



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**  
**ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**  
**Maestría en Química**

**Estudio químico de la resina de *Bursera fagaroides* y de los tallos  
de *Bursera morelensis***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN QUÍMICA**

PRESENTA:

**RENÉ VELÁZQUEZ JIMÉNEZ**

**ASESORES:** Dr. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA

Dr. CARLOS M. CERDA-GARCÍA-ROJAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Área Académica de Química

Mtro. Julio César Leines Medécigo  
Director de Administración Escolar de la  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
P r e s e n t e

Estimado Maestro:

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante de la Maestría en Química **René Velázquez Jiménez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Estudio químico de la resina de *Bursera fagaroides* y de los tallos de *Bursera morelensis***", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

SECRETARIO: Dra. Susana Rojas Lima

VOCAL: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

SUPLENTE: Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"  
Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 10 de enero de 2011.

  
M. en C. Octavio Castillo Acosta  
Director del ICBI



El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Química Orgánica y Productos Naturales, del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de los Doctores. J. Jesús Martín Torres Valencia (CIQ-UAEH) y Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas (CINVESTAV-IPN), con recursos del proyecto CONACYT “Estudio químico Biodirigido de especies medicinales del Estado de Hidalgo para la obtención de principios activos anticancerosos y antiinflamatorios” (ref. U2-80555).

Esta tesis de maestría generó una participación en un Congreso:

“Triterpenos de *Bursera morelensis*”, Velázquez Jiménez R., Torres-Valencia J.M., Hernández-Hernández J.D., Cerda-García-Rojas C. y Joseph-Nathan P. Presentado en la Sexta Reunión de la Asociación Mexicana de Química, Toluca, Edo. de México. Del 28 al 30 de Abril de 2010. Memorias de la Sexta Reunión de la Asociación Mexicana de Química, pág. 83.

---

# Agradecimientos

Con respeto y gran admiración a mis asesores el **Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia** y **Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas** por brindarme su gran apoyo y dirección para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros que me brindaron su apoyo en todo momento y principalmente por su gran amistad “muchas gracias”: Laura Adriana, Inés, Jesús, Mario, Luis Felipe y Alejandro.

A los miembros del jurado por sus acertadas observaciones durante la revisión para la elaboración de este trabajo, a la **Dra. Susana Rojas Lima**, **Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas**, el

**Dr. José Roberto Villagómez Ibarra y el Dr. J. Jesús Martín  
Torres Valencia.**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la  
beca del programa de Maestría (Núm.:225823).

---

---

# Dedicatorias

A Dios por darme la fuerza para cumplir esta meta tan importante en mi vida.

A las personas que más amo en la vida a mi esposa **Marycarmen** y a mi Hija **Abril** por apoyarme en todo momento y sobre todo por amarme.

A **MIS PADRES** por estar en todos momentos que necesitaba de ustedes, por enseñarme a ser alguien en la vida y por su paciencia.

A mis hermanos **Alma, César, Édgar y L. Enrique** por su apoyo, consejos, por estar siempre a mi lado y sobre todo por el gran amor que nos tenemos.

A todos mis familiares por brindarme su apoyo para alcanzar esta meta.

---

---

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.	i
RESUMEN.	1
RESUMEN DE ESTRUCTURAS.	2
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Importancia de los productos naturales en la medicina actual.	4
1.2 Definición y clasificación de lignanos.	8
1.3. Lignanos con actividad biológica.	10
1.4 Configuración absoluta.	
1.4.1 Importancia.	11
1.4.2 Dicroísmo circular vibracional.	11
2. ANTECEDENTES.	
2.1 Descripción del género <i>Bursera</i> .	13
2.1.1 <i>Bursera fagaroides</i> .	15
2.1.2 <i>Bursera morelensis</i> .	16
2.2 Estudios químicos de especies de <i>Bursera</i> .	
2.2.1 Triterpenos obtenidos de especies de <i>Bursera</i> .	17
2.2.2 Lignanos de especies de <i>Bursera</i> .	18
2.2.3 Flavonoides en el género <i>Bursera</i> .	19
3. OBJETIVOS.	21
4. JUSTIFICACIÓN.	22
5. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.	
5.1 Colecta de fuente vegetal.	23
5.2 Obtención del extracto de la resina de <i>B. fagaroides</i> .	23
5.3 Separación cromatográfica de extracto etanólico de <i>B. fagaroides</i> .	23
5.4 Obtención del extracto de la resina de <i>B. morelensis</i> .	47
5.5 Separación cromatográfica del extracto hexánico de <i>B. morelensis</i> .	47

5.6 Separación cromatográfica del extracto de AcOEt de <i>B. morelensis</i> .	68
5.6.1 Separación de la parte insoluble en AcOEt.	68
5.6.2 Separación de la parte soluble en AcOEt.	69
5.7 Determinación de la configuración absoluta mediante Dicroísmo Circular Vibracional.	75
6. CONCLUSIONES.	82
7. PARTE EXPERIMENTAL	83
8. BIBLIOGRAFÍA.	93
9. ANEXOS.	96

---

---

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotación específica
Ac	Grupo acetilo
APT	Attached proton test (experimento de carbonos unidos directamente a hidrógenos)
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
Cin	Grupo cinnamoilo
cm	Centímetros
COSY	Correlation spectroscopy (Espectroscopía de correlación)
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Doble
DCV	Dicroísmo circular vibracional
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
Et	Grupo etilo
g	Gramos
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (correlación heteronuclear a distancia múltiple de enlaces)
Hz	Hertz
IR	Espectro de infrarrojo

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

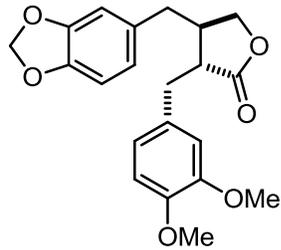
$J$	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
K	Grados Kelvin
L	Litro
MHz	Megahertz
Me	Grupo metilo
mL	Militros
mV	miliVoltios
°C	Grados celsius
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
$R_f$	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
t	Señal triple
td	Señal triple de dobles
T	Temperatura
UV	Ultravioleta
$\Delta\varepsilon$	Diferencia de absortividad molar
$\Delta E$	Diferencia de entalpía
$\Delta G$	Diferencia de la energía libre de Gibbs

## **RESUMEN**

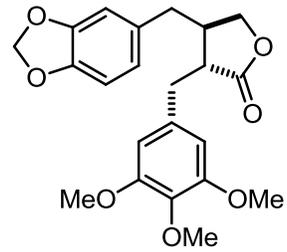
De la resina de *Bursera fagaroides* se aislaron los compuestos (-)-8'-desmetoxyateina (**1**), (-)-yateina (**2**), (-)-deoxipodofilotoxina (**3**), (-)-8'-desmetoxideoxipodofilotoxina (**4**) y (-)-*ent*-kaurenol (**5**). De los tallos de *Bursera morelensis* se obtuvieron (-)-limoneno (**6**), betulonal (**7**), ácido betulónico (**8**), eufol (**9**), acetato de  $\alpha$ -amirina (**10**), acetato de  $\beta$ -amirina (**11**),  $\beta$ -sitosterol (**12**), (+)-tetrahidroxiescualeno (**13**) y (-)-naringenina (**14**). Las sustancias se identificaron mediante espectroscopía de RMN en 1D y 2D, así como por comparación con datos descritos.

Adicionalmente, se adquirió comercialmente la podofilotoxina (**15**) de la cual se preparó su derivado acetilado (**16**). El compuesto **15** sirvió como referencia para caracterizar a los lignanos **1-4** y determinar su configuración absoluta, mediante dicroísmo circular vibracional (DCV).

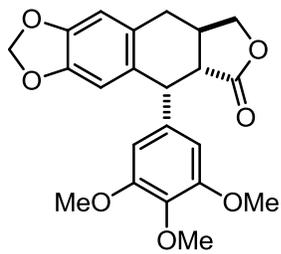
# RESUMEN DE ESTRUCTURAS



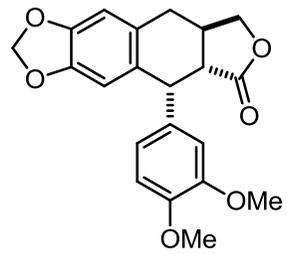
1



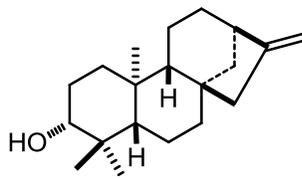
2



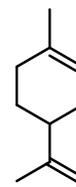
3



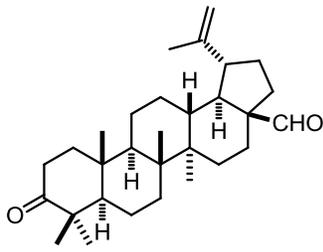
4



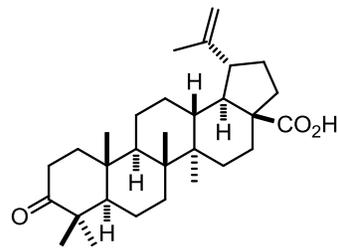
5



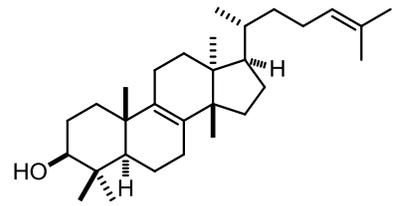
6



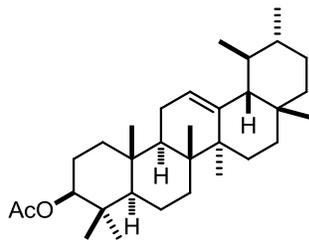
7



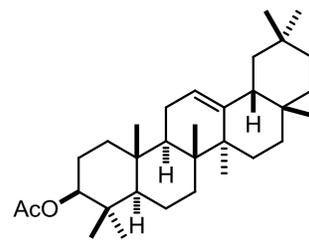
8



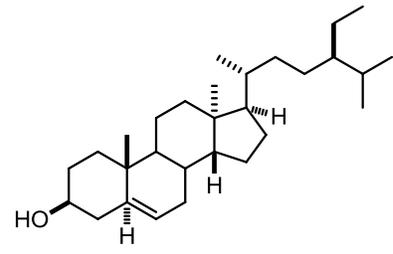
9



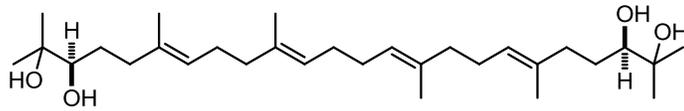
10



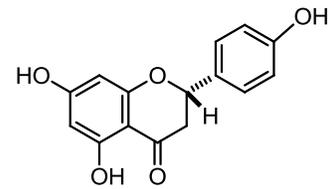
11



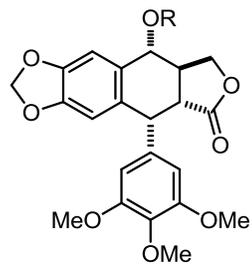
12



13



14



15. R= H  
16. R= Ac

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Importancia de los productos naturales en la medicina actual.

Un fármaco o principio activo se define como una sustancia pura, químicamente definida, extraída de una fuente natural o sintetizada en el laboratorio, dotada de una acción biológica, que puede ser aprovechada por sus efectos terapéuticos. Los productos naturales han sido la fuente principal de principios activos por siglos<sup>1</sup>; desde épocas muy antiguas diversas culturas adquirieron información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su medio ambiente que utilizaban para el tratamiento de diversas enfermedades.

Los compuestos que se encuentran en la naturaleza y que podemos aislar y procesar en el laboratorio se conocen como productos naturales. Este término se utiliza para referirse a los compuestos orgánicos de distribución limitada y específica que generalmente corresponden a metabolitos secundarios. En la medicina actual los productos naturales son una fuente para una amplia variedad de fármacos. Como ejemplos relevantes podemos mencionar a la bleomicina A2 (**17**), la daunorrubicina (**18**), la doxorrubicina (**19**), la vinblastina (**20**), la vincristina (**21**) y el paclitaxel (**22**) (Figura 1) que son empleados con éxito en el tratamiento del cáncer.

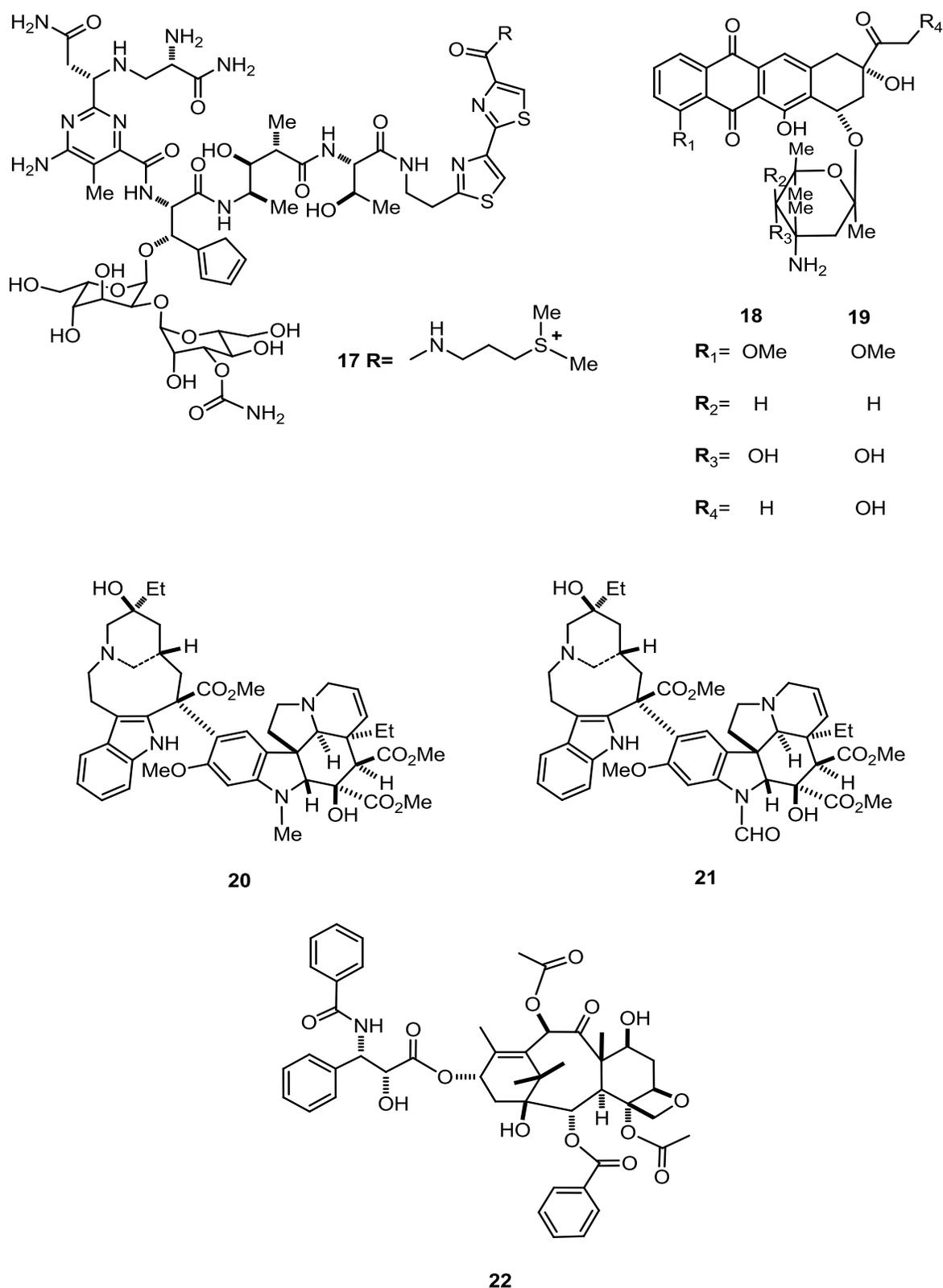
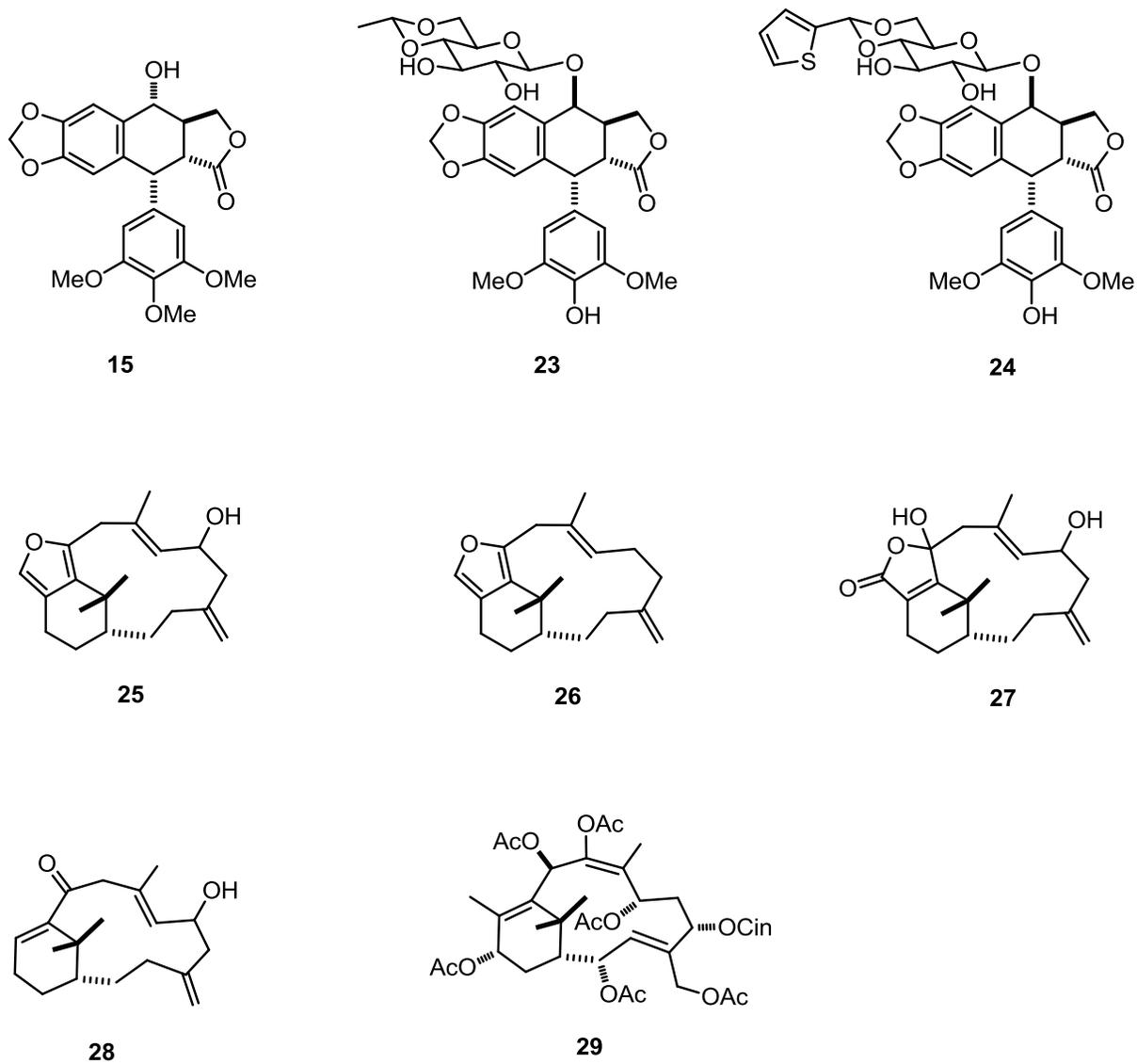


Figura 1. Principios activos anticancerígenos.

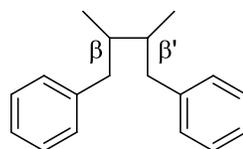
Los productos naturales pueden ser modificados químicamente para mejorar sus propiedades farmacológicas, tal es el caso de la podofilotoxina **15** (Figura 2), un ariltetralinlignano aislado de *Podophyllum hexandrum* y *P. peltatum*<sup>2</sup>, que ha sido utilizado como precursor de drogas anticancerígenas semisintéticas como el etopósido (**23**) y el tenipósido (**24**)<sup>3</sup> (Figura 2). También se puede mencionar a las cespitularinas A (**25**), B (**26**), C (**27**) y E (**28**), que son moléculas tipo verticilenos obtenidos del coral *Cespitularia hypotentaculata*. La cespitularina C (**27**) presenta una potente citotoxicidad contra células de leucemia linfocítica murina P-388 y células de cáncer de pulmón A549.<sup>4</sup> Del árbol japonés *Taxus cuspidata* también se han aislado un gran número de taxanos y verticilenos funcionalizados como la taxuspina X (**29**), la cual actúa como un agente potente que revierte la resistencia a múltiples fármacos antitumorales en células cancerígenas.<sup>5</sup>



**Figura 2.** Principios activos anticancerígenos.

## 1.2 Definición y clasificación de lignanos.

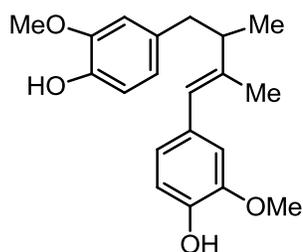
Los lignanos son una extensa clase de metabolitos secundarios encontrados ampliamente en el reino de las plantas caracterizados por la dimerización de dos unidades  $C_6C_3$  unidos  $\beta$ - $\beta'$  en la cadena lateral (Figura 3). El término lignano fue introducido por Harworth, biogénicamente se derivan de la fenilalanina y la tirosina, las cuales a su vez se generan mediante la ruta del ácido shikímico.<sup>6</sup>



**Figura 3.** Fenilpropanos sencillos con un enlace  $\beta$ - $\beta'$ .

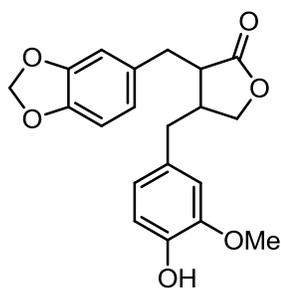
Los lignanos propiamente dichos, dependiendo de las cadenas laterales, se pueden dividir en cinco grupos de estructuras fundamentales<sup>6</sup>:

- a) **Diaril butanos:** cuando las cadenas laterales no están sustituidas como en el caso del ácido guayarético (**30**).

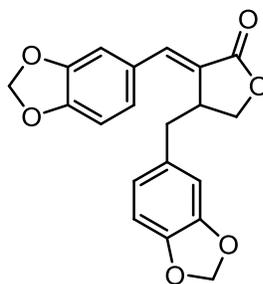


**30**

- b) **Butirolactonas:** una de las cadenas es un ácido carboxílico y la otra un alcohol que al deshidratarse forman una lactona, pueden ser saturadas como la 5-metoxi-isoyateína (**31**) o insaturadas como el caso de chaerofilina (**32**).

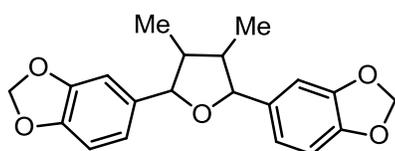


**31**

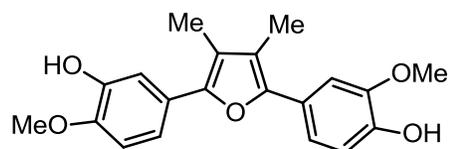


**32**

- c) **Furanos y Furanoides:** pueden ser saturados como la galbacina (**33**) e insaturados como la furoguayacina (**34**).

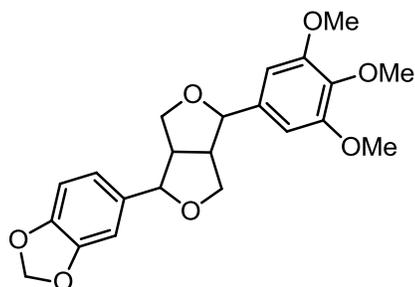


**33**



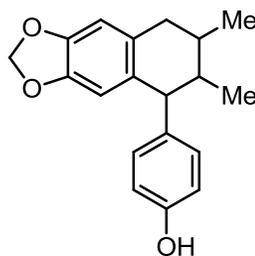
**34**

- d) **Furofuranos** o **Difuranos**: formados por dimerización oxidativa de dos moléculas de alcohol coniferílico, tal es el caso de aschantina (**35**).



35

- e) **Ariltetrahidronaftalenos (Tetralinas)**: la formación de otro enlace carbono-carbono, lo que da lugar a un nuevo anillo, como el caso de atenuol (**36**).



36

### 1.3 Lignan con actividad biológica.

Algunos lignanos como la desmetoxiyateina (**1**), yateina (**2**), deoxipodofilotoxina (**3**) y desmetoxiyateina (**4**)<sup>7-8</sup> han sido aislados de especies de *Bursera*, como *B. schlechtendalii* y *B. morelensis*. Se considera que estos metabolitos son precursores biosintéticos de la podofilotoxina (**6**), la cual es una sustancia con importante

actividad citotóxica, que ha sido modificada para mejorar sus propiedades farmacológicas. Tal es el caso del etopósido (**23**) y el tenipósido (**24**)<sup>3</sup> (Figura 2), que muestran actividad terapéutica notable en algunas neoplasias del ser humano. La podofilotoxina estabiliza los microtúbulos formados de tubulina para inhibir su polimerización, impidiendo la división celular.<sup>6</sup>

### **1.4 Configuración absoluta.**

#### **1.4.1 Definición e importancia.**

La configuración absoluta define la estructura tridimensional exacta de una molécula que tiene uno o más centros estereogénicos. En moléculas que presenten alguna actividad biológica, nos permite comprender cómo se lleva a cabo la interacción entre el compuesto en estudio y el sitio activo de una enzima o proteína. En la actualidad existen diferentes métodos para la determinación de la configuración absoluta:

- Difracción de rayos-X.
- RMN usando agentes derivatizantes quirales.
- Correlación química.
- Dicroísmo circular vibracional (DCV).

La metodología de DCV, en combinación con el modelado molecular de un compuesto, nos permite establecer su configuración absoluta.

### **1.4.2 Dicroísmo Circular Vibracional.**

El dicroísmo circular vibracional es una herramienta muy reciente que nos permite asignar la configuración absoluta de una molécula. Esta técnica espectroscópica utiliza una radiación infrarroja que es absorbida por un compuesto quiral produciendo cambios en las vibraciones moleculares de los grupos funcionales. Para conocer la configuración de un compuesto quiral se construye el modelo molecular y se hace una búsqueda y un análisis de sus conformeros principales. De aquellos mínimos energéticos se calculan los espectros de DCV. Los espectros de DCV resultantes se suman para obtener el espectro de DCV teórico. El espectro de DCV experimental y el teórico se comparan para asignar la configuración absoluta. El DCV es una técnica que se empieza a utilizar con mucho éxito para determinar la configuración absoluta de metabolitos secundarios de origen vegetal, por ejemplo los diterpenos tipo verticileno.<sup>9</sup>

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Descripción del género *Bursera*.

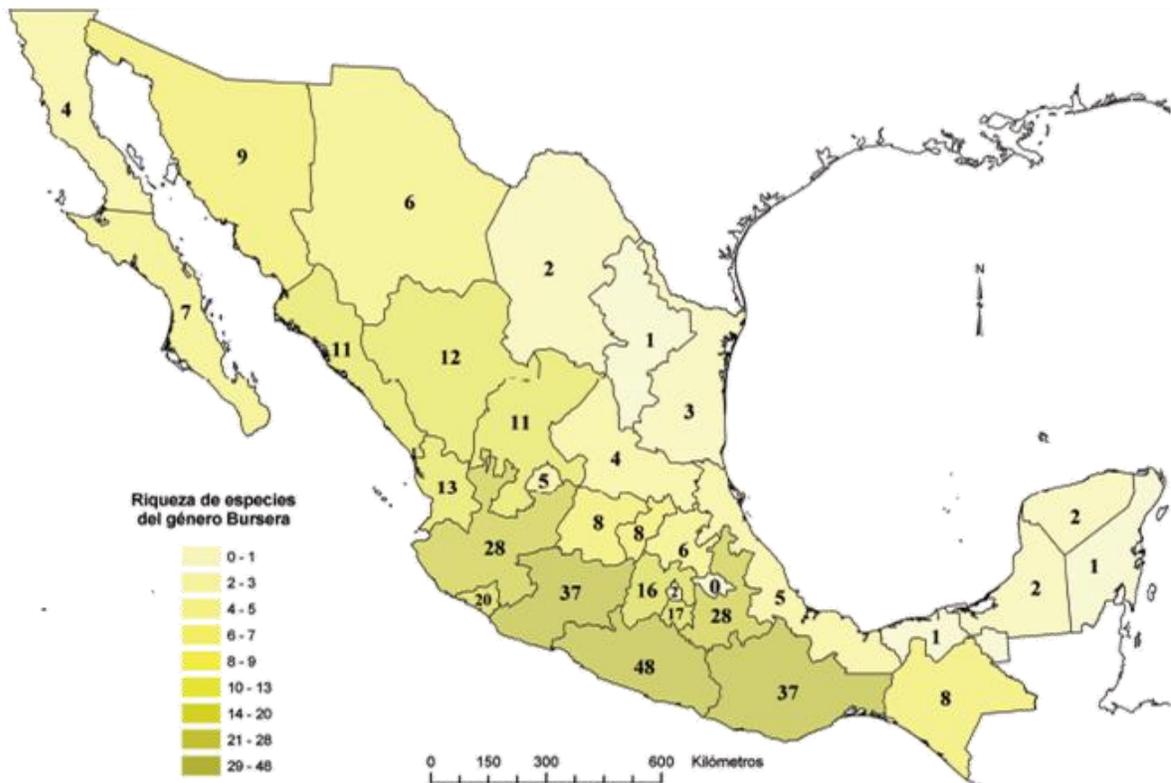
En el estado de Hidalgo se han estimado unas 460 especies medicinales cuya composición química es desconocida en la mayoría de los casos. De estas especies vegetales, al menos 42 se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer y la inflamación, entre ellas algunas especies de *Bursera*. Las plantas de *Bursera* son árboles o arbustos, algunos de ellos muy aromáticos y exudan un látex o resina, el género *Bursera* se dividen en dos secciones<sup>11</sup>: la sección *Bursera* que es la que comprende a las especies que se caracterizan por su exfoliación que presenta su corteza conocidas tradicionalmente como “cuajotes” (Figura 4) y la *Bullockia* que comprende a las especies que no exfolian conocidas como “copales” (Figura 5). Estas plantas crecen en gran parte de la República Mexicana distribuidas principalmente en áreas de altitud media y alta en los bosques tropicales caducifolios de la vertiente del Pacífico, encontrando su mayor biodiversidad y abundancia en los Estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Jalisco<sup>11</sup> (Figura 6).



**Figura 5.** *Bursera* no exfoliante.



**Figura 4.** *Bursera* exfoliante.



**Figura 6.** Distribución de plantas del género *Bursera* en el territorio mexicano.

El género *Bursera* tiene una importancia cultural en nuestro país, pues aún en la actualidad, los zinacantecos utilizan a *B. excelsa*, *B. bipinnata* y *B. tomentosa* como incienso<sup>12</sup>, mientras que Mayas modernos emplean a *B. simaruba* con fines medicinales principalmente contra la tos, para tratar enfermedades intestinales, del tracto respiratorio, así como cicatrizantes y endurecedores de encías. Diversas especies tienen importancia económica debido a que su madera es blanda y blanca, lo que hace ser muy apreciada para la elaboración de artesanías.

### 2.1.1 *Bursera fagaroides*.



**Figura 7.** Corteza, flor y fruto de *B. fagaroides*.

Arbusto o árbol dioico, de 0.5 a 8 m de alto, glabro, ramillas jóvenes con abundante resina transparente, ligeramente aromática; hojas imparipinnadas, menos frecuente trifolioladas, peciolo de 0.5 a 2(3) cm de largo, raquis con alas inconspicuas, foliolos (1)5 a 11(13), flores masculinas pentámeras, femeninas trímeras, pétalos verdosos a blanquecinos-amarillentos, fruto trivalvado, ovoide a subesferico, rojizo, glabro, de 0.5 a 0.8 cm de largo; tronco de hasta 30 cm de diámetro, corteza exfoliante, amarilla a amarilla-grisácea<sup>11</sup>.

Habita en el matorral xerófilo y en el bosque tropical caducifolio, en suelos diversos, en altitudes de 700 a 2200 m y florece de abril a junio. Permanece sin follaje de noviembre a mayo. Se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Oaxaca en México.

2.1.2 *Bursera morelensis*.



Figura 8. Corteza y flor de *B. morelensis*.

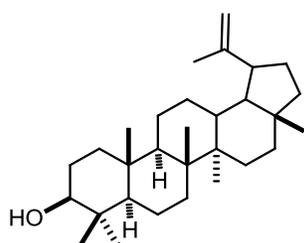
Árbol dioico, de 3 a 10 m de alto, con resina aceitosa abundante, aromática, tronco de hasta 40 cm de diámetro, corteza rojiza exfoliante en láminas delgadas, ramas jóvenes y maduras glabras; catafilos inconspicuos, hojas imparipinnadas, de 5 a 11 cm de largo y 1.5 a 4.5 de ancho, peciolo acanalado, raquis inconspicuamente alado, foliolos sésiles, flores masculinas pentámeras dispuestas en inflorescencias, pétalos amarillentos, verdosos o blanquecinos, fruto trivalvado, oblicuamente ovoide, de 5 a 8 cm de largo y de 4 a 6 cm de ancho<sup>11</sup>.

Habitante muy vistoso por su corteza de color rojizo intenso, frecuentemente y algunas veces dominante del bosque tropical caducifolio, en diferentes partes de sustrato, en altitudes de 500 a 1500 m. La especie es muy abundante en los parajes de la porción oriental de la cuenca del Balsas, sobre todo en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla.

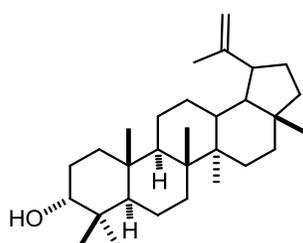
## 2.2 Estudios químicos del género *Bursera*.

### 2.2.1 Triterpenos obtenidos de especies de *Bursera*.

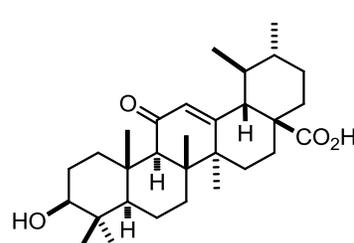
Los estudios químicos de las resinas de algunas especies han evidenciado la presencia de triterpenos con esqueleto hidrocarbonado tipo lupano, ursano y oleanano, que han mostrado actividad antiartrítica y antiinflamatoria<sup>13</sup>. De las resinas de *B. graveolens* se aislaron el lupeol (**37**) y el 3-epi-lupeol (**38**)<sup>14</sup>, de *B. delpechiana*, el ácido 11-oxo-ursólico (**39**), ácido 11-oxo-acetil ursólico (**40**) y sus ésteres metílicos (**41**) y (**42**)<sup>15</sup>, mientras que de *B. simaruba* el derivado tipo lupano lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,23-diol (**43**)<sup>16</sup>.



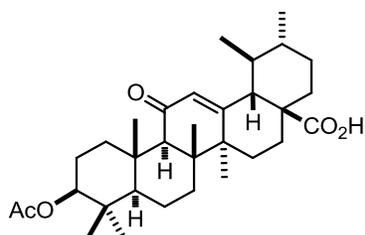
37



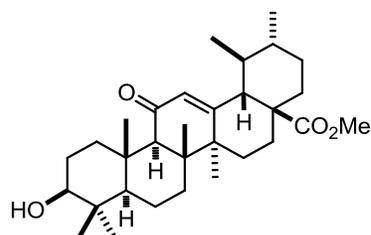
38



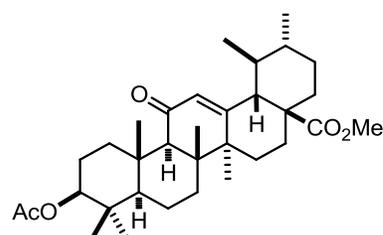
39



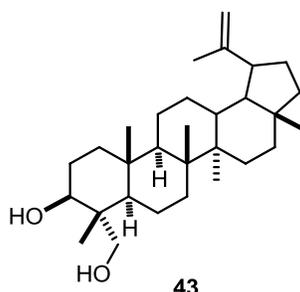
40



41



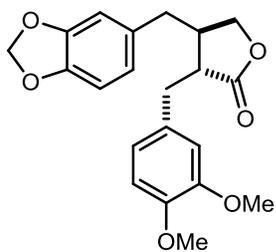
42



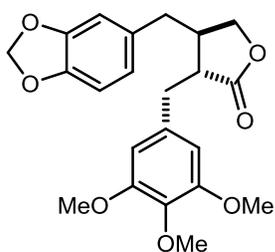
43

## 2.2.2 Lignanos obtenidos de especies de *Bursera*.

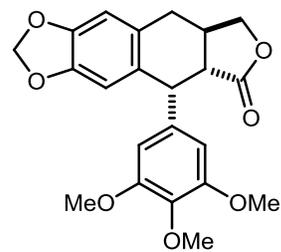
Se ha reportado la presencia de compuestos aromáticos con esqueleto fenólicos tipo lignano, los cuales han mostrado actividad citotóxica importante. Entre los compuestos que contiene las especies de *Bursera*, como *B. permollis*, *B. schlechtentalii*, *B. morelensis*, *B. simaruba*, *B. fagaroides* y *B. graveolenses*, se encuentran los lignanos como la desmetoxyateina (1), yateina (2), deoxipodofilotoxina (3),  $\beta$ -metil éter peltatina (44), burseranina (45) y picropoligamaina (46)<sup>7,8,14,17</sup>.



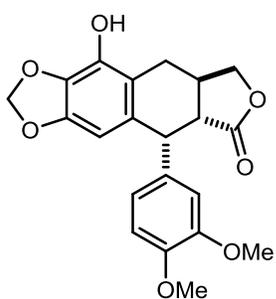
1



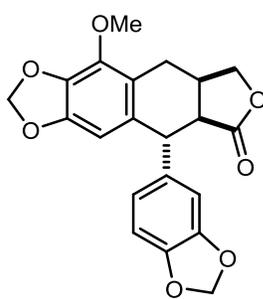
2



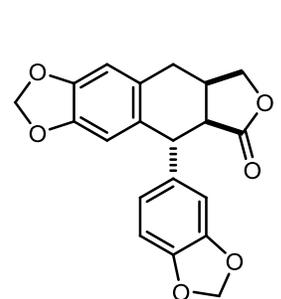
3



44



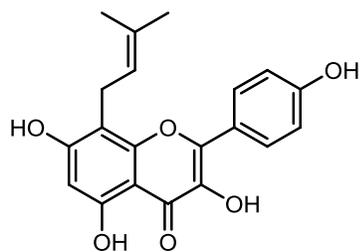
45



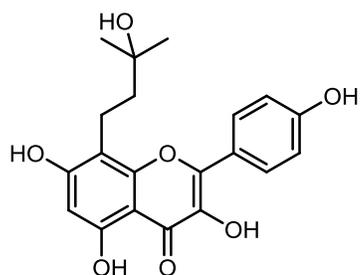
46

### 2.2.3 Flavonoides obtenidos de especies de *Bursera*.

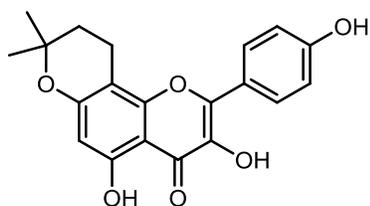
En *B. leptophloeos* también se han identificado diversos compuestos con esqueleto de flavonoide<sup>18</sup> como la desmetilicaritina (**47**), la aglicona de amurensina (**48**),  $\beta$ -anhidroicaritina (**49**) y felamuretina (**50**)<sup>19</sup>.



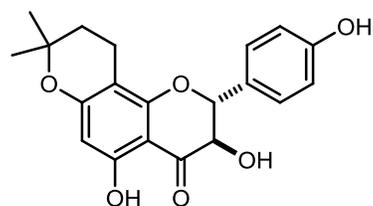
47



48

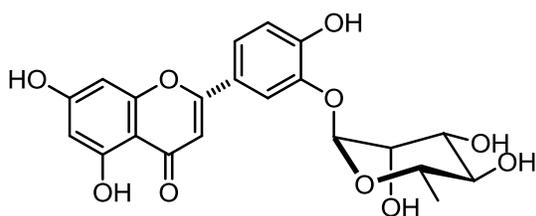


49

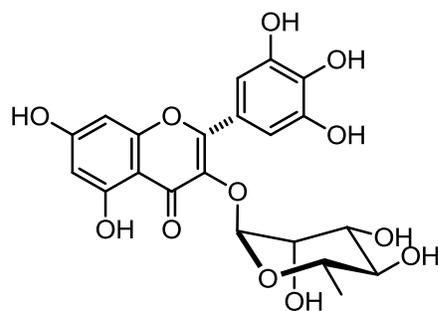


50

De las hojas de *B. fagaroides* var. *elongata* se aisló el 3'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido de luteolina (**51**) y 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido de miricetina (**52**)<sup>20</sup> se aisló de *B. ariensis*, *B. biflora*, *B. bipinata*, *B. excelsa* y *B. hintonii*.



51



52

### 3. OBJETIVOS.

- Llevar a cabo el estudio químico de *Bursera fagaroides* y *Bursera morelensis*.
- Aislar y caracterizar las sustancias presentes en los extractos de mayor polaridad de tallos y resinas de estas especies.
- Determinar la configuración absoluta de algunos compuestos selectos aislados de *B. fagaroides* y *B. morelensis* mediante Dicroísmo Circular Vibracional.
- Contribuir al conocimiento de sustancias naturales con posible actividad citotóxica.

## 4. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el año 2008 se registraron en México 539,530 defunciones, de las cuales 55.7% sucedieron en hombres y 44.3% en mujeres. Los tumores malignos ocuparon el tercer lugar en la lista de principales causas de defunción en el país; por dicha causa fallecieron 67,046 personas, cuyo volumen representa 12.4 % de defunciones registradas en el año (INEGI 2010)<sup>20</sup>.

Aunque en la actualidad se cuenta con diversos fármacos para el control de dichos padecimientos, es bien conocido que se siguen teniendo serias desventajas en cuanto a reacciones colaterales adversas (toxicidad), a la baja eficacia de las drogas y al elevado costo de los tratamientos. El estudio químico y biológico de especies de *Bursera* puede conducir a la obtención de principios con actividad anticancerígena y antiinflamatoria relevante y que en un futuro pudiesen ser utilizados para el tratamiento de estas enfermedades.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 Colecta de fuentes vegetales.

Se llevó a cabo la colecta de resinas de la especie *Bursera fagaroides* y de tallos de la especie *Bursera morelensis* en el estado de Guerrero en julio de 2009. Un espécimen se preparó y se envió al Herbario del Instituto de Ecología A. C., Centro Regional del Bajío, en Pátzcuaro, Mich. para su identificación botánica por parte del Prof. Jerzy Rzedowski.

### 5.2 Obtención de extracto de la resina de *Bursera fagaroides*.

Las resinas (64 g) fueron pulverizadas en un mortero, después se colocaron a reflujo con etanol (250 mL) por 4 h. Posteriormente el extracto se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener 46 g una miel de color amarillo.

### 5.3 Separación cromatográfica del extracto etanólico de la resina de *Bursera fagaroides*.

Una alícuota del extracto de EtOH (1.2 g) se sometió a separación mediante cromatografía en columna (CC), empleando gel de sílice y como eluyentes mezclas de hexano-AcOEt (4:1, 7:3, 1:1), AcOEt y MeOH. Se colectaron eluatos de 20 mL para obtener un total de 84 fracciones, las cuales se analizaron mediante CCF para su agrupación. La purificación de las fracciones 16-21 (27.6 mg) mediante

cromatografía en columna (CC), condujo a la obtención de un polvo blanco (7.3 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 49.2$  ( $c$  0.59,  $\text{CHCl}_3$ ) y un p.f. 157-159 °C. Este compuesto se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos<sup>21</sup> como (-)-*ent*-kaurenol (**5**). En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9, Tabla 1) presentó entre sus señales más significativas, dos simples anchas en  $\delta$  4.79 y 4.73 ppm características de un metileno exocíclico que fueron asignadas a los protones H-17 y H17', en  $\delta$  3.20 ppm una señal doble de dobles ( $J=10.5, 5.4$  Hz) característica de un protón base de OH que se asignó a H-3, una señal simple ancha en  $\delta$  2.64 ppm correspondiente al protón alílico H-13, en  $\delta$  1.84 ppm una señal doble de triples ( $J=13.2, 3.6$  Hz) correspondiente al protón H-1. A frecuencias bajas se observaron tres señales simples en  $\delta$  1.02, 0.98 y 0.78 ppm, que integraron para 3 protones cada una, y que se asignaron a los metilos 20, 18 y 19, respectivamente. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10, Tabla 1), se observaron 20 señales, entre ellas las más significativas en  $\delta$  155.8 y  $\delta$  102.9 ppm que se asignaron al doble enlace exocíclico C-16 y C-17, una señal característica de carbono base de oxígeno en  $\delta$  79.0 ppm que se asignó a C-3. A frecuencias bajas se observó el resto de las señales características de los carbonos  $\text{sp}^3$  de un diterpeno tipo kaureno.

En su espectro de infrarrojo (Anexos), la absorción característica de OH se apreció en  $3310\text{ cm}^{-1}$  y la banda de C=C en  $1655\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de masa se observó el ión molecular  $[\text{M}]^+$  288 con una intensidad del 10.5 %.

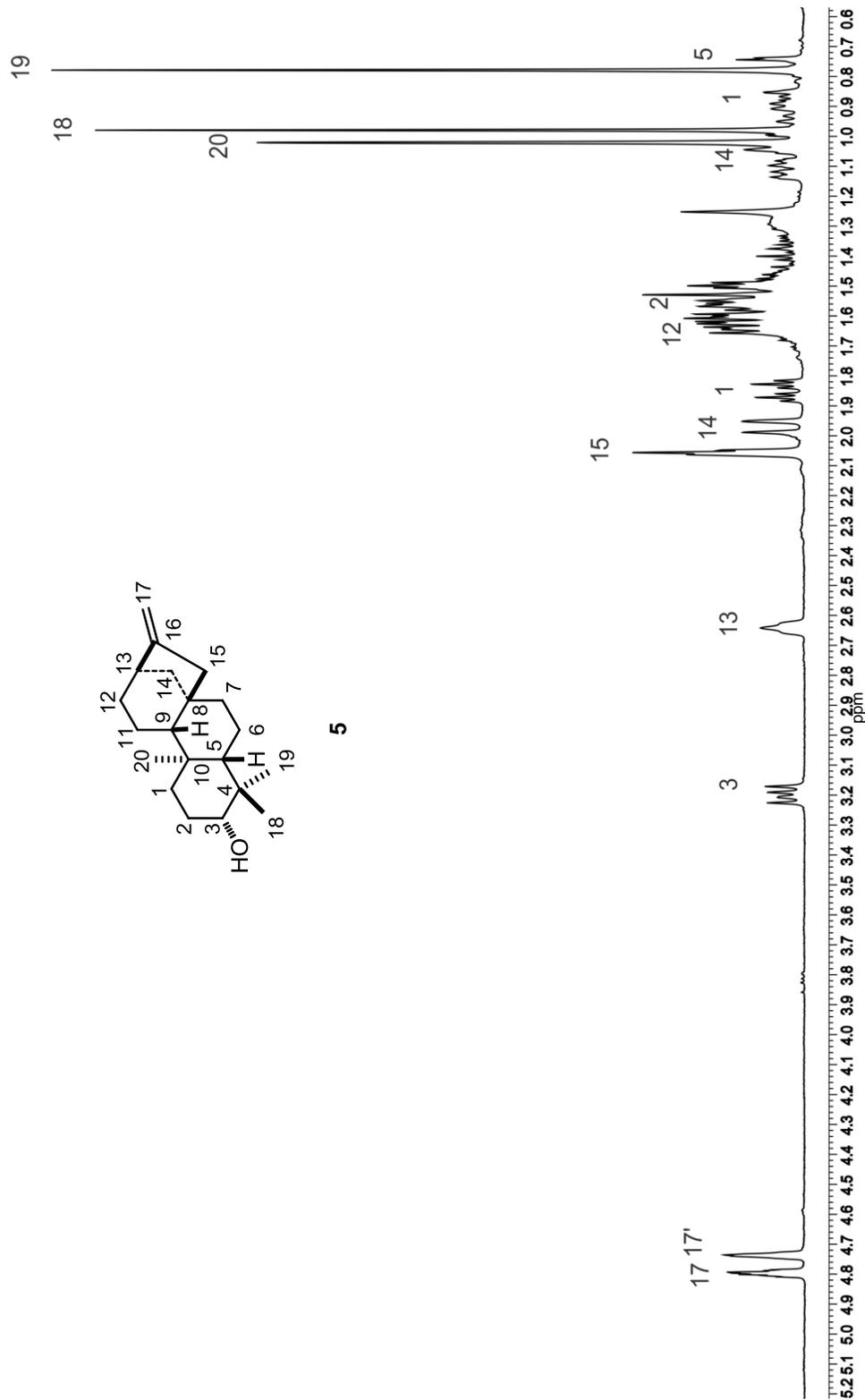


Figura 9. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) del (-)-ent-kaurenol (5) en CDCl<sub>3</sub>.

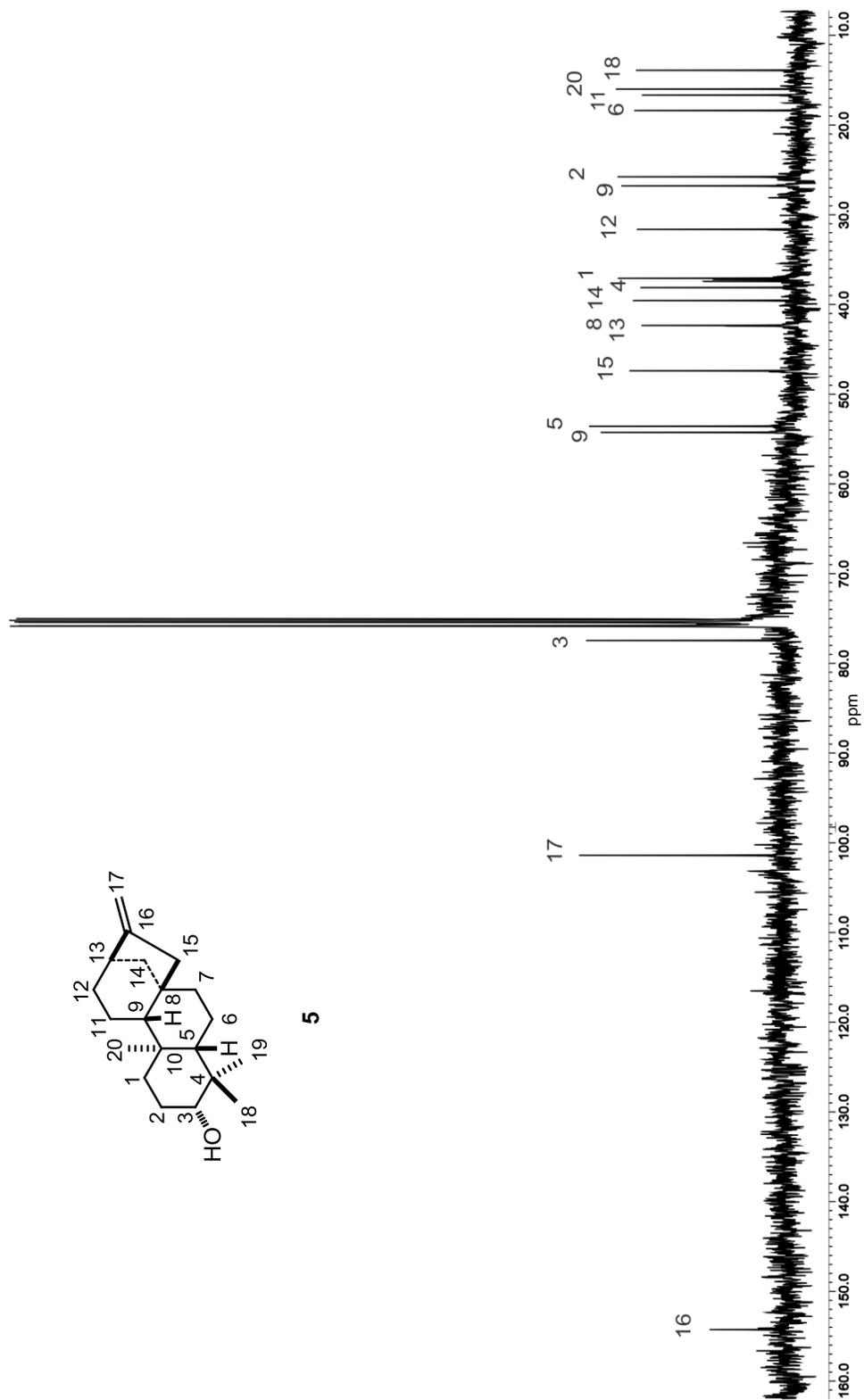


Figura 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) del (-)-ent-kaurenol (5) en  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabla 1.** Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz) de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz y 75 MHz) del compuesto **5**.

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	0.89 ( <i>m</i> ) 1.84 ( <i>dt</i> , 13.2, 3.6)	38.6
2	1.62 ( <i>m</i> )	27.3
3	3.20 ( <i>dd</i> , 10.5, 5.4)	79.0
4	-----	38.8
5	0.75 ( <i>d</i> , 1.9)	55.1
6	1.38 ( <i>m</i> ) 1.57 ( <i>m</i> )	19.9
7	1.51 ( <i>m</i> )	41.1
8	-----	43.9
9	1.03 ( <i>m</i> )	55.8
10	-----	39.0
11	1.59 ( <i>m</i> )	18.2
12	1.48 ( <i>m</i> ) 1.64 ( <i>m</i> )	33.2
13	2.64 ( <i>br s</i> )	43.9
14	1.97 ( <i>br d</i> ) 1.10 ( <i>m</i> )	39.6
15	2.06 ( <i>m</i> )	48.9
16	-----	155.8
17	4.73 ( <i>br s</i> ) 4.79 ( <i>br s</i> )	102.9
18	0.98 ( <i>s</i> )	28.3
19	0.78 ( <i>s</i> )	15.4
20	1.02 ( <i>s</i> )	17.5

Las fracciones 44-53 (121.7 mg) se recromatografiaron en gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de hexano-AcOEt (4:1 y 1:1) y AcOEt. De la fracción 20 se obtuvieron 10 mg (0.83%) en forma de una miel transparente que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 33.1$  (c 1.1,  $\text{CHCl}_3$ ) y que se caracterizó como la (-)-8'-desmetoxyateina (**1**), con base en los siguientes datos espectroscópicos. En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 11, Tabla 2) se apreció una señal en  $\delta$  6.79 ppm ( $J=8.0$  Hz) para el protón H-8', en  $\delta$  6.70 ppm una señal doble de dobles ( $J=7.7$  y 0.6 Hz) correspondiente a H-9', una señal doble ( $J=9$  Hz) en  $\delta$  6.69 ppm asignada para H-8, en  $\delta$  6.67 ppm una señal doble ( $J=1.9$  Hz) correspondiente al protón H-5', una señal doble ( $J=1.6$  Hz) en  $\delta$  6.46 ppm para H-5, en  $\delta$  6.44 ppm una señal doble de dobles ( $J=9.3$  y 1.6 Hz) correspondiente al protón H-9. En  $\delta$  5.94 y 5.93 ppm se apreciaron dos señales dobles ( $J=1.2$  Hz) características del grupo metilendioxi (H-10), una señal doble de doble en  $\delta$  4.11 ppm ( $J=12.0, 8.0$  Hz) correspondiente al protón H-1 $\alpha$ . En  $\delta$  3.92 ppm se apreció una señal doble de dobles ( $J=10.0$  y 8.8 Hz) que se asignó al protón H-1 $\beta$  y dos señales simples en  $\delta$  3.86 y  $\delta$  3.84 ppm que integraron para 3 protones cada una y que correspondieron a los MeO en C-6' y C-7', respectivamente. En  $\delta$  2.98 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J=14.0$  y 4.9 Hz) que se asignó a H-3 $\alpha$  y en  $\delta$  2.90 ppm una señal doble de dobles ( $J=14.0$  y 6.6 Hz) asignada al protón H-3 $\beta$ . A frecuencias bajas se observaron señales múltiples entre  $\delta$  2.60 y 2.40 ppm correspondientes a los protones H-3, H-2 y H-2'.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 12, Tabla 3) se observaron 21 señales, entre ellas la señal en  $\delta$  178.6 ppm característica de un carbonilo de lactona asignada a C-1', 4

señales típicas de carbonos aromáticos base de oxígeno en  $\delta$  149.0, 147.9, 147.9 y 146.3 ppm correspondientes a C-6', C-7', C-6 y C-7 respectivamente, 8 señales características de carbonos aromáticos entre  $\delta$  130.1 y 111.0 ppm para el resto de los carbonos de los dos anillos aromáticos, en  $\delta$  101.0 ppm la señal para C-10 del grupo metilendioxi y en  $\delta$  71.1 ppm una señal base de lactona correspondiente a C-1. En  $\delta$  55.8 y 55.7 ppm se apreciaron los carbonos de OMe en C-6'y C-7', respectivamente.

En su espectro de infrarrojo (Anexos), se observaron las bandas de absorción correspondientes al C=O en  $1767\text{ cm}^{-1}$  característica de lactona y C=C de aromático se observó en  $1607\text{ cm}^{-1}$ . En cuanto a su espectro de masa, el ión molecular  $[M]^+$  se observó en 370 con una intensidad del 57.6 %.

Este compuesto se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos<sup>7, 22</sup>, como (-)-8'-desmetoxyateina (**1**).

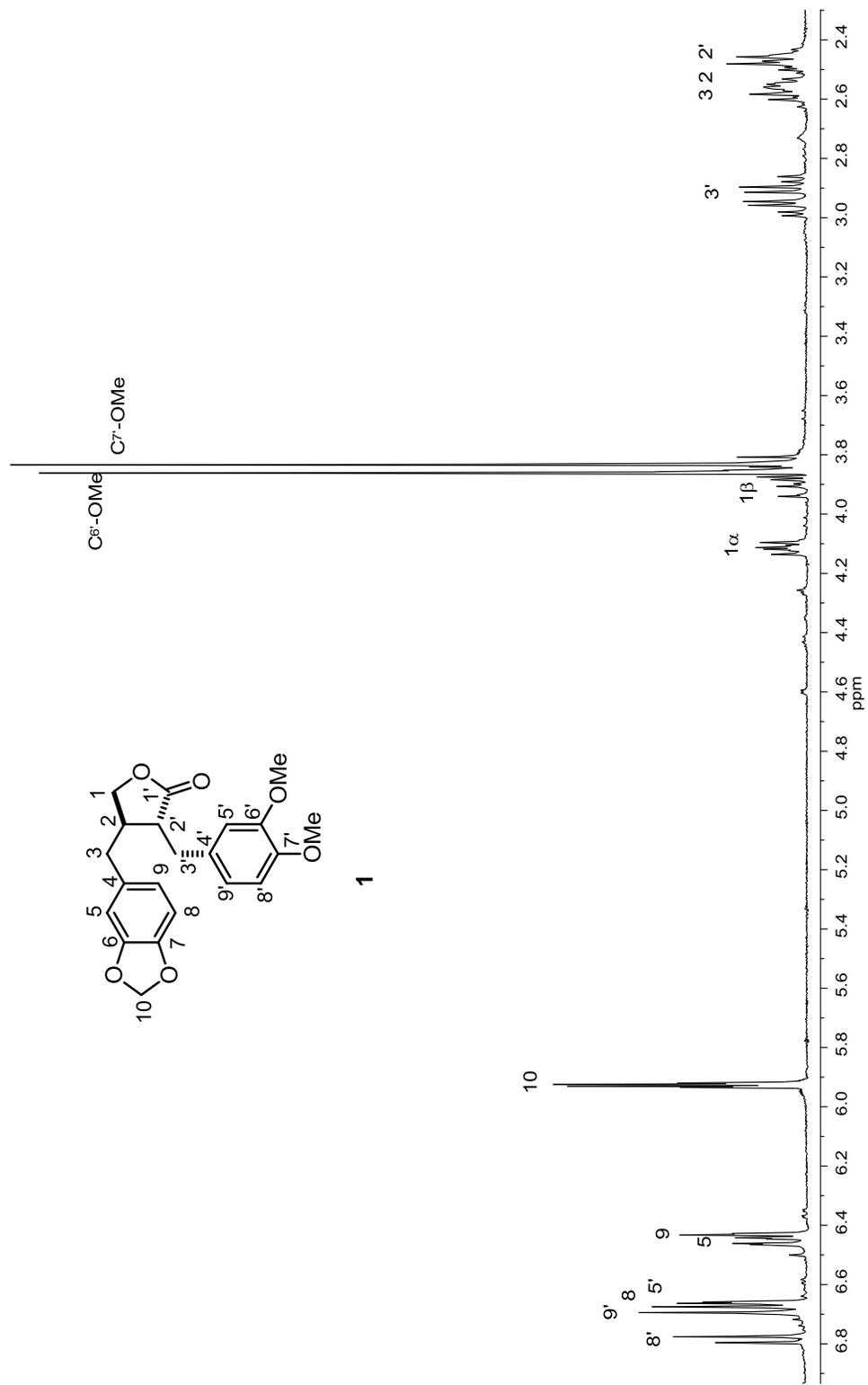


Figura 11. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) de la (-)-8'-desmetoxyateina (1) en CDCl<sub>3</sub>.

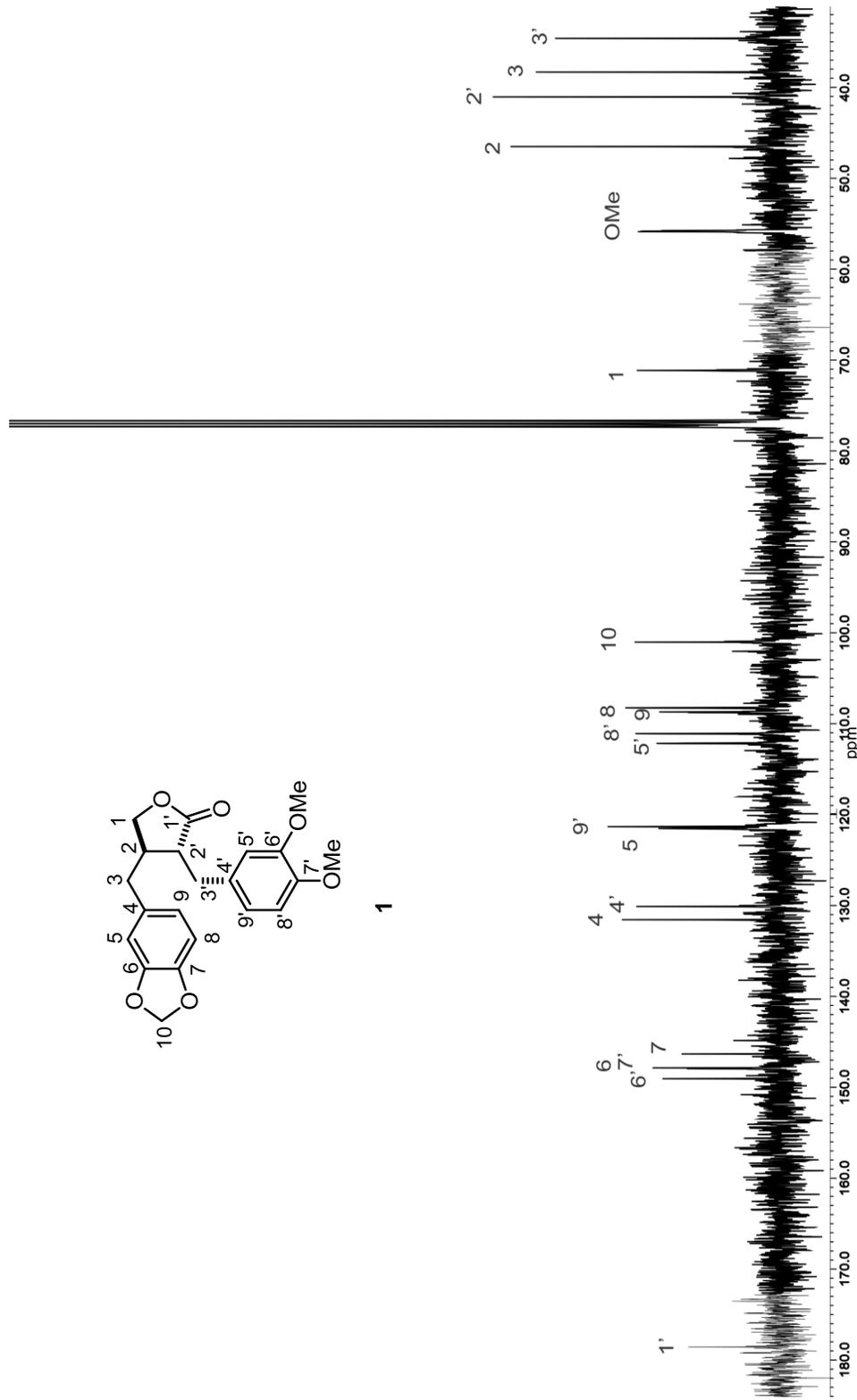


Figura 12. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de la (-)-8'-desmetoxyatena (1) en  $\text{CDCl}_3$ .

Las fracciones 54-63 (147.4) se recromatografiaron en gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (95:1 y 9:1) y MeOH. De la fracción 12-20 se obtuvo un compuesto (12 mg, 1%) en forma de una miel transparente que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 33.2$  (c 0.91,  $\text{CHCl}_3$ ). El análisis de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figuras 11 y 12), así como la comparación con datos descritos<sup>7, 22</sup> y los datos de la (-)-8'-desmetoxyateina (**1**), hizo evidente de que se trataba del lignano (-)-yateina (**2**). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13, Tabla 2) fue muy similar al del compuesto **1** y mostró 5 señales de protones aromáticos, una doble en  $\delta$  6.69 ppm con  $J=8.3$  Hz asignada al protón H-8, en  $\delta$  6.47 ppm una señal doble ( $J=1.8$  Hz) correspondiente a H-5, una señal doble de dobles ( $J=7.2$  y  $1.8$  Hz) en  $\delta$  6.46 ppm que se asignó a H-9 y en  $\delta$  6.35 ppm dos señales simples correspondientes a los protones H-5' y H-9'. En  $\delta$  3.82 ppm se observó una señal simple que integró para 9 protones correspondiente a los metoxilos en C-6', C-7' y C-8'. El resto de los protones presentaron pequeñas modificaciones en cuanto a desplazamiento químico con respecto a la (-)-8'-desmetoxyateina (**1**). De igual manera, el espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  de la sustancia **2** (Figura 14, Tabla 3) fue muy semejante al del compuesto **1**. A diferencia de este último, se observaron 22 señales de las cuales una señal adicional correspondió al carbono del grupo MeO en C-8', que presentó un desplazamiento igual al del grupo MeO en C-6' en  $\delta$  56.0 ppm. Adicionalmente, se observó la señal en  $\delta$  153.3 ppm para el C-8', base del nuevo grupo MeO. En su espectro de infrarrojo (Anexos) se observaron las bandas de absorción correspondientes al C=O de lactona y C=C de aromático en 1767 y 1591  $\text{cm}^{-1}$ . En el espectro de masa se apreció el ión molecular 400  $[\text{M}]^+$  con una intensidad del 100 %.

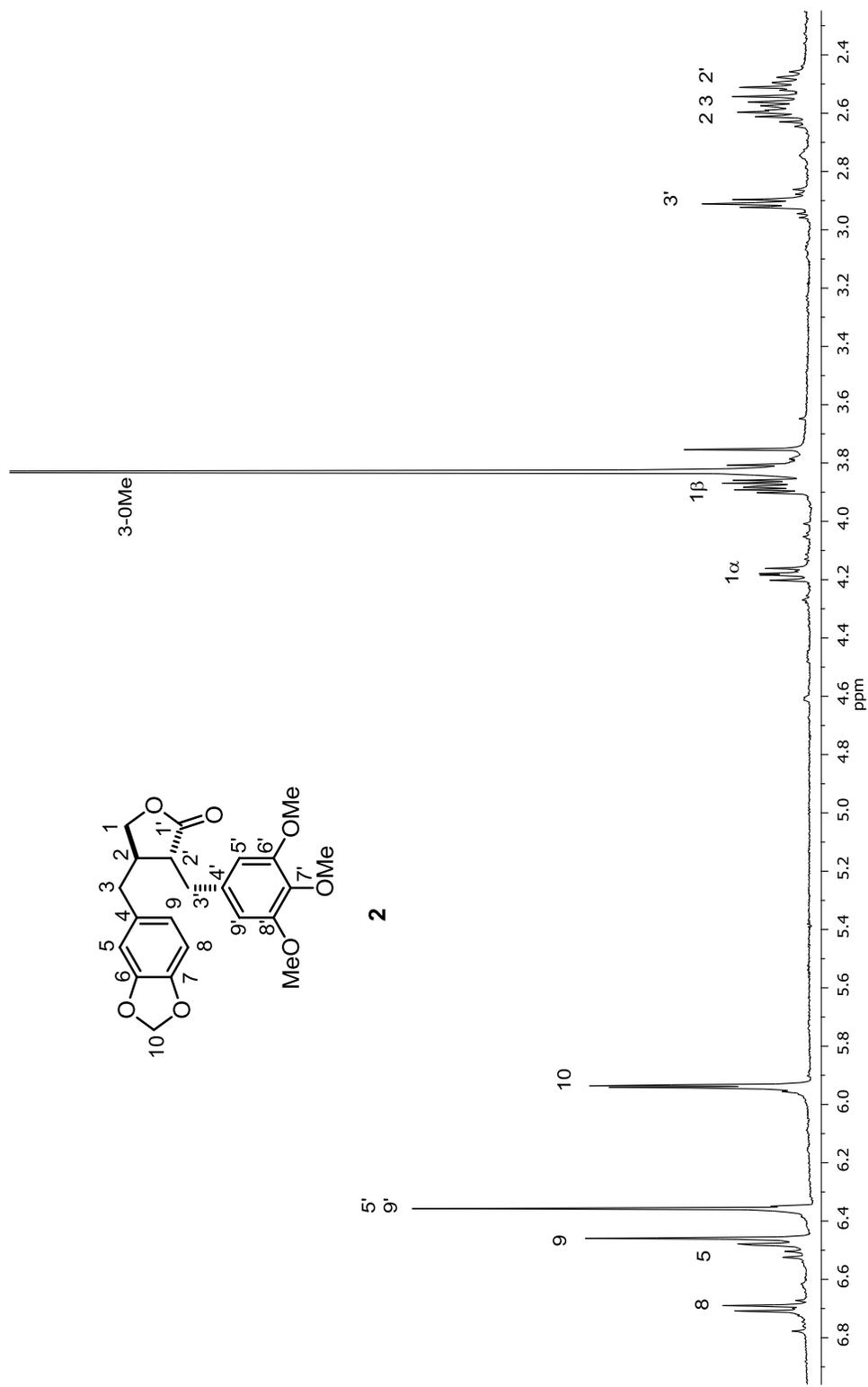


Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) de la (-)-yateina (2) en CDCl<sub>3</sub>.

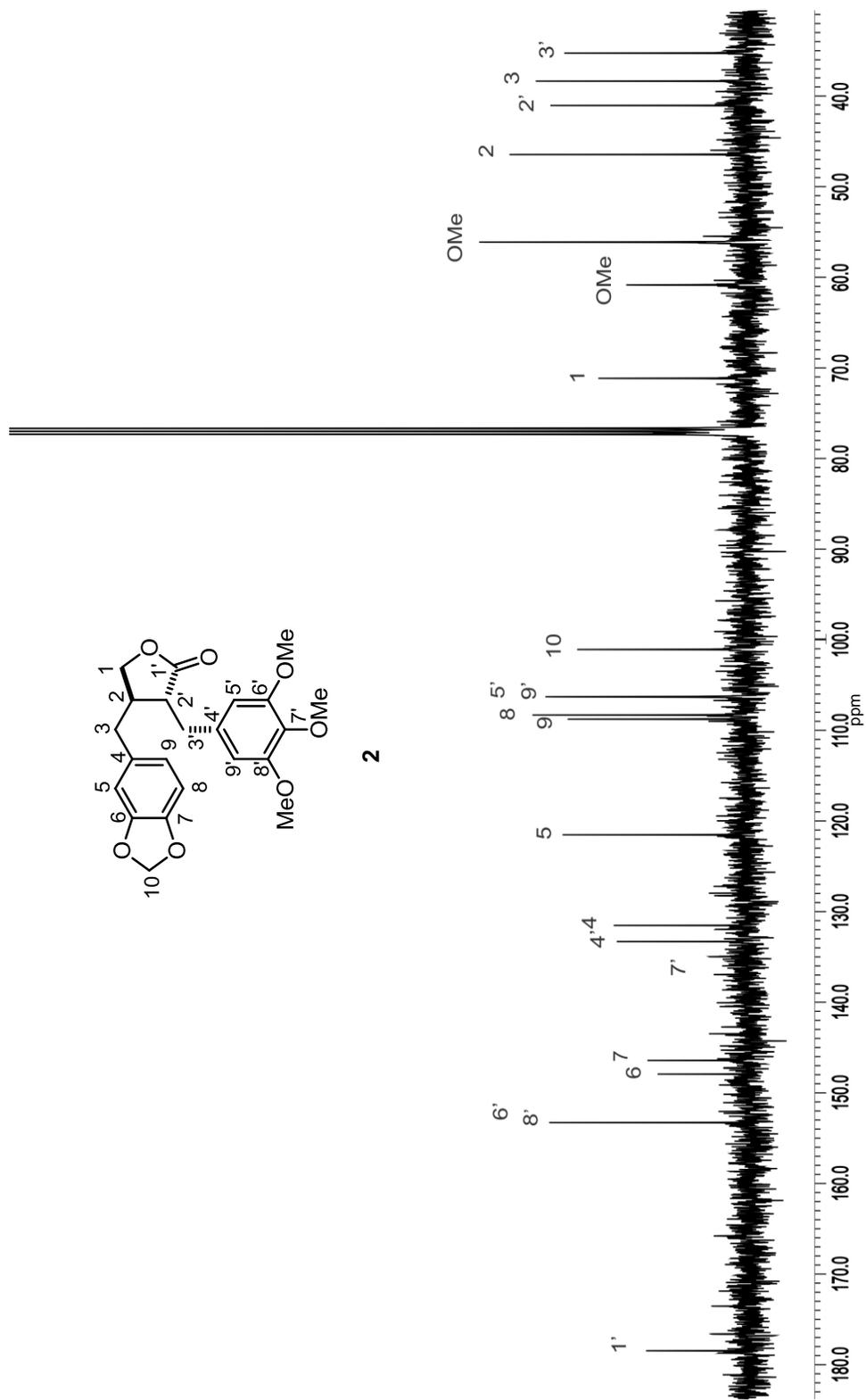


Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de la (-)-yateina (2) en  $\text{CDCl}_3$ .

La fracción 64-69 de la cromatografía del extracto EtOH, se purificó por CCF en una placa de 10 x 20 cm utilizando como eluyente una mezcla CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (4:1). De la banda con R<sub>f</sub> 0.57 se obtuvo una miel transparente (10 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 95.2^\circ$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) y que por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los descritos<sup>8, 23</sup>, se determinó que se trataba del lignano conocido como (-)-deoxipodofilotoxina (**3**). Su espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 15, Tabla 2) mostró en  $\delta$  6.67 ppm una señal simple para H-5, una señal simple en  $\delta$  6.53 ppm correspondiente a H-8, en  $\delta$  6.35 ppm una señal simple asignada a los protones H-5' y H-9', en  $\delta$  5.96 y 5.94 ppm se apreciaron dos señales dobles (*J*=1.3 Hz) características del grupo metilendioxi (H-10), una señal doble (*J*=4 Hz) en  $\delta$  4.61 ppm debida al protón H-3', una señal doble de dobles (*J*=8.0 y 4.0 Hz) en  $\delta$  4.46 ppm para el protón H-1 $\alpha$ , en  $\delta$  3.92 ppm una señal doble de dobles (*J*=12.0 y 8.0 Hz) para el protón H-1 $\beta$ , una señal simple en  $\delta$  3.81 ppm que integró para 3 protones y que correspondió al MeO en C-7', mientras que en  $\delta$  3.75 ppm se observó la señal simple que integró para 6 protones y que se asignó a los MeO en C-6' y C-8'. A frecuencias bajas se observaron las señales múltiples entre  $\delta$  3.08 y 2.73 ppm correspondientes a los protones H-3, H-2 y H-2'.

En el espectro de <sup>13</sup>C (Figura 16, Tabla 3) se observaron 22 señales, entre las más significativas tenemos en  $\delta$  174.9 ppm una señal característica de un carbonilo de lactona (C-1'), 5 señales típicas de carbonos aromáticos base de oxígeno en  $\delta$  152.5, 152.5, 147.0, 146.7 y 137.0 ppm correspondientes a C-8', C-6', C-6 y C-7 y C-7' respectivamente, 7 señales características de carbonos aromáticos entre  $\delta$  136.3 y

108.2 ppm para el resto de los carbonos de los dos anillos aromáticos, en  $\delta$  101.2 ppm la señal para C-10 del grupo metilendioxi y en  $\delta$  72.1 ppm una señal base de lactona correspondiente a C-1. En  $\delta$  60.8 y 56.2 ppm se observaron las señales de los 3 MeO de la molécula y 4 señales más en la zona de carbonos  $sp^3$  asignadas a C-2', C-3', C-3 y C-2.

El espectro HMBC de **3** (Figura 17) presentó la correlación a tres enlaces entre H-5 y C-9, así como H-8 y C-6, también se observó la correlación entre H-9' y C-5', la correlación de H-5' con C-7', así como la interacción de H-9' con C-7'.

En su espectro de infrarrojo (Anexos) se observaron las bandas de absorción correspondientes al C=O de lactona y C=C aromático en 1770 y 1589  $cm^{-1}$ .

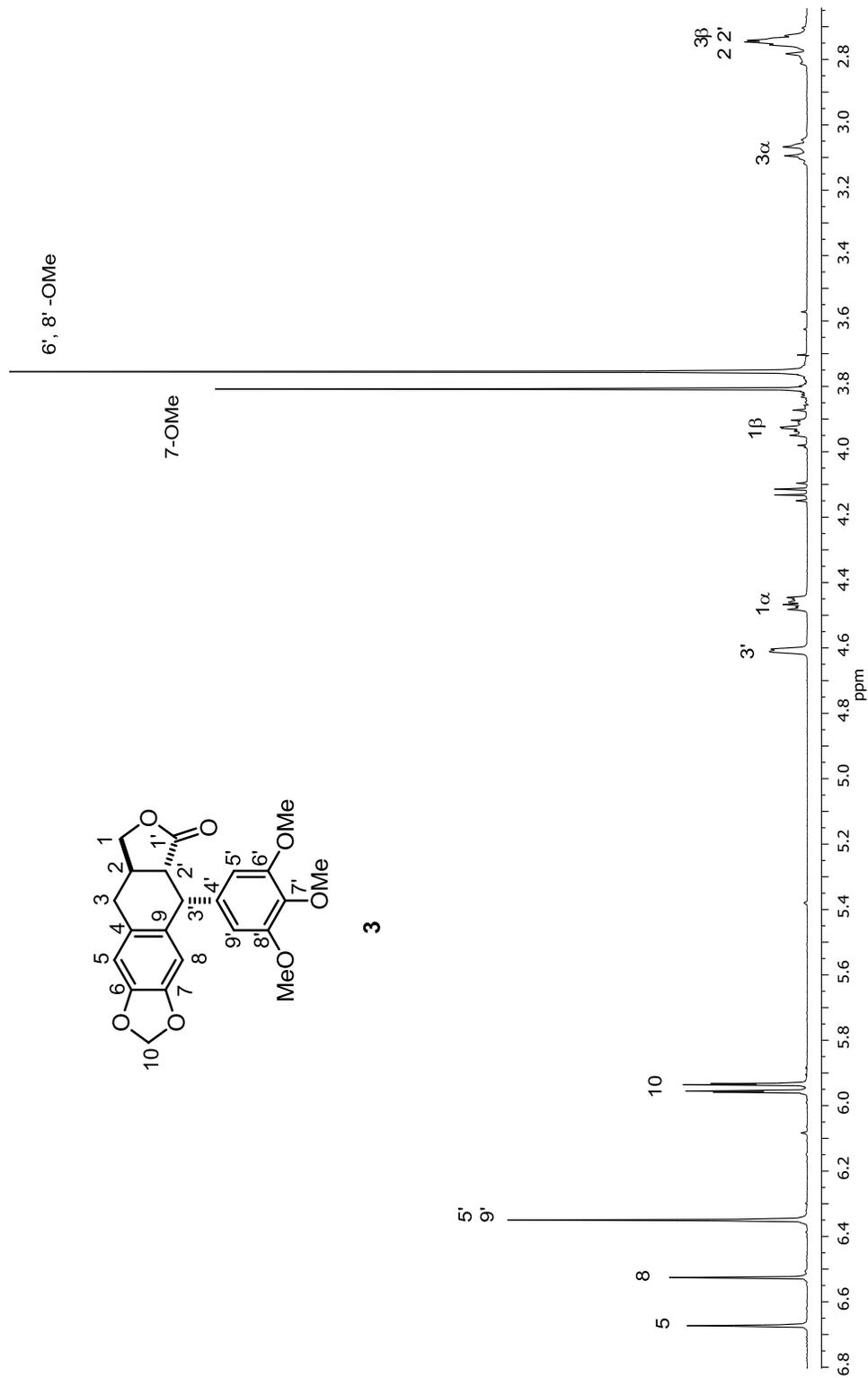


Figura 15. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la (-)-deoxipodofiloxina (3) en CDCl<sub>3</sub>.

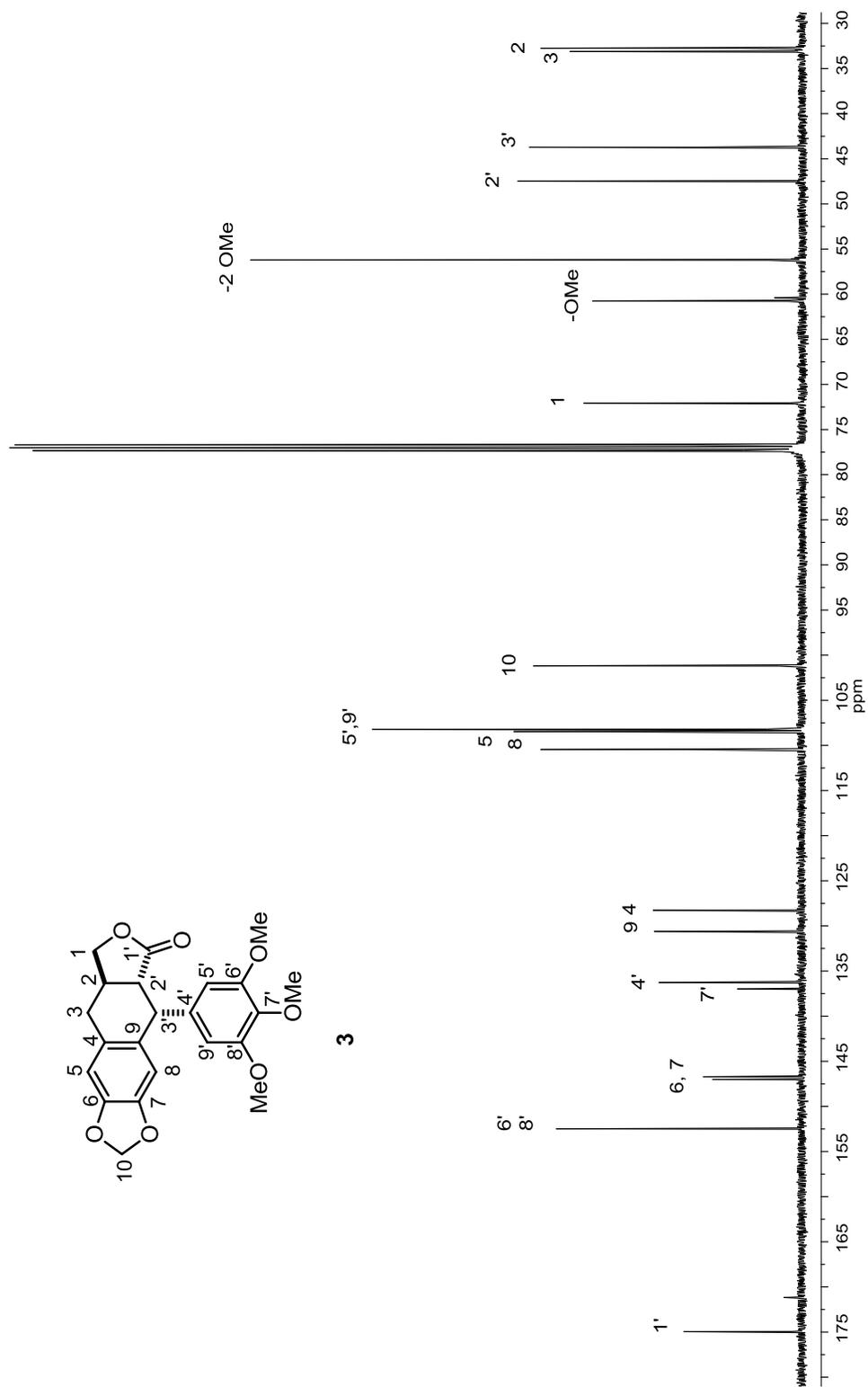


Figura 16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de la (-)-deoxipodofilotoxina (3) en  $\text{CDCl}_3$ .

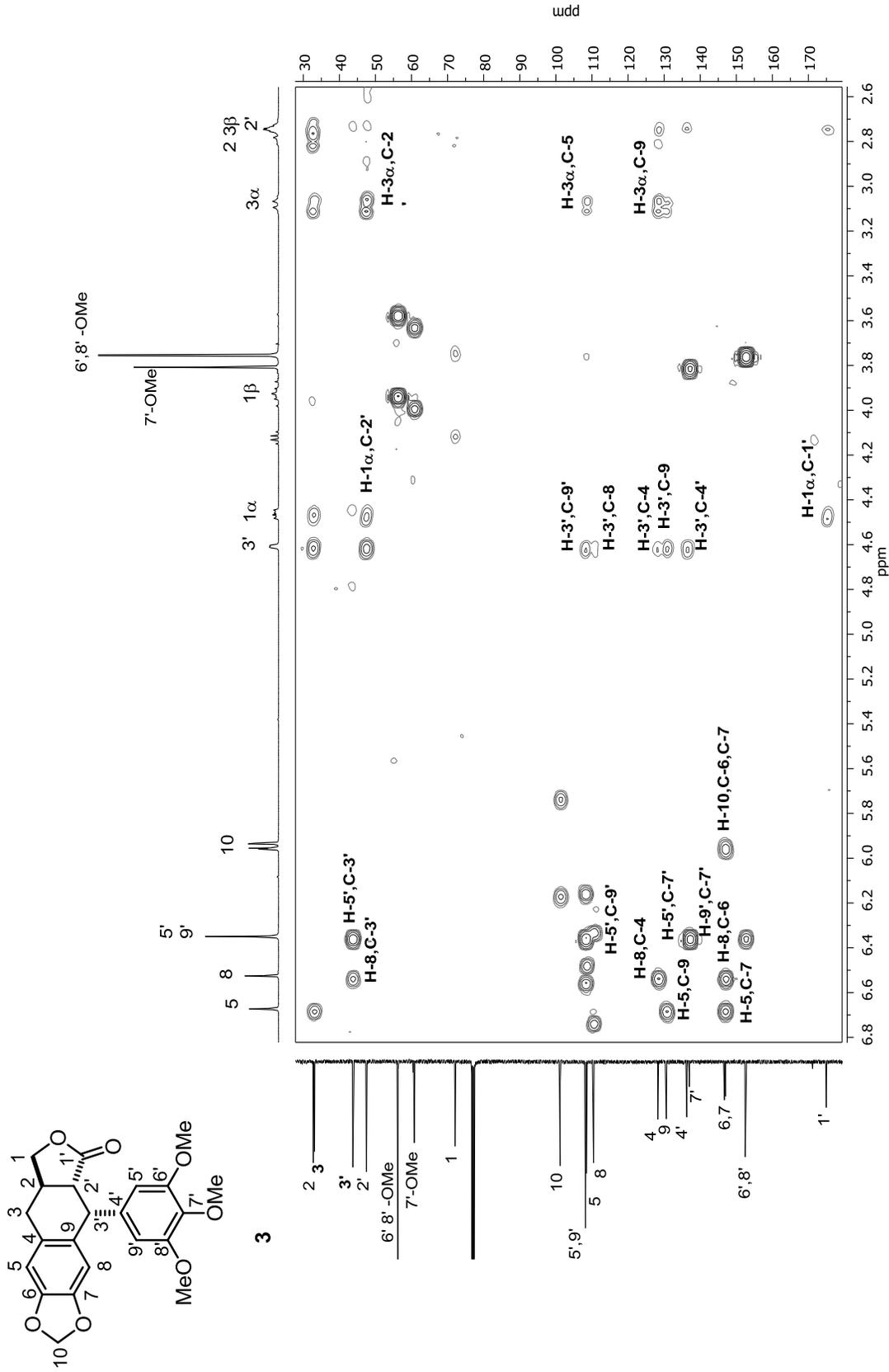


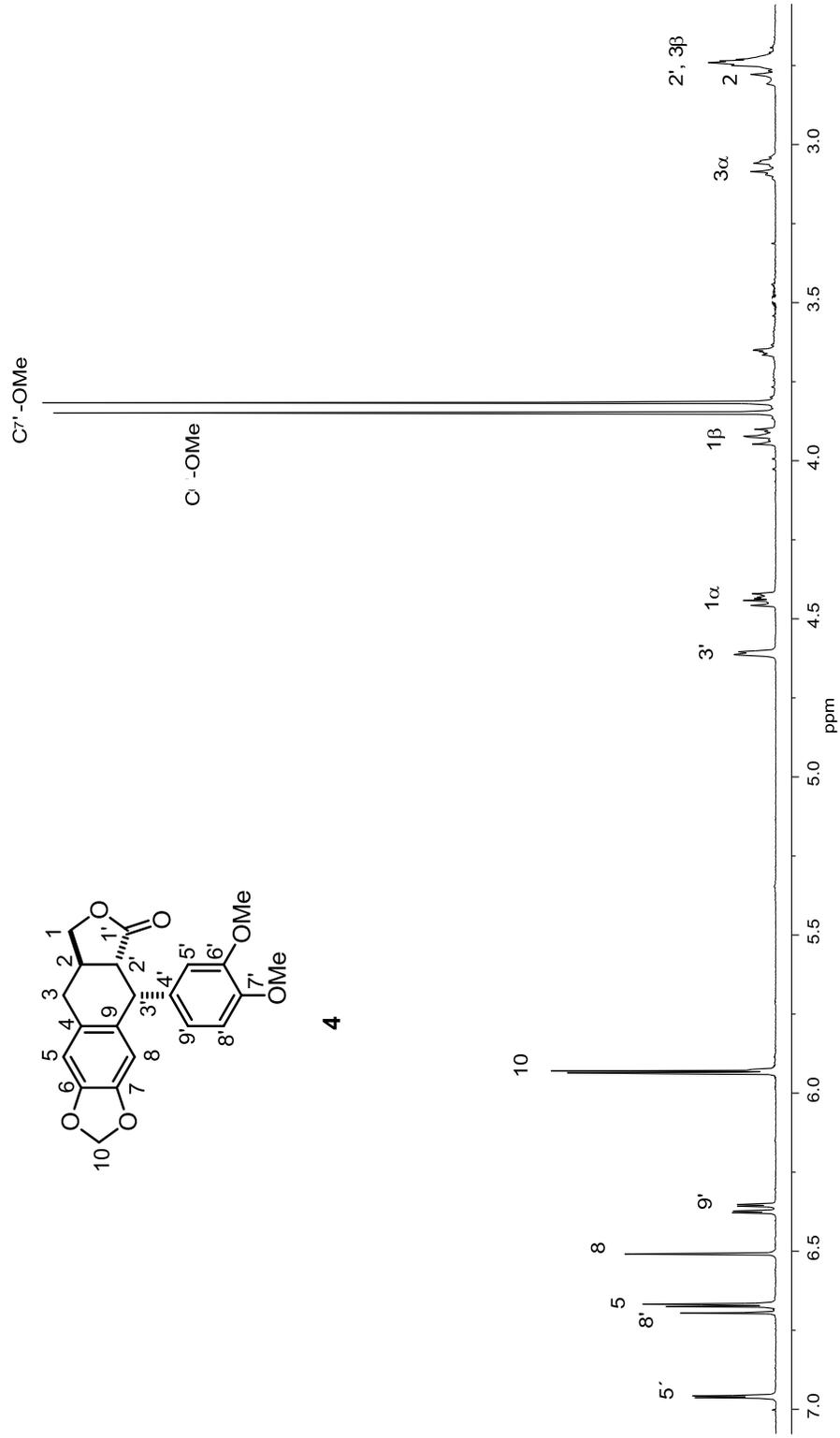
Figura 17. Espectro HMBC de la (-)-deoxipodofilotoxina (3) en CHCl<sub>3</sub>.

De la banda con  $R_f$  0.68 se obtuvo una miel blanquecina (6.2 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20}$  - 127.2 (c 0.36,  $\text{CHCl}_3$ ). El análisis de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 19 y 20), así como la comparación con datos descritos<sup>8, 23</sup> y los datos de la (-)-deoxipodofilotoxina (**3**), hizo evidente de que se trataba del lignano (-)-8'-desmetoxideoxipodofilotoxina (**4**). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 18, Tabla 2) fue muy similar al del compuesto **3** y mostró 5 señales de protones aromáticos, una señal doble en  $\delta$  6.96 ppm ( $J=4.0$  Hz) para el protón H-5', en  $\delta$  6.68 ppm una señal doble ( $J=8.0$  Hz) correspondiente a H-8', una señal simple en  $\delta$  6.67 ppm para H-5, en  $\delta$  6.51 una señal simple correspondiente al protón H-8, una señal doble de dobles ( $J=8.0$  y 4.0 Hz) en  $\delta$  6.37 ppm para H-9', dos señales simples en  $\delta$  3.84 y  $\delta$  3.82, que integraron para 3 protones cada una correspondientes a los metoxilos de C-6' y C-7'. El resto de los protones presentaron pequeñas modificaciones en cuanto a desplazamiento químico con respecto a la deoxipodofilotoxina **3**.

De igual manera, el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **4** (Figura 19 y Tabla 3) fue muy semejante al de **3**. A diferencia de este último, se observaron 21 señales, 4 señales típicas de carbonos aromáticos base de oxígeno, en  $\delta$  148.2, 147.9, 146.9 y 146.7 ppm correspondientes a C-7', C-6', C-6 y C-7, respectivamente. En  $\delta$  110.2 ppm se observó la señal del carbono de aromático C-8' y en  $\delta$  55.9 y 55.8 ppm se apreciaron las señales para los carbonos de MeO en C-6' y C7'. En el resto de señales no se apreciaron cambios significativos.

El espectro HMBC de **4** (Figura 20) nos permitió confirmar las asignaciones hechas tanto para hidrógenos como para los carbonos de la molécula, en el cual se observó la correlación a tres enlaces entre H-5' y C-9', así como H-8' y C-4', también se observó la correlación de la señal de H-9' y C-7'. Adicionalmente, se observó la correlación de las señales de los metoxilos C-6' y C-7'.

En su espectro de infrarrojo (Anexos) se observaron las bandas de absorción correspondientes al C=O de lactona y C=C de aromático en 1771 y 1590  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 18.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) de la (-)-8'-8'-desmetoxideopodofilotoxina (4) en CDCl<sub>3</sub>.

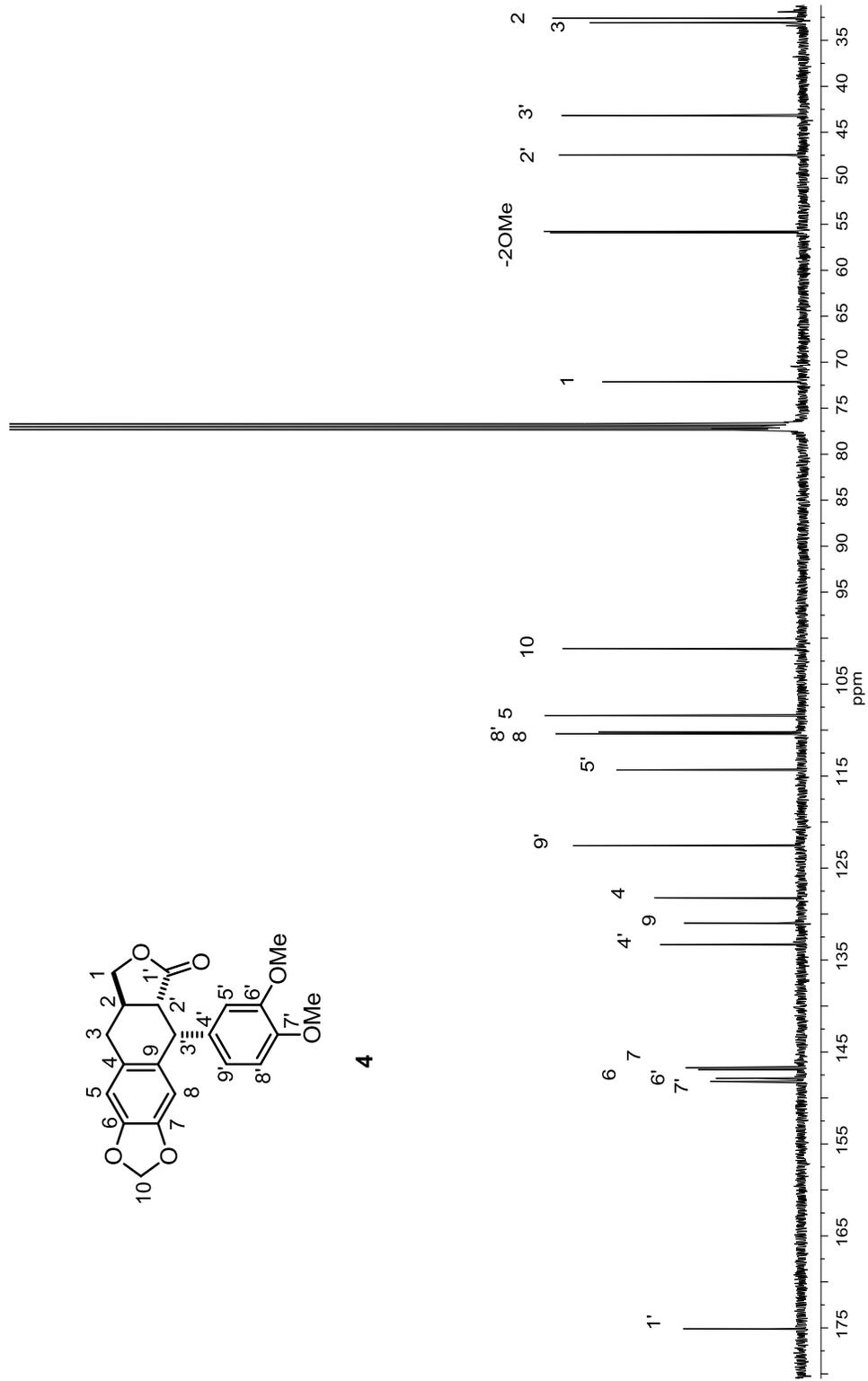


Figura 19. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de la (-)-8'-desmetoxideipodofiloxina (4) en  $\text{CDCl}_3$ .

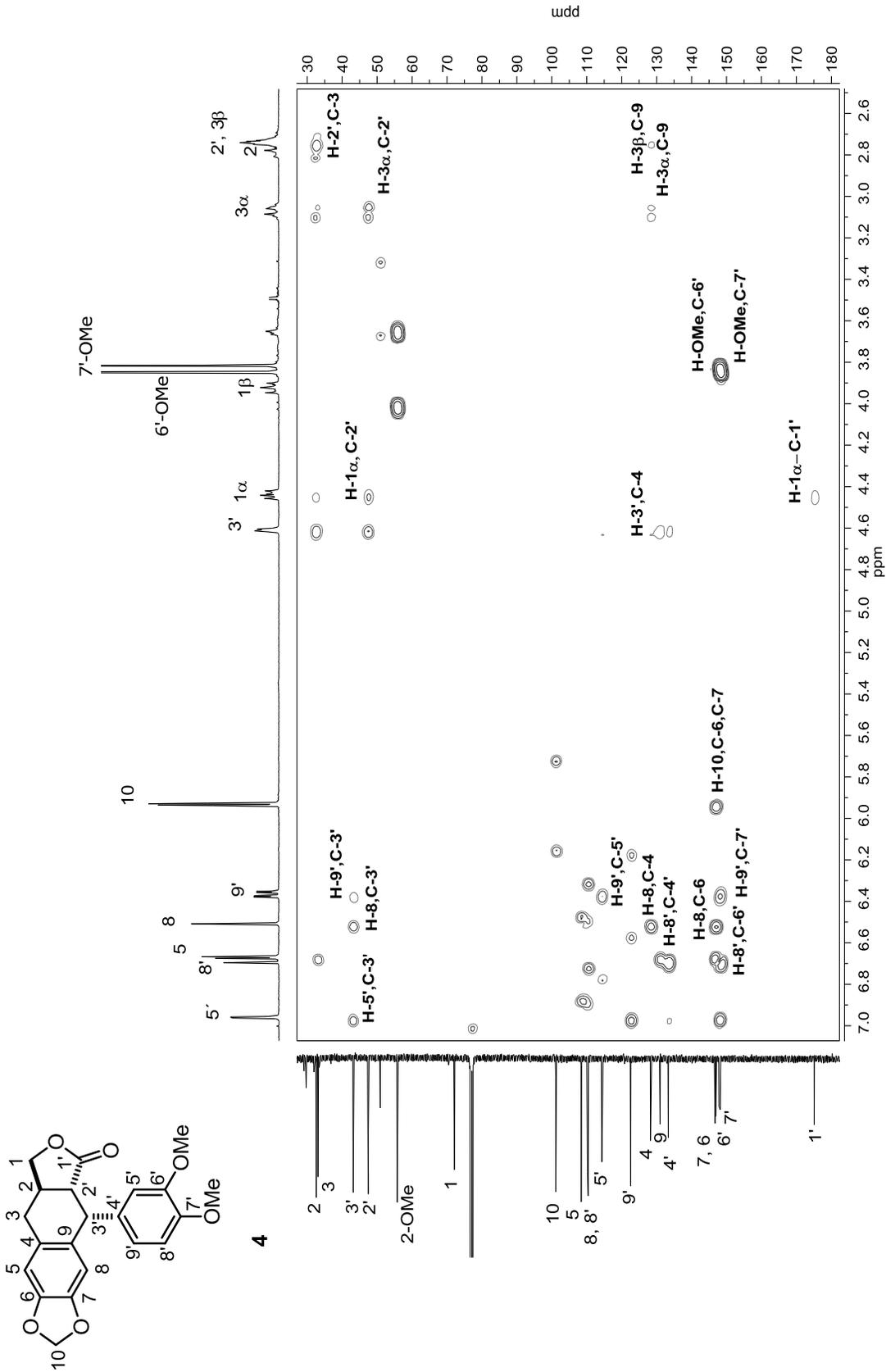


Figura 20. Espectro HMBC de la (-)-8'-desmetoxideipodofiloxina (4) en  $\text{CHCl}_3$ .

**Tabla 2.** Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz) de RMN  $^1\text{H}$  de los lignanos **1-4** ( $\text{CDCl}_3$ , \* 300 MHz y 400 MHz).

protón	1*	2*	3	4
H-1 $\alpha$	4.11 (dd, 9.3, 6.7)	4.17 (dd, 9.2, 7.0)	4.46 (dd, 8.0, 4.0)	4.44 (dd, 12.0, 8.0)
H-1 $\beta$	3.85 (m)	3.87 (dd, 6.9, 4.3)	3.92 (dd, 12.0, 8.0)	3.92 (dd, 10.0, 8.8)
H-2	2.56 (m)	2.58 (m)	2.77 (m)	2.78 (m)
H-3 $\alpha$	2.49 (m)	2.55 (m)	3.08 (dd, 12.0, 4.0)	3.08 (dd, 16.0, 4.0)
H-3 $\beta$	2.59 (dd, 12.3, 6.7)		2.73 (m)	2.73 (m)
H-5	6.46 (d, 1.6)	6.47 (d, 1.8)	6.67 (s)	6.67 (s)
H-8	6.69 (d, 9.0)	6.69 (d, 8.4)	6.53 (s)	6.51 (s)
H-9	6.44 (dd, 9.3, 1.4)	6.46 (dd, 7.2, 1.8)		
H-2'	2.48 (m)	2.50 (m)	2.75 (m)	2.75 (m)
H-3' $\alpha$	2.98 (dd, 14.0, 5.0)	2.94 (dd, 13.9, 5.4)		
H-3' $\beta$	2.90 (dd, 14.0, 6.6)	2.90 (dd, 14.0, 6.0)	4.61 (d, 4.0)	4.61 (d, 4.0)
H-5'	6.67 (d, 0.6)	6.35 (s)	6.35 (s)	6.96 (d, 4.0)
H-8'	6.79 (d, 8.0)			6.68 (d, 8.0)
H-9'	6.70 (dd, 7.7, 0.6)	6.35 (s)	6.35 (s)	6.37 (dd, 8.0, 4.0)
MeO-C6'	3.86 (s)	3.82 (s)	3.75 (s)	3.84 (s)
MeO-C7'	3.84 (s)	3.82 (s)	3.81 (s)	3.82 (s)
MeO-C8'	-----	3.82 (s)	3.75 (s)	-----
10	5.93 (d, 1.4)	5.93 (d, 1.3)	5.94 (d, 1.3)	5.93 (d, 1.2)
	5.94 (d, 1.4)	5.94 (d, 1.3)	5.96 (d, 1.3)	5.94 (d, 1.2)

**Tabla 3.** Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  de los lignanos **1-4** ( $\text{CDCl}_3$ , \* 75 MHz y 100 MHz).

Carbono	1*	2*	3	4
1	71.1	71.1	72.1	72.1
2	46.5	46.4	32.8	32.2
3	38.3	38.3	33.1	33.1
4	131.5	131.5	128.3	128.4
5	121.5	121.5	108.5	108.4
6	147.9	147.9	147.0	146.9
7	146.3	146.3	146.7	146.7
8	108.2	108.2	110.4	110.4
9	108.7	108.7	130.6	131.1
1'	178.6	178.5	174.9	175.1
2'	41.0	40.9	47.5	47.5
3'	34.6	35.2	43.7	43.2
4'	130.1	133.3	136.3	133.3
5'	112.1	106.1	108.2	114.3
6'	149.0	153.2	152.5	147.9
7'	147.9	136.8	137.0	148.2
8'	111.0	153.2	152.5	110.2
9'	121.3	106.1	108.2	122.6
MeO- C6'	55.8	56.0	56.2	55.9
MeO-C7'	55.7	60.8	60.8	55.8
MeO-C8'	-----	56.0	56.2	-----
10	101.0	101.0	101.2	101.1

#### **5.4 Obtención de los extractos de los tallos de *Bursera morelensis*.**

Los tallos frescos y cortados en pequeños canutos (10 kg) se sometieron a primera maceración con hexano (12 L) por 4 semanas, al término de las cuales, el extracto se filtró y se concentró en el rotavapor. Este procedimiento se repitió una vez más para obtener 20 g de producto y se hizo lo mismo con AcOEt y MeOH mediante extracciones secuenciales para obtener 32 g del extracto de AcOEt y 40 g del extracto metanólico.

#### **5.5 Separación cromatográfica del extracto hexánico de los tallos de *Bursera morelensis*.**

Una alícuota del extracto hexánico (3 g) se sometió a cromatografía empleando una columna de vidrio de 3.5 cm de diámetro interno, gel de sílice (80 g, 230-400 mesh ASTM) y como eluyentes hexano; mezclas de hexano-AcOEt (9:1, 7:3; 1:1 y 3:7) y AcOEt. Se colectaron eluatos de 100 mL para obtener un total de 30 fracciones, las cuales se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (CCF). De la fracción 2 (hexano) se obtuvo un aceite transparente y de olor agradable cuyo espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 21) mostró en  $\delta$  5.40 ppm una señal simple ancha asignada a H-2, una señal simple en  $\delta$  4.65 ppm correspondiente a H-9 y a frecuencias bajas dos señales simples entre  $\delta$  1.75 y 1.60 debidas a los Me-10 y Me-7.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 22) se observaron 10 señales, entre ellas las más significativas en  $\delta$  149.7 y 133.4 ppm correspondientes para los carbonos de enlace doble asignadas a C-8 y C-1, una señal en  $\delta$  121.0 ppm asignada a C-2 vinílico y en  $\delta$  108.6 ppm la señal para el carbono C-9. A frecuencias bajas se observaron 6 señales restantes características de los carbonos  $\text{sp}^3$  de monoterpeno tipo limoneno. Este compuesto se caracterizó como (-)-limoneno (**6**) con base en sus datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y sus datos físicos y espectroscópicos resultaron iguales a los descritos.<sup>24</sup> Esta sustancia es un monoterpeno conocido en especies de *Bursera*.

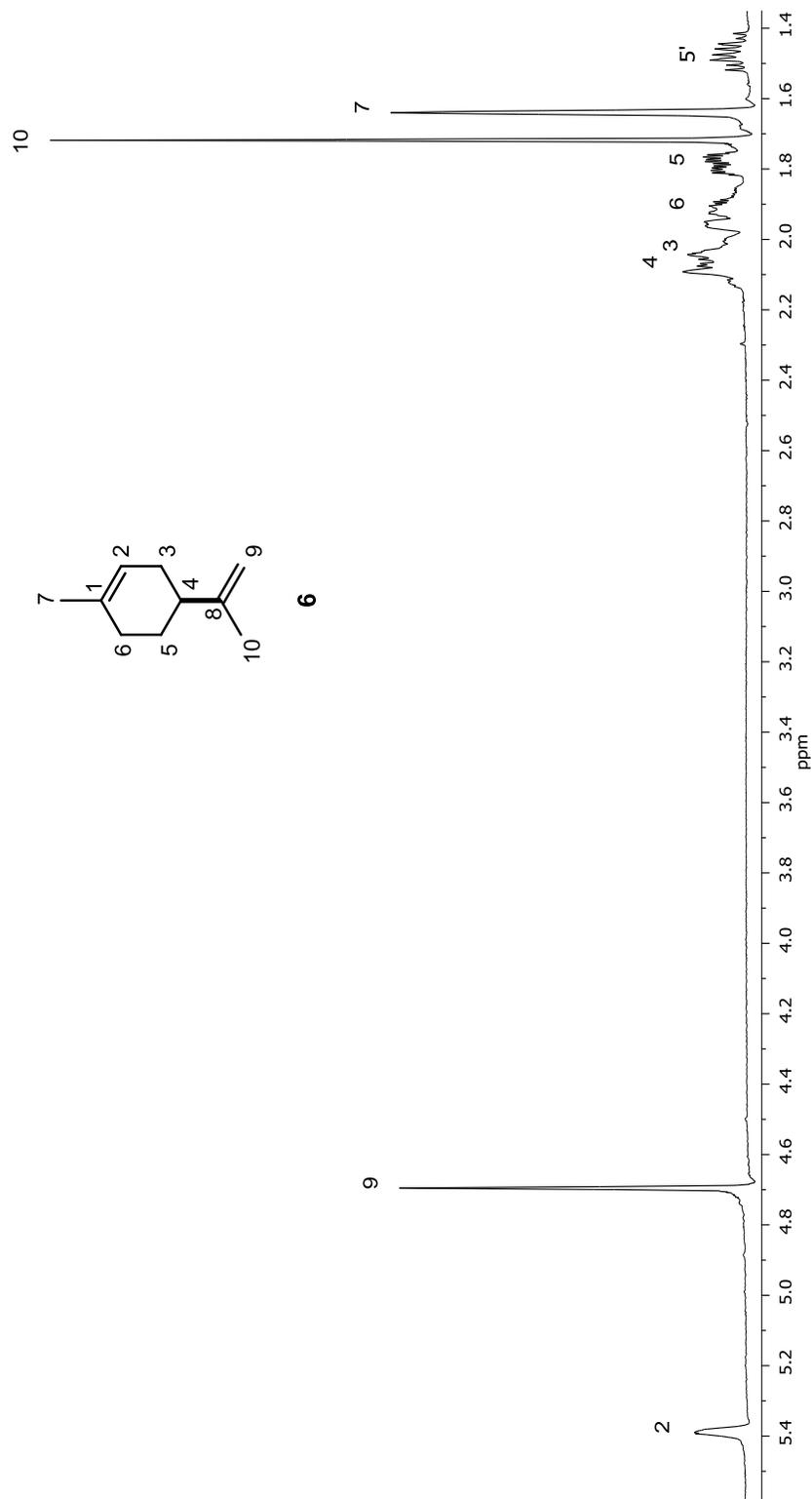


Figura 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del (-)-limoneno (6) en  $\text{CDCl}_3$ .

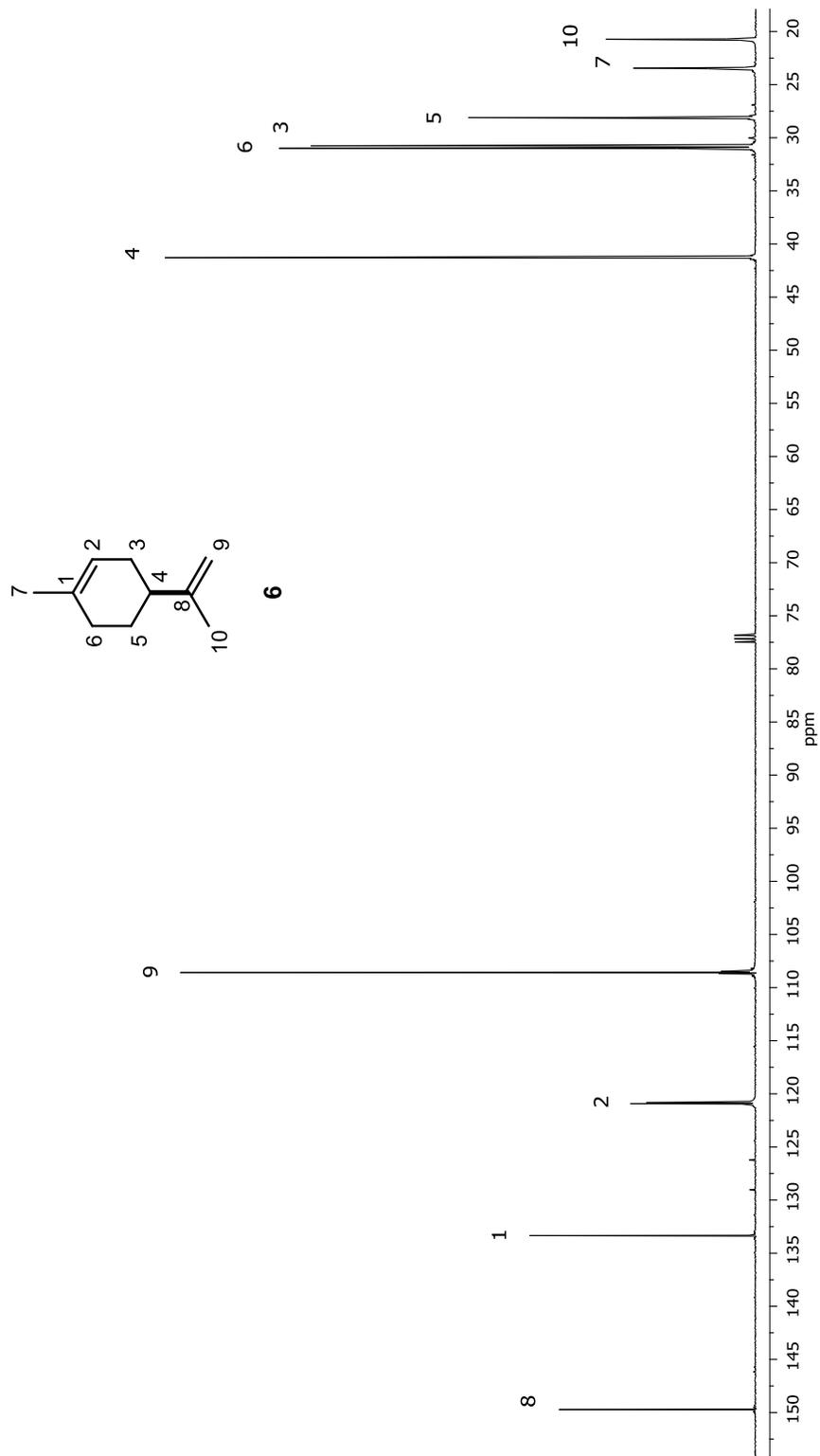


Figura 22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del (-)-limoneno (6) en  $\text{CDCl}_3$ .

La separación cromatográfica de la fracción 7 (124.3 mg), usando gel de sílice y hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (49:1) como eluyentes, dio lugar a un polvo blanco (21.5 mg, 17.3%) que mostró  $[\alpha]_D^{20} + 47$  (c 2.2, CHCl<sub>3</sub>) y que se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos<sup>25</sup> como (+)-betulonal (**7**), un triterpeno conocido estructuralmente relacionado con el lupeol (**37**).

En su espectro de RMN <sup>1</sup>H (figura 23) se apreció en  $\delta$  9.65 ppm una señal simple característica de un protón de aldehído asignada a H-28, dos señales simples anchas en  $\delta$  4.74 y 4.61 ppm características de un metileno exocíclico que se asignaron a los protones H-29 y H-29', en  $\delta$  2.87 ppm una señal triple de dobles ( $J=11.0$  y  $5.8$ ) correspondiente al protón H-19 y una señal simple en  $\delta$  1.68 ppm característica de metilo vinílico. A frecuencias bajas, en  $\delta$  1.05, 0.99, 0.97, 0.93 y 0.90 ppm se observaron 5 señales simples para los Me-23, Me-24, Me-27, Me-25 y Me-26, respectivamente.

En el espectro de <sup>13</sup>C (Figura 24) se observaron 30 señales, entre ellas una señal en  $\delta$  218.1 ppm una señal característica de un carbonilo de cetona que se asignó a C-3, en  $\delta$  206.6 ppm se apreció una señal característica de un carbonilo de aldehído y que se asignó a C-28, en  $\delta$  149.7 y 110.3 ppm se observaron las señales debidas a los carbonos del doble enlace C-20 y C-29, respectivamente. A frecuencias bajas se observó el resto de las señales características de los carbonos sp<sup>3</sup> de la sustancia.

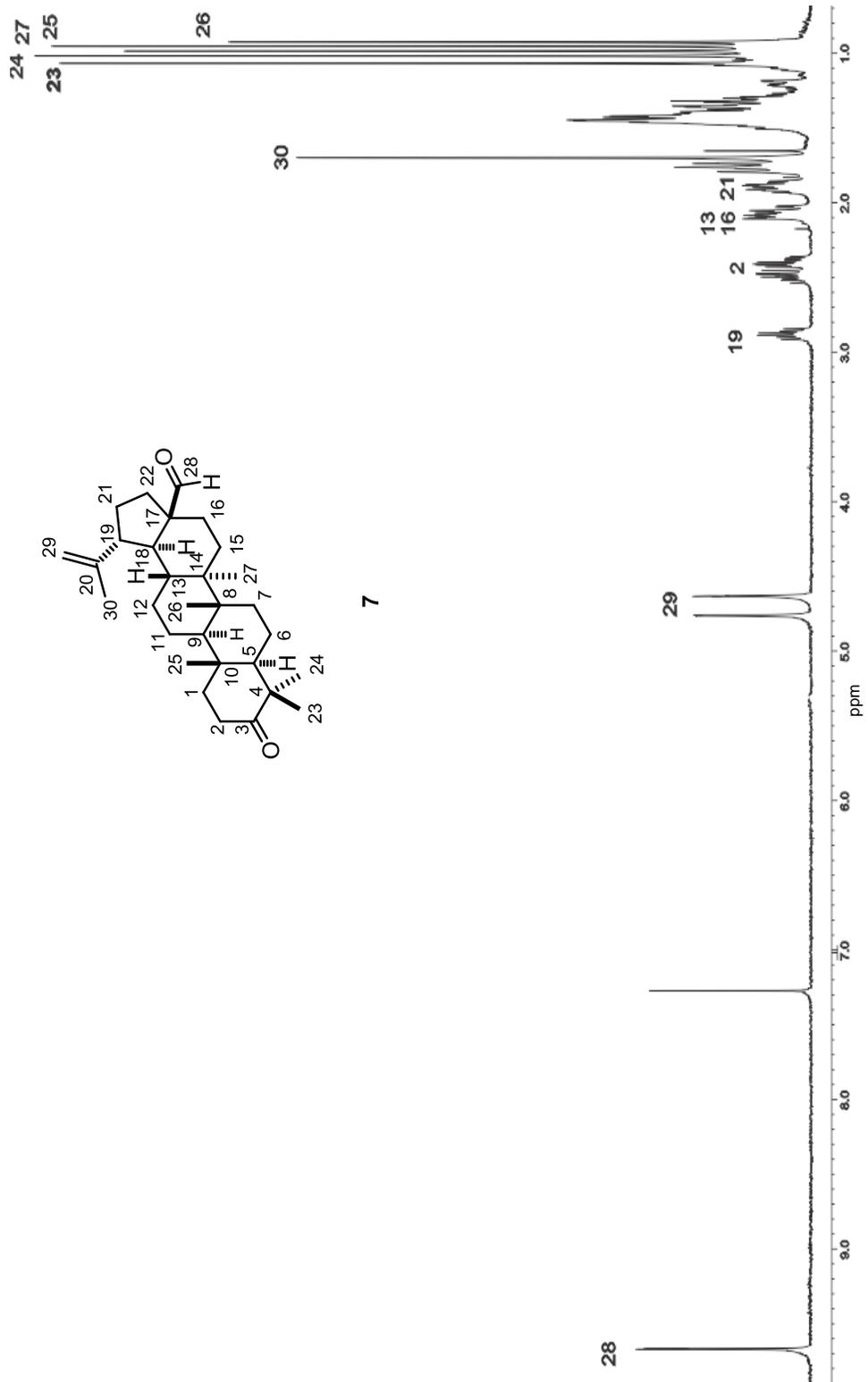


Figura 23. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del (+)-betulonal (7) en CDCl<sub>3</sub>.

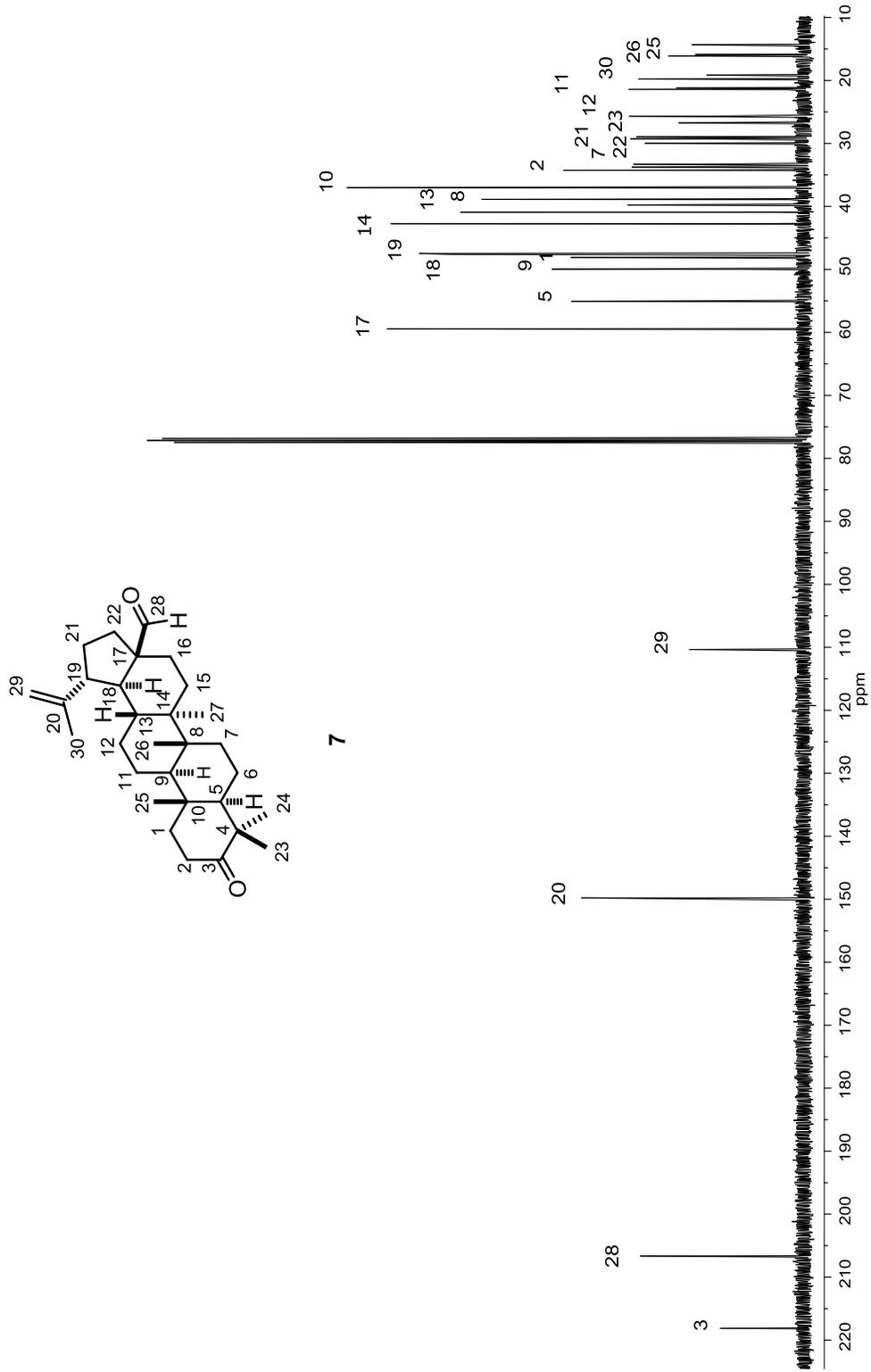


Figura 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del (+)-betulonal (7) en  $\text{CDCl}_3$ .

La separación cromatográfica de la fracción 8 (335.3 mg) en gel de sílice y  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (9:1) como eluyentes, condujo a la obtención de otro compuesto 91.5 mg (44 %) en forma de cristales blancos con p.f. 115-117 °C. El cual se caracterizó como eufol (**9**) con base en sus datos físicos y espectroscópicos, así como por la comparación con datos de la literatura.<sup>26</sup>

Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 25) mostró en  $\delta$  5.12 ppm una señal triple característica de un protón vinílico (H-24), en  $\delta$  3.22 ppm una señal doble de dobles ( $J=12.0$  y  $4.0$  Hz) característica de un protón base de OH que fue asignada a H-3. En  $\delta$  1.68 y 1.61 ppm dos señales simples característica de metilos vinílicos y a frecuencias bajas se observaron 5 señales simples en  $\delta$  1.05, 0.99, 0.97, 0.93 y 0.90 ppm para los Me-23, Me-24, Me-27, Me-25 y Me-26 respectivamente, mientras que el metilo secundario (21) se observó en  $\delta$  0.86 ppm como una señal doble ( $J=7.0$  Hz).

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 26) se observaron 30 señales, entre ellas las más significativas fueron 4 señales características para los carbonos de doble enlace correspondientes a C-8, C-9, C-25 y C-24, entre  $\delta$  135.0 y 125.0 ppm, respectivamente, y la señal de carbono base de oxígeno en  $\delta$  79.0 ppm, asignada a C-3. A frecuencias bajas se observó el resto de las señales características de los carbonos  $\text{sp}^3$  de este triterpeno. Los desplazamientos y la multiplicidad de las señales se compararon con datos reportados<sup>26</sup> lo cual corroboró su estructura.

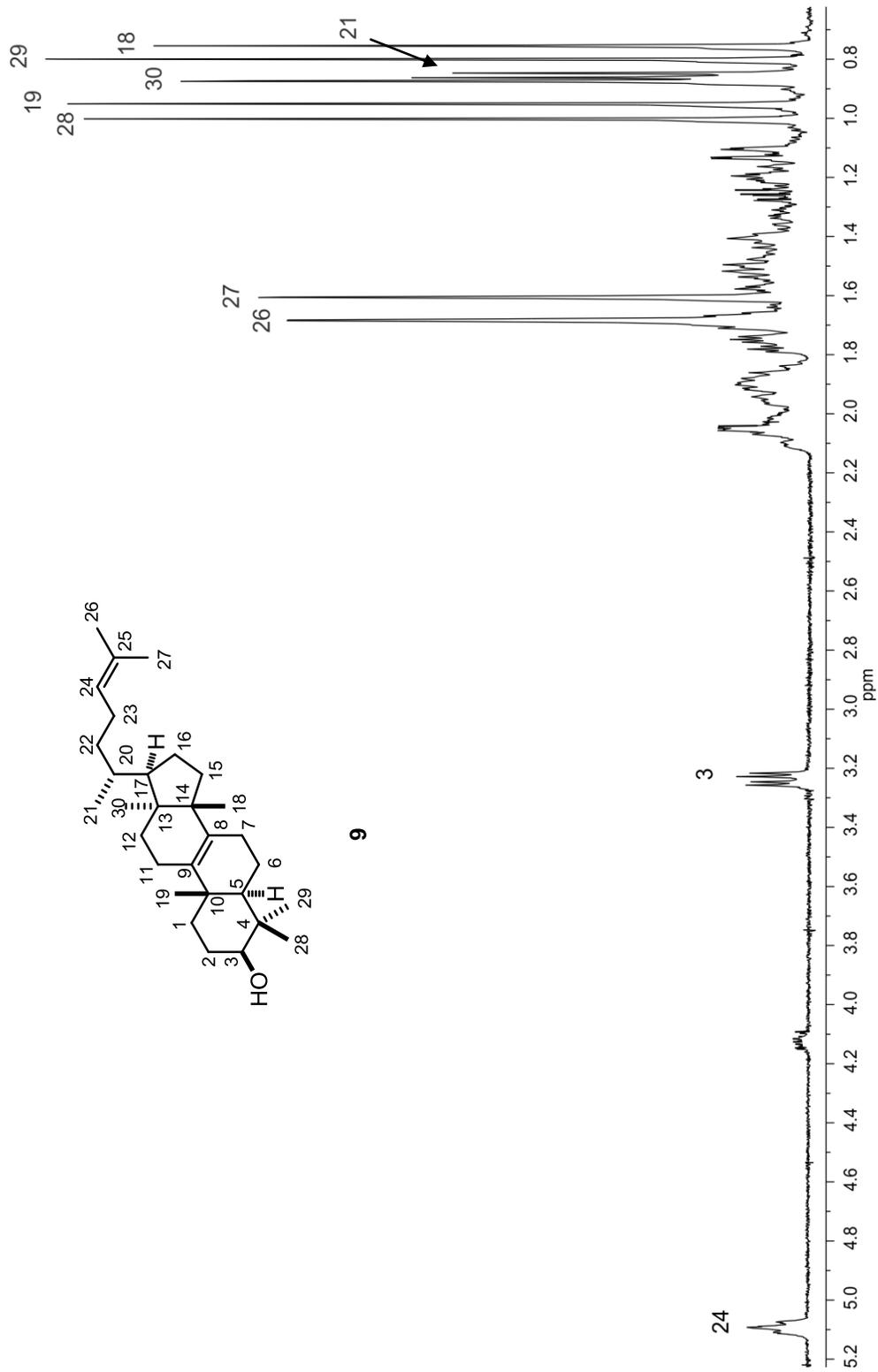


Figura 25. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del eufol (**9**) en  $\text{CDCl}_3$ .

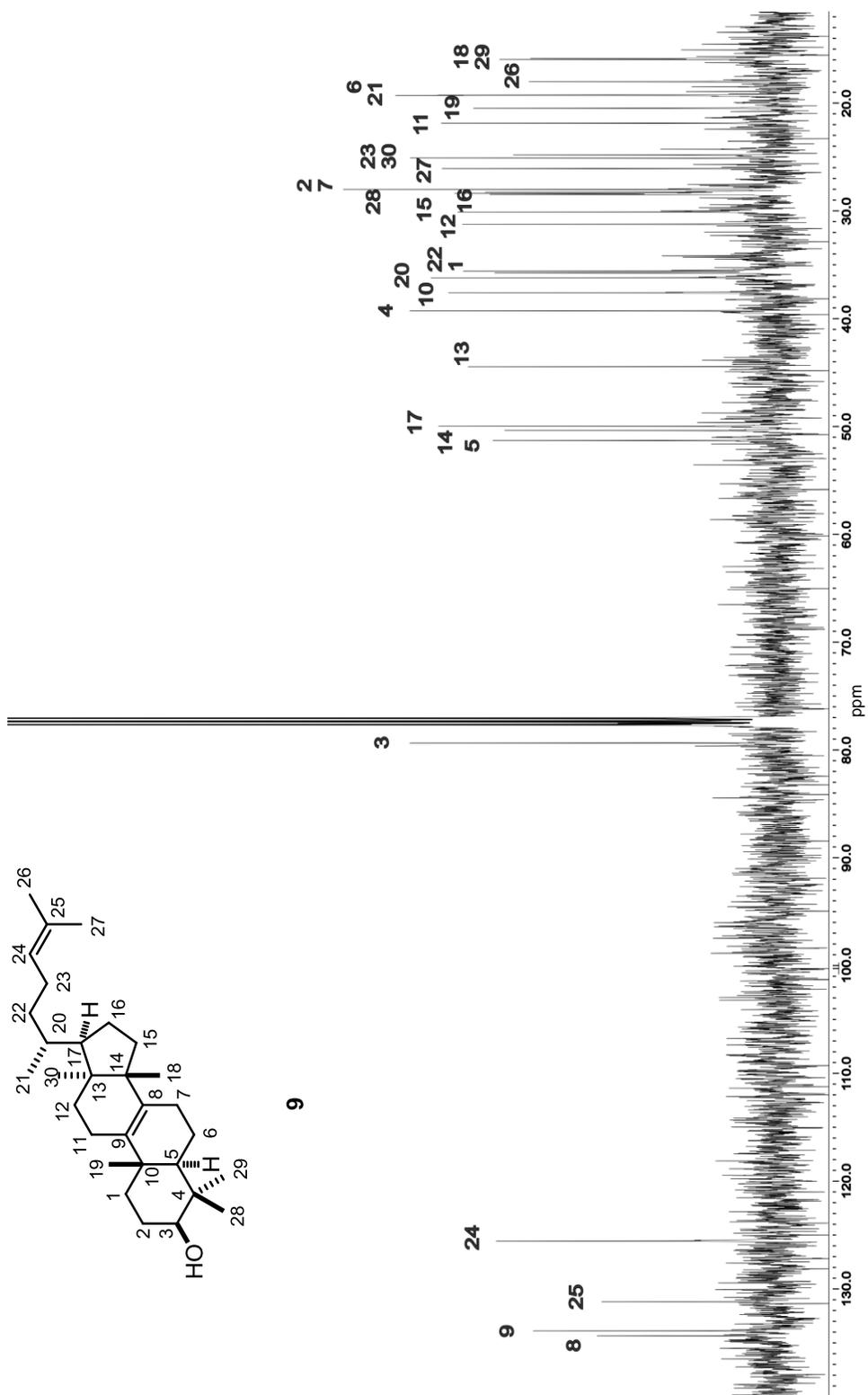


Figura 26. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz) del eufol (9) en CDCl<sub>3</sub>.

La purificación de los eluatos 13-15 mediante sucesivas cromatografías permitió la obtención de una mezcla del acetato de  $\alpha$ -amirina (**10**) y acetato de  $\beta$ -amirina (**11**). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 27) mostró señales características en  $\delta$  5.28 y 5.24 ppm de protón vinílico (H-12), en  $\delta$  4.50 ppm una señal base de éster debida a H-3, a frecuencias bajas se observaron señales simples correspondientes a los metilos terciarios Me-23, Me-28, Me-24, Me-26, Me-29, Me-27, Me-25 y Me-30. Estos triterpenos son sustancias conocidas y sus datos espectroscópicos resultaron iguales a los descritos.<sup>27</sup>

La separación cromatográfica de las fracciones 14-16 (127.6 mg) en gel de sílice utilizando como eluyentes una mezcla  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (9:1), así como la recromatografía de la subfracción en 10-12 condujo al aislamiento de  $\beta$ -sitosterol (**12**). Sus datos de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28) resultaron iguales a los descritos.<sup>28</sup>

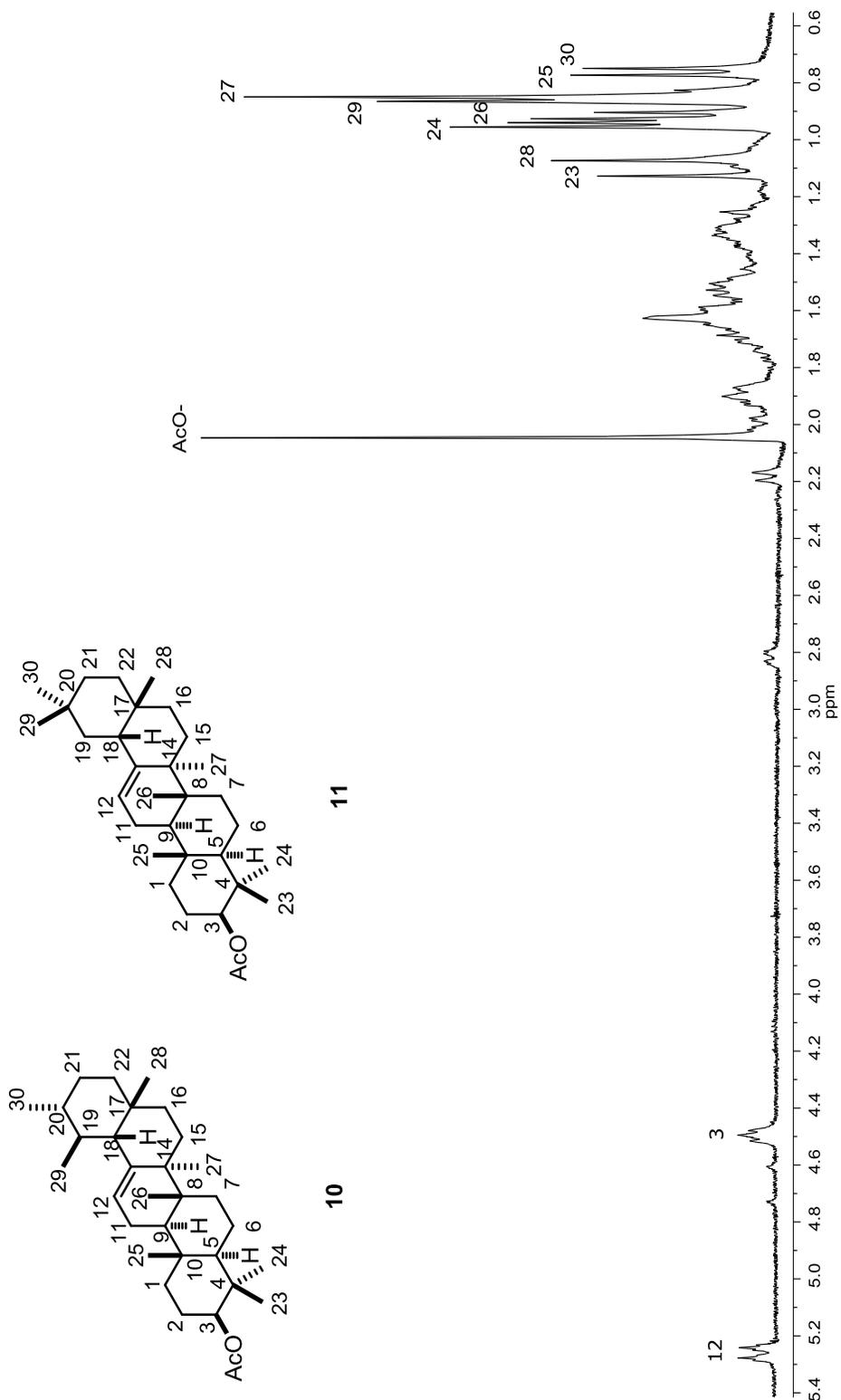


Figura 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de los acetatos  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirinas (**10**) y (**11**) en  $\text{CDCl}_3$ .

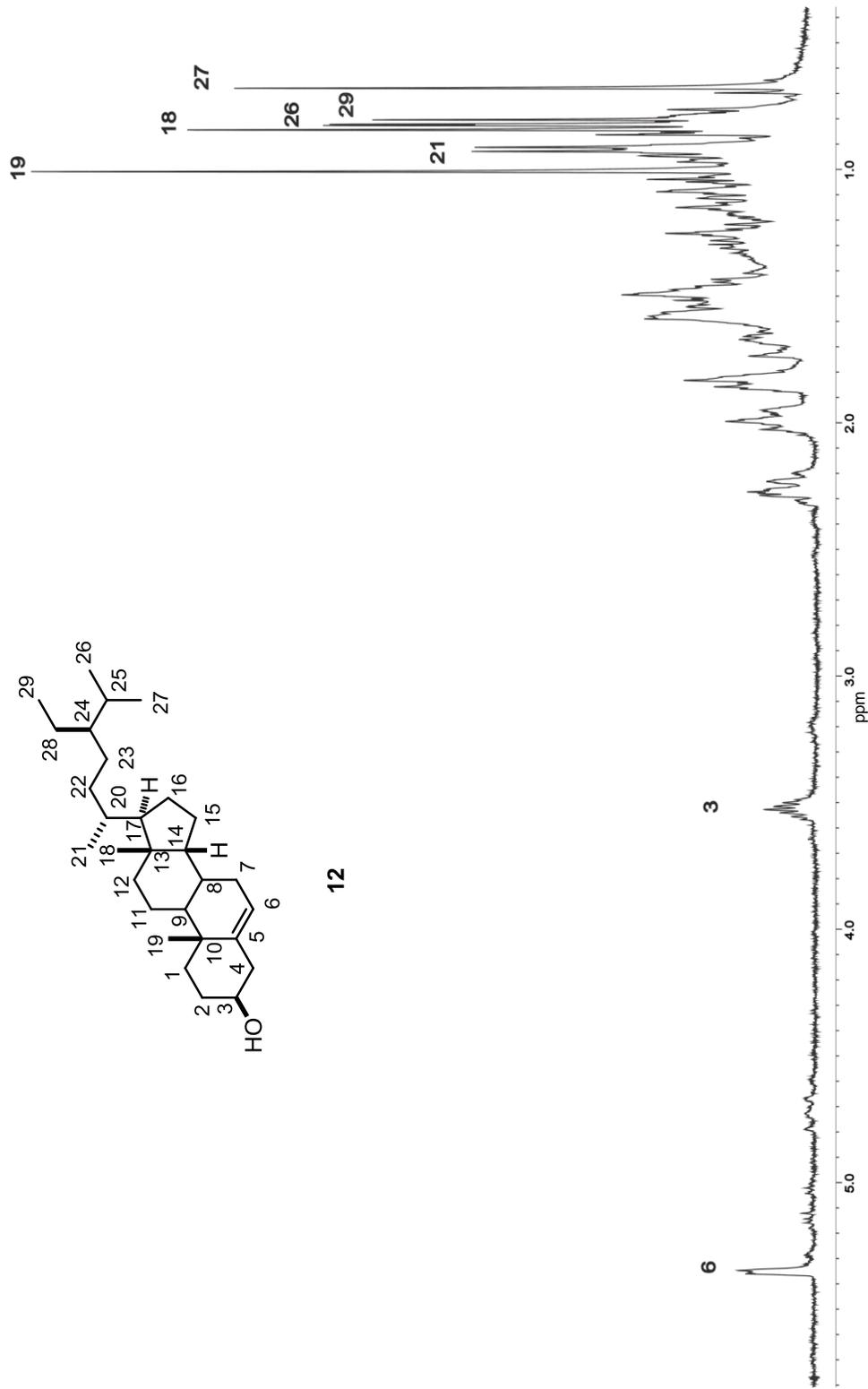


Figura 28. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del  $\beta$ -sitosterol (12) en  $\text{CDCl}_3$ .

De la fracción 21-35 se obtuvieron 21.5 mg en forma de polvo blanco, cuyo espectro de IR mostró una banda característica en  $2500\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  de ácido carboxílico, su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 29) se comparó con el del compuesto **7** en el cual no se observó la señal en  $\delta$  9.65 ppm del protón de aldehído, el resto de los protones presentaron pequeñas modificaciones en cuanto a desplazamiento químico con respecto a **7**. En su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 30) se observó una señal en 182.3 ppm correspondiente a C-28 ahora de ácido carboxílico, lo cual evidenció que esta sustancia se trataba del ácido betulónico (**8**).

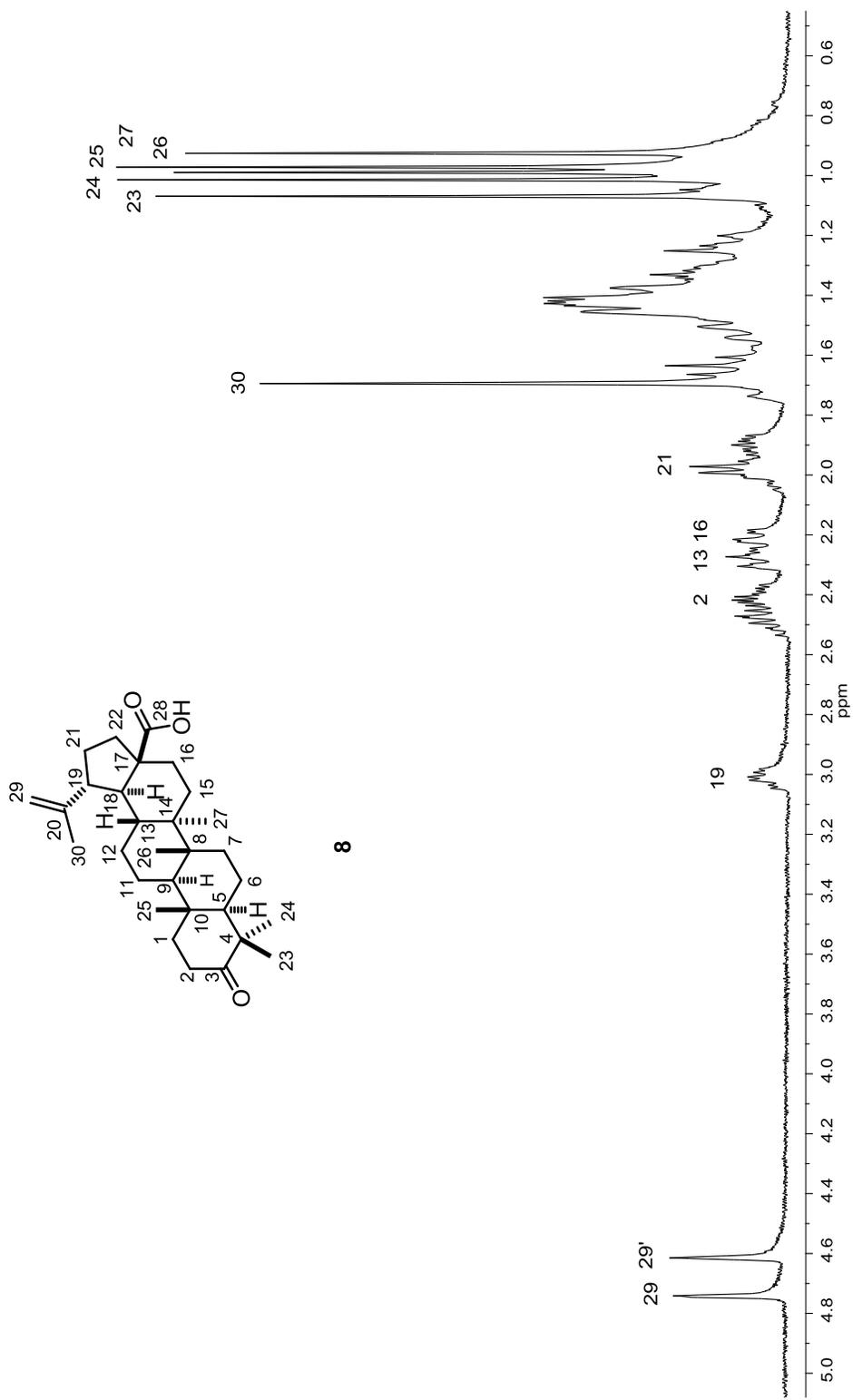


Figura 29. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del ácido betulónico (8) en  $\text{CDCl}_3$ .

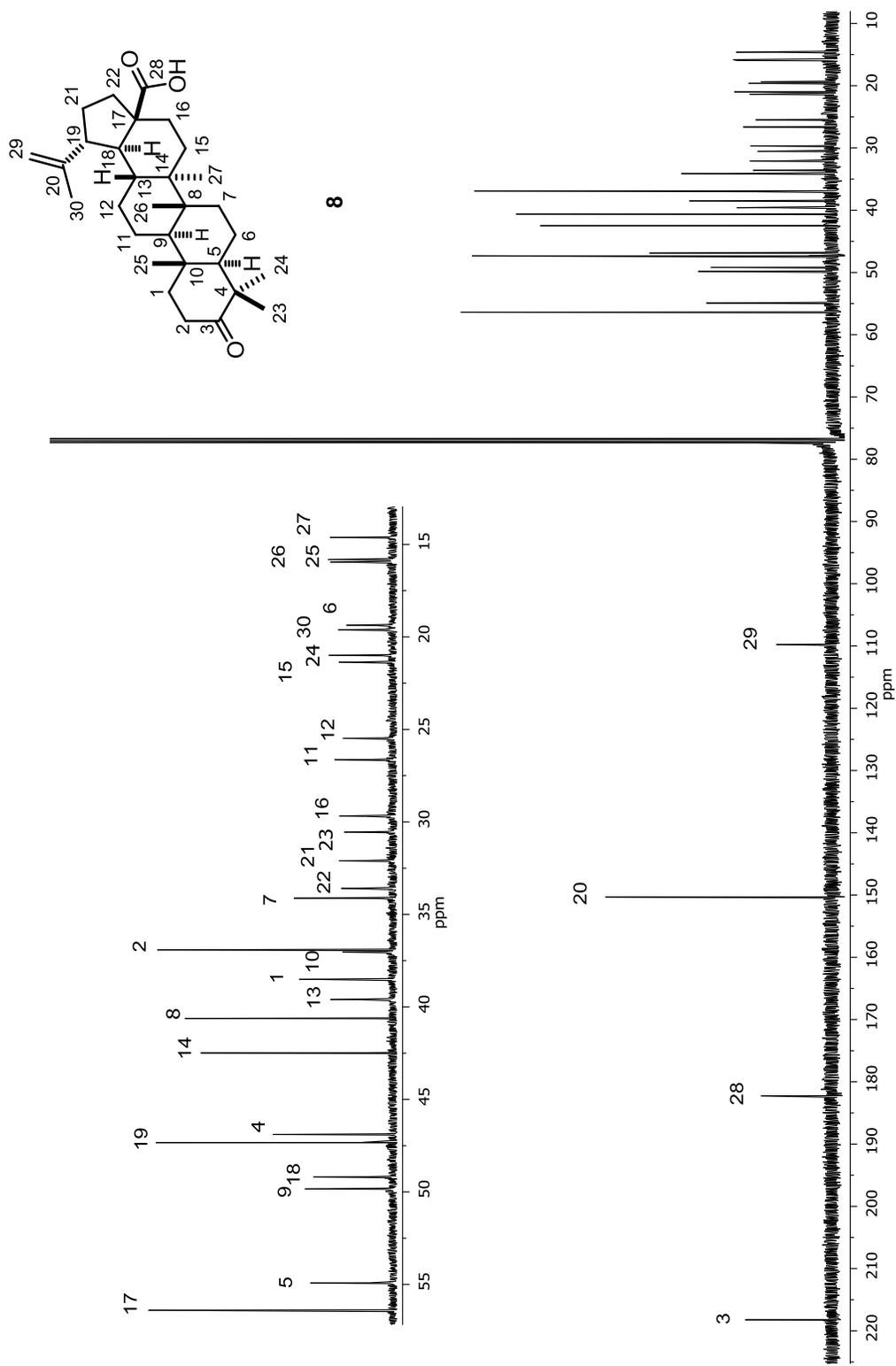


Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del ácido betulónico (8) en  $\text{CDCl}_3$ .

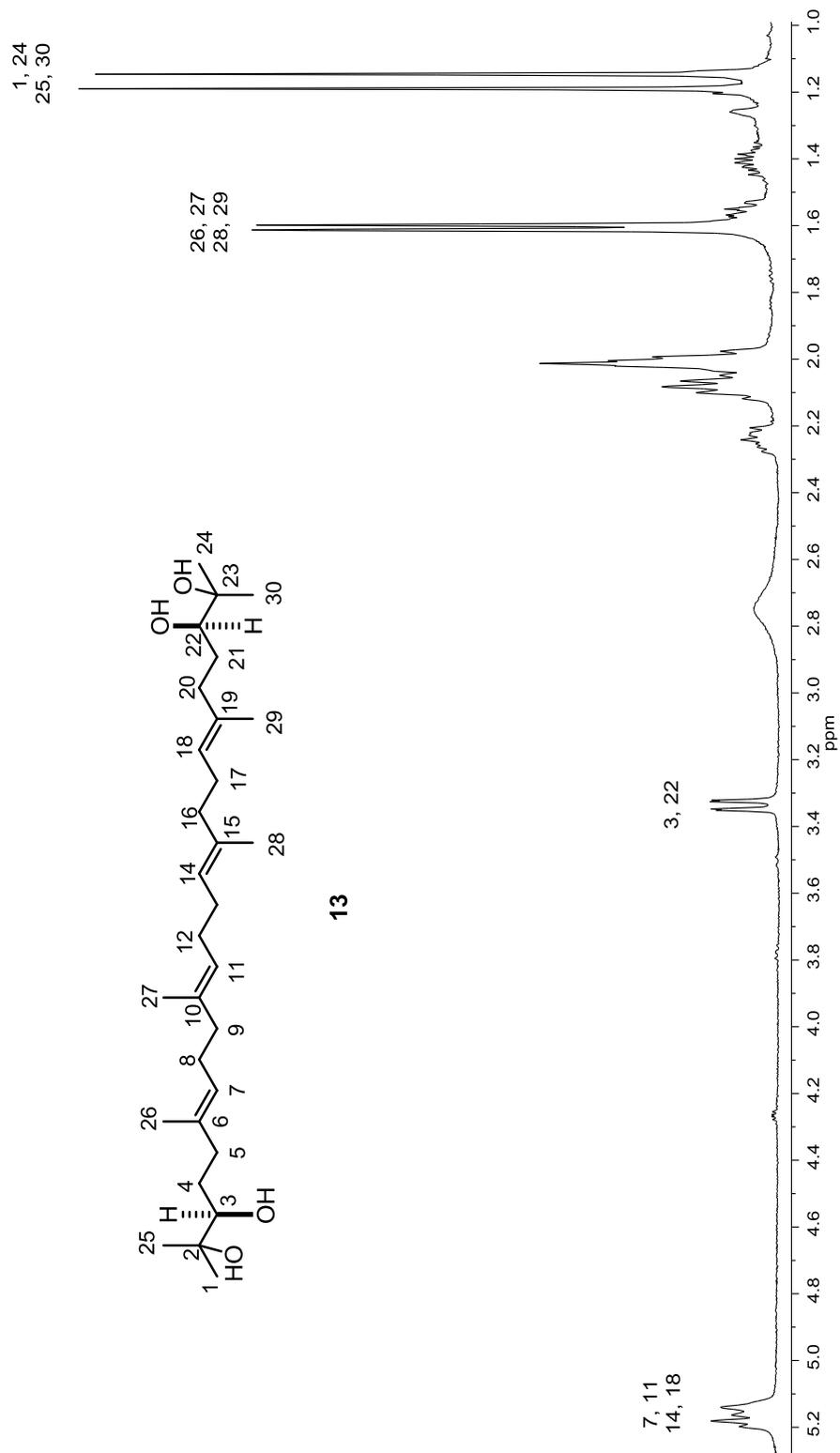
La separación cromatográfica de la fracción 28-35 (1 g), proveniente de la cromatografía en columna (CC) del extracto hexánico empleando gel de sílice y mezclas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (7:3 y 1:1), AcOEt y MeOH, permitió obtener un sólido transparente que mostró  $[\alpha]_D^{20} + 19.6$  (c 2.3,  $\text{CHCl}_3$ ). Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 31) mostró en  $\delta$  5.12 ppm una señal múltiple de protones vinílicos (H-7, H-11, H-14 y H-18), una señal doble de dobles en  $\delta$  3.22 ppm ( $J=10.4$  y 1.6 Hz) característica de un protón base de OH (H-3 y H-22), en  $\delta$  2.2 ppm señales múltiples correspondientes a los metilenos presentes en la molécula, en  $\delta$  1.60 ppm dos señales simples característica de metilos vinílicos (Me-26, Me-27, Me-28 y Me 29), y debido a la simetría de la molécula dos señales simples en  $\delta$  1.20 y 1.12 ppm para los metilos terciarios Me-1, Me-24, Me-25 y Me-30.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) se observaron 15 señales, entre ellas en  $\delta$  135.2 ppm la señal para los carbonos cuaternarios de enlace doble (C-6, C-10, C.15 y C-19), en  $\delta$  125.2 y  $\delta$  124.7 ppm se apreciaron las señales de los carbonos de enlace doble (C-7, C-11, C-14 y C-18), dos señales características de carbonos base de oxígeno en  $\delta$  78.4 y en  $\delta$  73.1 ppm (C-3,C-22,C-2 y C.23). A frecuencias bajas entre  $\delta$  40 y 15 ppm, se observó el resto de las señales características de los carbonos  $\text{sp}^3$ .

El experimento APT (Figura 33) nos permitió definir la naturaleza de cada uno de los carbonos. Así, se evidenció que de las señales de los carbonos  $\text{sp}^2$ , dos de ellas son carbonos cuaternarios (C) de alqueno trisustituido, dos carbonos de metino (CH), las

señales de alcohol terciario (C), otra señal base de oxígeno correspondió a CH y en la zona de carbonos  $sp^3$ , cinco señales corresponden a metilenos ( $CH_2$ ) y 3 señales de carbono de metilos ( $CH_3$ ).

En su espectro de infrarrojo (Anexos), se observó la absorción característica de OH en  $3310\text{ cm}^{-1}$  y la banda de C=C en  $1655\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de masa, el ión molecular  $[M]^+$  se observó en 478 con una intensidad del 10.5 %, lo que permitió corroborar la estructura del compuesto. Esta sustancia se caracterizó completamente por el análisis de sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos<sup>29</sup>, como (+)-2,3,22,23-tetrahidroxiesqualeno (**13**).



**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz) del (+)-2,3,22,23-tetrahidroxisqualeno (**13**) en  $\text{CDCl}_3$ .

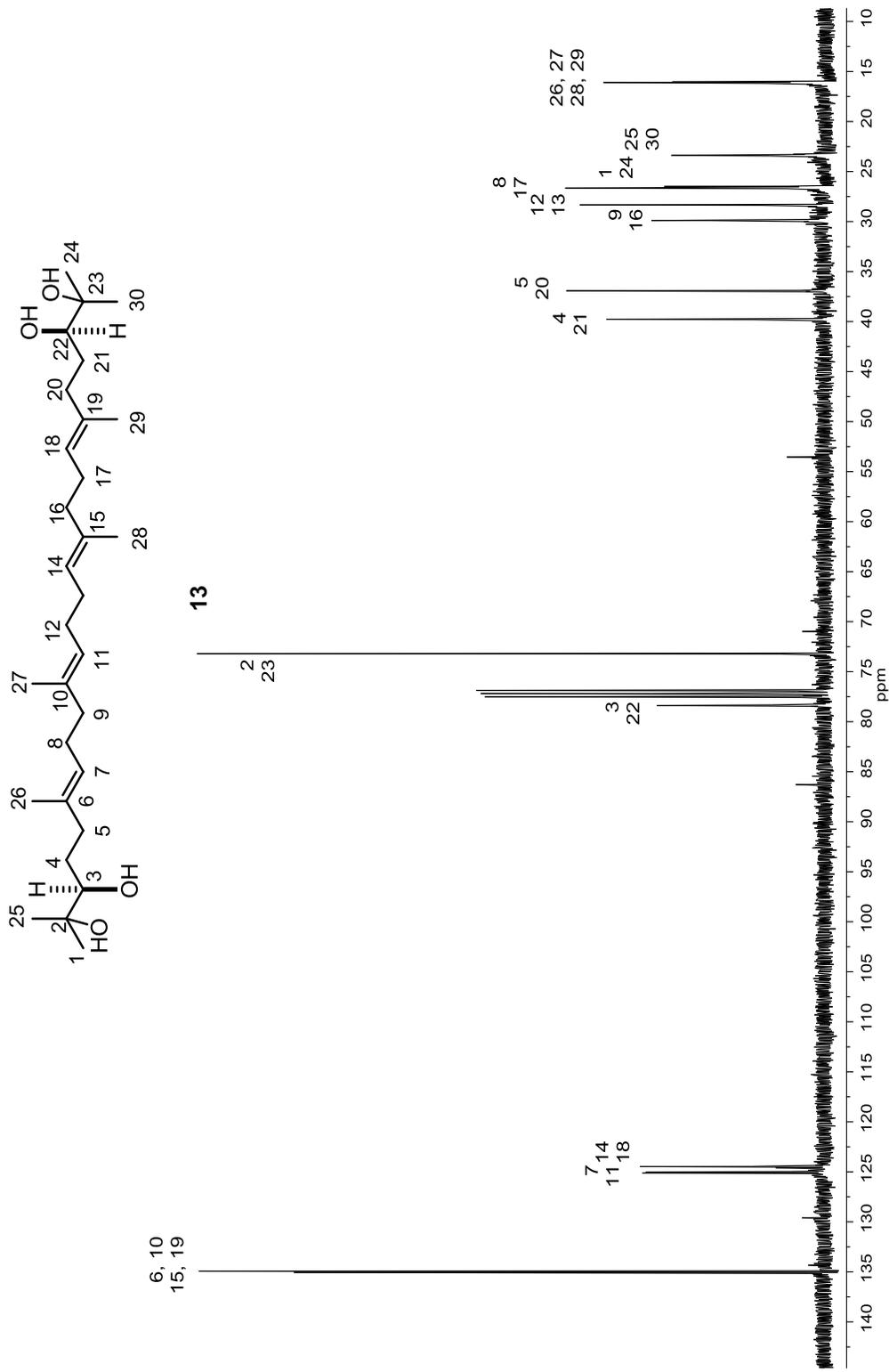


Figura 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (100 MHz) del (+)-2,3,22,23-tetrahydroescualeno (13) en CDCl<sub>3</sub>.

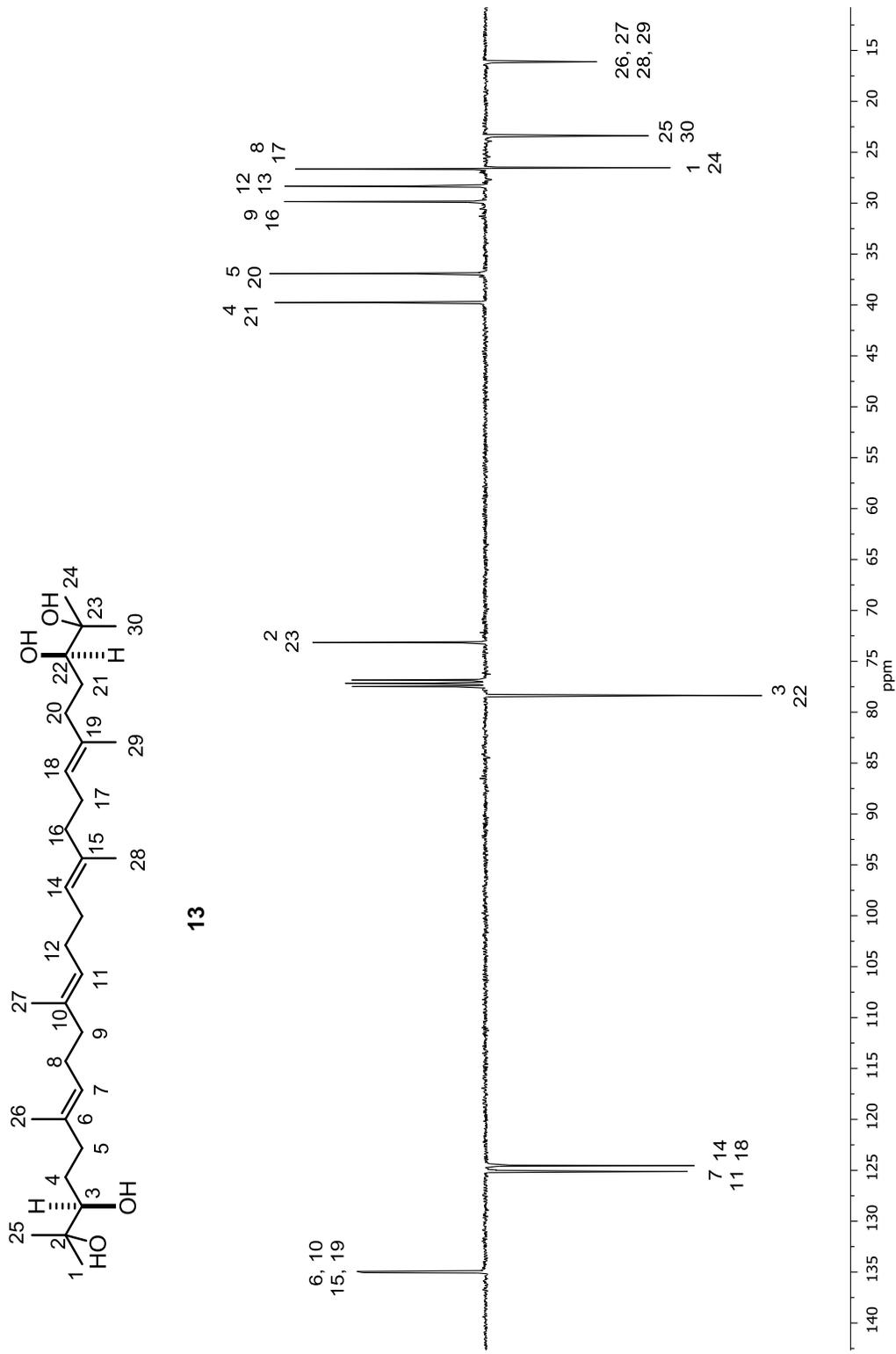


Figura 33. Espectro de RMN APT del (+)-2,3,22,23-tetrahidroescualeno (13) en CDCl<sub>3</sub>.

## 5.6 Separación cromatográfica del extracto AcOEt de los tallos de *Bursera morelensis*.

El extracto de AcOEt se disolvió en MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1), posteriormente se hicieron reextracciones con AcOEt obteniéndose dos subfracciones etiquetadas como parte insoluble y parte soluble de AcOEt.

### 5.6.1 Separación de la parte insoluble de AcOEt.

Una alícuota (2.2 g) se sometió a cromatografía en columna, empleando gel de sílice y como eluyentes mezclas de hexano-AcOEt (9:1, 7:3 y 1:1), AcOEt y MeOH. En la fracción 4 se obtuvo un polvo blanco, que mostró  $[\alpha]_D^{20} + 47$  (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>) y que se caracterizó con base en sus datos de RMN como betulonal (**7**) (Figura 23). De igual forma, en la fracción 6 se obtuvo otro compuesto en forma de cristales, el cual se caracterizó como eufol (**9**) (Figura 25). Estos dos compuestos ya se habían identificado en la separación cromatográfica del extracto hexánico.

### 5.6.2 Separación cromatográfica de la parte soluble de AcOEt.

Una alícuota (4.2 g) se sometió a cromatografía en columna en gel de sílice y mezclas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (7:3; 1:1 y 3:7), AcOEt, AcOEt-MeOH (1:1) y MeOH. Por sucesivas cromatografías de la fracción 18-29 se obtuvo un sólido amarillo (7.3 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 19.7$  (*c* 0.7, MeOH). Cuya caracterización se llevó a cabo mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos<sup>30, 31</sup> como (-)-naringenina (**14**). Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 34 y Tabla 4) mostró en  $\delta$  12.15 ppm una señal simple asignada al HO-C-5, una señal doble ( $J=8.5$  Hz) en  $\delta$  7.38 ppm que integró para dos protones (H-2' y H-6'), en  $\delta$  6.90 ppm una señal doble ( $J=8.5$  Hz) asignada a los protones H-3' y H-5', en  $\delta$  5.96 y 5.95 ppm se apreciaron dos señales simples correspondientes a H-6 y H-8, una señal doble de dobles ( $J=12.9$  y 3.0 Hz) en  $\delta$  5.46 ppm asignada a H-2, una señal doble de dobles ( $J=17.1$  y 12.9 Hz) en  $\delta$  3.19 ppm para el protón H-3 $\alpha$  y en  $\delta$  2.73 ppm una señal doble de dobles ( $J=17.1$  y 3.0 Hz) correspondiente al protón H-3 $\beta$ .

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 35 y Tabla 4) se observaron 15 señales, entre ellas las más significativas en  $\delta$  196.8 ppm una señal característica de un carbonilo de cetona (C-4), 4 señales típicas de carbonos aromáticos base de oxígeno en  $\delta$  166.5, 164.8, 163.5 y 159.6 ppm que correspondieron a C-7, C-6, C-9 y C-4', respectivamente, 7 señales características de carbonos aromáticos entre  $\delta$  130.3 y 95.5 ppm para el resto de los carbonos de los anillos aromáticos y 2 señales más en la zona de carbonos  $\text{sp}^3$ , en  $\delta$  79.0 ppm (C-2) y  $\delta$  42.6 ppm (C-3). Para corroborar la asignación

de las señales tanto en el espectro de protón como en el de  $^{13}\text{C}$  se hizo uso de los experimentos bidimensionales HMQC y HMBC en los cuales se observa el acoplamiento entre hidrógenos y carbonos a un enlace (HMQC) y a dos y tres enlaces (HMBC).

El espectro HMBC de **14** (Figura 36) presentó la correlación a tres enlaces entre H-6' y H-2' con C-4', así como H-3' y H-5' con C-1', también se observó la correlación de H-6 con C-10, la correlación de H-8 con C9', así como la de H-3' con C-1'. El protón de hidroxilo en C-5 mostró la correlación con su señal respectiva en  $^{13}\text{C}$ .

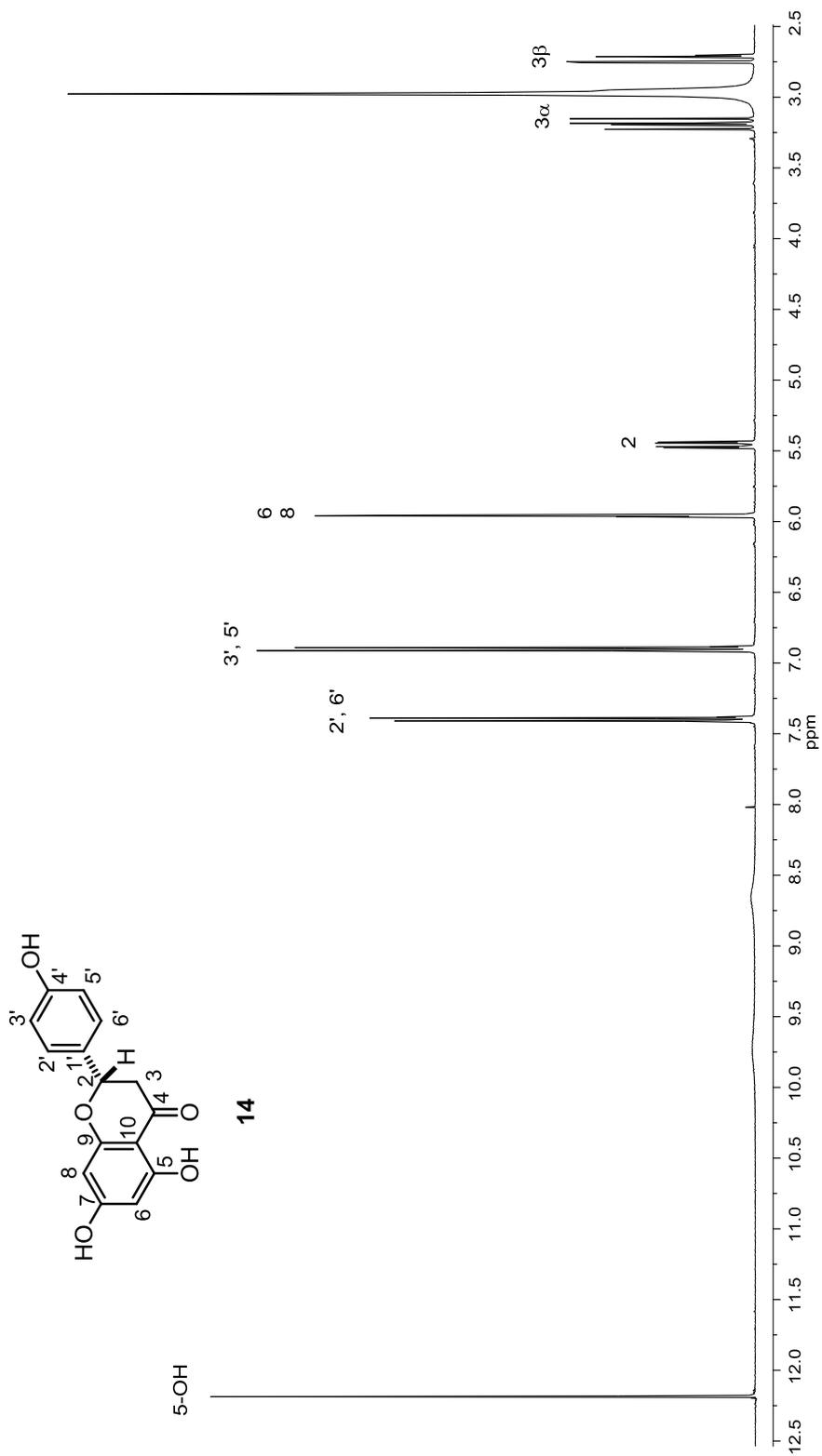


Figura 34. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) de la (-)-naringenina (14) en acetona- $d_6$ .

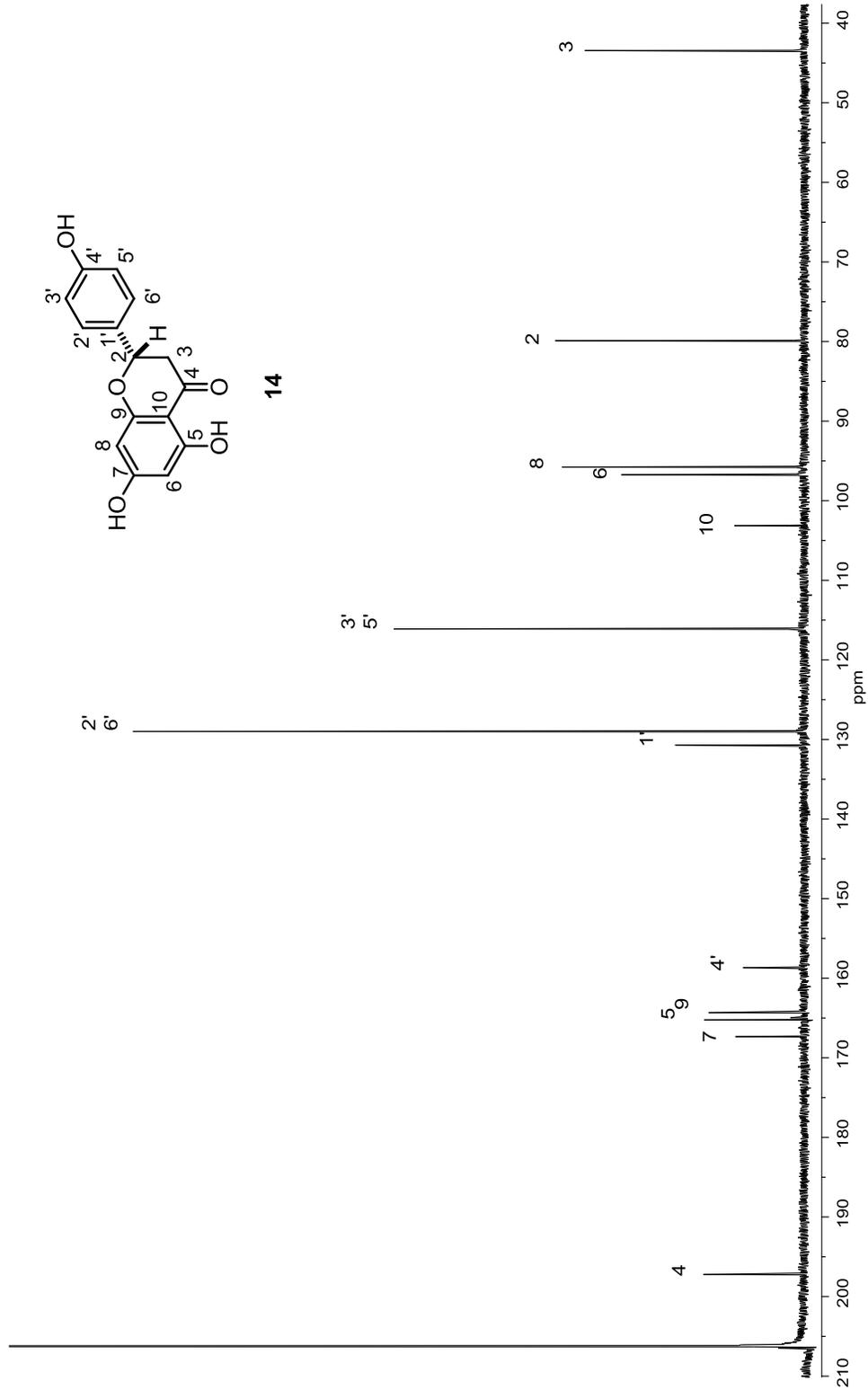


Figura 35. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de la (-)-naringenina (14) en acetona- $d_6$ .

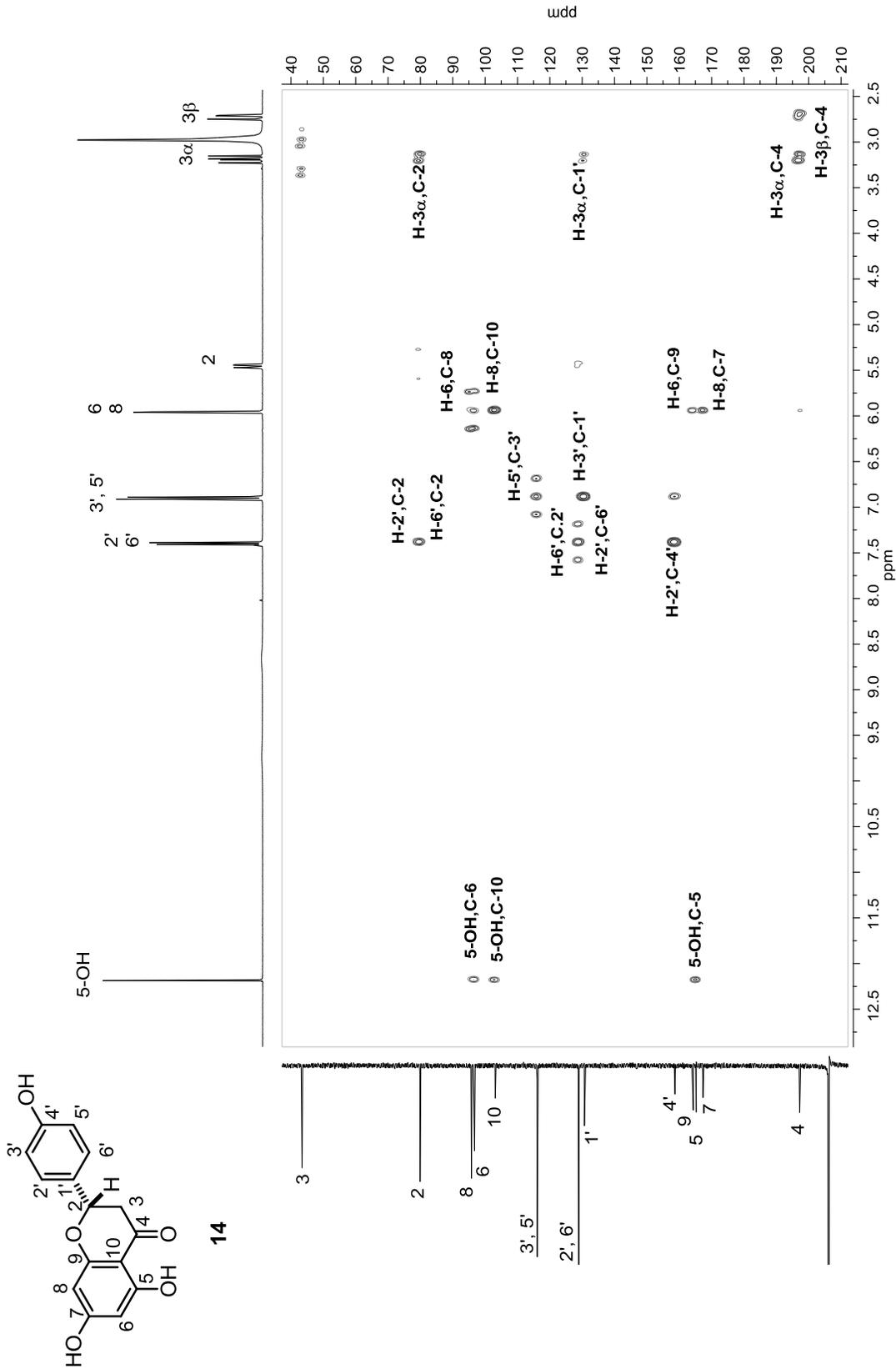


Figura 36. Espectro HMBC de la (-)-naringenina (14) en acetona- $d_6$ .

**Tabla 4.** Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz) de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 400 MHz y 100 MHz) de la (-)-naringenina (**14**).

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	5.46 ( <i>dd</i> , 12.9, 3.0)	79.0
3	3.19 ( <i>dd</i> , 17.1, 12.9) 2.73 ( <i>dd</i> , 17.1, 3.0)	42.6
4		196.8
5		164.8
6	5.96 ( <i>s</i> )	95.9
7		166.5
8	5.95 ( <i>s</i> )	94.9
9		163.5
10		102.3
1'		130.3
2'	7.38 ( <i>d</i> , 8.5)	128.6
3'	6.90 ( <i>d</i> , 8.4)	115.3
4'		159.6
5'	6.90 ( <i>d</i> , 8.4)	115.3
6'	7.38 ( <i>d</i> , 8.5)	128.1
5-OH	12.19 ( <i>s</i> )	

### **5.7 Determinación de la configuración absoluta de la podofilotoxina (15) y la deoxipodofilotoxina (3) mediante dicroísmo circular vibracional (DCV).**

El modelo molecular de la podofilotoxina (15) obtenida comercialmente y la deoxipodofilotoxina (3) obtenida en este trabajo se construyó utilizando el programa Spartan '04, para posteriormente llevar a cabo un análisis de distribución conformacional empleando el método Monte Carlo con Mecánica Molecular. Luego, se hizo una estimación de la energía con la teoría de funcionales de la densidad (DFT), usando B3LYP/6-31G\*, seguido por optimización de la geometría a temperatura ambiente usando B3LYP/DGDZVP. Finalmente, se calculó el espectro de DCV teórico mediante la ponderación de los mínimos energéticos obtenidos; que al ser comparado con el espectro experimental, se observó una buena correlación en las bandas principales del espectro. De tal manera que la configuración absoluta quedó establecida como se dibuja en las estructuras **3** y **15**. En las Figuras 37 y 38 se muestran los principales conformeros obtenidos en este estudio, mientras que en la Tabla 5 y Tabla 6 se muestra el análisis termodinámico obtenido para **3** y **15**. Además en la Figura 39 y Figura 40 se muestran los espectros de DCV teórico y experimental.

Tabla 5. Análisis termodinámico de la deoxipodofilotoxina (3).

Confórmero	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	$\%_{\text{MMFF}}^{\text{b}}$	$\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$	$\%_{\text{DFT}}^{\text{d}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{e}}$	$\%_{\text{OPT}}^{\text{f}}$
<b>3a</b>	1.466	2.23	2.635	0.51	0.000	24.33
<b>3b</b>	0.000	26.46	0.731	12.75	0.078	21.33
<b>3c</b>	1.400	2.49	0.000	43.81	0.094	20.76
<b>3d</b>	0.108	22.05	2.970	0.29	0.409	12.20
<b>3f</b>	1.323	2.83	0.294	26.67	0.827	6.02
<b>3g</b>	1.150	3.80	1.822	2.02	0.835	5.94
<b>3h</b>	0.481	11.76	4.180	0.04	0.887	5.44
<b>3i</b>	1.691	1.52	4.590	0.02	1.311	2.66
<b>3j</b>	1.134	3.90	0.819	10.99	1.732	1.31
<b>3k</b>	3.040	0.16	5.329	0.01	3.058	0.14
<b>3l</b>	0.088	22.80	1.611	2.89	3.501	0.07

<sup>a</sup> Energía de mecánica molecular relativa a **3a** con  $E_{\text{MMFF}} = 80.6219441$  kcal/mol.

<sup>b</sup> % de población calculada a partir de las energías con MMFF de acuerdo a  $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$ .

<sup>c</sup> Cálculo de energía B3LYP/6-31G(d) a 0 K relativas a **3a** con  $E_{6-31G(d)} = -864762.177$  kcal/mol.

<sup>d</sup> % de población calculada a nivel B3LYP/6-31G(d) de acuerdo a  $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$ .

<sup>e</sup> Energía libre de Gibbs relativa a **3a** con  $G_{\text{DGDZVP}} = -864,656.662784$  kcal/mol.

<sup>f</sup> % de población calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo a  $\Delta G = -RT \ln K$ .

**Tabla 6.** Análisis termodinámico de la podofilotoxina (**15**).

Confórmero	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	$\%_{\text{MMFF}}^{\text{b}}$	$\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$	$\%_{\text{DFT}}^{\text{d}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{e}}$	$\%_{\text{OPT}}^{\text{f}}$
<b>15a</b>	0.000	27.21	0.039	26.101	0.000	35.13
<b>15b</b>	1.819	1.26	0.283	17.290	0.286	21.69
<b>15c</b>	0.053	24.88	1.008	5.085	0.407	17.68
<b>15d</b>	4.665	0.01	3.857	0.041	1.106	5.43
<b>15e</b>	1.572	1.92	0.631	9.609	1.143	5.10
<b>15f</b>	1.574	1.91	1.652	1.715	1.146	5.08
<b>15g</b>	0.472	12.27	3.590	0.065	1.477	2.90
<b>15h</b>	3.456	0.08	0.884	6.269	1.622	2.27
<b>15i</b>	1.867	1.16	2.394	0.490	1.706	1.97
<b>15j</b>	2.854	0.22	1.715	1.542	1.868	1.50
<b>15k</b>	3.183	0.13	1.438	2.461	1.985	1.23
<b>15l</b>	3.144	0.13	2.422	0.467	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
<b>15m</b>	2.896	0.20	2.560	0.370	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
<b>15n</b>	2.862	0.22	3.853	0.042	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
<b>15o</b>	3.641	0.06	0.000	27.877	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
<b>15p</b>	3.160	0.13	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
<b>15q</b>	1.792	1.32	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
<b>15r</b>	0.036	25.60	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Energía de mecánica molecular relativa a **15a** con  $E_{\text{MMFF}} = 74.7708525$  kcal/mol.

<sup>b</sup> % de población calculada a partir de las energías con MMFF de acuerdo a  $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$ .

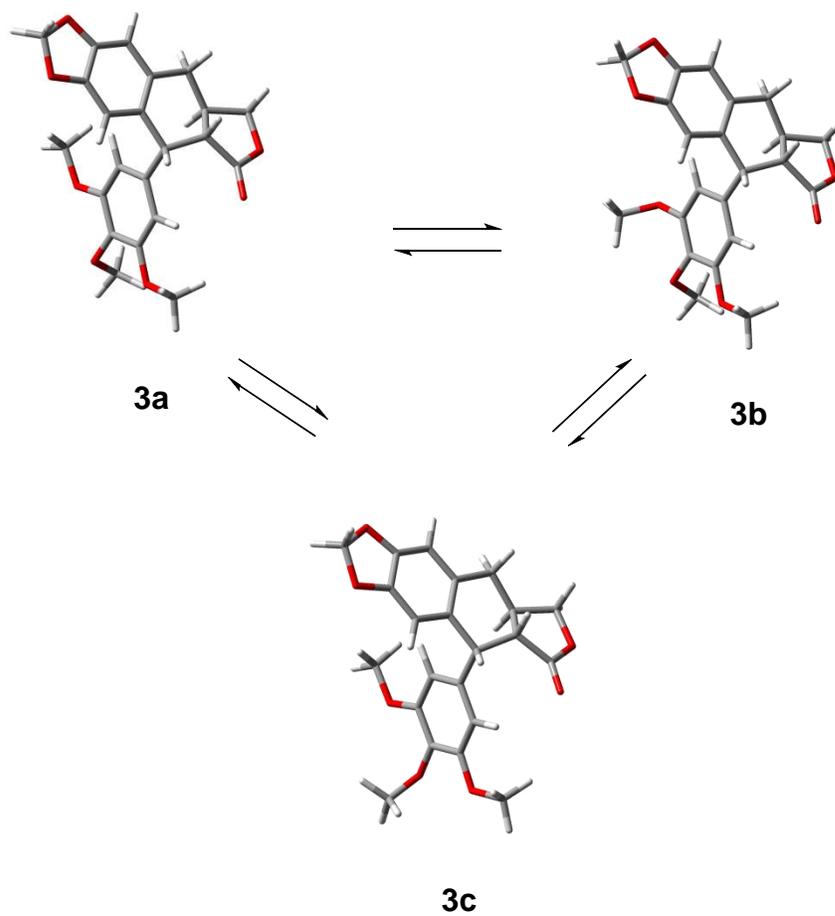
<sup>c</sup> Cálculo de energía B3LYP/6-31G(d) a 0 K relativas a **15a** con  $E_{6-31G(d)} = -911896.764$  kcal/mol.

<sup>d</sup> % de población calculada a nivel B3LYP/6-31G(d) de acuerdo a  $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$ .

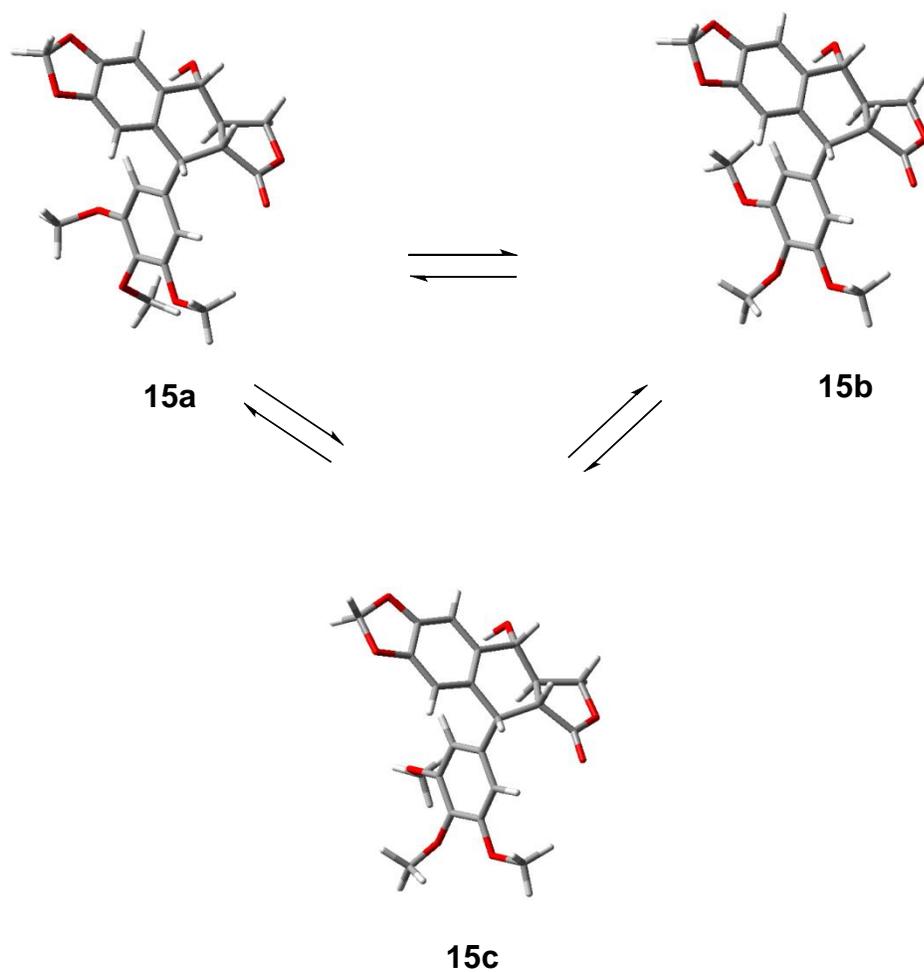
<sup>e</sup> Energía libre de Gibbs relativa a **15a** con  $G_{\text{DGDZVP}} = -911,862.029994$  kcal/mol.

<sup>f</sup> % de población calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo a  $\Delta G = -RT \ln K$ .

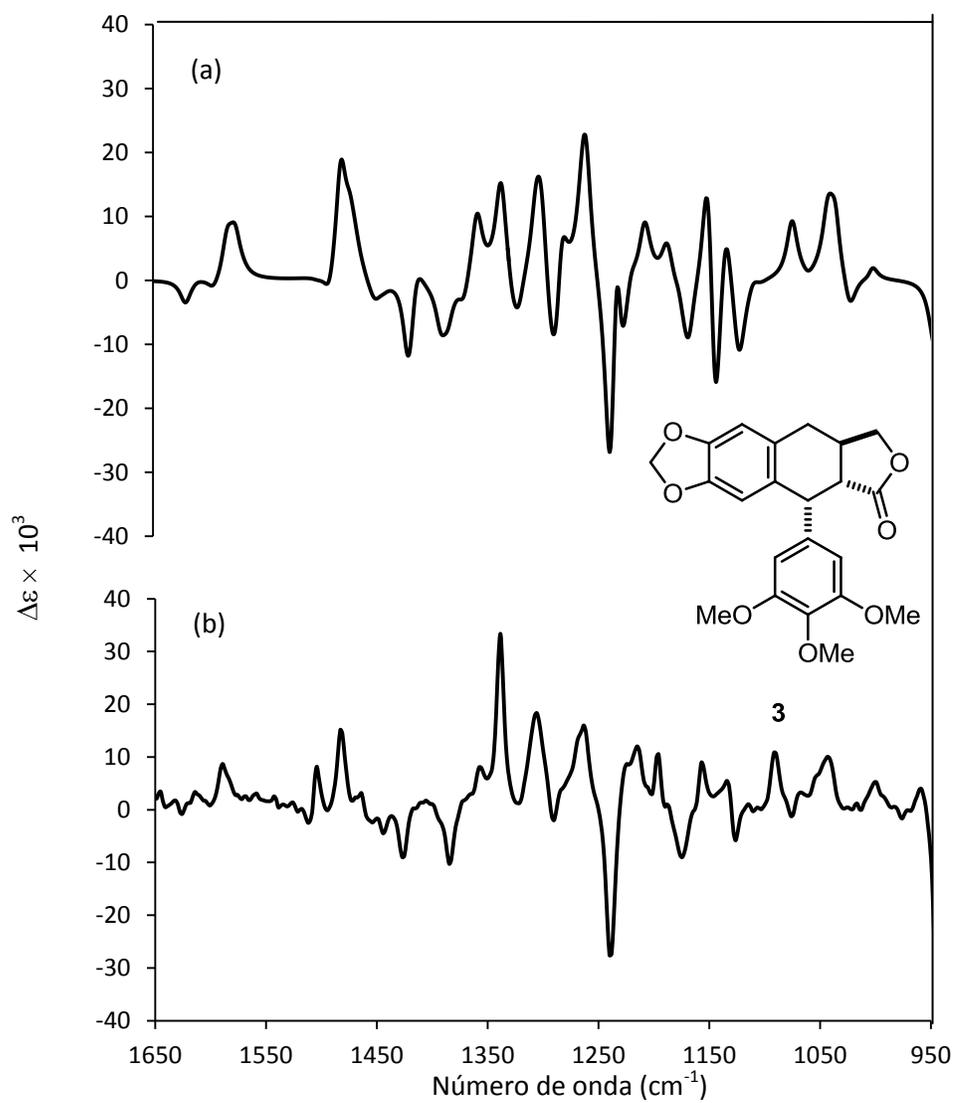
<sup>g</sup> No calculada.



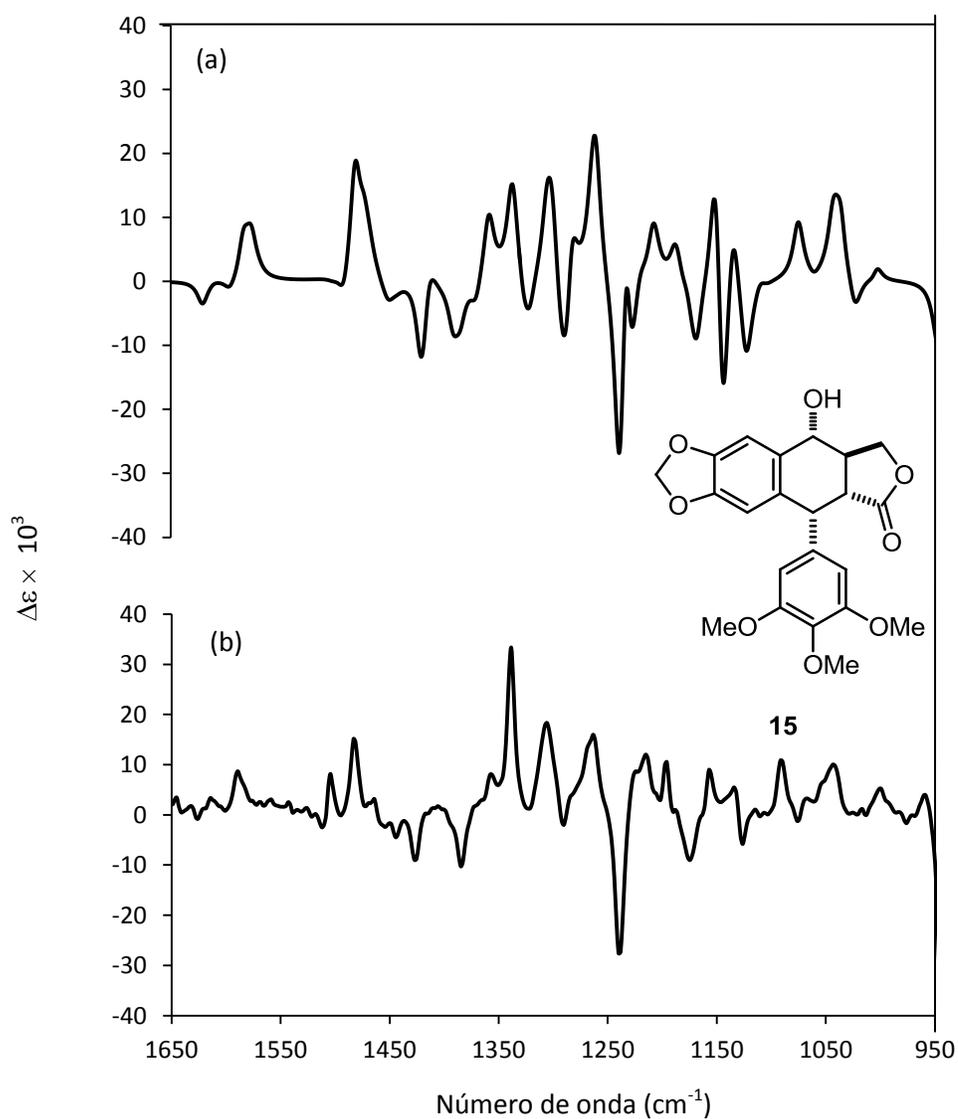
**Figura 37.** Principales confórmeros de la (-)-deoxipodofilotoxina (**3**).



**Figura 38.** Principales conformeros de la (-)-podofilotoxina (**15**).



**Figura 39.** (a) Espectro teórico (DFT, B3LYP/DGDZVP) y (b) Espectro Experimental de la (-)-deoxipodofilotoxina (**3**).



**Figura 40.** (a) Espectro teórico (DFT, B3LYP/DGDZVP) y (b) Espectro Experimental de la podofilotoxina (**15**).

## 6. CONCLUSIONES.

La separación cromatográfica del extracto etanólico de la resina de *Bursera fagaroides* condujo al aislamiento de los lignanos **1- 4** y el diterpeno **5**, los cuales se caracterizaron mediante sus datos físicos y espectroscópicos y por comparación con datos descritos.

La separación cromatográfica del extracto hexánico de tallos de *Bursera morelensis* condujo al aislamiento del monotepeno **6** y los triterpenos **7-13**. El triterpeno **13** es un producto natural que no había sido aislado del género *Bursera*. Del extracto de AcOEt de esta misma parte se aisló la flavona naringenina (**14**).

Se determinó de la configuración absoluta del lignano (**3**) y podofilotoxina (**15**) mediante dicroísmo circular vibracional, en la cual **3** presentó la misma configuración que el compuesto citotóxico **15**.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL.

### 7.1 General.

Los espectros de IR se determinaron en  $\text{CHCl}_3$  en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2000 FT-IR, los espectros de DCV se obtuvieron en un espectrofotómetro Chiral/IR FT-VCD marca BioTools, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz y 300 MHz) y de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz y 75 MHz), incluyendo los experimentos APT, HSQC, HMBC se determinaron en los equipos JEOL 400 Eclipse y Varian Mercury 300 y Varian 400, usando como disolventes  $\text{CDCl}_3$  y acetona- $d_6$ . Los espectros de masa se obtuvieron en un espectrómetro de masa Varian 220 acoplado a un cromatógrafo de gases Varian 450-GC, por medio de impacto electrónico a 70 eV. Las rotaciones específicas se determinaron en  $\text{CHCl}_3$  en un polarímetro Perkin-Elmer 341 y los puntos de fusión se determinaron en un equipo Büchi B-540.

### 7.2 Colecta de *Bursera fagaroides* (H.B.K.) y *Bursera morelensis*.

a) Colecta de fuentes vegetales.

La colecta de resinas de la especie *Bursera fagaroides* (H.B.K.) y la colecta de tallos de la especie *Bursera morelensis* se llevó a cabo en el km 95 Iguala-Chilpancingo, Guerrero, México, en julio de 2009. Ambos especímenes se prepararon y se enviaron al Herbario del Instituto de Ecología, A. C., Centro Regional del Bajío en Pátzcuaro, Mich. para su identificación botánica por parte del Prof. Jerzy Rzedowski, con

número de especimen: Juan Diego Hernández 236 para *B. fagaroides* y Juan Diego Hernández 237 para *B. morelensis*.

### 7.3 Obtención de extractos.

a) Obtención del extracto de la resina.

Las resinas (64 g) se pulverizaron en un mortero, después se colocaron a reflujo con etanol (250 mL) por 4 h. Posteriormente, el extracto se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener 46 g de una miel color amarillo.

b) Obtención de los diferentes extractos de tallos.

Los tallos frescos y cortados en pequeños canutos (10 kg) se sometieron a maceración con hexano (12 L) por 4 semanas, al término de las cuales, el extracto se filtró y se concentró en el rotavapor. Este procedimiento se repitió una vez más para obtener 20 g de producto. Luego se repitió con AcOEt y MeOH mediante extracciones secuenciales para obtener 32 g del extracto de AcOEt y 40 g del extracto metanólico. El extracto de AcOEt se disolvió en MeOH-H<sub>2</sub>O, posteriormente se extrajo con AcOEt, se filtró y se concentró obteniéndose 13 g de extracto soluble y una parte insoluble (5 g).

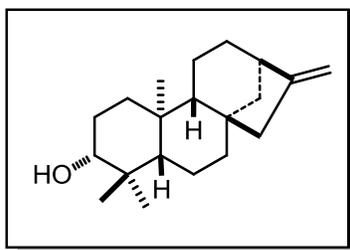
### 7.4 Obtención de compuestos.

Para los análisis cromatográficos se siguieron las técnicas convencionales, utilizando cromatofolios de gel de sílice soportada en aluminio Merck 60 F<sub>254</sub>, y como revelador

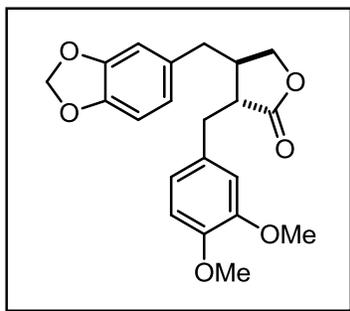
luz UV de onda corta (254) y de onda larga (365), además de sulfato cérico amoniacal preparado con 12 g de sulfato cérico amoniacal, 22.5 mL de ácido sulfúrico y 350 g de hielo.

#### 7.4.1. Separación cromatográfica del extracto etanólico de la resina de *Bursera fagaroides*.

Una alícuota del extracto de EtOH (1.2 g) se sometió a cromatografía empleando una columna de vidrio de 5 cm de diámetro interno, gel de sílice (6 pulgadas, 230-400 mesh ASTM) y como eluyentes mezclas de hexano-AcOEt (4:1, 500 mL, 7:3, 800 mL y 1:1, 150 mL), AcOEt (200 mL) y MeOH (300 mL). Se colectaron eluatos de 20 mL para obtener un total de 84 fracciones, las cuales se analizaron mediante CCF para su agrupación.

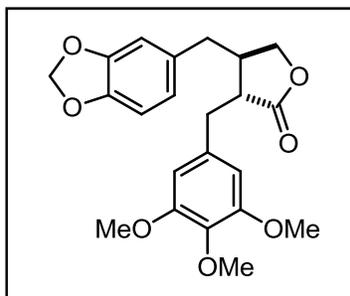


(-)-**ent-Kaurenol (5)**. La separación cromatográfica de la fracción 16-21 (27.6 mg) empleando una columna de vidrio de 2 cm de diámetro interno, gel de sílice (13 g, 230-400 mesh ASTM) y como eluyentes mezclas de hexano-AcOEt (9:1 300 mL y 4:1 200 mL), AcOEt (80 mL) y MeOH (100 mL) y colectando eluatos de 10 mL, permitió obtener un total de 50 fracciones que se analizaron por CCF. En la fracción 5 se obtuvo el compuesto **5** como un polvo blanco (7.3 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 49.2$  (c 0.59, CHCl<sub>3</sub>). Los datos de RMN se muestran en la Tabla 1.



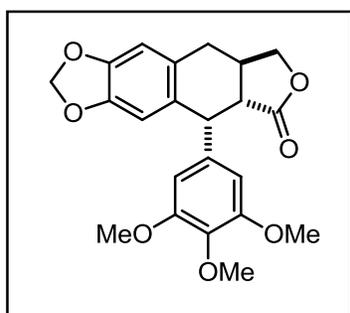
(-)-**8'-Desmetoxyateina (1)**. Las fracciones 44-53 (121.7 mg) se recromatografiaron en gel de sílice (15 g, 70-230 mesh ASTM) y usando mezclas de hexano-AcOEt (4:1, 250 mL y 1:1, 150 mL) y AcOEt (100 mL) y colectando eluatos de 10 mL. De la fracción 20 se obtuvieron 10 mg

(0.83%) del lignano **1** en forma de una miel transparente, que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 33.1$  ( $c$  1.1,  $\text{CHCl}_3$ ). Este compuesto se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos<sup>22</sup>. Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se muestran en la Tablas 2 y 3.



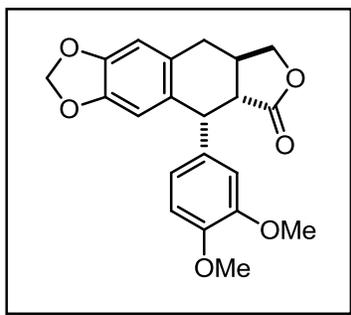
(-)-**Yateina (2)**. Las fracciones 54-67 se recromatografiaron en gel de sílice (15 g, 70-230 mesh ASTM) y mezclas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (95:5, 370 mL y 9:1, 300 mL) y MeOH (200 mL) como eluyentes. De la fracción 12-20 se obtuvieron 12 mg de **2** (1%) en forma de una

miel transparente, con  $[\alpha]_D^{20} - 33.2$  ( $c$  .91,  $\text{CHCl}_3$ ). RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , ver Tablas 2 y 3.



(-)-**Deoxipodofilotoxina (3)**. Las fracciones 64-69 (97.7 mg) se analizaron mediante CCF y UV observándose dos bandas con  $R_f$  de 0.57 y 0.68 que fueron purificadas por CCF en una placa de 10 x 20 cm, la cual se corrió con  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (4:1). De la banda de  $R_f$  0.57 se obtuvo una

miel transparente (10 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 95.2$  (c 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ) y que correspondió al lignano **3**. Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se muestran en las Tablas 2 y 3.

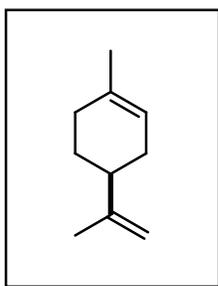


(-)-**8'-Desmetoxideoxipodofilotoxina (4)**. De la banda con  $R_f$  0.68 de la CCF anterior se obtuvo una miel blanquecina (6.2 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 127.2$  (c 0.36,  $\text{CHCl}_3$ ). Del análisis de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , así como de la comparación con datos descritos<sup>23</sup> se concluyó que se

trataba del lignano (-)-desmetoxideoxipodofilotoxina **4**.

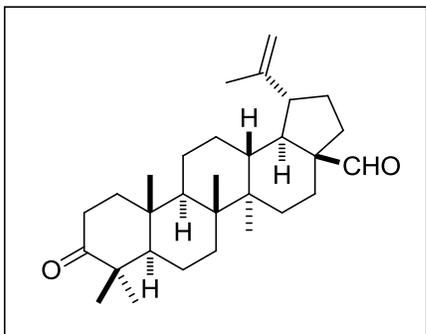
#### 7.4.2 Separación cromatográfica del extracto hexánico de los tallos de *Bursera morelensis*.

Una alícuota del extracto hexánico (3 g) se sometió a cromatografía empleando una columna de vidrio de 3.5 cm de diámetro interno, gel de sílice (80 g, 230-400 mesh ASTM) y como eluyentes hexano (400 mL), mezclas de hexano-AcOEt (9:1, 900 mL, 7:3, 600 mL; 1:1, 400 mL y 3:7, 400mL) y AcOEt (400 mL). Se colectaron eluatos de 100 mL para obtener un total de 30 fracciones, las cuales se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (CCF).



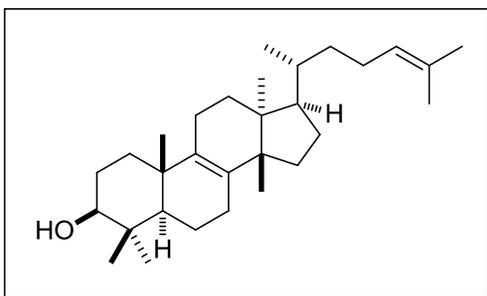
(-)-**Limoneno (6)**. De la fracción 2 (hexano) se obtuvo como aceite transparente y de olor agradable que se caracterizó como limoneno (**6**) con base en sus datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Esta sustancia es

un monoterpeno conocido en especies de *Bursera*, y sus datos físicos y espectroscópicos resultaron iguales a los descritos.<sup>9</sup>



**Betulonal (7).** La purificación de la fracción 7 (124.3 mg) se llevó a cabo en gel de sílice (3 g, 70-230 mesh ASTM) y hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (49:1) como eluyentes, colectando eluatos de 3 ml. De la fracción 4 se obtuvo un polvo blanco (21.5 mg, 17.3%) que

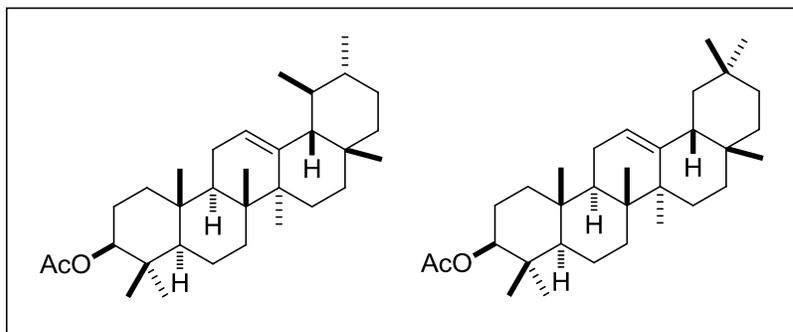
mostró  $[\alpha]_D^{20} + 47$  (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>). Este compuesto se caracterizó como betulonal (7) mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos.<sup>25</sup>



**Eufol (9).** La fracción 8 (335.3 mg) se purificó por cromatografía en gel de sílice (6.5 g, 70-230 mesh ASTM) y CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (9:1) como eluyentes. Los eluatos 6-8 (207.4 g) se recromatografiaron en gel de sílice (6.5 g, 70-

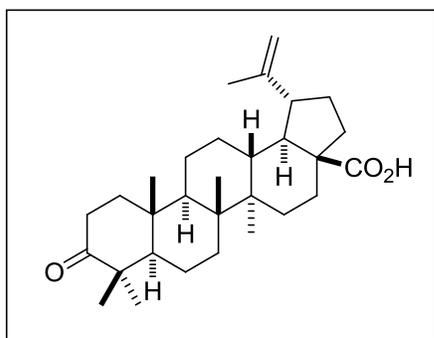
230 mesh ASTM) y CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (9:1) como eluyentes, colectando eluatos de 3 mL. De la fracción 6-11 se obtuvieron 91.5 mg (44%) en forma de cristales.

Este compuesto se caracterizó como eufol (9) mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos.<sup>26</sup>



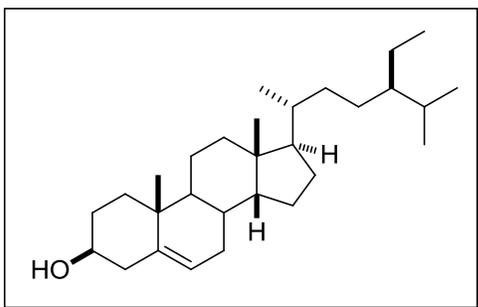
**Acetato de  $\alpha$ -amirina (10)** y **acetato de  $\beta$ -amirina (11)**. La separación cromatográfica de las fracciones 13-15

(404.2 mg) en gel de sílice (6.25 g, 70-230 mesh ASTM) y  $\text{CHCl}_3$ , mezcla  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt en orden de creciente polaridad como eluyentes, condujo a la fracción 6 (172.4 mg) que se recromatografió en gel de sílice (2.5 g, 70-230 mesh ASTM) y  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (49:1) y (9:1) como eluyentes. La fracción 5-8 (104.7 mg) se recromatografió en gel de sílice (2.7 g, 70-230 mesh ASTM) y  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (98:2) y (9:1) como eluyentes. De la fracción 16-19 se obtuvieron 9 mg en forma de una miel transparente, cuyo espectro de RMN  $^1\text{H}$  se comparó con la literatura <sup>27</sup>, lo cual correspondió a una mezcla del acetato de  $\alpha$ -amirina (10) y acetato de  $\beta$ -amirina (11).



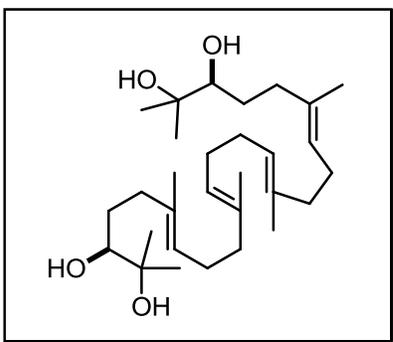
**Ácido betulónico (8)**. Las fracciones 21-35 se obtuvieron en forma de polvo blanco (21.5 mg), cuyo espectro de IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$  mostró una banda ancha en 2500-3500 característica de OH de ácido carboxílico. Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  se comparó

con el del compuesto **8**, así como con datos descritos, lo cual nos permitió identificar este compuesto como ácido betulónico (**8**).



**$\beta$ -Sitosterol (12).** La separación cromatográfica de las fracciones 14-16 (127.6 mg) en gel de sílice (12 g, 70-230 mesh ASTM) y mezcla  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (9:1), dio lugar a la fracción 10-12 que se recromatografió en gel de sílice (3 g, 70-

230 mesh ASTM) y  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (94:6) y AcOEt como eluyentes. De la fracción 6 se obtuvieron 8 mg de un polvo blanco, cuyo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  correspondió al del  $\beta$ -sitosterol (**32**).<sup>28</sup>

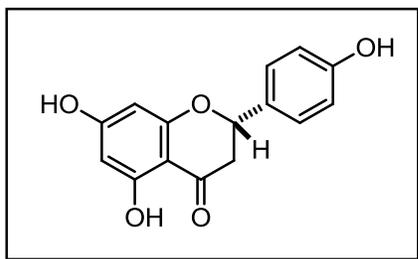


**Tetrahydroxiescualeno (13).** La fracción 28-35 (998.7 mg) se separó por cromatografía en columna de vidrio de 2 cm de diámetro interno, gel de sílice (20 g, 230-400 mesh ASTM) y como eluyentes, mezclas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (7:3, 250 mL, 1:1, 250 mL) y AcOEt (70

mL) y MeOH (200 mL). Se colectaron eluatos de 5 mL para obtener un total de 63 fracciones, las cuales se monitorearon mediante CCF. En la fracción 34-56 se obtuvo un sólido que mostró  $[\alpha]_D^{20} + 19.6$  (c 0.23,  $\text{CHCl}_3$ ). Este compuesto se caracterizó como 2,3,22,23-tetrahydroxiescualeno (**13**) mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos.<sup>29</sup>

### 7.4.3 Separación cromatográfica de la parte soluble de AcOEt.

Una alícuota de la parte soluble de AcOEt (4.2 g) se sometió a cromatografía en columna en gel de sílice y mezclas de CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (7:3; 1:1 y 3:7), AcOEt, AcOEt-MeOH (1:1) y MeOH. Se colectaron 38 fracciones de 20 mL, las cuales se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (CCF).



(-)-**Naringenina (14)**. La fracción 6 (104.4 mg) se recromatografió en gel de sílice y CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (9:1 y 7:3), AcOEt y MeOH. La fracción 18-29 (30.4 mg) se recromatografió en gel de sílice y CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (9:1 y 7:3), AcOEt y MeOH como eluyentes. De la fracción 15-23 se obtuvo un sólido amarillo (7.3 mg) que mostró  $[\alpha]_D^{20} - 19.7$  (c 0.7, MeOH) y p.f. 250-252 °C, que se caracterizó como el compuesto **(14)**. RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Tabla 4).

## **7.5 Modelado molecular y obtención de los espectros de dicroísmo circular vibracional (DCV) teórico.**

Los modelos moleculares de **3** y **15** se construyeron utilizando el programa Spartan '04, para posteriormente llevar a cabo un análisis de distribución conformacional empleando el método Monte Carlo con Mecánica Molecular en este mismo programa. Luego se hizo una estimación de la energía con la teoría de funcionales de la densidad (DFT), usando B3LYP/6-31G\*, seguido por optimización de la geometría a temperatura ambiente usando B3LYP/DGDZVP. Finalmente, se calculó el espectro de DCV teórico mediante la ponderación de los mínimos energéticos obtenidos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Williams, D.A.; Lemke, T.L. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5a edición, Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, E.U.A. **2002**, 24–25.
2. Jackson, D.E.; Dewick P.M. *Phytochemistry* **1984**, 23, 1147–1152.
3. Fred Brewer C.; Loike, J.D.; Horwitz, B.S. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 215–221.
4. Duh, C. Y.; El-Gamal, A.A.H.; Wang, S.K.; Dai, C.F. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1429–1433.
5. Renzulli, M.L.; Rocheblave, L.; Avramone, S.; Corelli, F.; Botta, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 5155–5158.
6. Dewick, P.M. Medicinal Natural Products 2<sup>a</sup> Edición. Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, E.U.A. **2002**, 132–135.
7. McDoniel, P.B.; Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.* **1972**, 61, 1992–1994.
8. Jolad, S.D.; Wiedhopf, R.M.; Cole, J.R. *J. Pharm. Sci.* **1977b**, 66, 892–893.
9. Cerda-García-Rojas, C. M.; Hernández-Hernández, J.D.; Román-Marín, L. U.; Joseph-Nathan, P. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1598–1602.
10. Rzedowki, J. *Acta Botánica Mexicana* **2004**, 66, 23–151.
11. Stacey, R. J.; Cartwright, C. R.; McEwan, C. *Archaeometry* **2006**, 48, 323–340.
12. Agrawal, R. B.; Rangari, V. D. *Ind. J. Pharmacol.* **2003**, 3, 384–387.

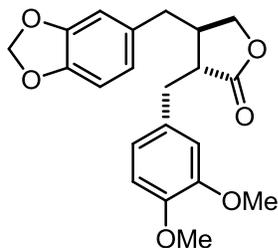
13. Nakanishi, T.; Inatomi, Y.; Murata, H.; Shigeta, K.; Pérez, M.A.; Linuma, M.; Tanaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 229–231.
14. Syamasundar, K.V.; Mallavaparu, R.; Muralikrishina, E. *J. Nat. Prod.* **1991**, *30*, 362–362.
15. Peraza, S.R.; Salazar-Aguilar, N.E.; Peña-Rodríguez, L.M. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 271–274.
16. Peraza-Sánchez, S.R.; Peña-Rodríguez, L.M. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1768–1771.
17. Souza, M.; Machado, I.; Filho-Braz, R. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2467–2470.
18. Hasegawa, M.; Shirato, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5507–5511.
19. Hernández-Hernández, J.D.; García, L.; Álvarez, R.; Román-Marín, L. U. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2002**, *46*, 295–300.
20. Información disponible en:  
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=2358> (Ingreso en Diciembre, 2010).
21. Tanaka, R.; Matsunaga, S. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2273–2277.
22. Sakakibara, N.; Suzuki, S.; Umezawa, T.; Shimada, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2474–2485.
23. Ikeda, R.; Nagao, T.; Okabe, H.; Nakano, Y.; Matsunaga, H.; Katano, M.; Mori, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 875–878.
24. Hernández-Hernández, J. D.; Velázquez-Jiménez, R. XII Congreso de la Investigación Científica del Pacífico. Del 22-24 de Agosto de **2007**, Nuevo Vallarta, Nayarit. *Memorias de Congreso*, 124.

25. Pichette, A.; Hongyan, L.; Roy, C.; Tanguay, S.; Simard, F.; Lavoie, S. *Syn. Comm.* **2004**, *34*, 21, 3925–3937.
26. Yuan-Wah, L.; Harrison, L. J. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 849–857.
27. Hernández-Hernández, J. D.; Elías-Rubio, K.N.; Velázquez-Jiménez, R.; Armenta-Salinas, C.; Álvarez-García, R.; Román-Marín, L.U. *Bol. Soc. Quím. Mex.* **2007**, *1* (Número Especial), 235.
28. Wright, J.L.C.; McInnes, A.G.; Shimizu, S.; Smith, D.G.; Walter, J.A. *Cad. J. Chem.* **1978**, *50*, 1898–1902.
29. Nishiyama, Y.; Moriyasu, M.; Ichimaru, M.; Juma, F.D. *Phytochemistry* **1996**, *46*, 803–807.
30. Seong, H. J.; Wanjoo, C.; Yong Joon, C.; Yong Soo, K. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 978–982.
31. Osawua, K.; Yasuda, H.; Maruyama, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa H. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2970–2974.

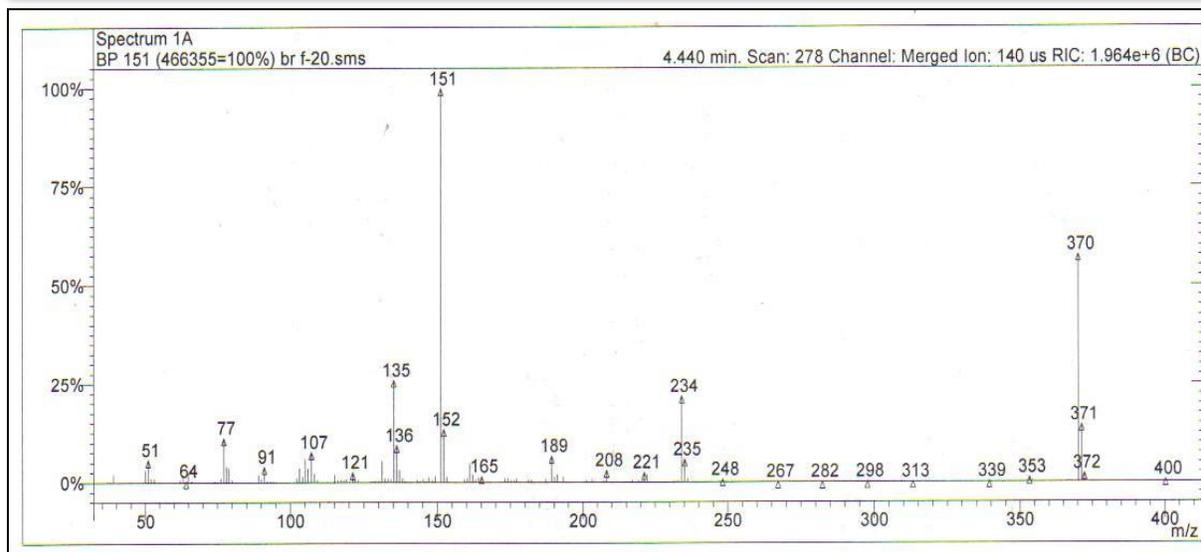
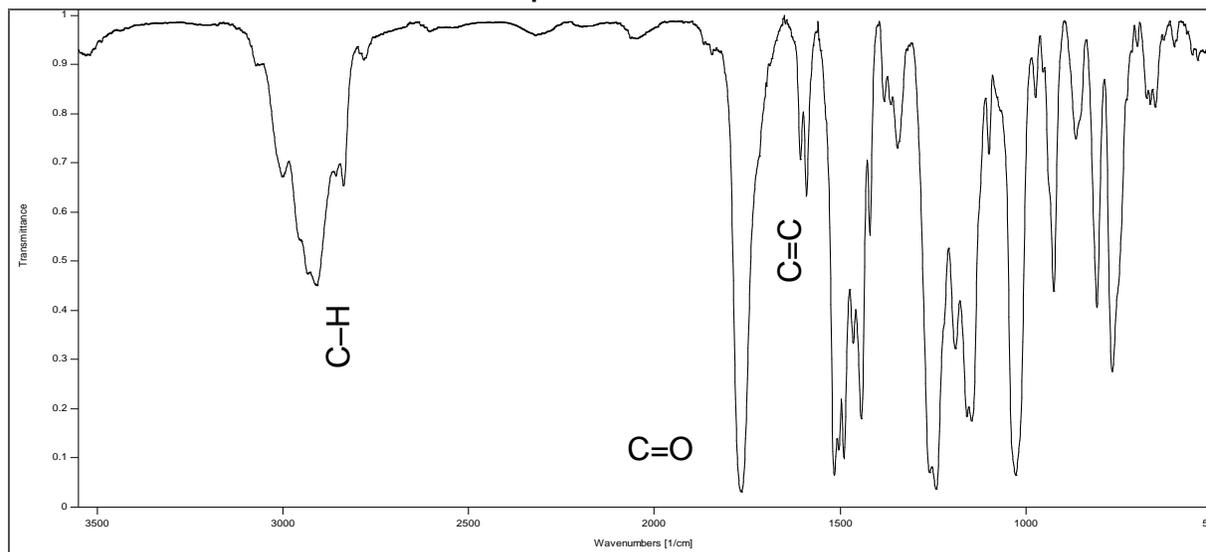
## 9. ANEXOS

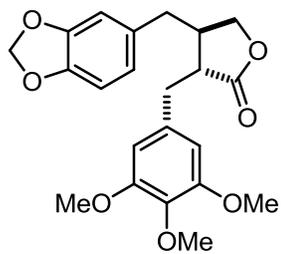
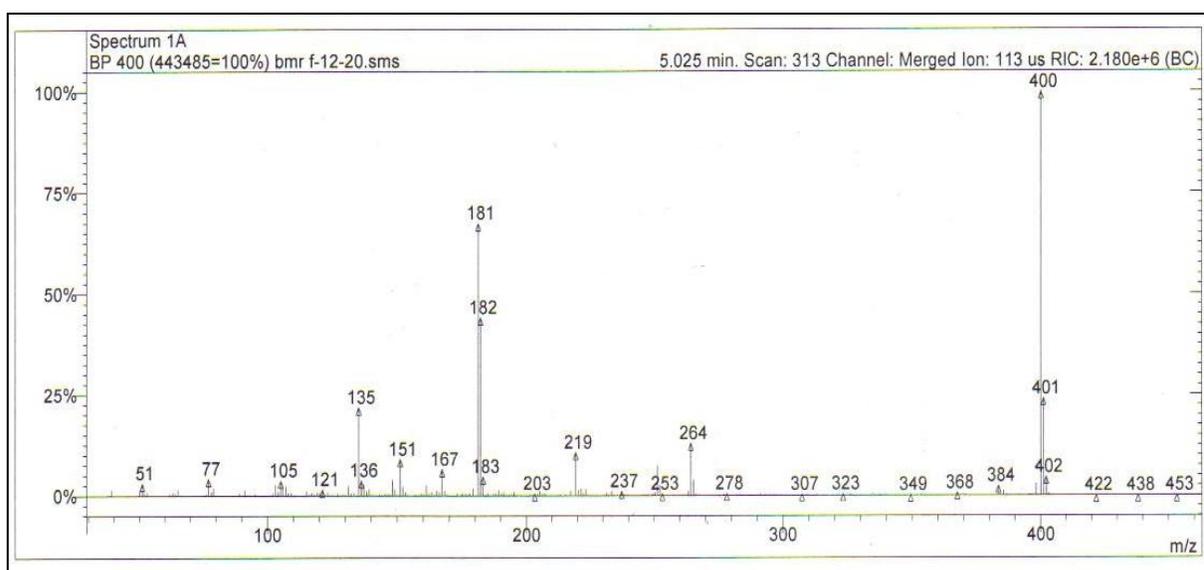
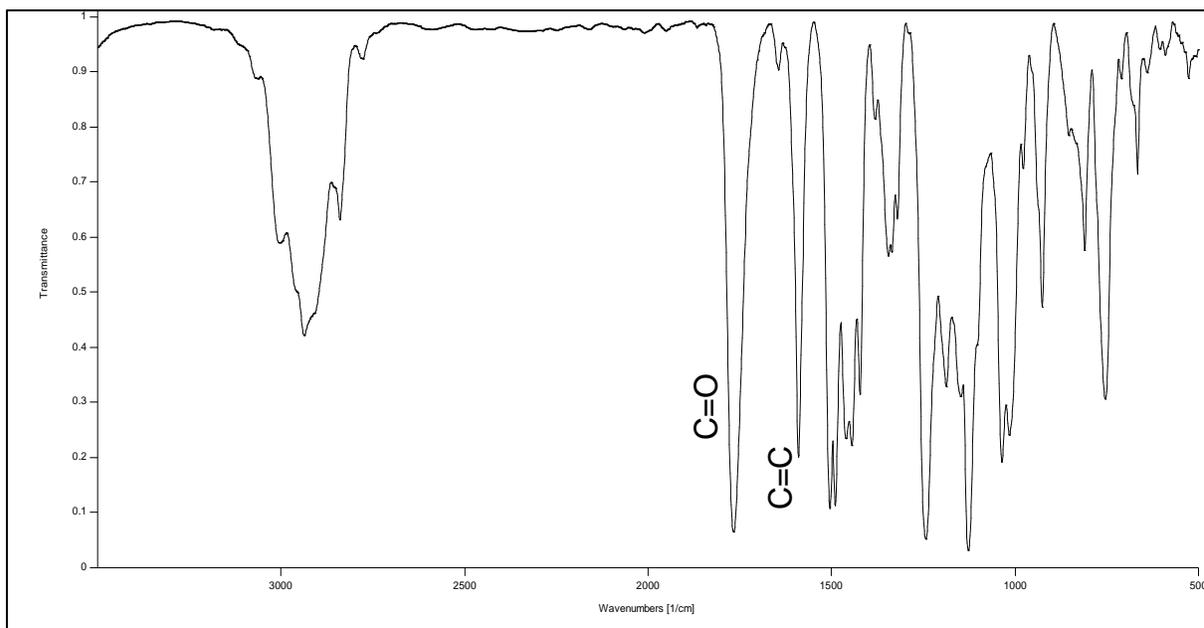
### Espectros de IR y masa.

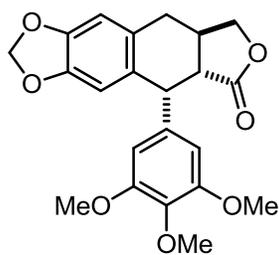
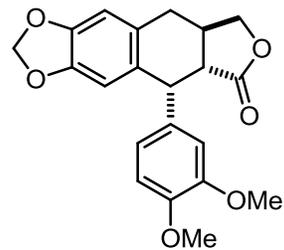
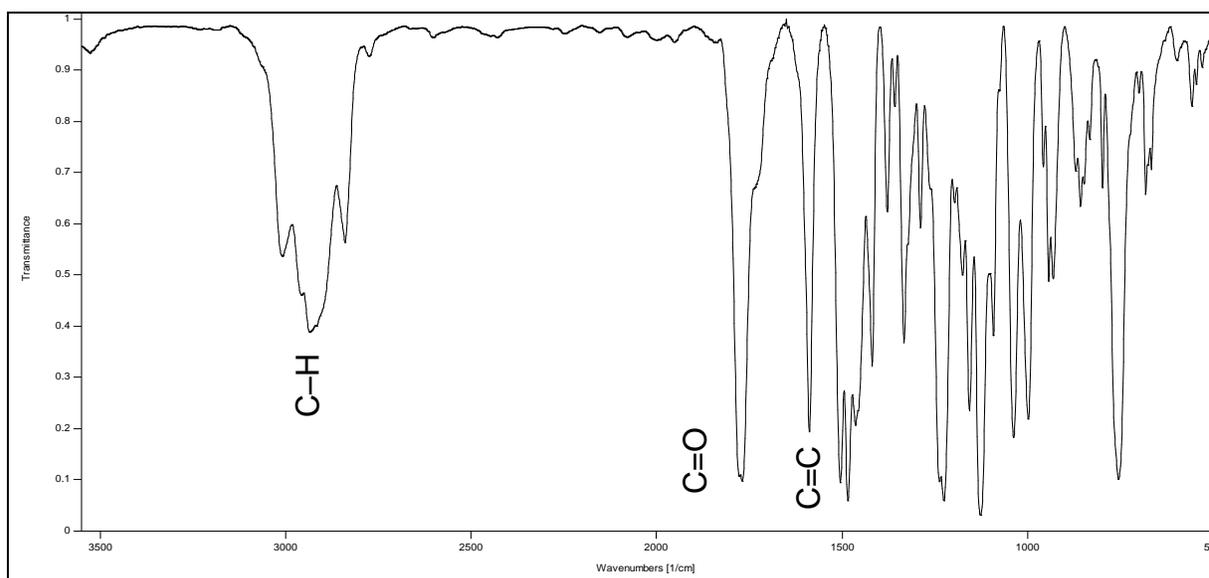
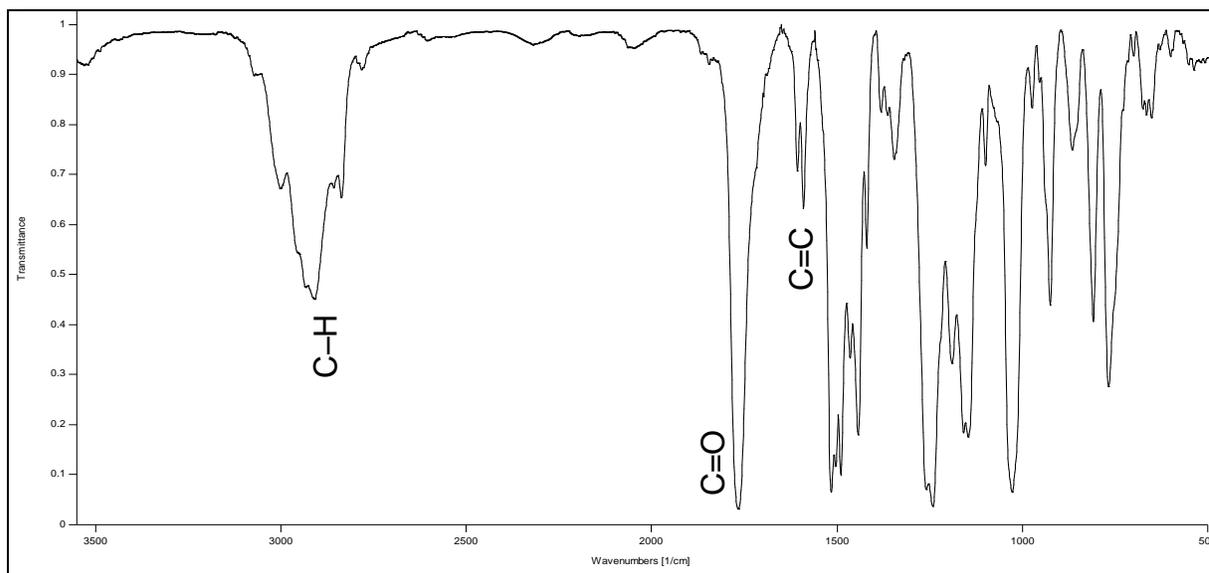
(-)-8'-Desmetoxyateina (1).

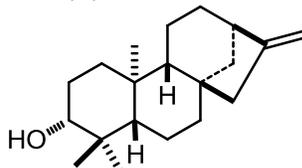
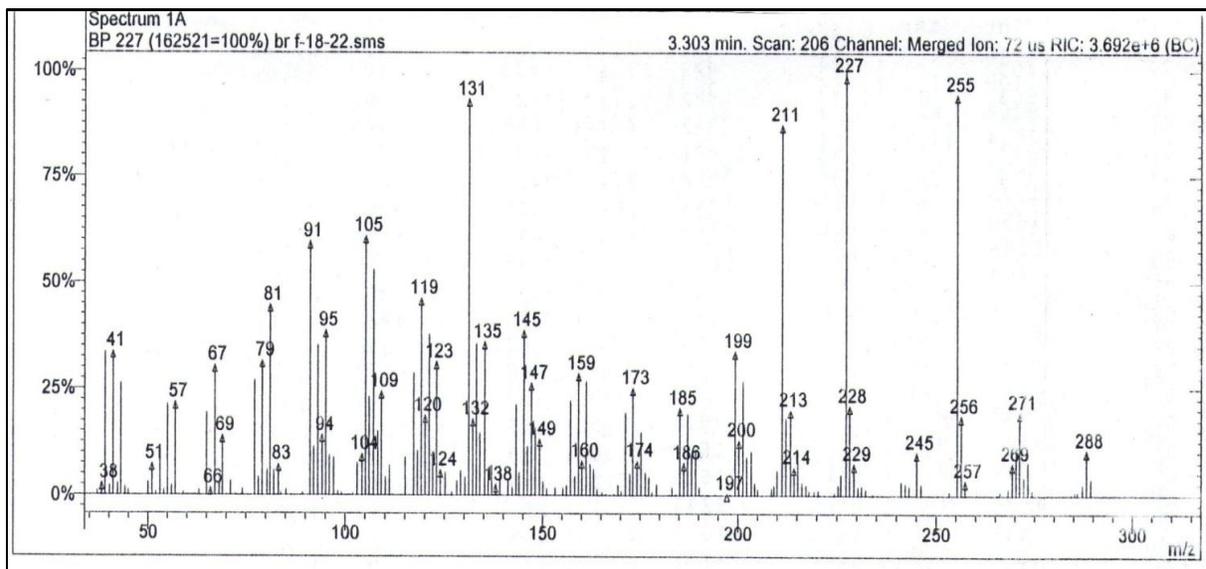
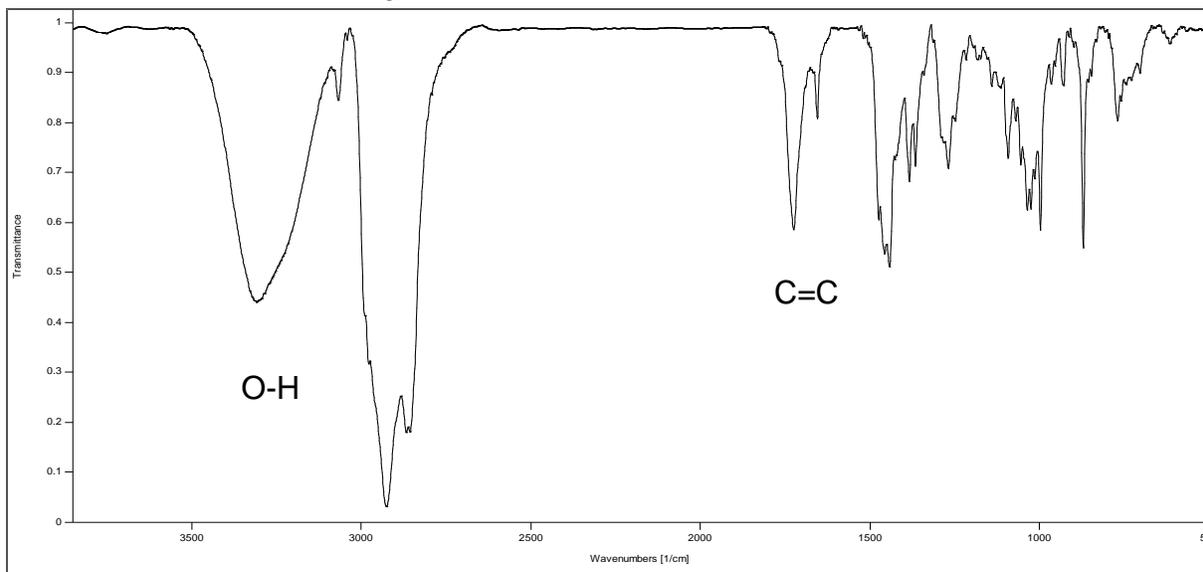


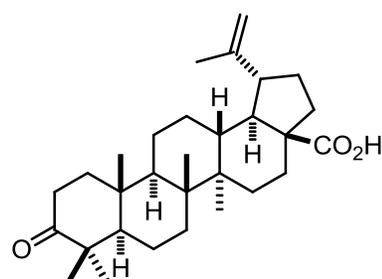
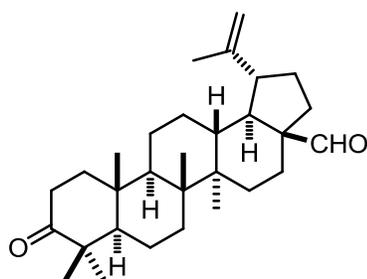
1



**(-)-Yateina (2).****2**

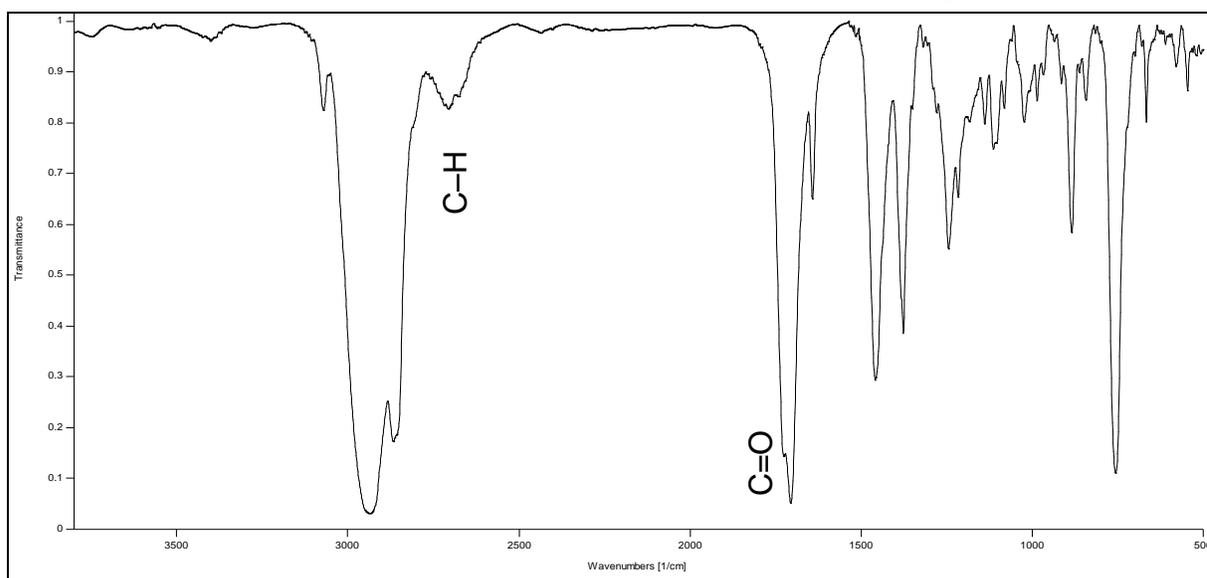
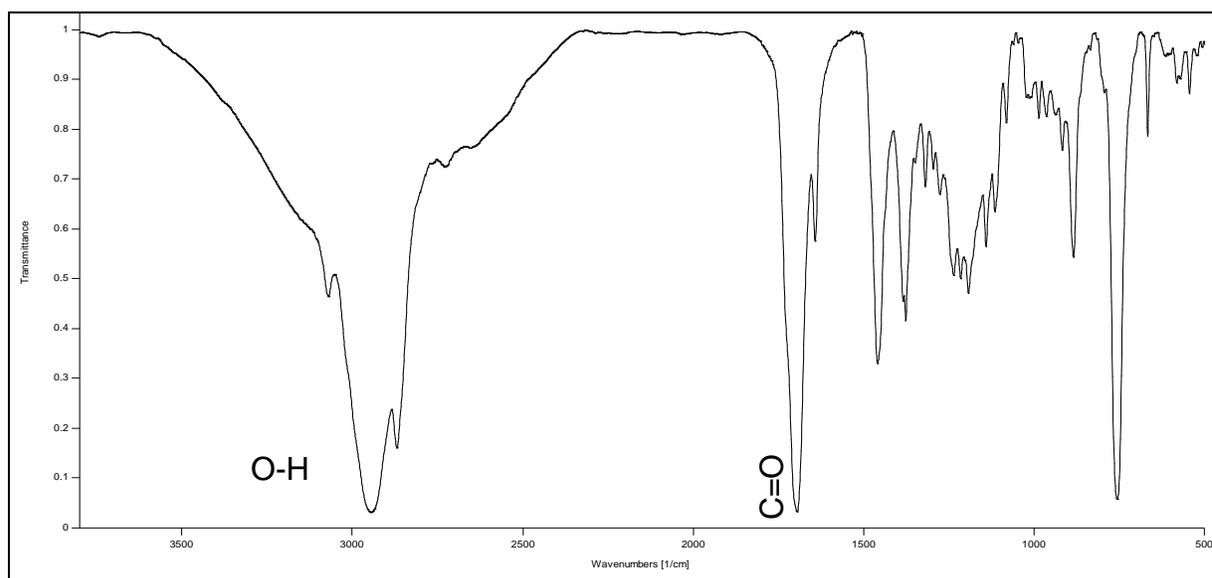
**(-)-Deoxipodofiloxina (3).****3****4****(-)-8'-Desmetoxideoxipodofiloxina (4).**

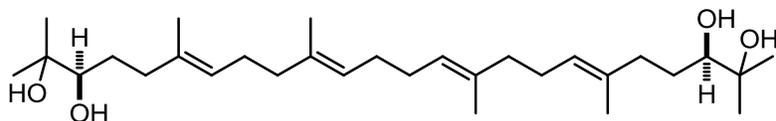
**(-)-ent-Kaurenol (5).****5**

**(+)-Betulonal (7).**

7

8

**Ácido betulónico (8).**

**(+)-Tetrahydroiescualeno (13).**

13

