

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIBACTERIAL DE *Bursera  
linanoe***

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A:

**FELIX LUCERO CRUZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ

**CODIRECTOR**

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ



DIRECCIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES

Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 12 de Noviembre del 2021.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE

DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES PRESENTE.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: C. LUCERO CRUZ FELIX, con el título del trabajo: ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIBACTERIAL DE Bursera linanoe

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA:

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO:

COMENTARIOS:

FIRMA

- Dra. Ofelia Sotelo Caro
M. en M.M. Isaura Quintana Padilla
Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez
Dr. Rodolfo Abarca Vargas
Dr. Manasés González Cortázar





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

ISAURA QUINTANA PADILLA | Fecha:2021-11-12 12:00:45 | Firmante

IYmScZwAuPcYsBgFk5byF2+krjh5YPMkijY/nnSAvrEuxjMi75GTn0NawQrYKPE2jblm6wCyn1SgVfEF2P3sLFZdK38ZR9tKJ3elh5FhiAKkv  
hmyjEd83yxxZ6iwmU/19TwnJoa0lhLY  
gbcI4Wwmak9BJQStgwyzAx4lcX//cVeuOtvghMx4Zvpxh5COfnidGHQRDCFFly1Z10sRCrYfOsvIH/KcTfWz6vHzmI8JJpqcRqhkv+/khl0e  
G9gC1ziqJivwMcIN4PyE4aP8lVWQeBYbPseBtS+aAcy2i130Fr+ZWnfUToTrgcSCzclAYIBANO2LSHCCM84VjY7L5/21w==

DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2021-11-12 12:34:32 | Firmante

mKLOfigMoViUnkbZX9F6wqjWDA7IXcxtzowW0bB4FvDf8t7ISv2olsH/CRLZwScdg8xqITboxiXQzNYJgRPTYkypccKLMrV4MzyyFlqAhRju2  
MfrKUub/v9FsBmWQ0tuL1zpDKAWIb1  
Q7ykiSnCvHJZvWZQvp/Y0kGCdOW37gSA6CWcLyu/P+/800o+fXrfohjysLcMfWhHhYxqMD5qTeY4z5wwTgU13C6nhVrMbwS2DuzwZW  
ows3ihftw/R7tmmPhJL6w8aEgLCcWWmNzgv6z66OEL6Mwup9cSytUzN/cMHVTFzrrsxuJ8lrbZQZ9OJwVfUET+bZpw8hv4O1Nw==

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2021-11-12 13:29:55 | Firmante

WckNjvCuvkJNaSFB6FLKwp8Nf8KvpFvX03FQYns6xvFQraqVuqjSPGGFRHNVPogkRAqrWyBA+/igmwllQS3tpm2xDa/DXYvQmlwewm  
mYFitChMU43R2BPbHAv3ywha/GOu  
adG8jkbwuvqpizMTVuulgcEAYmW2FQv2363dwX6U0COHCyKuab3Qa6geFARsTm5vz57L20lySvUar3JsnLatXW8jGTgpuOrEdNhZa8Tz/  
Abqch546GPULBR+puQj5ZQwQWwL  
c9c1SUa0uE/Upy+qzd61KeZgY4wrGvLcQluJtvijUflvCY1vXgsXsAUQErRCNnN7c2vFoGBJaZsxyzQ==

OFELIA SOTELO CARO | Fecha:2021-11-13 15:20:15 | Firmante

EEdDHWdZG5XZwVzc3FAKI9RvMnmjloKVYe1dl63kTdf2fmc1kr6jy4VOlewRhDuRbIELGkljwmgJqfQDedHwXnykAAyqh3tX+37BclK  
DZslZNHijkwBh0SriPLuHR1xmxfolInk  
q7yfMRLv55SD7DWS6T781mk0r28cjOCrre9Ve3JP77xZPYdyUrcD0JGpTtbjanTJANLEZM07Ak4GwNuq4shXGQ27MRlx7N+c7l+Ay9KnbV  
4SNTCl2s7vfiHeck5s0/Yj/UsmyG7y6 OQFc7VrzCA7jqzESkF8ZLVDj+9qx1dKltqV+qqIHmTJgjMOLtcoXmH5wVnElwo11HhA==

RODOLFO ABARCA VARGAS | Fecha:2021-11-16 14:09:58 | Firmante

ne9gl9dnoM1akrIleRyoNhjYHaOiwHG4a9PFuP09rlu2fQx9yok6LQ+EOJLSAEC+XefH5OfLqyjMzDx30kqCOI3uzU7DLZ5MCjm4il7nHC/rB  
WEGh8L7Rvbbv+b1O+dl7L+cBixHz/  
4TwtJ7G2tZG6oG1C9z7i3mJLDCFD0erSZjwWx+YIKRt6a15kOwPMJU74/azyn6s9TpXYS04kFD/hhgwbqHOqJrDUH06vrgLbGs8EAUBD  
ILD0ld2izz9NUKGA6ZQfaZ+DpxB9Y/20rrg3D1z0oOpK6Yb8HmewraCDLVA8huSomDr2D6IH0yJ1h5Tsf3F+ZjQ/C0Gudyw==



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

**FRsbNuHe7**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2nHRKxR0NEENhgLdu6BhebdRaRUXVTe>

El presente trabajo se llevó a cabo en:



**Centro de Investigación Biomédica del Sur del  
Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Departamento de Farmacología, Fitoquímica y  
Microbiología.  
Xochitepec, Morelos**



**Centro de Investigación en Biodiversidad y  
Conservación.  
Laboratorio de Fitoquímica y Productos  
Naturales.  
Cuernavaca, Morelos.**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Aquilina Cruz Rosendo y Luis Lucero Rosendo que son mi dedicación, mi inspiración y con quienes he compartido mis logros, mis alegrías, mis tristezas, gracias por ser unos excelentes padres y gracias por brindarme todo su apoyo.

A mis hermanos Juventino, María Alberta, David y Guadalupe, gracias por estar siempre conmigo, compartiendo triunfos y derrotas, siempre juntos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alejandro Zamilpa, por todo el tiempo académico que me ha dedicado en el transcurso de este proyecto de investigación y por darme la oportunidad de trabajar con usted. Doctor Alejandro, muchas gracias.

Al Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez, por haberme aceptado para realizar este proyecto de investigación y haber creído en mí. Por ser una excelente persona y un gran amigo. Doctor David, muchas gracias.

Al Dr. Manasés Gonzales y a la Dra. Maribel Herrera, gracias por el apoyo académico que me brindaron durante mi estancia en el CIBIS.

A la Dra. Ofelia Sotelo y a la M. en C. Isaura Quintanilla, por el apoyo en mi formación académica en la Escuela de Estudios Superiores del Jicareo y sus consejos siempre me han impulsado a seguir adelante.

A la Lic. Brisa del Mar Dircio, por todo su apoyo y consejos que me han impulsado a seguir adelante. Por ser una excelente persona.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS y a la ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICAREO, por ser una excelente institución la cual me ha permitido superarme académicamente.

Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL SUR y Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN, por recibirme y formarme en la licenciatura.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1. Inflamación.....	2
2.2. Inflamación Aguda.....	3
2.3. Inflamación Crónica.....	3
2.4. Reguladores del Proceso Inflamatorio .....	3
2.5. Fármacos Antiinflamatorios .....	4
2.6. Principales Grupos de AINEs.....	4
2.7. Mecanismo de Acción de los AINEs.....	5
2.8. Efectos Secundarios de los AINEs.....	6
2.9. Fisiopatología .....	6
2.10. Proceso de Inflamación Aguda.....	7
2.11. Progresión a una Inflamación Crónica .....	8
2.12. Plantas Medicinales del Género <i>Bursera</i> con Actividad Antiinflamatoria .....	9
2.12.1 <i>Bursera simaruba</i> .....	9
2.12.2 <i>Bursera graveolens</i> .....	9
2.13. Enfermedades Infecciosas.....	10
2.14. Agentes Causantes de Enfermedades Infecciosas .....	11
2.15. Tratamiento Farmacológico .....	12
2.16. Mecanismo de Acción de los Antibióticos.....	13
2.17. Efectos Secundarios de los Antibióticos.....	13
2.18. Plantas Medicinales del Género <i>Bursera</i> con Actividad Antibacterial .....	14
2.18.1. <i>Bursera graveolens</i> .....	14
2.18.2. <i>Bursera aloexylon</i> .....	15
2.18.3. <i>Bursera morelensis</i> .....	16
2.18.4. <i>Bursera glabrifolia</i> .....	17
2.19. Antecedentes de la Planta a Estudiar .....	18
2.19.1 <i>Bursera linanoe</i> .....	18
2.20. Ubicación Taxonómica .....	18
2.21. Descripción.....	19

2.22. Origen y Distribución.....	19
2.23. Fundamento de la Prueba de TPA.....	19
2.24. Fundamento de la Prueba Antibacterial .....	20
2.24.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	20
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	20
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS .....	20
6. JUSTIFICACIÓN.....	21
7. OBJETIVOS .....	21
8. MATERIALES Y REACTIVOS .....	22
8.1. Colecta de material biológico.....	22
8.2. Animales de experimentación.....	22
8.3. Microorganismos y medios .....	22
9. MÉTODOS.....	23
9.1. Obtención de extractos de <i>n</i> -hexano, acetona y metanol de <i>Bursera linanoe</i> .....	23
9.2. Cromatografía en columna fase normal de BIMH.....	23
9.3. Obtención de una mezcla de Ribopiranosido de kaempherol (RK) y Ribopiranosido de Quercetina (RQ) .....	26
9.4. Cromatografía en columna fase normal de BIAF .....	28
9.5. Modelos experimentales:.....	29
9.5.1. Modelo de inflamación aguda en ratones con TPA .....	29
9.6. Modelo de evaluación de la actividad antibacterial (MIC) .....	30
9.6.1. Actividad antibacterial .....	30
9.7. Análisis estadísticos.....	31
10. RESULTADOS .....	31
10.1. Actividad Antiinflamatoria del extracto metanólico (BIMH) de las hojas de <i>Bursera linanoe</i> .....	33
10.1.1. Actividad Antiinflamatoria de BIF1 .....	36
10.2. Actividad antibacterial del extracto acetona BIAF del fruto de <i>Bursera linanoe</i> .....	37
10.2. 1. Actividad Antibacterial de la subfracción BIF4, aislada de BIAF.....	39
11. DISCUSIÓN.....	40
12. CONCLUSIÓN .....	41
13. PERSPECTIVAS .....	41
14. CITAS BIBLIOGRAFICAS.....	42

15. ANEXOS .....	47
Anexo a. Planta <i>Bursera linanoe</i> colectada en Zontecomatlan municipio de Olinalá (Guerrero, México) y una muestra del espécimen fue depositada en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM). .....	47
Anexo b. RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	47
Anexo c. RMN de <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 150 MHz) de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	48
Anexo d. RMN de <sup>13</sup> C-DEPT(CD <sub>3</sub> OD, 150 MHz) de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	48
Anexo e. RMN de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (COSY) en CD <sub>3</sub> OD y 600 MHz de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	49
Anexo f. RMN de <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C (HSQC) en CD <sub>3</sub> OD de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	49
Anexo g. RMN de <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C (HMBC) en CD <sub>3</sub> OD de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	50
Anexo h. Cromatograma de HPLC de la subfracción B1F1. ....	50
Anexo i. Cromatograma de HPLC de la subfracción C1R-17 - Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1). .....	51
Anexo j. Cromatograma de HPLC de la subfracción F10 (Mezcla de 1 y 2). .....	51
Anexo k. Cromatograma de HPLC de la subfracción C1-R 23- Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cromatografía en capa fina fase normal de la reunión C1R-17 de la columna 1, sistema 95-5 diclorometano/ metanol revelado sulfato cérico amoniacal en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N. ....	25
<b>Figura 2.</b> Cromatografía en capa fina en fase reversa de la reunión B1F1 de la columna 1. Sistema 5-5 H <sub>2</sub> O/Acetonitrilo revelado con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente flavonoides). .....	25
<b>Figura 3.</b> Cromatografía en capa fina fase reversa de la reunión C1-R23 de la columna 1, sistema 7:3 H <sub>2</sub> O/ acetonitrilo revelado con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente flavonoides). .....	26
<b>Figura 4.</b> Cromatografía en capa fina en fase reversa de las reuniones de la columna 2. Sistema 5-5 H <sub>2</sub> O/Acetonitrilo revelado con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente Flavonoides). .....	27
<b>Figura 5.</b> Cromatografía en capa fina en fase reversa de las reuniones de la columna 3. Sistema 5-5 H <sub>2</sub> O/Acetonitrilo revelado con sulfato cérico amoniacal en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N. ....	29
<b>Figura 6.</b> Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2) .....	32



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fraccionamiento en columna (C1), fase normal de BIMH .....	24
<b>Tabla 2.</b> Fraccionamiento químico de la subfracción BIF1.....	27
<b>Tabla 3.</b> Fraccionamiento en columna (C3) fase normal de BIAF .....	28
<b>Tabla 4.</b> Rendimientos de los extractos de <i>Bursera linanoe</i> .....	31
<b>Tabla 5.</b> Datos espectroscópicos de RMN para Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2) ( <sup>1</sup> H 600 MHz and <sup>13</sup> C 150 MHz, en CD <sub>3</sub> OD) de 1 y 2. ....	33
<b>Tabla 6.</b> Actividad antiinflamatoria del extracto de metanol (BIMH) de <i>Bursera linanoe</i> en un modelo de edema auricular en ratón ICR inducido por TPA.....	34
<b>Tabla 7.</b> Actividad antiinflamatoria de BIF1 en un modelo de edema auricular en ratón ICR inducido por TPA.....	36
<b>Tabla 8.</b> Actividad antibacterial del extracto de acetona (BIAF) de fruto de <i>Bursera linanoe</i> contra <i>Sa</i> sensible y multirresistente a metilicina, por el método de concentración mínima inhibitoria (mg/ml).....	38
<b>Tabla 9.</b> Actividad antibacterial de fracciones aisladas de BIAF contra <i>Sa</i> sensible y multirresistente a metilicina por el método de concentración mínima inhibitoria (mg/ml). ....	39

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Efecto de la administración local del extracto BIHH, BIAH, BIMH, BIHF, BIAF y BIMF a 1 mg/oreja, sobre el edema (diferencia de peso) inducido con TPA en el pabellón auricular de ratones ICR. INDO: indometacina. Anova post-Dunnett, p<0.05. ....	35
<b>Gráfica 2.</b> Los resultados muestran que los extractos inhibieron el edema en BIHH 2%, BIAH 37%, BIHF47%, BIAF 32% y BIMF 2%, por otro lado, el extracto BIMH en 58%, respectivamente a una dosis de 1 mg/oreja. Mientras que la INDO (control positivo) a 1 mg/oreja mostró un 75.3% de inhibición del edema.....	35
<b>Gráfica 3.</b> Efecto de la administración local de B1F1 a 1 mg/oreja, sobre el edema (diferencia de peso) inducido con TPA en el pabellón auricular de ratones ICR. INDO: indometacina. Anova post-prueba Dunnett, p<0.05.....	36
<b>Gráfica 4.</b> Los resultados muestran que B1F1 que contiene una mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). inhibió el edema en un 42% a una dosis de 1 mg/oreja. La INDO a una dosis de 1 mg/oreja presentó una inhibición del edema del 75 .....	37

## ABREVIATURAS

AA	Acido araquidónico
AINE	Antinflamatorio No Esteroideo
ANOVA	Análisis de Varianza
BIHH	<i>Bursera linanoe</i> Hexano Hoja
BIAH	<i>Bursera linanoe</i> Acetona Hoja
BIMH	<i>Bursera linanoe</i> Metanol Hoja
BIHF	<i>Bursera linanoe</i> Hexano Fruto
BIAF	<i>Bursera linanoe</i> Acetona Fruto
BIMF	<i>Bursera linanoe</i> Metanol Fruto
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CC	Cromatografía en Columna
COX	Ciclooxigenasa
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FLA2	Fosfolipasa A2
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography)
IL-10	Interleuquina Diez
IL-12	Interleuquina Doce
IL -18	Interleuquina Dieciocho
IL-1	Interleuquina Uno
IL-6	Interleuquina Seis
IL-8	Interleuquina Ocho
LPS	Lipopolisacaridos
LOX	Lipooxigenasa
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
TXA2	Tromboxano
TPA	13-acetato de-12-O-tetradecanoilforbol
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral-Alfa

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antiinflamatoria y antibacterial de la especie *Bursera linanoe*, colectada en Zontecomatlan municipio de Olinalá Guerrero, utilizando los modelos de edema inducido por 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) en ratones ICR y el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en bacterias *Staphylococcus aureus* sensible (Sa) y multirresistente a meticilina (SaR) respectivamente. El extracto metanólico de las hojas de *Bursera linanoe* (BIMH) fue el que presentó mayor efecto antiinflamatorio, disminuyó el edema 58.24 % a una dosis 1 mg/oreja. Del fraccionamiento químico de BIMH se obtuvo una subfracción BIF1, que a una dosis de 1 mg/oreja disminuyó el edema auricular en un 42.45 %. Esta fracción está constituida principalmente por flavonoides. Del fraccionamiento de BIF1 se obtuvo una fracción F10 de color blanco, el análisis de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, indicó que se trata de una mezcla la cual corresponde a Ribopiranosido 3-*O*-β-D- Kaempferol y Ribopiranosido 3-*O*-β-D- Quercetina. Por otro lado, el extracto acetónico de frutos de *B. linanoe* (BIAF) presentó mayor actividad antibacterial en el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en bacterias a concentraciones 2.0, 1.0 mg/ml frente a SaR y a 2.0, 1.0, 0.5 mg/ml frente a Sa. Del fraccionamiento químico de BIAF se obtuvo una subfracción BIF4, que presentó una inhibición del crecimiento bacteriano con un MIC= SA 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml), (SaR 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml). Estos resultados demuestran que BIF1 modula la respuesta antiinflamatoria y que BIF4 inhibe el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* sensible (Sa) y multirresistente a meticilina (SaR)

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el ataque de las bacterias y los problemas inflamatorios siguen siendo dos problemas de salud muy frecuentes de la sociedad global. Datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) comentan que los niños y adultos mayores son las poblaciones más susceptibles a las enfermedades infecciosas (Okeke et al., 2005) y han revelado que las bacterias han generado una alta resistencia a los antibióticos existentes, por lo que las infecciones se han elevado (OMS, 2017). Las bacterias resistentes más frecuentes son, *Staphylococcus aureus* sensible y multirresistente a meticilina entre otras. (OMS, 2017). Por otro lado, la inflamación está implicada en varias enfermedades crónico-degenerativas entre las que destacan el cáncer, la diabetes y la hipertensión. Este problema de salud causa altos niveles de mortalidad alrededor del mundo. Los principales tratamientos incluyen los antiinflamatorios no esteroidales (AINE's) y corticosteroides, desafortunadamente ambos grupos de medicamentos tienen efectos secundarios nocivos para la salud del ser humano (Borda and Koff, 1992). La medicina tradicional ha jugado un papel relevante en el cuidado de la salud, de hecho el estudio de las plantas medicinales ha sido una de las fuentes más importantes de nuevos compuestos tanto antibacteriales como antiinflamatorios. *Bursera linanoe*, es utilizada en Morelos y Guerrero, como fuente de materiales para hacer trabajos manuales con olores agradable y es una de las especies utilizadas para la extracción de linalool (Noge et al., 2010). Estudios previos farmacológicos del género *Bursera*, indican que producen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lignanos, entre otros (Robles et al., 2005; Yucawa et al., 2004; Zuñiga et al., 2005; Noguera et al., 2006; Marcotulio et al., 2018). En el aspecto farmacológico, se han reportado varias especies de *Bursera* con propiedades antibacterianas y antiinflamatorias. (Queiroga et al., 2007; Camarda et al., 2007; Manzano et al., 2009; Luján-Hidalgo et al., 2012; Martínez-Elizalde et al., 2018; Villa-Ruano et al., 2018). En la bibliografía no se han encontrado estudios farmacológicos de *B. linanoe*, por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antibacterial y antiinflamatoria de extractos obtenidos a partir de esta especie vegetal, que puedan inhibir el crecimiento de bacterias mediante el

método de concentración mínima inhibitoria (CMI) por otro lado, suprimir la respuesta inflamatoria utilizando el modelo: inflamación aguda en ratones con, 13-acetato de-12-O-tetradecanoilforbol (TPA).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Inflamación

La inflamación es una respuesta de los organismos a diferentes agresiones endógenas o exógenas, al daño causado a sus células y tejidos por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica (bacterias, virus, hongos, parásitos); química: (detergentes, pegamentos, halogenados o cáusticos en aerosol, desinfectantes, insecticidas, aromatizantes) y física/mecánica (traumatismos, cirugías, quemaduras y radiaciones). Tanto la respuesta inmune innata como la adquirida intervienen en este proceso que tiene numerosos efectos locales y sistémicos. Según el tiempo de evolución puede ser aguda o crónica, que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o cáncer (Vega et al., 2008; García et al., 2008; Arts et al., 2018). Los tratamientos más utilizados para prevenir o disminuir la progresión de la inflamación aguda o crónica son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) y corticosteroides, pero se menciona que tienen varios efectos colaterales (Borda and Koff, 1992). En el proceso inflamatorio es importante mencionar las principales moléculas que son mediadores de la inflamación como las citosinas, interleucinas (IL-1, IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), son pequeñas proteínas o glicoproteínas, que actúan como autacoides o como hormonas, producidas generalmente como formas precursoras por células activadas que regulan el proceso inflamatorio, como por ejemplo la IL-1, lipopolisacáridos (LPS) y TNF- $\alpha$  pueden aumentar los niveles de las leptinas y de manera bidireccional, estas regulan la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, citocinas proinflamatorias que aumentan aún más el proceso inflamatorio. Por otro lado, entre las moléculas antiinflamatorias se encuentra el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), con efectos pro y antiinflamatorios, que

se sintetiza por células mononucleares y macrófagos. La IL-6 según el receptor al que se una puede tener efectos que favorecen o disminuyen la inflamación (Sutterwalla et al., 2007).

## **2.2. Inflamación Aguda**

Este tipo de inflamación es una respuesta inmediata al agente agresor cuya finalidad es liberar mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión cuyo comienzo es rápido y cursa una duración corta. Por otro lado, es una respuesta protectora natural del cuerpo a cualquier lesión, irritación, o cirugía. Este proceso de defensa natural lleva un flujo de sangre incrementado al área afectada, lo que produce una acumulación de líquidos. A medida que el cuerpo acumula esta respuesta protectora, los síntomas de la inflamación se desarrollan. Estos incluyen; hinchazón, dolor, aumento del calor y enrojecimiento de la piel. Por lo tanto, cuando es aguda, ocurre como una respuesta inmediata a un trauma lesión o cirugía, habitualmente en el curso de las siguientes dos horas (Herrera, 2014).

## **2.3. Inflamación Crónica**

Es un proceso prolongado, que lleva a cabo la destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación. De tal forma, que la inflamación refleja una respuesta continúa a una condición médica de más largo plazo, tal como la artritis. Así mismo, la inflamación crónica es una inflamación de duración prolongada en la que ocurre al mismo tiempo la inflamación activa, la lesión hística y la resolución. La inflamación crónica muestra las características siguientes: infiltración por células mononucleadas, tales como los macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Destrucción hística, reparación, que implica la proliferación de nuevos vasos y fibrosis (Herrera, 2014; González-Costa et al., 2019).

## **2.4. Reguladores del Proceso Inflamatorio**

Los principales mediadores de la inflamación: histamina, serotonina, bradicinina, eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), quimiocinas, enzimas (triptasas y otras proteasas), factor activador de plaquetas, fibrina, C3a, C5a. Citocinas IL-1, IL-6, Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), son las conductoras del proceso.

Participan también citocinas quimioattractantes (IL-8); inductoras de la respuesta linfocítica (IL-12, IL -18); generadoras de células en médula ósea (IL-3, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF); supresoras del proceso (IL-10), Factor-transformador de crecimiento (TGFβ) (Vega, 2008).

## 2.5. Fármacos Antiinflamatorios

Los antiinflamatorios no esteroideos que son utilizados hoy día, en su inmensa mayoría inhiben las actividades de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) presente en diversos tejidos y reacciones fisiológicas, y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) presente en el tejido lesionado. La inhibición de COX-2 media los efectos no deseados de la inflamación, pero la simultánea inhibición de COX-1 ocasiona efectos colaterales que son consecuencia de la disminución en la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Pektas et al., 2007). Los AINEs, incluyen muy diversos compuestos, que, aunque casi nunca tienen relación química alguna, sí comparten actividades terapéuticas y efectos colaterales. En este grupo se incluyen los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos (Pérez et al., 2002; Cisneros et al., 2018; Kim et al., 2008).

## 2.6. Principales Grupos de AINEs (Perea-Martínez et al., 2016).

Salicilatos	ASA (ácido acetilsalicílico), Diflunisal
Derivados pirazolónicos	Aminofenazona (dipirona o metamizol), Fenilbutazona, Azapropazona
Derivados del para-aminofenol	Acetaminofen (paracetamol o tylenol)
Derivados del ácido acético	Indometacina, Sulindaco, Glucametacina
Derivados carboxílicos y pirrolpirrónicos	Etodolaco, Ketorolaco
Derivados del ácido fenilacético	Diclofenaco (voltaren), Aclofenaco, Tolmetina Fenclufenaco
Derivados del ácido n-acetiln-antranílico	Ácido mefenámico, Niflumico, Meclofenamico, Clonixinato de lisina
Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno, Naproxeno, Ketoprofeno, Flurbiprofeno, Fenoprofeno, Oxapropina
Derivados enólicos	Piroxican, Meloxican, Tenoxican
Grupo naftilalcanonas	Nabumetona

## 2.7. Mecanismo de Acción de los AINEs

La familia de prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares han sido llamados eicosanoides porque derivan de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos, en los seres humanos, el ácido araquidónico es el precursor más abundante y proviene del ácido linoleico de los alimentos o se ingiere como parte de la dieta, por ejemplo, el ácido araquidónico (AA) se encuentra esterificado a los fosfolípidos de membrana, cuando se produce la agresión de los tejidos por diferentes agentes, se activa la fosfolipasa A2 (FLA2), esta enzima hidroliza el enlace de éster de fosfolípidos de membrana con la liberación de AA (desprendido de la membrana celular); los corticosteroides inhiben a la FLA2, lo que impide la liberación de AA (Morse et al., 2006). La primera enzima que participan en la síntesis de prostaglandinas es la sintetasa de endoperóxido (PGH2) llamada comúnmente como ciclooxigenasa de ácido graso; existen 2 isoformas de la enzima que son la COX-1 y la COX-2, la primera se expresa en forma constitutiva en casi todas las células, por otro lado, la COX-2 necesita ser inducida y se expresa en forma transitoria y casi exclusivamente en células inflamatorias estimuladas y promueve la formación rápida y en gran escala de mediadores de la inflamación (Kim et al., 2008). Los AINEs ejercen su actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la COX-2 en el sitio de la inflamación, pero también estos fármacos son capaces de inhibir la COX-1 en los tejidos gastrointestinales y renales, lo que genera efectos indeseables y puede limitar su utilidad terapéutica expresando en otros términos la relación beneficio riesgo de los AINEs, que dependerá de su capacidad de bloquear en mayor o menor grado a estas formas de COX (Pérez et al., 2002;). El PGH2, también es metabolizado en las plaquetas a tromboxano (TXA2), sustancia vasoconstrictora y agregante plaquetario, el tromboxano sintetasa es la enzima que media su formación, de tal forma que, la prostaciclina (PGI2) es formada también a partir de prostaciclina por acción de la prostaciclina sintetasa, solamente en el nivel de los endotelios; la PGI2 tiene efectos opuestos al TXA2, ya que es vasodilatadora y antiagregante, en cambio, el AA, que es metabolizado por la lipooxigenasa (LOX), dará lugar a la producción de leucotrienos, que son sustancias hipersensibilizantes y vasoconstrictoras. Asimismo, las prostaglandinas y leucotrienos son importantes mediadores del proceso



inflamatorio y serán responsables de las manifestaciones clínicas de la inflamación (Cisneros et al., 2018).

## **2.8. Efectos Secundarios de los AINEs**

Los antiinflamatorios no esteroideos AINEs son medicamentos, que pueden producir daño por su mecanismo de acción, efectos no deseables en el organismo de los pacientes; uno de los órganos principales donde pueden producir estos efectos es en el aparato digestivo al inhibir las COXs (González-Costa et al., 2019). Los efectos se relacionan con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal, pero la mayoría de las veces no hay síntomas, pero pueden ser muy graves, se estima su incidencia hasta el 10% de los usuarios, los más susceptibles son los ancianos; este efecto adverso depende de la inhibición de las prostaglandinas, son unas moléculas importantes en la protección de la mucosa gástrica, pues limitan la secreción ácida gástrica y estimulan la formación de mucus (Renda et al., 2010). Los AINEs además de producir lesión local, reducen el flujo sanguíneo y dificultan el funcionamiento de las defensas en la mucosa del tubo digestivo. Por otro lado, los efectos secundarios gastrointestinales más frecuentes son:

- Esofagitis, úlceras (siendo sus complicaciones más frecuentes hemorragia y perforación), gastroduodenitis, lesiones tóxicas y diarrea.
- La aparición de estos efectos nocivos a nivel del tracto digestivo (erosiones, úlceras y perforaciones) puede producirse independientemente de cuál sea la vía de administración del fármaco (oral, inyectable o rectal) y que su toma por vía oral junto con alimentos o después de las comidas no protege de su aparición (Pérez, 2012).

## **2.9. Fisiopatología**

El proceso inflamatorio representa una reacción tisular imprevista ante una agresión, basadas en la integración de secuencias moleculares incitadas por el daño tisular causado por el ingreso de microbios o por la presencia de material extraño exógeno o endógeno (Arts et al., 2018).

La inflamación es un mecanismo fisiopatológico básico, la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial pues una respuesta inflamatoria insuficiente resulta en inmunodeficiencia, lo cual puede conducir desde una infección hasta cáncer; por otro lado una excesiva respuesta inflamatoria causa morbilidad y mortalidad en enfermedades tales como, arteriosclerosis, tromboembolismo, enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, entre otras (Nathan, 1987).

### **2.10. Proceso de Inflamación Aguda**

En el proceso inflamatorio hay cambios vasculares donde los vasos sanguíneos sufren cambios importantes en el flujo que posibilitan y maximizan la salida de proteínas y células plasmáticas desde la circulación hacia el foco inflamatorio, uno de los primeros cambios vasculares es la vasodilatación, inducida por la histamina, producida por las células cebadas y el ácido nítrico, que actuarán sobre el músculo liso vascular, dilatándolo, por lo tanto, habrá un aumento de la permeabilidad microvascular, resultado de la combinación del aumento de la presión hidrostática y la disminución de la presión osmótica, lo que lleva a la salida de líquidos del espacio intravascular al extravascular con la formación de edema; estos cambios tienen como consecuencia la disminución de la velocidad sanguínea, que, sumada a la pérdida de líquido intravascular, concentración de hematíes y aumento de la viscosidad de la sangre, da como resultado la éstasis, la cual es responsable de la marginación de los leucocitos, los cuales en condiciones normales circulan por el centro de los vasos (Weiss, 2002). Por otro lado, los leucocitos deben viajar desde la luz de los vasos sanguíneos al sitio de la lesión y ejecutar ahí sus funciones de defensa, es decir, fagocitar al agente patógeno; la lesión sigue el curso de una locomoción orientada por un gradiente químico, que es la quimiotaxis; los leucocitos “saben a dónde ir” gracias a los agentes quimiotácticos, los cuales a su vez causan la activación leucocitaria; los leucocitos ya activados cumplirán su función principal, eliminar al agente agresor del foco inflamatorio mediante la fagocitosis, que se dará en tres etapas, el reconocimiento y unión de partículas,

interiorización con formación de vacuola fagocítica, y muerte o degradación del material patógeno ingerido (Herrera, 2014). La inflamación puede restituirse al completo estado de normalidad solamente si se elimina el agente causal, se reabsorbe totalmente el exudado y se regeneran los tejidos destruidos este proceso dependerá del grado de respuesta de cada organismo a los mediadores químicos, y se podrán evidenciar dos posibles resultados del mismo; resolución completa y curación por reemplazo de tejido conectivo (fibrosis). (García, 2008).

### **2.11. Progresión a una Inflamación Crónica**

En la inflamación crónica las características más importantes son: infiltrado celular compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, importante destrucción tisular, formación de tejido fibroso y angiogénesis (proliferación de pequeños vasos sanguíneos) que prevalece sobre exudado de líquidos (Robbins y Cotran, 2010). Los macrófagos son derivados de los monocitos del torrente sanguíneo, los cuales, al igual que los neutrófilos en la inflamación aguda, son inducidos a migrar de la luz de los vasos hasta el foco de la inflamación, por acción de los factores quimiotácticos; estos macrófagos se activan gracias a citocinas producidas por las células T o por otros factores de origen no inmunitario, este grupo celular será el de acumulación más persistente en la inflamación crónica, otras células que interfieren en este cuadro inflamatorio son los linfocitos y los eosinófilos (Herrera, 2014). Las células cebadas están distribuidas por los tejidos conjuntivos y están presentes tanto en la inflamación aguda como en la crónica. Una forma específica de inflamación crónica es la inflamación granulomatosa, como reacción inflamatoria distintiva, la cual consiste en la presencia de granulomas que, son focos microscópicos que se caracterizan por la presencia de agregados de macrófagos transformados en células epiteloideas, que se refleja por un aplanamiento celular además de aumento de volumen, y a su vez estas células epiteloideas están rodeadas por un collar de leucocitos mononucleares (Müller, 2001). Entre las causas para que se desencadene este tipo de inflamación, podemos mencionar causas bacterianas, como en el caso de tuberculosis y lepra, parasitarias, micóticas, por metales pesados, por presencia de cuerpos extraños y por causas desconocidas (García, 2008).

## **2.12. Plantas Medicinales del Género *Bursera* con Actividad Antiinflamatoria**

### **2.12.1 *Bursera simaruba***

*Bursera simaruba* también conocida como indio desnudo, cucheme o mara, es una especie originaria de América tropical, Florida central hasta las Bahamas, las Antillas, México Colombia, Venezuela y la Guayana, la corteza, hoja, flor y fruto recolectadas de la especie vegetal son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades (García et al., 1975) como úlceras, reumatismo, resfriado, disentería y diarrea (Bernal y Correa et al., 1990; Gupta et al., 1995). Varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antiinflamatoria, de esta especie vegetal; de la corteza fueron aislados tres compuestos mediante estudios de resonancia magnética nuclear, vitamina E, metil- $\beta$ -peltatina A y metil-  $\beta$ -peltatina B; un estudio de actividad antiinflamatoria por el método de edema plantar con carragenina del extracto de *n*-hexano de las hojas a 60 mg/kg y mostró una inhibición del edema de 53,12 %. Los compuestos probados fueron metil- $\beta$ -peltatina A 20 mg/kg y metil-  $\beta$ -peltatina B 26, 2 mg/kg. La mayor actividad inhibitoria fue de metil- $\beta$ -peltatina A con un 29,3 % de inhibición al compararse con el antiinflamatorio fenilbutazona (FBZ) a 80 mg/kg (Noguera et al., 2006).

### **2.12.2 *Bursera graveolens***

*B. graveolens* también conocido como caraño, sasafrás o tatamaco es un árbol caducifolio de la familia *Burseraceae* se encuentra distribuido en Yucatán Colombia y Perú. La resina y hojas recolectadas de la especie vegetal son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de hernias, tronchaduras, para extraer cuerpos extraños de la piel, para lavar heridas y en forma oral son usados contra el asma, la diarrea y cálculos en el riñón (Bernal y Correa et al., 1990). Varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antiinflamatoria, de esta especie vegetal; un estudio de actividad antiinflamatoria por el método de edema plantar con carragenina, del extracto etanólico de corteza a 300 mg/Kg de peso, dio un 71.66 % de inhibición; mientras que, el extracto etanólico de hojas mostró un 62.0 % de inhibición a la misma concentración. Por su parte, la fracción en éter de petróleo de hojas a 100 mg/Kg de peso dio un 60.77 % y una fracción de diclorometano en

igual concentración dio un 50.48 % de inhibición. La fracción con mayor actividad inhibitoria fue la de éter de petróleo de la corteza que a 100 mg/Kg de peso, mostró un 70.02 % de inhibición al compararse con el antiinflamatorio indometacina (5 mg/Kg). Tanto de la fracción de éter de petróleo como de la de diclorometano de corteza fueron aislados tres triterpenos tetracíclicos: ácido  $\beta$ -elemónico, ácido  $\alpha$ -elemónico, ácido 3 $\alpha$ -hidroxitirulaca-7,24-dien-21-oico (Robles et al., 2005). Un estudio fitoquímico de *B. graveolens* informó que se aislaron cinco compuestos del aceite volátil obtenido por extracción con éter dietílico de corteza de *B. graveolens*, sus estructuras se dilucidaron mediante estudios de RMN, los compuestos fueron (-)-dihydro- $\alpha$ -agarofurano, (-)-5, 11-epoxy-4 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 10 $\alpha$ -eudesm-1-eno, (-)-4 $\alpha$ -hydroxydihydroagarofurano, (-)-3 $\beta$ , 4 $\beta$ -oxidoagarofurano and (-)-10-epi- $\gamma$ -eudesmol (Yukawa et al., 2004).

### 2.13. Enfermedades Infecciosas

El mundo que nos rodea está constituido de un complejo y denso contenido de microorganismos, principalmente bacterias y hongos que causan enfermedades y son un problema de salud que representa importantes costos tanto en lo económico como en el bienestar de las personas afectadas, la importancia de la prevención y el control de las infecciones por microorganismos es relevante ya que, genera un problema de salud pública mundial (Camarena et al., 1995). Podemos mencionar los siguientes microorganismos patógenos que, causan diferentes enfermedades como:

- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), desde el punto de vista clínico, las infecciones por SARM las infecciones son las que afectan al tejido cutáneo y subcutáneo (lesiones supuradas o abscesificadas), las infecciones de herida quirúrgica, bacteriemia, neumonía, osteomielitis, artritis y la infección asociada al catéter intravascular o sondaje urinario. Entre las complicaciones potencialmente graves de la bacteriemia estafilocócica se encuentran el shock séptico y las infecciones metastásicas graves, como la endocarditis aguda, miocarditis, pericarditis, meningitis, artritis, osteomielitis, neumonía y abscesos (Cervantes-García et al., 2014).

- El impacto de los microorganismos patógenos sobre la salud y a través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. Aunque los microorganismos forman parte del microbiota normal del ser humano, entre 25 y 50 % de la población sana está colonizada por estos microorganismos que, constituyen un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. En los últimos años han aumentado de forma notable las infecciones por estos microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Monina et al., 2007).

#### 2.14. Agentes Causantes de Enfermedades Infecciosas

- ***Staphylococcus aureus***

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*

Los *estafilococos* son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan por que se dividen en agrupaciones que, asemejan a racimos de uva. *Staphylococcus aureus* sigue siendo un patógeno peligroso en humanos causando infecciones de piel y tejidos blandos. Por otro lado, su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbimortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario, son frecuentemente adquiridos en la comunidad por consumir alimentos contaminados por microorganismos patógenos. En los hospitales las infecciones se han vuelto más difíciles de combatirlo, debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos como *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Lowy, 1998; Kong et al., 2016; Merriman et al., 2014; Zendejas-Manzo et al., 2014).

## 2.15. Tratamiento Farmacológico

Los antimicrobianos se definen, como medicamentos que destruyen los microorganismos o impiden su multiplicación, en el tratamiento de una enfermedad infecciosa se debe de matar o inhibir al microorganismo causante de la infección y además debe ser efectivo a bajas concentraciones. Actualmente, se conocen más de 5000 antibióticos de los cuales alrededor del 75 % son producidos por los mismos microorganismos (Kotra et al., 2000).

Basados en su estructura química, los antibióticos se pueden clasificar en los siguientes grupos:

**1.- Betalactámicos.** Se caracterizan por poseer en su estructura el anillo betalactámico que está compuesto por 3 átomos de carbono y 1 átomo de nitrógeno. En esta categoría se incluyen:

Penicilinas: Bencilpenicilina

Clavamas: Acido clavulánico

Cefalosporinas: Cefotaxima

Monobactamas: Aztreonam

Carbapenemas: Imipenem

**2.- Macrólidos.** A esta categoría pertenece la eritromicina que consiste en un anillo lactónico con azúcares aminados.

**3.- Aminoglicósidos.** El antibiótico más conocido, la neomicina también pertenece a este grupo y debido a que se absorbe poco se utiliza oralmente antes de una cirugía intestinal.

**4.- Tetraciclinas.** Los antibióticos de este grupo (tetraciclina, clortetraciclina, oxytetraciclina, doxiciclina) tienen en común en su estructura el anillo naftaleno (4 anillos).

**5.- Polipeptídicos.** A este grupo pertenece la bacitracina. Los antibióticos pertenecientes a este grupo se caracterizan por poseer una cadena de aminoácidos algunas veces circular como es el caso de la polimixina B debido a su toxicidad se aplican de forma tópica.

**6.- Polienos.** Compuestos que contienen tres o más dobles enlaces. El grupo incluye los antibióticos nistatina y anfotericina B. pero debido a su toxicidad se usa en tratamientos de

la piel e infecciones bucales. La anfotericina B (su nombre proviene de su carácter anfotérico ya que posee propiedades de ácido y base) y también es tóxico (causa daños en el riñón) por lo que se administra monitorizado en el tratamiento de infecciones internas fúngicas (Giron, 2008).

## **2.16. Mecanismo de Acción de los Antibióticos**

La eficacia tóxica de los antibióticos es la consecuencia de su capacidad de inhibir una reacción bioquímica específica y esencial. Para que el antibiótico ejerza su acción es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias (por difusión o transporte activo) y alcance intracelularmente la concentración necesaria. Una vez dentro de la célula el antibiótico puede ser bacteriostático si inhibe la multiplicación de forma reversible, o bactericida si tiene un efecto letal. En general, cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra como por ejemplo los antibióticos bacteriostáticos: macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol y los antibióticos bactericidas: betalactámicos, aminoglicósidos, polipeptídicos, polienos. Los antibióticos de uso pueden ejercer su acción en una de las siguientes estructuras o funciones:

- 1.- Inhibición de la síntesis de la pared celular
- 2.- Alteración sobre la membrana citoplasmática
- 3.- Inhibición de la síntesis proteica
- 4.- Bloqueo de la síntesis de los ácidos nucleicos (Morejon et al., 2003).

## **2.17. Efectos Secundarios de los Antibióticos**

Los antibióticos son medicamentos que tienen determinadas reacciones adversas. Sin embargo, no se desconoce que ciertas clases de antimicrobianos comparten el mismo efecto colateral, como ocurre con los betalactámicos que pueden inducir hipoprotrombinemia, los aminoglicósidos asociados a ototoxicidad y nefrotoxicidad, las quinolonas que tienen efectos colaterales, los principales son provocar fiebre y/o erupción cutánea. Podemos mencionar otros efectos relacionados con hipersensibilidad menciona a ciertos antimicrobianos inductores de: fiebre, erupción cutánea, reacción anafiláctica,



como son las penicilinas, cefalosporinas, isoniazida, aminoglucósidos, macrólidos y vancomicina (Arteaga et al., 2002).

## **2.18. Plantas Medicinales del Género *Bursera* con Actividad Antibacterial**

El género *Bursera* agrupa más de un centenar de especies de plantas leñosas, cuya distribución se restringe al continente americano, se extiende desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos. Su centro de diversidad se localiza en México, donde hasta la fecha se conocen al menos 80 especies que habitan en los bosques tropicales a altitudes entre 650 y 1800 m, situados principalmente en la cuenca del río Balsas (Rzedowski et al., 2005). Son árboles de tamaño bajo a medio (5 a 15 m); se considera característico de comunidades, ya que su presencia en los sitios perturbados es poco frecuente. Son dioicas, muy resinosas, con aromas agradables y penetrantes. Presentan un tronco de hasta 60 cm de diámetro, con corteza gris-rojiza, no exfoliante y con ramillas lignificadas rojizas oscuras. Su floración se presenta de mayo a principios de julio y se encuentra desprovisto de follaje durante los meses de noviembre a mayo (Rzedowski y Kruse, 1979).

Varias de las especies del género *Bursera* se han utilizado en etnobotánica y en la etnofarmacología, se ha informado que el aroma que se desprende de las resinas de varias especies de *Bursera* y el de los vapores del incienso se utilizan como cura para diversas enfermedades. Las resinas también se usan medicinalmente en ungüentos para tratamiento de picaduras de escorpiones, con actividad antibacterial y antiinflamatoria para aliviar diversas dolencias. (Junor et al., 2007; Yukawa et al., 2004; Robles et al., 2005). Se han realizado varios estudios fitoquímicos del género *bursera* algunas de las plantas a destacar son las siguientes:

### **2.18.1. *Bursera graveolens***

*B. graveolens* también conocido como caraño, sasafrás o tatamaco es un árbol caducifolio de la familia *Burseraceae* se encuentra distribuido en México (Yucatán), Colombia y Perú. La resina y hojas recolectadas de la especie vegetal son utilizadas en la

medicina tradicional para el tratamiento de hernias, tronchaduras, para extraer cuerpos extraños de la piel para lavar heridas y en forma oral son usados contra el asma, la diarrea y cálculos en el riñón (Bernal y Correa et al., 1990). Varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antibacterial, de esta especie vegetal; un estudio de actividad antibacterial por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI), del extracto etanólico de hojas frente a *S. aureus* fue de 160 mg/ml; mientras, que para el de corteza fue de 190 mg/mL. La fracción en acetato de etilo de cortezas de *B. graveolens* mostró mayor actividad frente a *S. aureus* a una concentración de 150 mg/ml al compararse con la gentamicina 50 mg/ml. Tanto de la fracción de éter de petróleo como de la de diclorometano de corteza fueron aislados tres triterpenos tetracíclicos: ácido  $\beta$ -elemónico, ácido  $\alpha$ -elemónico, ácido 3 $\alpha$ -hidroxitirulaca-7, 24-dien-21-oico (Robles et al., 2005). Un estudio fitoquímico de *B. graveolens* informó que se aislaron cinco compuestos del aceite volátil obtenido por extracción con éter dietílico de corteza de *B. graveolens*, sus estructuras se dilucidaron mediante estudios de RMN, los compuestos fueron (-) -dihydro- $\alpha$ -agarofurano, (-) -5, 11-epoxy-4 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 10 $\alpha$ -eudesm-1-eno, (-) -4 $\alpha$ -hydroxydihydroagarofurano, (-) -3 $\beta$ , 4 $\beta$ -oxidoagarofurano and (-) -10-epi- $\gamma$ -eudesmol (Yukawa et al., 2004).

### **2.18.2. *Bursera aloexylon***

El aceite de *B. aloexylon* es utilizado en la preparación de fragancias, además es importante en la medicina tradicional mexicana. Su uso medicinal es contra la diarrea, fiebre, gingivitis, tos y sarampión. Varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antibacterial, de esta especie vegetal; un estudio de actividad antimicrobiana por concentración mínima inhibitoria (MIC), del extracto de aceite de las hojas fue efectivo contra *Rhodococcus equi* (MIC 0.60 mg/ml) y *Staphylococcus epidermidis* (MIC 0.15 mg/ml) de inhibición al compararse con el antibiótico chloramphenicol (1 mg/ml). El del extracto de aceite de las hojas se observó un alto nivel de linalool (96.7 %) con actividad antibacterial. Un estudio fitoquímico de *B. aloexylon* informó que se aislaron tres compuestos del aceite volátil obtenido de *B. aloexylon*, sus estructuras se dilucidaron mediante estudios de

cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), los compuestos fueron óxido de linalol (0,56 %), linalol (96,70 %) y alcanfor (0,64 %) (Queiroga et al., 2007).

### **2.18.3. *Bursera morelensis***

*Bursera morelensis*, mejor conocida como "Aceitillo", es un árbol endémico de México y se encuentra en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí. La corteza es recolectada de la especie vegetal y es utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones de la piel y por sus propiedades curativas de heridas (Canales-Martínez et al., 2017; Carretero et al., 2008; Queiroga et al., 2007; Zuñiga et al., 2005). Varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antibacteriana de esta especie vegetal; por el método de dilución en caldo. Se colocó un total de 250 g de planta fresca en agua destilada donde se obtuvo el aceite esencial, diluciones de aceite esencial de 4000 a 62,5 µg/ml, fueron probadas. El aceite esencial tenía actividad antibacteriana contra todas las cepas (Gram positivas y negativas), las cepas más sensibles al aceite esencial fueron *S. pneumoniae*, *V. cholerae* y *E. coli* (MIC 0.125 mg/ml, MBC 0.25 mg/ml). El aceite esencial de tallos jóvenes y trozos de corteza obtenida por agua destilada fueron aislados 28 compuestos como; β-thujene 3.856 1.99 %, α-pineno 3, 945 5, 82 %, sabinene 4.329 2.65 %, β-pineno 4.450 2.56 %, β-mirceno 4.490 2.15 %, α-felandreno 4.658 32.69 %, o-cimeno 4.866 8.71 %, β-felandreno 4.938 14.79 %, β-ocimene 5.011 0.65 %, γ-terpinene 5.139 0.42 %, α-terpinoleno 5.411 0.88 %, 4, 5-epoxycarene 5.956 0.69 %, terpinen-4-ol 6.205 0.58 %, α-terpineol 6.301 0.47 %, neoisothujol 6.405 0.71 %, biciclo [3.1.0] hexano-6-metanol, 2-hidroxi-1, 4, 4-trimetil- 6.774 3.62 %, camphenol 7.095 0.46 %, pinanediol 7.295 2.96 %, 5-isopropenil-2-metil-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-2-ol 7.383 1.80 %, bornane-2, 3-diol 7.784 0.42 %, decahidronaftaleno-1-ol-3-cetona 7.976 0.60 %, isocariofileno 8.096 7.48 %, α-cariofileno 8.305 0.85 %, β-cubebene 8.481 1.99 %, denderalasin 8.946 0.61 %, óxido de cariofileno 9.146 1.17 %, β-eudesmol 9.539 0.35 % y biciclo [3.1.1.] Hept-3-eno, 2-formilmetil-4, 6,6-trimetil 10.541 0.50 %. Un estudio fitoquímico de *B. morelensis* informó que se aislaron cinco compuestos principales obtenidos por aceite esencial de tallos jóvenes y trozos de

corteza obtenida por agua destilada, sus componentes fueron identificados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6850, acoplado a un espectrómetro de masas (MS), los compuestos fueron  $\alpha$ -fellandreno (32.69 %),  $\beta$ -fellandreno (14.79 %), *o*-cimeno (8.71 %), isocariofileno (7.48 %) y  $\alpha$ -pineno (5.82 %) (Canales-Martínez et al., 2017).

#### **2.18.4. *Bursera glabrifolia***

*Bursera glabrifolia* se encuentra principalmente en el bosque seco tropical ubicado en el sur de México. La corteza del tallo y hojas son recolectadas de la especie vegetal y son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades antibacterianas (Hernández-Pérez et al., 2011; Peters et al., 2003). Varios estudios farmacológicos han demostrado la actividad antibacterial, de esta especie vegetal (aceites esenciales de las hojas y corteza del tallo); un estudio de actividad antibacterial por el método de concentración mínima inhibitoria (MIC) y microdilución en caldo de bacterias, menciona que, los aceites esenciales mostraron una fuerte actividad antibacterial en *Enterococcus faecalis* (MIC, 132.7–173.6  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ ) y *Helicobacter pylori* (MIC, 74.8–199.2  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ ). La evaluación de los principales volátiles reveló  $\alpha$ -terpineol como el principal agente antibacteriano (MIC, 78.6–149.7  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  de inhibición al compararse con cloranfenicol, vancomicina y claritromicina. De esta especie vegetal, fueron aislados 4 compuestos  $\alpha$ -terpineol (17.9–29.7 %),  $\alpha$ -terpinene (12.6–17.4 %), limoneno (14.9–26.8 %) y  $\beta$ -pineno (2.1–16.7 %) como los más abundantes. Un estudio fitoquímico de *B. glabrifolia* informó que se aislaron 19 compuestos en el año 2015–2018 consecutivos de los compuestos del aceite volátil obtenido por extracción por hidrodestilación de la corteza y hojas de *B. glabrifolia*, sus estructuras se dilucidaron mediante estudios de RMN, los compuestos fueron  $\alpha$ -thujene,  $\alpha$ -pineno [b], sabinene,  $\beta$ -pineno [b],  $\beta$ -mirceno, *p*-cimeno, limoneno [b], 1, 8-cineol [b], ocimene,  $\alpha$ -terpinene [b], linalol [b], *p*-cymen-8-ol [b],  $\alpha$ -terpineol [b], verbenona [b], nerolidol, elemol, espatulenol, óxido de cariofileno [b],  $\alpha$ -cadinol, monoterpenos y sesquiterpenos (Villa-Ruano et al., 2018).

## **2.19. Antecedentes de la Planta a Estudiar**

### **2.19.1 *Bursera linanoe***

*Bursera linanoe* también conocido como copalillo, linaloé, linanoé, ulinoé, inanué, linaloe, linalué, ulinalué, xochicopatl en los estados de Puebla, Guerrero, Morelos y Oaxaca. El principal uso es la fabricación de las artesanías de Olinalá, Guerrero, que utilizan secciones de madera necrosada o “jaspe”, lo cual incrementa su valor comercial y las identifica como artesanías originales debido a su apariencia y aroma (Arellano-Ostoa et al., 2015).

Por otro lado, también se obtiene aceite esencial por la destilación de la madera y frutos que se utiliza en las industrias de perfumería y farmacéutica. Estudios fitoquímicos mencionan que el género *Bursera* presenta actividad antiinflamatoria y antimicrobiana por ejemplo *Bursera glabrifolia* se menciona que el aceite obtenido mediante el disolvente bromuro de metilo en hidrodestilación, produce una fuerte actividad antibacteriana contra ciertos agentes patógenos. Por otro lado, *Bursera graveolens* es utilizado en el tratamiento de hernias, tronchaduras de los pies y para extraer cuerpos extraños de la piel, estudios fitoquímicos mencionan que el extracto de *Bursera graveolens* presenta actividad antiinflamatoria en el disolvente de éter de petróleo de corteza (Andrés-Hernández et al., 2002).

## **2.20. Ubicación Taxonómica**

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Burseraceae

Género: *Bursera*

Especie: *Bursera linanoe*

### **2.21. Descripción**

*Bursera linanoe* generalmente se trata de árboles de tamaño bajo a medio (5 a 15 m). Es una especie dioica, muy resinosa, con aroma agradable y penetrante. Presenta un tronco de hasta 60 cm de diámetro, con corteza gris-rojiza, no exfoliante y con ramillas lignificadas rojizas oscuras. Su floración se presenta de mayo a principios de julio y se encuentra desprovisto de follaje durante los meses de noviembre a mayo (Rzedowski & Kruse et al., 1979).

### **2.22. Origen y Distribución.**

*Bursera linanoe* es especie endémica de México, se encuentra distribuido principalmente en los estados de Puebla, Guerrero, Morelos y Oaxaca. Que habitan en los bosques tropicales a altitudes entre 650 y 1800 m, situados principalmente en la cuenca del río Balsas (Rzedowski et al., 2005).

### **2.23. Fundamento de la Prueba de TPA**

La administración tópica de 13-acetato-12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) en pabellón auricular de ratón que produce un edema agudo con infiltración leucocitaria. El TPA es el más potente de todos, este posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores. La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema, extravasación y edema. El TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa C (PKC) dependiente de  $Ca^{2+}$  y sobre fosfolípidos liberando ácido araquidónico, cuyos metabolitos pueden mediar prácticamente todos los pasos de la inflamación y son sintetizados mediante COX-1, COX-2 que generan prostaglandinas (que median el dolor y la fiebre) y por lipoxigenasas cuyo producto principal, el ácido 5-hidroxieicosatetraenoico (ácido 5-HETE), es quimiotáctico para neutrófilos y da lugar a leucotrienos, que poseen potente efecto quimiotáctico y promueven la agregación y adhesión de los leucocitos al endotelio vascular (Gómez et al., 2011).

## **2.24. Fundamento de la Prueba Antibacterial**

### **2.24.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La CMI, o concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. Una CMI, ayuda a determinar qué clase de antibiótico es más eficaz. Esta información puede conducir a la elección adecuada de un antibiótico, lo que aumentará las probabilidades de éxito del tratamiento y ayudará en la lucha para frenar la resistencia a antibióticos. (Quintana et al., 2005).

## **3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Los medicamentos usados para los problemas inflamatorios causan efectos tóxicos e indeseables en el paciente. Por otro lado, los altos índices de infecciones bacterianas en el mundo causadas por *Staphylococcus aureus*, y la resistencia que han presentado las bacterias ante los antibióticos, ha mantenido vigente la necesidad de seguir buscando nuevas sustancias con esta actividad biológica.

## **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Varios estudios farmacológicos han demostrado que especies del género *Bursera* presentan actividad antibacterial y antiinflamatoria, por lo tanto: ¿*Bursera linanoe* presentará actividad biológica en los modelos antiinflamatorio y antibacterial?

## **5. HIPÓTESIS**

Varias especies del género *Bursera* han presentado actividad antiinflamatoria y antibacterial, por lo tanto, *Bursera linanoe* presentará alguno o algunos compuestos químicos con actividad antiinflamatoria o antibacterial.

## 6. JUSTIFICACIÓN

Las especies vegetales del género *Bursera* que se han utilizado en la medicina tradicional mexicana, presentan actividad antibacterial y antiinflamatoria por lo que, *Bursera linanoe* puede ser una alternativa viable en la obtención de compuestos con este efecto biológico. Por lo tanto, esta investigación sentará las bases en el desarrollo de fitomedicamentos eficaces y seguros para contrarrestar las enfermedades bacterianas e inflamatorias y permitirá ser una fuente sustentable en el desarrollo de fármacos.

## 7. OBJETIVOS

### General

Evaluar la capacidad antiinflamatoria y antibacterial de *Bursera linanoe* utilizando los modelos de edema inducido por TPA en ratones ICR y el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en bacterias *Staphylococcus aureus* sensible y multirresistente a meticilina.

### Particulares

1. Obtener tres extractos orgánicos de diferente polaridad de *Bursera linanoe*
2. Evaluar el efecto antiinflamatorio de extractos de *Bursera linanoe* utilizando el modelo de edema en el pabellón auricular de ratón inducido por TPA.
3. Evaluar el efecto antibacterial de extractos de *Bursera linanoe* utilizando método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).
4. Realizar un estudio químico biodirigido del extracto que tenga mayor actividad antiinflamatoria y antibacterial.
5. Evaluar las fracciones activas y al menos un compuesto aislado.
6. Elucidar estructuralmente el compuesto con mayor efecto biológico, utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



## 8. MATERIALES Y REACTIVOS

### 8.1. Colecta de material biológico

#### *Bursera linanoe*

Se colectaron 4.610 kg de hoja de planta fresca y 1.850 kg de fruto de planta fresca (*B. linanoe*) obteniendo 1.800 kg de hoja seca y 0.504 kg de fruto seco (Tabla 4).

La planta fue colectada en el mes de octubre de 2019 en Zontecomatlan municipio de Olinalá (Guerrero, México) y una muestra del espécimen fue depositada en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM); con número de registro (39808). La identificación taxonómica la realizó el MC Gabriel Franco Flores, botánico e investigador del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) (Anexo a).

### 8.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR con un peso de 25-30 g proporcionados por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Sur del IMSS. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana: Pautas NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio) y pautas éticas internacionales para el cuidado y uso de animales experimentales. El protocolo experimental fue autorizado por el Comité Local de Investigación en Salud (IMSS, número de registro: R-2010-1701-33). Los ratones se mantuvieron a una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 5\%$  de humedad con ciclos de luz / oscuridad de 12 h y comida/agua ad libitum. Un grupo de control recibió acetona como vehículo y se usó indometacina (Indo, antiinflamatorio) como control positivo.

### 8.3. Microorganismos y medios

Los microorganismos utilizados para la evaluación antimicrobiana se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, EE. UU.). Se utilizó la bacteria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Las bacterias se mantendrán en agar tríptico de soja (TSA; Merck, Darmstadt,

Alemania) y se analizarán en agar Mueller-Hinton (MH; Merck). Se usará agar de glucosa Sabouraud al 4 % (SGA; Merck) para mantener la levadura y como medio de ensayo.

## 9. MÉTODOS

### 9.1. Obtención de extractos de *n*-hexano, acetona y metanol de *Bursera linanoe*

El material vegetal (hojas y fruto) se secó a la sombra, a temperatura ambiente, después las hojas y el fruto se molieron por separado. El material molido fue extraído por maceración con *n*-hexano, acetona y metanol por separado. La extracción se efectuó durante tres días por triplicado (por cada Kg de planta seca se utilizaron 5 L de disolvente). El disolvente fue eliminado totalmente por destilación a presión reducida con la ayuda de un evaporador rotatorio marca Buchi mod 205 y posteriormente los extractos se secaron al vacío. Los extractos provenientes de las hojas de *B. linanoe* fueron nombrados dependiendo del disolvente BIHH (*n*-hexano), BIAH (acetona), BIMH (metanol). Los extractos obtenidos del fruto fueron nombrados de igual forma, BIHF (*n*-hexano), BIAF (acetona), BIMF (metanol).

### 9.2. Cromatografía en columna fase normal de BIMH

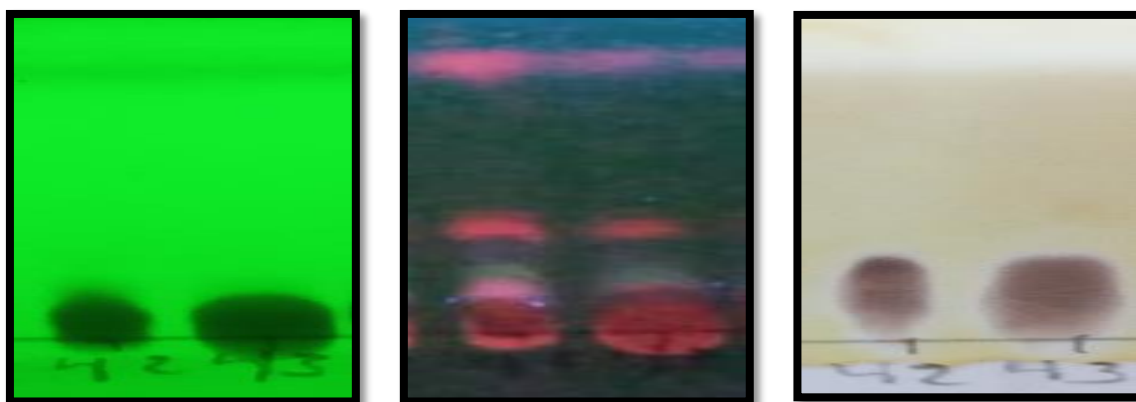
En 30 g de sílica se adicionaron 25.9 g de BIMH disuelto en acetona, agitándose constantemente y colocándose en lapsos breves sobre la parrilla para conseguir una absorción más rápida, se empaco con 100 g de sílica gel 60 con un poro de 0.2 mm - 0.5 mm (Darmstadt, Germany) en una columna de vidrio (33 cm de altura con 5 cm de diámetro) con llave de paso. El sistema de elución que se utilizó fue de 100 % diclorometano para su activación, agregándole gradualmente una mezcla de diclorometano -metanol para la separación de los compuestos, este proceso se explica en la (Tabla 1). Las fracciones se colectaron de 100 ml para su concentración en un sistema de destilación a presión reducida con variaciones en el sistema de vacío de 50-60 rpm en un baño maría a 50-60 °C ayudados con un rota-vaporador Heldoph. Todos los concentrados fueron recuperados con acetona. El proceso de separación fue comprobado por medio de cromatografía en capa fina (CCF)

la cual utilizo TLC silica gel 60 F254 (Merck, Alemania) y fase reversa C18 (40–63  $\mu\text{m}$ , Merck), así como los disolventes *n*-hexano, diclorometano y metanol.

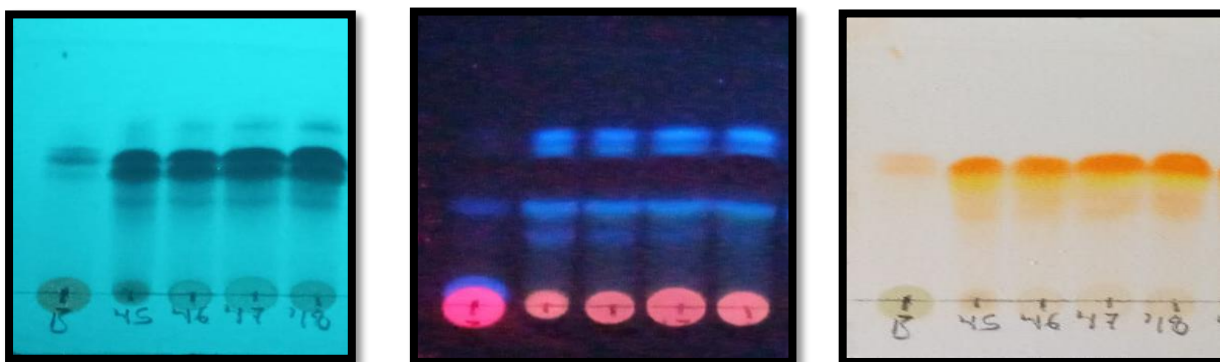
**Tabla 1.** Fraccionamiento en columna (C1), fase normal de BIMH

Polaridad del sistema	Fracciones	Subfracciones	Clave	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (100%)	(1-5)	1	1	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (98-2)	(6-10)	2	2-4	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (96-4%)	(11-15)	3	6-8	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (94-6%)	(16-20)	4	9-10	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (92-8%)	(21-25)	5	11-12	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (90-10%)	(26-30)	6	13-15	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (88-12%)	(31-35)	7	16-18	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (86-14%)	(36-40)	8	19-21	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (84-16%)	(41-45)	9	22-23	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (82-18%)	(46-50)	10	24-27	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (80-20%)	(51-55)	11	28	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (78-22%)	(56-60)	12	29-32	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (76-24%)	(61-65)	13	33	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (74-26%)	(66-67)	14	34-36	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (70-30%)	(68-79)	15	37	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (65-35%)	(73-77)	16	38-41	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (60-40%)	(78-82)	17	42-43	C1-R17
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH (50-50%)	(83-87)	18	44-48	BIF1
MeOH (100%)	(88-92)	20	49-50	
		21	51-55	
		22	56-60	
		23	61-64	C1-R23
		24	65	
		25	66-68	
		26	69-75	
		27	76	
		28	77-78	
		29	79-80	
		30	81-84	
		31	85	
		32	86	
		33	87-89	
		34	90	
		35	91-93	

Se analizaron las subfracciones C1-R17, BIF1 y C1-R23 de la columna 1 en cromatografía en capa fina (fase normal y reversa), se observó mediante rayos UV de onda corta y onda larga, así como también se reveló con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente flavonoides) y sulfato cérico amoniacal en  $H_2SO_4$  2N (Figura 1, 2, 3). Por otro lado, se llevó a cabo la separación de compuestos de la subfracción BIF1 con posible actividad biológica, en un sistema 5-5  $H_2O$ /Acetonitrilo.



**Figura 1.** Cromatografía en capa fina fase normal de la reunión C1R-17 de la columna 1, sistema 95-5 diclorometano/ metanol revelado sulfato cérico amoniacal en  $H_2SO_4$  2N.



**Figura 2.** Cromatografía en capa fina en fase reversa de la reunión BIF1 de la columna 1. Sistema 5-5  $H_2O$ /Acetonitrilo revelado con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente flavonoides).



**Figura 3.** Cromatografía en capa fina fase reversa de la reunión C1-R23 de la columna 1, sistema 7:3 H<sub>2</sub>O/ acetonitrilo revelado con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente flavonoides).

### 9.3. Obtención de una mezcla de Ribopiranosido de kaempherol (RK) y Ribopiranosido de Quercetina (RQ)

La subfracción BIF1, obtenida en el fraccionamiento del extracto de metanol fue separada (154.1 mg) mediante un proceso de cromatografía en columna abierta en la que se utilizó gel de sílice de fase reversa (RP-18, 40-63  $\mu$ m, 3 g) como fase estacionaria. Esta columna fue estabilizada con agua destilada con incrementos graduales de acetonitrilo hasta llegar a un 100 % de éste disolvente, para iniciar el proceso de purificación. Después de adicionar la mezcla en la columna, se cambió la fase móvil a un sistema H<sub>2</sub>O: acetonitrilo (90:10). La polaridad de esta fase móvil fue disminuyendo mediante incrementos continuos del disolvente menos polar hasta llegar al 100 % de acetonitrilo. Se obtuvieron 15 fracciones de 10 ml de las cuales 3 subfracciones que mostraron patrones similares en CCF de fase reversa, fueron agrupadas de acuerdo a su contenido químico. En la subfracción 10, se obtuvo un precipitado amarillento el cual presentó un compuesto al ser analizado en cromatografía en capa fina (5:5 H<sub>2</sub>O: Acetonitrilo) y revelado con sulfato cérico amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N lo que generó una mancha de color amarillento característica de flavonoides, el proceso se explica en la (Tabla 2).

**Tabla 2.** Fraccionamiento químico de la subfracción BIF1

Polaridad del sistema		Fracciones	Subfracciones	Clave	
H <sub>2</sub> O	(100%)	1-3	1	1-3	
H <sub>2</sub> O – CH <sub>3</sub> CN	(90-10%)	4-8	2	4	
H <sub>2</sub> O – CH <sub>3</sub> CN	(80-20%)	9-13	3	5	
CH <sub>3</sub> CN	(100%)	14-15	4	6	
			5	7	
			6	8	
			7	9	
			8	10	F10
			9	11	
			10	12	
			11	13	
			12	14	
			13	15	

Al observar las subfracciones de esta columna en CCF en fase reversa, se observó mediante la lámpara de rayos UV de onda corta y onda larga así como también se reveló con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente flavonoides), en un sistema 5-5 H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo (Figura 4), por otro lado, la subfracción F10 fue enviado a análisis de HPLC debido a que se observa una mezcla de compuestos (Anexo j), sin embargo, mediante la precipitación de F10 se observó un compuesto blanco, este fue identificado como la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempferol y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (Figura 6), por análisis de Resonancia Magnética Nuclear <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Tabla 5).



**Figura 4.** Cromatografía en capa fina en fase reversa de las reuniones de la columna 2. Sistema 5-5 H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo revelado con 2-aminoetildifenilborinato (específicamente Flavonoides).

#### 9.4. Cromatografía en columna fase normal de BIAF

En 25 g de sílica se adicionaron 9.2 g del extracto de acetona de *Bursera linanoe* (BIAF) disuelto en acetona, agitándose constantemente y colocándose en lapsos breves sobre la parrilla para conseguir una absorción más rápida, se empacó con 70 g de sílica gel 60 con un poro de 0.2 mm - 0.5mm (Germany) en una columna de vidrio (33 cm de altura con 5 cm de diámetro) con llave de paso. El sistema de elución que se utilizó fue de 100 % diclorometano para su activación, agregándole gradualmente diclorometano y metanol para la separación de los compuestos, este proceso se explica en la (Tabla 3). Las fracciones se colectaron de 100 ml para su concentración en un sistema de destilación a presión reducida con variaciones en el sistema de vacío de 50-60 rpm en un baño maría a 50° - 60°C ayudados con un rota-vaporador Heldoph. Todos los concentrados fueron recuperados con acetona. El proceso de separación fue comprobado por medio de cromatografía en capa fina (CCF) la cual utilizo TLC silica gel 60 F254 (Merck, Alemania) y fase reversa C18 (40–63 µm, Merck), así como los disolventes hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol.

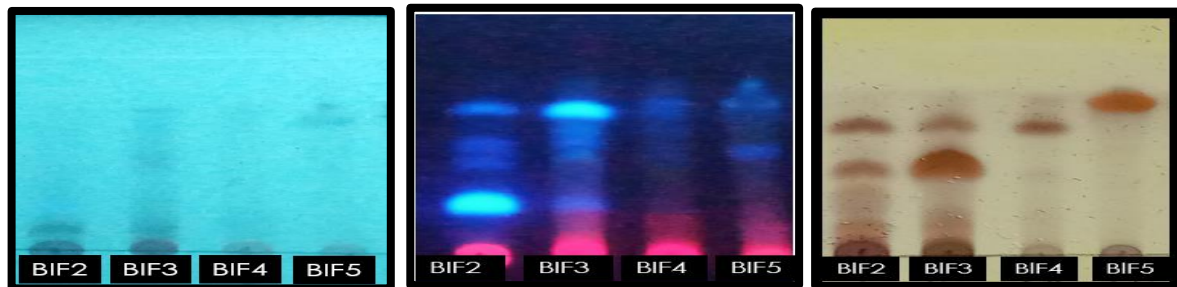
**Tabla 3.** Fraccionamiento en columna (C3) fase normal de BIAF

Polaridad del sistema	Fracciones	Subfracciones	Clave	
CH <sub>2</sub> Cl (100%)	1-5	1	1-2	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (98-2%)	6-10	2	3	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (96-4%)	11-15	3	4-8	BIF2
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (94-6%)	16-20	4	9	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (92-8%)	21-25	5	10-14	BIF3
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (90-10%)	26-30	6	15-18	BIF4
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (88-12%)	31-35	7	19-22	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (86-14%)	36-40	8	23	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (84-16%)	41-45	9	24	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (82-18%)	46-50	10	25-29	BIF5
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (80-20%)	51-55	11	30	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (78-22%)	56-60	12	31-33	
CH <sub>2</sub> Cl–MeOH (76-24%)	61-65	13	34-35	
MeOH (100%)	66-70	14	36-37	
		15	38-39	
		16	40	
		17	41-45	BIF6
		18	46-49	

20	50-52
21	53-54
22	55-56
23	57-59
24	60-61
25	62-66
26	68-69
27	70

---

Se analizaron las subfracciones BIF2, BIF3, BIF4, BIF5 y BIF6 de la columna 3 en cromatografía en capa fina en fase reversa, se observó mediante rayos UV de onda corta y onda larga, así como también revelada con sulfato cérico amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Por otro lado, se llevó a cabo la separación de compuestos con posible actividad biológica, en un sistema 5-5 H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo (Figura 5), el cual posteriormente las subfracciones BIF2, BIF3, BIF4, BIF5 y BIF6 se sometieron a evaluación antibacterial.



**Figura 5.** Cromatografía en capa fina en fase reversa de las reuniones de la columna 3. Sistema 5-5 H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo revelado con sulfato cérico amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

## 9.5. Modelos experimentales:

### 9.5.1. Modelo de inflamación aguda en ratones con TPA

La inflamación en la oreja de ratón fue inducida mediante el modelo descrito previamente por (Salinas Sánchez et al., 2012). Grupos de 8 ratones fueron formados y se les aplicó 2.5 µg de TPA disuelto en 20 µL de acetona y aplicados tópicamente en la superficie interna y externa de la oreja derecha para causar edema. Las muestras en estudio fueron disueltas en acetona y se aplicaron tópicamente sobre la oreja del ratón por ambos lados inmediatamente después de la administración del TPA. Las dosis fueron las siguientes:



1mg/oreja de los extractos BIHH, BIAH, BIMH, BIHF, BIAF, BIMF; BIF1y la indometacina 1 mg/oreja. Después de 6 h de la administración del agente inflamatorio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron secciones circulares de 6 mm de diámetro de las dos orejas del animal, oreja tratada (t) y no tratada (nt), las cuales fueron pesadas para determinar por diferencia de peso la inflamación provocada como  $\Delta P = P_t - P_{nt}$ . El porcentaje de inhibición se obtendrá utilizando la siguiente expresión: % de inhibición =  $[\Delta w_{control} - \Delta w_{tratamiento} / \Delta w]$  [100].

## 9.6. Modelo de evaluación de la actividad antibacterial (MIC)

El extracto utilizado se diluyo en dimetilsulfóxido (DMSO) y agua destilada. Las dosis empleadas de los extractos fueron 0.25, 0.5, 1.2  $\mu\text{g}$  respectivamente. Estas fueron inoculadas en cajas Petri con 3 mL del agar Müller-Hinton para las bacterias .Estos se incubaron en una estufa de cultivo a 37° y 28° C respectivamente. Se dejaron incubando por 18-24 h. en cada caja Petri y se sembraron *Sa*, *SaR*.

### 9.6.1. Actividad antibacterial

BIHH 60.7 mg disuelto 809  $\mu\text{L}$  DMSO/3238  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIAH 53.7 mg disuelto en 716  $\mu\text{L}$  DMSO/2864  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIMH 30.7 mg disuelto en 410  $\mu\text{L}$  DMSO/1637  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIHF 32.6 mg disuelto en 434  $\mu\text{L}$  DMSO/1739  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIAF 30.1 mg disuelto en 400  $\mu\text{L}$  DMSO/1600  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril y BIMF 34.2 mg disuelto en 456  $\mu\text{L}$  DMSO/1824  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril y fracciones BIF1 32.1 mg disuelto 428  $\mu\text{L}$  DMSO/1712  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIF2 39.2 mg disuelto 523  $\mu\text{L}$  DMSO/2090  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIF3 30.9 mg disuelto 412  $\mu\text{L}$  DMSO/1648  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIF4 42.2 mg disuelto 563  $\mu\text{L}$  DMSO/2250  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril, BIF5 22.9 mg disuelto 305  $\mu\text{L}$  DMSO/1222  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril y BIF6 13.8mg disuelto 184  $\mu\text{L}$  DMSO/736  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O estéril el medio de cultivo fue el agar Müller-Hinton. Una vez esterilizado se dejó enfriar a temperatura ambiente para su vertido en las cajas Petri contenidas con las dosis 0.25, 0.5, 1 y 2 mg respectivamente, en esta se vertieron 3 ml y se dejaron gelificar. Para la siembra de las bacterias *Staphylococcus aureus* sensible y multirresistente a meticilina. Una vez sembradas se metieron a encubar en la estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. Como control se utilizó Gentamicina (*Sa*, *SaR*), inoculando la dosis correspondiente.

## 9.7. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se expresarán como  $\pm$  Error Estándar de la Media (ESM), los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) y post-prueba Dunnet, \*p <0.05.

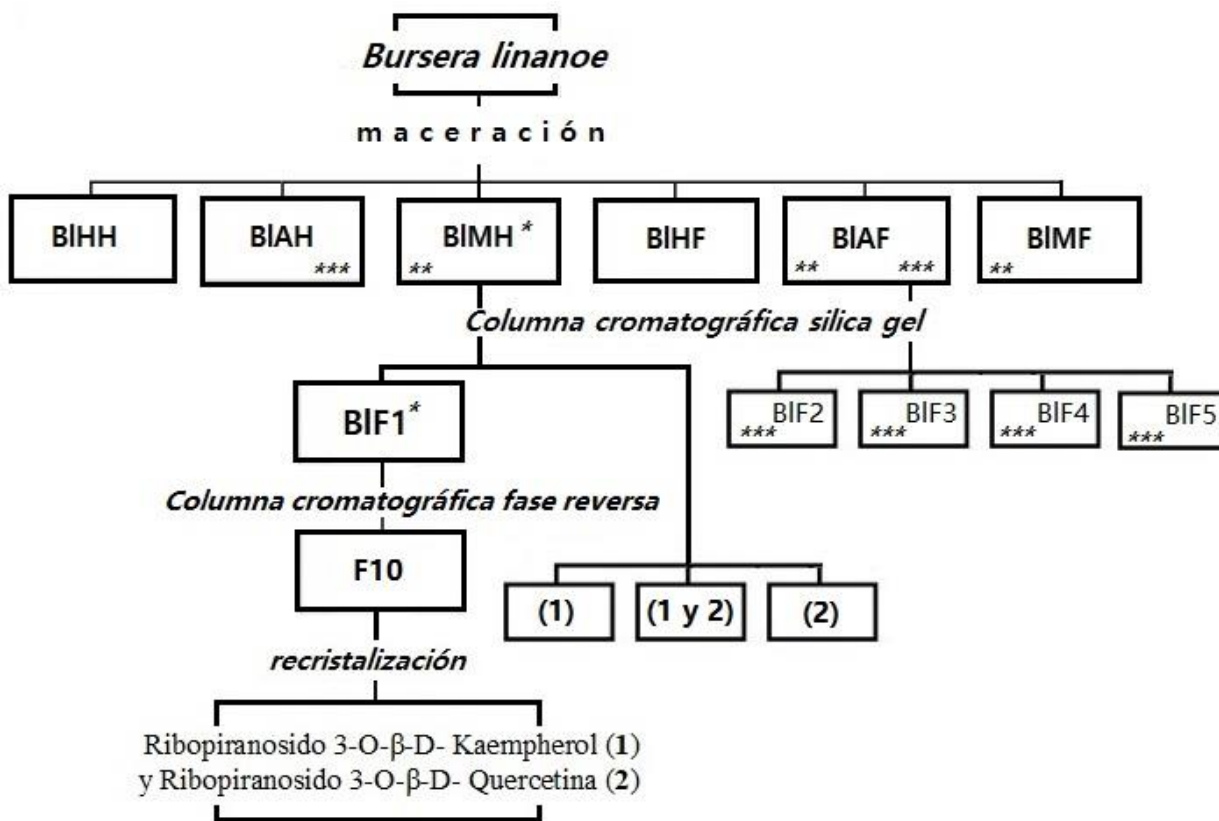
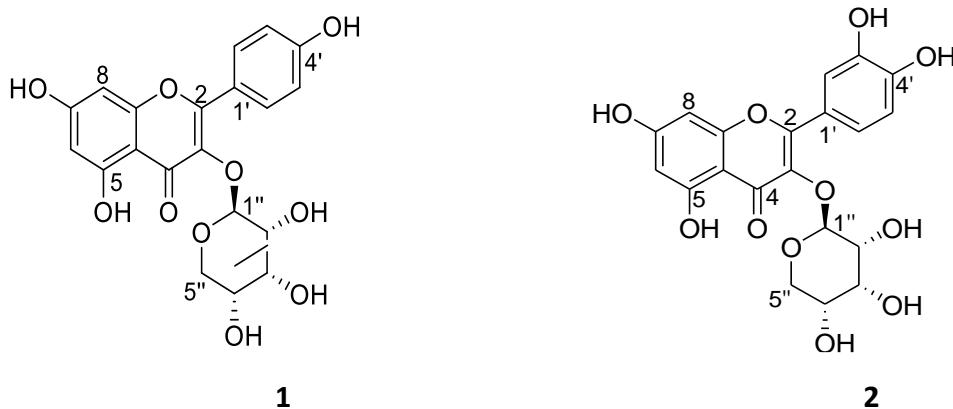
## 10. RESULTADOS

**Tabla 4.** Rendimientos de los extractos de *Bursera linanoe*

Planta/Parte	Disolvente	Clave	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>B. linanoe</i> /hoja	Hexano	BIHH	39.1	2.17
<i>B. linanoe</i> /hoja	Acetona	BIAH	51.8	2.87
<i>B. linanoe</i> /hoja	Metanol	BIMH	80.1	4.45
<i>B. linanoe</i> /fruto	Hexano	BIHF	77.4	15.35
<i>B. linanoe</i> /fruto	Acetona	BIAF	17.6	3.49
<i>B. linanoe</i> /fruto	Metanol	BIMF	13	2.57

El extracto metanólico de hoja de *Bursera linanoe* BIMH mostró una importante actividad antiinflamatoria y una buena actividad antibacterial frente a *Staphylococcus aureus*, sensible a meticilina. La purificación cromatográfica en columna abierta de este extracto permitió obtener una subfracción BIF1, con efecto antiinflamatorio. BIF1 mediante una separación cromatográfica de fase reversa permitió obtener una fracción F10, que contenía una mezcla de flavonoides. La recristalización de esta fracción F10, originó un sólido de color blanco del cual fue posible identificar mediante el análisis de sus datos de espectroscópicos de RMN de una y dos dimensiones (Tabla 5, Anexo b-g) como la mezcla de ribopiranosido de kaempherol y ribopiranosido de quercetina (Figura 6, Diagrama 1), los datos de HPLC mostraron tiempos de retención de 10.5 min y de 9.7 min con espectro de UV  $\lambda_{nm} = 205, 265$  y  $356$ ;  $205, 255$ , y  $358$  señales  $nm$  características para compuestos derivados de kaempherol y quercetina respectivamente (Anexo h-k). Estos compuestos no han sido reportados para esta especie.

**Figura 6.** Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2)



**Diagrama 1.** Estrategia de Separación fitoquímica de BIMH y BIAF.

\*Extractos y fracciones con buen efecto antiinflamatorio; \*\*Extractos con actividad antibacterial contra *Sa*, sensible; \*\*\* Extractos con actividad antibacterial contra *Sa*, sensible y multirresistente a meticilina

**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de RMN para Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempferol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2) (<sup>1</sup>H 600 MHz and <sup>13</sup>C 150 MHz, en CD<sub>3</sub>OD) de 1 y 2.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^1\text{H}$ (J in Hz)	
	1	2	1	2
2				
3	134.9	134.8		
4	179.8	179.9		
5	161.5	163.0		
6	100.1	100.1	6.20 (d, 1.83)	6.20 (d, 1.83)
7	166.6	166.6		
8	94.9	94.9	6.39 (d, 1.83)	6.38 (d, 1.83)
9	159.3	158.6		
10	105.5	105.4		
1'	122.9	123.1		
2'	131.9	116.8	7.95 (d, 8.8)	7.54 (d, 2.2)
3'	116.5	146.3	6.92 (d, 8.8)	
4'	161.5	149.8		
5'	116.5	116.4	6.92 (d, 8.8)	6.90 (d, 8.07)
6'	131.9	122.8	7.95 (d, 8.8)	7.48 (d, 2.2, 8.4)
$\beta$ -D-ribopiranososa				
1''	109.6	109.5	5.47 (s, br)	5.46 (s, br)
2''	83.3	83.2	4.32 (dd, 1.1, 2.9)	4.33 (dd, 1.1, 2.9)
3''	78.6	78.7	3.91 (dd, 2.5, 5.1)	3.91 (dd, 2.5, 5.1)
4''	88.0	88.0	3.81 (dd, 4.03, 4.7)	3.88 (dd, 4.03, 4.7)
5''a	62.5	62.5	3.51 (dd, 4.03, 4.7)	3.88 (dd, 4.03, 4.7)
b			3.49 (dd, 1.83, 1.83)	3.49 (dd, 1.83, 1.83)

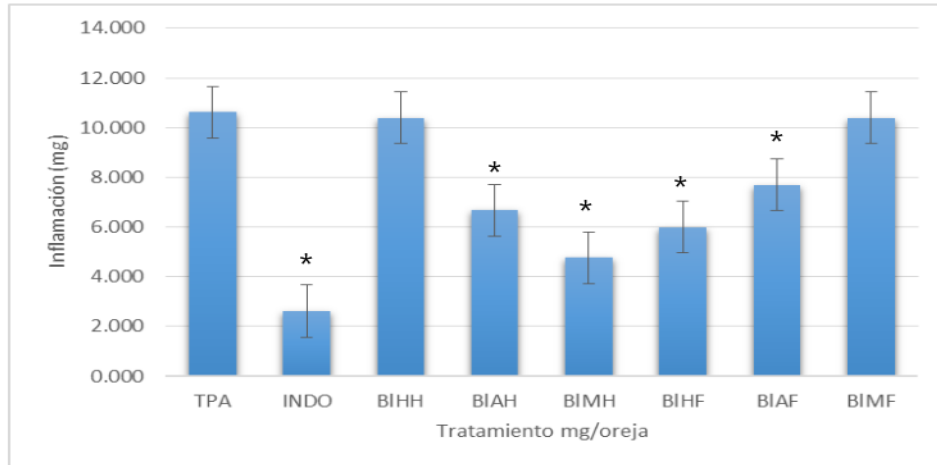
### 10.1. Actividad Antiinflamatoria del extracto metanólico (BIMH) de las hojas de *Bursera linnae*

El extracto de metanol de las hojas de *B. linnae*, mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA. La evaluación de BIHH, BIAH, BIMH, BIHF, BIAF y BIMF se llevó a cabo a una dosis de 1 mg/oreja. La (Tabla 6) muestra los resultados de inhibición del edema inducido por TPA en oreja de ratón. BIHH inhibió el edema en un 2.07 %  $\pm$  3.388, BIAH en 37.22 %  $\pm$  0.859, BIMH en 58.24 %  $\pm$  2.293, BIHF en 47.36 %  $\pm$  1.421, BIAF 32.45 %  $\pm$  1.616 y BIMF en 2.07 %  $\pm$  3.388 comparada con la indometacina a 1 mg/oreja con un 75.32 %  $\pm$  0.760 de inhibición.

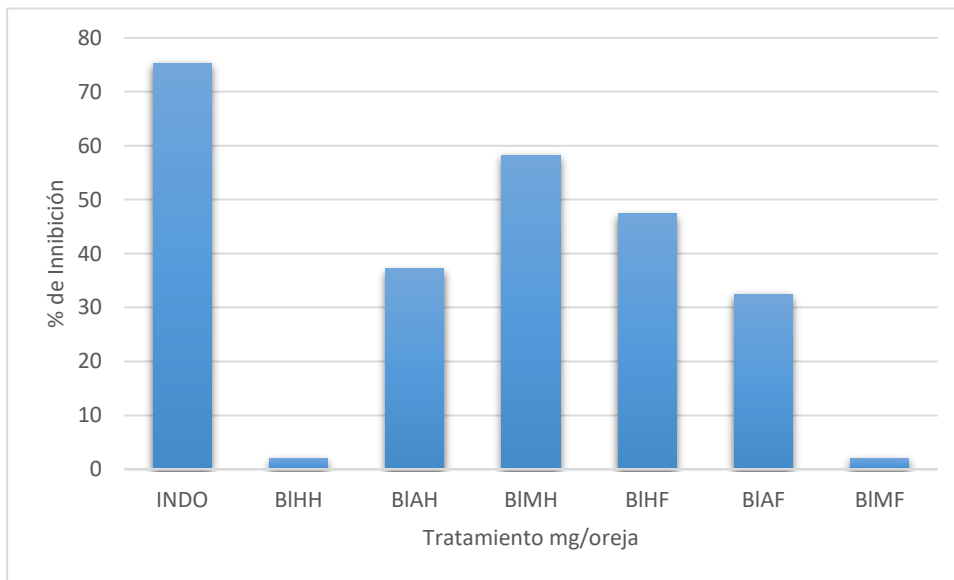
**Tabla 6.** Actividad antiinflamatoria del extracto de metanol (BIMH) de *Bursera linanoe* en un modelo de edema auricular en ratón ICR inducido por TPA.

Sustancia	Tiempo (h)	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) promedio $\pm$ EEM	Inhibición del edema (%)
TPA		---	10.620 $\pm$ 2.564	-----
BIHH	6	1.0	10.400 $\pm$ 3.388	2.07 $\pm$ 3.388
BIAH	6	1.0	6.667 $\pm$ 0.859*	37.22 $\pm$ 0.859
BIMH	6	1.0	4.760 $\pm$ 2.293*	58.24 $\pm$ 2.293
BIHF	6	1.0	6.000 $\pm$ 1.421*	47.36 $\pm$ 1.421
BIAF	6	1.0	7.700 $\pm$ 1.616*	32.45 $\pm$ 1.616
BIMF	6	1.0	10.400 $\pm$ 3.388	2.07 $\pm$ 3.388
Indo	6	1.0	2.620 $\pm$ 0.760*	75.32 $\pm$ 0.760

Cabe mencionar que a la fecha hay pocos reportes de actividad farmacológica y fitoquímica para la especie *Bursera linanoe*, por otro lado, para el género de esta planta solo hay escasos datos que indican el efecto antiinflamatorio. En el presente trabajo *B. linanoe*, presenta inhibición del edema, por lo que se decidió continuar con el trabajo experimental basado en la separación química y actividad farmacológica.



**Gráfica 1.** Efecto de la administración local del extracto BIHH, BIAH, BIMH, BIHF, BIAF y BIMF a 1 mg/oreja, sobre el edema (diferencia de peso) inducido con TPA en el pabellón auricular de ratones ICR. INDO: indometacina. Anova post-Dunnet,  $p < 0.05$ .



**Gráfica 2.** Los resultados muestran que los extractos inhibieron el edema en BIHH 2 %, BIAH 37 %, BIHF 47 %, BIAF 32 % y BIMF 2 %, por otro lado, el extracto BIMH en 58 %, respectivamente a una dosis de 1 mg/oreja. Mientras que la INDO (control positivo) a 1 mg/oreja mostró un 75.3 % de inhibición del edema.

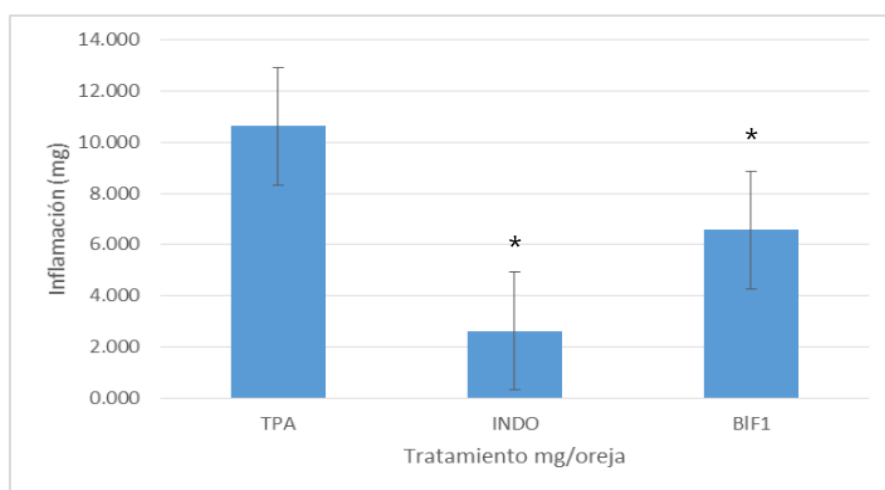
### 10.1.1. Actividad Antiinflamatoria de BIF1

La subfracción BIF1 de *B.linanoe* a dosis de 1 mg/oreja, inhibió el edema auricular en ratón inducido por TPA con  $42.45 \% \pm 1.781$  respectivamente (Tabla 7) y la indometacina a dosis de 1 mg/oreja inhibió el edema  $75.32 \% \pm 0.760$ , estadísticamente los datos del grupo fueron significativamente diferentes ( $*p < 0.05$ ) al grupo de animales que se les indujo inflamación vía TPA y sólo recibieron vehículo (acetona).

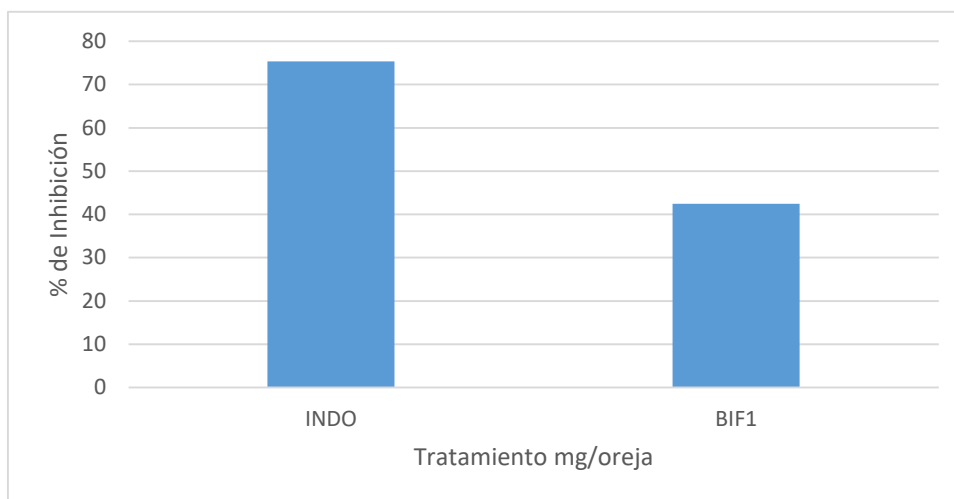
**Tabla 7.** Actividad antiinflamatoria de BIF1 en un modelo de edema auricular en ratón ICR inducido por TPA.

Sustancia	Tiempo (h)	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) promedio $\pm$ EEM	Inhibición del edema (%)
TPA		---	$10.620 \pm 2.564$	-----
BIF1	6	1.0	$6.560 \pm 1.781^*$	$42.45 \pm 1.781$
Indo	6	1.0	$2.620 \pm 0.760^*$	$75.32 \pm 0.760$

Los datos mostrados, indican que la subfracción BIF1 tiene compuestos capaces de inhibir el edema auricular.



**Gráfica 3.** Efecto de la administración local de BIF1 a 1 mg/oreja, sobre el edema (diferencia de peso) inducido con TPA en el pabellón auricular de ratones ICR. INDO: indometacina. Anova post-prueba Dunnett,  $p < 0.05$ .



**Gráfica 4.** Los resultados muestran que BIF1 que contiene una mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D- Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D- Quercetina (2). inhibió el edema en un 42 % a una dosis de 1 mg/oreja. La INDO a una dosis de 1 mg/oreja presentó una inhibición del edema del 75 % inhibición.

## 10.2. Actividad antibacterial del extracto acetona BIAF del fruto de *Bursera linanoe*

El extracto de acetona fruto de *B. linanoe*, demostró tener una mayor actividad antibacterial en el método de concentración mínima inhibitoria (CMI). La evaluación de BIHH, BIAH, BIMH, BIHF, BIAF y BIMF se llevó a cabo a concentraciones de 2.0, 1.0, 0.5 y a 0.25mg/ml. En la (Tabla 8) se muestran que sólo 4 extractos inhibieron el crecimiento bacteriano mediante CMI. El extracto BIAH inhibió el crecimiento bacteriano en SaR a 2.0 mg/ml, BIMH en Sa a 2.0 mg/ml, BIAF en SaR a 2.0, 1.0 mg/ml y en Sa a 2.0, 1.0, 0.5 mg/ml, BIMF en Sa a 0.25 mg/ml. Por otro lado, los extractos BIHH y BIHF no presentaron actividad antibacterial comparada con la gentamicina a una concentración mínima inhibitoria (MIC= Sa y SaR 0.25 mg/ml).



**Tabla 8.** Actividad antibacterial del extracto de acetona (BIAF) de fruto de *Bursera linanoe* contra *Sa* sensible y multirresistente a metilicina, por el método de concentración mínima inhibitoria (mg/ml).

Extracto y/antibacterial	Microorganismos	
	Sa	SaR
BIHH	NP	NP
BIAH	NP	2.0
BIMH	2.0	NP
BIHF	NP	NP
<b>BIAF</b>	2.0, 1.0, 0.5	2.0, 1.0
BIMF	2.0, 1.0, 0.5, 0.25	NP
DMSO	NP	NP
Gentamicina	0.25	0.25

NP: no presento actividad antibacterial

Es importante mencionar que a la fecha no existen reportes de actividad farmacológica y fitoquímica para la especie *Bursera linanoe*. En el presente trabajo el extracto BIAF presentó una mayor inhibición del crecimiento bacterial contra *Sa* sensible y multirresistente a metilicina, por lo que se decidió continuar con el trabajo experimental basado en la separación química y actividad farmacológica de BIAF.

### 10.2. 1. Actividad Antibacterial de la subfracción BIF4, aislada de BIAF

Las subfracciones BIF2, BIF3, BIF4 y BIF5 de *B. linanoe* a concentración de 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 inhibieron el crecimiento bacteriano frente a *Staphylococcus aureus* sensible y multirresistente a meticilina mediante el método de concentración mínima inhibitoria con BIF2 (MIC= Sa 1.0, 2.0 mg/mL), (SaR 1.0, 2.0 mg/mL), BIF3 (MIC= Sa 1.0, 2.0 mg/mL), (SaR 1.0, 2.0 mg/mL), BIF4 (MIC= Sa 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL),(SaR 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) y BIF5 (MIC= Sa 2 mg/mL),( SaR 2 mg/mL) respectivamente (Tabla 9) comparado con la gentamicina a una concentración mínima inhibitoria (MIC= Sa y SaR 0.25 mg/ml). Por otro lado, BIF1 y BIF6 no presentaron actividad antibacterial frente a *Staphylococcus aureus* sensible y multirresistente a meticilina.

**Tabla 9.** Actividad antibacterial de fracciones aisladas de BIAF contra *Sa* sensible y multirresistente a meticilina por el método de concentración mínima inhibitoria (mg/ml).

Fracción y/antibacterial	Microorganismos	
	Sa	SaR
BIF1	NP	NP
<b>BIF2</b>	1.0, 2.0	1.0, 2.0
<b>BIF3</b>	1.0, 2.0	1.0, 2.0
<b>BIF4</b>	2.0, 1.0, 0.5	2.0, 1.0, 0.5, 0.25
<b>BIF5</b>	2.0	2.0
BIF6	NP	NP
DMSO	NP	NP
Gentamicina	0.25	0.25

NP: no presento actividad antibacterial

## 11. DISCUSIÓN

El género *Bursera*, ha generado un gran interés en su estudio, esto ha sido estimulado por su amplia gama de usos medicinales en la medicina tradicional mexicana, por ejemplo, en aplicaciones antiinflamatorias, antirreumáticas y antiulcerosas (Rüdiger et al., 2007). Sin embargo, no ha habido informes farmacológicos que demuestren el efecto antiinflamatorio de *B. linanoe*, aunque su uso medicinal como agente antiinflamatorio está justificado por los antecedentes fitoquímicos y farmacológicos del género *Bursera*. Además, de que los usos medicinales populares que se le atribuyen a sus resinas en preparados como ungüentos para tratamiento de picaduras de escorpiones, con actividad antibacterial y antiinflamatoria y para aliviar diversas dolencias, ha sido reportado por (Junor et al., 2007; Yukawa et al., 2004; Robles et al., 2005). En este trabajo, se demostró que el extracto BIMH, obtenido a partir de las hojas de esta especie, inhibió el edema auricular en ratón ICR inducido por TPA en 58.24 %. Dicho extracto mostró la mayor actividad antiinflamatoria. Este resultado concuerda con el estudio de (Figuroa-Suarez et al., 2019), donde reporta que un extracto de metanol aislado de las partes aéreas de *Bursera cuneata* inhibe el edema en oreja de ratón en un 77.4 %. Otro estudio realizado por (Columba-Palomares et al. 2018), encontraron que un extracto de diclorometano-metanol obtenido de las hojas de *B. copallifera* posee una importante actividad antiinflamatoria este extracto disminuyo el edema en oreja de ratón inducido por TPA en un 55.5 %. Asimismo, el análisis fitoquímico de BIMH, permitió el aislamiento de una mezcla de flavonoides: **(1)** Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D- Kaempherol y **(2)** Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D- Quercetina, estos compuestos no habían sido reportados para el género *Bursera*. Por otro lado, los resultados de actividad antibacterial frente a *Staphylococcus aureus*, demostraron que BIAF, fue el más activo a una concentración de 0.5 mg/ml contra *S. aureos* sensible y a 1 mg/ml contra *S. aureus* resistente a meticilina. (Robles et al. 2005), reporto que un extracto etanólico (160 mg/ml) y fracciones de acetato de etilo (190 mg/ml) de *Bursera graveolens* presentó un efecto inhibitorio frente a *S. aureus*. Es importante señalar que se deben realizar estudios enfocados a comprender los mecanismos de acción del extracto y de los compuestos

obtenidos. Estos datos mostrados en este estudio, apoyan el uso que se le atribuye en medicina tradicional a la especie *Bursera linanoe*.

## 12. CONCLUSIÓN

Nuestro estudio muestra que los extractos orgánicos de hoja de *Bursera linanoe* tienen efecto antiinflamatorio. El presente trabajo describe, por primera vez, la presencia de una mezcla de flavonoides: **(1)** Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D- Kaempherol y **(2)** Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D- Quercetina en la especie de *Bursera linanoe*, así como sus propiedades antiinflamatorias. Por otro lado, los extractos orgánicos del fruto presentaron actividad antibacterial. Los resultados de este estudio validaron el uso de *Bursera linanoe* en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y bacterianas. Experimentos adicionales son necesarios para explicar el proceso y los mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria y antibacterial de *B. linanoe*.

## 13. PERSPECTIVAS

**13.1.** Evaluación de los compuestos puros de Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D- Kaempherol y Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D- Quercetina en el modelo de edema agudo en oreja de ratón inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA).

**13.2.** Aislar los compuestos bioactivos de la subfracción BIF4 responsables de la actividad antibacterial.

#### 14. CITAS BIBLIOGRAFICAS

- Arellano-Ostoa G, González-Bernal S, Arellano-Hernández G, (2015).** *Linaloe (Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski Calderon & Medina), Threatened species with timber and industrial potential: a strategy for its conservation. ***Agro Productividad*** pp. 42-51.
- Andrés-Hernández AR, Espinosa-Organista D, (2002).** Morfología de plántulas de *Bursera Jacq. Ex L.* (Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas. ***Boletín de la Sociedad Botánica de México*** 70:5-12.
- Artaga RB, Aranda ET, Arteaga RM, (2002).** Efectos colaterales de antibióticos. ***Revista de la Sociedad Boliviana Pediatría*** pp. 41.
- Arts RJW, Joosten LAB, Netea MG, (2018).** The Potential Role of Trained immunity in Autoimmune and Autoinflammatory Disorders. ***Frontiers in Immunology*** 9:298.
- Borda and Koff, (1992).** R.S. NSAID. A Profile of Adverse Effects; Hanley and Belfus, Inc Philadelphia, PA, USA.
- Bernal H, Correa J, (1990).** Especies vegetales promisorias de los países. Tomo III. Burseraceae. Editado por la Secretaria Ejecutivas del Convenio Andrés Bello (SECAB).
- Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM, (2014).** Características generales del *Staphylococcus aureus*. ***Revista Latinoamericana Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*** 61:28-40.
- Camarena J.J and Sánchez R, (1995).** Infección por *staphylococcus aureus* resistente a meticilina. ***Control Calidad SEIMC*** 22:128-135.
- Columba-Palomares MC, Villarreal ML, Marquina S, Romero-Estrada A, Rodríguez-López V, Zamilpa AL, Alvarez L, (2018).** Antiproliferative and Anti-inflammatory Acyl Glucosyl Flavones from the Leaves of *Bursera copallifera*. ***Sociedad Química de México*** 62-4.
- Canales-Martínez M, Rivera-Yañez CR, Salas-Oropeza J, López HR, Jimenez-Estrada M, Rosas-Lopez R, Duran DA, Flores C, Hernandez LB, Rodriguez-Monroy MA, (2017).** Antimicrobial Activity of *Bursera morelensis* Ramírez Essential Oil. ***African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*** 14:74-82.
- Carretero ME, López-Pérez JL, Abad MJ, Bermejo P, Tillet S, Israel A, Noguera-PB, (2008).** Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo)Sarg. (Burseraceae) leaves. ***Ethnopharmacology*** 116: 11-15.
- Camarda L, Dayton T, Stefano VD, Pitonzo R, Schillaci D, (2007).** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Some Oleogum Resin Essential Oils From *boswellia* spp. (*burseraceae*). ***Annali di Chimica*** 97:387-884.
- Correa QJE y Bernal HY (1990).** Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello, Tomo III, pp. 67-74.

- Cisneros RA, Martínez EC, Gutiérrez GLS, Álvarez DAL, Habib ERG, (2018). Estandarización de fármacos antiinflamatorios no esteroideos administrados a un modelo murino para evaluación de actividad antiartrítica. *Revista divulgación científica* 4:663-667.
- Colorado JR, Galeano EJ, Martínez AM, (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Revista de la facultad de química farmacéutica* 14: 67-71.
- Figueroa-Suarez MZ, González CJ, Cardoso-Taketa AT, Gutierrez VMC, Rodríguez-Lopez V, (2019). Anti-inflammatory and antihistaminic activity of triterpenoids isolated from *Bursera cuneata* (Schldl.) Engl. *Journal of Ethnopharmacology* 238: 111786.
- García BP, (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España)* 102:91-159.
- García BH (1975). Flora Medicinal de Colombia. *Botánica Médica*, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, Vol II pp. 47-48.
- Girón MWI, (2008). Antimicrobianos. *Revista de Facultad de Ciencias Médicas*.
- González-Costa M, Padrón GAA, (2019). Inflammation from an immunologic perspective: a challenge to medicine in the 21st century. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 18:30-44.
- Gómez EAH, González RNK, Medina JD, (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10:182 – 217.
- Gupta MP (1995). Plantas Medicinales Iberoamericanas, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).pp. 211-214.
- Hernandez-Hernandez JD, Roman-Marin LU, Cerda-Garcia-Rojas CM, Joseph-Nathan Pj, (2005). Verticillane derivatives from *Bursera suntui* and *Bursera kerberi*. *Natural Products* 68:1598.
- Hernández-Pérez E, González-Espinosa M, Trejo I, Bonfil C (2011). Distribution of the genus *Bursera* in Morelos state Mexico and its relation to climate. *Revista Mexicana Biodiversidad* 82:964–976.
- Herrera WEV (2014).Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica* 43:2261- 2265.
- Junor G, Porter RBR, Facey PC, Yee TH, (2007). Investigation of Essential Oil Extracts from Four Native Jamaican Species of *Bursera* for Antibacterial Activity. *West Indian Medical Journal* 56:22-25.
- Kong C, Hui-min N, Nathan S, (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins* 72:2-21.
- Kim K, Brar P, Jakubowski J, Kaltman S, Lopez E, (2008). The use of corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory medication for the management of pain and inflammation after third molar surgery: A review of the literatura. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* 107:630-640.

- Luján-Hidalgo** MC, Gutiérrez-Miceli FA, Ventura Canseco LMC, Dendooven L, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez S, García-Barradas O, Abud Archilla M, (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of *Bursera graveolens* and *Taxodium mucronatum* essential oils from Chiapas, México. *Gayana Botánica* 69:7-14.
- Lowy** FD, (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine* 339:520-532.
- Morse** Z, Tump A, Kevelham E, (2006) Ibuprofen as a pre-emptive analgesic is as effective as rofecoxib for mandibular third molar surgery. *Odontology* 94:59-63.
- Müller** S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianci ME, (2001). The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *The EMBO Journal* 20: 4337-40.
- Mrtínez-Elizalde** KS, Rodríguez-Monroy MA, Flores CM, Hernandez-portilla LB, Barbosa-Cabrera E, Canales-Martínez, M, (2018). Comparison of Biological Properties of Two Medicinal Extracts of the Tehuacan-Cuicatlan Valley. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* pages 9.
- Marcotullio** MC, Curini M, Becerra JX, (2018). An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera* spp. *Molecules* 23:1-20.
- Manzano** SP, Miranda M, Gutiérrez Y, García G, Orellana T, Orellana A, (2009). Antinflammatory effect and chemical composition of *Bursera graveolens* Triana & Planch. branch oil (palo santo) from Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14:45-53.
- Mayer** FL, Wilson D, Hube B, (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4:119-128.
- Morejon** M, Salup R, Cue M, (2003). Actualización en Tetraciclinas. *Revista cubana de farmacia* 37(3).
- Merriman** JA, Schlievert PM, (2014). Are we close to a vaccination against *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology* 9:717–720.
- Monina** RK, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S , Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK, (2007). Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *American Medical Association* 298:1763-1771.
- Noge** K, Shimizu N, Becerra JX, (2010). (R)- (-)-Linalyl Acetate and (S)-(-)-Germacrene D from the Leaves of Mexican *Bursera linanoe*. *Natural Product Communications* 5:351 – 354.
- Nathan** C, (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846 - 852.
- Noguera** B, López-Pérez JL, San Feliciano, Días E, García MV, Israel EA, (2006). Actividad antiinflamatoria de la metil- $\beta$ -peltatina A aislada de la hoja de la sp. *Bursera simaruba* (L.) sarg. (*Burseraceae*). *Revista Facultad de Farmacia* 69:28-33.

- Okeke** IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, Pablos MA, Klugman KP (2005). Resistencia a los antimicrobianos en los países en desarrollo: tendencias recientes y estado actual. *Lancet Infectious Diseases* 5:481-493.
- Kotra** L, Haddad J, Mobashery S, (2000). Aminoglycosides: Perspective on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(12): 3249-3256.
- Organización Mundial de la Salud, 2017. Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos Manual para la Primera fase de Implementación. Disponible en Línea: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/253135/9789243549408-spa.pdf?sequence=1> (Acceso 4 de Noviembre de 2019).
- Pérez** AA (2012). Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroideos. *Unidad de Digestivo Agencia Sanitaria Costa del Sol*. 4-5.
- Pérez** RAA, López MMA, Grau LI, (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana Estomatología* 39:1-9.
- Pektas** ZO, Sener M, Bayram B, Eroglu T, Bozdogan N, Donmez A, (2007). comparison of pre-emptive analgesic efficacy of diflunisal and lornoxicam for postoperative pain management: a prospective, randomized, single-blind, crossover study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 36:123-7.
- Perea-Martínez** A, López-Navarrete G, Osa-Busto M, Reyes-Gómez U, (2016). Antiinflamatorios no esteroideos y sus aplicaciones terapéuticas. *Boletín Clínico de Hospital Infantil del Estado de Sonora* 33:73-82.
- Peters** CM, Purata SE, Chibnik M, Brosi BJ, Lopez AM, Ambrosio M, (2003). The life and Times of *Bursera glabrifolia* (H. B. K.) Engl. In Mexico: A Parable for Ethnobotany. *Economic Botany* 57:431-441.
- Queiroga** CL, Duarte MCT, Ribeiro BB, Magalhães PM, (2007). Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia* 78: 327-328.
- Quintana** HG, Díaz SM, Taboada VW, Ortiz TJ, (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana* 16:39-45.
- Renda** G, Zurro M, Romano M, De Caterina R, (2010). Aspirin-triggered lipoxin in patients treated with aspirin and selective vs. Nonselective COX-2 inhibitors. *British Journal of Clinical Pharmacology* 69:303 - 306.
- Robles** J, Torrenegra R, Gray AI, Piñeros C, Ortiz L, Sierra M, (2005). Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15: 283-286.

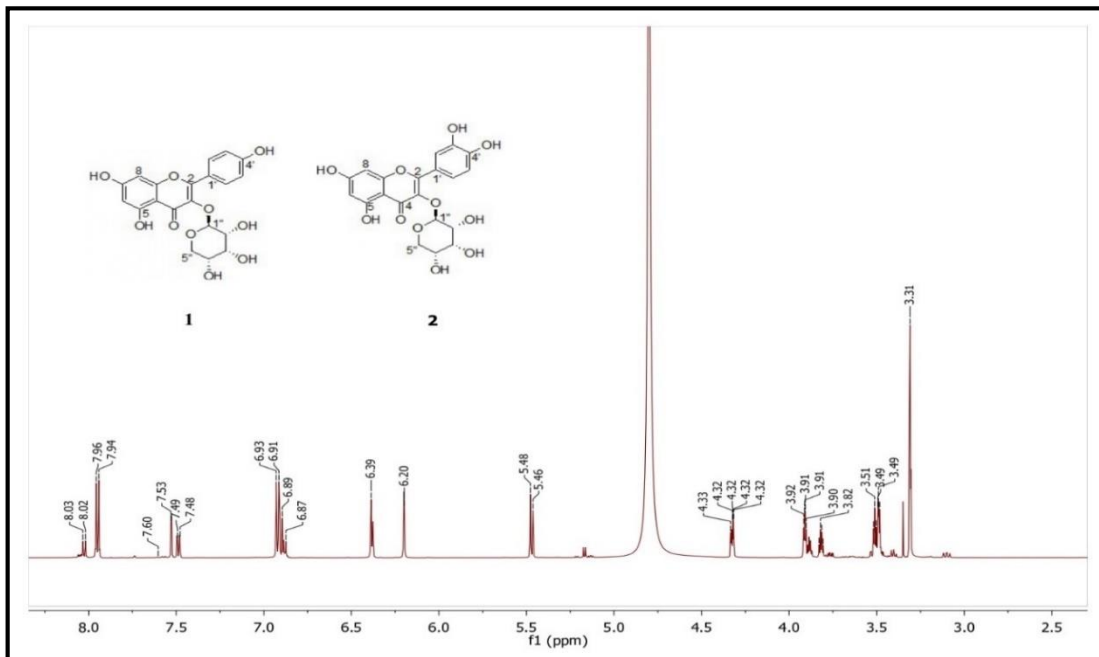


- Rzedowski J, Medina LR, Calderón GR, (2005).** Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera*. *Acta Botánica Mexicana* 70:85-111.
- Rzedowski J, Kruse H, (1979).** Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon* 28:103-116.
- Robbins y Cotran, (2010).** Patología estructural y funcional. Capítulo: Inflamación aguda y crónica. 8va edición. *Elsevier España* 47-116.
- Rudiger AL, Siani AC, Junior VV, (2007).** The chemistry and pharmacology of the South America genus Protium Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy reviews* 1: 93–104.
- Salinas-Sánchez, Herrera-Ruiz M, Pérez S, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, (2012).** Anti-inflammatory Activity of Hautriwaic Acid Isolated from *Dodonaea viscosa* Leaves. *Molecules* 17, 4292-4299.
- Sutterwalla F, Ogura Y, Flavell R, (2007).** The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 82: 259-264.
- Villa-Ruano N, Becerra-Martínez E, Cruz-Durán R, Jose Alejo Zarate-Reyes JA, Landeta-Cortés G, Romero-Arenas O, (2018).** Volatile Profiling, Insecticidal, Antibacterial and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Bursera glabrifolia* Leaves. *Chemistry Biodiversity*15:2-8.
- Vega RGB (2008).** Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 51: 220-222.
- Weiss U (2002)** Nature insight: Inflammation. *Nature* 420: 845.
- Yukawa C, Iwabuchi H, Kamikawa T, Komemushi S, Sawabe A, (2004).** Terpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 565–570.
- Zúñiga B, Guevara-Fefer P, Herrera J, Contreras JL, Velasco L, Pérez FJ, Esquivel B, (2005).** Chemical Composition and Anti-Inflammatory activity of the Volatile Fractions from the bark of Eight Mexican *Bursera* Species. *Planta Medica* 71:825-828.
- Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto Padilla MY, (2014).** Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica* 25:129-143.

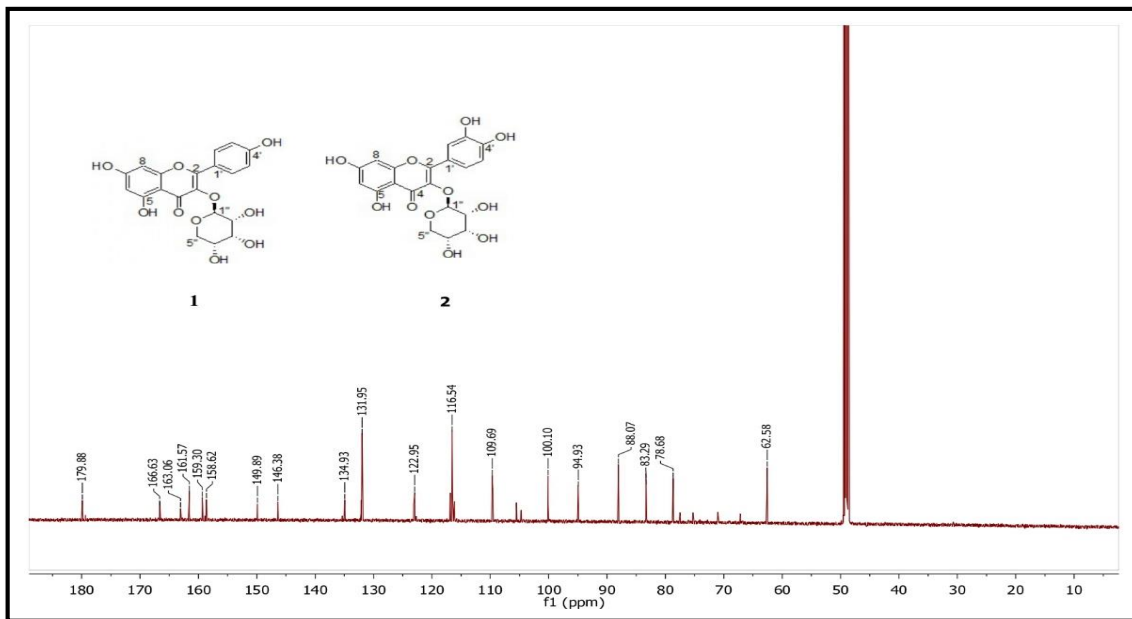
## 15. ANEXOS



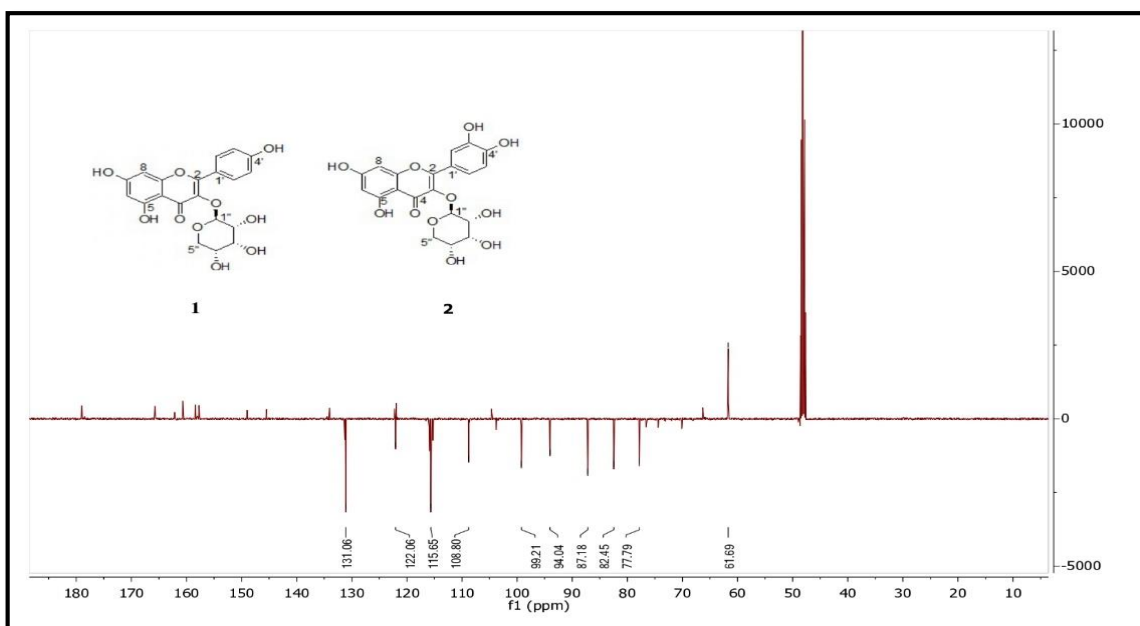
**Anexo a.** Planta *Bursera linanoe* colectada en Zontecomatlán municipio de Ominá (Guerrero, México) y una muestra del espécimen fue depositada en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM).



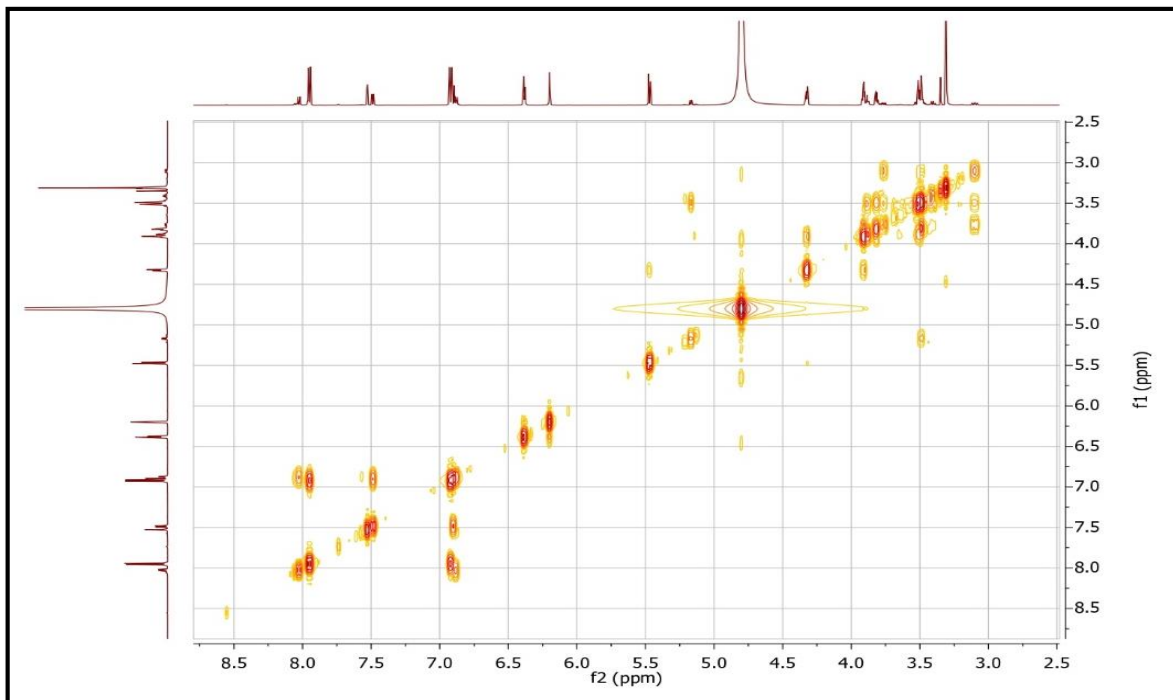
**Anexo b.** RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) de la mezcla de Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Kaempferol (1) y Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Quercetina (2).



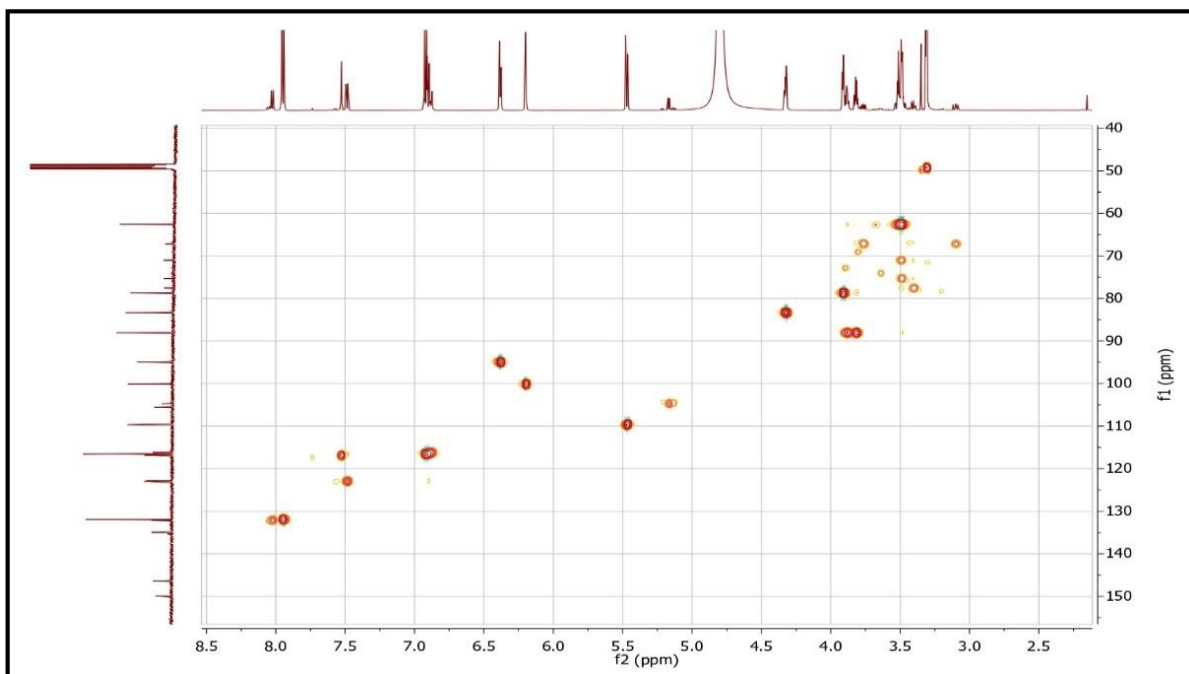
**Anexo c.** RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D-Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D-Quercetina (2).



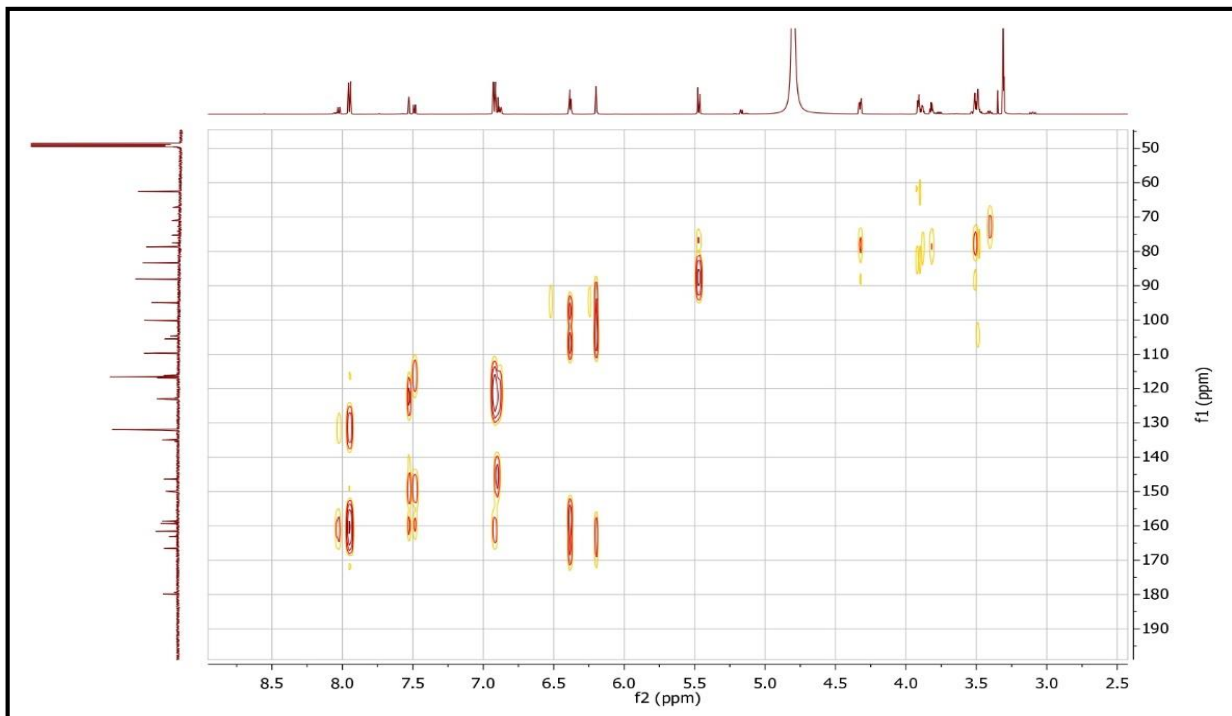
**Anexo d.** RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) de la mezcla de Ribopiranosido 3-O-β-D-Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O-β-D-Quercetina (2).



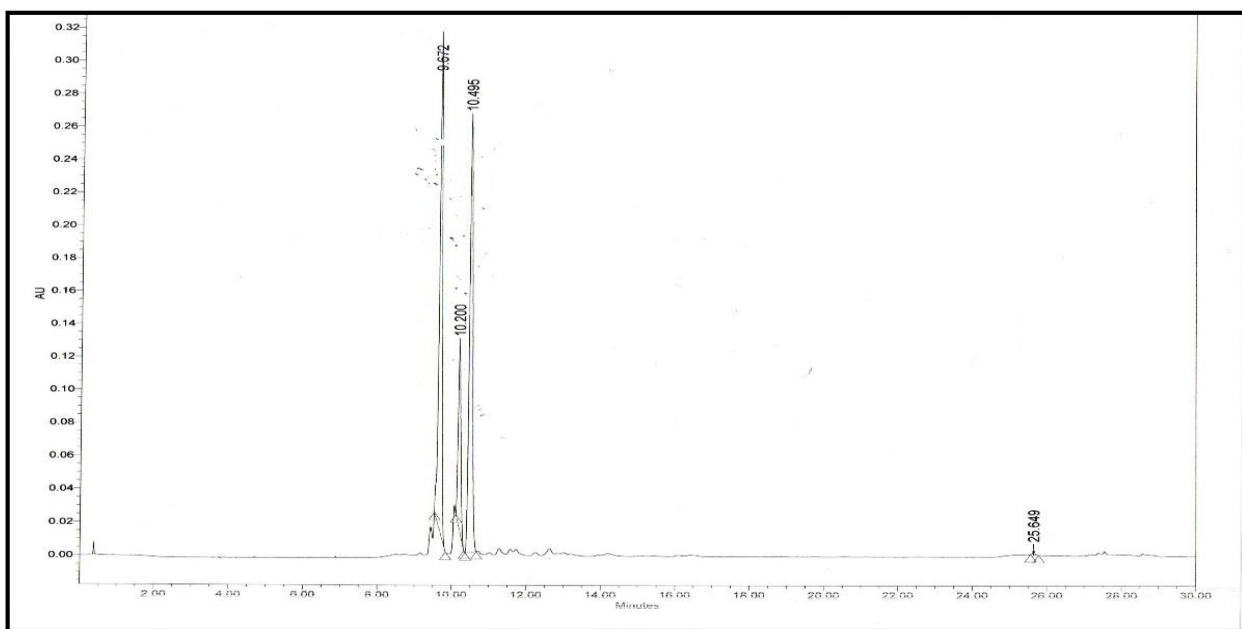
**Anexo e.** RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  y 600 MHz de la mezcla de Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Quercetina (2).



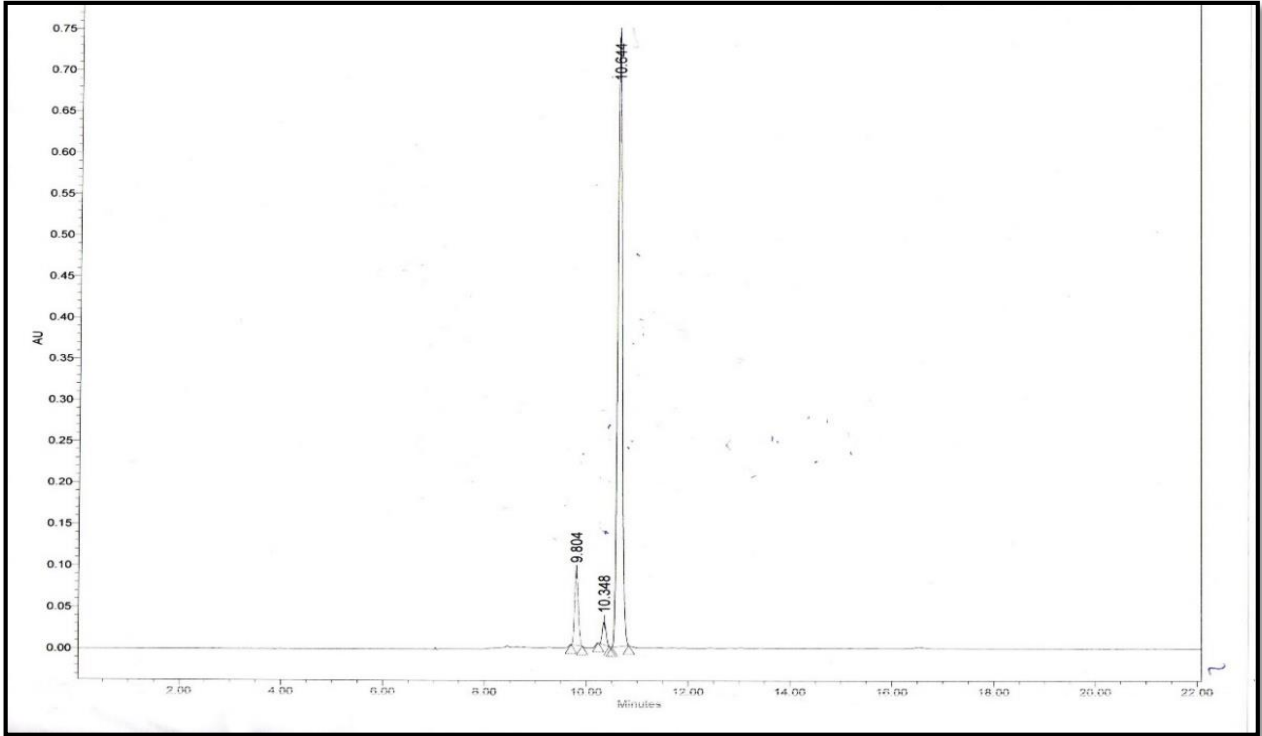
**Anexo f.** RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de la mezcla de Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Quercetina (2).



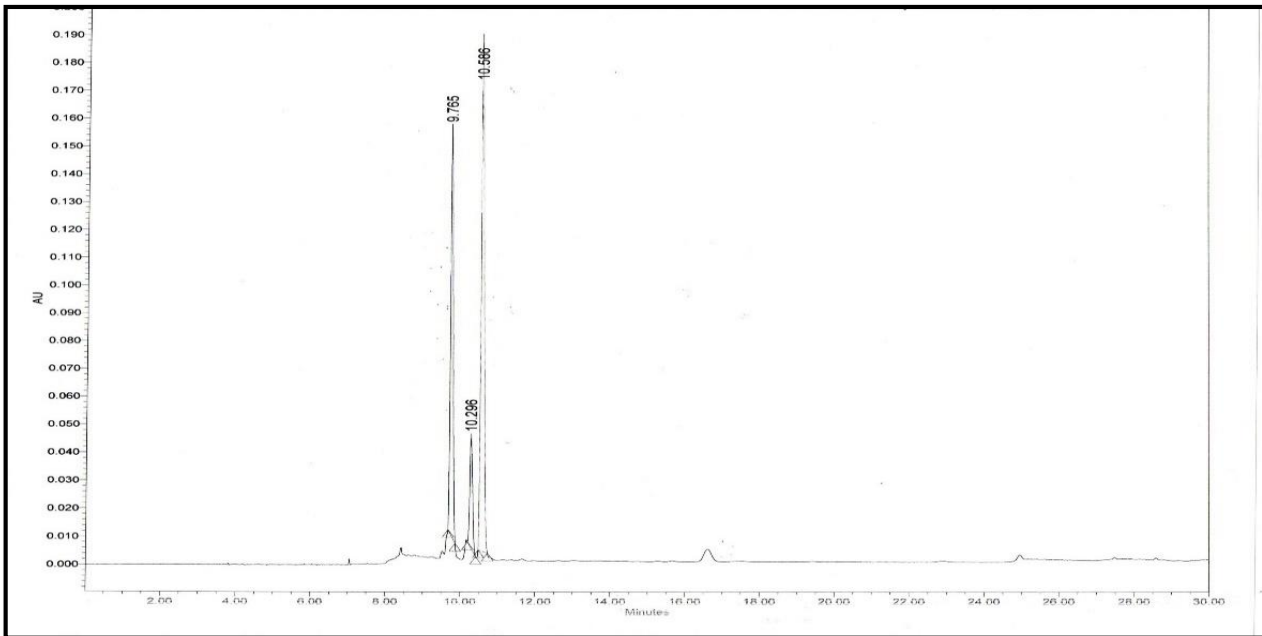
**Anexo g.** RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC) en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de la mezcla de Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Kaempherol (1) y Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Quercetina (2).



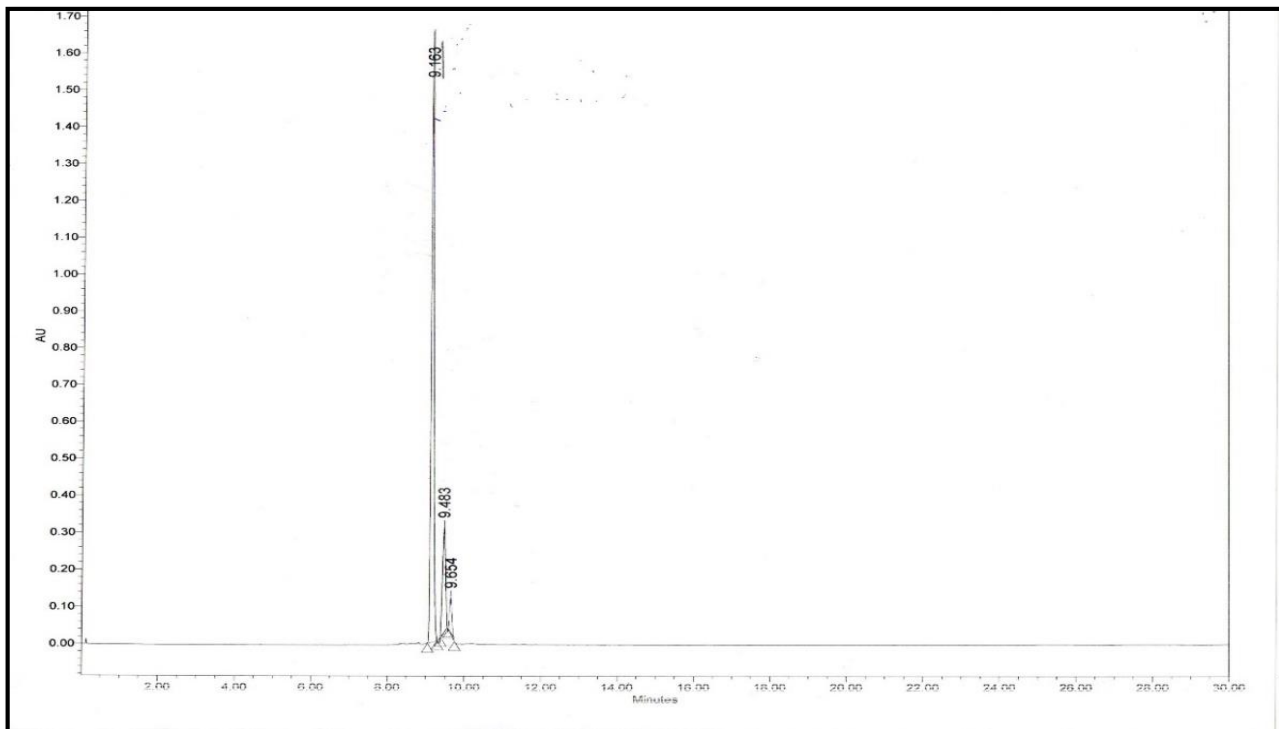
**Anexo h.** Cromatograma de HPLC de la subfracción BIF1.



**Anexo i.** Cromatograma de HPLC de la subfracción C1R-17 - Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Kaempherol (1)



**Anexo j.** Cromatograma de HPLC de la subfracción F10 (Mezcla de 1 y 2).



**Anexo k.** Cromatograma de HPLC de la subfracción C1-R23- Ribopiranosido 3-O- $\beta$ -D-Quercetina (2).