

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LAS
FRACCIONES OBTENIDAS DE LOS EXTRACTOS EN PETROL Y EN ETANOL DE HOJAS Y
CORTEZA DE LA PLANTA *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & Pl.**

JUAN JOSÉ JAIMES BARRETO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar por el título de

BIÓLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGIA

BOGOTÁ, D.C.

JUNIO 2009

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LAS
FRACCIONES OBTENIDAS DE LOS EXTRACTOS EN PETROL Y EN ETANOL DE HOJAS Y
CORTEZA DE LA PLANTA *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & Pl.**

JUAN JOSÉ JAIMES BARRETO

APROBADO

JORGE ELIÉCER ROBLES CAMARGO Ph.D

Director

NOEMÍ TELLEZ

Jurado

FABIO RUIZ

Jurado

**EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LAS
FRACCIONES OBTENIDAS DE LOS EXTRACTOS EN PETROL Y EN ETANOL DE HOJAS Y
CORTEZA DE LA PLANTA *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & Pl.**

JUAN JOSÉ JAIMES BARRETO

APROBADO

INGRID SCHULER, Ph.D

Decana Académica

ANDREA FORERO

Directora Carrera

DEDICATORIA

A mis padres quienes con gran esfuerzo y dedicación me sacaron adelante e hicieron de mí lo que soy hoy en día, a mis hermanos que siempre me han apoyado, a mis sobrinos que los quiero mucho, y todos los compañeros y amigos que me acompañaron y ayudaron en éste proceso.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres y hermanos, quienes estuvieron pendientes todo el tiempo de mi trabajo de grado, nunca dudaron de mis capacidades y me apoyaron económica y espiritualmente.

También agradezco enormemente el apoyo y la dirección de Jorge Robles Ph.D quien me mostró el mundo de la fitoquímica, me tuvo paciencia durante todo el proceso y me enseñó otra forma de hacer ciencia, además de colaborarme con los solventes, los materiales y todas las necesidades que se presentaron durante la investigación.

Agradezco al profesor Luis Fernando Ospina Ph.D de la facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, quien es experto en el tema de antiinflamatorios y muy amablemente me prestó su asesoría para llevar a feliz término ésta investigación, además de haberme ayudado en todo el proceso experimental con los animales y los extractos.

Agradezco a Catalina Correa por su amor, por el constante apoyo durante la carrera, por los ánimos brindados y por el incondicionalismo prestado durante todo el proceso de mi trabajo de grado.

Agradezco también a todos los profesores del Grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana, en especial a Julio Pedrozo Ph.D y a Noemí Téllez Ph.D, quienes en ausencia de mi director estuvieron pendientes de mí, me colaboraron y guiaron desinteresadamente.

Finalmente agradezco a mi amigo y Biólogo Federico Sánchez que me ayudo desinteresadamente en el proceso de muestreo y en parte de la experimentación, con el único ánimo de hacerse a un colega más.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
2. MARCO TEORICO.....	2
2.1 Potencial Económico y Medicinal de las Plantas.....	2
2.2 Metabolitos Secundarios de las Plantas.....	4
2.3 Clases de Metabolitos Secundarios.....	5
2.4 Descripción Botánica de la Familia Burseraceae.....	6
2.5 Ubicación Geográfica de la Familia Burseraceae.....	7
2.6 Usos y Antecedentes Fitoquímicos de la Familia Burseraceae.....	7
2.7 Actividad Antiinflamatoria de la Familia Burseraceae.....	10
2.8 Descripción Botánica del Genero <i>Bursera</i>.....	12
2.9 Usos y Antecedentes Fitoquímicos del Genero <i>Bursera</i>.....	13
2.10 Descripción Botánica de <i>Bursera tomentosa</i>.....	16
2.11 Usos y Antecedentes Fitoquímicos de <i>Bursera tomentosa</i>.....	17
2.12 Generalidades Sobre Desordenes Inflamatorios.....	19
2.13 Clases de Inflamación.....	21
2.14 Mecanismos de Inflamación Aguda.....	21
2.15 Métodos para Evaluar la Actividad Antiinflamatoria.....	24
2.15.1 Edema Auricular agudo inducido por TPA.....	25
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	27
3.1 Problema de investigación.....	27
3.2 Pregunta de investigación.....	28

5.2.2.5.1 Pruebas para Fracciones Derivadas de Extractos en Petrol.....	47
5.2.2.5.2 Pruebas para Fracciones Derivadas de Extractos en Etanol.....	48
5.2.2.6 Marcaje de Animales y Organización de Grupos Experimentales.....	49
5.2.2.7 Bioensayo para Evaluar la Actividad Antiinflamatoria de la Planta.....	51
5.2.2.8 Cromatografías de Capa Delgada.....	54
5.3 Análisis Estadístico.....	55
6 RESULTADOS.....	56
6.1 Cantidades y Rendimiento de los Extractos y las Fracciones Derivados de <i>Bursera tomentosa</i>	56
6.2 Pruebas Químicas Preliminares Para las Fracciones Derivadas de los Extractos de <i>Bursera tomentosa</i>	57
6.3 Pesos de las Orejas (secciones circulares) Obtenidos en el Bioensayo para los Tratamientos (Fracciones, Control e Indometacina).....	58
6.4 Deltas de Peso y Porcentajes de Inhibición de Inflamación Calculados para el Edema Auricular Tratado con las Fracciones, el Control y la Indometacina.....	61
6.5 Análisis Estadístico de los Datos Obtenidos en el Bioensayo.....	64
6.6 Análisis Grafico del Promedio de los Deltas de Peso y de los Porcentajes de Inhibición de Inflamación.....	70
6.7 Resultados de las Cromatografías de Capa Delgada.....	73
7. DISCUSION.....	77

8. CONCLUSIONES.....86

9. RECOMENDACIONES.....88

10. LITERATURA CITADA.....89

11. ANEXOS.....96

RESUMEN

La especie *Bursera tomentosa* fue muestreada en el municipio de Agua de Dios Cundinamarca. Las Hojas y la Corteza de ésta planta fueron procesadas mediante métodos fitoquímicos y de ellas se obtuvieron los extractos en Petrol y en Etanol. Posteriormente cada uno de los extractos fue fraccionado, obteniendo las fracciones Petrol, CH₂Cl₂ y AcOEt, las cuales fueron evaluadas mediante un bioensayo para actividad antiinflamatoria realizado con ratones raza Ballce. En el bioensayo se utilizo el protocolo del edema auricular agudo inducido por la aplicación de TPA, y se realizaron seis repeticiones para cada uno de los tratamientos. La concentración de TPA aplicada fue de 2,5 µg/oreja, la concentración de indometacina aplicada fue de 0,5 mg/oreja, y la concentración de las fracciones aplicadas fue de 1 mg/oreja. Posteriormente se realizaron pruebas estadísticas con los resultados obtenidos, las cuales pusieron en evidencia la acción antiinflamatoria significativa de las fracciones AcOEt del Extracto en Petrol de las Hojas, CH₂Cl₂ del extracto en Etanol de las Hojas y AcOEt del extracto en Petrol de la Corteza. Finalmente las Fracciones que tuvieron actividad significativa en el bioensayo mostraron promedios de porcentajes de inhibición de inflamación de 35.41%, 39.99% y 33.28% respectivamente.

1. INTRODUCCION

El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos ha sido desde siempre una práctica ligada al desarrollo de las culturas aborígenes, y hoy en día al desarrollo de la cultura moderna. De esta manera, en la medicina contemporánea un gran porcentaje de los fármacos y las sustancias utilizadas son de origen vegetal y representan una fuente de ingresos industriales bastante lucrativa para los países en vía de desarrollo.

Por otro lado, todavía existen en nuestros bosques y selvas muchas plantas que han sido utilizadas desde la antigüedad por nuestras culturas indígenas, pero que por desconocimiento o falta de financiación siguen sin ser investigadas a fondo. Esto implica el hecho de que todavía hay mucho camino por recorrer en cuanto a investigación farmacológica se refiere, ya que existen plantas medicinales que representan un gran potencial económico y farmacológico para nuestro país, pues sus propiedades pueden ser evaluadas rigurosamente mediante análisis fitoquímicos, y a partir de ellas se podrían desarrollar nuevos y mejores fármacos.

Así, el presente estudio busca hacer una evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de una de las plantas de la familia Burseraceae distribuida por las tierras de Colombia (*Bursera tomentosa*), ya que gran parte de las plantas de esta familia son usadas normalmente por muchas culturas con diversos fines terapéuticos, en especial con el fin antiinflamatorio.

2. MARCO TEORICO

2.1 Potencial Económico y Medicinal de las Plantas

“Desde siempre, las plantas han tenido una inmensa importancia económica para la humanidad, el hombre ha encontrado en ellas su principal fuente de alimento; ha obtenido materiales combustibles y fibras para la fabricación de papel y de telas. El hombre también ha descubierto plantas productoras de tóxicos que utilizadas en pequeñas dosis alivianan los dolores, mitigan la fatiga y contrarrestan los síntomas de muchas enfermedades. También ha aprendido a extraer los aceites esenciales que utiliza en los perfumes y en los saborizantes de sus alimentos, y como si fuera poco, ha descubierto resinas utilizadas como material impermeable, como preservadores de la madera y en la fabricación de pinturas para sus habitaciones” (Pedrozo 2004).

“Desde el principio de los tiempos, el hombre tuvo que distinguir entre las plantas venenosas y las que no lo eran, así se desarrolló gradualmente el conocimiento de las drogas de origen natural, que se fue transmitiendo de generación en generación primero verbalmente, después de forma escrita y más recientemente, mediante sistemas de información computarizados” (Pedrozo 2004).

“Así pues, hoy en día prosperan por lo menos 800 mil especies de plantas en el mundo, pero es curioso considerar cuan pocas han sido explotadas por el hombre. En la zona tropical es en donde se ha concentrado una mayor cantidad de ellas, pero es precisamente en esta región en donde la flora es aun poco conocida. El hombre ha hecho uso de unas 3 mil especies vegetales como fuentes de alimento y unas 150 de ellas han tenido importancia en el comercio mundial” (Pedrozo 2004).

“Por otro lado, el término farmacognosia (derivado de pharmakon=droga, y gignosco=adquirir el conocimiento de algo) fue introducido en 1815, y pese a que ésta se refiere, principalmente, a las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal, no está totalmente limitada a tales sustancias. La farmacognosia también estudia los tejidos preparados de fibras naturales y uso quirúrgico; los agentes aromatizantes, las plantas alucinógenas, la materia prima para la obtención de anticonceptivos orales, los alérgenos, y los herbicidas e insecticidas” (Pedrozo 2004).

“En consecuencia, aunque son muchas las drogas vegetales utilizadas por la civilización oriental, tan solo un puñado de ellas ha servido a la civilización occidental durante miles de años, y son muchas las plantas cuyos constituyentes químicos, biológicamente activos, podrían aislarse con fines medicinales” (Pedrozo 2004).

Los países del tercer mundo han sido por largo tiempo, los proveedores de abundante materia prima vegetal, permitiendo a los países industrializados, el aprovechamiento de muchos compuestos extraídos de la naturaleza, aplicables en la satisfacción de múltiples necesidades del ser humano. Sin embargo a medida de que las naciones en desarrollo, adquieren y luego producen ciencia y tecnología, se van concientizando de su propia riqueza (Bilbao 1997).

Aproximadamente el 50% de las tierras Colombianas está constituido por la Orinoquía y la Amazonía, las cuales son tierras aptas casi exclusivamente para bosques y vegetación espontánea. Así, toda Colombia, desde sus cordilleras hasta sus valles, ofrece un campo privilegiado en cuanto a flora aprovechable se refiere. En consecuencia, en los años recientes, ha renacido un inmenso interés en la medicina hacia los sistemas fitoterapéuticos, estrechamente relacionados con los recursos vegetales (Bilbao 1997).

Los extractos obtenidos a partir de las plantas han sido usados durante siglos como remedios populares contra varios trastornos de salud. Campos como el de la biología de productos naturales, la etnofarmacología, así como el de la bioprospección, han recibido una atención renovada en años recientes. Los productos naturales y los remedios herbales usados en la medicina folclórica tradicional, han sido la fuente de muchas drogas beneficiosas médicamente, así como muchas plantas medicinales han mostrado una interesante actividad biológica y farmacológica al ser usadas como agentes terapéuticos (Kaileh *et al* 2007).

“Finalmente, es Indudable que el reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias con un valor medicinal aún por descubrir, y es así como hoy en día un gran número de plantas son analizadas constantemente con relación a su posible valor farmacológico, particularmente, por sus propiedades antiinflamatorias, hipotensoras, amebicidas, hipoglucemiantes, antiparasitarias, antifertilidad, citotóxicas, antibióticas y antiparkinsonianas, entre muchas otras” (Pedrozo 2004).

Así pues, en América Latina, Asia y África crece el interés por desarrollar programas tendientes a estudiar las riquezas naturales autóctonas, con un objeto común de encontrar solución a problemas relacionados con la salud o con el desarrollo industrial (Bilbao 1997).

2.2 Metabolitos Secundarios de las Plantas

Las plantas producen una amplia gama de compuestos orgánicos que no están involucrados en el metabolismo primario, es decir, que no poseen roles reconocidos en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación, y que también difieren de los metabolitos primarios por tener una distribución restringida en el reino vegetal, lo cual significa que un

producto secundario en particular (metabolito secundario), generalmente se halla sólo en una especie o en un grupo de especies taxonómicamente relacionadas (Taiz & Zeiger 2002).

A través del tiempo, el hombre ha hecho uso de los metabolitos secundarios con diversos propósitos, entre los que puede mencionarse los saborizantes, los colorantes, las fragancias, los insecticidas, las drogas medicinales y las adictivas, y los cosméticos (Salisbury & Ross 1992).

El principal rol metabólico atribuido a estos grupos de sustancias es la protección frente al ataque de herbívoros y las infecciones microbianas o virales, aunque también funcionan como atrayentes de insectos polinizadores y como agentes de competición planta-planta (Azcón-Bieto & Talón 2000).

2.3 Clases de Metabolitos Secundarios

“Para clasificar a los metabolitos secundarios se han utilizado muchos puntos de vista, aunque en todos ellos es inevitable la superposición. Los criterios clasificatorios de mayor aceptación son: la estructura química, el origen biogenético, la acción biológica y la actividad farmacológica” (Pedrozo 2004).

Según la actividad farmacológica, dentro de los metabolitos secundarios se pueden encontrar los siguientes grupos: glicósidos cardiotónicos, analgésicos, narcóticos, antibióticos, hormonas, análogos a prostaglandinas y otros (Pedrozo 2004).

2.4 Descripción Botánica de la Familia Burseraceae

Conformada por unos 20 géneros y cerca de 680 especies, distribuidas en las regiones calientes del mundo, con mayor diversidad en América tropical, en el norte y en el sur de África y en Malasia (Harley & Daly 1996, Rzedowski & Guevara 1992). Esta se distingue por ser la familia del incienso y la mirra con árboles y arbustos que pueden alcanzar los 40 metros de altura. Tienen un característico olor a incienso o "trementina" producido por canales resiníferos que se ubican principalmente en cortezas y ramas (Cuatrecasas 1957).

Árboles o arbustos, provistos de resina y a menudo de aceite esencial; hojas alternas, por lo general imparipinnadas, algunas veces bipinnadas, trifolioladas o reducidas a un solo foliolo, los foliolos laterales opuestos, comúnmente sin estípulas; inflorescencias axilares o terminales, básicamente cimosas, pero a menudo paniculadas, pseudoracimosas o fasciculadas, o bien las flores solitarias; flores casi siempre unisexuales (las plantas suelen ser dioicas o polígamo-dioicas), pequeñas, actinomorfas, 3 a 5 (6)-meras; cáliz más o menos cupuliforme, dividido en 3 a 5 (6) segmentos connados o casi libres, valvados, contortos o abiertos en botón; pétalos 3 a 5 (6), rara vez ausentes, libres o en pocos casos unidos para formar un tubo, contortos o valvados en botón; estambres dispuestos en 1 ó 2 verticilos, del mismo número que las divisiones del cáliz o más frecuentemente dos veces más numerosas, por lo general estériles en las flores femeninas (que a menudo dan la apariencia de ser hermafroditas), filamentos por lo común libres, insertos debajo o rara vez sobre el disco, anteras biloculares, longitudinalmente dehiscentes, disco anular o cupuliforme, a veces inconspicuo; pistilo 1, el ovario súpero, 2 a 5-locular y de otros tantos carpelos, placentación axilar, óvulos 2 por cada lóculo, estilo corto o casi obsoleto, estigma 2 a 5-lobado; fruto más o menos drupáceo, el pericarpo por

lo general carnosos, pero a menudo finalmente dehiscentes por medio de 2 a 5 valvas, huesos (endocarpios lignificados) 1 a 5, casi siempre monospermos y con frecuencia cubiertos por un pseudoarilo; semillas sin endosperma, embrión por lo común derecho (Rzedowski & Guevara 1992).

2.5 Ubicación Geográfica de la Familia Burseraceae en Colombia

Esta comprendida por un grupo de plantas que se encuentran dentro de los bosques secos tropicales siendo algunas endémicas de países como Colombia, México y Venezuela (Becerra & Venable 1999). Para el caso particular de Colombia, la familia se distribuye en 143 municipios de los 32 departamentos del país, aunque el comportamiento por géneros varía, y dentro de éstos se destacan algunas especies por su amplia distribución (Martínez 1998).

En general en Colombia, toda la familia se ubica en las zonas bajas, ya que el 66% de los registros indican una altura dentro 0-500 m.s.n.m, y un 24% entre 1001-2500 m.s.n.m. Sin embargo, la frecuencia de registros de un lugar determinado depende más de la cantidad de colecciones realizadas, que de la cantidad de especies presentes; cabe anotar que los 10 departamentos con mayor información sobre Burseraceae son: Amazonas, Caquetá, Meta, Valle, Antioquia, Vaupés, Magdalena, Cundinamarca, Santander y Chocó (Martínez 1998).

2.6 Usos y Antecedentes Fitoquímicos de la Familia Burseraceae

Como lo ha descrito Culioli et al. los inciensos tradicionales, incienso y mirra, son ambos extraídos de especies de la familia Burseraceae, *Boswellia* y *Commiphora* spp. respectivamente (referenciado en Junor *et al* 2008).

La familia Burseraceae es una fuente conocida de exudados y resinas ricas en sustancias aromáticas que son usadas para muchos objetivos medicinales, así como en las industrias de perfumería y producción de barnices (referenciado en Siani *et al* 1999).

La familia Burseraceae incluye plantas que exudan resinas usadas para muchos objetivos artísticos. El género *Canarium* crece en Australia, en el Sudeste asiático y en África. Varias especies resinosas de este género, muchas veces, han sido colocadas en el mercado europeo bajo el nombre de elemi. En particular, el producto conocido como Manila elemi de las Islas filipinas, exudado de la especie *Canarium luzonicum* y *Canarium commune*, ha sido usado sobre todo en Bellas Artes (De la Cruz *et al* 2005).

En la medicina tradicional, la goma y las oleoresinas de la especie *Protium* son usadas para muchos objetivos, entre los que encontramos el tónico y el estimulante. Esta especie también es utilizada en la curación de úlceras y como agente antiinflamatorio (referenciado en Siani *et al* 1999).

Para ésta familia, los canales resiníferos están en la mayoría de las especies y muchas de ellas transportan repelentes antiherbívoros y toxinas que se componen principalmente de terpenos (Raffa 1991). Muchas especies de esta familia deben su valor económico a los aceites esenciales, terpenos, esteroides, y lignanos encontrados en sus resinas (Carretero *et al* 2008).

La familia Burseraceae según Robles (1998) y Bruneton (1993), está compuesta por unidades fundamentales, las cuales son los terpenos o terpenoides. Estas sustancias son sintetizadas a partir de acetil CoA o de intermediarios básicos de la glicólisis. Las oleorresinas producidas por esta familia, son sustancias que están conformadas por monoterpenos, sesquiterpenos o diterpenos a nivel molecular y su característica física es la

consistencia suave o semilíquida. Estas son mezclas de aceites esenciales y resinas, es decir, exudados que en su mayoría contienen compuestos resinosos y compuestos volátiles (Bruneton 1993; Robles 1998).

El análisis químico de resinas de las especies de Burseraceae ha conducido principalmente al aislamiento e identificación de compuestos de terpenoides, donde los mono y los triterpenos predominan. La resina, el tallo y hojas son una fuente de aceites esenciales, esteroides, terpenos, lignanos y otros tipos de compuestos (referenciado en Siani *et al* 1999).

Los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de muchas especies de la familia Burseraceae han sido mencionados por su carácter antiinflamatorio, antialérgico y hepatoprotector. La actividad inmunoestimulante así como la actividad antiinflamatoria son reportadas en algunos extractos acuosos de las resinas de las especies de Burseraceae. El aceite esencial de las hojas y los frutos de *Protium heptaphyllum* poseen actividad cercaricida, y el extracto etéreo de su oleorresina muestra una analgesia no opiácea eficaz. Otros géneros son reportados por poseer propiedades antisépticas en enfermedades de la piel, actividad antitumoral y actividad acaricida (referenciado en Siani *et al* 1999).

El análisis fitoquímico realizado al extracto en éter de *Protium kleinii* ha revelado la presencia de varios triterpenos pentacíclicos como el (urs-12-eno-3 β -16 β -diol) y el α -amireno (Otuki *et al* 2005).

En la medicina tradicional árabe el extracto de *Commiphora opobalsamum* es usado para tratar el dolor de cabeza, la retención urinaria y el estreñimiento. Recientemente del extracto total de *Commiphora opobalsamum* se reportaron efectos hipotensores, antiulcerogénicos y hepatoprotectores en experimentos con ratas. El análisis fitoquímico preliminar de las partes

aéreas de *C. opobalsamum* reveló la presencia de flavonoides, esteroides, triterpenos, saponinas, bases volátiles y aceites volátiles (referenciado en Abbas *et al* 2007).

Con respecto a lo anterior, Abbas y colaboradores (2007) por primera vez describen el aislamiento y la caracterización de seis compuestos de *Commiphora opobalsamum*, los cuales son: friedelina, canofilal, ácido oleanónico, ácido siringico, mearnsetina y quercetina.

Además de la renombrada actividad antiinflamatoria de los ácidos boswellicos aislados de *Boswellia carteri* y *Boswellia serrata*, éstos también han sido investigados extensivamente en lo que concierne a su actividad contra células tumorales y efectos quimiopreventivos (Referenciado en Banno *et al* 2006).

2.7 Actividad Antiinflamatoria de la Familia Burseraceae

La resina de *Boswellia carteri* y *Boswellia serrata* ha sido usada para el tratamiento de artritis reumatoidea y otras enfermedades inflamatorias en la medicina tradicional en muchos países. La búsqueda de los principios activos de la resina permitió el aislamiento de los ácidos boswellicos, los cuales pertenecen a los triterpenos pentacíclicos de la serie del ursano y el oleanano (Banno *et al* 2006).

Se sabe que los ácidos Boswellicos disminuyen la respuesta inflamatoria en los procesos inducidos de inflamación severa mediante varios modelos experimentales diferentes, incluyendo el bioensayo con 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA). Singh *et al.* (1996) demostró que estos ácidos triterpénicos fueron capaces de bloquear reacciones inflamatorias de una

manera relacionada con la dosis, en modelos de inflamación agudos y crónicos (Banno *et al* 2006).

Se han aislado metabolitos secundarios que presentan actividad antiinflamatoria a partir de raíces de *Commiphora merkeri*. Dichos metabolitos del tipo triterpeno pentacíclico fueron evaluados por la metodología del edema plantar (Fourie & Snyckers 1989).

Duwiejua y colaboradores (1993) estudiaron la actividad antiinflamatoria de cuatro especies de algunas plantas pertenecientes a la familia Burseraceae (*Boswellia dalzielii*, *B. carteri*, *Commiphora mukul* y *C. incisa*) de las cuales, tres presentaron una inhibición significativa del edema plantar a partir de los extractos acuosos. De las cuatro especies, *Commiphora mukul* presentó la mejor actividad, de la cual posteriormente se aisló, la mansumbinona y el ácido mansumbinoico, triterpenos del octanordamaranno a los cuales se les atribuye la actividad antiinflamatoria.

Las resinas y las hojas de las especies del género *Protium* comúnmente son usadas en la medicina tradicional brasileña para la curación de úlceras y para el tratamiento de dolencias inflamatorias. Adicionalmente, se ha demostrado una acción sistémica para el extracto de éter en los modelos inflamatorios en ratones (Otuki *et al* 2005).

Con respecto a la actividad antiinflamatoria de los aceites esenciales de las hojas y resinas de algunas especies del género *Protium* (*P. heptaphyllum*, *P. strumosum*, *P. grandifolium*, *P. lewelyni* y *P. hebetatum*, se comprobó actividad antiinflamatoria frente al modelo de pleuresía inducida por zimosan y lipopolisacáridos (Siani *et al* 1999).

2.8 Descripción Botánica del Genero *Bursera*

El género fue nombrado en honor del botánico alemán Joachim Burser (Cuatrecasas 1957). Este género tiene poco más de 100 especies, distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica, pero concentrando notablemente su diversidad en la vertiente pacífica de México. Muchas de sus especies constituyen elementos dominantes o codominantes del bosque tropical caducifolio y de algunos matorrales xerófilos (Rzedowski & Guevara 1992).

Árboles o a veces arbustos caducifolios, dioicos o polígamo-dioicos, rara vez hermafroditas, por lo general fuertemente resinosos y aromáticos; corteza externa de las partes lignificadas provista de una capa de clorénquima, la del tronco a menudo rojiza o amarillenta y exfoliante, otras veces gris, lisa y sin exfoliarse; ramillas abreviadas (braquiblastos) comúnmente presentes; hojas sin estípulas, a menudo dispuestas en forma de roseta en el extremo del braquiblasto, otras veces alternas y esparcidas sobre ramas jóvenes y vigorosas, en la mayoría de las especies imparipinnadas y con los folíolos opuestos, pero a veces bipinnadas, trifolioladas o simples (unifolioladas), el raquis a menudo alado, a las hojas normales en muchos casos les anteceden en aparición una o varias rosetas de catafilos más o menos precozmente caedizos, de forma oblonga o triangular, y es también muy frecuente que las primerísimas hojas en aparecer sean trifolioladas o con un número de folíolos más reducido que el común para la especie; inflorescencias axilares, originándose por lo general con o antes de las primeras hojas, pero a menudo se observan como si fueran fasciculadas o aglomeradas sobre los braquiblastos, en forma de panículas, tirsos, (pseudo-) racimos, cimas, glomérulos, o bien por reducción las flores solitarias, bracteolas por lo general presentes; flores casi siempre unisexuales, rara vez hermafroditas, pequeñas, 3 a 5 (6)-meras; cáliz profundamente dividido, sus lóbulos abiertos

en botón; corola de prefloración valvada, a menudo conduplicado-valvada, los pétalos por lo general más largos que el cáliz, blanquecinos, amarillentos, verdosos o rojizos, con frecuencia cuculados; estambres dos veces más numerosos que los pétalos, dispuestos en dos series iguales o en ocasiones algo desiguales, los filamentos insertos en la base del disco, anteras dorsifijas, más pequeñas y estériles en las flores femeninas, disco glandular, anular; ovario con 2 ó 3 lóculos y 2 óvulos por cada lóculo, estilo corto, estigma bi o trilobulado; fruto en forma de “drupa” ovoide a subglobosa, biconvexa o más o menos asimétricamente trígona, tardíamente dehiscente por medio de 2 ó 3 valvas, el hueso parcial o totalmente cubierto por un pseudoarilo que al abrirse el fruto es rojo, anaranjado o amarillo, pero por lo común pronto se torna gris o blanquecino; semilla por lo general una sola en cada fruto (Rzedowski & Guevara 1992).

2.9 Usos y Antecedentes Fitoquímicos del Genero *Bursera*

Se han reportado usos medicinales para especies del genero *Bursera* como es el caso de *Bursera graveolens* y *Bursera simaruba*, las cuales son utilizadas en Latinoamérica en forma de emplastos para extraer cuerpos extraños epidérmicos y para tratar hernias y tronchaduras. También son utilizadas en cocción para tratar enfermedades como el asma, la diarrea, la pleuresía, los cálculos en el riñón y la tuberculosis (Bernal & Correa 1990).

Los aceites de las especies del género *Busera* han sido usados como un ingrediente en las industrias de cosméticos, alimentos y bebidas. Así pues, de la extracción comercial de *Busera delpechiiana*, *Busera simaruba* y *Busera aloexylon* han sido aislados productos para el empleo en el comercio de la perfumería (referenciado en Junor *et al* 2008).

El género *Bursera* tiene grandes variaciones químicas, en la composición de terpenoides, ya sea por su número, identidad y cantidades relativas de terpenoides individuales; que pueden producir mezclas compuestas (Rzedowski & Ortiz 1988; Becerra & Venable 1999).

En muchas especies que pertenecen al género *Bursera* se ha encontrado particularmente en sus resinas, aceites esenciales, triterpenos, esteroides, bilignanos, podofilotoxinas del tipo lignano y flavonoides (referenciado en Maldini *et al* 2009).

Bursera simaruba conocida en Venezuela como gumbolimbo, ha sido usada para hacer incienso y también con otros propósitos, como el tratamiento de quemaduras, de dolor de cabeza, de hemorragias nasales, de fiebre, de dolor de estómago y para predecir la lluvia a través de su florescencia. Otro uso prometedor para la corteza de gumbolimbo es encontrado en el tratamiento de psoriasis, eczema, picaduras de insecto y hongos de la piel (Noguera *et al* 2004).

La resina que exuda de la corteza de *Bursera simaruba* es usada medicinalmente para tratar úlceras y enfermedades venéreas. Además, la infusión de la corteza es usada contra la diarrea, como un diurético, como desodorante, como expectorante y como un purgante (en altas dosis); la decocción de la corteza es tomada como un té para infecciones, enfermedades urinarias, fiebre, golpe, frío y gripe. *Bursera simaruba* también ha sido usada en Venezuela para el tratamiento del cáncer y de tumores, y los aceites esenciales y las resinas también poseen actividad antiinflamatoria y actividad antibacteriana (referenciado en Junor *et al* 2008).

Del extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba*, 11 compuestos fueron aislados incluyendo cuatro conocidos, los cuales son: yatein lignanos, β - peltatin - O - β - D - glucopiranosido, hinokinina y bursehernina. También fueron aislados siete compuestos fenólicos incluyendo tres nuevos compuestos que son: 3,4 - dimetil - oxifenil - 1 - O - β - glucopiranosido (6 sulfo) - glucopiranosido; 3,4,5 - trimetoxifenil 1 - O - β - (6-sulfo) - glucopiranosido; 3,4 dihidroxifeniletanol - 1 - O - β - D - glucopiranosido (6 sulfo) glucopiranosido. Por otro lado también se encontraron escopoletina, floroacetofenona - 4 - neohesperidosido; 4 - acetil - 3,5 - dihidroxifenil - β - D - glucopiranosido y picraquassiosido D (Maldini *et al* 2009).

Bursera graveolens ha sido usada por los ecuatorianos como analgésico, sedante, desodorante y como remedio para el reumatismo, y recientemente las investigaciones han encontrado material citotóxico en sus tallos. Hay pocos informes sobre los componentes químicos de *Bursera graveolens*, pero en un estudio se relató la presencia de limoneno y α -terpineol (Young *et al* 2007). Más recientemente, Yukawa analizó el aceite volátil de *Bursera graveolens* mediante la utilización de modernas técnicas analíticas, encontrando dos nuevos compuestos sesquiterpenoides y reportando otros siete por primera vez para esta planta (referenciado en Young *et al* 2007).

Según Jutiviboonsuk *et al.* (2005), se encontró que *Bursera tokinensis* se halla entre las plantas que muestran potencial citotóxico en la investigación llevada a cabo sobre compuestos activos anticancerígenos de las plantas de Vietnam y Laos como parte del grupo 1CBG (International Cooperative Biodiversity Group); en este estudio se evidenciaron las propiedades citotóxicas de *Bursera tokinensis* a partir del 4' - demetildesoxipodofilotoxina en líneas celulares KB (carcinoma humano oral), Col2 (cáncer de colon humano) y LNCaP (cáncer de próstata humano).

En 2001, Murillo-Álvarez *et al*, reportaron actividad inhibitoria del extracto etanólico de la corteza de *Bursera odorata* frente a líneas celulares HCT-116 (células de cáncer colorectal humano); esta planta es reportada en la medicina tradicional del sur de baja California como tóxica (Martínez 1998).

2.10 Descripción Botánica de *Bursera tomentosa*

La especie *Bursera tomentosa* es una planta que pertenece a la familia Burseraceae y se encuentra dentro del género *Bursera*. Encontrada por primera vez en 1763, fue denominada con el nombre de *Elaphrium tomentosa*, pero finalmente su clasificación fue hecha en 1872, cambiando su nombre al actual. Conocida en Colombia como Sasafrás macho o Tatamaco; es un arbusto de 5m de alto y 14cm de DAP (Diámetro a la altura del pecho). Pertenece a los bosques secos; con copa compacta y follaje de color verde lustroso. Las hojas son imparipinadas (5-11 foliólos); es tomentosa y tiene el raquis alado. Es una especie caducifolia, pero emite hojas nuevas inmediatamente después de perder las hojas viejas. La flor tiene sépalos lanceolados a lineales, más largos que la mitad de la longitud de los pétalos. Los frutos son drupas de color morado cuando se maduran, además tienen el endocarpo totalmente fusionado y el exocarpo dehiscente y miden aproximadamente 12mm de largo y 10 mm de diámetro (Martínez 1998) (Figura1).

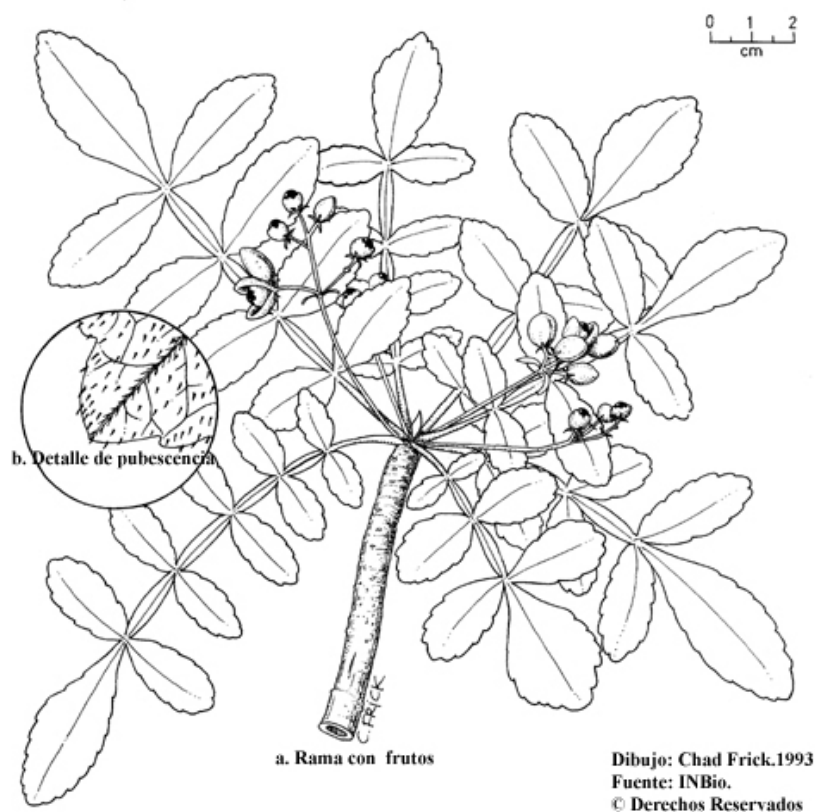


Figura 1. Esquema de algunos caracteres taxonómicos de *Bursera tomentosa*. Tomado de <http://darnis.inbio.ac.cr>

2.11 Usos y Antecedentes Fitoquímicos de *Bursera tomentosa*

Para esta planta, se encuentran en la literatura pocos estudios realizados con respecto a los usos o a la Fitoquímica, ya que es una planta que en su mayoría solo se ha estudiado desde el punto de vista taxonómico.

Bursera tomentosa es un árbol de zonas semiáridas que se distribuye desde Centro América hasta el norte de Suramérica, donde es conocida comúnmente como bálsamo de incienso y tiene múltiples aplicaciones como planta medicinal y artesanal (Castillo *et al* 2005).

En Venezuela ésta especie, la cual presenta una madera blanca, es muy apreciada por los artesanos del municipio Jiménez del estado Lara, para la realización de diferentes tallados, actividad que constituye un ingreso familiar importante (Castillo *et al* 2005).

Las culturas indígenas Mexicanas sustraen de *Bursera tomentosa* un incienso genuino o resina de copal, el cual es un símbolo sagrado utilizado para ritos religiosos, como pegamento para unir madera y como condimento en las tortillas para darles un sabor más agradable (De la Cruz *et al* 2005).

La especie *Bursera tomentosa* posee un gran potencial curativo dentro de la medicina botánica tradicional; a esta planta conocida en Colombia como "tatamaco" en algunas regiones de Cundinamarca y el Tolima, se le han atribuido propiedades curativas frente a dolencias relacionadas con la próstata en los hombres, como calmante de dolores premenstruales en las mujeres y males relacionados con el cáncer, entre otros (Rojas 2008).

Según Robles (1999) *Bursera tomentosa* Tr. & Pl. posee una oleorresina o "taca mahac" que es generalmente utilizada para atender los tumores (Robles *et al.*, 1999).

En un estudio Fitoquímico de tesis de pregrado realizado con *Bursera tomentosa* se determinó que la planta poseía efectos citotóxicos en las pruebas preliminares de citotoxicidad frente a las líneas celulares de cáncer CSC-1595 y Colo 205. También se observó que es posible que los compuestos de menor polaridad presentes en las Hojas hayan sido los causantes de los efectos citotóxicos. Así mismo, se encontró la mayor actividad frente a las líneas celulares, en la subfracción Diclorometano-Metanol (9,5:0,5) obtenida a partir del extracto en Petrol de las Hojas. Finalmente se concluyó que el principio activo con efectos citotóxicos, cuya

naturaleza polar es media-alta, es posible que se encuentre en las subfracciones-fracciones en Diclorometano y Diclorometano-Metanol (9,5:0,5) obtenidas a partir del extracto en Petrol de las Hojas (Rojas 2008).

2.12 Generalidades Sobre Desordenes Inflamatorios

La inflamación es un factor subyacente común que contribuye a la exacerbación de una amplia variedad de enfermedades que incluyen la artritis, el asma, las enfermedades dérmicas y las enfermedades cardiovasculares entre otras, lo cual representa un serio problema de salud (Carretero *et al* 2008).

La inflamación es una reacción local especialmente del tejido conectivo vivo vascularizado, frente agentes infecciosos como bacterias, virus y parásitos o agentes irritantes como sustancias químicas, radiaciones térmicas o emanaciones radioactivas (Stites *et al* 1998). Como respuesta a esto, la inflamación destruye, diluye o aísla el agente nocivo permitiendo una regeneración o sustitución de el mismo tipo de células ó cicatrización del tejido lesionado (Cotran *et al* 2000).

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios representan un importante grupo; enfermedades como la artritis reumatoidea, la gota, el asma o los trastornos neurodegenerativos implican reacciones inflamatorias en algunos casos incapacitantes para quienes las padecen. Además, muchas otras dolencias menores que se presentan diariamente involucran procesos inflamatorios como respuesta natural del organismo ante traumas físicos y alergias (Franco *et al* 2007).

Como interfase primaria con el ambiente externo, la piel esta sujeta constantemente a heridas y a la invasión de patógenos, lo cual puede traer como consecuencia distintos trastornos inflamatorios que pueden ocurrir en el curso de la vida. Mientras algunos desórdenes inflamatorios de la piel suelen ser bien tratados, normalmente no es posible tratar satisfactoriamente las enfermedades inflamatorias crónicas de la piel, como la psoriasis y las dermatitis atópicas (Otuki *et al* 2005).

La inflamación cutánea es producida y mantenida por la interacción de varias poblaciones celulares (macrófagos residentes, queratinocitos, fibroblastos, mastocitos, plaquetas y células endoteliales) que alcanzan el foco inflamatorio por quimiotaxis (neutrófilos, monocitos y linfocitos) en respuesta a la liberación de mediadores pro-inflamatorios de estas células como las citosinas, las prostaglandinas, los leucotrienos, y el factor activador de plaquetas (Otuki *et al* 2005).

Los desordenes inflamatorios incluyen diferentes tipos de enfermedades reumáticas que son comunes en todo el mundo. Aunque el reumatismo es una de las enfermedades más antiguas conocidas de la humanidad la cual afecta a la mayoría de población, no se ha hecho ningún progreso sustancial para alcanzar una cura permanente. La mayor desventaja que tienen en este momento las potentes medicinas sintéticas disponibles está en su toxicidad y en la reaparición de los síntomas después de la interrupción. Por lo tanto, el desarrollo y la selección de drogas con actividad antiinflamatoria sigue todavía en progreso, y hay muchas esperanzas en encontrar medicinas antiinflamatorias a partir de las plantas medicinales de los indígenas (Amresh *et al* 2007).

2.13 Clases de Inflamación

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas, aguda y crónica (Cotran *et al* 2000). La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve, con una duración que oscila entre minutos, hasta horas y pocos días; sus características principales son la exudación de fluido y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración de leucocitos (predominantemente neutrófilos). Por otra parte, la inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza por la presencia de linfocitos y macrófagos, y por la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo (Trowbridge & Emling 1993; Cotran *et al* 2000).

2.14 Mecanismos de Inflamación Aguda

Las células que participan en la inflamación se dividen en dos: 1) células circundantes (en plasma sanguíneo) son los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas; y 2) células en tejido conectivo como los mastocitos al rededor de los vasos sanguíneos, los fibroblastos en el tejido conectivo y en ocasiones macrófagos y linfocitos residentes (Cotran *et al* 2000).

Al inicio de la inflamación aguda se presentan tres componentes principales que son: modificaciones en el calibre de los vasos que dan lugar al aumento en el flujo de sangre, aumento de la permeabilidad vascular y migración de los leucocitos desde el punto en que abandonan la microcirculación hasta el foco de lesión donde se acumulan (referenciado en Stites 1998; Cotran *et al* 2000).

Las alteraciones del flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos se inician de forma muy rápida tras la lesión y evolucionan a un ritmo que depende de la intensidad de la misma. Se produce primero un periodo inconstante y transitorio de vasoconstricción de arteriolas, luego se produce una vasodilatación que afecta principalmente las arteriolas y da lugar a la apertura de lechos vasculares en la zona de lesión, como consecuencia hay un aumento en el flujo de la sangre, que a su vez es el motivo del enrojecimiento y el incremento del calor en la zona (referenciado en Stites *et al* 1998; Cotran *et al* 2000).

Luego se produce un aumento en la permeabilidad vascular que da lugar a la salida de un exudado rico en proteínas, hacia el intersticio. Esta es la característica principal y de mayor especificidad de la inflamación aguda (Cotran *et al* 2002). Así mismo la pérdida de fluido rico en proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular e incrementa la presión osmótica del fluido intersticial, este mecanismo da lugar a una importante salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial. Este incremento neto del fluido extravascular da origen al edema (Roitt *et al* 1997). Sin embargo para que se de este cambio de fluido y cambio en la permeabilidad vascular debe existir un cambio en la integridad del endotelio lo cual puede ocurrir mediante tres posibles mecanismos: 1) contracción de células endoteliales con ensanchamiento de las uniones intercelulares en las vénulas el cual es un mecanismo activado por la histamina, la bradisinina, los leucotrienos y otros tipos de mediadores químicos, 2) lesión endotelial directa con necrosis por parte del agente lesivo lo que ocasiona el desprendimiento de las células endoteliales y 3) los leucocitos se adhieren al endotelio en la fase temprana de la inflamación en donde se da liberación de formas tóxicas de oxígeno y de enzimas proteolíticas por parte de estos, causando lesión y desprendimiento del endotelio (referenciado en Roitt *et al* 1997, Cotran *et al* 2000).

Debido a la disminución del flujo sanguíneo en las fases iniciales de la inflamación, los leucocitos (inicialmente neutrófilos polimorfonucleares), abandonan su ubicación en la columna central y se sitúan en la superficie endotelial, este proceso se conoce como marginación. Posteriormente los leucocitos de forma individual, se colocan sobre el endotelio y se adhieren a él de forma transitoria (rodamiento), para finalmente adherirse al endotelio firmemente e iniciar el proceso de migración endotelial para llegar al sitio de lesión. Este proceso de migración celular depende de la expresión de moléculas de adhesión celular (MAC), que corresponden a las glicoproteínas de superficie celular que funcionan como receptores celulares. Las familias de moléculas implicadas en inflamación son las selectinas como la p-selectina, que esta presente en las células endoteliales y plaquetas, la 1-selectina que se encuentra en la mayor parte de los leucocitos, las inmunoglobulinas que incluyen dos moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1, presentes en las células endoteliales, y las integrinas las cuales se encuentran en todos los leucocitos (Roitt *et al* 1997).

Después de presentarse la migración leucocitaria, los leucocitos emigran hasta la zona de lesión, a través de un proceso denominado quimiotaxis, en donde la locomoción del leucocito esta orientada por un gradiente químico. Diversas sustancias exógenas y endógenas pueden actuar de modo quimiotáctico. Los agentes exógenos más comunes son los productos bacterianos, en el caso de los factores endógenos se encuentran los componentes del sistema de complemento especialmente la C5a, el leucotrieno 64 y las citocinas, en particular las de la familia interleucina-8 (IL-8) (Roitt *et al* 1997).

A continuación se produce la fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos que constituyen los dos principales efectos beneficiosos de la acumulación de leucocitos en el foco de la inflamación. La

fagocitosis se lleva a cabo por un reconocimiento y contacto con la partícula que va a ser ingerida por el leucocito, luego se engloba la partícula con formación posterior de una vacuola fagocitaria y por último la destrucción o degradación del material fagocitado (Cotran *et al* 2000).

2.15 Métodos para Evaluar la Actividad Antiinflamatoria

En la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios es importante el empleo de modelos experimentales en animales, ya que dependiendo del protocolo experimental, los resultados se pueden en parte extrapolar al posible comportamiento en humanos. Existen varios tipos de protocolos en función de la forma de aplicación, agente irritante utilizado o duración del proceso inducido (referenciado en Yueqin 2006). Los métodos pueden ser utilizados entonces bajo los siguientes parámetros:

- En función de la forma de aplicación se emplean métodos que provocan una irritación tópica, aguda o subcrónica y son válidos para el estudio de sustancias activas en procesos inflamatorios de piel y mucosas. La administración oral o parenteral es útil para el estudio de agentes de efecto sistémico, independientemente del agente irritante.
- El agente irritante varía en función del modelo que se quiera mimetizar, puede ser AA, TPA, serotonina (5-HT), histamina, carragenina, bradicinina (BK), PLA₂, entre otros. Unos de administración tópica y otros de empleo parenteral.
- La duración del proceso y del tratamiento va a condicionar la posible utilidad del extracto o agente antiinflamatorio. En algunos procesos agudos se cuantifica el edema inducido, que a veces dura minutos y otras horas. Otros procesos inducen una auténtica inflamación, por lo que

además de edema se pueden valorar otros parámetros, como enzimas inducidas, o mediadores liberados.

El porcentaje de inhibición del edema se refiere al grupo control (no tratado) al cual se le administra solamente el agente irritante (100% de inflamación). Es imprescindible comparar el resultado con una sustancia o fármaco de referencia (referenciado en Yueqin 2006).

Los métodos empleados para el estudio de los agentes antiinflamatorios se han realizado *in vivo* e *in vitro*. En la actualidad existen diferentes técnicas que permiten evaluar las propiedades antiinflamatorias de las sustancias, dichos métodos se clasifican en (referenciado en Piñeros 2003):

- Modelos de inflamación aguda (p.e: edema plantar, edema auricular).
- Modelos de inflamación crónica (p.e: granulomas inducidos por disco de algodón y artritis por adyuvante y carragenina).
- Técnicas específicas (p.e: Técnica de Edwards, Técnica de Sedwick).

2.15.1 Edema Auricular agudo inducido por TPA

El TPA es un potente agente flogógeno y promotor de tumores que se encuentra en el aceite de croton (*Croton tiglium* L.). La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria. El TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa C (PKC), dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La enzima es activada por diacilglicerol (DAG), mediador liberado a partir de inositol-fosfolípidos de la membrana. El TPA y otros ésteres del forbol cuando se intercalan en la membrana pueden actuar como sustitutos del DAG, activando la PKC de forma más permanente que el

mediador endógeno, ya que el TPA es difícilmente degradable. La PKC activada actúa a diferentes niveles, incluyendo la liberación de AA, formación de prostanoïdes, incremento de radicales libres y síntesis de diversas proteínas proinflamatorias (referenciado en Yueqin 2006).

Tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación entre 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor como consecuencia de la extravasación de líquido, siendo el edema máximo a las 6-8 h. Transcurridas 12-14 h el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 h. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de leucocitos PMN a las células endoteliales entre 4-6 h, y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las 6 h. Al cabo de 6-24 h comienza el acumulo de leucocitos en la dermis que dan lugar a abscesos subcorneales a las 48-72 h. Por último, tras 48-96 h se observa hiperplasia en la membrana basal epidérmica, debida al incremento del número de células en división (referenciado en Yueqin 2006).

El estudio bioquímico demuestra un incremento de AMPc, PGE2 y PGE2a, además de actividad de la enzima ornitín-descarboxilasa (ODC) y de síntesis proteica. Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como indometacina, aunque los inhibidores de la COX, LOX y PLA2 dan buenos resultados, además de corticoides y antihistamínicos. La ventaja del método es la rapidez y poca muestra necesaria para desarrollar un estudio e incluso una curva dosis efecto. El principal inconveniente radica en la falta de selectividad, ya que un elevado número de fármacos y sustancias objeto de análisis suelen dar resultados positivos en este test. Otro problema adicional es que el fármaco se administra conjuntamente con el irritante, lo que permitiría conocer un grado de protección, no de curación real (referenciado en Yueqin 2006).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

3.1 Problema de investigación

Las enfermedades inflamatorias representan uno de los grandes problemas médicos actuales ya que muchas de estas son causadas por una activación descontrolada y continuada de respuestas inflamatorias que causan daño en los tejidos. Así, hoy en día una de las principales causas de consulta médica es el dolor y la inflamación que se produce debido a alteraciones muy diversas. En consecuencia, existen una gran variedad de enfermedades del aparato locomotor, las cuales afectan las articulaciones, los músculos, los huesos y los tendones. De las anteriores, las más comunes son las enfermedades reumáticas las cuales aquejan no solo a la mayoría de los adultos de la tercera edad sino también a muchos niños.

En Colombia existe una gran variedad de plantas medicinales, que desde tiempos inmemorables, han sido utilizadas en la medicina tradicional por las culturas aborígenes para tratar diversas dolencias y enfermedades. Una de estas es *Bursera tomentosa*, un árbol bien distribuido por las regiones del país y que es conocido vulgarmente con el nombre de tatamaco. A esta planta se le han atribuido propiedades curativas frente a dolencias relacionadas con la próstata y como calmante de dolores premenstruales entre otros. Así pues, de esta planta ya se han hecho algunos estudios con sus extractos en el laboratorio de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, y por los antecedentes bibliográficos y etnobotánicos se cree que tiene un gran potencial como antiinflamatorio natural.

3.2 Pregunta de investigación

¿Presentarán actividad antiinflamatoria las fracciones obtenidas a partir de los extractos en Petrol y Etanol, de las Hojas y de la Corteza de *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & Pl.?

3.3 Justificación

Ya que la inflamación es uno de los problemas relacionados con muchas de las enfermedades que aquejan gran parte de la población mundial, es importante adelantar investigaciones de tipo fitoquímico que permitan, a largo plazo, desarrollar fármacos naturales y económicos que ayuden a controlar esta dolencia. Por otro lado, la mayoría de fármacos que se utilizan hoy en día para controlar la inflamación tienen efectos colaterales en otros sistemas del cuerpo como el digestivo o el nervioso central, por lo cual es de gran interés analizar otro tipo de sustancias alternas que combatan este mal.

Así, uno de los primeros pasos que se debe dar en la investigación, es probar la acción que tienen ciertas plantas medicinales utilizadas dentro de nuestra medicina tradicional, ya que en ellas se encuentra un gran potencial farmacológico y económico, además de ser un recurso natural mucho menos nocivo que los actualmente utilizados.

Por lo anterior, es de gran importancia para la medicina y para las empresas farmacéuticas, encontrar y desarrollar nuevos fármacos que ayuden a controlar y a prevenir la inflamación en muchos de los tipos de enfermedades. Así, el conocimiento entnobotanico que tienen nuestras culturas indígenas de las plantas medicinales, cumple un importante papel en el desarrollo de la investigación fitoquímica, ya que abre nuevos campos para el desarrollo de fármacos naturales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- Evaluar la acción antiinflamatoria de las fracciones obtenidas a partir de los extractos en Petrol y en Etanol, de las Hojas y la Corteza de *Bursera tomentosa*.

4.2 Objetivos Específicos:

- Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en las fracciones obtenidas a partir de los extractos en Petrol y en Etanol, mediante pruebas químicas preliminares y cromatografías de capa delgada.
- Evaluar cuales de las fracciones obtenidas a partir de los extractos en Petrol y en Etanol tienen una actividad antiinflamatoria significativa después de haber inducido inflamación a ratones Balbce mediante el método del edema auricular.
- Comparar las fracciones obtenidas a partir de los extractos con un control negativo (vehículo) y un control Positivo (Patron).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Diseño de la investigación

Factor de diseño: Sustancias aplicadas a los ratones para evaluar la acción antiinflamatoria de *Bursera tomentosa*.

Niveles del factor de diseño:

- Fracción Petrol
- Fracción CH₂Cl₂
- Fracción AcOEt
- Control (Vehiculo)
- Indometacina (Patrón)

Variable respuesta: Deltas (Δ) de peso de las orejas del ratón.

Unidad de respuesta: Ratón Ballce

Unidad de muestreo: Ratón Ballce

5.1.1 Población de estudio y Muestra

La población de estudio se compuso de un grupo de 85 ratones Ballce con un peso promedio entre 40g y 55g. Los ratones fueron proporcionados por el Bioterio de la Pontificia Universidad Javeriana y se mantuvieron en jaulas metálicas con camas de aserrín, en grupos de seis individuos por jaula (Figura 2). Los ratones se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia, a una temperatura constante, con el mismo ciclo de luz día/noche, con agua suficiente y con una dieta adecuada compuesta por rodentina.



Figura 2. Grupos de ratones Balce y jaulas para contenerlos. Fotos tomadas por el autor.

5.1.2 Variables de estudio

Debido al protocolo de experimentación y las condiciones del experimento, la investigación corresponde a un diseño experimental completamente al azar.

Variable independiente: Sustancias con posible acción antiinflamatoria.

Variable dependiente: Deltas (Δ) de peso de las orejas del ratón.

5.2 Métodos

5.2.1 Métodos Utilizados Comúnmente en Fitoquímica

En ésta parte se citan los métodos y las técnicas que más se utilizan en las investigaciones fitoquímicas, los cuales fueron revisados antes de manipular los materiales y de proceder a trabajar con *Bursera tomentosa*.

5.2.1.1 Procesamiento del Material Vegetal

Las plantas deben ser secadas para su extracción, así la planta se debe limpiar, separar en sus partes y es esencial que la operación de secado sea llevada a cabo bajo condiciones controladas, para evitar la ocurrencia de algunas transformaciones químicas extrañas. Los órganos vegetales deben ser secados tan rápido como sea posible, utilizando temperaturas por debajo de los 40°C y, preferiblemente con una buena corriente de aire, para asegurar un contenido de humedad no mayor al 10% (Bilbao 1997, Pedrozo 2004).

El material vegetal seco se debe pulverizar para romper los tejidos celulares y permitir una mayor superficie de contacto material-solvente; tal procedimiento se debe hacer utilizando un molino apropiado, limpio y que no genere mucho calor (Bilbao 1997, Pedrozo 2004).

5.2.1.2 Proceso de Extracción

La forma mas precisa de extracción depende la textura y el contenido acuoso del material vegetal a extraer y, del tipo de sustancia que se va a aislar. Los metabolitos secundarios pueden ser volátiles, oleoresinosos, resinosos sólidos, termolábiles, termoestables, lipofílicos e hidrofílicos. Teniendo en cuenta todas estas características se puede seleccionar entre una o más técnicas de extracción. Si la extracción es hecha a un material vegetal al cual se le va a comprobar una actividad biológica es preferible hacerla por maceración en frío y en lo posible, las temperaturas de tratamiento no deben sobrepasar los 40°C para evitar la degradación de metabolitos termolábiles (Bilbao 1997, Pedrozo 2004).

“La extracción por maceración consiste en tener el material vegetal en contacto con un líquido (solvente) frío, en recipientes de vidrio o de acero inoxidable. Esta operación requiere un tiempo más o menos largo (96 horas como mínimo y un tiempo ideal de 8 días), y generalmente va acompañada de trituración mecánica del material. Es el método más recomendable para extraer sustancias termolábiles” (Pedrozo 2004). “La homologación de técnicas fitoquímicas recomienda hacer extracción sucesiva con dos solventes de polaridad creciente, empleando primero el de menor polaridad y luego el de mayor polaridad” (Bilbao 1997).

5.2.1.3 Concentración de los Extractos

Para evaporar los extractos se debe utilizar un rotavapor, concentrándolos al vacío a temperaturas entre 30°C y 40°C, hasta obtener el mínimo volumen, y en caso de extractos acuosos o alcohólicos estos deben liofilizarse, cuando sea posible (Bilbao 1997, Pedrozo 2004).

5.2.1.4 Proceso de Floculación

Para producir precipitaciones químicas se utilizan reactivos que forman sólidos insolubles con uno o más de los constituyentes de la mezcla a fraccionar. Dichos Precipitados (Flóculos) se pueden recuperar por filtración o por decantación. Las precipitaciones pueden ser causadas además por cambios bruscos de la polaridad o del pH en el medio (Proceso de extracción ácido-base) (Pedrozo 2004).

5.2.1.5 Fraccionamiento de los Extractos

“La cromatografía líquido-sólido es aquella en que la superficie sólida adsorbe pequeñas capas de moléculas de componente sólido de una

mezcla. Por cromatografía líquido-sólido pueden separarse dos solutos que difieran en coeficientes de adsorción hacia cierto sólido. En esta modalidad están comprendidas las cromatografías de capa delgada y de columna” (Bilbao 1997).

El fraccionamiento por Cromatografía en Columna (CC) “es una técnica que se lleva a cabo introduciendo la fase estacionaria dentro de un cilindro largo de vidrio, provisto de una llave de paso en su parte inferior, obteniéndose así una columna del material retenedor. El cilindro puede ser cambiado por una bureta o por algún otro recipiente similar” (Pedrozo 2004).

En la Cromatografía en Columna clásica, las dimensiones de la columna son escogidas de acuerdo a la cantidad de muestra a separar y, al tipo de adsorbente a utilizar. Por regla general debe emplearse 20 a 30 veces más adsorbente que el peso de material que se desea separar. La altura del adsorbente al diámetro de la columna, debe estar en una relación de 8 a 1 o de 10 a 1 (Bilbao 1997, Pedrozo 2004).

“La velocidad de elución de la Cromatografía en Columna puede ser aumentada mediante un sistema de vacío (Cromatografía líquida de vacío - CLV-) acoplado a la llave de paso inferior de la columna de vidrio. En este caso, la columna debe ser recta con una placa de vidrio sinterizado con poros entre 10-15 μ o 10-20 μ . Los solventes utilizados deben ser poco volátiles y de baja viscosidad. Como adsorbentes se pueden utilizar sílica gel 60H, alúmina 60H, LiChrosorb RP-8 o RP-18, etc. El vacío aplicado se encuentra entre los 20-70 mmHg” (Pedrozo 2004).

“Los fraccionamientos continuos líquido-líquido se basan en la distribución de una sustancia entre dos fases líquidas inmiscibles, dicha sustancia no deben reaccionar, asociarse o disociarse. En los procesos de extracción empleados

normalmente en fitoquímica, una fase es siempre agua y la otra un disolvente orgánico inmiscible con ella; así, se debe tener presente que un cambio en el disolvente cambiaría la solubilidad en dicha fase, y se alteraría el coeficiente de reparto. En general la regla de que lo semejante disuelve a lo semejante es una guía adecuada siempre y cuando se escoja el disolvente ideal” (Pedrozo 2004).

Existen dos tipos de equipos de fraccionamiento a escala de laboratorio, uno para solventes menos densos que el agua, y otro para los mas densos que ella (Figura 3). Es conveniente que el solvente de fraccionamiento sea de bajo punto de ebullición para evitar calentamientos innecesarios de la solución (Pedrozo 2004).



A.

B.

Figura 3. Equipos de Fraccionamiento. Fotos tomadas por el autor.
A: Equipo de fraccionamiento para solventes menos densos que el agua.
B: Equipo de fraccionamiento para solventes mas densos que el agua.

5.2.1.6 Cromatografías de Capa Delgada

A la Cromatografía de Capa Delgada (CCD) se le conoce también con el nombre de "cromatografía en columna abierta" Entre sus ventajas sobresalen: su gran versatilidad, su velocidad en el desarrollo y su sensibilidad. La versatilidad deriva del gran número de adsorbentes diferentes disponibles en el comercio: silicagel (el mas ampliamente empleado), óxido de aluminio (alúmina), celita (tierra de Diatomeas),

hidróxido de calcio, fosfato de magnesio, poliamida, celulosa, etc., y mezclas de dos o más de ellos. La gran velocidad es debida a la naturaleza mas compacta del adsorbente y la sensibilidad se debe a que la separación de cantidades menores a los μg puede ser llevada a cabo si es necesario. (Pedrozo 2004).

La Cromatografía en Capa Delgada (TLC, sus siglas en inglés, Thin Layer Chromatography) nos permite entre otras cosas: determinar el grado de pureza de una muestra, comparar muestras, hacer el seguimiento de una reacción química, controlar el contenido de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna y determinar las condiciones más adecuadas para una cromatografía en columna. La fase estacionaria consiste en una fina capa delgada de gel de sílice o alúmina adherida a un soporte de vidrio, aluminio o materiales plásticos con un grosor que puede oscilar entre 1 hasta 0,1 – 0,2 mm (López et al 2005).

Los Silicagel poseen un grupo funcional Si-OH y en ellos, la letra G indica que el material correspondiente contiene yeso como aglutinante mientras que los rotulados con la letra H no lo contienen, los señalados con la letra P son los utilizados en CCD preparativa y, los que poseen la letra R tiene un alto grado de purificación del adsorbente. La letra F significa que dicho adsorbente contiene indicador de fluorescencia (el subíndice numérico que acompaña a esta letra indica la longitud de onda para excitar la fluorescencia). El número que sigue a la letra indica el diámetro promedio de poro, así el Silicagel G (tipo 60) posee un poro de 60A y es el adsorbente mas utilizado debido a que presenta buena reproducibilidad de los resultados (Pedrozo 2004).

Para realizar la Cromatografía de Capa Delgada se aplica la muestra disuelta en la parte inferior de la placa, con la ayuda de un capilar. Las muestras se

deben colocar de tal forma que al ponerlas en contacto con el solvente que se encuentra en la cámara cromatográfica no las cubra. La placa se introduce verticalmente en la cámara que contiene en el fondo una pequeña cantidad del eluyente que se va a usar (fase móvil), dejando que el solvente ascienda por capilaridad. Cuando el eluyente ha ascendido hasta casi el borde superior de la placa, se saca, se seca y se observan las señales (López et al 2005).

Muchas veces las sustancias desarrolladas por este método, al no ser coloreadas, no son visibles. Para hacerlas visibles se utiliza luz ultravioleta entre 240 – 270 nm. Para hacer visibles aquellas señales que no se detectan a la luz UV ni son coloreadas, se procede al revelado de la placa usando un agente revelador. El revelado consiste en pulverizar en forma de spray la placa con el agente revelador y posteriormente calentarla en una estufa alrededor de 100 °C, lográndose de esta manera la carbonización de los compuestos orgánicos (López et al 2005).

5.2.2 Métodos de la Investigación con *Bursera tomentosa*

En los numerales que aparecen a continuación se describen los métodos y las técnicas utilizados para obtener los extractos, las fracciones y los resultados cromatográficos de *Bursera tomentosa*.

5.2.2.1 Recolección del Material Vegetal

La planta *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & Pl. se colectó en la vereda La Balastrea del municipio de Agua de Dios Cundinamarca, el cual limita con los municipios de Tocaima, Girardot, Nilo y Ricaurte. El municipio de Agua de Dios tiene una altitud de 400 msnm, una temperatura promedio de 27°C y una precipitación pluviométrica de 1.000 mm promedio anuales (Figura 4).



Figura 4. Mapa de Relieve y Límites del Municipio de Agua de Dios. Tomado de maps.google.com

Se colectaron las hojas y la corteza de un árbol escogido al azar que se encontraba a la orilla del camino en una finca de la vereda. Los materiales utilizados para esto fueron: un machete para cortar los troncos y unas tijeras podadoras para cortar las ramas con hojas. Así pues, se colectaron mas o menos 7 Kg de material fresco (3 Kg de hojas y 4 Kg de Corteza) (Figura 5).



Figura 5. Hojas y Troncos de *Bursera tomentosa*. Fotos tomadas por el autor

Posteriormente las hojas fueron separadas cuidadosamente de las ramas y los troncos fueron limpiados de Líquenes y Briofitos mediante un raspado, luego la Corteza fue retirada de los troncos con un cuchillo.

5.2.2.2 Procesamiento del Material Vegetal

Las muestras de la Corteza y de las Hojas de *Bursera tomentosa* se dejaron secar al aire libre, obteniendo aproximadamente 1.5 Kg de material seco con respecto a las Hojas y 2 Kg de material seco, con respecto a la Corteza.

Luego se procedió a la molienda para pulverizar el material seco de *Bursera tomentosa*, lo cual se realizó en el molino industrial Salvato modelo 35010 del Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. La molienda fue hecha por separado para cada uno de los órganos (Figuras 6 y 7).

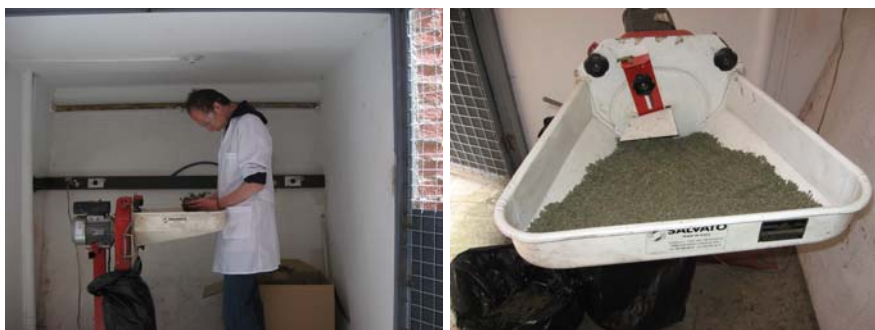


Figura 6. Proceso de Molienda. Fotos tomadas por el autor.



Figura 7. Material Vegetal Pulverizado (Hojas y Corteza). Fotos tomadas por el autor.

5.2.2.3 Obtención de los Extractos de Hojas y Corteza

La técnica de extracción que se escogió teniendo en cuenta las características mencionadas en el numeral 5.2.1.2, fue la de maceración en frío, ya que los extractos estarían sujetos a pruebas biológicas y se quería evitar alterar las sustancias termolábiles. Para hacer esto, primero se determinó el peso seco exacto del material vegetal que se iba a extraer (835 g de Hojas y 1813 g de Corteza) y posteriormente éste se puso en erlenmeyers de 5000 ml con los solventes.

La primera extracción se hizo en Éter de Petróleo realizándose cambios de solvente cada 4 días aproximadamente. Al marco seco de la primera extracción, se le realizó una extracción posterior en Etanol e igualmente se le cambió el solvente cada 4 días aproximadamente (Figura 8). La extracción se demoró alrededor de 10 días para cada uno de los órganos y de este procedimiento se obtuvieron un extracto en Petrol y un extracto en Etanol para cada uno ellos.

Después se procedió a filtrar los extractos para quitar los residuos sólidos del material vegetal. Esto se realizó pasando el extracto a través de papel filtro, con un embudo de vidrio y en una base de metal con su respectivo aro (Figura 9).

Los extractos de *Bursera tomentosa* fueron concentrados con la ayuda de un rotavapor Büchi RE 111, y con un controlador de vacío Büchi B-720. Los Extractos en Petrol se concentraron a baja temperatura y no se les puso presión de vacío, mientras que los extractos en Etanol fueron concentrados con presión de vacío y temperatura baja (Figura 10).



Figura 8. Extracción por Maceración en frío de Hojas y Corteza Pulverizados. Fotos tomadas por el autor.

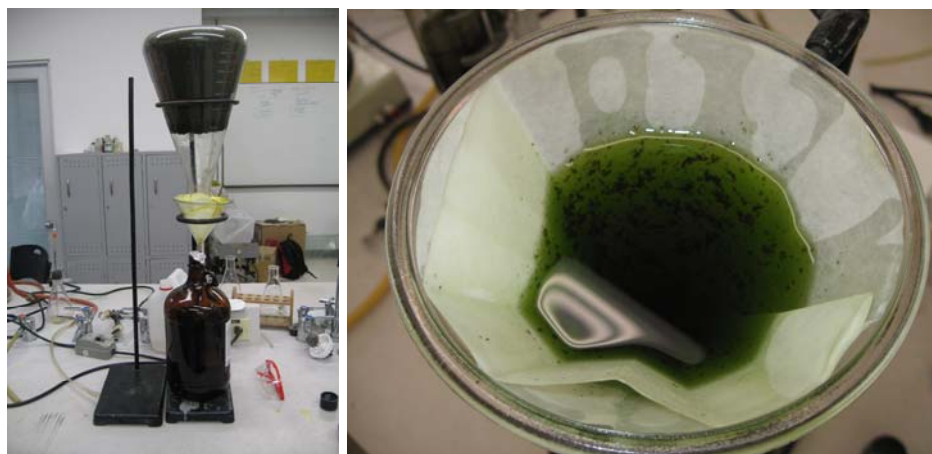


Figura 9. Filtración de los Extractos. Fotos tomadas por el autor.

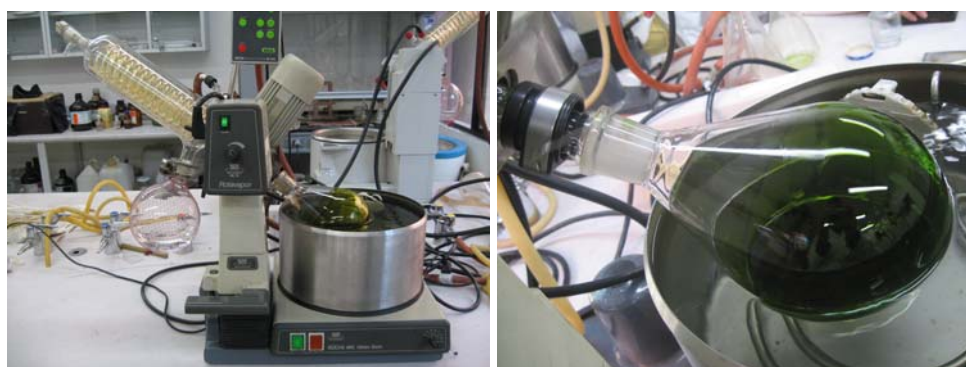


Figura 10. Concentración de los Extractos en el Rotavapor. Fotos tomadas por el autor.

Posteriormente los extractos se dejaron reposar hasta que se evaporó el excedente de solvente y llegaron a sequedad. Al estar los extractos secos, se llevaron a la balanza analítica y se determinaron los pesos secos para cada uno de estos, para después hacer los cálculos correspondientes a los porcentajes de rendimiento.

En el caso de *Bursera tomentosa*, los extractos fueron floculados para remover las grasas. Así, los extractos en Petrol fueron floculados con Acetona en proporción 1:2, y los extractos en Etanol fueron floculados con H₂O en la proporción mencionada anteriormente (Figura 11). Luego de esto, los extractos fueron filtrados nuevamente para separarlos del floculo, se volvieron a concentrar, se dejaron reposar hasta llegar a la sequedad y se volvieron a pesar con el fin de calcular nuevamente los porcentajes de rendimiento.



Figura 11. Floculación de Extractos en Petrol y en Etanol (Hojas y Corteza). Fotos tomadas por el autor.

5.2.2.4 Fraccionamiento de los Extractos

Los extractos obtenidos a partir de las Hojas y de la Corteza fueron fraccionados según sus propiedades. Esto se realizó con el fin de extraer los metabolitos de los extractos según el orden de elución comúnmente utilizado y la polaridad de estos. Los procedimientos mediante los cuales se realizaron la extracción y los fraccionamientos están resumidos en la Figura 12.

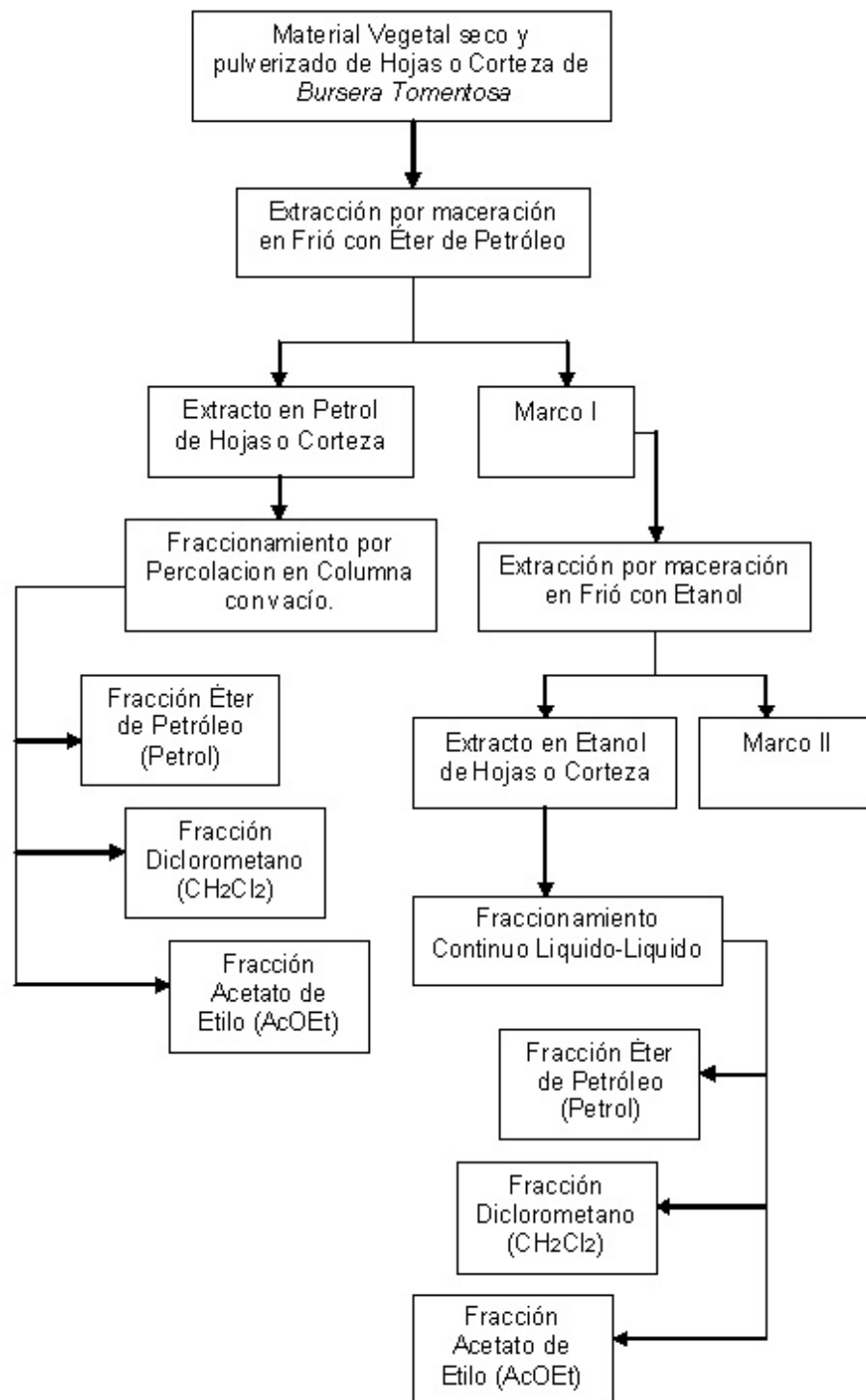


Figura 12. Marcha del trabajo realizado para la Extracción y los Fraccionamientos

5.2.2.4.1 Fraccionamiento de los Extractos en Petrol

La técnica escogida para fraccionar los extractos en Petrol derivados de las Hojas y de la Corteza de *Bursera tomentosa* fue la Percolacion en Columna con vacío. La fase estacionaria escogida fue Sílicagel 60 G Merck y las fases móviles escogidas fueron Éter de Petróleo, Diclorometano (CH_2Cl_2) y Acetato de Etilo (AcOEt) (Figuras 13 y 14).

Así pues, se percolaron 12 g del extracto en Petrol de las Hojas en 120 g de sílica gel G 60, por lo cual la relación de extracto-sílica fue de 1:10. Por comodidad se fraccionaron primero 6 g del extracto y luego los otros 6, por lo que se hicieron dos percolaciones de la misma forma para éste extracto con las fases móviles descritas anteriormente.

Así mismo, se percolaron 22 g del extracto en Petrol de la Corteza en 220 g de sílica gel G 60, lo que quiere decir que la relación extracto-sílica fue nuevamente 1:10. También hicieron dos percolaciones para éste extracto, fraccionando primero 11 g y luego los otros 11. Igualmente, las fases móviles fueron las mismas que se mencionaron anteriormente.

En consecuencia se obtuvieron tres fracciones para el Extracto en Petrol de las Hojas (fracción Petrol, fracción CH_2Cl_2 , fracción AcOEt) y tres fracciones para el extracto en Petrol de la Corteza (fracción Petrol, fracción CH_2Cl_2 , fracción AcOEt). Estas fracciones fueron nuevamente concentradas, llevadas a sequedad y pesadas para poder continuar con el cálculo de los porcentajes de rendimiento (Anexo 1).



Figura 13. Cromatografía líquida de vacío en Columna, Extracto en Petrol, Hojas.
Fotos tomadas por el autor.

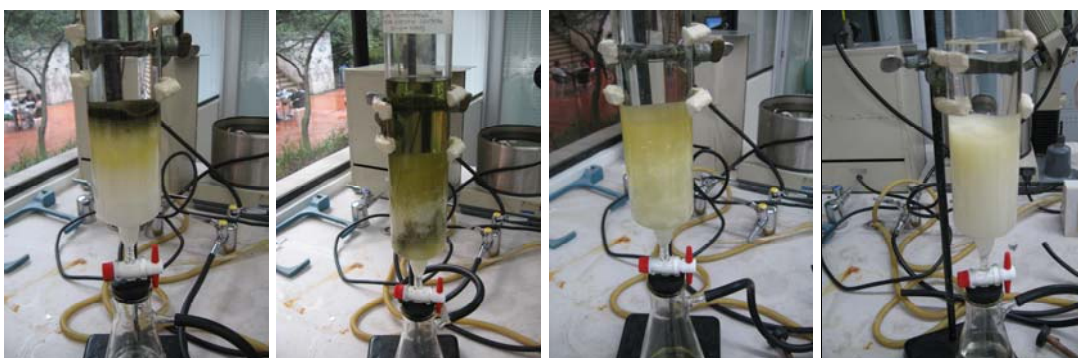


Figura 14. Cromatografía líquida de vacío en Columna, Extracto en Petrol, Corteza.
Fotos tomadas por el autor.

5.2.2.4.2 Fraccionamiento de los Extractos en Etanol

El método que se escogió para fraccionar los extractos en Etanol de *Bursera tomentosa* derivados de las Hojas y la Corteza, fue el fraccionamiento continuo liquido-liquido, ya que éstos eran extractos acuosos y esta técnica se ajustaba a las características de éstos.

Por consiguiente, los extractos fueron nuevamente diluidos en el solvente en el que se extrajeron y posteriormente se montaron en los equipos de fraccionamiento correspondientes a cada una de las fases con las que se fraccionó. Así, las fases inmiscibles escogidas para fraccionar los extractos fueron Éter de Petróleo, Diclorometano (CH_2Cl_2) y Acetato de Etilo (AcOEt).

Las fracciones Petrol y Acetato de Etilo (AcOEt) se obtuvieron con el equipo para fraccionar con solventes menos densos que el agua y la fracción Diclorometano (CH_2Cl_2) se obtuvo con el equipo para fraccionar con solventes más densos que el agua. Lo anterior implicó cambiar de montaje con cada uno de las fracciones ya que se debía hacer la elución según la polaridad de los solventes (Figura 15).

De esta forma, se obtuvieron tres fracciones del extracto en Etanol de las Hojas, y tres fracciones del extracto en Etanol de la Corteza, las cuales se volvieron a concentrar, se llevaron a la sequedad y se pesaron para poder continuar con el cálculo de los porcentajes de rendimiento (Anexo 1).



Figura 15. Fraccionamientos continuos liquido-liquido de los extractos en Etanol.
Fotos tomadas por el autor.

5.2.2.5 Pruebas Químicas Preliminares

Para tener un indicio del tipo de compuestos presentes en las fracciones obtenidas, se realizaron dependiendo del extracto del cual provenían éstas, las siguientes pruebas químicas preliminares: la Prueba de Liebermann-Burchard, la Prueba de Salkowski, la Prueba de Baljet, la Prueba del

Hidroxamato Férrico, la Prueba de Shinoda, la Prueba del Cloruro Férrico, la Prueba de Antrona, la Prueba de Dragendorff y la Prueba de la espuma (Anexo 2). Algunas de estas pruebas se hicieron en una placa excavada y las otras en tubos de ensayo.

5.2.2.5.1 Pruebas para Fracciones Derivadas de Extractos en Petrol

La prueba de Liebermann-Burchard es la más utilizada en el análisis de Esteroides y Esteroles y se realizó para determinar la presencia de éstos. La reacción consistió en someter la sustancia problema disuelta en cloroformo a la acción de una mezcla de anhídrido acético, cloroformo (CHCl_3) y ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), empleando gotas en la placa excavada. En esta prueba se genera una gama de colores rosa, violeta, azul, verde, que varían con el tiempo (0, 1, 5, 20 y 60 minutos) en caso de que la prueba resulte positiva. Las gotas deben agregarse por el borde de la cavidad de la placa muy lentamente para apreciar los cambios de color, de lo contrario la mezcla reaccionante se quema y sólo se observa color café (Ikan 1991, Bilbao 1997).

La prueba de Salkowski se hizo para determinar la presencia de Esteroides y Terpenos. Esta se realizó disolviendo la muestra en cloroformo (CHCl_3) en una placa excavada y agregándole una gota de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Esta mezcla muestra una coloración amarilla o roja si la prueba es positiva (Domínguez 1985, Bilbao 1997).

La Prueba de Baljet se realizó para determinar la presencia de Esteroles y Terpenos. Esta prueba consistió en agregar gotas del Reactivo de Baljet al extracto y observar la reacción. El reactivo de Baljet consiste en dos soluciones; la solución A (1 g de ácido pícrico en 100 ml de Etanol) y la

solución B (10 g de NaOH en 100 ml de Agua). La prueba es positiva si se observa una tonalidad naranja o rojo oscuro (Domínguez 1985, Bilbao 1997).

La prueba del Hidroxamato Férrico se hizo para determinar la presencia Sesquiterpenlactonas. Las cumarinas por ser lactonas también dan positiva esta prueba. La prueba consistió en añadirle a la muestra una gota de solución metanólica (MeOH) 2N de clorhidrato de hidroxilamina y una gota de solución 2N de hidróxido de potasio (KOH). La mezcla se calentó durante uno o dos minutos. Luego se enfrió, se aciduló con HCl 0.5N y se añadió una gota de FeCl₃ al 1%, se observa la coloración violácea si el resultado es positivo (Domínguez 1983, Bilbao 1997).

5.2.2.5.2 Pruebas para Fracciones Derivadas de Extractos en Etanol

La Prueba de Shinoda se realizó para determinar la presencia de Flavonoides y Fenoles, los cuales reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio. La prueba consistió en mezclar 1 ml del extracto etanólico en un tubo de ensayo con 1 cm de cinta de Magnesio (Mg), después se le agregan 2 ml de HCl 2N. Los colores rosado, naranja, rojo o fresa indican prueba positiva (Ikan 1991, Bilbao 1997).

La prueba del cloruro férrico se hizo para reconocer Flavonoides y Fenoles. La prueba se desarrolló al agregar una gota de solución de cloruro férrico al extracto etanólico, después se observó. La presencia de flavonoides es evidente si hay una coloración verde o azul (Ikan 1991, Bilbao 1997).

La prueba de Antrona se realizó para determinar la presencia de Glicosidos Cardiotónicos de Flavonoides o de Terpenos. La prueba se realizó en un tubo de ensayo donde se colocó una gota de agua y uno a tres ml del extracto, después se dejó resbalar por la pared del tubo una solución reciente

(no mayor de 24 horas) de antrona. Si aparece un anillo azul o verdoso en la interfase, la prueba es positiva (Bilbao 1997).

La prueba de Dragendorff se hizo para determinar la presencia de alcaloides. El reactivo de Dragendorff se preparó disolviendo 8g de subnitrito de bismuto en 20 ml de HNO_3 concentrado, luego se añadió lentamente esta solución a una solución concentrada de 27.2 gramos de KI en 50 ml de agua. Se enfrió y decantó para separar los cristales de nitrato de potasio y se diluyó con agua a 100 ml. La prueba se desarrolló acidulando 1 ml del extracto etanólico con HCl al 0.5 %. Luego de esto, se agregó unas 2 o 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Si se evidencia la aparición de un precipitado marrón o café en la mezcla la prueba es positiva. (Domínguez 1985, Bilbao 1997).

La prueba de la Espuma se realizó con el objetivo de determinar la presencia de Saponinas. La prueba se hizo con 1 ml del extracto etanólico, al cual se le agregaron 4ml de agua destilada en un tubo de ensayo. Esta mezcla se agitó fuertemente durante 1 minuto. Las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua produciéndose espumas de alturas de hasta 2 cm. La prueba es positiva al formarse una espuma que permanezca durante más de 15 minutos (Ikan 1991).

5.2.2.6 Marcaje de Animales y Organización de Grupos Experimentales

Para poder realizar el bioensayo de manera ordenada, se procedió a marcar los animales y organizar los grupos experimentales.

Así pues, los ratones fueron marcados en distintas partes del cuerpo con ácido picrico diluido en agua y con un copito de algodón, esto tenía como fin organizar los grupos experimentales. Así pues, las marcas se hicieron de la

siguiente forma: marca en la cabeza = grupo 1, marca en la pata anterior derecha = grupo 2, marca en la pata posterior derecha = grupo 3, marca en la base de la cola = grupo 4, marca en la pata posterior izquierda = grupo 5, marca en la pata anterior izquierda = grupo 6, marca en el dorso a nivel de las patas anteriores = grupo 7, y marca de forma lineal en el dorso a nivel de las patas posteriores = grupo 8. La forma en la que se marcaron los ratones se muestra en la figura 16.

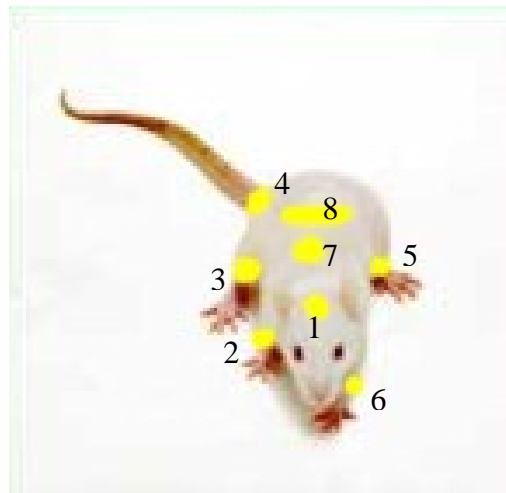


Figura 16. Forma de marcar los ratones para realizar el bioensayo. Tomado de imágenesgoogle.com y modificado por el autor.

Después de realizar las marcas, los 85 ratones se dividieron en grupos de 6 individuos por caja, para un total de 14 cajas. Cada caja contenía individuos con una de las marcas específicas citadas anteriormente, y a cada caja se le asigno un tratamiento. Ya que sobraba un ratón, la Caja del grupo control se dejó con 7 individuos, lo cual se hizo con el fin de tener una media más homogénea para este grupo y así poder hacer posteriormente las comparaciones estadísticas contra los otros grupos. Así, se hicieron 6 repeticiones para los tratamientos y la indometacina, y 7 para el grupo control.

5.2.2.7 Bioensayo para Evaluar la Actividad Antiinflamatoria de la Planta

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas a partir de *Bursera tomentosa* se siguió la técnica del Edema Auricular descrita por Young & De Young (1989) y modificada por Payá et al. (1993). Este bioensayo se realizó en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia en colaboración con el Doctor Luis Fernando Ospina. Mediante esta técnica se les indujo inflamación en las orejas a un grupo de ratones raza Balb/c, para posteriormente poder evaluar la actividad que tenían las fracciones en este tipo de trauma.

Para inducir la inflamación se administraron con una micropipeta 2,5 µg/oreja de 13-acetato-12-tetradecanoilforbol (TPA) disueltos en 20 µL de acetona. Los tratamientos y la indometacina se disolvieron en 20 µL de acetona-etanol (7:3) y las dosis escogidas fueron de 1 mg/oreja para los tratamientos, y 0,5 mg/oreja para la indometacina (figura 17). La dosis se escogió de ésta manera siguiendo la guía del Doctor Ospina, quien es experto en el tema, y asegura que ésta es la dosis indicada para evaluar extractos y fracciones obtenidos a partir de plantas. Por otro lado, Yuequin (2006) en su tesis Doctoral también reporta las mismas dosis para este tipo de bioensayo, por lo cual también se siguieron los lineamientos de este autor para escoger la dosis.

Los tratamientos y la indometacina se administraron tópicamente a razón de 10 µL por cada lado de la oreja derecha del ratón, e inmediatamente después de haber hecho esto en todas las cajas, el TPA fue administrado de igual forma y en la misma razón. La oreja izquierda de los ratones no fue tratada con el fin de poder calcular posteriormente los deltas de inflamación.

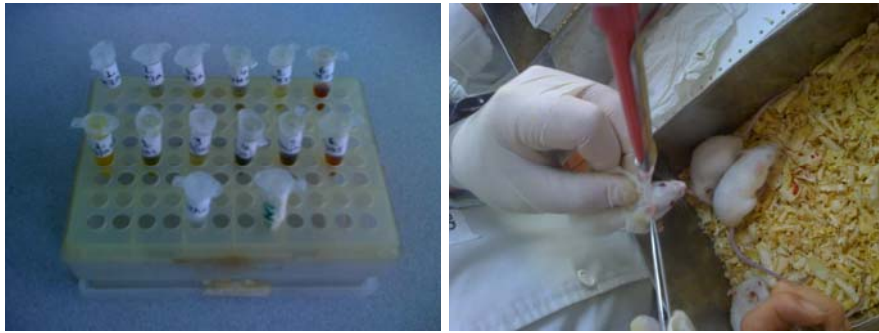


Figura 17. Tratamientos, Indometacina y su administración. Fotos tomadas por el autor.

Ya que para esta técnica el edema es máximo 4h después de la aplicación del agente irritante, transcurridas cuatro horas después la administración de éste, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se tomaron secciones circulares de las dos orejas del animal. Esto se hizo con la ayuda de un sacabocados de 6mm de diámetro para asegurar que las muestras tomadas fueran todas del mismo tamaño (Figura 18).

El experimento se realizo de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia y a los lineamientos éticos internacionales para el cuidado y uso de animales de experimentación.

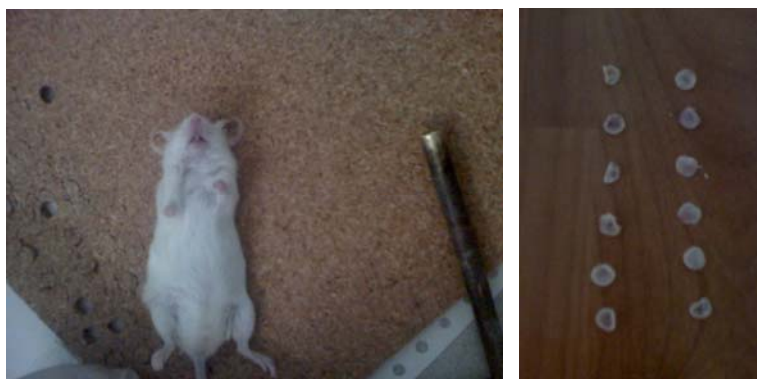


Figura 18. Proceso para sacar las secciones circulares de 6mm de ambas orejas. Fotos tomadas por el autor.

Para poder evaluar la acción antiinflamatoria que podían haber tenido los tratamientos, se pesaron las secciones circulares de la oreja izquierda y de la oreja derecha de cada ratón, con el fin de poder determinar por diferencia, el edema como delta de peso. Los resultados se expresaron en términos de éstos deltas de peso y como porcentajes de inhibición de inflamación con respecto al grupo control.

Para calcular los deltas de peso se utiliza la siguiente expresión:

$$\Delta P_{eso} = PO_t - PO_{nt}$$

Donde PO_t corresponde al peso de la oreja tratada (derecha) y PO_{nt} corresponde al peso de la oreja no tratada (izquierda).

Para calcular el porcentaje de inhibición de inflamación se utiliza la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibicion} = 100 - \left(\left(\frac{\Delta P_{Trat}}{\bar{X}\Delta P_C} \right) \times 100 \right)$$

Donde ΔP_{Trat} corresponde al delta de peso de cada uno de los individuos dentro de cada tratamiento y $\bar{X}\Delta P_C$ corresponde a la media aritmética de los deltas de peso del grupo control.

5.2.2.8 Cromatografías de Capa Delgada

En el caso de las fracciones obtenidas de los extractos de las Hojas y la Corteza de *Bursera tomentosa* se realizaron Cromatografías de Capa Delgada para comparar las fracciones homologas de los extractos en Petrol y en Etanol de cada una de las partes de la planta, como el ejemplo que se muestra en la Figura 19.

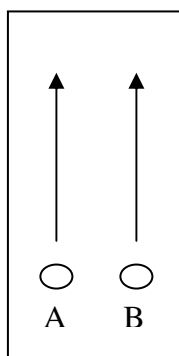


Figura 19. A: Fracción AcOEt del Extracto en Petrol de las Hojas.
B: Fracción AcOEt del Extracto en Petrol de la Corteza.
Fase móvil AcOEt - CH₂Cl₂ (7:3), Fase estacionaria Silicagel G 60 F 254

Las Cromatografías de Capa Delgada fueron hechas en placas de Silicagel G 60 F 254 Merck y las fases móviles fueron escogidas de acuerdo al solvente con que fueron extraídas las fracciones y a las propiedades de las mismas. Las cromatoplacas median 7 cm de largo por 3 cm de ancho. Por otro lado, para realizar las cromatografías, las muestras de las fracciones obtenidas a partir de extractos en Petrol fueron disueltas en el solvente con el cual se fracciono, mientras que las muestras de las fracciones obtenidas a partir de extractos en Etanol fueron disueltas todas en EtOH.

Las fases móviles para las cromatografías realizadas se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1. Fases Móviles y Estacionarias de las Cromatografías Hechas para las Fracciones Obtenidas de Los extractos en Petrol y en Etanol.

Fracciones	Fases Móviles	Fases Estacionarias
Fracciones Petrol de los extractos en Petrol de Hojas y Corteza	Éter de Petróleo puro	Silica gel G 60 F 254
Fracciones CH ₂ Cl ₂ de los extractos en Petrol de Hojas y Corteza	CH ₂ Cl ₂ puro	Silica gel G 60 F 254
Fracciones AcOEt de los extractos en Petrol de Hojas y Corteza	AcOEt - CH ₂ Cl ₂ (7:3)	Silica gel G 60 F 254
Fracciones Petrol de los extractos en Etanol de Hojas y Corteza	Éter de Petróleo-AcOEt (9:1)	Silica gel G 60 F 254
Fracciones CH ₂ Cl ₂ de los extractos en Etanol de Hojas y Corteza	CH ₂ Cl ₂ -AcOEt (9.5:0.5)	Silica gel G 60 F 254
Fracciones AcOEt de los extractos en Etanol de Hojas y Corteza	CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH (8.5:1.5)	Silica gel G 60 F 254

5.3 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos a partir del bioensayo se procesaron mediante un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA) ya que este es el análisis que correspondía al diseño experimental. Para poder hacer el análisis de varianza se realizaron previamente una prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas, y una prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la distribución normal de los datos.

Finalmente se hizo una prueba de comparación múltiple para averiguar cuales de los tratamientos eran mas significativos. Así pues, se realizo una prueba de Dunnett, ya que en esta prueba los tratamientos se comparan contra el control, lo cual es el análisis mas apropiado para el experimento planteado y para los resultados obtenidos. Con las medias de los deltas de peso y con las medias de los porcentajes de inflamación se hicieron graficas para condensar y organizar mejor la información.

6. RESULTADOS

6.1 Cantidades y Rendimiento de los Extractos y las Fracciones Derivados de *Bursera tomentosa*.

Del material vegetal seco y molido, se obtuvieron las siguientes cantidades de peso seco en gramos (g), y se obtuvo el rendimiento en porcentaje (%) para los extractos secos en Petrol y en Etanol (Tabla 2 y Tabla 3):

Tabla 2. Pesos y rendimiento, del material seco y los extractos en Petrol, de Hojas y Corteza de *Bursera tomentosa*.

Planta	Partes	Peso Seco (g)	Peso Extracto en Petrol AF (g)	Peso Extracto en Petrol DF (g)	Rendimiento (%)
<i>Bursera tomentosa</i>	Hojas	835	16.96	12.33	1.47
	Corteza	1813	30.20	30.20	1.66

AF= Antes de Flocular DF= Después de Flocular

Tabla 3: Pesos y rendimiento, del material seco y los Extractos en Etanol, de Hojas y Corteza de *Bursera tomentosa*.

Planta	Partes	Peso Seco (g)	Peso Extracto en Etanol AF (g)	Peso Extracto en Etanol DF (g)	Rendimiento (%)
<i>Bursera tomentosa</i>	Hojas	835	41.20	20.48	2.45
	Corteza	1813	27.09	8.59	0.47

AF= Antes de Flocular DF= Después de Flocular

De cada uno de los extractos secos en Petrol y en Etanol se obtuvieron tres fracciones a las cuales también se les calcularon los siguientes pesos secos en gramos (g) y los respectivos rendimientos en porcentaje (%) (Tabla 4):

Tabla 4: Pesos y rendimiento, de las Fracciones para los Extractos en Petrol y en Etanol, de Hojas y Corteza de *Bursera tomentosa*.

Tipo de Extracto	Peso del Extracto (g)	Fracción	Peso de la Fracción (g)	Rendimiento (%)
Extracto en Petrol de las Hojas	12.33	Petrol	2.93	23.76
		CH ₂ Cl ₂	8.50	68.93
		AcOEt	0.62	5.51
Extracto en Etanol de las Hojas	20.48	Petrol	1.82	8.88
		CH ₂ Cl ₂	3.75	18.31
		AcOEt	4.65	22.70
Extracto en Petrol de la Corteza	30.20	Petrol	0.36	1.19
		CH ₂ Cl ₂	21.16	70.06
		AcOEt	0.62	2.05
Extracto en Etanol de la Corteza	8.59	Petrol	0.82	9.54
		CH ₂ Cl ₂	2.02	23.51
		AcOEt	0.35	4.07

6.2 Pruebas Químicas Preliminares Para las Fracciones Derivadas de los extractos de *Bursera tomentosa*.

A las fracciones Petrol, CH₂Cl₂ y AcOEt obtenidas a partir de los extractos en Petrol y en Etanol se les realizaron las siguientes pruebas químicas preliminares con sus respectivos resultados (Tabla 5 y Tabla 6):

Tabla 5. Pruebas químicas preliminares para las Fracciones derivadas de los extractos en Petrol, de las Hojas y la Corteza de *Bursera tomentosa*.

Tipo de Extracto		Extracto en Petrol de las Hojas			Extracto en Petrol de la Corteza		
Fracción		Petrol	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Petrol	CH ₂ Cl ₂	AcOEt
Prueba Química	Lieberman-Burchard (Esteroides y Esteroles)	+	+	+	+	+	+
	Salkowski (Terpenos)	+	+	+	+	+	+
	Baljet (Terpenos y Esteroles)	+	+	+	+	+	+
	Hidroxamato Férrico (Sesquiterpenlactonas)	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Pruebas químicas preliminares, de las fracciones derivadas de los extractos en Etanol, de las Hojas y la Corteza de *Bursera tomentosa*.

Tipo de Extracto		Extracto en Etanol de las Hojas			Extracto en Etanol de la Corteza		
Fracción		Petrol	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Petrol	CH ₂ Cl ₂	AcOEt
Prueba Química	Shinoda (Flavonoides y Fenoles)	-	+	+	-	+	+
	Cloruro Férrico (Flavonoides y Fenoles)	-	+	+	-	+	+
	Drangendroff (Alcaloides)	-	-	-	-	-	-
	Prueba de Antrona (Glicosidos de Flavonoides o de terpenos)	-	-	+	-	-	-
	Prueba de la Espuma (Saponinas)	-	-	-	-	-	-

6.3 Pesos de las Orejas (secciones circulares) Obtenidos en el Bioensayo para los Tratamientos (Fracciones, Control e Indometacina).

Del bioensayo realizado con las fracciones obtenidas a partir de los extractos en Petrol y En Etanol de las Hojas se obtuvieron los siguientes pesos de las secciones circulares sacadas de cada oreja de los ratones: Tabla 7.

Del bioensayo realizado con las fracciones obtenidas a partir de los extractos en Petrol y En Etanol de la Corteza se obtuvieron los siguientes pesos de las secciones circulares sacadas de cada oreja de los ratones: Tabla 8.

Para la sustancia control (acetona-etanol), que a su vez era el vehiculo de dilución, y para la Indometacina, que era el fármaco patrón, evaluadas en el bioensayo, se obtuvieron los siguientes pesos de las secciones circulares sacadas de cada oreja de los ratones: Tabla 9.

Tabla 7: Pesos obtenidos a partir de las secciones circulares sacadas de las orejas sin Tratar y Tratada de cada ratón. Fracciones obtenidas de las Hojas.

Tratamiento	Individuo	Pesos en (g) de secciones circulares	
		Oreja sin Tratar	Oreja Tratada
Fracción Petrol Extracto en Petrol Hojas	1	18.1	37.2
	2	13.2	34.3
	3	13.3	26.1
	4	13.6	28.1
	5	12.4	28.4
	6	12.4	25.7
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Petrol Hojas	1	14.5	29.6
	2	12.6	31.7
	3	12.8	28.4
	4	14.1	25.6
	5	13.6	21.8
	6	13.8	16.4
Fracción AcOEt Extracto en Petrol Hojas	1	13.6	24.8
	2	12.5	19.8
	3	12.6	23.5
	4	13.6	28.3
	5	12.6	24.2
	6	10.9	18.7
Fracción Petrol Extracto en Etanol Hojas	1	8.7	30.1
	2	14.2	26.3
	3	11.7	23.6
	4	10.3	25.5
	5	11.4	24.4
	6	12.6	19.2
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Etanol Hojas	1	18.9	25.9
	2	13.3	29.9
	3	15.3	27.5
	4	13.5	21.7
	5	13.5	22.2
	6	11.3	17.6
Fracción AcOEt Extracto en Etanol Hojas	1	14.0	27.6
	2	13.1	23.5
	3	13.5	24.6
	4	13.3	26.5
	5	11.6	27.9
	6	12.0	27.5

Tabla 8: Pesos obtenidos a partir de las secciones circulares sacadas de las orejas sin Tratar y Tratada cada ratón. Fracciones obtenidas de la Corteza.

Tratamiento	Individuo	Pesos en (g) de secciones circulares	
		Oreja sin Tratar	Oreja Tratada
Fracción Petrol Extracto en Petrol Corteza	1	16.2	32.6
	2	14.6	25.7
	3	13.2	29.0
	4	14.6	27.6
	5	15.2	31.9
	6	11.6	25.1
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Petrol Corteza	1	15.5	28.5
	2	18.2	24.6
	3	14.5	32.2
	4	18.6	29.6
	5	12.9	31.0
	6	12.3	25.9
Fracción AcOEt Extracto en Petrol Corteza	1	15.8	26.7
	2	14.0	26.7
	3	15.3	30.7
	4	12.5	18.0
	5	16.5	28.3
	6	11.9	21.2
Fracción Petrol Extracto en Etanol Corteza	1	11.8	29.5
	2	14.1	32.0
	3	15.3	29.9
	4	15.7	25.5
	5	14.8	31.5
	6	14.2	26.0
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Etanol Corteza	1	12.5	33.6
	2	13.6	31.4
	3	15.0	30.4
	4	14.5	29.2
	5	15.5	26.3
	6	13.6	24.0
Fracción AcOEt Extracto en Etanol Corteza	1	15.0	31.5
	2	20.0	28.0
	3	16.1	27.4
	4	12.2	23.5
	5	14.9	32.5
	6	13.8	24.5

Tabla 9: Pesos obtenidos a partir de las secciones circulares sacadas de las orejas sin Tratar y Tratada de cada ratón. Control e Indometcina.

Tratamiento	Individuo	Pesos en (g) de secciones circulares	
		Oreja sin Tratar	Oreja Tratada
Indometacina	1	11.2	17.3
	2	12.5	18.5
	3	16.8	23.7
	4	15.5	21.7
	5	18.9	25.9
	6	14.2	20.8
Control (Vehiculo)	1	17.3	32.2
	2	15.4	37.7
	3	13.5	29.9
	4	16.5	28.1
	5	12.9	29.0
	6	13.8	28.1
	7	12.6	31.7

6.4 Deltas de Peso y Porcentajes de Inhibición de Inflamación Calculados para el Edema Auricular Tratado con las Fracciones, el Control y la Indometacina.

Para las Fracciones obtenidas a partir de los Extractos en Petrol y en Etanol de las Hojas, se calcularon los siguientes deltas de peso y porcentajes de Inhibición de inflamación, con respecto a las mediciones del edema inducido en el bioensayo: Tabla 10.

Para las Fracciones obtenidas a partir de los Extractos en Petrol y en Etanol de la Corteza, se calcularon los siguientes deltas de peso y porcentajes de inhibición de inflamación (PII), con respecto a las mediciones del edema inducido en el bioensayo: Tabla 11.

Los valores negativos de PII que se reportan en las tablas para algunas repeticiones significan que no hubo actividad antiinflamatoria.

Tabla 10. Deltas de Peso y Porcentajes de Inflamación calculados para las fracciones Petrol, CH₂Cl₂ y AcOEt obtenidas de los Extractos de las Hojas.

Tratamiento	Individuo	Delta de peso (Δ)	Inhibición Inflamación (%)
Fracción Petrol Extracto en Petrol Hojas	1	19.1	-16.56
	2	21.1	-28.77
	3	12.8	21.88
	4	14.5	11.51
	5	16.0	2.35
	6	13.3	18.83
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Petrol Hojas	1	15.1	7.85
	2	19.1	-16.56
	3	15.6	4.80
	4	11.5	29.82
	5	8.2	49.96
	6	2.6	84.13
Fracción AcOEt Extracto en Petrol Hojas	1	11.2	31.65
	2	7.3	55.45
	3	10.9	33.48
	4	14.7	10.29
	5	11.6	29.21
	6	7.8	52.40
Fracción Petrol Extracto en Etanol Hojas	1	21.4	-30.60
	2	12.1	26.16
	3	11.9	27.38
	4	15.2	7.24
	5	13.0	20.66
	6	6.6	59.72
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Etanol Hojas	1	7.0	57.28
	2	16.6	-1.31
	3	12.2	25.54
	4	8.2	49.96
	5	8.7	46.90
	6	6.3	61.55
Fracción AcOEt Extracto en Etanol Hojas	1	13.6	17.00
	2	10.4	36.53
	3	11.1	32.26
	4	13.2	19.44
	5	16.3	0.52
	6	15.5	5.41

Tabla 11. Deltas de Peso y Porcentajes de Inflamación calculados para las fracciones Petrol, CH₂Cl₂ y AcOEt obtenidas de los Extractos de la Corteza.

Tratamiento	Individuo	Delta de peso (Δ)	Inhibición de Inflamación (%)
Fracción Petrol Extracto en Petrol Corteza	1	16.4	-0.09
	2	11.1	32.26
	3	15.8	3.57
	4	13.0	20.66
	5	16.7	-1.92
	6	13.5	17.61
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Petrol Corteza	1	13.0	20.66
	2	6.4	60.94
	3	17.7	-8.02
	4	11.0	32.87
	5	18.1	-10.46
	6	13.6	17.00
Fracción AcOEt Extracto en Petrol Corteza	1	10.9	33.48
	2	12.7	22.49
	3	15.4	6.02
	4	5.5	66.43
	5	11.8	27.99
	6	9.3	43.24
Fracción Petrol Extracto en Etanol Corteza	1	17.7	-8.02
	2	17.9	-9.24
	3	14.6	10.90
	4	9.8	40.19
	5	16.7	-1.92
	6	11.8	27.99
Fracción CH ₂ Cl ₂ Extracto en Etanol Corteza	1	21.1	-28.77
	2	17.8	-8.63
	3	15.4	6.02
	4	14.7	10.29
	5	10.8	34.09
	6	10.4	36.53
Fracción AcOEt Extracto en Etanol Corteza	1	16.5	-0.70
	2	8.0	51.18
	3	11.3	31.04
	4	11.3	31.04
	5	17.6	-7.41
	6	10.7	34.70

Para el control (Vehículo) y la indometacina (Patrón), se calcularon los siguientes deltas de peso con respecto a las mediciones del edema inducido en el bioensayo: Tabla 12. El porcentaje de Inhibición de inflamación, solo se calculó para la Indometacina, ya que éste valor se calcula con base en la media aritmética de los deltas de peso del grupo control, y en consecuencia si calculara para éste grupo (control) los valores serian cero:

Tabla 12. Deltas de Peso y Porcentajes de Inflamación calculados para el Control y la Indometacina.

Tratamiento	Individuo	Delta de peso (Δ)	Inhibición de Inflamación (%)
Indometacina	1	6.1	62.77
	2	6.0	63.38
	3	6.9	57.89
	4	6.2	62.16
	5	7.0	57.28
	6	6.6	59.72
Control (Vehículo)	1	14.9	NC
	2	22.3	NC
	3	16.4	NC
	4	11.6	NC
	5	16.1	NC
	6	14.3	NC
	7	19.1	NC

NC= Valor que No se Calculó

6.5 Análisis Estadístico de los Datos Obtenidos en el Bioensayo

Los datos analizados estadísticamente fueron los deltas de peso, ya que estos son los que determinan el edema o la inflamación como tal. Así pues, como el diseño experimental era completamente al azar y el único factor que varió fueron los tratamientos, se decidió hacer un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Ya que el Análisis de Varianza (ANOVA) es una prueba paramétrica, lo primero que se hizo fue comprobar los parámetros requeridos para poder realizarla. En consecuencia, antes se hicieron otras dos pruebas para comprobar la distribución Normal y la Homegenidad de Varianzas de la población.

La distribución Normal se evaluó mediante una prueba de Shapiro-Wilk hecha con un nivel de confianza del 95%, la cual pone en contraste las dos siguientes hipótesis:

Ho: La población sigue una distribución Normal

Ha: La población no sigue una distribución Normal

Con respecto a lo dicho anteriormente, la prueba de Shapiro-Wilk realizada indicó que la población de datos seguía una distribución Normal ya que el valor $p=0.52$ fue mayor que el $\alpha=0.05$ y por lo tanto no se rechazó la hipótesis nula (Figura 20).

La distribución Normal fue calculada con el software R 2.9.0, y con este mismo software se realizó una gráfica con los datos observados y los datos esperados para la población, la cual demuestra la distribución Normal de ésta, y la contrasta con una línea de tendencia (Figura 21).

```
Shapiro-Wilk normality test
data: ANAVA$residuals
W = 0.9859, p-value = 0.5265
```

Figura 20. Prueba de Shapiro-Wilk para comprobar Distribución Normal.

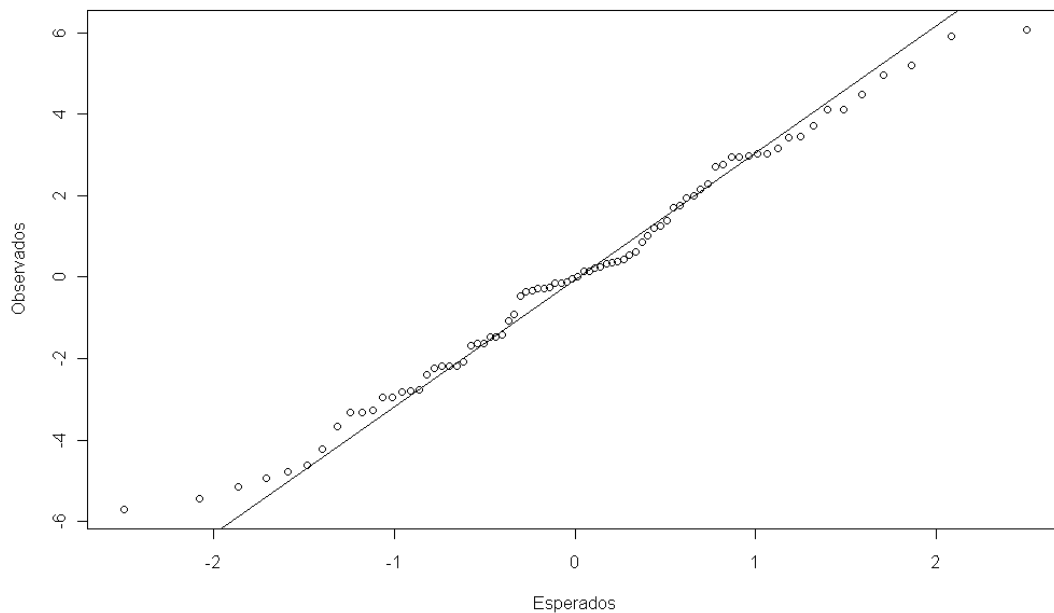


Figura 21. Grafica de Normalidad para la población de datos.

La Homogenidad de Varianzas se evaluó mediante una prueba de Levene hecha con un nivel de confianza del 95%, la cual pone en contraste las dos siguientes hipótesis:

Ho: En la población hay Homogenidad de Varianzas

Ha: En la población no hay Homogenidad de Varianzas

Así, la prueba de Levene que se hizo, indicó que había Homogenidad de Varianzas en la población ya que el valor $p= 0.36$ fue mayor que el $\alpha=0.05$, por lo que no se rechazó la hipótesis nula (Tabla 13).

La Homogenidad de Varianzas fue calculada con el software SPSS 17.0, y con el software R 2.9.0 se graficaron los valores observados y los valores esperados para la población, lo cual corrobora el resultado obtenido con el estadístico de Levene (Figura 22).

Tabla 13. Prueba de Levene para comprobar la Homogenidad de Varianzas.

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.116	13	66	.362

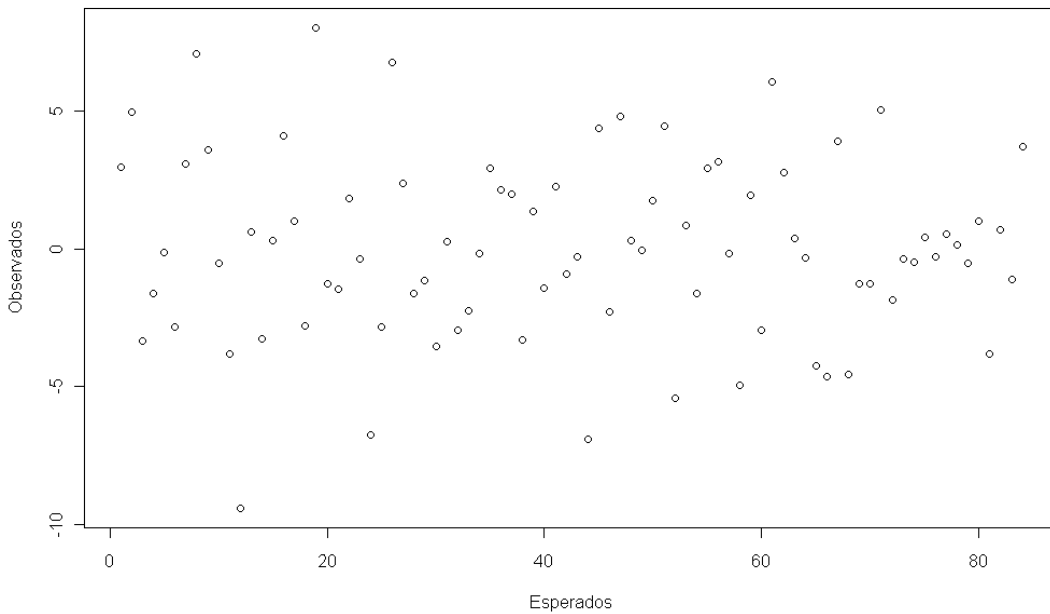


Figura 22. Grafica de Homogenidad de Varianzas para la población de datos.

Después de comprobar los parámetros requeridos para el Análisis de Varianza, se procedió a calcular el estadístico ANOVA de una sola vía con un nivel de confianza del 95%, el cual pone a prueba las dos siguientes hipótesis:

H₀: No existen diferencias significativas entre los Tratamientos

H_a: Al menos uno de los Tratamientos es diferente

El ANOVA de una sola vía fue calculado con el software SPSS 17.0., y el resultado que éste arroja fue que si existían diferencias significativas entre los tratamientos, ya que el valor $p = 2,80 e^{-06}$ fue mucho menor que el $\alpha = 0.05$, por lo cual se rechazó la hipótesis nula (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de Varianza de una sola vía para los Tratamientos.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	640.855	13	49.297	5.204	.000
Within Groups	625.265	66	9.474		
Total	1266.120	79			

Como el Análisis de Varianza puso en evidencia que había diferencias altamente significativas entre los Tratamientos, después se procedió a realizar una prueba de comparación múltiple para averiguar cuales eran los Tratamientos más significativos.

La prueba de comparación múltiple que se escogió para analizar los datos fue la prueba de Dunnett, ya que esta prueba compara las medias de cada uno de los Tratamientos contra el Control, lo cual permite mirar que tan buena fue la respuesta de cada uno de ellos con respecto a la respuesta del Control.

La prueba de Dunnett se calculo con el Software SPSS 17.0, con un nivel de confianza del 95%. Éste estadístico pone a prueba las siguientes hipótesis:

H₀: La media del Tratamiento X es igual a la media del Control

H_a: La media del Tratamiento X es diferente a la media del Control

La prueba de Dunnett indicó que los Tratamientos más significativos obtenidos de las Hojas de la planta fueron la fracción AcOEt del Extracto en Petrol con un valor $p=0.013$ y la fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol con un valor $p=0.001$. Así pues, ya que estos dos valores eran menores que el $\alpha=0.05$ entonces se rechazó la hipótesis nula. De los tratamientos sacados de la Corteza de la planta, el único significativo fue la fracción AcOEt del extracto en Petrol con un valor $p=0.023$ que era menor que el $\alpha=0.05$, por lo cual se rechazó la hipótesis nula (Tabla 15).

Tabla 15. Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett.

Multiple Comparisons

Dunnett t (2-sided)^a

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Fracción Petrol Extracto en Petrol Hojas	Control	-.2524	1.7124	1.000
Fracción CH_2Cl_2 Extracto en Petrol Hojas	Control	-2.4857	1.8023	.790
Fracción AcOEt Extracto en Petrol Hojas	Control	-5.8024	1.7124	.013
Fracción Petrol Extracto en Etanol Hojas	Control	-4.6257	1.8023	.111
Fracción CH_2Cl_2 Extracto en Etanol Hojas	Control	-7.9057	1.8023	.001
Fracción AcOEt Extracto en Etanol Hojas	Control	-3.0357	1.7124	.500
Fracción Petrol Extracto en Petrol Corteza	Control	-1.9690	1.7124	.918
Fracción CH_2Cl_2 Extracto en Petrol Corteza	Control	-1.7057	1.8023	.978
Fracción AcOEt Extracto en Petrol Corteza	Control	-5.4524	1.7124	.023
Fracción Petrol Extracto en Etanol Corteza	Control	-1.6357	1.7124	.976
Fracción CH_2Cl_2 Extracto en Etanol Corteza	Control	-1.3524	1.7124	.995
Fracción AcOEt Extracto en Etanol Corteza	Control	-2.9057	1.8023	.620
Indometacina	Control	-9.9190	1.7124	.000

a. Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

6.6 Análisis Grafico del Promedio de los Deltas de Peso y de los Porcentajes de Inhibición de Inflamación.

Los valores obtenidos para los Tratamientos, el Control y la Indometacina se promediaron con el fin de condensar y analizar la información de forma grafica. Con la media de los porcentajes de inhibición de Inflamación se realizo una grafica que corrobora los resultados del análisis estadístico, ya que los tratamientos que tuvieron una acción antiinflamatoria significativa fueron aquellos que tuvieron promedios de inhibición de inflamación mas altos. Así pues, para la Hojas de la planta, la fracción AcOEt del Extracto en Petrol y la fracción CH₂Cl₂ del extracto en Etanol tuvieron un valor medio de porcentaje de inhibición de inflamación de 35.41% y 39.99% respectivamente. Así mismo, para la corteza de la planta, la fracción AcOEt del extracto en Petrol tuvo un valor medio de porcentaje de inhibición de inflamación de 33.28% (Figura 23).

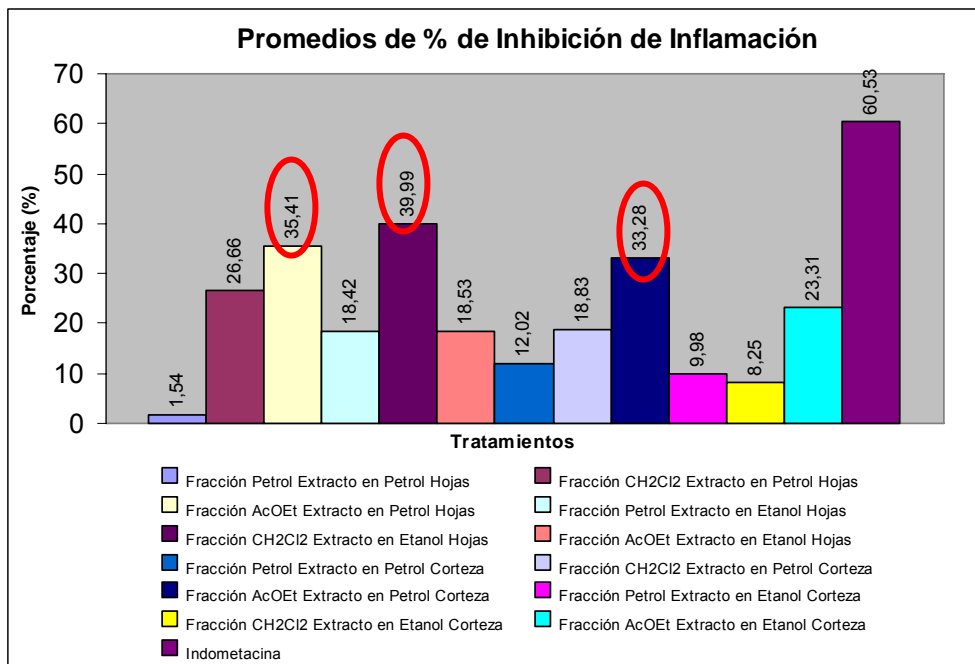


Figura 23. Promedios de Porcentajes de Inhibición de Inflamación para los Tratamientos y la Indometacina.

Con las medias de los deltas de peso se realizaron graficas para observar la evolución del edema contra el tiempo de duración del bioensayo. En consecuencia, se comparó gráficamente el Control con la Indometacina que era el fármaco patrón (Figura 24), también se compararon los Tratamientos significativos entre ellos (Figura 25), y finalmente la Indometacina, el Control y los Tratamientos significativos entre si (Figura 26). En estas graficas se puede observar como el Control no tiene ningún efecto sobre el edema pasadas cuatro horas después de su inducción ya que éste es máximo en éste tiempo, mientras que los Tratamientos significativos tienen una acción antiinflamatoria muy parecida a la de la Indometacina, al culminar el tiempo del experimento.

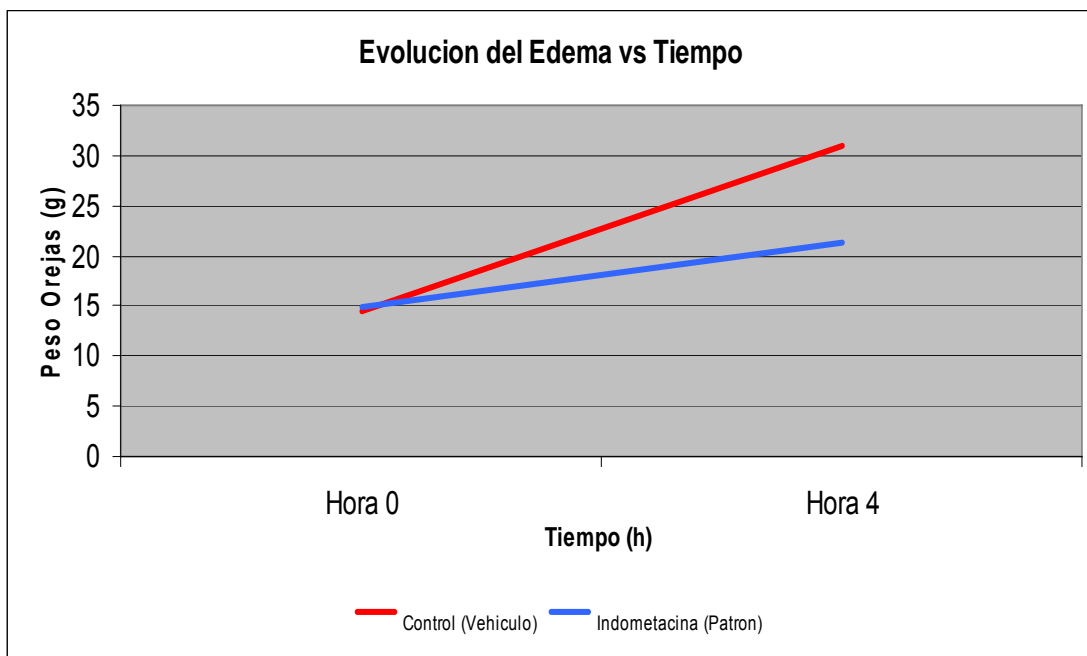


Figura 24. Evolución del Edema para el Control y la Indometacina con respecto al Tiempo de duración del Bioensayo.

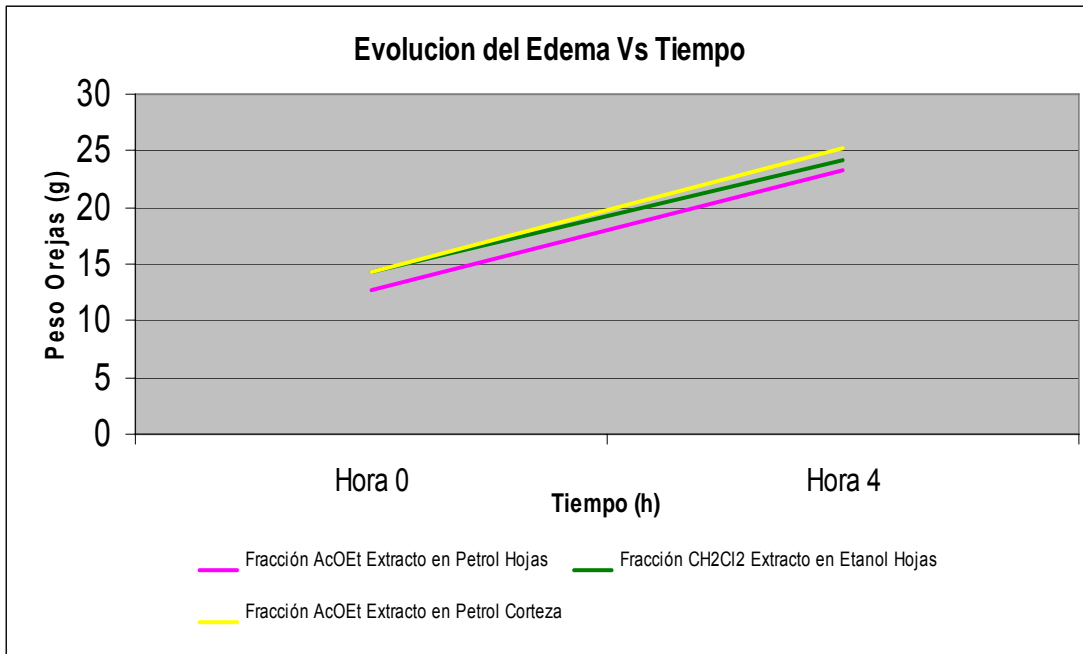


Figura 25. Evolución del Edema para los Tratamientos significativos con respecto al Tiempo de duración del Bioensayo.

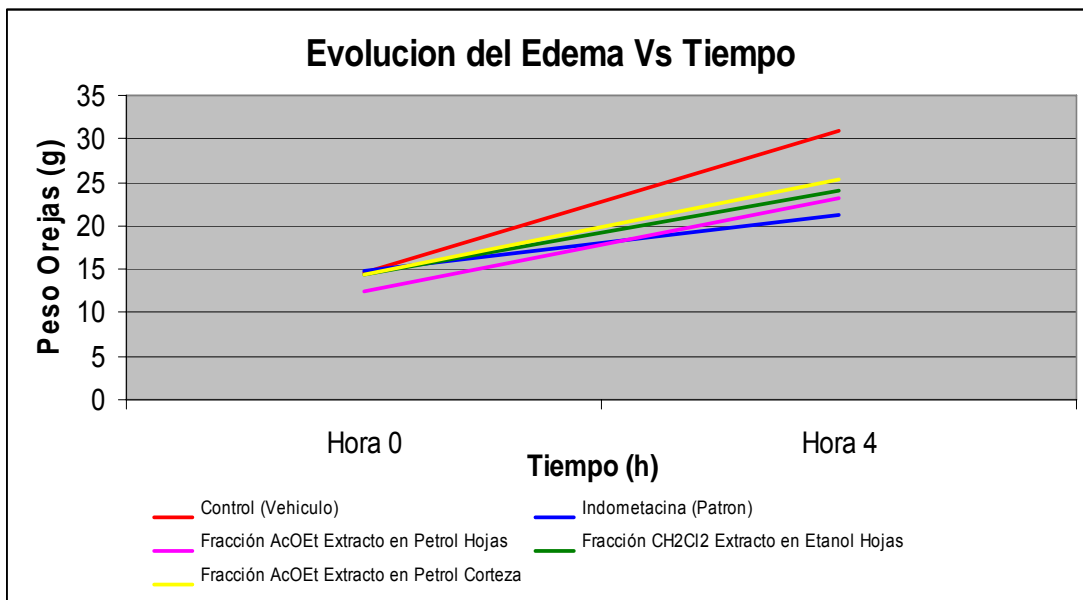


Figura 26. Evolución del Edema para el Control, la Indometacina y los Tratamientos Significativos con respecto al Tiempo de duración del Bioensayo.

6.7 Resultados de las Cromatografías de Capa Delgada

A continuación se muestran las fotos tomadas a las Cromatografías de Capa Delgada realizadas para las fracciones de los extractos en Petrol y en Etanol de las Hojas y la Corteza. En las fotos de las cromatografías se aprecian las manchas presentes al ser reveladas bajo luz UV y las manchas presentes al ser reveladas con Vainillina. Las manchas más notorias y las más relevantes fueron numeradas y marcadas con un círculo rojo como se muestra en las siguientes figuras (Figura 27, la Figura 28, la Figura 29, la Figura 30, la Figura 31, la Figura 32 y la Figura 33). Los Rf calculados para cada una de las manchas se muestran en el anexo 3.

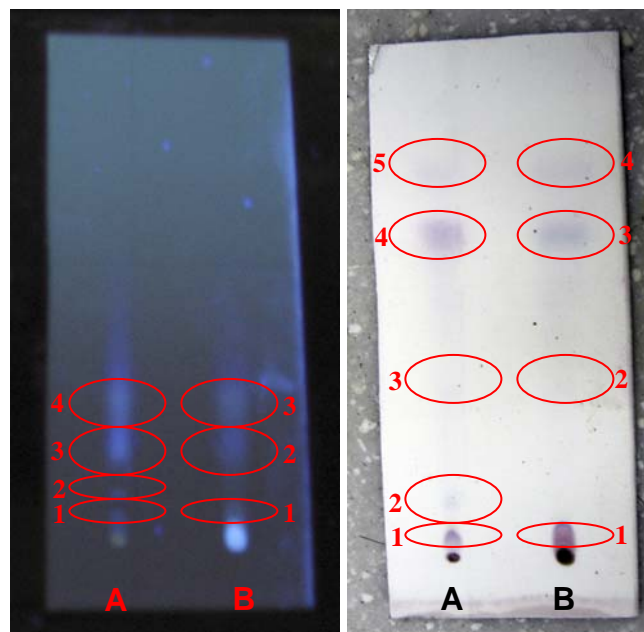


Figura 27. Cromatografía de Capa Delgada para las fracciones Petrol de los extractos en Petrol. Fase Móvil Éter de Petróleo puro. Fase Estacionaria Silica gel G 60 F 254
A=Fracción Petrol del extracto en Petrol de las Hojas.
B=Fracción Petrol del extracto en Petrol de la Corteza.

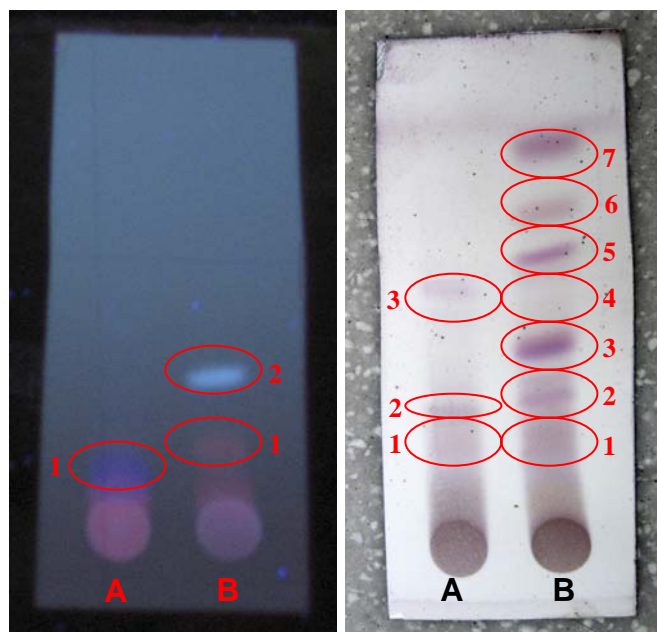


Figura 28. Cromatografía de Capa Delgada para las fracciones Petrol de los extractos en Etanol. Fase Móvil Éter de Petróleo-AcOEt (9:1). Fase Estacionaria Silica gel G 60 F 254
 A=Fracción Petrol del extracto en Etanol de las Hojas.
 B=Fracción Petrol del extracto en Etanol de la Corteza.

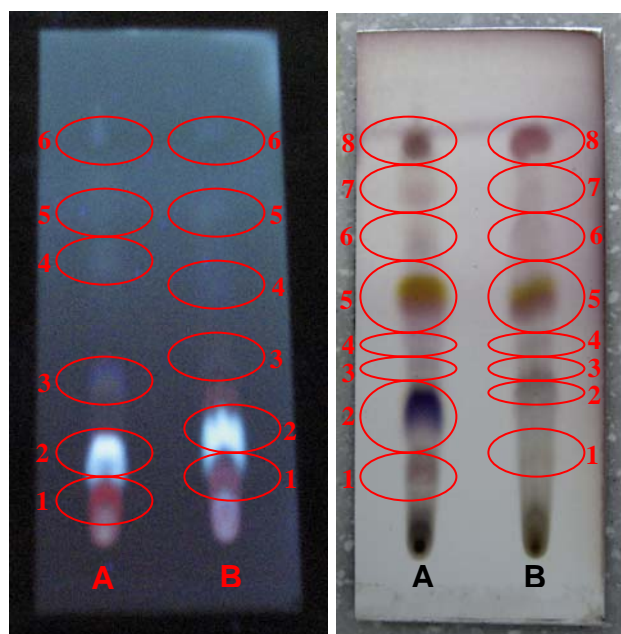


Figura 29. Cromatografía de Capa Delgada para las fracciones CH₂Cl₂ de los extractos en Petrol. Fase Móvil CH₂Cl₂ puro. Fase Estacionaria Silica gel G 60 F 254
 A=Fracción CH₂Cl₂ del extracto en Petrol de las Hojas.
 B=Fracción CH₂Cl₂ del extracto en Petrol de la Corteza.

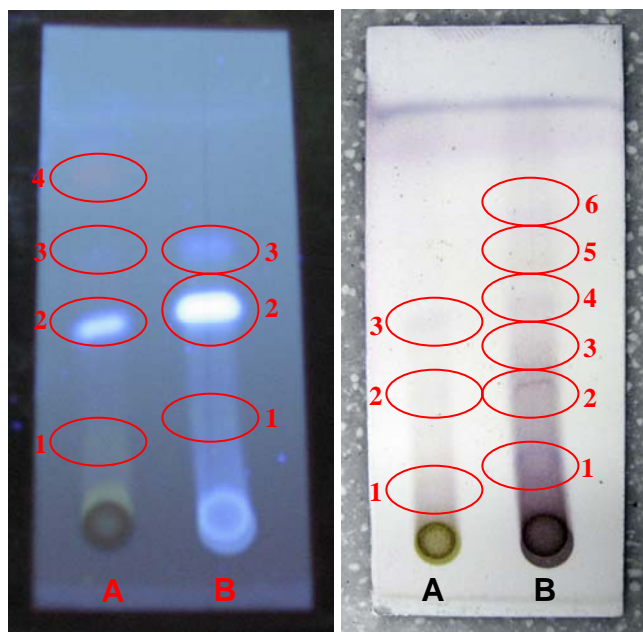


Figura 30. Cromatografía de Capa Delgada para las fracciones CH_2Cl_2 de los extractos en Etanol. Fase Móvil CH_2Cl_2 -AcOEt (9.5:0.5). Fase estacionaria Silica gel G 60 F 254. A=Fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol de las Hojas. B=Fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol de la Corteza.

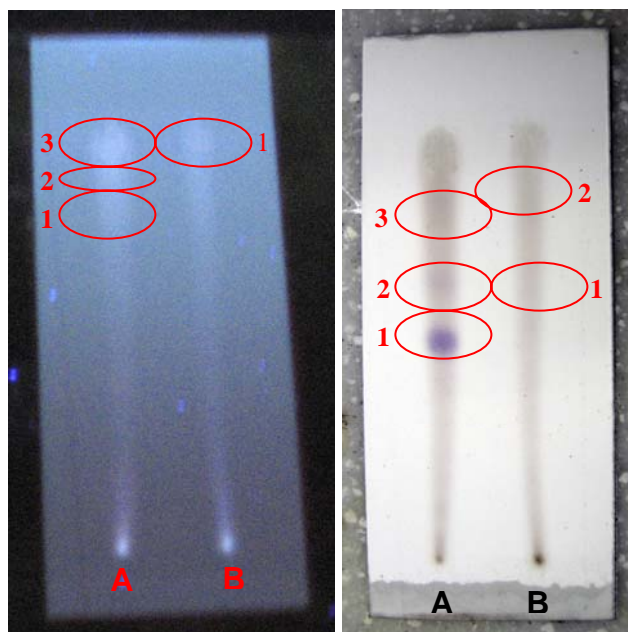


Figura 31. Cromatografía de Capa Delgada para las fracciones AcOEt de los extractos en Petrol. Fase Móvil AcOEt - CH_2Cl_2 (7:3). Fase Estacionaria Silica gel G 60 F 254. A=Fracción AcOEt del extracto en Petrol de las Hojas. B=Fracción AcOEt del extracto en Petrol de la Corteza.

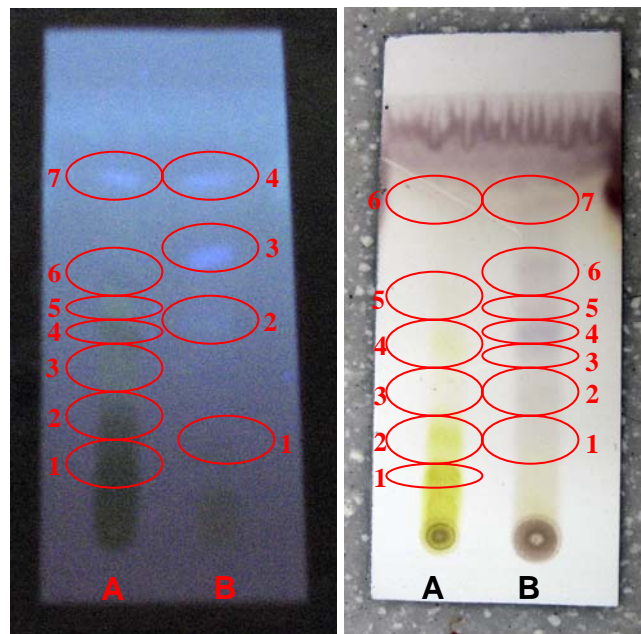


Figura 32. Cromatografía de Capa Delgada para las fracciones AcOEt de los extractos en Etanol. Fase Móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$ (8.5:1.5). Fase Estacionaria Silica gel G 60 F 254.
 A=Fracción AcOEt del extracto en Etanol de las Hojas.
 B=Fracción AcOEt del extracto en Etanol de la Corteza.

7. DISCUSION

Las pruebas químicas preliminares y las cromatografías de capa delgada hechas para las fracciones de los extractos en Petrol y en Etanol de Hojas y Corteza de *Bursera tomentosa* revelaron la presencia de esteroides, esteroles, terpenos, flavonoides, fenoles y glicosidos.

Según la prueba de Lieberman-Burchard hecha para las fracciones de los extractos en Petrol de *Bursera tomentosa* se demostró la presencia de esteroides y esteroles en todas las fracciones de los extractos (Tabla 5). Así mismo, las cromatografías de capa delgada hechas para las fracciones de los extractos en Petrol muestran manchas de color azul, rosa violáceo y gris. En consecuencia en la cromatografía hecha para las fracciones Petrol de los extractos en Petrol, se ve una mancha azul para la Corteza (Figura 27). También se evidencian una gran mancha azul en la fracción CH₂Cl₂ del extracto en Petrol de las Hojas y varias manchas color rosa violáceo en la misma fracción pero del extracto de la Corteza (Figura 29). Finalmente se pueden ver claramente las manchas grises presentes en la cromatografía hecha para las fracciones AcOEt de los extractos en Petrol de las dos partes de la planta (Figura 31). Esto concuerda con lo reportado por Domínguez (1985), ya que según éste, los esteroles y metilesteroles se pueden extraer con solventes de mediana a baja polaridad como el éter de petróleo, el bisulfuro de carbono, el cloroformo y el éter etílico. Por otro lado, al revelar las cromatografías de capa delgada, éstos compuestos originan manchas rosas que cambian a azul (Domínguez 1985). Así mismo, Bilbao (1993) reporta que los esteroides pueden originar en las cromatoplasman manchas de color azul, verde, violeta, rosa violáceo o gris.

Las pruebas de Salkowski y de Baljet también fueron positivas para todas las fracciones de los extractos en Petrol de los dos órganos de la planta, demostrando la presencia de terpenos en éstas fracciones (Tabla 5). La presencia de éstos compuestos en los extractos de la planta también se corroboró con los resultados de las cromatografías de capa delgada, ya que en ellas se pueden evidenciar una gran cantidad de manchas violeta. Así, se pueden ver manchas de este color en la base de la placa cromatográfica y en la parte superior, en la cromatografía realizada para las fracciones Petrol de los extractos en Petrol (Figura 27).

También se pueden ver algunas manchas violetas en la cromatografía de las fracciones CH_2Cl_2 de los extractos en Petrol (Figura 29) y una mancha del mismo color en la cromatografía de las fracciones AcOEt del extracto en Petrol de las Hojas. Lo anterior concuerda con lo reportado por Bilbao (1993) quien asegura que los compuestos terpenoides se pueden separar con solventes o mezclas de ellos, de todas las polaridades, como por ejemplo el hexano, el éter de petróleo, el benceno, el éter isopropílico, el acetato de etilo, la acetona y el etanol. Por otro lado, los terpenoides son los compuestos que dan origen biogénico a los esteroides, y las reacciones coloridas para éstos compuestos no son verdaderamente específicas ya que otros tipos de sustancias, tales como los glicosidos cardiotónicos, los esteroalcaloides y algunas saponinas, también tienen detalles estructurales comunes o análogos (Domínguez 1985). Sin embargo, en las cromatografías de capa delgada, los compuestos terpenoides suelen originar manchas de color azul o violeta al revelarlas (Bilbao 1993).

La prueba del Hidroxamato Ferrico fue negativa para todas las fracciones de los extractos en Petrol lo cual demuestra que no se detectaron sesquiterpenlactonas en las Hojas o en la Corteza (Tabla 5). Así mismo, las cromatografías de capa delgada para las fracciones de los extractos en

Petrol no muestran manchas características para éstos compuestos (Figuras 27, 29 y 31). Esto es congruente con lo reportado por Domínguez (1985) ya que según éste, las sesquiterpenlactonas se pueden extraer con solventes de mediana polaridad tales como el cloroformo o el éter etílico. Por otro lado, según el anterior autor, estos compuestos originan manchas de color rojo, verde y negro al revelar las cromatografías de capa delgada.

Las pruebas de Shinoda y del Cloruro Ferrico fueron positivas para las fracciones CH₂Cl₂ y AcOEt de las dos partes de la planta demostrando la presencia de flavonoides y fenoles (Tabla 6). Así mismo, en las cromatografías de capa delgada realizadas para las fracciones AcOEt y CH₂Cl₂ de los extractos en Etanol se observan manchas de color amarillo-verdoso y café negrusco bajo luz ultravioleta (Figuras 30 y 32). Estas mismas cromatografías muestran manchas de color amarillo y café después del revelado con vainillina, lo que deja claro una alta concentración de flavonoides en las fracciones AcOEt de las dos partes de la planta y una baja concentración de éstos compuestos en las fracciones CH₂Cl₂ (Figuras 30 y 32). Lo anterior concuerda con el hecho de que los flavonoides, las flavonas y los flavonoles se pueden extraer de soluciones acuosas con solventes de mediana a alta polaridad como el éter etílico y el acetato de etilo (Domínguez 1985). Por otro lado, en las cromatografías de capa delgada, los flavonoles muestran manchas amarillo-verdosas, las flavonas manchas cafés y las antocianinas manchas cafés o negras al revelar bajo luz ultravioleta (Domínguez 1985). Así mismo, al revelar las cromatografías de capa delgada adicionándoles un álcali, las flavonas y los flavonoles se ponen amarillos, las flavonas e isoflavonas viran a diversos tonos de rojo, las chalconas a púrpura rojizo, los flavonoles a café anaranjado y las antocianinas a azul (Domínguez 1985, Bilbao 1993).

La prueba de Drangendorff fue negativa para todas las fracciones de los extractos en Etanol de las Hojas y la Corteza, lo que pone en evidencia que no se detectaron alcaloides en ninguna de las dos partes de la planta analizadas (Tabla 6). También se puede inferir que las cromatografías de capa delgada realizadas para las fracciones de los extractos en Etanol no presentan manchas características de alcaloides, ya que como se comentó anteriormente, la prueba química para estos compuestos fue negativa y además el agente cromogénico fue vainillina, el cual no es específico para alcaloides y no los muestra con claridad (Figuras 28, 30 y 32). Esto es congruente con lo reportado por Domínguez (1985) quien señala que los alcaloides se pueden extraer de soluciones acuosas con solventes de mediana polaridad tales como el cloroformo, el cloruro de metileno y el éter etílico o isopropílico. Este mismo autor también señala que este tipo de compuestos muestran manchas de color marrón, rosa o violeta en las cromatografías de capa delgada reveladas con yodoplatinato de potasio.

La prueba de la Antrona realizada para las fracciones de los extractos en Etanol de las dos partes de la planta reveló la presencia de glicosidos solo en la fracción AcOEt de las Hojas (Tabla 6). Esto es congruente con la cromatografía de capa delgada realizada para esta fracción ya que las manchas para estos compuestos se pueden ver de color verde violáceo bajo luz ultravioleta tal y como se ve en la Figura 32. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Domínguez (1985), el cual asegura que los glicósidos cardiotónicos se pueden extraer con acetato de etilo puro o con metanol. Así mismo, estos compuestos se ven de color púrpura o azul al revelar las cromatografías de capa delgada, pero las manchas se desvanecen después de 10 minutos (Domínguez 1985). Los Glicósidos cardiotónicos también pueden virar a colores rojos o verdes violáceos (Bilbao 1993). Al revelar las cromatografías bajo luz ultravioleta éstos compuestos pueden tener las mismas tonalidades mencionadas anteriormente (Domínguez 1985).

La prueba de la espuma hecha para las fracciones de los extractos en Etanol fue negativa en todos los casos poniendo en evidencia que no hay saponinas ni en las Hojas ni en la Corteza (Tabla 6). Esto es congruente con la cromatografía hecha para las fracciones AcOEt de los extractos en Etanol de las dos partes de la planta, ya que en ellas no se ven manchas que demuestren su presencia (Figura 32). En consecuencia, los resultados son congruentes con el hecho de que las saponinas se pueden extraer con solventes de alta polaridad tales como el etanol o el metanol (Domínguez 1985). Igualmente, éste tipo de compuestos muestran manchas de color verde al revelarse la cromatografía de capa delgada (Domínguez 1985), las cuales no se ven en la cromatoplaca mencionada anteriormente.

Sin embargo, lo anterior contrasta con la investigación de Rojas (2008), ya que las pruebas químicas preliminares que él realizó para los extractos de *Bursera tomentosa* fueron positivas para saponinas, lo cual se puede deber quizá a que la planta fue muestreada en otra zona, y por ende las condiciones ambientales que había allí permitieron cambios en la producción y en la concentración de ciertos metabolitos.

En lo que respecta al bioensayo realizado para evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones, la prueba estadística de Dunnett los mostró que los tratamientos más significativos fueron los representados por las Fracciones CH₂Cl₂ del extracto en Etanol de las Hojas y AcOEt del extracto en Petrol de Hojas y Corteza, con valores p de 0.001, 0.013 y 0.023 respectivamente (Tabla 15). Estos valores indican que estadísticamente estas fracciones fueron las que mostraron mejor actividad antiinflamatoria en el bioensayo.

Lo anterior se corroboró al promediar los porcentajes de inhibición de inflamación calculados para cada grupo experimental de animales al que se le aplicaron estas fracciones. Así, el grupo experimental al que se le aplicó la fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol de la Hojas presentó la media de porcentaje más alta, con un valor del 39.99%. Igualmente los grupos a los que se les aplicaron las fracciones AcOEt del extracto en Petrol de las Hojas y AcOEt del extracto en Petrol de la Corteza tuvieron unos valores medios de porcentaje de inhibición de inflamación de 35.41% y 33.28% respectivamente (Figura 23).

Por otro lado el promedio de porcentaje de inhibición de inflamación más bajo lo presentó la fracción Petrol del extracto en Petrol de las hojas, con un valor de 1.54%. La fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol de la Corteza también presentó una media de porcentaje de inhibición baja, con un valor de 8.25%, lo cual contrasta con el resultado obtenido para la misma fracción pero del extracto de las Hojas, ya ésta fue la que tuvo una mejor actividad antiinflamatoria. De acuerdo a esto se puede presumir que los compuestos que podrían tener algún efecto antiinflamatorio presentes en la fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol, están en muy bajas concentraciones o ausentes, ya que la concentración de metabolitos secundarios es diferente en cada uno de los órganos de la planta (Azcón-Bieto & Talón 2000). Igualmente también existe la posibilidad que en esta fracción puedan haber sustancias que en vez de inhibir la inflamación más bien puedan promoverla, pero para asegurar esto es necesario hacer otro tipo de experimentación de carácter bioquímico.

En la mayoría de investigaciones hechas con plantas de la familia Burseraceae, los componentes aislados y responsables de diversas actividades medicinales, incluyendo la desinflamación, han sido compuestos de tipo terpenoide o esteroide, lo que nos hace presumir que la actividad

antiinflamatoria de las fracciones de *Bursera tomentosa* se deba a este tipo de compuestos. Esto también se puede evidenciar en las cromatografías de capa delgada hechas para las fracciones con actividad antiinflamatoria de la planta, ya que la mayoría de manchas presentes en ellas, corresponden a compuestos de tipo terpenoide o esteroide.

Así pues, según Robles (1998) el análisis fitoquímico de la Familia Burseraceae muestra que ésta, está compuesta por unidades fundamentales de terpenos. Igualmente, los aceites esenciales de estas plantas son predominantemente monoterpenoides y sesquiterpenoides (Khalid 1983).

Así, compuestos de tipo monoterpeno han sido aislados para esta familia de plantas, estando bien distribuidos por ella compuestos como el Mirceno, el Limoneno, el α Felandreno, el α Pineno, el α Terpinoleno y el sabinol (De la Cruz *et al* 2005) También se han encontrado diterpenos como el Camforeno y el Mukolol (Khalid 1983). Igualmente se han encontrado sesquiterpenos como el Cadineno, el β Bisaboleno, el β Santoleno, el Furanodieno, el *cis*-Calameneno y el β Eudesmol (Khalid 1983, De la Cruz *et al* 2005).

En el mismo orden de ideas Khalid (1983) reporta que las resinas de esta familia acumulan triterpenos tanto tetracíclicos como pentacíclicos, y que éstos pueden ser clasificados ampliamente en cuatro series, siendo los tetracíclicos del tipo eufano/tirucalano y los pentacíclicos del tipo lupano, ursano y oleanano. En consecuencia, de las especies *Canarium schweinfurthii*, *Dacryodes edulis* y *Bursera klugii* que pertenecen a la familia estudiada, han sido aislados compuestos del tipo eufano/tirucalano como los ácidos elemolico e isomasticadienonico, y las sapelinas A y B. Igualmente, triterpenos de la serie lupano han sido aislados de los géneros *Bursera* y *Cammiphora*, destacándose el lupeol y la lupeonona (Khalid 1983).

Por otra parte, en la mayoría de investigaciones de antiinflamatorios realizadas con la familia Burseraceae los compuestos reportados también son del tipo terpenoide y esteroide, demostrando una vez más la importancia que este tipo de metabolitos tiene en la actividad medicinal de las plantas en cuestión.

Así pues, Carretero y colaboradores (2008) estudiaron la acción antiinflamatoria de las hojas de *Bursera simaruba* logrando el aislamiento y la identificación de cinco compuestos terpenoides y esteroides, los cuales son: neofitadieno; ergost-5-en-3-ol; 24*S*-stigmast-5,22*E*-dien-3 β -ol; 24*S*-stigmast-5-en-3 β -ol y α Amireno. Igualmente Banno y colaboradores (2006) estudiaron la acción antiinflamatoria de *Boswellia carteri*, encontrando abundantes ácidos triterpenicos y algunos diterpenos, entre los que se destacaron el ácido α Boswellico, el ácido β Boswellico, el ácido Lupeolico y el Incesol.

Por otro lado, un estudio de la actividad antiinflamatoria de *Bursera simaruba* resulto en el aislamiento y la identificación del compuesto metil- β -peltatin el cual es un lignano esteroidal al cual se le asigno la posible acción medicinal (Noguera et al 2004). Igualmente, Maldini y colaboradores (2009) reportan que *Bursera simaruba* es una planta rica en compuestos fenólicos derivados de lignanos, los cuales pertenecen a las familias de la dibenzilbutirolactona y la aritetralinelactona siendo una clave biosintética en la acción antitumoral de las podofilotoxinas de tipo lignano.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en ésta tesis de grado ya que en las pruebas químicas preliminares se demostró la presencia de compuestos fenólicos, los cuales pueden ser presumiblemente del tipo lignano. Igualmente el estudio de Maldini et al (2009) también concuerda con los resultados obtenidos por Rojas (2008), quien también trabajo con la

planta *Bursera tomentosa* y demostró la acción citotóxica de sus extractos frente a líneas celulares tumorales. Esto nos hace inferir que tal vez las sustancias y metabolitos presentes en la especie estudiada, sean de múltiple acción y tengan una actividad medicinal útil en diferentes trastornos como el cáncer o la inflamación.

Finalmente es presumible que el tipo de acción antiinflamatoria de *Bursera tomentosa* que se muestra en éste documento sea útil para tratar enfermedades relacionadas con la inflamación de la piel como la psoriasis o la dermatitis crónica, ya que Otuki y colaboradores (2006) reportan en su trabajo, un estudio realizado por Trotta et al (2002), en el cual se realizaron pruebas *in vivo* que demuestran la fácil penetración de compuestos triterpenicos a través de la dermis. Además el tipo de bioensayo que se utilizo en este trabajo de grado, en el cual se usa el TPA como agente irritante, es por lo general extrapolado para trastornos inflamatorios de la piel, pues el TPA y los tratamientos son aplicados de manera tópica.

8. CONCLUSIONES

Para los Extractos en Petrol y en Etanol de la Hojas de *Bursera tomentosa*, se obtuvo un rendimiento de 1.47% y 2.45% respectivamente, y para los Extractos en Petrol y en Etanol de la Corteza, se obtuvo un rendimiento de 1.66% y 0.47% respectivamente.

Las pruebas químicas preliminares y las cromatografías de capa delgada hechas para las fracciones de los extractos en Petrol y en Etanol de Hojas y Corteza de *Bursera tomentosa* pusieron en evidencia la presencia de esteroides, esteroles, terpenos, flavonoides, fenoles y glicosidos.

En el bioensayo de inflamación aguda inducido por TPA que se realizó para *Bursera tomentosa* se comprobó la acción antiinflamatoria que tienen algunas de sus fracciones, lo cual concuerda con los reportes etnobotánicos citados para ésta especie.

La prueba de análisis de Varianza de una vía (ANOVA) que se realizó para los tratamientos (Fracciones, Control e Indometacina) reveló que existían diferencias estadísticas significativas entre ellos ($p=2,80 e^{-06}$).

Según el resultado del bioensayo y la prueba paramétrica con las que se trabajó (Dunnett, $p=0.001$; $p=0.013$; $p=0.023$), las fracciones más significativas estadísticamente desde el punto de vista antiinflamatorio fueron la fracción CH_2Cl_2 del extracto en Etanol de las Hojas, la fracción AcOEt del Extracto en Petrol de la Hojas y la fracción AcOEt del Extracto en Petrol de la Corteza.

Los valores medios de los porcentajes de inhibición de inflamación para cada grupo experimental corroboraron la acción antiinflamatoria de la planta. Así, la fracción CH₂Cl₂ del extracto en Etanol de las Hojas presento el promedio de inhibición de inflamación mas alto, con un valor de 39.99%. Igualmente las fracciones AcOEt del Extracto en Petrol de la Hojas y AcOEt del Extracto en Petrol de la Corteza, presentaron promedios de inhibición de inflamación altos, con valores de 35.41% y 33.28% respectivamente.

De las graficas realizadas para observar la evolución del edema contra el tiempo de duración del bioensayo se puede concluir que el Control no tiene ningún efecto sobre el edema pasadas cuatro horas después de su inducción, mientras que los Tratamientos significativos tienen una acción antiinflamatoria muy parecida a la de la Indometacina que era el fármaco patrón.

Finalmente se concluye que la acción antiinflamatoria de *Bursera tomentosa* se debe presumiblemente a compuestos del tipo terpenoide, esteroide o fenólico, ya que como lo demuestra la literatura, la acción antiinflamatoria de la familia Burseraceae se debe principalmente a este tipo de compuestos.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con el estudio fitoquímico de *Bursera tomentosa*, ya que de ella se pueden llegar a aislar compuestos naturales y útiles en los tratamientos de enfermedades relacionadas con desordenes inflamatorios y tumorales. Para esto, se pueden hacer investigaciones en la que se subfraccionen las fracciones con actividad antiinflamatoria que aquí se reportan, para luego analizarlas por medio de HPLC y elucidar los compuestos que éstas contienen.

También se recomienda continuar con el estudio farmacológico antiinflamatorio de la especie, a través de un bioensayo de edema plantar agudo inducido por carragenina, en el cual se pueden ensayar varias dosis y extrapolar efectos sistémicos.

10. LITERATURA CITADA

- Abbas, F. A., Al-Massarany, S. M., Khan, S., Al-Howiriny, T. A., Mossa, J. S., Abourashed, E. A. 2007. Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L. *Natural Product Research*. 21:5 383–391.
- Amresh, A., Reddy, G. D., Rao, Ch. V., Singh P. N. 2007. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 526–531.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Editorial McGraw Hill/Interamericana. Buenos Aires. 851 p.
- Banno, N., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H, Tabata, K., Nakamura, Y., Nishimura, R., Kimura, Y., Suzuki, T. 2006. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 249–253.
- Becerra, J. & Venable, L. 1999. Nuclear ribosomal DNA phylogeny and its implications for evolutionary trends in Mexican *Bursera* (Burseraceae). *American Journal of Botany*. 86:7 1047-1057.
- Bernal, H. & Correa, J. *Especies Vegetales Promisorias de los países del convenio Andrés Bello*”, Editado por Secretaria Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB). Bogota.
- Bilbao, M. R. 1997. *Análisis Fitoquímico Preliminar. Química de los productos naturales*. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas. Armenia. p 1 - 119.

- Bruneton, J. 1993. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Ed. Lavoisier Publishing. p 82-85, 467-469, 600-607.
- Castillo, M., Sanabria, M. E., Hidalgo, C., Perozo, Y. 2005. Características Anatómicas del Tallo de Bálsamo de Incienso (*Bursera tomentosa* (Jacq) Tr. & Planch). Bioagro. 17:1 17-23.
- Carretero, M. E., López, J. L., Abad, M. J., Bermejo, P., Tillet, S., Israel, A., Noguera, B. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. Journal of Ethnopharmacology 116: 11–15.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, C. 2000. Robbins: Patología estructural y funcional. Editorial McGraw-Hill, Interamericana. México, p 53-93.
- Cuatrecasas, J. 1957. Prima Flora colombiana: *Burseraceae*. Webbia. 2: 375-441.
- De la Cruz, J., Doménech, M. T., Gimeno, J. V., Castro R. M., Bosch F. 2005. Study of *Burseraceae* resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1093: 177–194.
- Domínguez, X. 1985. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México D.F., México. 281 p.
- Duwiejwa, M., Zeitlin I. J., Waterman, P. G., Chapman J., Mhango, G. J., Provan G. J. 1993. Antiinflammatory activity of resins from some species of the plants Family Burseraceae. Planta Medica. 59:1 12-16.

- Franco, L. A., Matiz, G. E., Calle, J., Pinzón, R., Ospina, L. F. 2007. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica*. 27: 110-115.
- Fourie, T. Snyckers, F. 1989. A pentacyclic triterpene with anti-inflammatory and analgesic activity from the roots of *Commiphora merkeri*. *Journal of Natural Products*. 52 (5): 1129-1131.
- Ikan, R. 1991. *Natural products a laboratory guides*. 2nd Edition. Ed. Academic Press. San Diego, USA. p. 168 - 181.
- Harley, M. & Daly, D. 1996. *Burseraceae Kunth. Proteieae March. em. Engl. World Folien and Spore Flora 20. Angiospermae*. Scandinavian University Press. Oslo. Stockholm.
- Junor, G. A., Porter, R., Yee, T. H. 2008. The Chemical Composition of the Essential Oils from the Leaves, Bark and Fruits of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. from Jamaica. *Journal of Essential Oil Research*. 20: 426-429.
- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Teng Tan, G., Ma, C., Van Hung, N., Cuong, N. M., Bunyaphatsara, N., Soejarto, D. D., Fong, H. 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tokinensis*. *Phytochemistry*. 66: 2745-2751.
- Kaileh, M., Vanden Berghe, W., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G. 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 113: 510-516.

- Khalid, S. 1983. Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Chapter 10, Chemistry of the Burseraceae. Edited by Waterman and Grundon, Academic Press. London. 281-299 pp.
- López, M., Triana, J., Pérez, F. J., Torres, M. E. 2005. Métodos Físicos de Separación y Purificación de Sustancias Orgánicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Departamento de Química. España. p 20-48.
- Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza C. 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*. 70: 641-649.
- Martínez, C. 1998. Estudio Preliminar de la Familia Burseraceae en Colombia con Énfasis en la Etnobotánica de la Región Amazónica (San Martín de Amacayacu-Amazonas). Tesis pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Santafé de Bogotá, Colombia. 89 p.
- Murillo-Alvarez, J. I., Encarnación, D. R., Franzblau, S. G. 2001. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants from Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology*. 39: 445-449.
- Noguera, B., Díaz, E., García, M. V., San Feliciano, A., López-Pérez, J. L., Israel, A. 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 129–133.

- Otuki, M. F., Vieira, F., Malheiros, A., Yunes, R. A., Calixto, J. B. 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507: 253– 259.
- Payá, M., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos J. L., Alcaraz, M. J. 1993. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytother Res* 7:159-62.
- Pedrozo, J. 2004. *Productos Naturales Vegetales: Generalidades Químicas, Papel Biológico, Importancia Industrial. Métodos de uso común en fitoquímica cuadernillos No 1 y No 3.* Grupo de Investigación Fitoquímica (GIFUJ). Pontificia Universidad Javeriana. Santa fe de Bogotá. 68 p.
- Piñeros, C. 2003. *Determinación de la Actividad Antiinflamatoria de los Extractos Etanólicos y Algunas Fracciones de Hojas y Corteza de *Bursera graveolens* (H.B.K) Triana y Planchon (Burseraceae).* Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Biología. Bogota, Colombia. 109 p.
- Raffa, K. 1991. Induced defensive reactions in conifer-bark beetle systems. *American Zoology*. 20:4 195-198.
- Robles, J. 1998. *Phytochemical investigation of some traditional medicinal plants used by indigenous Colombian tribes. PhD Thesis.* Strachlyde University. Department of Pharmaceuticals Science. School of Pharmacy. Glasgow, Scotland.

- Robles, J., Gray, A., Torrenegra, R. 1999. Química de las *Burseráceas*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento Química. Grupo de Investigación de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ). Bogotá, Colombia. 17 p.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 1997. Inmunología. Cuarta Edición. Harcourt Brace de España S.A. Capítulo 14.
- Rojas, R. A. 2008. Evaluación de la Actividad Citotóxica de las Partes Aéreas de *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & P1. Frente a las Líneas Celulares Tumoraes CSC 15-95 (carcinoma de seno) y COLO 205 (carcinoma de colon). Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Biología. Bogotá, Colombia. 106 p.
- Rzedowski, J. & Ortiz, E. 1988. Estudios quimiotaxonómicos de *Bursera* (Burseraceae). Una especie de origen híbrido de la Barranca de Tolantongo, Estado de Hidalgo. Acta Botánica de México. 1: 11-20.
- Rzedowski, J., Guevara, F. 1992. Burseraceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes 3: 1-44.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericano. México. D. F. 658 p.
- Siani, A., Ramos, M., Meneses de Lima, O., Ribeiro dos Santos, R., Fernandez, E., Soares, R., Rosas, E., Susunaga, G., Guimaraes, A., Zoghbi, M. & Henriques, M. 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from leaves and resin of species of *Protium*. Journal of Ethnopharmacology. 66: 57-69.

- Stites, D., Parslow, T., Terr, A., Imboden, J. 1998. Inmunología Básica y clínica. 10ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México. p. 215-230.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3rd Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, USA. 514 p.
- Trowbridge, H., Emling R. 1993. Inflammation, a review of the process. Fourth edition. Quintessence Publishing. Illinois, USA. p 9-12.
- Young, J. M., De Young, L., M. 1989. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. Modern Methods in Pharmacology. Pharmacological Methods in the Control of Inflammation. Spector S, Back N, eds. New York, pp. 215-231.
- Young, D. G., Chao, S., Casabianca, H., Bertrand, M. C., Minga, D. 2007. Essential Oil of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch from Ecuador. Journal of Essential Oil Research. 19: 525-526.
- Yueqin, Z. 2006. Identificación y Actividad Farmacológica de Principios de Especies Antiinflamatorias. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Departamento de Farmacología. Valencia, España. 178 p

Anexo 1. Fracciones Obtenidas a partir de los Extractos en Petrol y en Etanol de las Hojas y la Corteza.



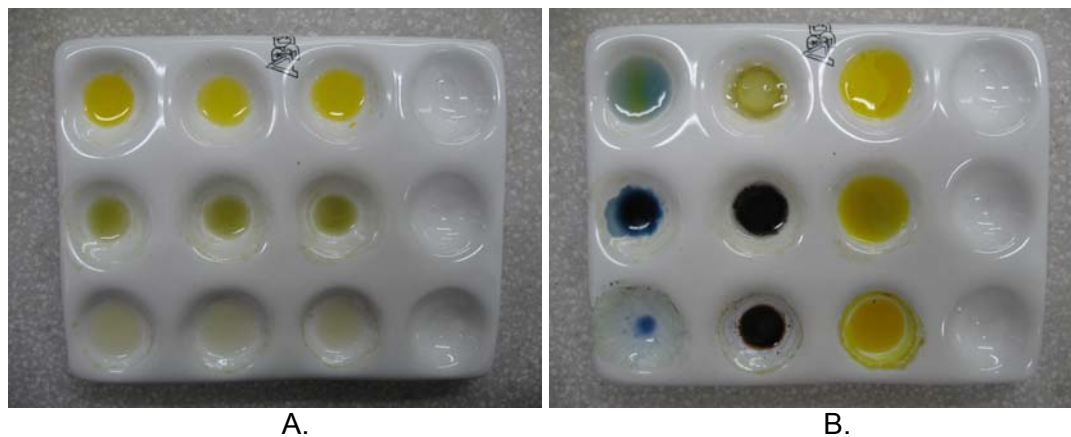
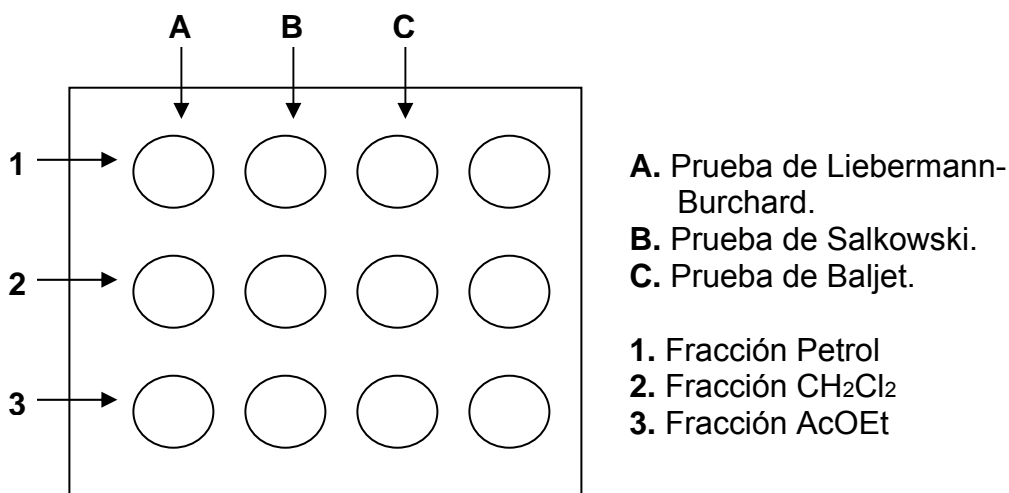
Fracciones de los Extractos de las Hojas. Fotos tomadas por el autor.



Fracciones de los Extractos de la Corteza. Fotos tomadas por el autor.

Anexo 2. Pruebas Químicas Preliminares hechas para los Extractos en Petrol y en Etanol de Hojas y Corteza.

Las pruebas químicas preliminares hechas en la placa excavada para los extractos en Petrol se realizaron como se muestra en el siguiente esquema y los resultados de estas pruebas se ven en las fotos a continuación.



Pruebas de Liebermann-Burchard, Salkowski y Baljet hechas en placa excavada para las Fracciones del Extracto en Petrol de las Hojas. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de las pruebas.



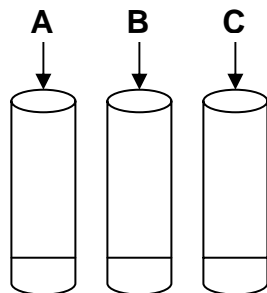
A.

B.

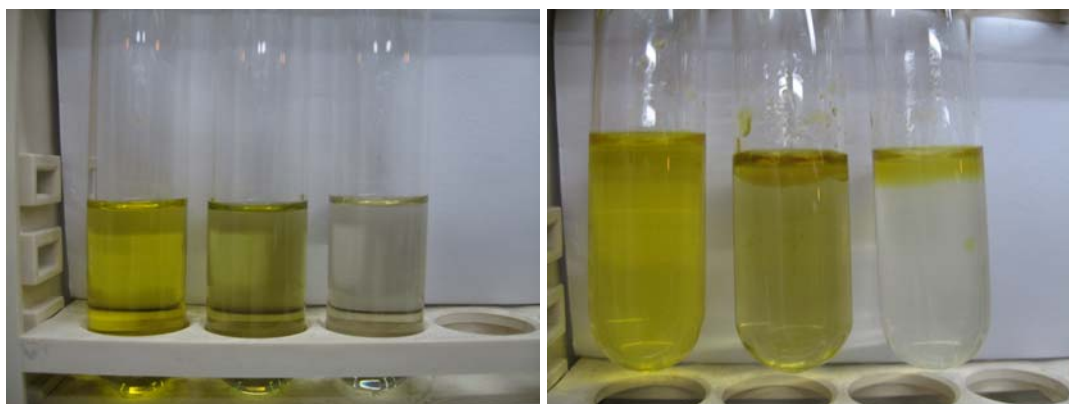
Pruebas de Liebermann-Burchard, Salkowski y Baljet hechas en placa excavada para las Fracciones del Extracto en Petrol de la Corteza. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de las pruebas.

Las pruebas químicas preliminares hechas en tubos de ensayo para los extractos en Petrol se realizaron como se muestra en el siguiente esquema y los resultados de estas pruebas se ven en las fotos a continuación.



A. Fracción Petrol
 B. Fracción CH_2Cl_2
 C. Fracción AcOEt

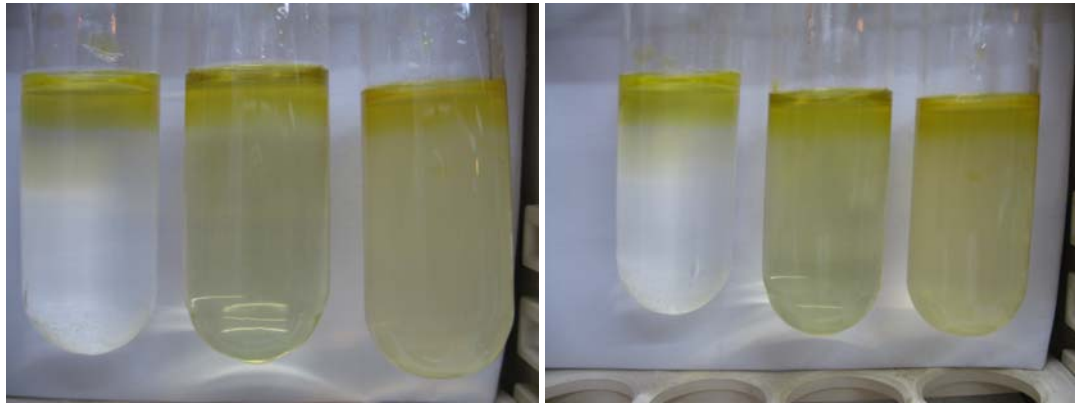


A

B

Prueba del Hidroxamato Férrico hecha en tubo de ensayo para las Fracciones del Extracto en Petrol de las Hojas. Fotos tomadas por el autor.

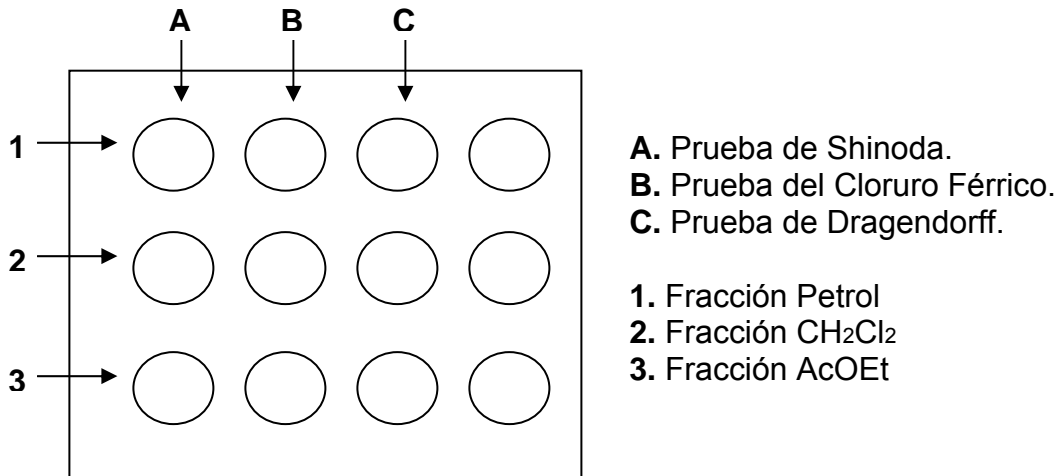
A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de la prueba.



A
B

Prueba del Hidroxamato Férrico hecha en tubo de ensayo para las Fracciones del Extracto en Petrol de la Corteza. Fotos tomadas por el autor.
 A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de la prueba.

Las pruebas químicas preliminares hechas en la placa escavada para los extractos en Etanol se realizaron como se muestra en el siguiente esquema y los resultados de estas pruebas se ven en las fotos a continuación.



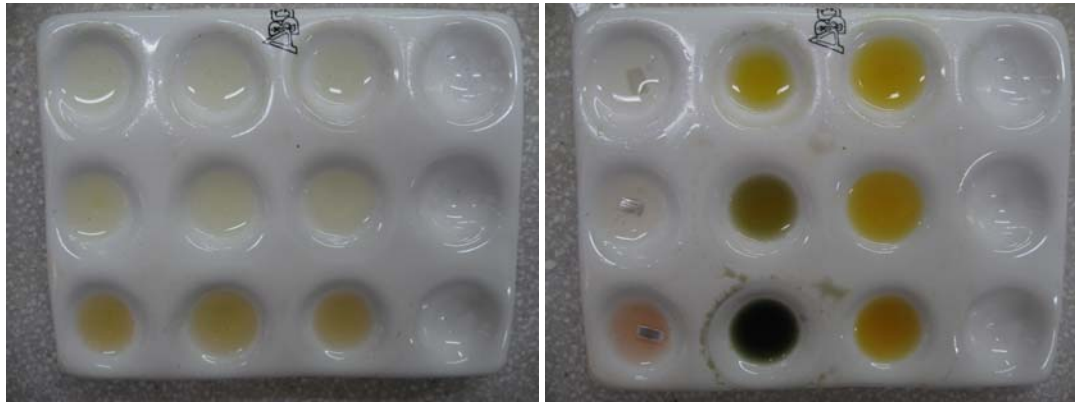


A.

B.

Pruebas de Shinoda, Cloruro Férrico y Dragendorff hechas en placa excavada para las Fracciones del Extracto en Etanol de las Hojas. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de las pruebas.



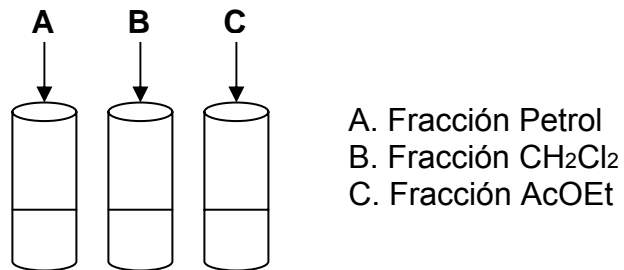
A.

B.

Pruebas de Shinoda, Cloruro Férrico y Dragendorff hechas en placa excavada para las Fracciones del Extracto en Etanol de la Corteza. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de las pruebas.

Las pruebas químicas preliminares hechas en tubos de ensayo para los extractos en Etanol se realizaron como se muestra en el siguiente esquema y los resultados de estas pruebas se ven en las fotos a continuación.

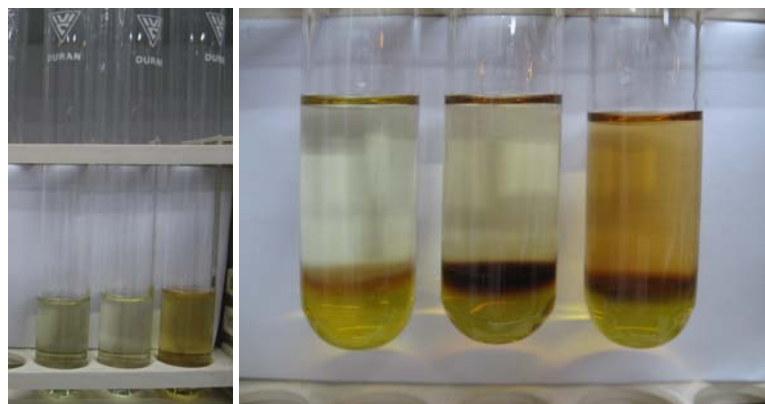


A

B

Prueba de Antraona hecha en tubo de ensayo para las Fracciones del Extracto en Etanol de las Hojas. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de la prueba.

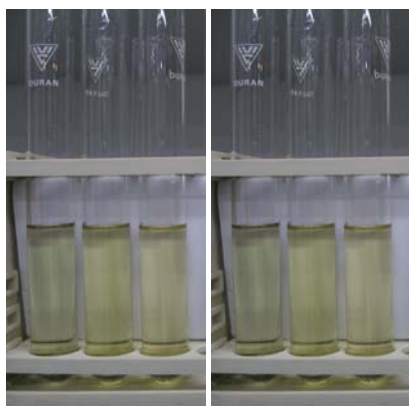


A

B

Prueba de Antraona hecha en tubo de ensayo para las Fracciones del Extracto en Etanol de la Corteza. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de la prueba.

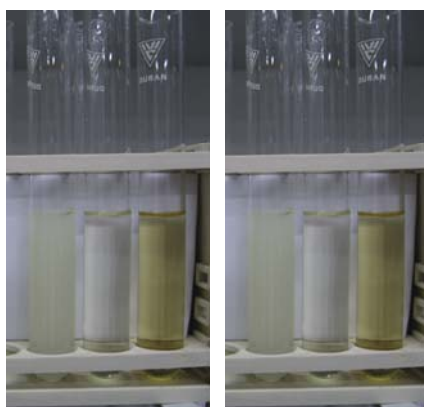


A

B

Prueba de la Espuma hecha en tubo de ensayo para las Fracciones del Extracto en Etanol de las Hojas. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de la prueba.



A

B

Prueba de la Espuma hecha en tubo de ensayo para las Fracciones del Extracto en Etanol de la Corteza. Fotos tomadas por el autor.

A: Fracciones antes de las pruebas. B: Resultados después de la prueba.

Anexo 3. Valores de Rf calculados para las cromatografías de capa delgada

A las manchas relevantes de las cromatografías de capa delgada que se muestran en el capítulo 6.7 de este trabajo se les calcularon valores de Rf que son reportados en las tablas que aparecen a continuación.

Tabla 16. Valores de Rf calculados para las manchas de las cromatografías de capa delgada realizadas para las fracciones Petrol de los extractos en Petrol y Etanol de las Hojas y la Corteza.

Fracciones	Mancha	Rf	
		Hojas	Corteza
Fracciones Petrol de los extractos en Petrol (Cromatografía revelada bajo UV)	1	0.08	0.10
	2	0.12	0.22
	3	0.22	0.31
	4	0.31	-
Fracciones Petrol de los extractos en Petrol (Cromatografía revelada con Vainillina)	1	0.05	0.07
	2	0.12	0.36
	3	0.36	0.70
	4	0.70	0.84
	5	0.84	-
Fracciones Petrol de los extractos en Etanol (Cromatografía revelada bajo UV)	1	0.18	0.24
	2	-	0.39
Fracciones Petrol de los extractos en Etanol (Cromatografía revelada con Vainillina)	1	0.22	0.22
	2	0.32	0.34
	3	0.60	0.47
	4	-	0.60
	5	-	0.67
	6	-	0.77
	7	-	0.93

Tabla 17. Valores de Rf calculados para las manchas de las cromatografías de capa delgada realizadas para las fracciones CH₂Cl₂ de los extractos en Petrol y Etanol de las Hojas y la Corteza.

Fracciones	Mancha	Rf	
		Hojas	Corteza
Fracciones CH ₂ Cl ₂ de los extractos en Petrol (Cromatografía revelada bajo UV)	1	0.09	0.13
	2	0.19	0.23
	3	0.39	0.49
	4	0.66	0.58
	5	0.78	0.76
	6	0.94	0.96
Fracciones CH ₂ Cl ₂ de los extractos en Petrol (Cromatografía revelada con Vainillina)	1	0.17	0.19
	2	0.32	0.37
	3	0.43	0.43
	4	0.49	0.49
	5	0.58	0.58
	6	0.70	0.72
	7	0.82	0.82
	8	0.94	0.94
Fracciones CH ₂ Cl ₂ de los extractos en Etanol (Cromatografía revelada bajo UV)	1	0.19	0.27
	2	0.47	0.52
	3	0.62	0.66
	4	0.90	-
Fracciones CH ₂ Cl ₂ de los extractos en Etanol (Cromatografía revelada con Vainillina)	1	0.13	0.18
	2	0.37	0.37
	3	0.50	0.45
	4	-	0.54
	5	-	0.62
	6	-	0.73

Tabla 18. Valores de Rf calculados para las manchas de las cromatografías de capa delgada realizadas para las fracciones AcOEt de los extractos en Petrol y Etanol de las Hojas y la Corteza.

Fracciones	Mancha	Rf	
		Hojas	Corteza
Fracciones AcOEt de los extractos en Petrol (Cromatografía revelada bajo UV)	1	0.65	0.89
	2	0.76	-
	3	0.89	-
Fracciones AcOEt de los extractos en Petrol (Cromatografía revelada con Vainillina)	1	0.47	0.65
	2	0.61	0.83
	3	0.74	-
Fracciones AcOEt de los extractos en Etanol (Cromatografía revelada bajo UV)	1	0.12	0.22
	2	0.24	0.53
	3	0.38	0.73
	4	0.48	0.83
	5	0.55	-
	6	0.68	-
	7	0.87	-
Fracciones AcOEt de los extractos en Etanol (Cromatografía revelada con Vainillina)	1	0.16	0.26
	2	0.26	0.38
	3	0.38	0.44
	4	0.51	0.53
	5	0.63	0.61
	6	0.85	0.70
	7	-	0.85