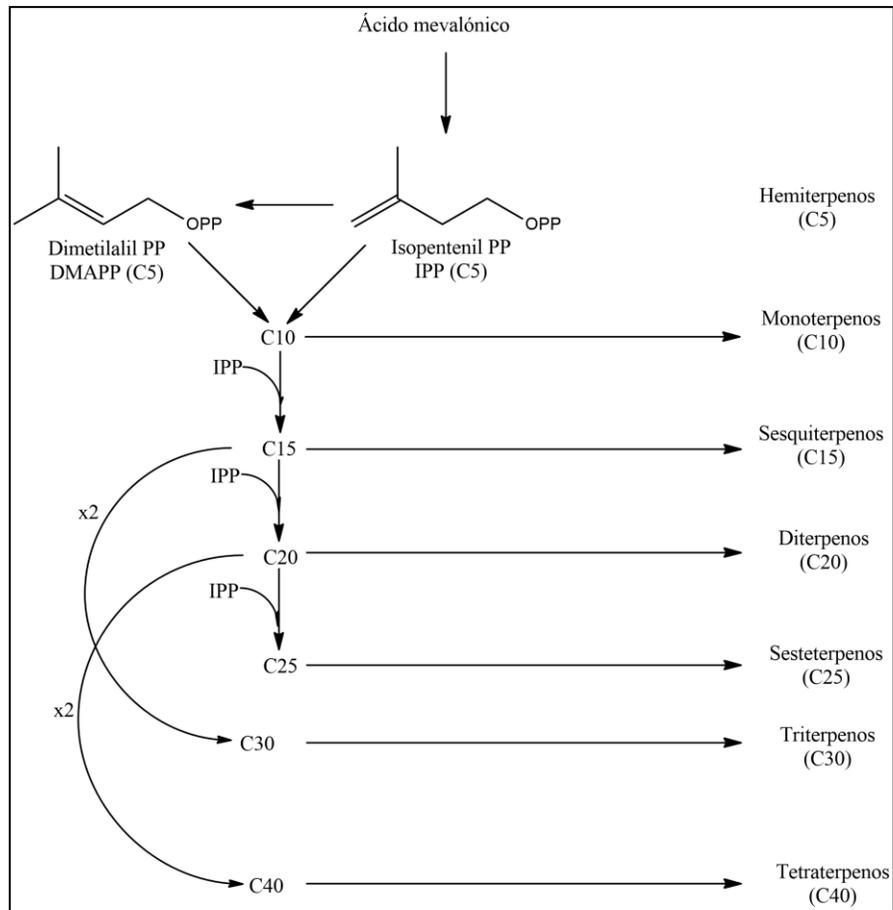


Figura 7. Ruta metabólica terpenos (tomado y modificado de Dewick 2002).

La unidad de isopreno no es producida de forma natural si no que se forma a partir de los compuestos pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y pirofosfato de isopentenilo (IPP) a partir del ácido mevalónico **figura. 8**. Los monoterpenos se componen de dos unidades de isopreno y se detallan a continuación.

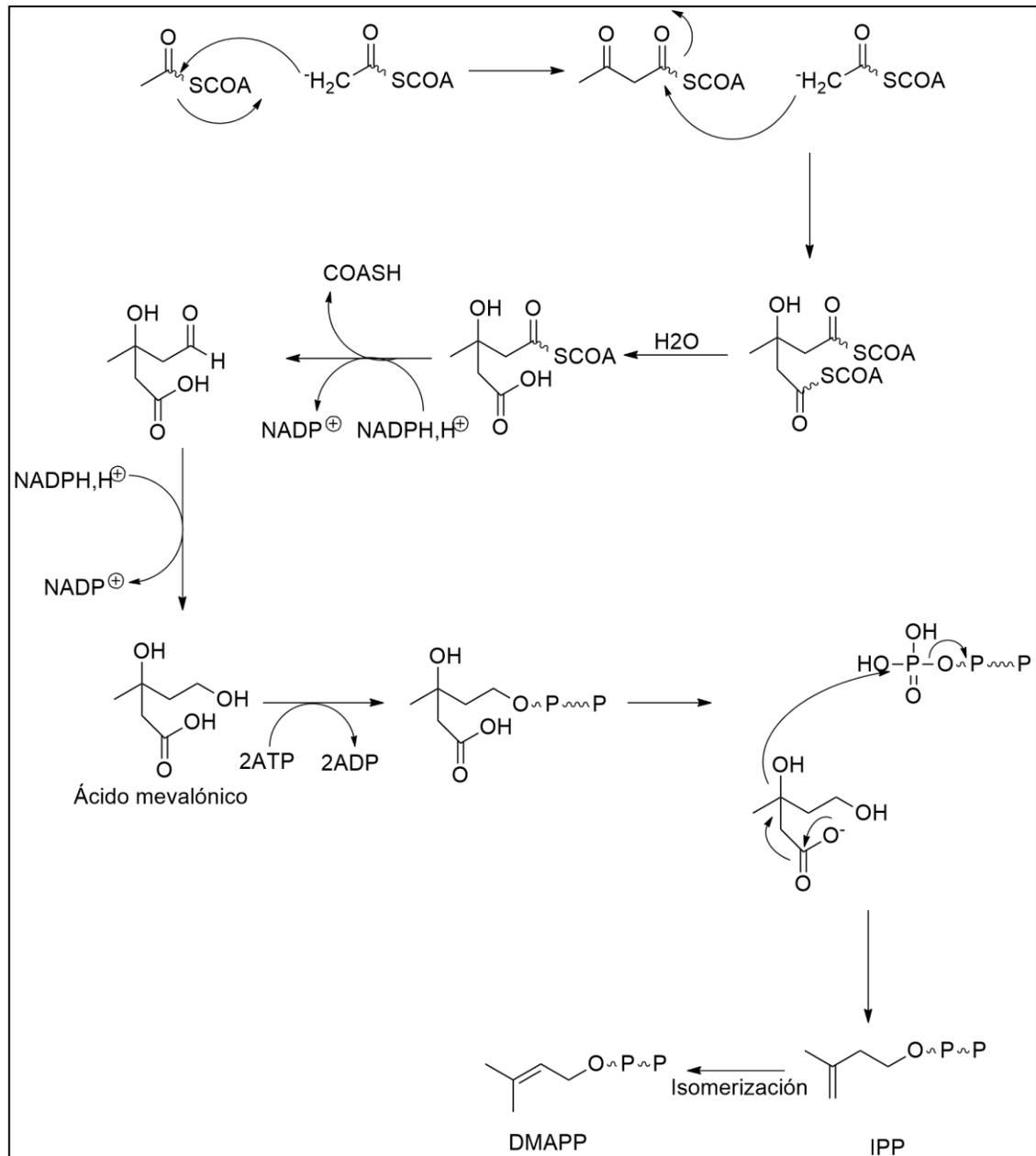


Figura 8. Formación de precursor DMAPP para la formación de terpenos.

En los aceites esenciales, los compuestos mayoritarios importantes son los monoterpenos y sesquiterpenos. La volatilidad y el olor típico de los aceites esenciales se debe a estos dos grupos de compuestos [de Groot 2016]. Hay muchas formas de clasificar a los monoterpenos y sesquiterpenos, en la **tabla 6** se enlistan la clasificación de estos compuestos químicos de acuerdo con de Groot y colaboradores.

Tabla 6. Clasificación química de Monoterpenos y sesquiterpenos (Tomado y modificado de Groot, 2016).

Clase química	Ejemplos
Terpenos acíclicos	Mirceno, (E)-ocimeno, (Z)-ocimeno (55-57)
Monoterpenos monocíclicos	p-cimeno, α -fencheno, limoneno, β -felandreno, terpinoleno, α -terpineno, γ -terpineno (58-64)
Monoterpenos bicíclicos	Canfeno (65), α -pineno (41), β -pineno (42), sabineno (40), α -tujano (66)
Monoterpenos tricíclicos	Triciclono (67)
Sesquiterpenos acíclicos	α -farneseno (68), (E)- β -farneseno (70)
Sesquiterpenos monocíclicos	α -bisaboleno, β -bisaboleno, curcumeno, β -elemeno (71-74)
Sesquiterpenos bicíclicos	α -cardineno (75), γ -cardineno (76), cariofileno (36), β -selineno (78)
Sesquiterpenos tricíclicos	Aromadendreno, α -cedreno, β -cedreno, α -gurjuneno (79-82)
Monoterpeno acíclico (alcohol)	Citronelol (54), geraniol (83), linalool (53), nerol (84), lavandulol (85)
Monoterpeno acíclico (éster)	Acetato citronelilo, acetato geranilo, acetato linalilo (86-88)
Monoterpeno acíclico (aldehído)	Citronelal, geranial, neral (89-91)
Monoterpeno monocíclico (alcohol)	(Z)-carveol, mentol, pulegol, terpineol (92-95)
Monoterpeno monocíclico (fenoles)	Carvacrol (96), eugenol (34), timol (97)
Monoterpeno monocíclico (cetonas)	Carvona (98), mentona (51), piperitona (100), pulegona (50)
Monoterpeno bicíclico (alcohol)	Borneol, mirtenol, pinocarveol (101-103)
Monoterpeno bicíclico (aldehído)	Mirtenal (104)
Terpeno bicíclico (cetonas)	α -canfor (105), d-canfor (106), fenchona (38)
Sesquiterpeno monocíclico (alcohol)	α -bisabolol, β -bisabolol, elemol (108-110)
Sesquiterpeno bicíclico (alcohol)	α -cadinol, α -eudesmol, β -eudesmol (111-113)
Sesquiterpeno bicíclico (aldehído)	Isovalencenal, zizanal (114-115)
Sesquiterpeno bicíclico (cetonas)	(E,E)-germacrona, α -vetivona, β -vetivona (116-118)
Sesquiterpeno tricíclico (alcohol)	Patchulol, α -santalol (119-120)
Alcohol aromático	Alcohol de bencilo, alcohol cinamílico (121-122)
Éster aromático	(Z)-metilcinamato (123), salicilato de metilo (46)
Aldehído aromático	Benzaldehído, cuminaldehído, vanilina (124-126)
Éteres fenólicos	Anetol (37), safrol (127), estragol (39)
Oxidos	Eucaliptol, mentofurano (128-129)
Ácidos	Ácido geránico, ácido isovalérico (130-131)

2.5.3.1 Monoterpenos

Los monoterpenos muestran un olor y sabor característicos [Can 2010], han sido usados en las industrias cosméticas; alimentaria; para insecticidas, repelentes de insectos, entre otras más, comprenden aproximadamente el 90% de los aceites esenciales con un número de actividades biológicas, como anticancerígenos, antimicrobianos, antioxidantes, antivirales, analgésicos y antiinflamatorios [Quintans 2019]

Sus características lipofílicas favorecen la modulación de las citocinas por su absorción y acción rápida. También se ha reconocido que los monoterpenos estimulan citocinas antiinflamatorias, como la IL-10 [Spelman 2006]. El desarrollo de analgésicos y antiinflamatorios con relación a monoterpenos ha sido estudiada en los últimos años.

Los monoterpenos pueden ser hidrocarburos lineales o acíclicos como el Mirceno (**55**), monocíclicos y bicíclicos [de Groot 2016] (**Figura 9**), alcoholes como el geraniol (**83**), aldehídos como el geranial (**90**), especialmente acetatos por reacción con acetil-CoA.

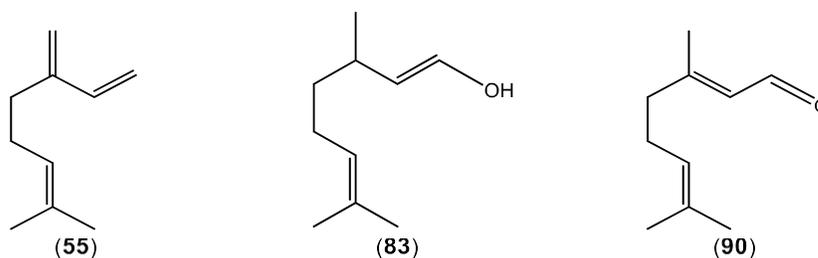


Figura 9. Ejemplo de monoterpeno acíclico, con alcohol y con aldehído.

Dentro de la clasificación de los monoterpenos monocíclicos y bicíclicos podemos encontrar tipos de esqueletos, en el primero se encuentran con estructura base de tipo mentano y en los segundos se pueden encontrar estructuras de tipo pinano y canfano como se muestra en la **figura 10**.

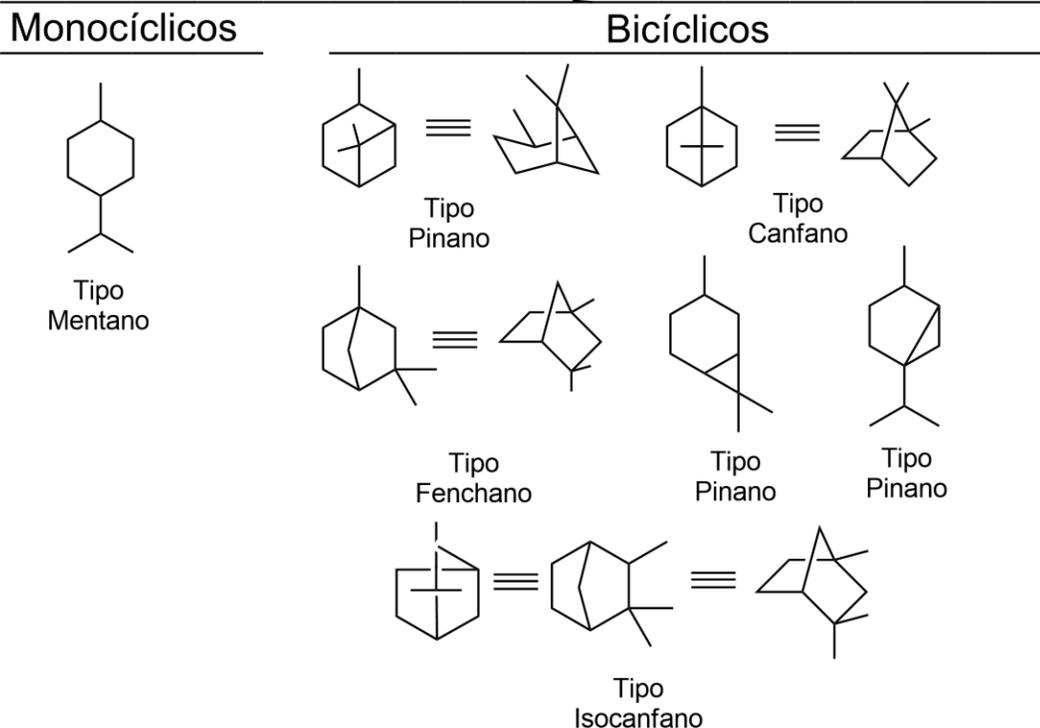


Figura 10. Tipos de estructuras de monoterpenos monocíclicos y bicíclicos.

También, dentro de los monoterpenos se pueden distinguir dos grandes agrupaciones: a) los monoterpenos regulares y b) los monoterpenos irregulares teniendo esqueleto base como se muestra en la **figura 11**.

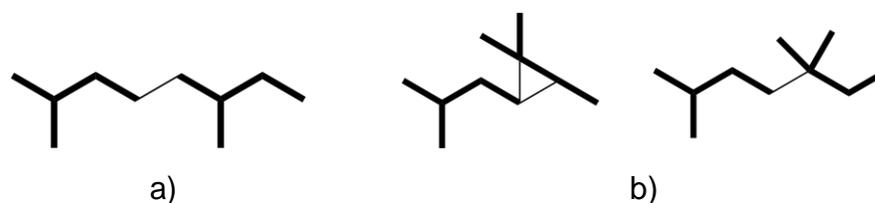


Figura 11. Esqueletos base de monoterpenos a) regulares y b) irregulares.

Los monoterpenos cíclicos siguen una serie de reacciones químicas, su precursor Geranyl PP se convierte posteriormente mediante la eliminación de OPP a Linalil PP (LPP) y a su vez se convierte en Neril PP (NPP). Es de suma importancia el precursor GPP pues no ocurrirían las reacciones de ciclación, la estereoquímica es importante pues un isómero E del doble enlace desfavorece la formación del anillo, por lo tanto, estas reacciones son de vital importancia, el resultado es un isómero Z

quien si puede llevar a cabo la ciclación [Dewick 2002] como se muestra en la **figura 12.**

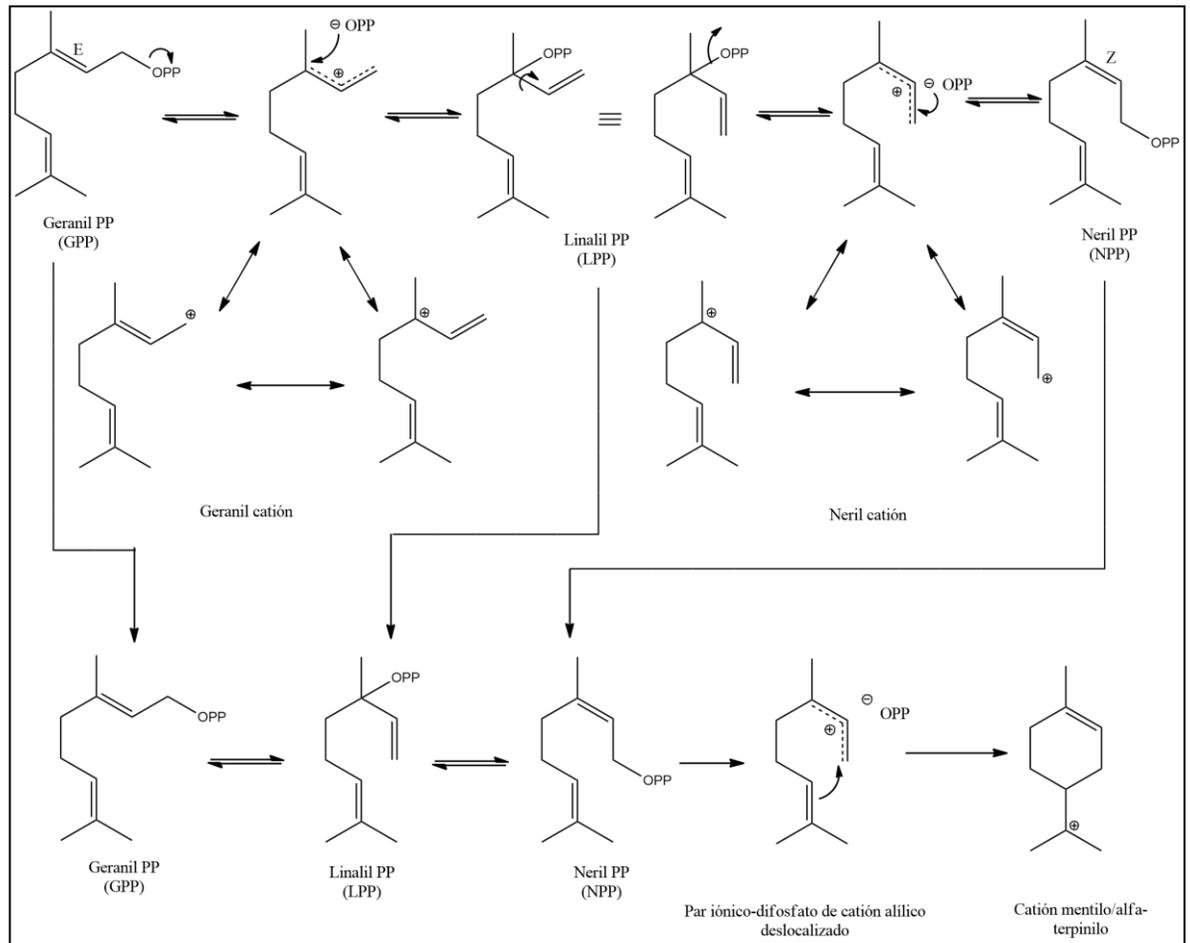


Figura 12. Ruta biosintética de ciclación de monoterpenos (Tomado y modificado de Dewick 2002).

2.5.3.2 Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son otro grupo importante, fungen también propiedades antiinflamatorias, son menos volátiles que los monoterpenos y se conforman de tres unidades C₅, es decir, poseen 15 carbonos, poseen estructuras acíclicas, monocíclicas, bicíclicas y tricíclicas [de Groot, 2016], sus mecanismos para su formación son similares a los monoterpenos [Dewick 2002].

Estos compuestos son los causantes del olor característico de algunas plantas, tienen altas temperaturas de ebullición, ocupan aproximadamente el 25%

de la fracción de los terpenos [de Groot 2016] y son de importancia por sus propiedades terapéuticas, como antiinflamatoria, espasmódica y sedante.

Como se ha mencionado, los aceites esenciales han mostrado propiedades antiinflamatorias. La inflamación ha sido un mecanismo de protección del sistema inmunitario para eliminar patógenos extraños a nuestro organismo, así como daños físicos, pero muchas veces estos factores externos provocan anomalías haciendo que la inflamación sea un factor determinante en otras enfermedades como el cáncer, diabetes, asma, artritis reumatoide entre otras más [IRB 2007] por ello, es importante saber el mecanismo completo de la inflamación.

2.6 Inflamación

La revista de la real academia de ciencias exactas, físicas y naturales definen a la inflamación como la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica [García 2008] y se pueden identificar cinco síntomas: calor, rubor, edema, dolor y pérdida de la función celular [Margni 1996].

2.6.1 Inmunidad innata y adaptativa

Centrándonos en los patógenos, la piel es la primera barrera física donde los ácidos grasos, moléculas microbidas y células intraepiteliales evitan la proliferación de los patógenos. Aquellos que logren atravesarla son reconocidos por el sistema inmune, desencadenando muchas señales para eliminar el agente desconocido externo [Margni 1996]. La inmunidad innata y adaptativa logran destruir por completo la mayoría de patógenos en nuestro organismo. [Tizard 2009]

La primera línea de defensa de nuestro organismo ante un patógeno se llama inmunidad innata, mientras que la inmunidad adaptativa tiene como propósito la eliminación específica de los microorganismos con los que la inmunidad innata no puede contener. Asimismo, posteriormente de una respuesta inmune viene una fase de reparación de tejidos, y después de una respuesta del sistema inmune adaptativo, quedan guardadas células de memoria, para evitar que el patógeno

particular que causó la infección vuelva a infectar el organismo (memoria). [Tizard 2009].

El sistema inmunitario adaptativo recurre a tres estrategias principales para combatir a la mayoría de los microbios. • Anticuerpos. • Fagocitosis. • Procesos de muerte de la célula infectada. El objetivo de la respuesta adaptativa consiste en activar uno o varios de estos mecanismos de defensa contra los diversos microbios que puedan hallarse presentes. [Abbas 2015]

2.6.2 Células madre sanguíneas

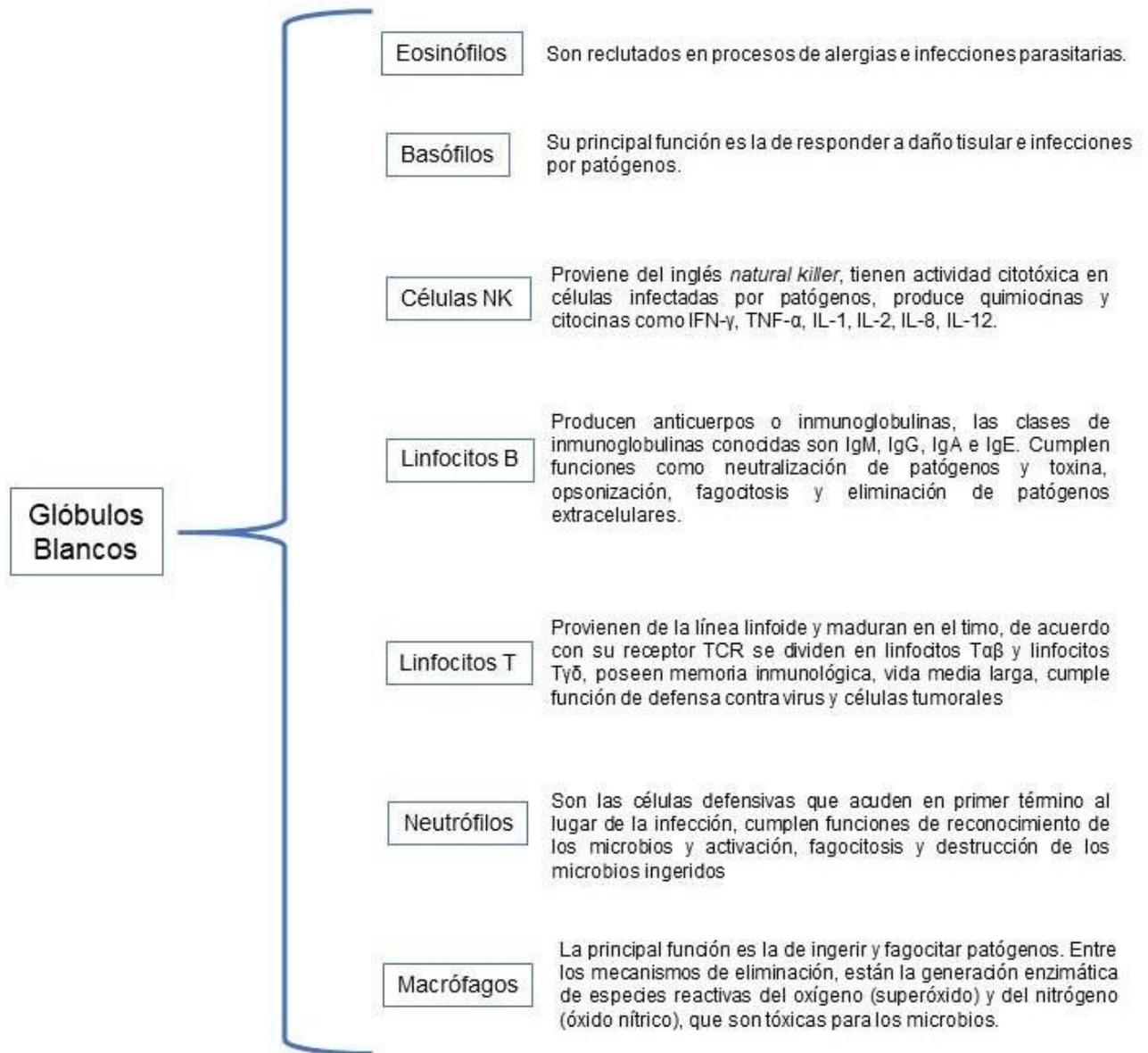
Las células madre hematopoyéticas se encuentran en la sangre periférica y en la médula ósea. También se llama célula madre sanguínea y se clasifican de acuerdo con su origen en: [NIH 2019]

- Células madre mieloides

Se convierten en 4 tipos de glóbulos sanguíneos: glóbulos rojos, plaquetas, Granulocitos (Eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y monocitos (macrófagos inmaduros). Siendo los dos últimos pertenecientes al grupo de glóbulos blancos.

- Células madre linfoides

Los glóbulos blancos o leucocitos son los encargados de combatir infecciones y otras enfermedades [NIH 2019]. Las células madre linfoide primero se convierten en linfoblastos para convertirse posteriormente en células NK, linfocitos B y linfocitos T, todos ellos glóbulos blancos (**figura 13**).



[Abbas 2015], [Fainboim 1994], [Pavón 2016], [Tizard 2009]

Figura 13. Clasificación de glóbulos blancos.

2.6.3 Invasión microbiana

Podemos encontrar microorganismos exógenos como las bacterias, hongos, protozoos y parásitos helmintos. Y microorganismos intracelulares como los virus,

bacterias o protozoos intracelulares los cuales darán paso al desencadenamiento del proceso inflamatorio, pues el sistema inmune es capaz de detectar agentes extraños que ingresan a nuestro cuerpo mediante receptores celulares. [Tizard 2009].

2.6.3.1 PAMP

Las sustancias microbianas que estimulan la inmunidad innata son con frecuencia compartidas por distintas clases de microbios y se llaman patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMP) [Abbas 2015; Fainboim 1994; Pavón 2016]. Los PAMP son moléculas presentes en los microorganismos que comparten tres propiedades: a) se expresan en los microorganismos, pero no en el huésped, b) están presentes en diferentes microorganismos y c) son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. [Fainboim 1994]

2.6.4 Receptores de reconocimiento de patrones (RRP): TLR LPS NOD

Para que el sistema inmune reconozca moléculas propias y extrañas cuenta con muchos receptores mencionados a continuación, estos pueden reconocer a PAMP y así desencadenar el proceso de eliminación del patógeno.

2.6.4.1 TLR

Los receptores tipo *Toll* son glucoproteínas de membrana de cadena corta [Tizard 2009], se encuentran en la superficie celular y dentro de la célula, nuestro organismo cuenta con 10 receptores de este tipo, los primeros reconocen PAMP de bacterias, hongos y parásitos (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 y TLR-10) y los segundos reconocen ácidos nucleicos y productos virales dentro del endosoma (TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9) [Pavón 2016].

2.6.4.2 LPS

El lipopolisacárido está presente en la superficie de las bacterias gramnegativas, activa la vía alterna del sistema de complemento además de un amplio abanico de respuestas celulares mediadas por células endoteliales,

neutrófilos y macrófagos cuando se unen a los RRP [Fainboim 1994, Abbas 2015]. Debido a que no actúan directamente en las células se deben unir a ciertas proteínas y crear el complejo CD14/TLR4 activando macrófagos y citoquinas [Tizard 2009]

2.6.4.3 NOD

NLR del inglés Like Receptors, también llamados de tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos) son receptores citoplasmáticos y se encuentran en el interior de la célula y reconocen PAMP, partículas virales, entre otros. [Pavón 2016]

2.6.5 Células centinela

Una vez que el sistema inmune detecta la presencia de un patógeno, las células centinela encargadas en la inmunidad innata de responder rápidamente ante la presencia de patógenos. Los macrófagos, mastocitos y células dendríticas (DC) pueden actuar como células centinela, ya que son los primeros en atacar al microorganismo invasor. Se encuentran en mayor número justo debajo de la superficie corporal en localizaciones como la dermis y las mucosas, donde es más probable encontrar microorganismos invasores. [Tizard 2009]

2.6.6 Moléculas vasoactivas

Los mastocitos son los encargados de liberar a las moléculas vasoactivas (**figura 14**) como las triptasa, quimasas, histamina y citocinas detalladas a continuación, siendo como resultado un aumento en el flujo sanguíneo y, por lo tanto, ocurre una inflamación en determinado sitio. Entre las principales moléculas vasoactivas están las triptasas y quimasas que son proteasas causantes de la vasodilatación y filtración del fluido desde los vasos sanguíneos propiciando que las paredes de los vasos sanguíneos comienzan a ser adherentes para los neutrófilos [Tizard 2009].

La histamina es una amina natural producida por descarboxilación de la histidina, induce la clásica respuesta vascular de la inflamación aguda, incrementando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y produciendo edema,

dolor y picazón. [Margni 1996] La histamina que se une a receptores H1 estimula a las células endoteliales para que produzcan óxido nítrico, un vasodilatador muy potente. Al mismo tiempo, la histamina causa filtración vascular, ocasionando la acumulación de fluidos y el edema local. Por último, también se liberan mediadores como citocinas, activadas por el factor nuclear kappa-B (NF-kB) [Tizard 2009]. Las citocinas son un grupo de proteínas de estructuras diversas que regulan y coordinan los procesos de la inmunidad innata y adaptativa [Abbas 2015]. Se pueden clasificar en citocinas proinflamatorias, citocinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas. [Fainboim 1994]. Las quimiocinas son esenciales para el reclutamiento de leucocitos sanguíneos circulantes en las zonas extravasculares, por lo tanto, aumenta la adhesión de los leucocitos al endotelio y la migración de los leucocitos al lugar de la infección o daño tisular. [Abbas 2015] y las citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que activa el endotelio vascular y favorece la liberación de óxido nítrico promoviendo la vasodilatación.

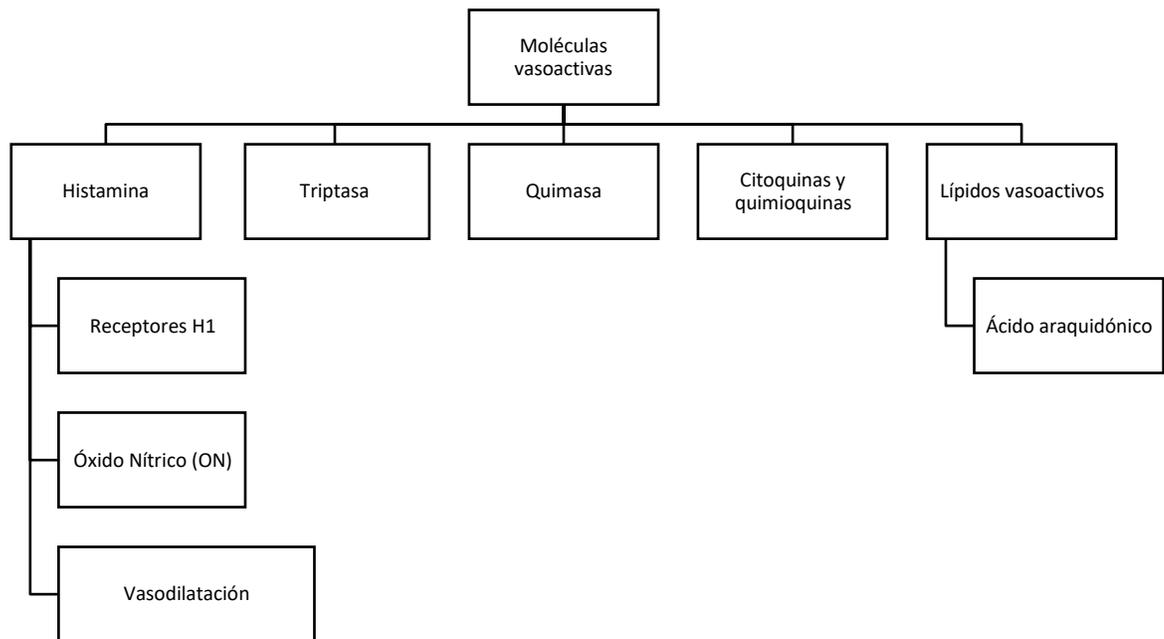


Figura 14. Moléculas vasoactivas liberadas en el proceso inflamatorio.

2.6.6.1 El ácido araquidónico

El ácido araquidónico es liberado de su depósito en los fosfolípidos de la membrana, es específico de las células en cuestión y depende de la presencia de las enzimas que transforman al ácido araquidónico, tales como las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) y las lipoxigenasas (LOX) y luego de la presencia de sintetetas específicas que convierten a los productos del ácido araquidónico en eicosanoides biológicamente activos (**figura 15**). El ácido araquidónico es convertido a prostaglandinas por la acción inicial de la ciclooxigenasa, mientras que los leucotrienos (B4, C4, D4 y E4) son convertidos por lipooxigenasas, siendo el B4 un potente agente quimiotáctico para neutrófilos y probablemente uno de los más importantes mediadores liberados por los mastocitos durante la infección bacteriana. [Fainboim 1994] y las lipoxinas son formadas por la acción inicial de las lipoxigenasas.

Cuando los neutrófilos llegan a los lugares de la inflamación, utilizan la enzima 15-lipooxigenasa para producir lipoxinas a partir de ácido araquidónico. Entonces se produce un cambio gradual de la producción de leucotrienos proinflamatorios a lipoxinas antiinflamatorias [Tizard 2009]

A partir de los fosfolípidos de membrana, las ciclooxigenasas (COX1 y COX2), producen prostanoides: los tromboxanos y las prostaciclina. Entre las prostaglandinas (PGE2 y PGF2) la prostaglandina PGE2 es más relevante al proceso inflamatorio, pues tiene potentes acciones como vasodilatadora, inductora de dolor y de fiebre. [Pavón 2016]. Los tromboxanos: (TxA2 y TGA2) son, compuestos no prostaglandínicos con un átomo de oxígeno insertado en el anillo, el tromboxano (TxA2) que produce agregación de plaquetas y vasoconstricción es inestable, tiene una vida media inferior al minuto y se transforma en TXB2 más estable, pero menos activo [Margni 1996]. Las prostaciclina PG12 producen vasodilatación [Pavón 2016].

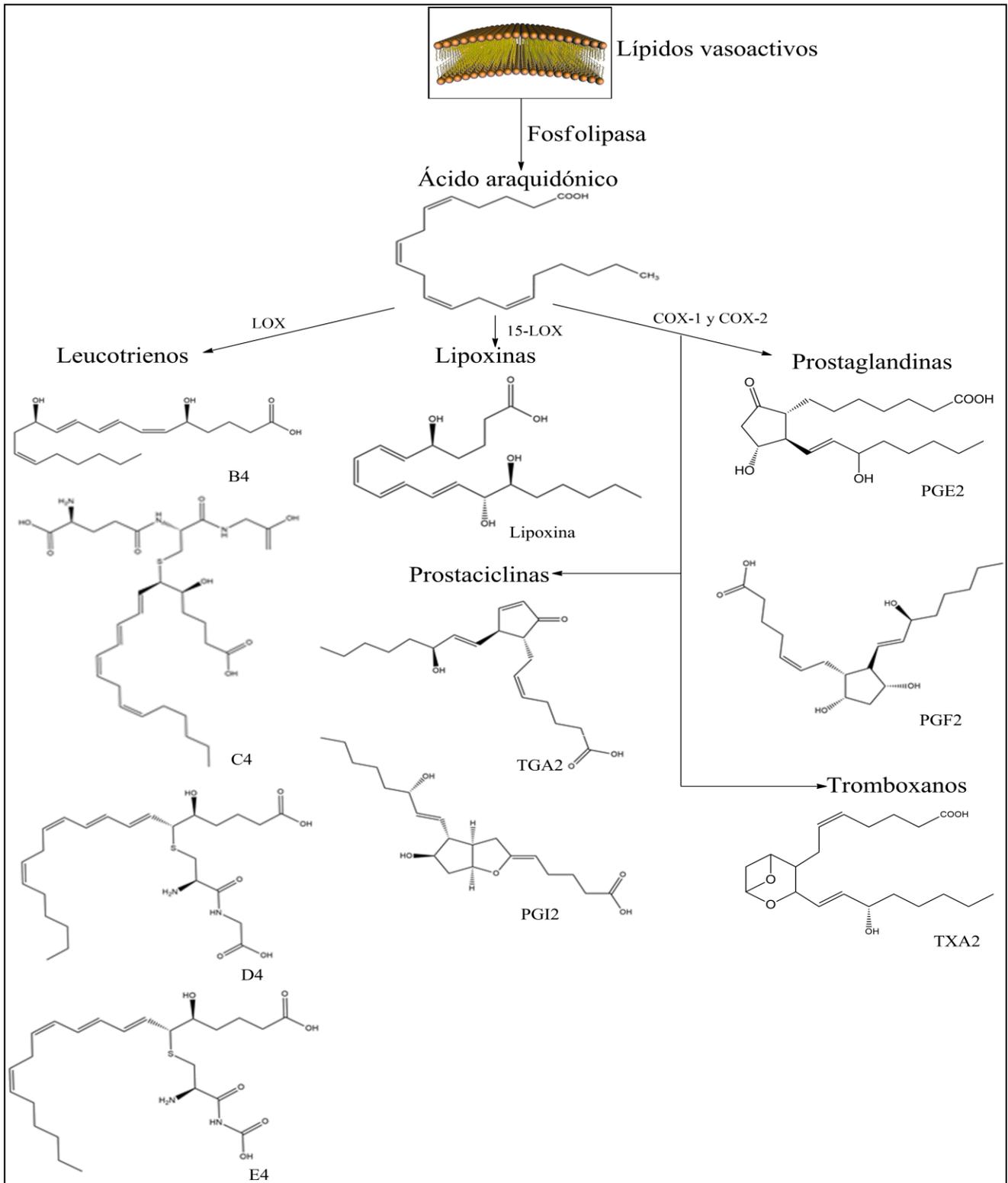


Figura 15. Moléculas vasoactivas derivadas del ácido araquidónico.

2.6.6.2 Óxido Nítrico

El óxido nítrico (ON) desempeña un papel importante en los procesos infecciosos; es sintetizado a partir de la *L*-arginina por la Óxido Nítrico Sintetasa y se asocia a la inflamación. El óxido nítrico (**figura 16**), es un radical libre gaseoso inestable, potencialmente tóxico, que puede difundir libremente a través de las membranas celulares, con efecto vasodilatador, tiene una vida media de 3 a 5 s. Tiene una masa molecular de 30.006 g/mol y densidad de 1.3402 g/L. Su punto de ebullición de -152 °C y su punto de fusión es de -164 °C. Activa a las formas constitutiva e inducible de las ciclooxigenasas. El efecto fisiológico más importante del ON es el de comportarse como un potente vasodilatador. Esta propiedad, y su capacidad de inducción de la COX-2 hacen que el ON sea un importante mediador del proceso inflamatorio. [Margni 1996]

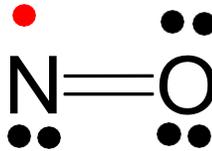


Figura 16. Estructura química del óxido nítrico.

Los neutrófilos y los macrófagos fagocitan microbios y los matan mediante la producción de ROS, óxido nítrico y enzimas en las fagolisosomas. Los macrófagos producen, además, citocinas que estimulan la inflamación y promueven la reestructuración tisular en los lugares de infección. Los fagocitos reconocen y responden a productos microbianos mediante diferentes tipos de receptores, como los TLR, las lectinas del tipo C, y los receptores basurero. [Pavón 2016]

3. JUSTIFICACIÓN

3. Justificación

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico ante la presencia de patógenos. También está relacionada con diversas enfermedades respiratorias y cáncer. Estudiar compuestos específicos de productos naturales con potencial antiinflamatorio, nos permitirá evaluar la posible acción molecular de estos compuestos químicos, y además de proponer alternativas a los compuestos o medicamentos ya existentes (AINEs y AIEs)

Dentro de las especies vegetales relacionadas con el estudio de la inflamación se encuentran *Bursera copallifera* y *Bursera bipinnata*, las cuales son los copales más abundantes en México y se han usado desde tiempos ancestrales para rituales, así como en la medicina tradicional mexicana, usadas como agentes tópicos antiinflamatorios [Columba 2016].

Algunos estudios químicos han confirmado la presencia de triterpenos de tipo lupeol, ursano y oleanano con importante actividad antiinflamatoria. Sin embargo, los estudios de los aceites esenciales (compuestos volátiles) de estas especies son limitados.

Por lo tanto, en este proyecto de investigación se llevará a cabo el análisis de la composición química de los aceites esenciales de resinas de *Bursera copallifera* y *Bursera bipinnata* autenticadas taxonómicamente, con la finalidad de conocer el efecto farmacológico antiinflamatorio *in vitro* de los aceites esenciales, que podría ser potencialmente relevante para el desarrollo de agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

4. OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1 General

Comparar la composición química y actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aceites esenciales de las resinas de *Bursera copallifera* y *Bursera bipinnata*.

4.2 Específicos

1. Obtener los aceites esenciales de las resinas de *B. copallifera* y *B. bipinnata* por medio de un extractor de fluido supercrítico con CO₂.
2. Identificar los componentes químicos de los aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC-EM).
3. Comparar la composición química de ambas especies de copal.
4. Determinar el efecto de los aceites esenciales de *B. copallifera* y *B. bipinnata* sobre la viabilidad celular e inflamación a través de la evaluación de la secreción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7

5. METODOLOGÍA

5. Metodología

5.1 Material vegetal

Las resinas de *Bursera copallifera* (DC) *Bullock.* y *Bursera bipinnata* (DC) Engl. De la familia Burseraceae, fueron recolectadas por el M. en BIBC Fidel Ocampo en la Reserva de la Biosfera de Sierra de Huautla (REBIOSH), con coordenadas 18°34'29" N, 98°55'46" W, en el municipio de Tepalcingo, Morelos.

La muestra botánica del árbol se depositó en el herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, número de Voucher 31840 (*Bursera bipinnata*) y 34838 (*Bursera copallifera*) perteneciente al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC).

Las resinas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron trabajadas de manera cruda sin tratamiento previo.

5.2 Extracción supercrítica con CO₂

Para la extracción supercrítica-CO₂ de los aceites esenciales de las resinas, se utilizó un equipo *melloeX* de *Alegre science*. El cual está integrado por un recirculador de agua, cámara de vidrio (extractor), correa de calentado como se muestra en la **figura 17**. Las especificaciones del extractor se muestran en la **Tabla 7**. Para esto se pesaron 20 g de las resinas de *Bursera copallifera* (RBc) y *Bursera bipinnata* (RBb) colecta 2015 y 10 g para la colecta 2019, los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado. El producto de cada extracción se almacenó a -20°C hasta su análisis por CG-EM.

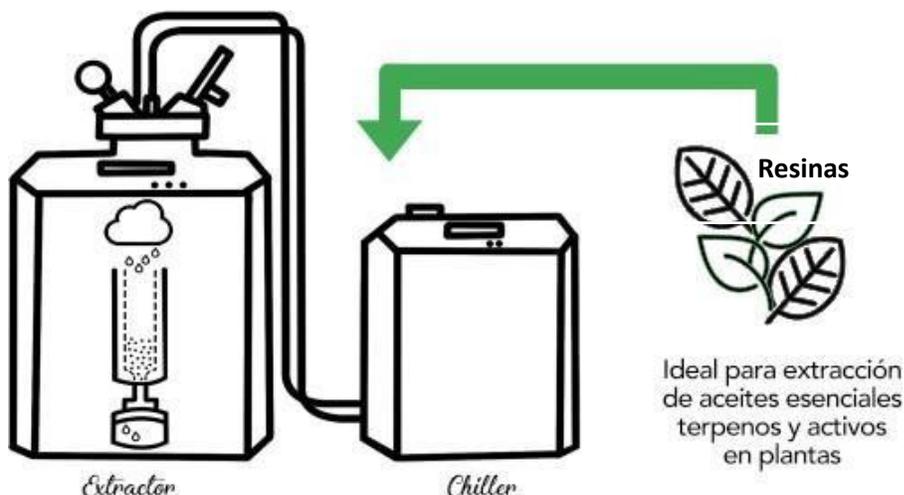


Figura 17. Sistema de extracción con fluido supercrítico CO₂.

Tabla 7. Especificaciones generales de extractor con CO₂.

Presión	< 900 psi, 62 bar
Liberación de presión	1,000 psi
Eléctrica	90-240 V, 50-60 Hz, 1000 W
Reciente a presión	28 x 8 x 8 in, 38 lbs.
Enfriador	10-15°C

El protocolo es el siguiente de acuerdo con el manual del equipo (*copyright* © Alegre Science, 2018) se especifica en anexo A.

5.3 Análisis por CG-EM

5.3.1 Preparación de muestras para Cromatografía de Gases

Una vez extraídos los aceites esenciales, se pesaron 2 mg de cada producto de extracción y se disolvieron en 0.5 mL de hexano grado HPLC, para ser llevado al área analítica. El tratamiento de las resinas y residuos de resinas una vez extraídas fueron llevados a cabo de la misma manera.

5.3.2 Especificaciones de Cromatografía de Gases

El análisis de la composición química de los aceites esenciales se llevó a cabo mediante un Cromatógrafo de Gases Agilent Technology 6890 acoplado a un detector de masas 5973N con las condiciones descritas en la **Tabla 8**. Los espectros de masas fueron comparados con la Biblioteca NIST versión 1.7^a

Tabla 8. Descripción del cromatógrafo de gases.

Técnica de Ionización	Impacto electrónico
Columna	HP 5MS 30m x 0.250mm x 0.25 μ m
Gas acarreador	Helio 1ml/min, flujo constante
Horno	40°C durante 1 min 10 °C/min hasta 250 °C durante 5 min 10°C/min hasta 285 °C durante 10 min.
Inyector	250°C, Splitless
Detector	MSD
Fuente iónica	250°C
Biblioteca	NIST versión 1.7 ^a

5.4 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

La evaluación del potencial antiinflamatorio de los aceites esenciales y las resinas colectadas se realizó en un ensayo *in vitro*. Para dicho estudio, se usaron macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, donde, se determinó el efecto inhibitorio de las muestras sobre la producción de ON, el trabajo experimental se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Yang et al., 2012, para lo cual

se contó con la colaboración del Dr. Antonio Romero Estrada de la Universidad de Guadalajara. (Romero, 2016).

5.4.1 Cultivo celular

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (Tib-71™ de ATCC) se cultivó en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, inactivado por calentamiento), sin antibiótico. Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda que contenía 5% de CO₂ a una temperatura de 37 ° C y se subcultivaron en frascos de cultivo de 25 cm².

5.4.2 Ensayo MTS para determinar la viabilidad celular

Las células RAW 264.7 se sembraron en una placa de 96 pozos (10,000 células/pozo) con 0.1 mL de medio de cultivo y se incubaron durante 24 h. A continuación, las células fueron tratadas con las resinas y aceites esenciales a varias concentraciones (5 - 40 µg/mL) o vehículo (DMSO, 0.21%, v/v) o etopósido (40 µg/mL) que sirvió como control positivo, y se incubó durante 22 h. Trascurridas las 22 h, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTS. Brevemente, se añadieron 20 µL de solución de MTS (Promega) a cada pocillo y se incubó durante otras 2 h. La densidad óptica se midió a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

5.4.3 Tratamiento de los macrófagos con LPS

Las células RAW 264.7 se sembraron en una placa de 96 pozos (20,000 células/pozo) con 0.2 mL de medio de cultivo y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con las resinas y aceites esenciales a concentraciones que no afectan la viabilidad celular o vehículo (DMSO, 0.21%, v / v) o indometacina (30 µg/mL) que sirvió como control positivo, y se incubó durante una hora. A continuación, se aplicó el estímulo proinflamatorio LPS a 4 µg/mL a los pozos que fueron tratados con las resinas y aceites esenciales, vehículo e indometacina, dejando pozos con células que solamente fueron tratadas con LPS (control de 100% estímulo) y pozos con células sin ningún tratamiento (control negativo), y se incubó a 37 ° C durante 20 h. Finalmente, se colectaron los

sobrenadantes libres de células y se usaron en fresco para la cuantificación de óxido nítrico (ON).

5.4.4 Determinación de la concentración de ON

El nitrito, producto final estable del óxido nítrico (ON) se utilizó como indicador de la producción de ON en los sobrenadantes celulares y se midió de acuerdo con la reacción de Griess. Brevemente, 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 fresco.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. Resultados y discusión

De manera general, se trabajaron dos resinas, *Bursera copallifera* (colecta 2015) y *Bursera bipinnata* (colecta 2015 y 2019). En el siguiente diagrama se muestran los rendimientos obtenidos de la extracción de aceites por fluidos supercríticos (**figura 18**)

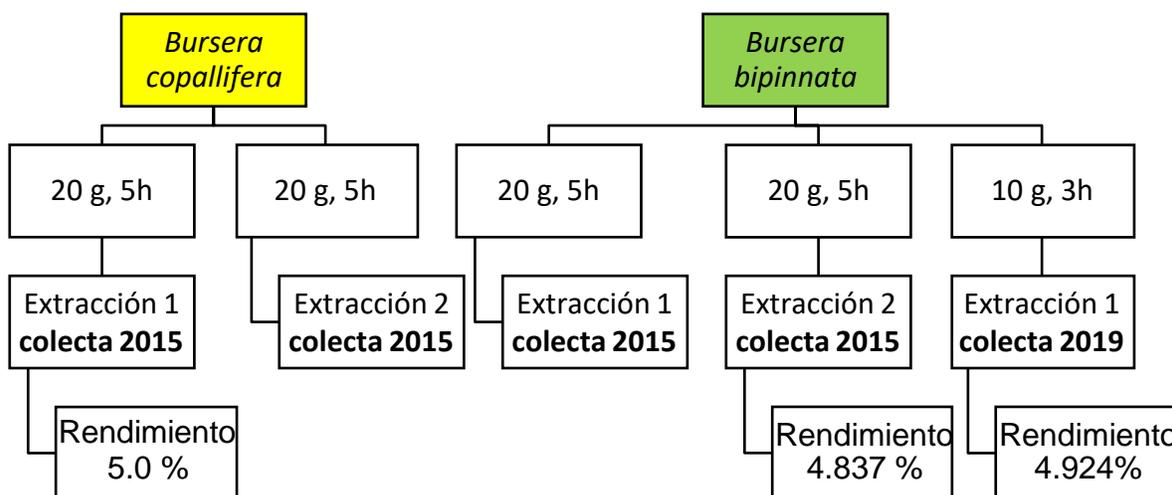


Figura 18. Descripción general de rendimientos de los aceites esenciales.

6.1 Análisis químico de los aceites esenciales de *Bursera copallifera* 2015.

Todos los compuestos se identificaron en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas y fueron procesados mediante la comparación con la biblioteca NIST con un score $\geq 80\%$. Los detalles metodológicos se muestran en la sección 5.3.

En esta sección se describe la composición química de la resina de *Bursera copallifera* (**RBc**) colectada en el año 2015, los compuestos detectados en el cromatograma de CG del aceite extraído de la resina (**AeRBc2015**) muestra a los compuestos poco polares en un tiempo de retención entre 0-20 minutos y los compuestos de tipo triterpénico se muestran en tiempos de retención más altos entre 35-40 minutos (**figura 19, C**).

Por otro lado, el análisis de EM de **AeRBc2015** identificó 14 compuestos poco polares, siendo dos monoterpenos mayoritarios, los cuales fueron el α -felandreno (**132**) (17.501 min, [136]⁺) (29.511 %), *m*-cimeno (**133**) (7.313 min, [134]⁺) (28.771 %) y epóxido de α -felandreno (**134**) (10.099 min, [152]⁺) (7.237 %). Además, se observó la presencia de cuatro compuestos de tipo triterpénico como el lupeol (**10**) (37.417 min, [426]⁺) (32.577 %), α -amirina (**12**) (37.805 min, [426]⁺) (10.586 %), β -amirina (**13**) (36.294 min, [426]⁺) (9.995 %) y acetato de Lupeol (**135**) (37.897 min, [468]⁺) (3.498%) descritos en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Compuestos identificados en aceite de *Bursera copallifera* (AeRBc) primera colecta.

Compuesto	% área relativa del pico*	Tr	[M ⁺]
β -felandreno (61)	3.587	6.44	136
<i>m</i> -cimeno (133)	28.771	7.313	134
Limoneno (60)	1.506	7.392	136
Epóxido de α -felandreno (134)	7.237	10.099	152
Cumaldehído (136)	5.584	10.611	148
Timoquinona (137)	3.878	10.736	164
Bencenometanol,4-(1-metiletil) (138)	0.295	11.366	150
Carvacrol (96)	3.748	11.557	150
2-ciclohexen-1-ona,4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil)-trans (139)	3.808	13.35	168
Calameneno (140)	0.348	14.362	202
fenol,4-metoxi-2,3,6-trimetil (141)	4.606	14.861	166
Óxido de cariofileno (142)	0.155	15.156	220
α -felandreno (132)	29.511	17.501	136
R-Kaur-16-eno (143)	0.159	20.037	272
β -amirina (13)	9.995	36.294	426
Lupeol (10)	32.577	37.417	426
α -amirina (12)	10.586	37.805	426
Acetato de lupeol (135)	3.498	37.897	468

*Abundancia relativa con respecto al aceite

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

Con fin de comprobar la extracción eficaz de los compuestos más volátiles (aceites esenciales), se decidió comparar la composición química entre el aceite extraído, la resina sin extracción y el residuo de la extracción (**figura 19 A-C** respectivamente). En los cromatogramas, el aceite extraído AeRBc (**figura 19A**) con respecto a la resina (**figura 19B**) y el residuo de la resina (**figura 19C**), se observaron claramente el incremento de la abundancia de los compuestos volátiles (T_R entre 0-20min). Por otra parte, los compuestos polares (triterpenos, T_R entre 35-40 min) mostraron en mayor proporción en la resina y el residuo de la resina (**figura 19 B y C**). Con esto se comprobó una buena extracción de los aceites esenciales.

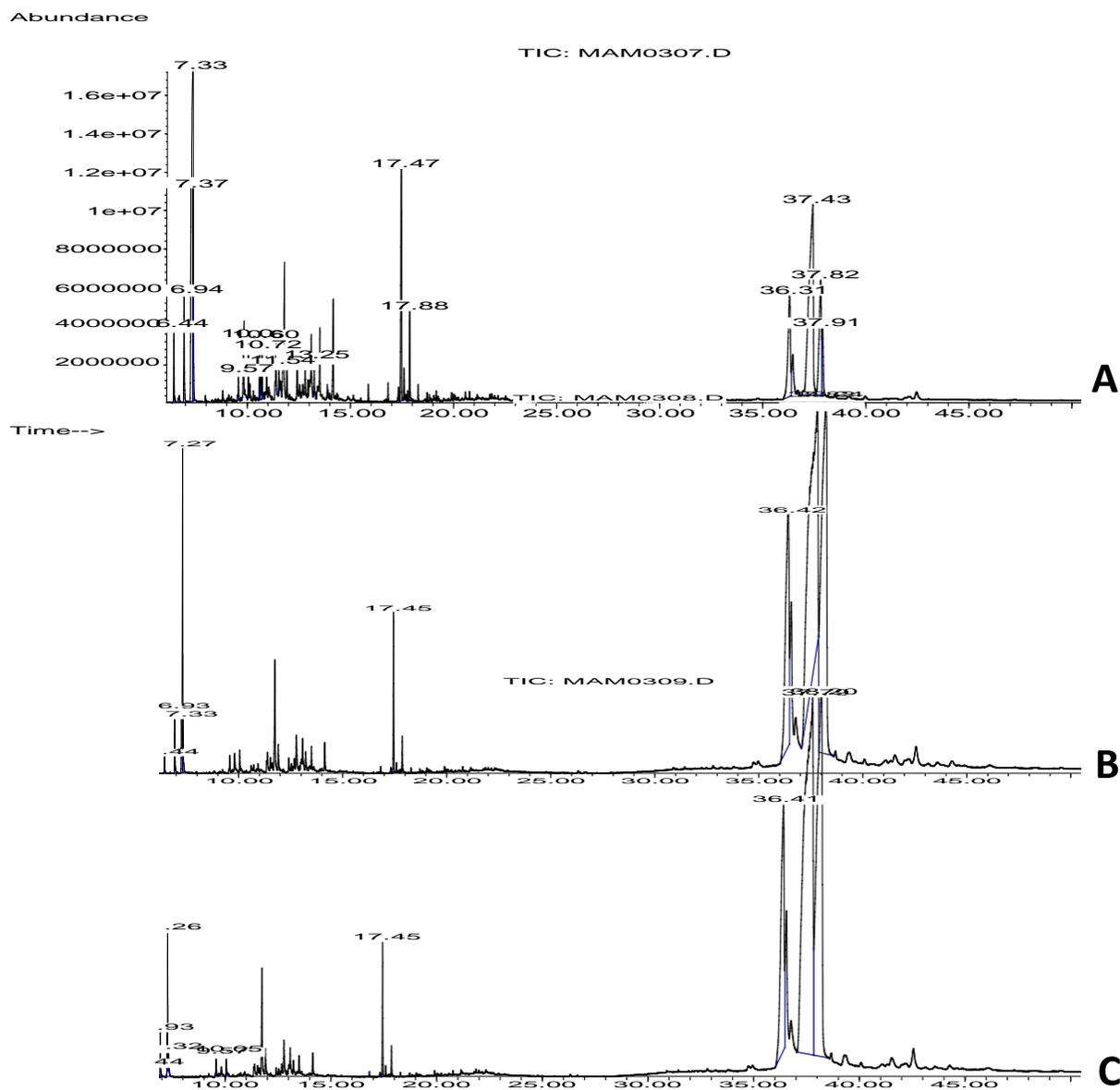


Figura 19. Cromatograma de CG de **A:** Aceite; **B:** Resina; **C:** Residuo de resina de *Bursera copallifera* (RbC) colecta 2015.

En la **Tabla 10** se hace una comparación más detallada de los compuestos detectados en los tres análisis: aceite, resina y residuo de resina (**A**, **B**, **C**), se identificaron 14 compuestos volátiles en el aceite extraído (**AeRbC**), de los cuales disminuyeron su abundancia del 28-49% en la resina (**B**) y el residuo de la resina (**C**). Los compuestos más abundantes fueron el α -felandreno (**132**) (17.501 min, [136]⁺) quien se encontró presente en el aceite (AeRbC) y aumentó 19 veces más con respecto a la resina (**B**). El *m*-cimeno (**133**) (7.313 min, [134]⁺) solo fue

identificado en el aceite de la extracción con un alto porcentaje de abundancia y por último el compuesto epóxido de α -felandreno (**134**) (10.099 min, [152]⁺) aumentó hasta 49 veces más su porcentaje con respecto al valor de la resina sin extraer. Por otra parte, los compuestos triterpénicos como la β -amirina (**13**) (36.294 min, [426]⁺) y la α -amirina (**12**) (37.805 min, [426]⁺) disminuyeron su abundancia en un 66% y 29% respectivamente en el aceite con respecto al valor de la abundancia en la resina intacta, el lupeol (**10**) (37.417 min, [426]⁺) mostró un gran porcentaje de abundancia en los tres análisis pues su disminución en el aceite y el residuo de la resina fue apenas aproximadamente del 22% con respecto a la resina intacta.

Tabla 10. Comparación de compuestos detectados en aceite, resina y residuo de resina de *Bursera copallifera* primera colecta.

Compuesto	% área relativa* aceite	% área relativa* resina	% área relativa* residuo
Sabineno (40)	NI	0.108	0.063
α -felandreno (132)	29.511	1.556	1.114
β -felandreno (61)	3.587	NI	NI
<i>m</i> -cimeno (133)	28.771	NI	NI
<i>p</i> -cimeno (58)	NI	3.502	1.045
Limoneno (60)	1.506	NI	NI
Silvestreno (144)	NI	NI	0.152
Cumaldehído (136)	5.584	NI	NI
Timoquinona (137)	3.878	NI	NI
Carvanona (145)	NI	NI	0.148
Epóxido de α -felandreno (134)	7.237	NI	0.148
Bencenometanol,4-(1-metiletil) (138)	0.295	NI	NI
Carvacrol (96)	3.748	NI	NI
<i>trans</i> -2-ciclohexen-1-ona,4-hidroxi- 3-metil-6-(1-metiletil) (146)	3.808	NI	NI
Calameneno (140)	0.348	NI	NI
fenol,4-metoxi-2,3,6-trimetil (141)	4.606	NI	NI
Oxido de cariofileno (142)	0.155	NI	NI
R-Kaur-16-eno (143)	0.159	NI	NI
β -pineno (42)	NI	0.65	13.226
β -amirina (13)	9.995	15.131	50.686
Lupeol (10)	32.577	42.765	32.986
α -amirina (12)	10.586	35.684	0.063
Acetato de Lupeol (135)	3.498	NI	NI

*Abundancia relativa con respecto al aceite

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

***NI: No identificado

62 Análisis químico de los aceites esenciales de *Bursera bipinnata* 2015

A continuación, se analizó la composición química de la resina *Bursera bipinnata* (RBb) colectada en el año 2015. Los compuestos identificados en el cromatograma de CG del aceite extraído de la resina (AeRBb2015) mostraron al igual que RBc (Ver figura 19) a los compuestos poco polares en un tiempo de retención entre 0-20 minutos y, por otra parte, también se detectaron compuestos

de esqueleto terpenoide en tiempos de retención más altos entre los 35-40 minutos (**figura 20, D**).

El análisis de EM para **AeRBb2015** identificó la presencia de 16 compuestos poco polares, siendo los compuestos de tipo monoterpeno mayoritarios el limoneno (**60**) (7.366 min, [136]⁺) (15.54%), carvona (**98**) (10.683 min, [150]⁺) (11.69%) y óxido de cariofileno (**142**) (15.163 min, [220]⁺) (9.24%). Además, de la presencia de cuatro triterpenos como la β-amirina (**13**) (36.255 min, [426]⁺) (6.11%), Lupeol (**10**) (37.352 min, [426]⁺) (23%), α-amirina (**12**) (37.766 min, [426]⁺) (2.41%) y el acetato de lupeol (**135**) (37.95 min, [468]⁺) (8.35%) descritos en la **tabla 11**.

Tabla 11. Compuestos detectados en aceite de *Bursera bipinnata* (AeRBb) primera colecta.

Compuesto	% área relativa del pico*	Tr	[M ⁺]
p-cimeno (58)	0.25	7.261	134
Limoneno (60)	15.54	7.366	136
trans-p-menta-2,8-dienol (147)	0.73	8.791	152
cis-2,8-p-Mentadien-1-ol (148)	1.17	9.015	152
Melilotal (149)	0.44	9.777	134
Trans-p-Menta-1 (7), 8-dien-2-ol (150)	0.41	9.829	152
trans-carveol (151)	6.66	10.335	152
cis-carveol (152)	0.83	10.499	152
Carvona (98)	11.69	10.683	150
Óxido de carvona (153)	0.82	11.13	166
Limoneno glicol (154)	3.83	12.063	170
Óxido de limoneno (155)	3.02	12.903	152
2-isopropilideno-5-metilhex-4-enal (156)	1.42	13.396	152
1-hidroxi-1,7-metil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (157)	2.91	14.296	222
Calameneno (140)	1.19	14.355	202
Óxido de cariofileno (142)	9.24	15.163	220
β-amirina (13)	6.11	36.255	426
Lupeol (10)	23.00	37.352	426
α-amirina (12)	2.41	37.766	426
Acetato de lupeol (135)	8.35	37.95	468

*Abundancia relativa con respecto al aceite

**Score ≥ 80%, identificados de acuerdo con su espectro de masas de la biblioteca NIST

Se compararon los análisis de la composición química entre el aceite extraído (AeRBb), la resina sin extracción (E) y el residuo de la extracción (F) (**figura 20 D-F**) respectivamente. En los cromatogramas se observó el incremento de la abundancia de los compuestos volátiles (T_R entre 0-20min) en el aceite extraído

AeRBb (**figura 20 D**) con respecto a la resina (**figura 20 E**) y el residuo de la resina (**figura 20 F**). Por otra parte, los compuestos polares (triterpenos, T_R entre 35-40 min) se mostraron en mayor proporción en la resina y el residuo de la resina (**figura 20 E y F**). En general, se podría concluir que ha sido una buena extracción de aceites esenciales, pues aumentaron en un 80% sus abundancias con respecto a la resina (**E**) y residuo de resina (**F**).

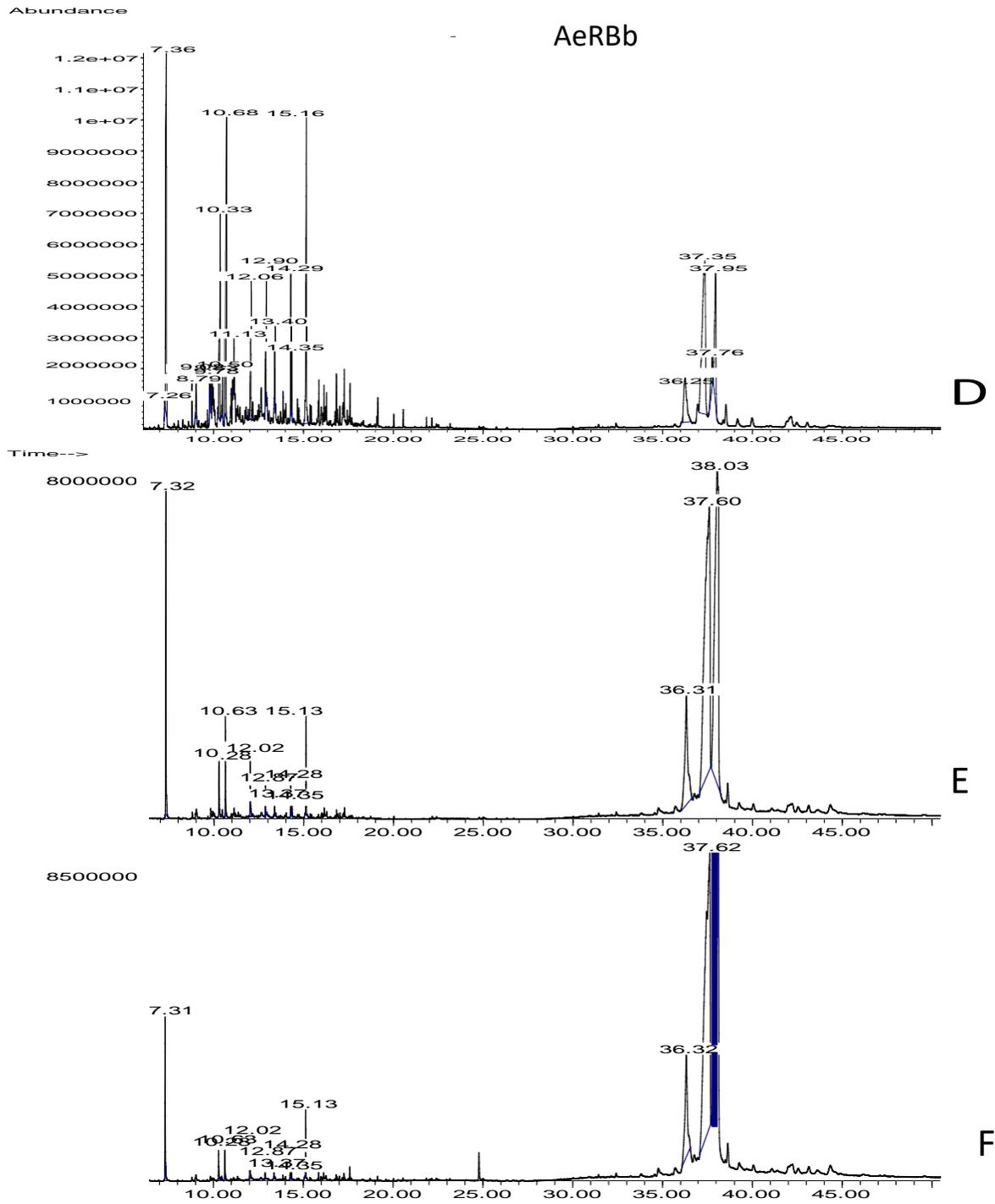


Figura 20. Cromatograma de CG de **D:** Aceite; **E:** Resina; **F:** Residuo de resina de *Bursera bipinnata* (RBb) primera colecta.

En la **tabla 12** se hace una comparación más detallada de los compuestos detectados en los tres análisis: aceite, resina y residuo de resina (**D, E, F**), en donde se identificaron 16 compuestos volátiles en el aceite extraído (**AeRBb**), de los cuales disminuyeron su abundancia del 7-30% en la resina (**B**) y el residuo de la resina (**C**). Los compuestos más abundantes fueron el limoneno (**60**) y la carvona (**98**) quienes se encontraron presentes en el aceite (**AeRBc**) y aumentaron en un 80% y 93% con respecto al residuo de la resina (F) respectivamente. Por último, el compuesto óxido de cariofileno disminuyó hasta en un 85% en la resina y residuo de la resina con respecto al aceite extraído. Por otra parte, los compuestos triterpénicos, como la β -amirina (**13**) aumentó en un 47% en el residuo de la resina con respecto al valor en el aceite. La α -amirina (**12**) mostró un porcentaje de abundancia alto (37.289%) en la resina sin extraer. Por último, el lupeol (**10**) aumentó tres veces más su porcentaje de abundancia en el residuo de la resina con respecto al aceite extraído.

Tabla 12. Comparación de compuestos detectados en aceite, resina y residuo de resina de *Bursera bipinnata* 2015.

Compuesto	% área relativa* aceite	% área relativa* resina	% área relativa* residuo
p-cimeno (58)	0.25	NI	NI
Limoneno (60)	15.54	4.561	3.117
trans-p-menta-2,8-dienol (147)	0.73	NI	NI
cis-2,8-p-Mentadien-1-ol (148)	1.17	NI	NI
Melilotal (149)	0.44	NI	NI
Trans- p-Mentha-1 (7), 8-dien-2-ol (150)	0.41	NI	NI
trans-carveol (151)	6.66	0.692	0.694
cis-carveol (152)	0.83	NI	NI
Carvona (98)	11.69	1.366	0.81
Óxido de carvona (153)	0.82	NI	NI
Limoneno glicol (154)	3.83	0.956	1.157
Óxido de limoneno (155)	3.02	0.39	NI
2-isopropilideno-5-metilhex-4-enal (156)	1.42	0.204	0.191
1-hidroxi-1,7-metil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (157)	2.91	0.413	0.566
Calameneno (140)	1.19	0.119	0.114
Óxido de cariofileno (142)	9.24	1.308	1.383
β -amirina (13)	6.11	10.051	12.979
Lupeol (10)	23.00	42.65	72.624
α -amirina (12)	2.41	37.289	5.012
Acetato de Lupeol (135)	8.35	NI	0.91

*Abundancia relativa con respecto al aceite

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

***NI: No identificado

63 Análisis químico de los aceites esenciales de *Bursera bipinnata* 2019

En esta sección se lleva a cabo el análisis químico de la resina de *Bursera bipinnata* (**RBb**) colectada en el año 2019. Se analizó de igual forma que los anteriores, el aceite extraído de ambas colectas mediante CO₂ (**AeRBb2019**) y (**AeRBb**) por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

El análisis de EM para **AeRBb2019** identificó la presencia de 23 compuestos poco polares, siendo los compuestos de tipo monoterpeno mayoritarios el α -felandreno (**132**) (7.11 min, [136]⁺) (24.4%), β -felandreno (**61**) (7.465 min,

[136]⁺) (8.275%) y cubenol (**158**) (17.607 min, [222]⁺) (8.047%). Además, de la presencia de cuatro triterpenos como la β -amirina (**13**) (36.958 min, [426]⁺) (6.281%), Lupeol (**10**) (38.094 min, [426]⁺) (18.773%), α -amirina (**12**) (38.534 min, [426]⁺) (5.079%) y el acetato de lupeol (**135**) (38.639 min, [468]⁺) (4.35%) descritos en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Compuestos identificados en aceite de *Bursera bipinnata* 2019 (AeRBb2019).

Compuesto	% área relativa del pico*	Tr	[M ⁺]
β-cirmeno (159)	0.559	6.788	136
α-felandreno (132)	24.4	7.11	136
2-careno (160)	0.18	7.228	136
p-cimeno (58)	6.716	7.392	134
β-felandreno (61)	8.275	7.465	136
Terpinoleno (62)	0.381	8.351	136
Carvanona (145)	0.138	9.626	152
Tujona (162)	0.553	9.842	152
4,5-epoxi-carano (69)	0.289	9.915	152
C ₁₀ H ₁₆ O (99)	1.039	10.204	152
Carvona (98)	0.479	10.756	150
3-ciclohexen-1-ona-2-isopropil-5-metil (107)	0.335	10.913	152
Copaeno (19)	0.541	12.575	204
Cariofileno (36)	6.314	13.212	204
α-cubebeno (30)	1.538	13.573	204
β-cubebeno (32)	0.316	13.705	222
<i>Epi</i> -biciclosesquifelandreno (23)	1.033	14.132	204
α-farneseno (68)	0.849	14.184	204
1-hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (157)	1.334	14.441	222
Calameneno (140)	0.627	14.493	202
Naftaleno, 1,2,3,4,6,8a-hexahidro-1-isopropil-4,7-dimetil- (77)	0.457	14.605	204
Óxido de cariofileno (142)	0.437	15.451	220
Cubenol (158)	8.047	17.607	222
β-amirina (13)	6.281	36.958	426
Lupeol (10)	18.773	38.094	426
α-amirina (12)	5.079	38.534	426
Acetato de lupeol (135)	4.35	38.639	468

*Abundancia relativa con respecto al aceite

**Score ≥ 80%, identificados de acuerdo con su espectro de masas de la biblioteca NIST

64 Comparación química de los aceites esenciales de *Bursera bipinnata* colecta 2015 y 2019.

En la **figura 21** se muestran los cromatogramas de CG comparativos de los resultados de los aceites obtenidos de las resinas de *B. bipinnata* 2015 y 2019 (**AeRBB2015** y **AeRBB2019**); en general se observaron compuestos poco polares en un tiempo de retención entre 0-20 minutos y compuestos de esqueleto terpenoide entre los 35-40 minutos (**figura 22**).

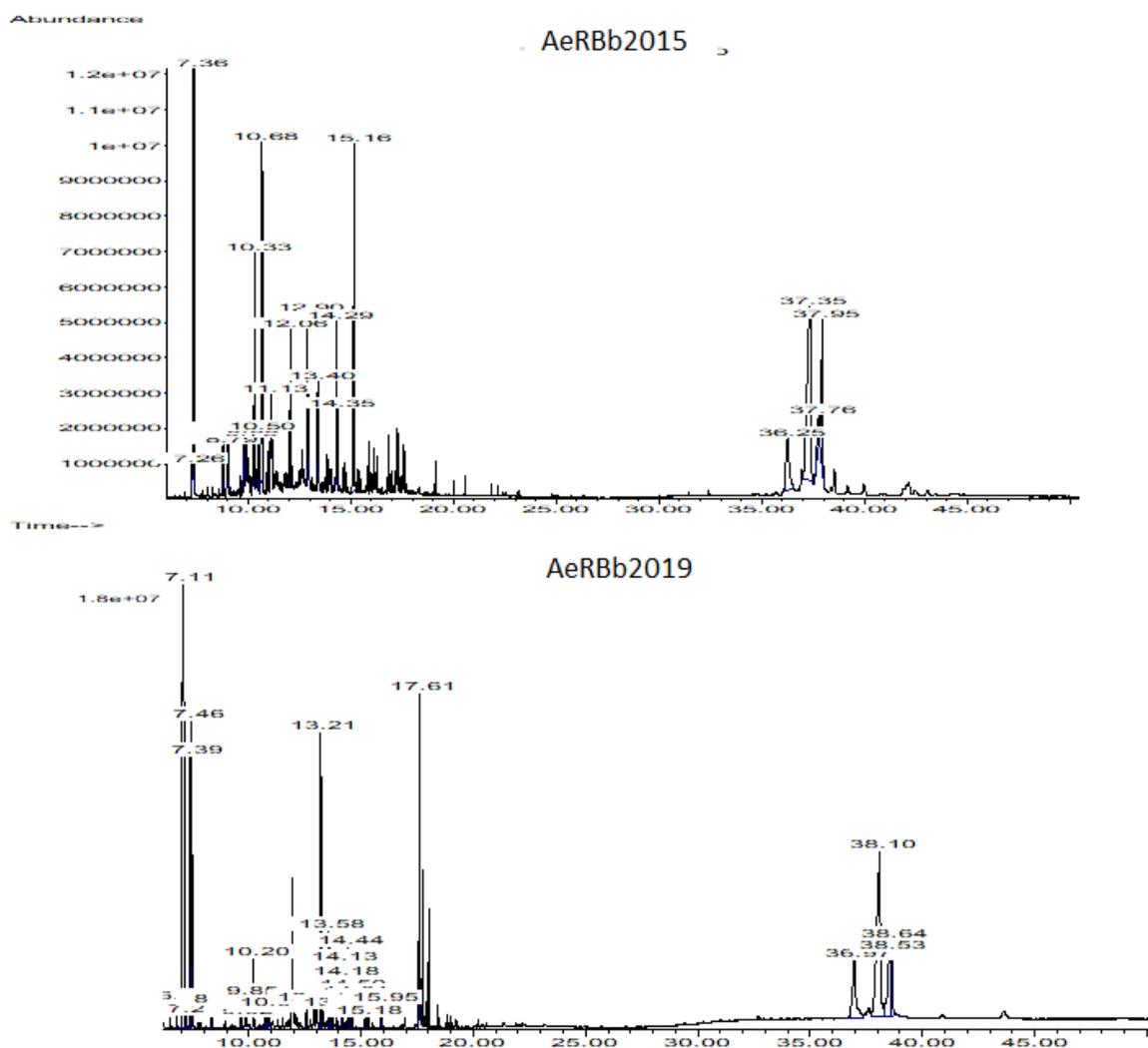


Figura 21. Comparación cromatográfica de aceites de RBb (colectas 2015 y 2019 respectivamente)

La comparación química entre AeRBb-2015 y AeRBb2019 (**Tabla 14**) mostró la presencia de cinco compuestos poco polares en ambas colectas. El compuesto aromático *p*-cimeno (**58**) aumentó su abundancia en la colecta 2019, de 0.25 % a 6.716%. Por otro lado, los cuatro compuestos restantes: carvona (**98**), 1-hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (**157**), calameneno (**140**) y óxido de cariofileno (**142**) disminuyeron su abundancia en la colecta 2019 con respecto a la colecta 2015, por ejemplo, carvona (**98**) disminuyó de un 11.69 % a 0.479% respectivamente, el óxido de cariofileno (**142**) disminuyó de un 9.24% a 0.437%.

Cabe mencionar que hay compuestos mayoritarios en la colecta 2015 que no se detectaron en la colecta 2019, siendo los compuestos mayoritarios el limoneno (**60**), *cis*-2,8-*p*-Mentadien-1-ol (**148**), limoneno glicol (**154**), óxido de limoneno (**155**), *trans*-carveol (**151**), 2-isopropilideno-5-metilhex-4-enal (**156**). Mientras que los compuestos mayoritarios detectados en la colecta 2019 y no en la colecta 2015 fueron el β -cirmeno (**159**), α -felandreno (**132**) (7.11 min, [136]⁺), β -felandreno (**61**), C₁₀H₁₆O (**99**), cariofileno (**36**), α -cubebeno (**30**), *Epi*-biciclosesquifelandreno (**23**) y cubenol (**158**) por mencionar algunos.

Con respecto con los compuestos de tipo triterpénico se mantuvieron de manera general su abundancia, incrementando únicamente el lupeol (**10**) 5% de mayor abundancia en la muestra del 2015.

Tabla 14. Comparación química de aceites de primera y segunda colecta de la resina *Bursera bipinnata*.

Compuesto	% área relativa *Aceite 2015	% área relativa *Aceite 2019
β -cirmeno (159)	NI	0.559
α -felandreno (132)	NI	24.4
2-careno (160)	NI	0.18
<i>p</i> -cimeno (58)	0.25	6.716
Limoneno (60)	15.54	NI
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dienol (147)	0.73	NI
<i>cis</i> -2,8- <i>p</i> -Mentadien-1-ol (148)	1.17	NI
Melilotal (149)	0.44	NI
<i>trans-p</i> -Mentha-1 (7), 8-dien-2-ol (150)	0.41	NI
<i>trans</i> -carveol (151)	6.66	NI
<i>cis</i> -carveol (152)	0.83	NI
β -felandreno (61)	NI	8.275
Terpinoleno (62)	NI	0.381
Carvanona (145)	NI	0.138
Tujona (162)	NI	0.553
4,5-epoxi-carano (69)	NI	0.289
C ₁₀ H ₁₆ O (99)	NI	1.039
Carvona (98)	11.69	0.479
Óxido de carvona (153)	0.82	NI
Limoneno glicol (154)	3.83	NI
Óxido de limoneno (155)	3.02	NI
2-isopropilideno-5-metilhex-4-enal (156)	1.42	NI
3-ciclohexen-1-ona-2-isopropil-5-metil (107)	NI	0.335
Copaeno (19)	NI	0.541
Cariofileno (36)	NI	6.314
α -cubeneno (30)	NI	1.538
β -cubebeno (32)	NI	0.316
<i>Epi</i> -biciclosesquifelandreno (23)	NI	1.033
α -farneseno (68)	NI	0.849
1-hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (157)	2.91	1.334
Calameneno (140)	1.19	0.627
1,4-Cadinadieno (22)	NI	0.457
Óxido de cariofileno (142)	9.24	0.437
Cubenol (158)	NI	8.047
β -amirina (13)	6.11	6.281
Lupeol (10)	23.00	18.773
α -amirina (12)	2.41	5.079
Acetato de lupeol (135)	8.35	4.35

*Abundancia relativa con respecto al aceite

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

***NI: No identificado

65 Comparación química de los aceites esenciales de *Bursera bipinnata* y *Bursera copallifera* 2015

En esta sección se llevó a cabo la comparación química de los aceites obtenidos de las resinas de *Bursera copallifera* (AeRBc) y *Bursera bipinnata* (AeRBb) ambas colectas del año 2015. De manera general, se detectaron 18 compuestos en *B. copallifera* y 20 en *B. bipinnata*. En la siguiente **Tabla 15** se describen la comparación de la composición química entre ambos aceites esenciales, clasificados de acuerdo con su estructura química en monoterpenos (hidrocarbonados, abiertos, oxigenados y aromáticos), sesquiterpenos, un diterpeno y triterpenos.

Tabla 15. Clasificación de compuestos identificados en aceite de *Bursera bipinnata* (AeRBb) y *Bursera copallifera* (AeRBc)

Tipo de compuesto	% en AeRBb bipinnata	% en AeRBc copallifera
Monoterpenos Hidrocarbonados		
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dienol (147)	0.73	-
Limoneno (60)	15.54	1.506
β -felandreno (61)	-	3.587
α -felandreno (132)	-	29.511
Monoterpenos oxigenados		
<i>cis</i> -2,8- <i>p</i> -Mentadien-1-ol (148)	1.17	-
<i>trans-p</i> -Mentha-1 (7), 8-dien-2-ol (150)	0.41	-
<i>trans</i> -carveol (151)	6.66	-
<i>cis</i> -carveol (152)	0.83	-
Limoneno glicol (154)	3.83	-
Carvona (98)	11.69	-
Óxido de carvona (153)	0.82	-
Óxido de limoneno (155)	3.02	-
2-ciclohexen-1-ona,4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil)- <i>trans</i> (139)	-	3.808
Timoquinona (137)	-	3.878
Epóxido de α -felandreno (134)	-	7.237
2-isopropilideno-5-metilhex-4-enal (156)	1.42	-
Monoterpenos Aromáticos		
Melilotal (149)	0.44	-
<i>p</i> -cimeno(58)	0.25	-
Bencenometanol,4-(1-metiletil) (138)	-	0.295
Carvacrol (96)	-	3.748
fenol,4-metoxi-2,3,6-trimetil (141)	-	4.606
Cumaldehído (136)	-	5.584
<i>m</i> -cimeno (133)	-	28.771
Sesquiterpenos		
1-hidroxi-1,7-metil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (157)	1.19	-
Óxido de cariofileno (142)	9.24	0.155
Calameneno (140)	2.91	0.348
Diterpenos		
R-Kaur-16-eno (143)	-	0.159
Triterpenos		
Acetato de lupeol (135)	8.35	3.498
β -amirina (13)	6.11	9.995
α -amirina (12)	2.41	10.586
Lupeol (10)	23	32.577

*% de abundancia relativa con respecto al aceite

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

En el siguiente diagrama de Venn (**figura 22**) se muestra dos conjuntos de elementos, en la izquierda los compuestos pertenecientes sólo a *B. bipinnata* **AeRBb**: (p-cimeno (**58**) (0.25 %), *trans*-p-menta-2,8-dienol (**147**) (0.73 %), *cis*-2,8-*p*-mentadien-1 ol (**148**) (1.17 %), melilotal (**149**) (0.44 %), *trans*-*p*-mentha-1 (7),8-dien-2-ol (**150**) (0.41 %), *trans*-carveol (**151**) (6.66 %), *cis*-carveol (**152**) (0.83 %), carvona (**98**) (11.69 %), óxido de carvona (**153**) (0.82 %), limoneno glicol (**154**) (3.83 %), óxido de limoneno (**155**) (3.02 %), 2-isopropileno-5-metilhex-4-enal (**156**) (1.42 %), 1-hidroxi-1,7-metil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (**157**) (2.91 %).

En la derecha del diagrama, los compuesto únicamente presentes en *B. copallifera* **AeRBc**: β -felandreno (**61**) (3.58 %), *m*-cimeno (**133**) (28.77 %), epóxido de α -felandreno (**134**) (7.23 %), cumaldehído (**136**) (5.58 %), timoquinona (**137**) (3.87 %), bencenometanol,4-(1-metiletil) (**138**) (0.29 %), carvacrol (**96**) (3.74 %), 2-ciclohexen-1-ona,4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil)-*trans* (**139**) (3.80 %), fenol,4-metoxi-2,3,6-trimetil (**141**) (4.60 %), α -felandreno (**132**) (29.51 %), *R*-kaur-16-eno (**143**) (0.15 %).

Y finalmente, en la intersección del diagrama, el conjunto de compuestos que pertenecen simultáneamente a **AeRBb** y **AeRBc**: acetato de lupeol (**135**) (8.35, 3.49 %), β -amirina (**13**) (6.11, 9.90 %), α -amirina (**12**) (2.41, 10.58 %) y lupeol (**10**) (23, 32.57 %), respectivamente.

AeRBb
Bursera bipinnata

AeRBc
Bursera copallifera

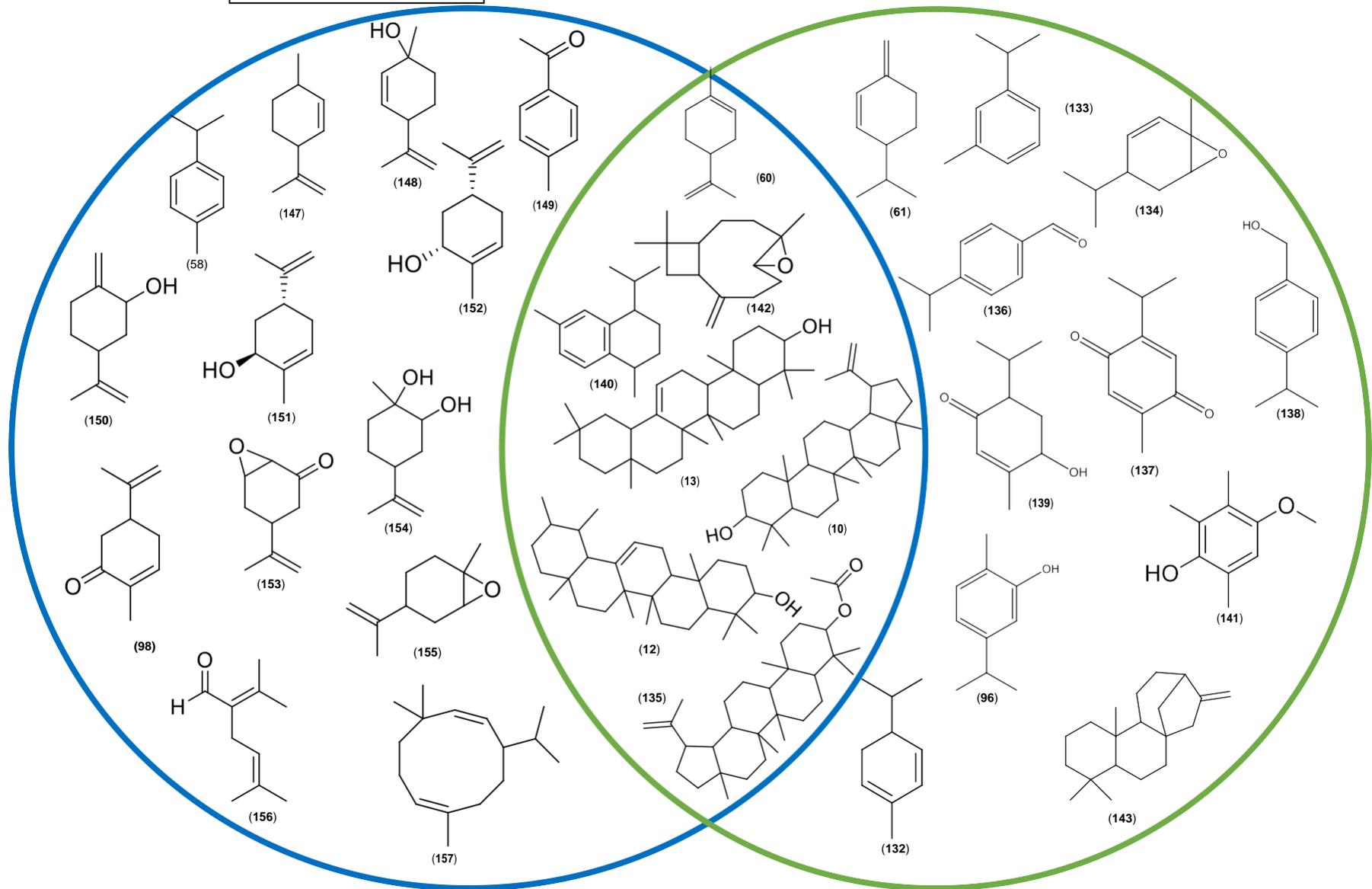


Figura 22. Diagrama de comparación química entre aceites esenciales de *B. bipinnata* y *B. copallifera* 2015 (en medio los compuestos presentes en ambos aceites esenciales).

6.5.1 Monoterpenos y sesquiterpenos

De acuerdo con su biosíntesis los monoterpenos son terpenoides unidos por dos moléculas de isopreno (10 átomos de carbono), mientras que los sesquiterpenos están conformado por tres unidades de isopreno con un total de 15 átomos de carbono. Ambos son importantes constituyentes de muchos aceites esenciales y se caracterizan por su alta volatilidad y el aroma característico de muchos de ellos. En esta sección se describirá el conjunto de mono y sesquiterpenos presentes en **AeRBb** y **AeRBc**.

6.5.1.1 Análisis de acuerdo con su estructura

En la **figura 22** y **tabla 16** podemos observar un mayor contenido de monoterpenos oxigenados en **AeRBc**, por otro lado, los monoterpenos con anillo aromático están presentes en mayor cantidad en **AeRBb**.

Otra comparativa destacable es la mayor abundancia de los sesquiterpenos en **AeBb**, diez veces mayor que en **AeBc**. Finalmente, el diterpeno Kaureno (**143**) únicamente se identificó en **AeBc** con abundancia de 0.159 %.

Tabla 16. Comparación química de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos en **AeBb** y **AeBc**.

	AeRBb bipinnata	AeRBc copallifera
Monoterpenos hidrocarbonados	60, 147	60, 61, 132
Monoterpenos oxigenados	98, 148, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156	134, 137, 139
Monoterpenos aromáticos	58, 149	96, 133, 136, 138, 141
Sesquiterpenos	157, 142, 140	140, 142
Diterpenos	NI	143

*NI: No Identificado

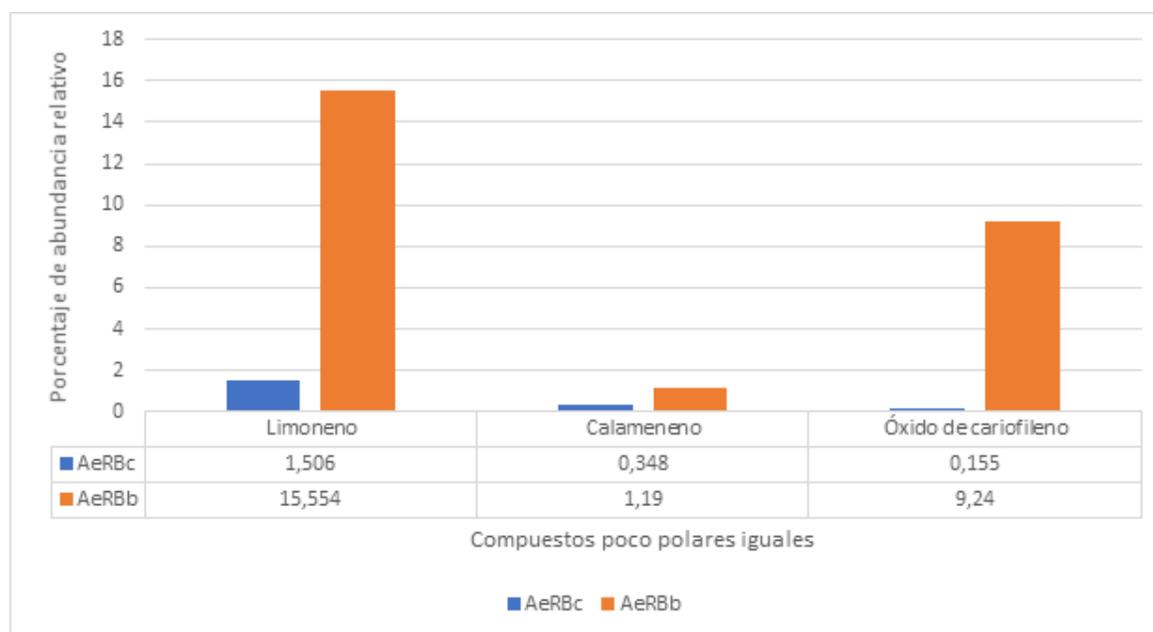
6.5.1.2 Análisis de acuerdo con su abundancia

Con base en su abundancia, el limoneno fue el compuesto mayoritario en **AeRBb** (15.54 %), sus propiedades se detallan más adelante, seguido del sesquiterpeno óxido de cariofileno (9.254 %), Chavan (2010) y colaboradores determinaron actividad analgésica y antiinflamatoria significativa, cuyo porcentaje de inhibición es competitivo contra el estándar utilizado (aspirina) [Chavan, 2010] también Soumyadeep (2014) y su equipo de investigación reportaron al óxido de cariofileno como un potente agente antiinflamatorio [Soumyadeep,2014].

Para **AeRBc** el *m*-cimeno (**133**), α -felandreno (**132**) y su epóxido (**134**) los compuestos mayoritarios con abundancias relativas de 28.771% y 29.511% respectivamente. El α -felandreno (**132**) muestra dos ensayos biológicos, en uno Jen-Jyh Lin (2014) y colaboradores mediante citometría de flujo midieron los efectos de este compuesto sobre la viabilidad celular total y los resultados indicaron que induce la muerte celular [Lin 2014].

Por otra parte, Shu-Ling Hsieh (2014) y su grupo de investigación, sugieren que α -felandreno (**132**) induce necrosis de células J5 pero no apoptosis, y que la necrosis inducida posiblemente involucró el agotamiento de ATP además se notó el aumento de especies reactivas de oxígeno entre ellas el óxido nítrico [Hsieh 2014]. Estos resultados podrían ser una hipótesis del por qué disminuye el porcentaje de inhibición de óxido nítrico en **RBc** con respecto a **RBb** ($72.17 \pm 1.82 < 75.44 \pm 8.12$ a una concentración de 40 mg/mL).

Finalmente, respecto a los compuestos de 10 y 15 carbonos, que comparten ambos aceites, únicamente son tres, un monoterpeno y dos sesquiterpenos; limoneno (**60**), calameneno (**140**) y óxido de cariofileno (**142**) respectivamente. En la **gráfica 1**, se puede apreciar que en **AeRBb** se detectan con mayor porcentaje estos tres compuestos.

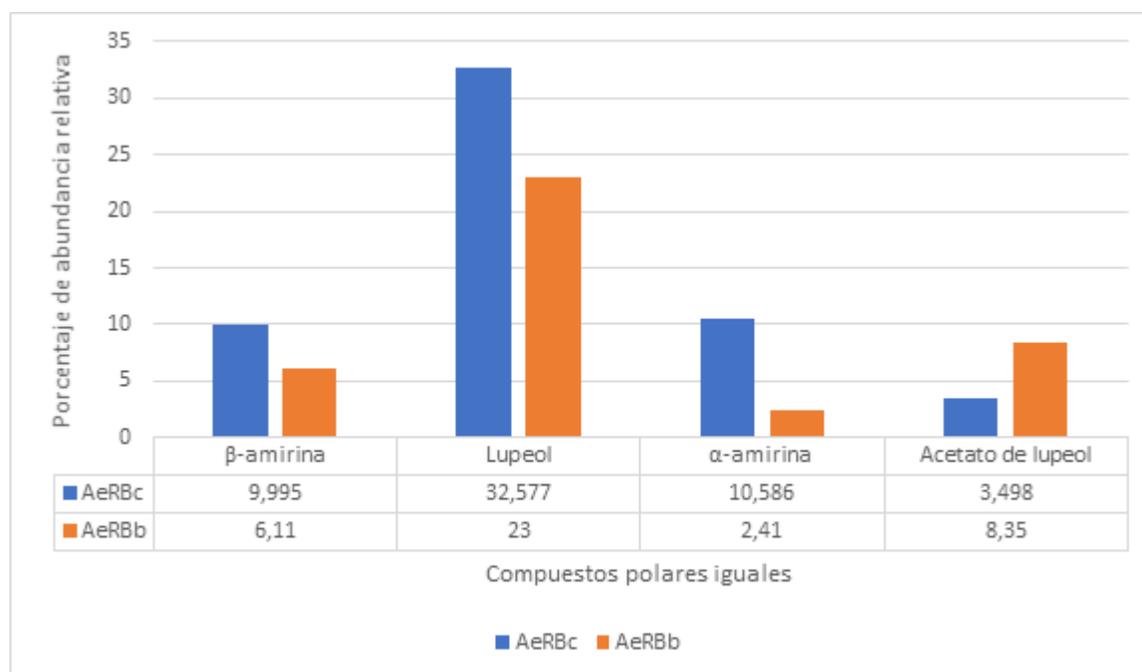


Gráfica 1. Monoterpenos y sesquiterpenos presentes en ambos aceites.

6.5.2 Triterpenos

Los triterpenos son terpenoides de 30 átomos de carbono presentes en varios vegetales y alimentos. Se identificaron por CG tres tipos de esqueleto de triterpeno, tipo lupano: lupeol (**10**) y acetato de lupeol (**135**), tipo oleanano: β -amirina (**13**) y tipo ursano: α -amirina (**12**). Cabe destacar que los cuatro triterpenos fueron detectados en ambas muestras (**AeRBb** y **AeRBc**).

Así mismo, se puede apreciar en la **gráfica 2** una mayor abundancia de estos compuestos terpénicos en **AeRBc**, siendo lupeol (**10**) el mayoritario en ambos aceites 23 y 32 %, respectivamente.



Gráfica 2. Triterpenos presentes en AeRBb y AeRBc.

Algunos de estos compuestos ya habían sido reportados por Lucero y colaboradores en 2014, en resinas colectadas en el centro ceremonial del Templo mayor en Ciudad de México, por medio de CG-EM encontraron en *B. copallifera* lupeol (10) y lupenona (11) en bajas cantidades, mientras que en *B. bipinnata* detectaron *epi*-lupeol (22) con la mayor abundancia, además de α-amirina (12) y su epímero.

66 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

6.6.1 Viabilidad Celular

Se determinó el efecto sobre la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 de los aceites esenciales y resinas de las colectas: **RBc2017**, **RBb2017** y **RBb2019** corresponde a las resinas sin extracción, así como **AeRBc2017**, **AeRBb2017** y **AeRBb2019** correspondiente a los aceites extraídos de las resinas. Para ello, se probaron las muestras a diferentes concentraciones [5, 10, 20, 30 y 40 µg/mL], los resultados indicaron que las resinas y los aceites esenciales no disminuyen la viabilidad celular de forma significativa a ninguna de las concentraciones probadas (**figura 23**), estos resultados permitieron

establecer qué las concentraciones idóneas para evaluar el efecto de las muestras sobre la producción de óxido nítrico son las mismas que se usaron en el ensayo de viabilidad celular (5-40 µg/mL) en la siguiente sección.

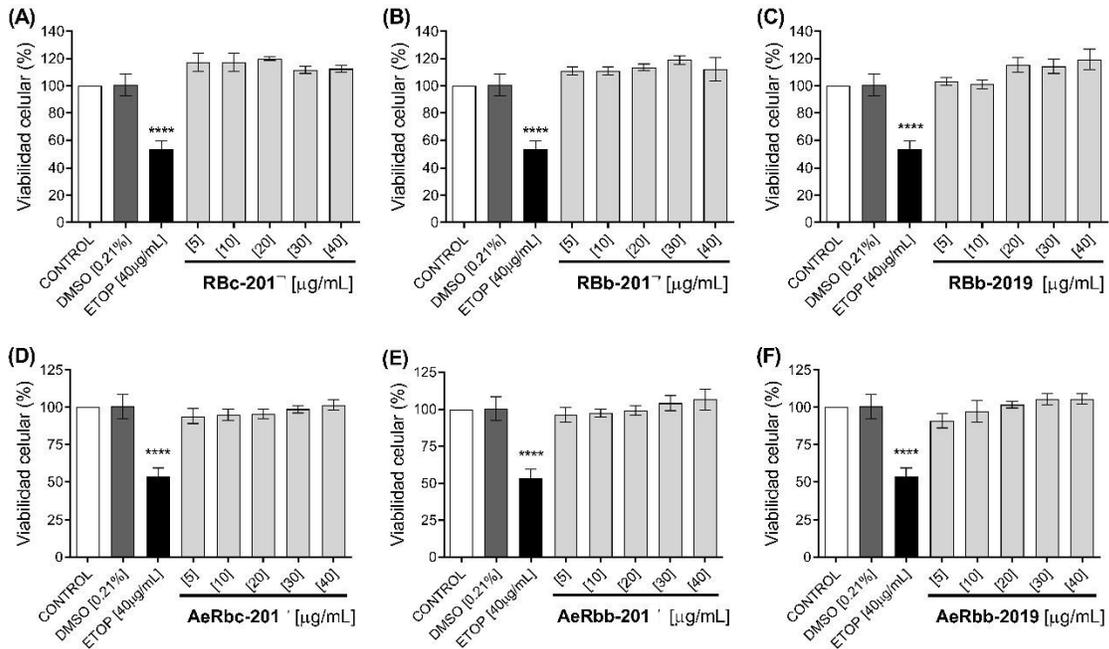


Figura 23. Efecto de las resinas y aceites esenciales sobre la viabilidad celular de los macrófagos RAW 264.7. Los valores se expresan como la media ± DE de tres experimentos independientes (n=3). La diferencia significativa se determinó utilizando un ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. DMSO, ETOP (etopósido), resinas y aceites esenciales comparados con el grupo control (**** p < 0.0001). Control = células sin tratamiento, definido como 100% viabilidad.

6.6.2 Evaluación Óxido Nítrico

Un modelo de actividad antiinflamatoria *in vitro*, es el que mide los niveles de secreción de óxido nítrico (ON), como se comentó previamente este metabolito se encuentra a mayor concentración en una reacción inflamatoria y se considera proinflamatorio debido a su acción como vasodilatador y activador de las enzimas COX.

Este ensayo se llevó a cabo en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se evaluaron las mismas seis muestras que en el ensayo de viabilidad celular (RBc2015, RBb2015 y RBb2019, así como AeRBc2015, AeRBb2015 y AeRBb2019). En las gráficas (Ver anexo D), se muestran el % de nitrito (reacción de Griess) versus el LPS comparado con el grupo de control, DMSO, INDO

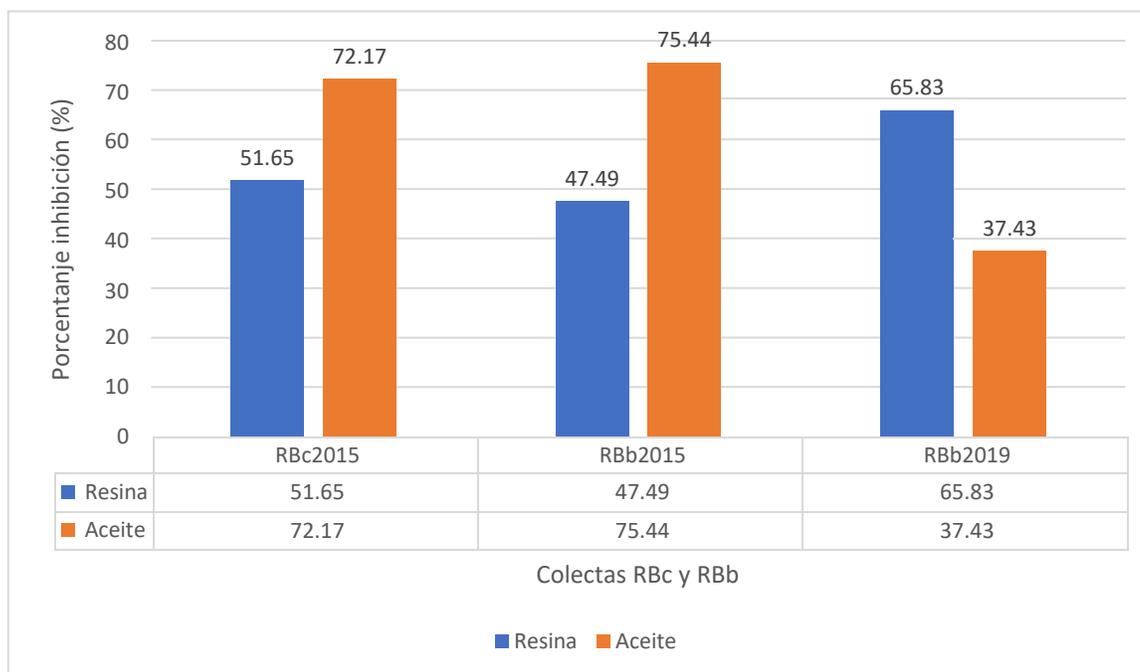
(indometacina), resinas y aceites esenciales [5, 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$], comparados con el grupo LPS.

Por otro lado, los resultados mostrados en la **Tabla 17**, indicaron que tanto las resinas como los aceites esenciales disminuyen de forma significativa la producción de óxido nítrico (ON) a todas las concentraciones probadas. Además, algo importante de apreciar es que a la concentración más alta de 40 $\mu\text{g/mL}$ se observa un mayor % de inhibición (~50→70%) en los aceites extraídos (**AeRbc2015** y **AeRbb2015**) que en las resinas sin extracción. La resina **Rbc-2015** mostró un % de inhibición de 51.65 ± 3.45 y su aceite (**AeRbc2015**) un % 72.17 ± 1.82 ; por otro lado, en **Rbb-2017** fue el % 47.49 ± 1.43 y para su aceite (**AeRbb-2017**) de 75.44 ± 8 ; aumentando la inhibición en ambos casos en alrededor del 30 %; no fue así para la colecta del 2019 (**Gráfica 3**). Finalmente, de todas las muestras, los inhibidores más efectivos fueron **AeRbc-2015** y **AeRbb-2015**.

Tabla 17. Efecto inhibitorio de las resinas y aceites esenciales sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Muestra	% Inhibición				
	[5 $\mu\text{g/mL}$]	[10 $\mu\text{g/mL}$]	[20 $\mu\text{g/mL}$]	[30 $\mu\text{g/mL}$]	[40 $\mu\text{g/mL}$]
Rbc-2015 (A)	13.38 \pm 3.29	9.97 \pm 4.06	17.47 \pm 5.62	40.73 \pm 5.60	51.65 \pm 3.45
Rbb-2015 (B)	13.96 \pm 3.43	24.23 \pm 5.60	31.37 \pm 5.05	35.17 \pm 5.76	47.49 \pm 1.43
Rbb-2019 (C)	9.86 \pm 2.37	15.21 \pm 3.57	40.42 \pm 2.11	48.6 \pm 3.57	65.83 \pm 8.53
AeRbc-2015 (D)	18.68 \pm 6.71	24.53 \pm 2.86	41.09 \pm 3.90	60.48 \pm 4.51	72.17 \pm 1.82
AeRbb-2015 (E)	23.76 \pm 4.88	38.23 \pm 7.25	41.76 \pm 8.72	52.57 \pm 4.35	75.44 \pm 8.12
AeRbb-2019 (F)	12.96 \pm 2.09	17.64 \pm 3.23	24.23 \pm 5.11	28.56 \pm 5.50	37.43 \pm 7.13
Indometacina	-	-	-	48.16 \pm 6.38	-

*Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes. Los datos están representados como la media \pm DE.



Gráfica 3. Comparación de % de inhibición (resina vs aceite) de RBc, RBb 2015 y RBb2019.

6.7 Análisis del contenido metabólico vs actividad biológica.

Al analizar el contenido químico de los aceites (**AeRBb**, **AeRBc**) (Tabla 15). El monoterpeno limoneno (**60**) se pudo detectar en ambas muestras, siendo abundante en **AeRBb** (15 %). En un estudio de Yoon (2010) y colaboradores, mostraron que a 0.01% el limoneno muestra actividad antiinflamatoria (~80%) en macrófagos RAW 264.7, estimulados con LPS, por lo tanto, disminuyen los niveles de ON y prostaglandinas (E2). Por otro lado, disminuye la expresión de citocinas, tal como TNF- α , IL-6 u IL-1 β [Yoon 2010]. Otro estudio de Yu (2017) y su grupo de investigación 2017, estudiaron un modelo de rata con colitis ulcerosa tratado con limoneno, mostrando una disminución de la producción de la prostaglandina E2 [Yu 2017], por lo tanto, se considera al limoneno (**60**) como un buen candidato con buenas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

Por otro lado, otro compuesto de mayor abundancia (únicamente en **AeRBc**) fue el α -felandreno (**132**) (29 %). Jen-Jyh Lin (2014) y colaboradores mediante citometría de flujo midieron los efectos del α -felandreno sobre la viabilidad celular

total y los resultados indicaron que induce apoptosis [Lin 2014]. Y, por otra parte, Shu-Ling Hsieh y su grupo de investigación, sugieren que α -felandreno induce necrosis de células J5, pero no apoptosis, y que la necrosis inducida posiblemente involucró el agotamiento de ATP además se notó el aumento de especies reactivas de oxígeno entre ellas el óxido nítrico [Hsieh 2014].

Así mismo, el terpenoide de 30 carbonos, lupeol (**10**) es el de mayor abundancia en las resinas y aceites de esta investigación, y su epímero en C-3, han mostrado diversas actividades farmacológicas *in vivo* e *in vitro*, principalmente como anticancerígenas y antiinflamatorias. Específicamente el lupeol (**10**) se ha probado en administración oral en ratones artríticos observándose importante reducción de niveles de citocinas IL-2 y IL-4 [Saleem 2009]. Un estudio más reciente en 2019 mostró al lupeol como un inhibidor de neuroinflamación inducida por LPS en cultivos cerebelosos [Oliveira 2019].

Adicionalmente, Romero y colaboradores en 2017, detectaron en RBc los triterpenos 3-epilupeol y α -amirina con alta actividad antiinflamatoria probadas en un modelo de inflamación inducida por TPA en oreja de ratón con 66.93 ± 4.38 , $25 \pm 1.81\%$ de inhibición, respectivamente [Romero 2017]. Mientras que, en ensayos *in vitro* sobre la inhibición de óxido nítrico en macrófagos, el epilupeol, acetato de epilupeol y α amirina, mostraron un alto % de inhibición, 94.75, 93.65 y 98.15 % respectivamente [Romero 2016].

Con base a lo antes expuesto y reportado, se plantea que la abundancia de los compuestos terpénicos (tanto mono como triterpenos), pueden ser los responsables de la inhibición de la secreción de óxido nítrico en los aceites esenciales.

No obstante, las resinas **RBc** y **RBb** (sin extracción) de acuerdo con su análisis por CG-EM, mostraron una mayor abundancia de triterpenos (**Fig. 18C** y **19F**) y escasa presencia de aceites esenciales (**Tabla 10 y 12**), con un % de inhibición de ON de 51.65 ± 3.45 y 47.49 ± 1.43 , respectivamente). Al comparar con el porcentaje de inhibición de sus aceites **AeRBc** y **AeRBb** (72.17 ± 1.82 y 75.44 ± 8.12 , respectivamente), se observa una inhibición mayor por los aceites; por lo que nos permite sugerir que la extracción de mono y sesquiterpenos lleva a cabo

una sinergia con los triterpenos, en los aceites, potenciando su actividad biológica alrededor de un 20 % más.

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Se realizó el análisis de los aceites esenciales de dos copales mexicanos autenticados de *Bursera bipinnata* (**AeRBb**) *Bursera copallifera* (**AeR Bc**) mediante una extracción supercrítica con CO₂.

En el aceite de *Bursera bipinnata* (**AeRBb-2015**) se identificaron 16 compuestos volátiles, siendo 2 monoterpenos hidrocarbonados (**60**, **147**), 9 monoterpenos oxigenados (**98**, **148**, **150**, **151**, **152**, **153**, **154**, **155**, **156**), 2 monoterpenos aromáticos (**58**, **149**), 3 sesquiterpenos (**157**, **142**, **140**) y 4 triterpenos pentacíclicos (**10**, **12**, **13**, **135**). Los compuestos mayoritarios detectados fueron: limoneno (**60**) (15.54%), carvona (**98**) (11.69%) y óxido de cariofileno (**142**) (9.24%).

En el aceite de *Bursera copallifera* (**AeRBc-2015**) se detectaron 14 compuestos volátiles, siendo 3 monoterpenos hidrocarbonados (**60**, **61**, **132**), 3 monoterpenos oxigenados (**134**, **137**, **139**), 5 monoterpenos aromáticos (**96**, **133**, **136**, **138**, **141**), 2 sesquiterpenos (**140**, **142**), 1 diterpeno (**143**) y 4 triterpenos pentacíclicos (**10**, **12**, **13**, **135**). Los compuestos mayoritarios fueron: α -felandreno (**132**) (29.511 %), *m*-cimeno (**133**) (28.771 %) y epóxido de α -felandreno (**134**) (7.237 %).

Los compuestos poco polares presentes en ambos aceites de **AeRBc-2015** y **AeRBb-2015** son:

limoneno (**60**) (1.506, 15.554%), calameneno (**140**) (0.348, 1.19%) y óxido de cariofileno (**142**) (0.155, 9.24%).

La comparación química de las dos diferentes colectas de aceites de *B. bipinnata* 2015 y 2019 (**AeRBb-2015** y **AeRBb-2019**) indicaron una diferencia de la mayoría de los monoterpenos, compartiendo únicamente 5 monoterpenos, *p*-cimeno (**58**), carvona (**98**), 1-hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno (**157**), calameneno (**140**) y óxido de cariofileno (**142**), así como 4 triterpenos: lupeol (**10**), α -amirina (**12**) β -amirina (**13**) y acetato de lupeol (**135**).

En cuanto a la actividad antiinflamatoria *in vitro*, los aceites **AeRBc-2015** y **AeRBb-2015** mostraron un % de inhibición de ON muy similar de 72.17 ± 1.82 y 75.44 ± 8.12 , respectivamente, esto es un 21 y 28 % más que las resinas sin extracción; lo que nos permite proponer que la extracción de mono y sesquiterpenos, puede llevar a cabo una sinergia con los triterpenos, potenciando así su actividad antiinflamatoria.

Finalmente, este trabajo confirma el uso tradicional como antiinflamatorio de los compuestos volátiles de dos copales mexicanos colectados en el estado de Morelos (*Bursera bipinnata* y *Bursera copallifera*).

8. PERSPECTIVAS

8. Perspectivas

Las perspectivas que se tienen contempladas para el proyecto son las siguientes:

- Recolección, extracción, análisis químico y evaluación biológica de una colecta nueva (reciente) de resina de *Bursera copallifera*.
- Análisis estacional de los aceites de los copales aquí estudiados.
- Ensayos *in vivo* en modelo de TPA de los aceites obtenidos.
- Estudio químico y biológico de otros tipos de copales mexicanos.

9. BIBLIOGRAFÍA

-Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular + StudentConsult*. Barcelona, España: Elsevier Health Sciences Spain.

-Acta Botánica Mexicana (2004), 66: 23-151

-Agarwal, S. G.; Gupta, A.; Kapahi, B. K.; Thappa, B. R. K.; Suri, O. P. Chemical Composition of Rose Water Volatiles. *J. Essent. Oil Res.* (2005), 17 (3), 265–267. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698897>.

-Alegre science. (2016). The melloeX botanical extractor harnesses the benefits of liquid CO₂ to extract botanicals safely and selectively. 23/09/2019, de Alegre science Sitio web: <https://alegrescience.com/home/mello-ex-extractor/>

-Alvarez, M. E. G., Jiménez, M. C., & Garcés, M. E. (2016). *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional*. Barcelona, España: Lippincott Williams & Wilkins.

-Antúnez, M. M.; León, A.; Rojas-Sepúlveda, A. M.; Marquina, S.; Mendieta-Serrano, M. A.; Salas-Vidal, E.; Villarreal, M. L.; Alvarez, L. Aryldihydronaphthalene-Type Lignans from *Bursera Fagaroides* Var. *Fagaroides* and Their Antimitotic Mechanism of Action. *RSC Adv.* (2016), 6 (6), 4950–4959. <https://doi.org/10.1039/c5ra23516b>.

-Başer, K. H. C.; Kürkçüoğlu, M.; Demirci, B.; Özek, T.; Tarımcılar, G. Essential Oils of *Mentha* Species from Marmara Region of Turkey. *J. Essent. Oil Res.* (2012), 24 (3), 265–272. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676775>.

-Can Baser K. H. (2010). Chemistry of essential oils. En *Handbook of essential oils, science, technology, and applications* (121-150). Florida, Estados Unidos: CRC Press Taylor & Francis Group.

-Cannabigold. (2019). What is Supercritical CO₂ extraction. 21/09/2019, de cannabigold Sitio web: <https://cannabigold.pl/en/knowledge/what-is-supercritical-co2-extraction/>

-Canales, M. M.; et al. Antimicrobial Activity of *Bursera Morelensis* Ramírez Essential Oil. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* (2017), 14 (3), 74–82. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i3.8>.

-Carrera, M. C. A.; Rocío, R. L.; Aurelio, R. M. M.; Margarita, C. M. M.; Angélica, R. G.; Rubén, J. A. Chemical Composition and In Vivo Anti-Inflammatory

Activity of *Bursera Morelensis* Ramírez Essential Oil. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* (2014), 17 (5), 758–768. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895149>.

-Case, R. J.; Tucker, A. O.; Maciarelo, M. J.; Wheeler, K. A. Chemistry and Ethnobotany of Commercial Incense Copals, Copal Blanco, Copal Oro, and Copal Negro, of North America. *Econ. Bot.* (2003), 57 (2), 189–202. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0189:CAEOCI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0189:CAEOCI]2.0.CO;2).

-Chavan, M. J.; Wakte, P. S.; Shinde, D. B. Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Caryophyllene Oxide from *Annona Squamosa* L. Bark. *Phytomedicine* (2010), 17 (2), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016>.

-Columba-Palomares, M. F. M. C.; Villareal, D. M.; Acevedo Quiroz, M. C. M. E.; Marquina Bahena, M. C. S.; Álvarez Berber, D. L.; Rodríguez-López, D. V. Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of *Bursera Copallifera*. *Pharmacogn. Mag.* (2016), 11 (44), 322. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.166067>.

-Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium Digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48 (6), 2576–2581. <https://doi.org/10.1021/jf990835x>.

-De Groot, A. C.; Schmidt, E. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis* (2016), 27 (4), 161–169. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000193>

-Dewick Paul M. (2002). The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids. En *Medicinal Natural Products*(167-212). England: John Wiley & Sons Ltd.

-Dorado Ramírez Óscar. (2019). Copales y cuajotes en el México biodiverso. 14/06/2020, de HYPATIA Sitio web: <https://revistahypatia.org/biotecnologia-revista-38.html>

-Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana SAde CV.

-García Barreno, P. La Inflamación. (2008), 102, 91–159. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*

-Hernández, J.; García, L.; Hernández, A.; Alvarez, R.; Román, L. U. Glicósidos de Luteolina y Miricetina de Burseraceae. *Rev. la Soc. Química México* (2002), 46 (4), 295–300.

-Hsieh, S. L.; Li, Y. C.; Chang, W. C.; Chung, J. G.; Hsieh, L. C.; Wu, C. C. Induction of Necrosis in Human Liver Tumor Cells by α -Phellandrene. *Nutr. Cancer* (2014), 66 (6), 970–979. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.936946>.

-IRB. (2007). La inflamación está en el origen y la progresión de enfermedades como la diabetes o el cáncer. 14/06/2020, de Institute for Research in Biomedicine Sitio web: <https://www.irbbarcelona.org/es/news/la-inflamacion-esta-en-el-origen-y-la-progresion-de-enfermedades-como-la-diabetes-o-el-cancer>

-Jolad, S. D.; Wiedhopf, R. M.; Cole, J. R. Cytotoxic Agents from *Bursera Morelensis* (Burseraceae): Deoxypodophyllotoxin and a New Lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *J. Pharm. Sci.* (1977), 66 (6), 892–893. <https://doi.org/10.1002/jps.2600660647>.

-Koulman, A. Podophyllotoxin: A Study of the Biosynthesis, Evolution, Function and Use of Podophyllotoxin and Related Lignans; University of Groningen: Groningen, The Netherlands, (2003).

-Lin, J.-J. Alpha-Phellandrene-Induced DNA Damage and Affect DNA Repair Protein Expression in WEHI-3 Murine Leukemia Cells In Vitro. *Environ. Toxicol.* (2014), May, 1322–1330. <https://doi.org/10.1002/tox>.

-Linares, E., y R. Bye. (2008). El copal en México. CONABIO. *Biodiversitas* 78:8-11

-Lopez, M. Los Aceites Esenciales. *Ámbito Farm.* (2004), 23 (7), 88–91.

-Lona, Naoli Victoria, “El copal en las ofrendas del Templo Mayor”, *Arqueología Mexicana* núm. 67, pp. 66-71.

-Lucero-Gómez, P.; Mathe, C.; Vieillescazes, C.; Bucio, L.; Belio, I.; Vega, R. Analysis of Mexican Reference Standards for *Bursera* Spp. Resins by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Application to Archaeological Objects. *J. Archaeol. Sci.* (2014), 41, 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.07.021>.

-Marcotullio, M. C.; Curini, M.; Becerra, J. X. An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera* Spp. *Molecules* (2018), 23 (8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081976>.

-Margni Aníbal Ricardo. (1996). *Inmunología e Inmunoquímica*. Fundamentos. Argentina: Editorial médica Panamericana.

-Martínez M. A. (2001). *Aceites esenciales*. Medellín: Facultad Química Farmacéutica.

-Medina-Lemos R. (2008). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. México, D.F.: Departamento de Botánica Instituto de Biología, UNAM.

-Montúfar López, Aurora, "Copal, humo aromático de tradición ritual mesoamericana", *Arqueología Mexicana* núm. 135, pp. 64-65.

-Nakanishi, T.; Inatomi, Y.; Murata, H.; Shigeta, K.; Iida, N.; Inada, A.; Murata, J.; Farrera, M.A.P.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; et al. A new and known cytotoxic aryltetralin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. *Chem. Pharm. Bull.* (2005), 53, 229–231.

-NIH. (2019). Célula madre hematopoyética . 14/06/2020, de NIH Sitio web: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/celula-madre-hematopoyetica>

-NIH. (2019). Glóbulo blanco. 14/06/2020, de NIH Sitio web: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/globulo-blanco>

-Oliveira-Junior, M. S.; Pereira, E. P.; de Amorim, V. C. M.; Reis, L. T. C.; do Nascimento, R. P.; da Silva, V. D. A.; Costa, S. L. Lupeol Inhibits LPS-Induced Neuroinflammation in Cerebellar Cultures and Induces Neuroprotection Associated to the Modulation of Astrocyte Response and Expression of Neurotrophic and Inflammatory Factors. *Int. Immunopharmacol.* (2019), 70 (February), 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.055>.

-Pavón Romero Lenin. (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. España: Wolters Kluwer.

-Purata, S. E. V. Uso y Manejo de Los Copales Aromáticos: Resinas y Aceites. *Colección Manejo Campesino Recur. Nat.* (2008), 60.

-Quintans, J. S. S.; Shanmugam, S.; Heimfarth, L.; Araújo, A. A. S.; Almeida, J. R. G. d. S.; Picot, L.; Quintans-Júnior, L. J. Monoterpenes Modulating Cytokines - A Review. *Food Chem. Toxicol.* (2019), 123 (July 2018), 233–257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.058>.

-Romero (2012). *Estudio de la actividad antiinflamatoria in vivo de los derivados sintéticos de epilupeol y α -amirina presentes en B. copallifera*. (Tesis maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, México.

-Romero, A. (2018). *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 de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, México.

-Sain, S.; Naoghare, P.; Devi, S.; Daiwile, A.; Krishnamurthi, K.; Arrigo, P.; Chakrabarti, T. Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from Aegle Marmelos, as the Potent Anti-Inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells. *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* (2014), 13 (1), 45–55. <https://doi.org/10.2174/18715230113129990016>.

-Saleem, M. Lupeol, a Novel Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Dietary Triterpene. *Cancer Lett.* (2009), 285 (2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.033>.

-Sepúlveda-jiménez, G. Sepúlveda Jiménez, Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. *Rev Mex Fitopatol* (2003), 21 (3), 355–363.

-Spelman, K.; Burns, J. J.; Nichols, D.; Winters, N.; Ottersberg, S.; Tenborg, M. Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines: A Review of Herbal Immunomodulators. *Altern. Med. Rev.* (2006), 11 (2), 128–150.

-Tizard, I. R. (2009). *Immunología Veterinaria*. Barcelona, España: Elsevier Science Health Science Division.

-Yoon, W. J.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. Limonene Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide, Prostaglandin E₂, and pro-Inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Macrophages. *J. Oleo Sci.* (2010), 59 (8), 415–421. <https://doi.org/10.5650/jos.59.415>.

-Yu, L.; Yan, J.; Sun, Z. D-Limonene Exhibits Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties in an Ulcerative Colitis Rat Model via Regulation of INOS, COX-2, PGE2 and ERK Signaling Pathways. *Mol. Med. Rep.* (2017), 15 (4), 2339–2346. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6241>.

10. ANEXOS

Anexo A. Protocolo de uso del extractor melloeX marca *Alegre science*.

Protocolo de uso del extractor de líquidos supercríticos con CO₂ melloeX marca *Alegre science*.

1. **Verificación del correcto funcionamiento y estado de los componentes del extractor.**
 - a. **Recirculador:** Verificar que tenga agua dentro del contenedor, si ya está muy sucia se procederá a su limpieza total. Verificar que las mangueras estén bien conectadas.
 - b. **Extractor:** Verificar que el cilindro no tenga polvo y pelusa, en caso contrario, con un trapo húmedo limpiar dentro de él.
 - c. **Soxhlet:** Manipular con mucho cuidado ya que es un instrumento frágil, verificar que esté bien limpio.
 - d. **Seguridad:** Utilizar siempre accesorios de seguridad en el laboratorio (bata, guantes, lentes de protección y botas).
2. **Preparación de la muestra**
 - a. Pesar muestra y frasco recolector en la balanza analítica.
 - b. Depositar la muestra en el cartucho blanco.
 - c. Introducir el cartucho dentro del soxhlet y poner la tapa amarilla.
 - d. Una vez pesado el frasco recolector, ponerlo al final del soxhlet y cerrar bien.
 - e. Poner la funda verde al frasco recolector.
 - f. Con una liga asegurar el gancho del frasco con un brazo del soxhlet.
 - g. Introducir todo este sistema dentro del cilindro del extractor, asegurarse que esté en medio y totalmente vertical.
 - h. Disponer a la mano la pistola de aire caliente y llave de trinquete.

Nota: Anotar registro en las respectivas bitácoras de uso de los equipos que se usen.



Tapa amarilla

Soxhlet

Frasco recolector + funda verde

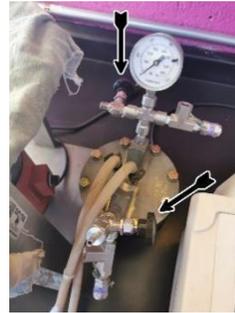
3. Pesar hielo seco

- a. Si el hielo seco está sin triturar, con un martillo y una jerga ir triturando y vaciando en otra hielera.
- b. En un recipiente, pesar 800 gramos de hielo seco por cada extracción que se realice.
- c. Vaciar el hielo seco dentro del cilindro del extractor, asegurarse que el hielo no incline el soxhlet y llenar de forma proporcional.
- d. Retirar la tapa amarilla y poner la tapa del extractor con precaución.

Nota: Realizar la trituración y pesado del hielo seco lo más rápido posible, debido a que se sublima rápido.

4. Cerrar el extractor

- a. Atornillar en forma cruzada
- b. Cerrar las dos válvulas de escape.



5. Calentamiento

- a. Prender la mantilla de calentamiento
- b. Prender la pistola de aire caliente a media potencia y apuntar directo en el cilindro, se formará escarcha en el cilindro.
- c. Aplicar el aire caliente durante aproximadamente 15 minutos, la válvula de presión debe llegar a la marca negra (800 psi).

6. Recirculador

- a. Al llegar a la presión máxima se enciende el recirculador.
- b. Se disminuye la temperatura de la mantilla de calentamiento.
- c. Dejar la extracción durante el tiempo establecido.

Nota: Monitorear que la temperatura del recirculador disminuya.

Revisar que la presión del extractor se mantenga en el límite.



7. Despresurización

- a. Al término de la extracción se apaga el recirculador y se desconecta.
- b. Apagar la mantilla de calentamiento y desconectarla.
- c. Abrir ligeramente las válvulas de escape.
- d. Dejar despresurizar lentamente hasta su término.
- e. Se desatornilla la tapa del extractor y se retira el soxhlet.
- f. Retirar el frasco recolector con el aceite extraído y pesarlo.
- g. Tapar, etiquetar y asegurar con Parafilm el frasco y llevarlo al refrigerador a -20°C.
- h. Limpiar el soxhlet con disolventes hasta dejarlo completamente limpio.
- i. Limpiar el área utilizada, así como el extractor.

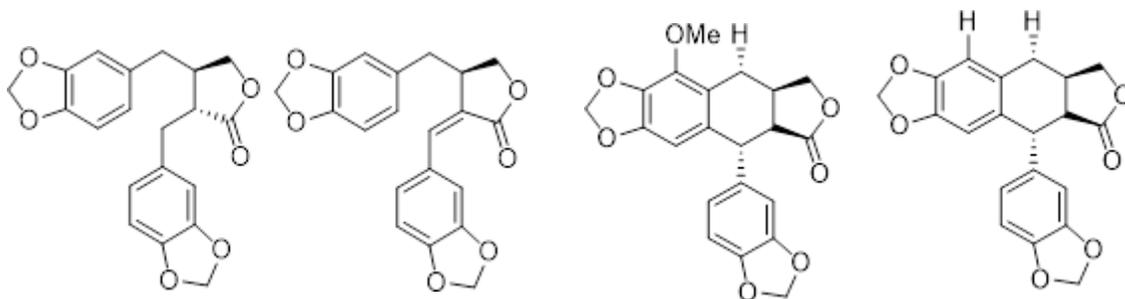
Anexo B. Claves numéricas de los compuestos

Clave numérica	Nombre del compuesto
1	Hinokinin
2	Savinin
3	Burseranin
4	Picropoligamain
5	Deoxipodofilotoxina
6	Morelensin
7	7'8'- deshidropodofilotoxina
8	7'8'- deshidroacetilpodofilotoxina
9	7'8'-deshidro trans-p- cumaroilpodofilotoxina
10	Lupeol
11	Lupenona
12	α -amirina
13	β -amirina
14	α -amirona
15	β -amirona
16	3- <i>epi</i> - α -amirina
17	3- <i>epi</i> - β -amirina
18	<i>epi</i> -lupeol
19	Copaeno
20	<i>D</i> -germacreno
21	3-O- α -L-ramnopiranosido de miricetina
22	1,4-cadinadieno
23	<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno
24	Terpinen-2,5-diol
25	Indometacina
26	3,4-seco-ursan-12(13)-en- 3,4 lactona
27	Acido ursólico
28	Oleanderolido
29	N-3,4-seco-urs- 4(23)12(13)-dien-il-1-4'R- hidroxi-L-prolina metil éster
30	α -cubebeno
31	N-3,4-seco-lupa-4(23) 20(29)-dienil-4'R-hidroxi-L- prolina metil éster
32	β -cubebeno
33	3,4-seco-urs-4(23),12(13)- dien-3-ol
34	Eugenol
35	Acetato de eugenilo
36	Cariofileno
37	Anetol
38	Fenchona
39	Estragol
40	Sabineno
41	α -pineno
42	β -pineno
43	Terpinen-4-ol
44	Miristicina
45	Elemicina
46	Salicilato de metilo
47	Cinamaldehído
48	2-metoxicinamaldehído
49	Cinamil acetato
50	Pulegona
51	Mentona
52	2-feniletanol
53	Linalool
54	Citronelol
55	Mirceno
56	<i>E</i> -ocimeno
57	<i>Z</i> -ocimeno
58	<i>p</i> -cimeno
59	α -fencheno
60	Limoneno
61	β -felandreno
62	Terpinoleno
63	α -terpineno
64	γ -terpineno
65	Canfeno
66	α -tujano
67	Triciclono
68	α -farneseno
69	4,5-epoxi-carano
70	(<i>E</i>)- β -farneseno
71	α -bisaboleno
72	β -bisaboleno
73	Curcumeno
74	β -elemeno
75	α -cadineno
76	γ -cadineno
77	Naftaleno, 1,2,3,4,6,8a- hexahidro-1-isopropil-4,7- dimetil-
78	β -selineno
79	Aromadendreno
80	α -cedreno
81	β -cedreno

82	α -gurjuneno
83	Geraniol
84	Nerol
85	Lavandulol
86	Acetato de citronelilo
87	Acetato geranilo
88	Acetato linalilo
89	Citronelal
90	Geranial
91	Neral
92	Z-carveol
93	Mentol
94	Pulegol
95	Terpineol
96	Carvacrol
97	Timol
98	Carvona
99	C ₁₀ H ₁₆ O
100	Piperitona
101	Borneol
102	Mirtenol
103	Pinocarveol
104	Mirtenal
105	α -canfor
106	D-canfor
107	3-ciclohexen-1-ona-2-isopropil-5-metil
108	α -bisabolol
109	β -bisabolol
110	Elemol
111	α -cadinol
112	α -eudesmol
113	β -eudesmol
114	Isovalencenal
115	Zizanal
116	(E,E)-germacrona
117	α -vetivona
118	β -vetivona
119	Patchoulol
120	α -santalol
121	Alcohol de bencilo
122	Alcohol cinámico
123	(Z)-metilcinamato
124	Benzaldehído
125	Cuminaldehído
126	Vanilina
127	Safrol
128	Eucaliptol
129	Mentofurano

130	Ácido geránico
131	Ácido isovalérico
132	α -felandreno
133	m-cimeno
134	Epóxido de a felandreno
135	Acetato de lupeol
136	Cumaldehído
137	Timoquinona
138	Bencenometanol,4-(1-metiletil)
139	2-ciclohexen-1-ona,4-hidroxi-3-metil-6-(1-metiletil)-trans
140	Calameneno
141	Fenol,4-metoxi-2,3,6-trimetil
142	Oxido de cariofileno
143	R-Kaur-16-eno
144	Silvestreno
145	Carvanona
146	Tujona
147	trans-p-menta-2,8-dienol
148	cis-2,8-p-mentadien-1-ol
149	Melilotal
150	trans-p-menta-1 (7), 8-dien-2-ol
151	trans-carveol
152	cis-carveol
153	Oxido de carvona
154	Limoneno glicol
155	Oxido de limoneno
156	2-isopropilideno-5-metilhex-4-enal
157	1-hidroxi-1,7-metil-4-isopropil-2,7-ciclodecadieno
158	Cubenol
159	β -cirmeno
160	2-careno

Anexo C. Biblioteca de estructuras químicas

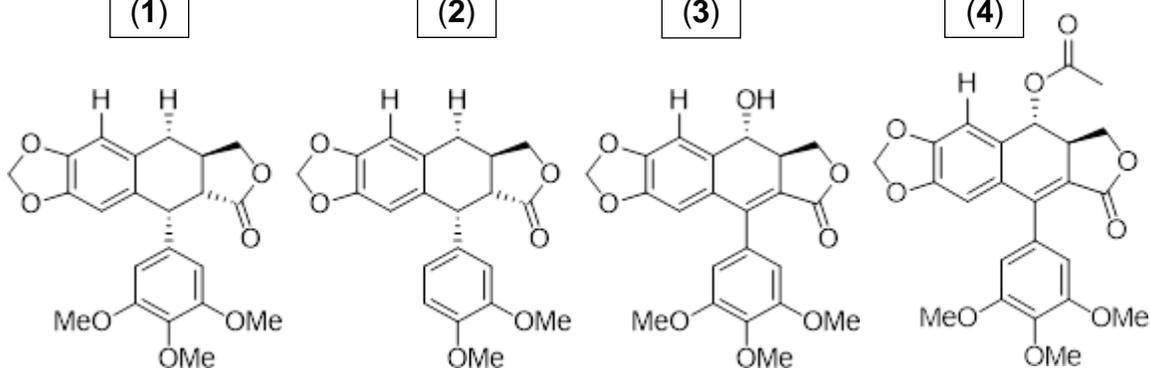


(1)

(2)

(3)

(4)

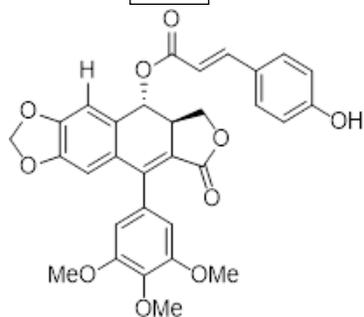


(5)

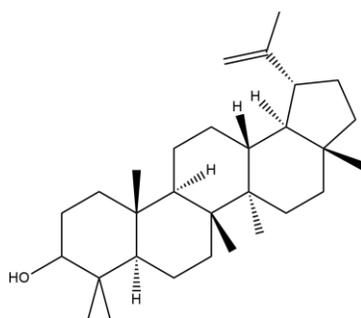
(6)

(7)

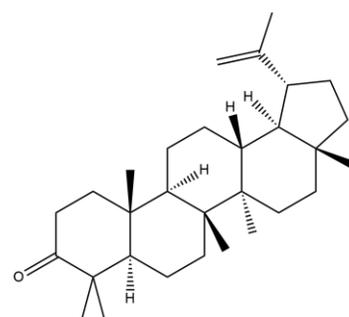
(8)



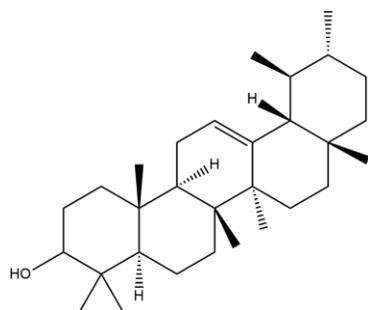
(9)



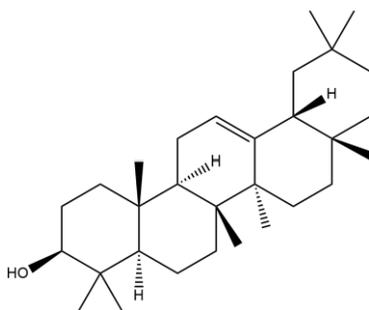
(10)



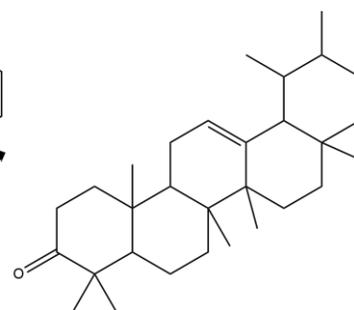
(11)



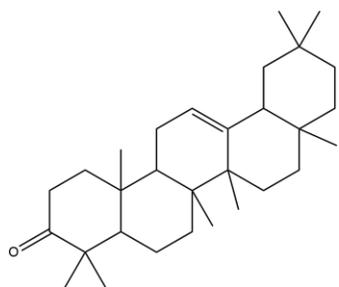
(12)



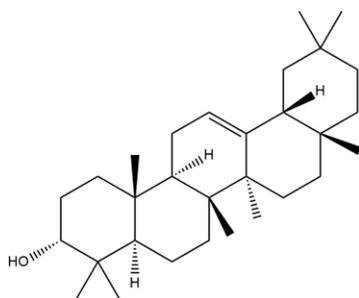
(13)



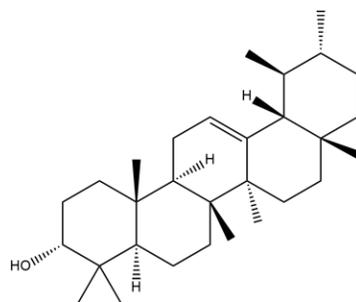
(14)



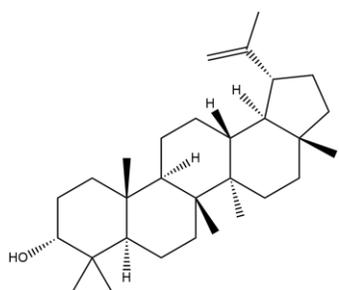
(15)



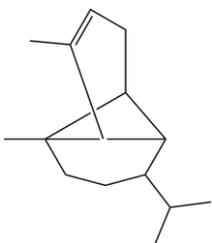
(16)



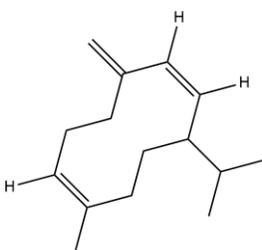
(17)



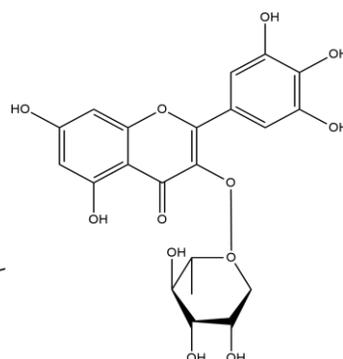
(18)



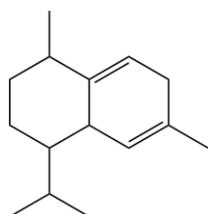
(19)



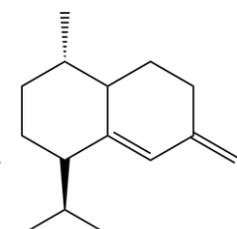
(20)



(21)

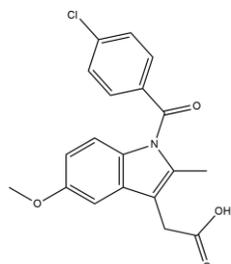


(22)

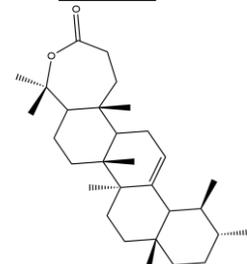


(23)

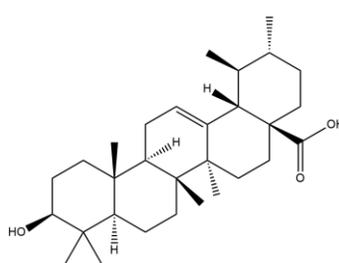
(24)



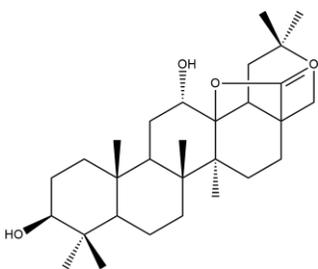
(25)



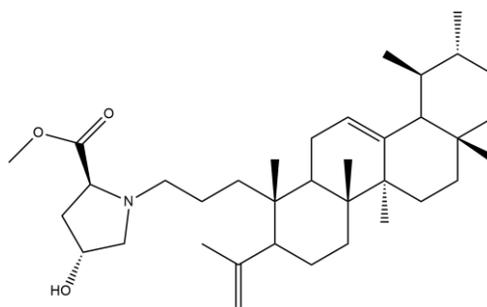
(26)



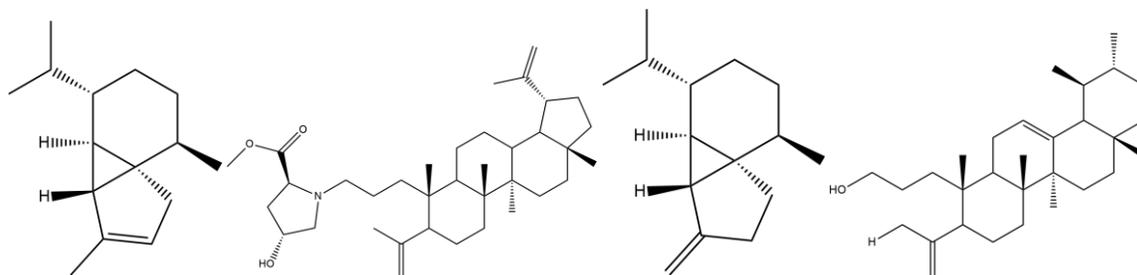
(27)



(28)



(29)

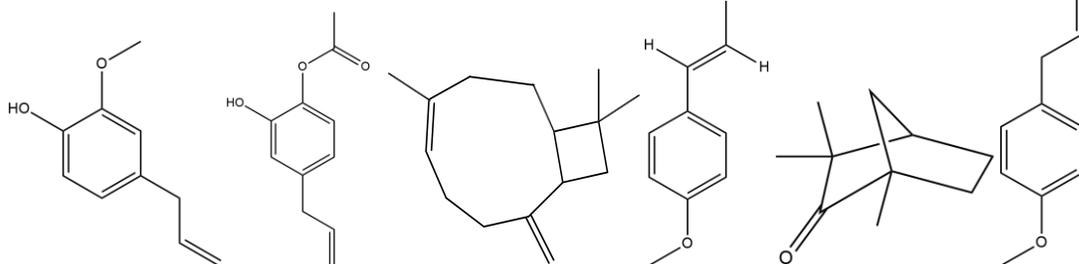


(30)

(31)

(32)

(33)



(34)

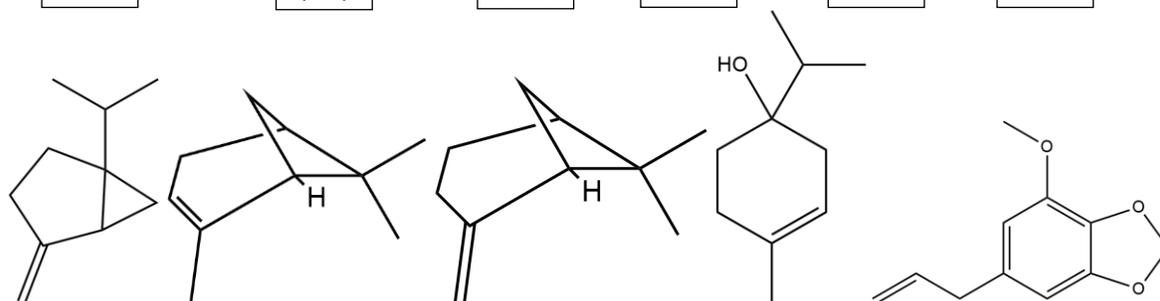
(35)

(36)

(37)

(38)

(39)



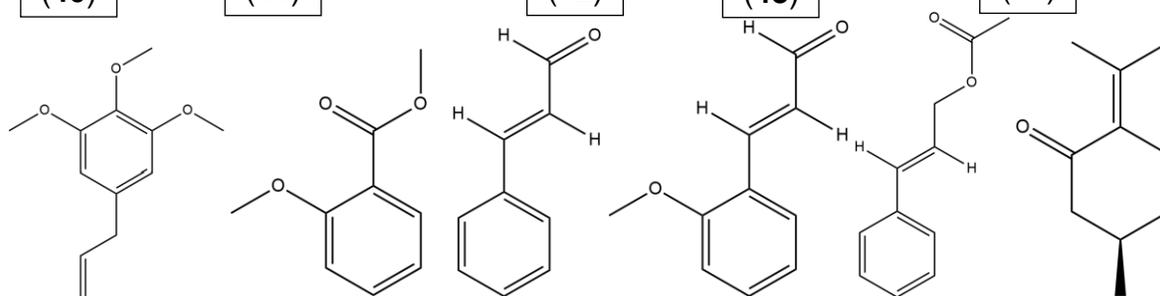
(40)

(41)

(42)

(43)

(44)



(45)

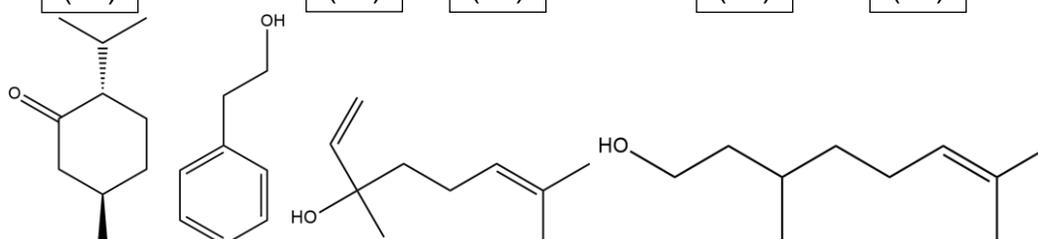
(46)

(47)

(48)

(49)

(50)

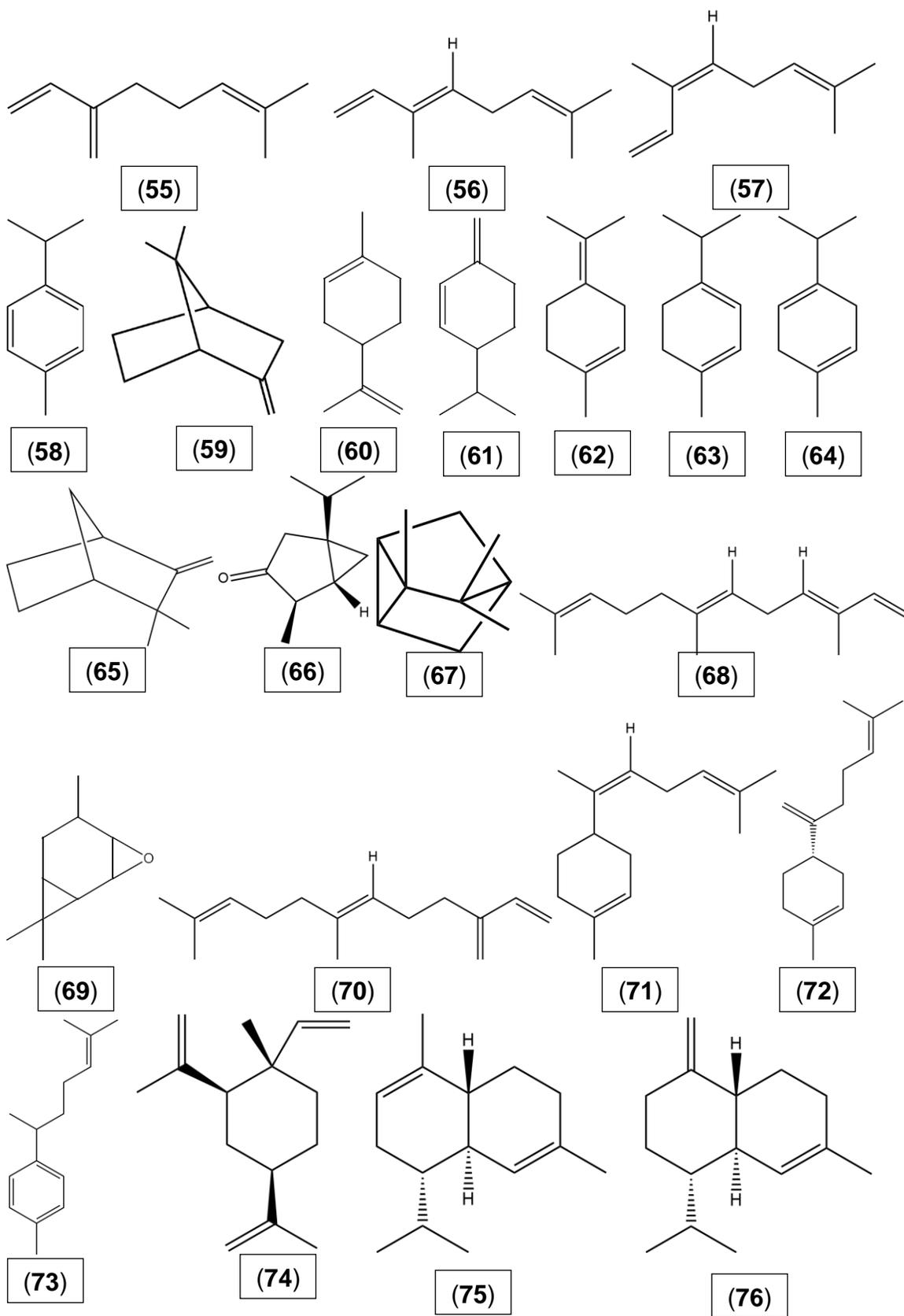


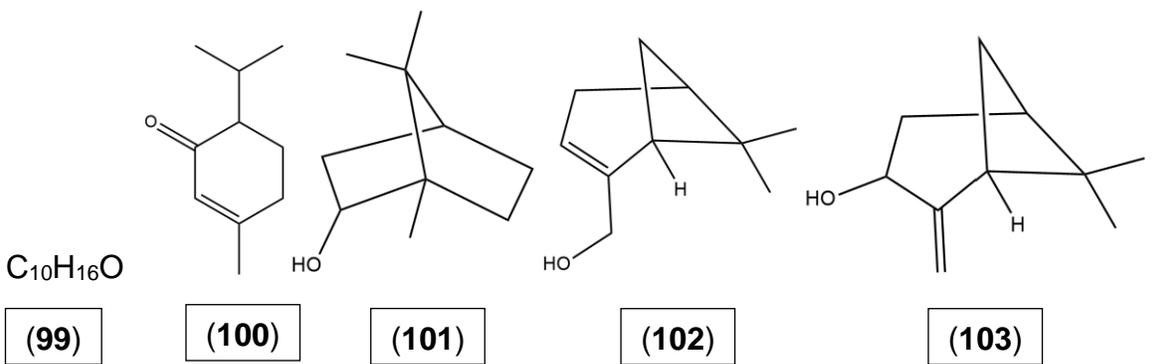
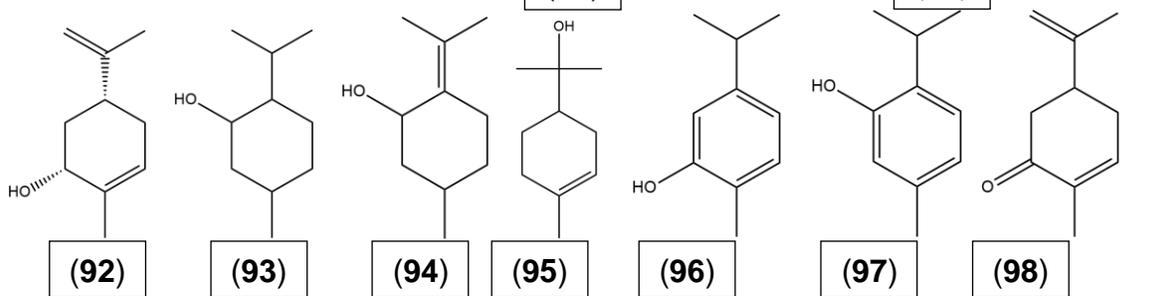
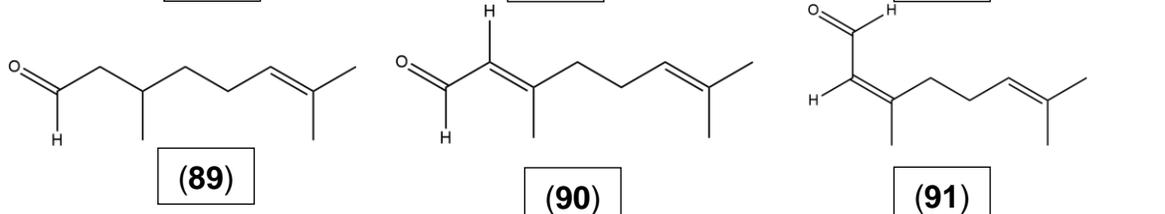
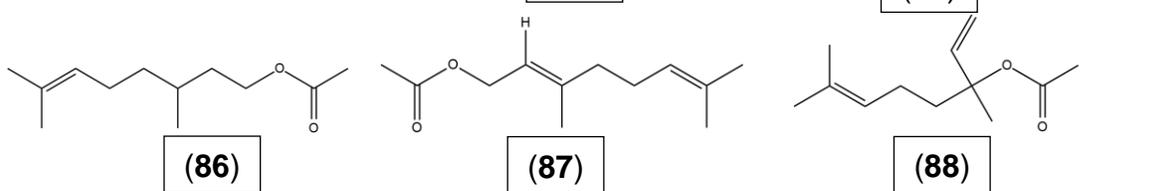
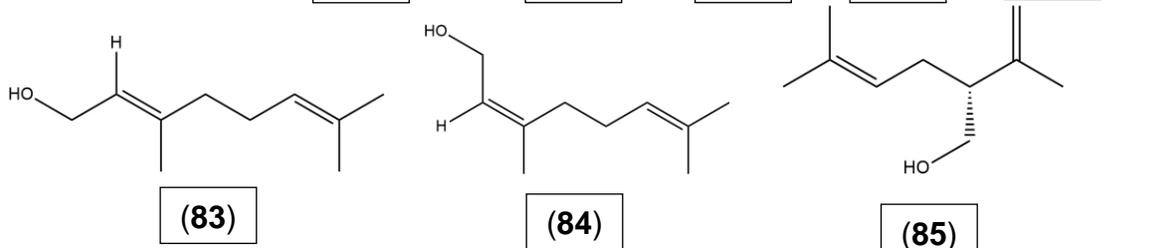
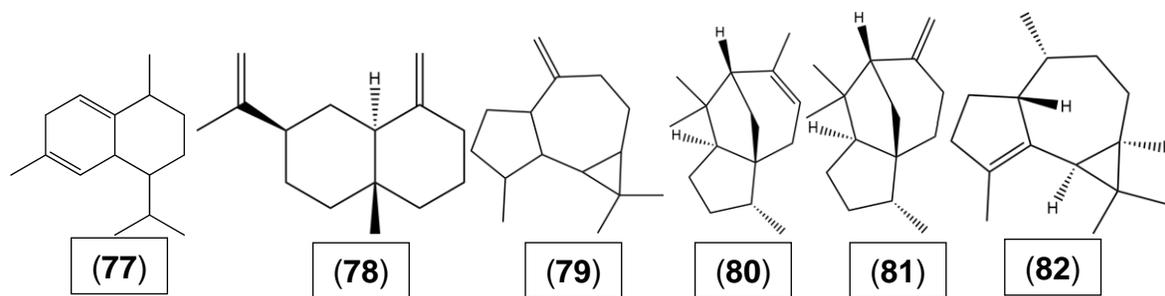
(51)

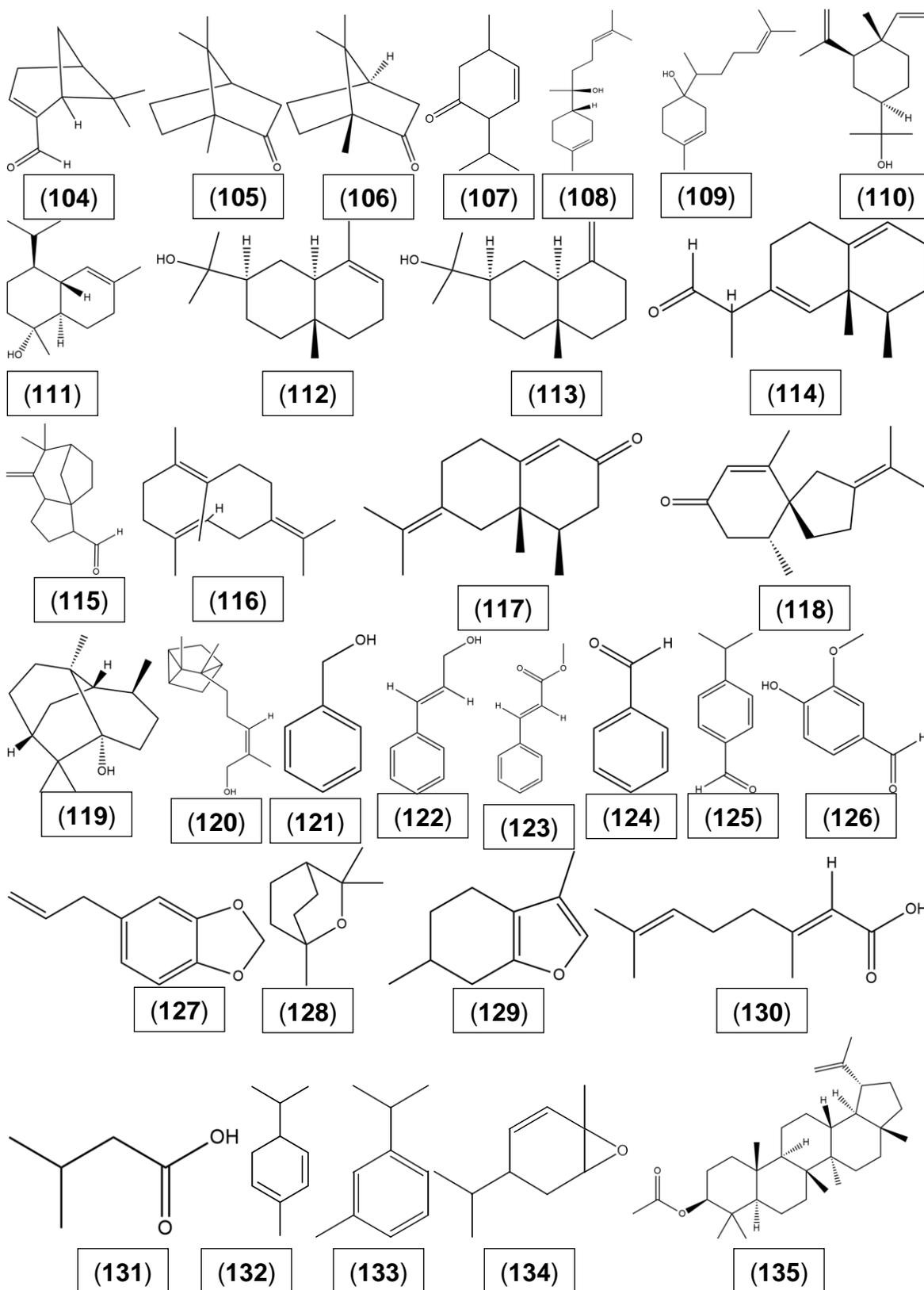
(52)

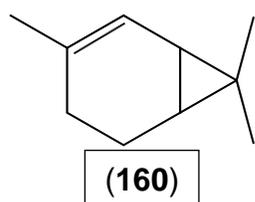
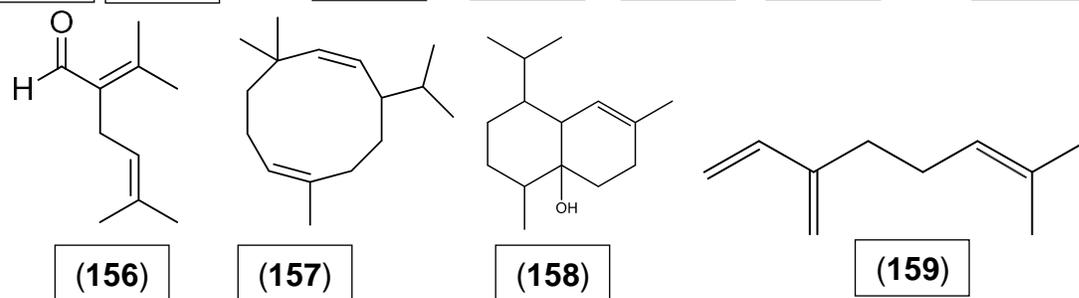
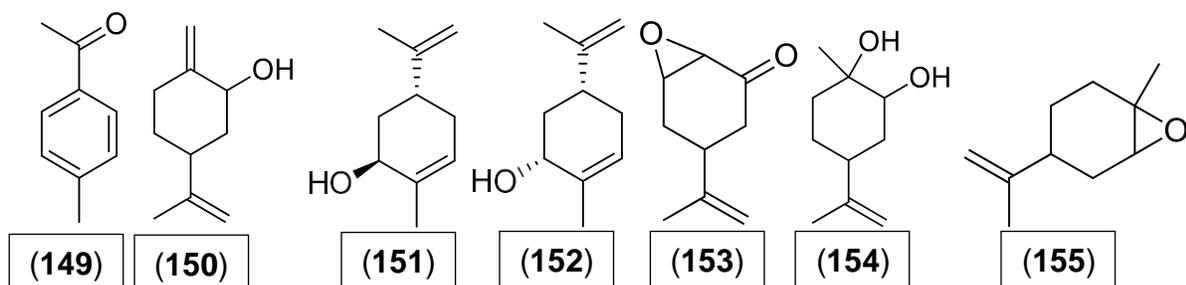
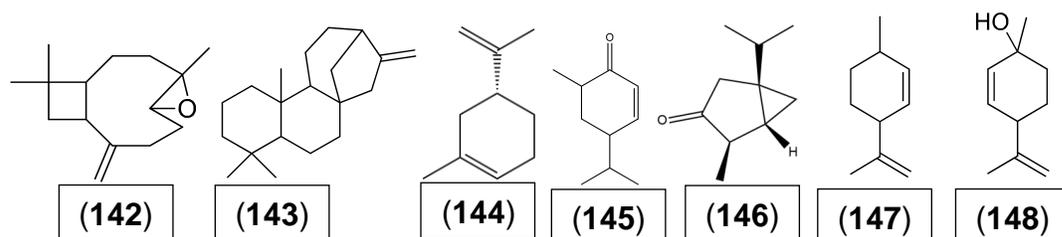
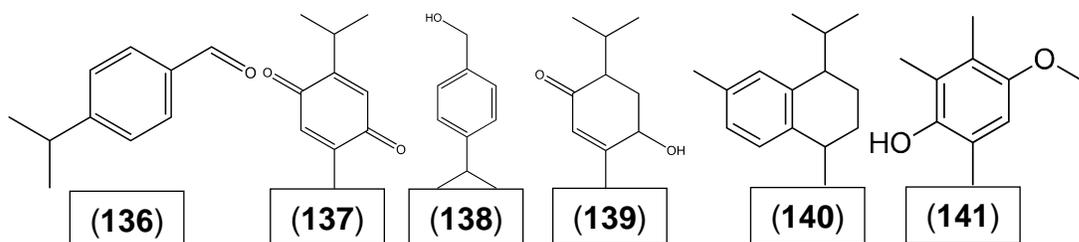
(53)

(54)









Anexo D. Efecto de las resinas y aceites esenciales sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

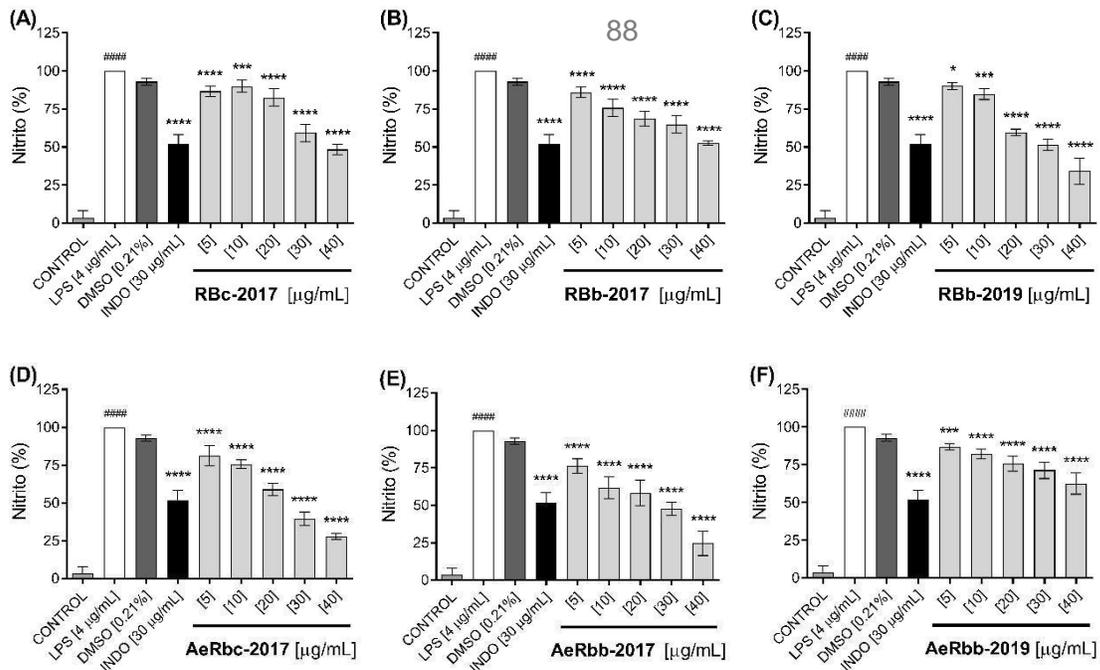


Figura 2. Efecto de las resinas y aceites esenciales sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Los valores se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes (n=3). La diferencia significativa se determinó utilizando un ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. LPS comparado con el grupo de control (#### p < 0.0001), y DMSO, INDO (indometacina), resinas y aceites esenciales comparados con el grupo LPS (* p < 0.05 o ** p < 0.01 o *** p < 0.001 o **** p < 0.0001). Control = células sin estímulo.