



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

*Bouvardia ternifolia* COMO FUENTE DE COMPUESTOS  
ANTITUBERCULOSOS Y DETERMINACIÓN DE  
TOXICIDAD SUBAGUDA DE UNA MEZCLA DE  
TRITERPENOS ACTIVOS CONTRA *M. tuberculosis*  
H37Rv.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA CRISTINA ALCARAZ REYES



México, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente:** Profesor: Rogelio Gregorio Pereda Miranda

**Vocal:** Profesor: José Fausto Rivero Cruz

**Secretario:** Profesor: María Adelina Jiménez Arellanes

**1er Suplente:** Profesor: Isabel del Carmen Rivero Cruz

**2º Suplente:** Profesor: Abraham Madariaga Mazón

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Unidad de Investigación Médica de Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

**SUPERVISOR TÉCNICO:** M. en C. Jorge Cornejo Garrido

**SUSTENTANTE:** María Cristina Alcaraz Reyes

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por el apoyo, asesoría, paciencia y tiempo dedicado para la realización de este trabajo.
- Al Fondo de Fomento e Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS 2006/IA)/I/053) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; proyecto 48339-M) por el financiamiento otorgado a los proyectos.
- Al M. en C. Jorge Cornejo Garrido, por su asesoría en los estudios toxicológicos, además por el consejo y apoyo brindado durante la realización de este proyecto.
- A la Ingeniero Bioquímico Nallely Rosalba Román Cortés, por su asesoría en la determinación de actividad antioxidante y actividad antimicrobiana, así como el apoyo durante mi estadía en el laboratorio.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio: Nallely, Jorge, Jovani, Rosalba, Marlene, Aurora, Mariana, por el tiempo compartido y hacer que el tiempo que estuve con ellos fuera alegre.
- A los miembros del jurado:

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Dr. José Fausto Rivera Cruz

M. en C Isabel del Carmen Rivero Cruz

Q.F.B. Abraham Madariaga Mazón

Ya que con sus observaciones, comentarios, sugerencias y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo permitieron el enriquecimiento del mismo.

## DEDICATORIAS

- A mis padres, por el apoyo, amor y esfuerzo que han mostrado a lo largo de mi vida y por impulsarme a ser mejor en lo que haga, gracias a ustedes he llegado a este momento de mi vida el cual les estaré siempre agradecida, los quiero.
- A mi hermana Gabriela gracias por estar conmigo, por brindarme tu apoyo cuando lo necesitaba, y por todos los momentos, risas y travesuras que compartimos
- A mis amigos de la Facultad, Angélica, Arely, Mónica, Marco, Emmanuel, Minerva, Lalo, Lulú gracias por amistad, por todos los momentos que nos hacían reír y las pequeñas travesuras que hicimos durante la carrera, sin ustedes este tiempo no habría sido igual.
- A la Dra. Adelina por todo el apoyo, comprensión y paciencia que me brindó durante mí estadía en el laboratorio.

## ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN	i
ANTECEDENTES	1
Antecedentes botánicos y etnobotánicos de <i>B. ternifolia</i>	1
Antecedentes de investigaciones biológicas y químicas de <i>B. ternifolia</i>	3
Importancia de la toxicidad de las plantas medicinales	11
OBJETIVOS GENERALES	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
METODOLOGÍA	16
Procedimiento general	16
Fraccionamiento químico del extracto metanólico de <i>B. ternifolia</i>	17
Purificación de la mezcla de triterpenos	21
Purificación de los hexapéptidos	22
Hidrólisis de los hexapéptidos	22
Evaluación de la actividad antioxidante	23
Evaluación de actividad antimicrobiana	26
Determinación de la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO	58

## LISTA DE ABREVIATURAS.

°C	grados centígrados	FR	fase reversa
%	porcentaje	g	gramos
$\lambda$	longitud de onda	GLU	glucosa
3PS	leucemias tipo murino	GOT	glutamato oxalato transaminasa
AAEVC	actividad antioxidante equivalente a vitamina C	GPT	glutamato piruvato transaminasa
AAO	actividad antioxidante	GPX	glutación peroxidasa
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	h	horas
Acet	acetona	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
AcUr	ácido úrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
AO	ácido oleanólico	Hb	hemoglobina
ATCC	American Type Culture Collection	HCl	ácido clorhídrico
AU	ácido úrsolico	HDL	lipoproteínas de alta densidad
B1	melanoma melanocítica B16	HeLa	carcinoma cervical
BAN	bandas	Hex	hexano
BAS	basófilos	HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
C.H.C.M	concentración de hemoglobina corpuscular media	Hto	hematocrito
CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio	IL-6	interleucina 6
ccf	cromatografía en capa fina	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	persulfato de potasio
CC	cromatografía en columna	KB	adenocarcinoma nasofaríngeo
CCl <sub>4</sub>	tetracloruro de carbono	kg	kilogramo
CH <sub>3</sub> CN	acetónitrilo	lb	libras
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo	LEU	leucocitos
CI <sub>50</sub>	concentración inhibitoria media	LIN	linfocitos
cm	centímetros	M	molar
CMI	concentración mínima inhibitoria	m	metros
CMN	Centro Médico Nacional	<i>m/z</i>	masa carga
COL	colesterol	MABA	micrométodo colorimétrico de azul de alamar
COX2	ciclooxigenasa 2	MeOH	metanol
CREAT	creatinina	mg	miligramos
DI <sub>50</sub>	dosis inhibitoria media	mg/kg	miligramos por kilogramo
DL <sub>50</sub>	dosis letal media	µg/mL	microgramos por mililitro
DMBA	7,12-dimetilbenzo[ $\alpha$ ]antraceno	mg/mL	miligramos por mililitro
DMPD	diclorhidrato de <i>N,N</i> -Dimetil- <i>p</i> - fenilendiamina	min	minutos
DMSO	dimetilsulfóxido	mL	mililitro
DNA	ácido desoxirribonucleico	µM	micromolar
DPPH	2,2- difenil-1-picrilhidrazilo	µm	micrómetros
EM-FAB	espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos	mm	milímetros
EM-IE	espectrometría de masas por impacto electrónico	MMP-2	metaloproteinasa 2
EOS	eosinófilos	mM	milimolar
ERI	eritrocitos	µmol/cm <sup>2</sup>	micromol por centímetro cuadrado
EtOH	etanol	MON	monocitos
FeCl <sub>3</sub>	cloruro de hierro	MPP	1-metil-4-fenilpiridinium
		MRF	multifarmacorresistente
		NF-κB	factor nuclear κB

nm	nanómetros	SOD	superóxido dismutasa
OMS	Organización Mundial de la Salud	TB	tuberculosis
OSCs	2,3-oxidoescualeno ciclasa	TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
p	probabilidad	TPA	13-acetato-12-O-decanoilforbol
PLA	plaquetas	t <sub>R</sub>	tiempo de retención
PS	leucemia linfocítica P388	TRI	triglicéridos
RA	reactivo analítico	TSB	caldo soya y tripticaseína
Rf	factor de retención	UFC	unidades formadoras de colonias
RMN- <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear protónica	UV	ultravioleta
S.E.M.	error estándar del promedio	V.C.M	volumen corpuscular medio
		XRF	extremadamente farmacorresistente



## ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de <i>B. ternifolia</i> .	18
Tabla 2. Fraccionamiento secundario de la fracción BDT9.	19
Tabla 3. Fraccionamiento secundario de la fracción BDT6.	20
Tabla 4. Fraccionamiento terciario de las fracciones secundarias BDT97 a BDT9-15 y BDT6-15 a BDT6-16 que contenían la mezcla de hexapéptidos.	21
Tabla 5. Condiciones analíticas para HPLC para la detección de la mezcla de triterpenos.	22
Tabla 6. Determinación de PT y AAECV de la fracción FT10 y de la mezcla de AU/AO por los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH y DMPD.	40
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la fracción FT10 y de la mezcla de AU/AO por los métodos ABTS, DPPH y DMPD.	41
Tabla 8. CMI del extracto metanólico, algunas fracciones primarias y de la mezcla de AU/AO de <i>B. ternifolia</i> .	42

## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1. Incremento del peso corporal semanal de ratones hembra y macho Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.	43
Gráfica 2. Peso relativo de los órganos de ratones hembra y macho Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.	44
Gráfica 3. Química sanguínea de ratones macho Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.	45
Gráfica 4. Química sanguínea de ratones hembra Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.	46
Gráfica 5. Biometría hemática, cuenta diferencial de células blancas de ratones hembra y macho Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.	47
Gráfica 6. Biometría hemática, valores hematológicos de ratones hembra y macho Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.	47

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. <i>Bouvardia ternifolia</i> .	3
Figura 2. Estructura química de la bouvardina (1), deoxibouvardina (2), 6-O-metilbouvardina (3), y un análogo sintético de la bouvardina (4).	5
Figura 3. Estructura química del ácido ursólico y ácido oleanólico.	6
Figura 4. Biosíntesis del ácido úrsólico.	6
Figura 5. Cromatogramas de HPLC de ácido ursólico comercial (a), ácido oleanólico comercial (b), mezcla de triterpenos comerciales (c) y del producto natural (d).	35
Figura 6. Cromatoplasmas de hidrólisis del hexapéptido, FT10, a las 2 (a) y 4 (b) h de reacción.	38

## ÍNDICE DE ESPECTROS.

		Página
Espectro 1.	Resonancia Magnética Nuclear protónica de la mezcla de triterpenos provenientes de <i>B. ternifolia</i> .	59
Espectro 2.	Espectro de Masas por Impacto Electrónico de la mezcla de triterpenos provenientes de <i>B. ternifolia</i> .	60
Espectro 3.	Resonancia Magnética Nuclear protónica del ácido ursólico comercial (Sigma).	61
Espectro 4.	Espectro de Masas por Impacto Electrónico del ácido ursólico comercial (Sigma).	62

## **JUSTIFICACIÓN.**

La búsqueda de nuevos agentes antituberculosos es urgente debido a que la tuberculosis (TB) constituye un problema de salud pública a nivel mundial. Una tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. La OMS ha implementado estrategias para su control y erradicación; a pesar de esto, el número de casos de TB se ha incrementado debido a la presencia de cepas multifarmacorresistentes (MFR) y extremadamente farmacorresistente (XFR). Otros factores que contribuyen son los altos niveles de desnutrición, tratamientos y diagnósticos ineficientes, la falta de vigilancia epidemiológica, problemas socioeconómicos, implementación inadecuado de los programas para su control, enfermedades que comprometen el sistema. Actualmente, los fármacos utilizados para el tratamiento de este padecimiento son poco eficaces, costosos y presentan severos efectos secundarios, por lo que es necesario encontrar nuevos compuestos o moléculas prototipo activas contra el microorganismo causante de la enfermedad, que sean menos tóxicos, económicos, con mecanismo de acción diferente a los existentes y de acción más rápida o bien que coadyuven a los tratamientos actuales. Con la finalidad de contribuir con la búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de compuestos activos, a nivel internacional se están evaluando diversos compuestos de origen sintético y natural, dentro de estos últimos se encuentran aquellos obtenidos a partir de las plantas medicinales. Cabe mencionar que diversas especies vegetales han sido utilizadas como remedios naturales durante muchos años y constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos y aun poco estudiados.

Este trabajo se enfoca al estudio químico del extracto metanólico de las partes aéreas de *Bouvardia ternifolia* con la finalidad de obtener compuestos antituberculosos, con base a un estudio preliminar y reportes previos en la literatura que describen que la especie biosintetiza a los ácidos ursólico y/o oleanólico. De manera adicional, se evaluó el efecto antibacteriano y antioxidante del extracto, de fracciones primarias y de compuestos puros. Así mismo, se determinó la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos en ratones Balb/C a 35 días, administrando el producto por vía subcutánea.

## **ANTECEDENTES.**

### **Antecedentes botánicos y etnobotánicos de *Bouvardia ternifolia*.**

El género *Bouvardia* pertenece a la familia *Rubiaceae*, que se encuentra constituida por aproximadamente 30 especies que crecen principalmente en climas templados (Martínez, 1979). Se distribuye desde el sur de Texas y en casi todo el antiplano mexicano (Villarreal, 1983). En México se localiza principalmente en áreas de vegetación secundaria (Villaseñor y Espinosa, 1998).

*B. ternifolia* (Cav) Schl (sinónimo *B. angustifolia* HBK, *B. hirtella* HBK, *B. jacquinii* HBK, *B. quaternifolia* HBK y *B. toluhana* Hook et Arn) es una especie endémica de la meseta Mexicana, que crece en climas secos, semisecos y templados, desde el nivel del mar hasta los 3000 m. (Aguilar *et al.*, 1994; INI, 1994; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 1998). La especie se distribuye en lugares perturbados, principalmente en pastizales, matorrales xerófilos y en bosques de pino-encino; además, se puede encontrar en orillas de caminos y carreteras (Villarreal, 1983).

La planta es un arbusto de 0.3 a 1.5 (3) m de altura, en sus ramas hay presencia de pelos, y en su juventud estos son blancos cortos, sus hojas son por lo común verticiladas, 3 a 4 por nodo estípulas pequeñas, pecíolos que miden entre 0.5 y 11 mm de largo, láminas extremadamente variables (lineares lanceoladas, elípticas, ovadas u obovadas), con mayor frecuencia elíptico-lanceoladas, de 1 a 10 cm de largo y 0.2 a 2.5 cm de ancho, ápice agudo, base cuneiforme, nervación pinnada, con o sin pelos. Sus flores generalmente se encuentran en forma de cima terminal de 3 a 40, pedicelos de 2 a 14 mm de largo; hipantio poco o densamente papiloso, estas flores presentan una corona tubular, de color salmón, rojo o naranja,

excepcionalmente blanco, extremadamente pubescente con pelos papilosos blancos, pero ápices rojos, escasamente pubescente, el tubo de 5 a 30 mm de largo, con un anillo velloso interno hacia la base, lóbulos ovados oblongos de 1.5 a 3.5 mm de largo; anteras de 2 a 4 mm de largo; lóbulos del cáliz lanceolados a lineares, de 2 a 10 mm de largo. El fruto es una cápsula de 4.5 a 9 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, sin pelos o algo papilosas; semillas de 2 a 3.5 mm de ancho. Florece en época de lluvia y es perenne (Rzedowski, 2001).

La planta es localmente conocida como trompetilla, mirto (Coahuila y Durango), hierba del indio, hierba del pasmo (Sinaloa), contrahierba, tlacoxóchitl (náhuatl, Estado de México), tlacosuchil, expatli (náhuatl), tonati-sochit, donita (otomí, Estado de México), nucopuetel (otomí, Puebla), candelilla (Hidalgo) y doto (otomí, Querétaro) (Aguilar *et al.*, 1998; Jolad *et al.*, 1977; Martínez, 1979; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 1998).

En la medicina tradicional de México, la cocción de esta planta es utilizada para el tratamiento de la disentería, hidrofobia, tos, dolores de estómago y cabeza, también se ha recomendado ampliamente como analgésico de aplicación tópica, y en algunos estados de la república como Puebla y Morelos, se utiliza como antídoto para el veneno de alacrán, araña, ciempiés y hormiga. El extracto acuoso de las hojas se emplea para el tratamiento de la diabetes, las raíces son utilizadas contra la insolación y para aliviar el agotamiento del corazón y la planta pulverizada es utilizada para contener hemorragias nasales abundantes (Jolad *et al.*, 1977; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 1998; O’Gorman, 1963; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Aguilar *et*

*al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998), la infusión de hojas y tallos es utilizada para el tratamiento de pacientes que han sido picados por escorpión (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005b), la infusión de la planta entera o de las raíces se utilizan para el tratamiento de mordedura de víbora, piquete de escorpión y ciempiés, y es probable que posea propiedades analgésicas, sedantes y antivirales. Se tiene conocimiento de que las semillas son utilizadas para calmar las molestias por piquetes de insectos. También se ha descrito que las flores mezcladas con tortillas son utilizadas para el tratamiento contra la rabia (Aguilar *et al.*, 1994; 1998; INI, 1994; Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005a).



Figura 1. *Bouvardia ternifolia*

### **Antecedentes de investigaciones biológicas y químicas.**

El extracto clorofórmico de las hojas de *B. ternifolia* presenta actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos y normoglucémicos a una dosis de 100 mg/kg. El efecto observado es similar a de la tolbutamida (fármaco facilitador de la secreción

de insulina, perteneciente al grupo de las sulfonilureas de 1ª generación); sin embargo, los extractos hexánico y metanólico resultaron inactivos en este estudio (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 1998). Por otro lado, el extracto hexánico y metanólico de las raíces aumenta la DL<sub>50</sub> del veneno de escorpión (*Centruroides limpidus limpidus*), siendo el extracto hexánico el que mostró la mejor actividad. Estos mismos extractos tienen la habilidad de contrarrestar la inflamación pancreática aguda producida por el veneno de escorpión (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005a; 2005b). También, se ha reportado que el extracto metanólico de las hojas, flores y tallos muestra actividad citotóxica contra leucemia linfocítica P388 (PS), melanoma melanocítica B16 (B1) y contra adenocarcinoma nasofaríngeo (KB) (Jolad *et al.*, 1977). En un estudio preliminar, los extractos hexánico y metanólico de las partes aéreas de *B. ternifolia*, realizados contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv resultaron inactivos (CMI >200 µg/mL) (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003).

Estudios químicos realizados sobre el extracto metanólico de las hojas, flores y tallos de la especie describen el aislamiento de tres hexapéptidos cíclicos identificados como bouvardina (**1**), deoxibouvardina (**2**) y 6-O-metilbouvardina (**3**) (Fig. 2) (Jolad *et al.*, 1977; Bates *et al.*, 1983), los cuales están formados por tres unidades de alanina (dos de L-alanina y una D-alanina) y tres de N-metiltirosina, que dan lugar a un ciclo de 18 miembros y se encuentra unido a otro anillo de 14 miembros confiriéndole rigidez y estabilidad a la molécula.

Estos tres hexapéptidos presentan una importante actividad antitumoral y citotóxica (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 1998), especialmente la bouvardina y deoxibouvardina que presentaron la mejor actividad citotóxica contra leucemias tipo murino (3PS), B1, KB (Jolad *et al.*, 1977). Estos hexapéptidos inhiben la síntesis de proteínas a nivel



ribosomal, y la actividad antitumoral y citotóxica se debe a la presencia del anillo de 14 miembros (Zalacaín *et al.*, 1982; Jolad *et al.*, 1977; Bates *et al.*, 1983). En otros experimentos realizados sobre la línea celular PS, se evaluaron la bouvardina y sus análogos (Fig. 2); uno de ellos presentaba un el anillo de 14 miembros abierto (4). Los compuestos con el anillo cerrado fueron los más activos y el análogo 4 (anillo abierto) resultó inactivo, por lo que se confirmó que el anillo de 14 miembros influye sobre el mecanismo de acción (Bates *et al.*, 1983; Slowikowski y Schram, 1985).

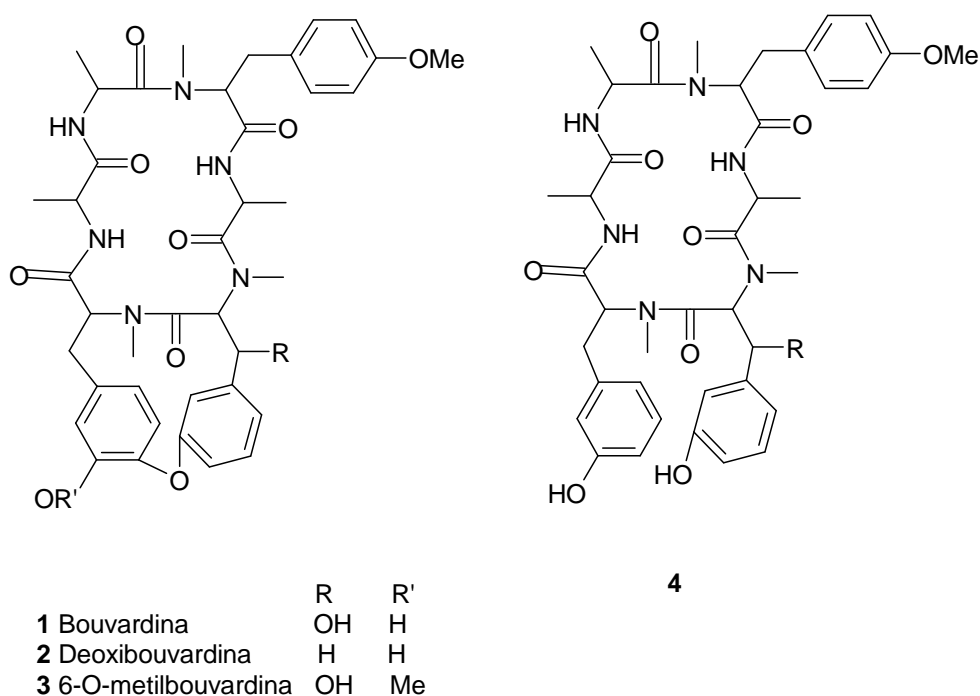


Figura 2. Estructura química de la bouvardina (1), deoxibouvardina (2), 6-O-metilbouvardina (3), y un análogo sintético de la bouvardina (4) (Slowikowski y Schram, 1985)

Por otro lado, también se ha descrito la presencia de ácidos triterpénicos como el ácido ursólico (AU) y el ácido oleanólico (AO) en el extracto hexánico y metanólico de las raíces y en el extracto clorofórmico del tallo de *B. ternifolia* (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005b; Pérez *et al.*, 1998).

El AU también conocido como ursón, prunol, micromerol y malol, junto con su isómero el ácido oleanólico (Fig. 3) se encuentran en numerosas especies vegetales (incluyendo plantas medicinales) y en diversos productos alimenticios (Ferrer-Hernández *et al.*, 2007; Liu, 1995; 2005; Somova *et al.*, 2003). Los triterpenos son compuestos derivados biosintéticamente de la ciclación del escualeno (Finlay *et al.*, 1997) mediante la acción de la enzima 2,3-oxidoescualeno ciclasa (OSCs) (Akashi *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 1988) (Fig. 4).

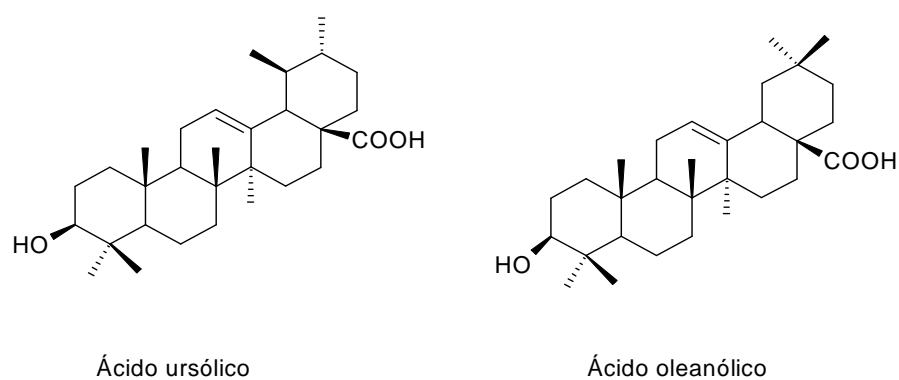


Figura 3. Estructuras químicas del ácido ursólico y ácido oleanólico.

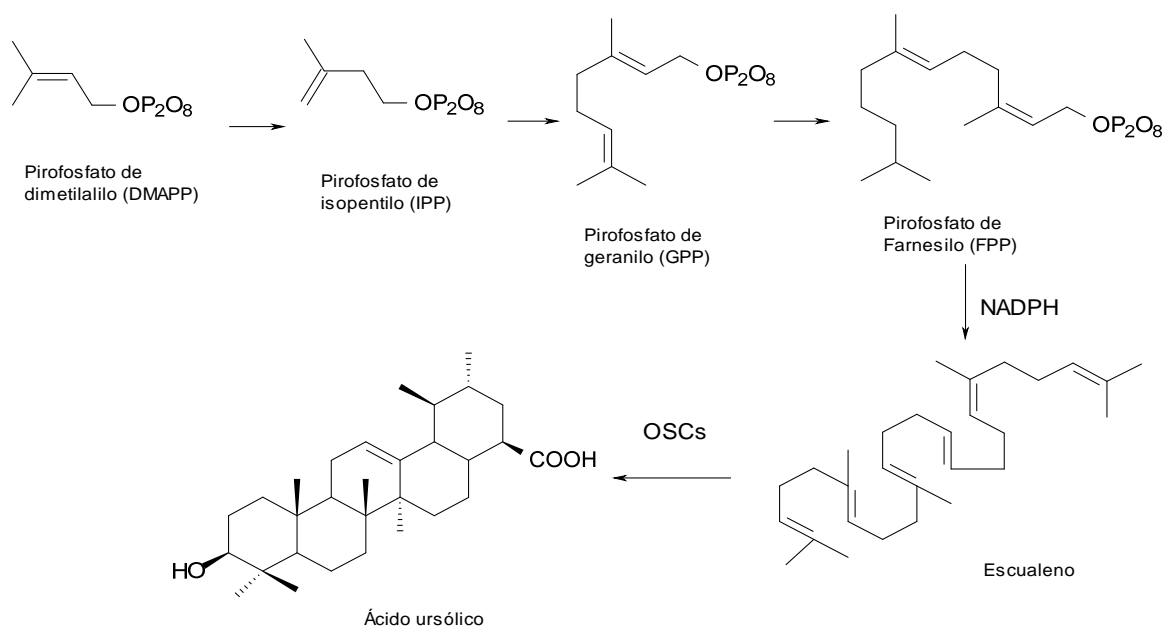


Figura 4. Biosíntesis del ácido ursólico (Seo *et al.*, 1988).

Durante mucho tiempo, se consideró que el AU y el AO eran inactivos farmacológicamente y solamente se empleaban como emulsionantes en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimenticios (Ferrer-Hernández *et al.*, 2007), pero diversas investigaciones han demostrado el potencial farmacológico de estos compuestos (Liu, 1995; 2005). A continuación se describen algunas de sus efectos farmacológicos.

Somova *et al.* (2003) demostró el efecto antihipertensivo de AU en ratas sensibles a la sal, debido probablemente al efecto antihiperlipidémico y a la actividad antioxidante combinados con el efecto diurético, natriurético y a la actividad salurética del compuesto. Otro estudio realizado por el mismo autor en 2004, reporta que tanto el AU como el AO poseen actividad antidisrítica al inducir las arritmias con adrenalina y  $\text{CaCl}_2$ , encontrando que el efecto observado es comparable al del propanolol ( $\beta$ -bloqueador no selectivo) y sugieren que pueden ser antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Una actividad importante que se ha demostrado para el AU es el efecto antioxidante *in vivo* encontrándose que presenta un efecto protector sobre la peroxidación de lípidos, estrés oxidativo y daño al DNA inducido por radiación ultravioleta (Ramachandran y Prasad, 2008). Yin y Chan (2007), demostraron el efecto antioxidante no enzimático del AU al secuestrar anión superóxido, efecto quelante sobre iones metálicos e inhibición de la xantina oxidasa. También se ha demostrado el efecto antioxidante y antiinflamatorio sobre la línea celular PC12 induciendo ambos efectos con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y con el ion 1-metil-4-fenilpiridinium ( $\text{MPP}^+$ ), los cuales ocasionan muerte celular por liberación de citocinas pro-inflamatorias [interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] y

disminución de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). Al pretratar las células PC12 con AU se disminuye la liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$ , por lo que este compuesto puede ser un agente protector en desórdenes de tipo neurodegenerativos (Tsai y Yin, 2008).

Respecto al efecto antiinflamatorio se describe que el AU presenta una mayor actividad que la indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo), ya que se determinaron  $DI_{50}$  de 0.12 y 0.26  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  respectivamente, al evaluar ambos compuestos en el modelo de edema en oreja de ratón inducida con aceite de ricino (Ismaili *et al.*, 2004; Baricevic *et al.*, 2001). Se observaron resultados similares al inducir la inflamación con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) obteniendo  $DI_{50}$  = 0.1 mg/oreja y un 90% de inhibición para el AU y para la indometacina una  $DI_{50}$  = 0.3 mg/oreja (Banno *et al.*, 2004). El AU también muestra importante efecto antiinflamatorio al inducir el proceso con carragenina o ácido acético en el edema plantar (Kosuge *et al.*, 1985; Liu 1995).

A la fecha se ha descrito que el compuesto inhibe la liberación de histamina, inhibe a la 5-lipooxigenasa, a la ciclooxigenasa-2 (COX2) y a la elastasa (Liu, 1995; Ismaili *et al.*, 2004; Ringbom *et al.*, 1998).

Para la mezcla AU/AO también se describe efecto hepatoprotector *in vivo* e *in vitro* al inducir daño hepático con  $\text{CCl}_4$ , disminuyendo los niveles de enzimas hepáticas [glutamato oxalato transaminasa (GOT), glutamato piruvato transaminasa (GPT)], y al regenerar la viabilidad de los hepatocitos (Liu, 1995; Martín-Aragón *et al.*, 2001). También protegen contra el daño hepático provocado por D-galactosamina, acetaminofen y otras sustancias (Liu, 1995; Martín-Aragón *et al.*, 2001). Algunos autores mencionan que el efecto hepatoprotector puede deberse a que el la mezcla

AU disminuye la actividad del citocromo P450; familia de enzimas que algunos compuestos hepatotóxicos requieren para su activación metabólica (Liu, 1995; Kim *et al.*, 2004).

Asimismo, se ha reportado que posee actividad antitumoral, al inhibir o suprimir la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que es inducido por varios carcinógenos, agentes inflamatorios y promotores de tumor. Este compuesto inhibe los sitios p50 y p65 del NF- $\kappa$ B, por lo que este no se puede unir al DNA e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$ , los ésteres del forbol, ácido okadaico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y humo de cigarro (Shishodia *et al.*, 2003). Algunos autores reportan que el AU inhibe pasos clave en el proceso de la angiogenesis (proliferación de las células endoteliales, migración y diferenciación) pero estimula otros, como degradación de matriz extracelular por matriz metaloproteinasa-2 (MMP-2) y urocinasa en ensayos *in vitro* (Cárdenas *et al.*, 2004). Sobre la línea celular HT-1080 (fibrosarcosoma humano) mostró una actividad antiinvasiva (Cha *et al.*, 1996). Por vía tópica, el AU inhibe en un 45-61% la promoción en cáncer de piel en ratones, al inducir la formación de tumores con 7,12-dimetilbenzo[ $\alpha$ ]antraceno (DMBA) junto con el promotor TPA (Huang *et al.*, 1994). Otro estudio reveló una reducción del 53% en la formación de cáncer de piel al inducirlo con TPA y tratarlos con dosis bajas de AU (Tokuda *et al.*, 1986); sin embargo, al tratar animales con cáncer de piel con altas dosis de AU, el efecto fue inconsistente por lo que los autores sugieren estudios adicionales para corroborar el efecto de AU en casos de cáncer de piel (Ikeda *et al.*, 2006).

También se ha reportado que el AU inhibe la proliferación celular en cáncer de pulmón A549 bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase G1 *in vitro* (Hsu *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2009), el mismo efecto se describe sobre carcinoma de colon

humano (HCT15) (Li *et al.*, 2002), cáncer leucémico humano (HL60), cáncer de endocervix (Ca9-22) (Chen *et al.*, 2009) y carcinoma epidérmico humano (A431), contra este último se observó un efecto citotóxico y citostático (Li *et al.*, 2002; Hollósy *et al.*, 2000). Meng *et al.* (2009), reporta actividad citotóxica para el AU y algunos derivados contra tres líneas celulares; carcinoma cervical (HeLa), cáncer de ovario (SKOV3), y carcinoma gástrico (BGC-823), siendo más activo contra el primero.

Respecto a la actividad antimicrobiana, el AU resultó activo contra *Staphylococcus aureus* (CMI= 8 µg/mL) y *Enterococcus faecalis* (CMI= 4 µg/mL), pero inactivo contra cepas resistentes a antibióticos (*S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus sp* resistente a vancomicina) (Fontay *et al.*, 2008). En otro estudio, la CMI contra *S. aureus* (62.5 µg/mL), *E. faecalis* (CMI= 47 µg/mL), *Escherichia coli* (CMI= 250 µg/mL), y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI= 4 µg/mL) fue significativa (Shai *et al.*, 2008).

Otra actividad relevante que se le ha demostrado al AU es su efecto contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra presentando una CMI= 12.5 µg/mL, al evaluarlo por el micrométodo colorimétrico de azul de alamar (MABA), (Tanachatchairatana *et al.*, 2008), y contra *M. tuberculosis* H37Rv se reportan diferentes valores, una CMI = 32 µM (50 µg/mL) por un ensayo radiorespirométrico BACTEC 460 (Cantrell *et al.* 2001; Wächter *et al.*, 1999) y de 41.9 y 31 µg/mL por el método MABA (Gu *et al.* 2004a; 2004b). Recientemente, se ha descrito que para la mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico se obtiene una CMI = 62.5 µg/mL *in vitro* al ser evaluada *in vitro* por MABA (Higuchi *et al.*, 2008). En un estudio realizado por nuestro grupo, se encontró que el ácido ursólico y el ácido oleanólico reducen la neumonía y las unidades formadoras de colonias (UFC's) en los animales con tuberculosis

avanzada, al inducir dicha enfermedad con *Mycobacterium tuerculosis* H37Rv y al administrar cada compuesto (AU y AO) por vía subcutánea durante dos meses (Patente/A/2006/080653).

Por otra parte, el AU presenta actividad antifúngica contra *Sporothrix schenki* (CMI= 32 µg/mL), *Microsporium canis* (CMI= 12 µg/mL), *Aspergillus fumigatus* (CMI= 24 µg/mL), *Cryptococcus neoformans* (CMI= 63 µg/mL) y *Candida albicans* (CMI= 63 µg/mL) (Shai *et al.*, 2008); actividad antiparasitaria contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* con una  $CI_{50}$ = 5 y 11 µg/mL, respectivamente, en esta evaluación se observó que fue más activo contra amastigotes respecto a los fármacos de referencia (Torres-Santos *et al.*, 2004) y contra *L. donovani* mostró una  $CI_{50}$ = 3.7 µg/mL, esta actividad no fue mayor a los controles positivos: pentamidina ( $CI_{50}$ = 1.9 µg/mL) y anfotericina B ( $CI_{50}$ = 0.7 µg/mL) (Filho *et al.*, 2009). Este autor también reportó el efecto de AU contra *Plasmodium falciparum* clone D6 ( $CI_{50}$ = 1 µg/mL). El AU posee una potente actividad contra *Tripanosoma cruzi*, ya que a la concentración de 40 µg/mL detiene el movimiento de todos los epimastigotes después de 48 h de incubación, falta por determinar su efecto sobre amastigotes y tripomastigotes del parásito (Abe *et al.*, 2002).

El AU también posee actividad hipoglucémica en ratones diabéticos y normoglucémicos, ejerciendo su máximo efecto a una dosis de 75 mg/Kg y después de 4.5 h de haber sido administrado, el efecto mostrado fue similar al de la tolbutamida en las mismas condiciones (Pérez *et al.*, 1998).

Cabe mencionar que a pesar de las diversas actividades biológicas descritas para estos triterpenos, a la fecha se desconoce su posible efecto tóxico en esquemas de administración subagudo, por lo que este trabajo describe el aislamiento de la mezcla de AU y AO y de otros compuestos presentes en el extracto metanólico de las partes aéreas de *B. ternifolia*, así como, la evaluación toxicológica subaguda de la mezcla de triterpenos.

### **Importancia de la toxicidad de las plantas medicinales.**

Las plantas medicinales son una fuente importante de principios activos, ya que estas son utilizados como materia prima en la fabricación de fármacos o en diversas preparaciones (cataplasmas, preparados rústicos, te, infusión, polvos, etc.) que son empleadas para tratar o prevenir diversos padecimientos (Balunas y Kinghorn, 2005). Durante los últimos años, ha crecido el interés por determinar la eficacia y seguridad de los remedios herbolarios y de sus derivados, debido al incremento de estos productos en el mercado. Aunado a que una gran parte de la población utiliza estos remedios sin ningún control de calidad y bajo ninguna prescripción médica para tratar diversas enfermedades. Como resultado del uso y abuso de estos productos, hoy en día existen reportes sobre daños irreversibles, efectos colaterales y muertes provocados por estos productos (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008).

En México existe una gran variedad de zonas climáticas que dan origen a una rica y extensa flora que incluye a las plantas medicinales, así por ejemplo en el herbario IMSS se tiene un registro de más de 5000 especies, de las cuales sólo algunas han sido objeto de investigación química y/o farmacológica. En la literatura científica internacional son pocos los trabajos que describen el potencial farmacológico de



productos de origen natural y más escasos son los trabajos que se enfocan a explorar el efecto tóxico tanto de extractos íntegros de las plantas medicinales como de los compuestos obtenidos de las mismas (Butler, 2004; Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008). A la par de explorar el efecto benéfico de un producto natural es importante determinar el efecto tóxico del mismo, para que de esta forma se pueda conocer su potencial real como agente terapéutico.

La población en general tiene la falsa creencia de que estos productos tienen relativa seguridad debido a que son naturales, aunado a que por mucho tiempo han sido utilizados en forma empírica por diversos grupos étnicos; sin embargo, existe poca información que asegure su nula o baja toxicidad, ya que para la mayoría de las plantas no se conocen los daños que puedan provocar a largo plazo, los cuales pueden ser nocivos, irreversibles o letales. La OMS estima que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de plantas medicinales, por lo que ha emitido diversos lineamientos emitidos para su uso, uno de ellos es conocer su seguridad, eficacia y llevar a cabo un adecuado control de calidad de las mismas (Balunas y Kinghorn, 2005; Déciga-Campos *et al.*, 2007).

Los efectos nocivos de una especie vegetal o sus derivados se presentan por efecto tóxico directo del mismo o indirecto provocado por contaminantes presentes en la planta (como son: metales pesados, microorganismos, toxinas microbianas, adulterantes) o por interacción con fármacos y otras plantas (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008).

En la actualidad, existen diversos métodos que permiten determinar o evaluar el grado y tipo de toxicidad que una planta puede provocar, y en algunas ocasiones han

sido identificados los compuestos químicos presentes en ellas. Para explorar el posible efecto tóxico que induce un producto de origen natural se cuenta con diferentes modelos como los de toxicidad crónica, aguda, subaguda, mutagenicidad, carcinogénesis, teratogénesis, citotoxicidad y neurotoxicidad, así como la interacción que pueda presentar con fármacos y otras plantas (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008; JRC, 2004). Mediante el empleo de alguno de estos modelos se han encontrado que ciertas especies medicinales de México contienen compuestos altamente tóxicos por lo que alerta a las autoridades de salud sobre el riesgo que representa su uso. Así por ejemplo, describen que los alcaloides aporfínicos de *Piper sanctum* tienen efecto sobre sistema nervioso central y citotóxico; que la especie *Arracacia toluensis* contiene cumarinas fitotóxicas; la especie *Larrea divaricata* contiene ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y compuestos proinflamatorios; *Passiflora incarnata* contiene apigenina que actúa sobre la memoria y habilidades motoras; en *Matricaria recutita* se describe la presencia de cumarinas las cuales interactúan con la warfarina provocando hemorragias internas (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008; Déciga-Campos *et al.*, 2007).

Por lo antes descrito, en el presente trabajo se determinó la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos obtenidos de *B. ternifolia*, mediante la evaluación de parámetros hematológicos y bioquímicos de las muestras sanguíneas de ratones Balb/C.

### **OBJETIVOS GENERALES:**

- Obtener los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en el extracto metanólico de *B. ternifolia*.
- Determinar la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos al ser administrados por vía subcutánea.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Obtener los compuestos adicionales presentes en el extracto metanólico de *B. ternifolia* e identificar de su estructura química.
- Determinar cantidad de polifenoles totales y actividad antioxidante *in vitro* del extracto, fracciones y mezcla de triterpenos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto, fracciones y mezcla de triterpenos de *B. ternifolia*.
- Determinar la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos en ratones Balb/C de ambos sexos administrada durante 35 días por vía subcutánea.

## METODOLOGÍA

### Procedimiento general

La cromatografía en columna (CC) de fase normal se realizó sobre sílica gel 60 (0.063 – 0.2 mm; Merck), empleando como fase móvil disolventes orgánicos con grado reactivo analítico (RA, J.T. Baker) destilados. Las fracciones colectadas fueron llevadas a sequedad en un sistema de vacío a presión reducida en un rotavapor (Büchi RE 111) acoplado a una bomba de vacío (Büchi Vac V-512) y a un recirculador (Eco 20). La detección y pureza de los compuestos se realizó empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia F<sub>254</sub> (Merck) con base de aluminio y cromatoplasmas de vidrio de tipo preparativo de fase reversa RP-18 F<sub>254S</sub> (Merck). Todas las cromatoplasmas se visualizaron en una cámara UV (254 nm; Entela<sup>®</sup>) y fueron reveladas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% con calentamiento; en el caso de los hexapéptidos se empleó como agente revelador ninhidrina en EtOH al 95% con calentamiento, el R<sub>f</sub> de cada compuesto se determinó en cromatografía en capa fina (ccf). Para la purificación del triterpeno se utilizó carbón activado (Sigma), el punto de fusión de los compuestos puros se determinó en el equipo Fisher-Johns y se reportan sin corregir. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó en un equipo Waters utilizando un controlador Waters 600 acoplado a un detector de arreglo de diodos Waters 960 y a un desgasificador (Degasit 6324), utilizando disolventes orgánicos grado HPLC (J.T. Baker), para el manejo del equipo se empleó el programa Millennium 32. La identificación química se realizó mediante el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H), espectrometría de masas por impacto

electrónico (EM-IE) y cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas (CG-EM).

Para la determinación de la actividad antioxidante se emplearon los siguientes reactivos, Folin-Ciocalteu (Golden Bell), ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y diclorhidrato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD) (Sigma), los cuales fueron pesados en una balanza analítica (Ohaus<sup>®</sup>), el pH de las soluciones fue medido con un potenciómetro 445 Corning, previamente calibrado. Para la toma de alícuotas se emplearon micropipetas (Ependorf<sup>®</sup>) y las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro UV-visible Varian Cary 50 Conc.

Las cepas de microorganismos empleadas para el ensayo de la actividad antibacteriana fueron: *Escherichia coli* (American Type Culture Collection [ATCC O157:H7]); *Pseudomonas fluorescens* (ATCC CD BB B-96) y *Listeria monocytogenes* (ATCC SCOTT A), para el mantenimiento de los microorganismos y para llevar a cabo el ensayo se empleó caldo soya y tripticaseína (TSB) (DIBCO) como medio de cultivo, previamente esterilizado en autoclave a 121°C y 15 lb de presión por 15 min. Se utilizó la escala de McFarland para determinar la densidad óptica de los microorganismos en un espectrofotómetro (Genesys<sup>™</sup> 10 scanning), se empleó dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) para disolver las muestras.

Para la evaluación de toxicidad subaguda se empleó aceite de olivo extravirgen (Sigma) como vehículo; xilazina (Procin<sup>®</sup>) y ketamina (Anesket<sup>®</sup>) como anestésicos y, para el análisis de biometría hemática y química sanguínea se emplearon equipos automatizados Coulter T890 y Selectra II (Italab) con reactivos Randox, respectivamente.

### Fraccionamiento químico primario.

Se tomaron 50 g del extracto metanólico de *B. ternifolia* (BDT) que se sometieron a un fraccionamiento químico en una CC empleando 1 kg de sílica gel 60 como fase estacionaria y como fase móvil mezcla de disolventes (Hex, CHCl<sub>3</sub>, MeOH) en grado creciente de polaridad; mediante este proceso se obtuvieron 76 fracciones primarias de 500 mL c/u, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil mostrado en ccf. Los sistemas de elución empleados así como las fracciones obtenidas y agrupadas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *B. ternifolia*.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reuniones	Peso (mg)	Clave
CHCl <sub>3</sub> :Hex 4:6	1-6	1-5	54.0	BDT1
CHCl <sub>3</sub> :Hex 6:4	7-11	6-14	358.7	BDT2
CHCl <sub>3</sub> :Hex 8:2	12-32	15-22	981.8	BDT3
		23-30	785.1	BDT4
CHCl <sub>3</sub>	33-39	31-40	432.5	BDT5
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 95:5	40-63	41-58	15000.0	<b>BDT6</b>
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 9:1	64-76	59-64	1119.4	BDT7
		65	2.3518	BDT8
		66-70	20700.0	<b>BDT9</b>
		71	1375.7	BDT10
		72	5211.0	BDT11
		73	1018.1	BDT12
		74	1410.2	BDT13
		75	879.1	BDT14
76	490.2	BDT15		

Hex= hexano, CHCl<sub>3</sub>= cloroformo, MeOH= metanol

En las fracciones primarias BDT6 y BDT9 se observó la presencia de compuestos mayoritarios por lo que fueron sometidos a posteriores fraccionamientos para obtener estos compuestos.

La fracción primaria BDT9 (20.7 g), fue sometida a CC empleando 360 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y como fase móvil mezcla de disolventes (CHCl<sub>3</sub>, Acet, MeOH) en grado creciente de polaridad, durante el proceso se obtuvieron 110 fracciones secundarias de 500 mL c/u, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico mostrado en ccf. Los sistemas de elución empleados así como las fracciones obtenidas y agrupadas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria BDT9.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reuniones	Peso (mg)	Clave
CHCl <sub>3</sub>	1-11	1-12	23.8	BDT9-1
CHCl <sub>3</sub> : Acet 9:1	12-17	13-20	36.9	BDT9-2
CHCl <sub>3</sub> : Acet 8:2	18-26	21-27	15.2	BDT9-3
CHCl <sub>3</sub> : Acet 7:3	27-34	28-38	243.3	BDT9-4
CHCl <sub>3</sub> : Acet 6:4	35-45	39-43	9.7	BDT9-5
CHCl <sub>3</sub> : Acet 1:1	46-52	44-59	867.4	BDT9-6
CHCl <sub>3</sub> : Acet 3:7	53-60	60-79	4550.0	<b>BDT9-7</b>
Acet	61-83	80-83	816.0	<b>BDT9-8</b>
Acet:MeOH 9:1	84-91	84-91	33.2	<b>BDT9-9</b>
Acet:MeOH 8:2	92-101	92-94	1820.0	<b>BDT9-10</b>
		95-99	405.0	<b>BDT9-11</b>
Acet:MeOH 6:4	102-106	100-105	1180.0	<b>BDT9-12</b>
		106-107	401.0	<b>BDT9-13</b>
Acet:MeOH 1:1	107-108	108	122.0	<b>BDT9-14</b>
MeOH	109-110	109-110	119.6	<b>BDT9-15</b>

CHCl<sub>3</sub>= cloroformo, Acet= acetona, MeOH= metanol

En las fracciones secundarias BDT9-7 a BDT9-15 se detectó la presencia de un compuesto mayoritario al revelar las cromatoplasas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% o con ninhidrina, y posterior calentamiento de cada ccf.

Por otro lado, en la fracción primaria BDT6 (Tabla 1) se observó la presencia de un triterpeno, por lo que se tomaron 15 g de esta fracción y se sometieron a CC utilizando 270 g de sílica gel 60 y como fase móvil mezcla de disolventes (Hex, CHCl<sub>3</sub>, MeOH) con grado creciente de polaridad, obteniéndose 82 fracciones de 500 mL c/u, las cuales fueron reunidas según el perfil cromatográfico que presentaban en ccf. En la Tabla 3 se describen las condiciones empleadas para este fraccionamiento.

Tabla 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria BDT6.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reuniones	Peso (mg)	Clave
CHCl <sub>3</sub> :Hex 8:2	1-26	1-3	13.6	BDT6-1
		4-6	29.6	BDT6-2
		7-8	45.4	BDT6-3
		9-12	1050.0	BDT6-4
		13-16	27.0	BDT6-5
		17-19	34.5	BDT6-6
		20-22	55.5	BDT6-7
		23-27	407.9	BDT6-8
CHCl <sub>3</sub> 100%	27-41	28-33	24.2	BDT6-9
		34-40	233.4	BDT6-10
		41-43	879.9	<b>BDT6-11</b>
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 95:5	42-53	44-46	669.7	<b>BDT6-12</b>
		47-57	913.3	<b>BDT6-13</b>
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 8:2	54-62	58	479.7	BDT6-14
MeOH	78-82	59-63	1550.0	<b>BDT6-15</b>
		64-82	8300.0	<b>BDT6-16</b>

Hex= hexano, CHCl<sub>3</sub>= cloroformo, MeOH= metanol

En las fracciones secundarias BDT6-11 a BDT6-13 se encontró presente el triterpeno en forma impura. En las fracciones secundarias más polares BDT6-15 a BDT6-16 se observó la presencia de otros compuestos, mismos que fueron detectados en las fracciones secundarias BDT9-7 a BDT9-15 (Tabla 2). Ambos grupos de fracciones



secundarias se reunieron y 22.6 g de esta mezcla fueron sometidos a un fraccionamiento terciario en CC, para lo cual se emplearon 360 g sílica gel 60 como fase estacionaria y como fase móvil mezcla de disolventes (CHCl<sub>3</sub>, MeOH) con grado creciente de polaridad, en este proceso se obtuvieron 72 fracciones de 500 mL c/u, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico observado en ccf (Tabla 4).

Tabla 4. Fraccionamiento terciario de las fracciones secundarias BDT9-7 a BDT9-15 y BDT6-15 a BDT6-16 que contenían la mezcla de hexapéptidos.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Reuniones	Peso (mg)	Clave
CHCl <sub>3</sub>	1-9	1-2	101.2	FT1
		3-7	348.5	FT2
		8-11	181.6	FT3
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 9:1	10-17	12-13	166.3	FT4
		14-17	223.4	FT5
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 8:2	18-27	18-19	186.9	FT6
		20-26	421.9	FT7
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 7:3	28-35	27-30	1853.9	FT8
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 6:4	36-49	31-39	9497.2	<b>FT9</b>
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 1:1	50-60	40-43	2661.0	<b>FT10</b>
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 3:7	61-64	44-62	5147.2	<b>FT11</b>
MeOH	65-72	63-72	257.2	FT12

CHCl<sub>3</sub>= cloroformo, MeOH= metanol

En las fracciones terciarias FT9 a FT11 se detectó la presencia de dos compuestos mayoritarios al realizar una ccf de FR empleando como sistema de elución H<sub>2</sub>O:MeOH (4:1) y al revelar la cromatoplaque con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. Los R<sub>f</sub> para cada compuesto fueron de 0.9 para el compuesto A (mezcla de hexapéptidos) y 0.2 para el compuesto B (compuesto flavonoide) en el sistema de elución antes descrito.

### Purificación del triterpeno.

En las fracciones BDT6-11 a BDT6-13, obtenidas por fraccionamiento secundario (Tabla 3), se detectó la presencia de la mezcla de triterpenos. Estas fracciones (2.0 g) fueron disueltas en 500 mL de MeOH y se agregó 1 g carbón activado, la solución fue agitada por 10 min y posteriormente filtrada, el disolvente fue evaporado y el residuo obtenido se sometió a una ccf utilizando CHCl<sub>3</sub>:éter etílico (85:15) como sistema de elución para verificar que el compuesto se encontraba puro, el R<sub>f</sub> mostrado por el triterpeno fue de 0.65.

Se realizó un análisis por HPLC, donde se comparó la mezcla de triterpenos obtenidos del fraccionamiento químico con AU comercial (Sigma), los compuestos se solubilizaron en MeOH a una concentración de 1 mg/mL. Las condiciones empleadas en el HPLC se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones analíticas en HPLC para la detección de la mezcla de triterpenos.

	<b>Condiciones analíticas</b>
Fase estacionaria	Columna symmetry C <sub>18</sub> 5µm, 3.9 x 150 mm
Fase móvil	CH <sub>3</sub> CN: MeOH (80:20) (Sistema isocrático)
Flujo (mL/min)	1
Vol. Inyección (µL)	100
Concentración (mg/mL)	1
Tiempo de corrida (min)	12
Longitud de onda (nm)	220

CH<sub>3</sub>CN= acetonitrilo, MeOH= metanol

El AU comercial presentó un tiempo de retención (t<sub>R</sub>) de 7.75 min y la mezcla de triterpenos un t<sub>R</sub> de 7.67 min. Para comprobar si se trataba del mismo compuesto se realizaron estudios de RMN-<sup>1</sup>H y EM-IE.

### **Purificación de los hexapéptidos.**

De la fracción FT11 (Tabla 4) obtenida por fraccionamiento terciario se obtuvieron los dos compuestos mayoritarios mediante ccf de FR (placas preparativas de 20x20 cm), utilizando un sistema de elución H<sub>2</sub>O:MeOH (4:1), los cuales fueron detectados mediante luz UV y revelados con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cada compuesto fue recuperado mediante el raspado de la sílica, la banda de mayor polaridad (Rf= 0.9) correspondió al compuesto A (mezcla de hexapéptidos) y la banda de menor polaridad (Rf= 0.2) correspondió al compuesto B (compuesto flavonoide), fueron desadsorbidos con agua y MeOH, respectivamente. Ambas muestras se mantuvieron en agitación por 30 min, posteriormente la sílica fue filtrada, el proceso de lavado se repitió cuatro veces. El disolvente fue eliminado a presión reducida y al residuo obtenido se le realizó una ccf de FR en el mismo sistema de elución para comprobar la pureza de cada compuesto.

### **Hidrólisis de los hexapéptidos.**

Este procedimiento se realizó empleando el método descrito por Jolad *et al.* (1977) en el que se obtiene alanina (Ala) y *N*-metiltirosina como productos de hidrólisis. Para la realización de la prueba se hicieron modificaciones al método, en el que se pesó 1 g de la fracción FT10 y se agregaron 6 mL de HCl al 1%. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 6 h a 60°C; cada hora se tomó una alícuota y se sometió a una ccf utilizando como sistema de elución ButOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (4:1:1). Como control de la reacción de hidrólisis se utilizó (L)-alanina (Sigma) y como agente revelador ninhidrina.

## **Determinación de Actividad Antioxidante (AAO).**

### **a) Preparación de la muestra.**

De acuerdo al método de Sellappan *et al.* (2002) se pesaron 100 mg de las muestras a evaluar y se disolvieron en 1 mL de MeOH y 4 mL de ácido acético al 4% en acetonitrilo, la mezcla anterior se dejó en agitación por 1 h a 30°C. Transcurrido el tiempo de agitación, la solución se aforó a 10 mL con la misma mezcla y se filtró empleando un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Acrodisc<sup>®</sup>), esta solución fue utilizada para realizar las diferentes técnicas que se describen a continuación.

### **b) Determinación de Polifenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu.**

Es un método espectrofotométrico muy empleado que se basa en la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu (una mezcla de ácidos fosfotungsténico y fosfomolibdico) en medio básico que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos (Kuskoski *et al.*, 2005). Para el desarrollo de la técnica, se tomaron 0.5 mL de la muestra previamente preparada (inciso a) a la cual se agregaron 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 4 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/L), la solución fue agitada en vórtex e incubada por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla de reacción se analizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 765 nm para determinar su absorbancia. Se utilizó como blanco 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mL del reactivo Folin Ciocalteu y 4 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/L). Se empleó ácido ascórbico como control positivo y los datos se reportan como el promedio de tres determinaciones y

se expresan como mg vitamina C por g de muestra, calculados por la siguiente expresión.

$$\frac{(A - b)}{C} = \left[ \frac{mg \text{ vitamina C}}{g \text{ muestra}} \right]$$

A= absorbancia después de agregar la muestra.  
m= pendiente curva patrón de ácido ascórbico.  
b= ordenada al origen curva patrón ácido ascórbico.  
C= Concentración de la muestra (g/L)

### **c) Determinación de AAO por el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).**

Es un método espectrofotométrico descrito por Re *et al.* (Re *et al.*, 1999; Kuskoski *et al.*, 2005) basado en la generación del radical catión ABTS<sup>•+</sup> (cromóforo azul-verde) mediante la oxidación del ABTS con persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), el radical generado se reduce por la presencia de compuestos donadores de hidrógeno como los antioxidantes. Este método es uno de los más empleados para la determinación de la AAO, ya que muestra alta sensibilidad, es rápido y estable (el radical es estable por 2 días a temperatura ambiente). El ABTS (7 mM) se reduce con K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a una concentración final de 2.45 mM, esta solución se deja reposar a temperatura ambiente y en la oscuridad por 16 h antes de su uso. Una vez formado el radical, éste se diluye con EtOH hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.1 a λ 734 nm en el espectrofotómetro.

De esta solución, se toma 1 mL a la que se le agregan 10 µL de la muestra problema (preparada en el inciso a), la solución se agita y se incuba a 30°C en baño María. Se toman las lecturas de las absorbancias de las muestras al minuto y a los siete minutos de incubación, tomando como blanco de reacción EtOH (Kuskoski *et al.*, 2005). En este ensayo se empleó ácido ascórbico como control positivo.

Los resultados se reportan como el promedio de tres determinaciones y se encuentran expresados como actividad antioxidante equivalente a vitamina C (mg vitamina C/g muestra), es decir, AAEVC, calculado por la siguiente fórmula.

$$AAEVC = \frac{\left(\frac{A - b}{m}\right) * PM}{C} = \left[ \frac{mg \text{ vitamina C}}{g \text{ de muestra}} \right]$$

A= absorbancia después de agregar la muestra.  
 m= pendiente curva patrón de ácido ascórbico.  
 b= ordenada al origen curva patrón ácido ascórbico.  
 PM= Peso molecular ácido ascórbico (mg/mL)  
 C= Concentración de la muestra (g/L)

Y en porcentaje de inhibición calculado mediante la siguiente fórmula (Monroy, 2007):

$$\% \text{ de inhibición}_{ABTS} = \left( \frac{A_f - A_o}{A_o} \right) * 100$$

A<sub>o</sub>= absorbancia inicial del radical.  
 A<sub>f</sub>= absorbancia después de adicionar la muestra.

#### **d) Determinación de AAO por el método DMPD (diclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina).**

Método espectrofotométrico propuesto por Fogliano *et al.* (1999) que se basa en la formación del radical DMPD<sup>•+</sup>, a partir de una solución de DMPD (100 mM), de la cual se toma 1 mL y se agregan 100 mL de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.25, posteriormente se agregan 0.2 ml de FeCl<sub>3</sub> (0.05 mM); la mezcla de reacción se agita en vórtex y se analiza en el espectrofotómetro a una λ 506 nm y la absorbancia obtenida debe ser de 0.9 ± 0.1.

Una vez preparado el radical, se toma 1 mL de este y se le agregan 50 μL de la muestra problema (preparada en el inciso a), se agita en vórtex y se incuba 10 min a 25°C, transcurrido el tiempo de incubación la solución es analizada en el espectrofotómetro para la medición de su absorbancia. Se utilizó como blanco buffer de acetatos 0.1 M pH 5.25.

Los resultados se reportan como el promedio de tres determinaciones expresadas como AAEVC utilizando la ecuación descrita en el inciso c, y en porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula (Fogliano *et al.*, 1999):

$$\% \text{ de inhibición}_{\text{DMPD}} = \left(1 - \frac{Af}{Ao}\right) * 100$$

Ao= absorbancia inicial del radical.  
Af= absorbancia después de adicionar la muestra.

### **e) Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).**

Método espectrofotométrico descrito por Kim *et al.* (2002), basado en la medición de absorbancia de una solución del radical DPPH\* (100µM) disuelto en MeOH al 80%, en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  517 nm. Este método junto con el de ABTS son los más utilizados para la determinación de AAO.

Ya preparado el radical se toman 2.9 mL de este y se le agregan 0.1 mL de la muestra a evaluar (inciso a), la mezcla se agita en vórtex y se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad, después de 30 y 60 min de incubación, la muestra se analizó en el espectrofotómetro para determinar su absorbancia. Se utilizó como blanco MeOH al 50%. Los resultados se reportan como el promedio de tres determinaciones y se expresan como AAEVC utilizando la ecuación descrita en el inciso c, y en porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula (Echavarría *et al.*, 2009):

$$\% \text{ de inhibición}_{\text{DPPH}} = \left(1 - \frac{Af}{Ao}\right) * 100$$

Ao= absorbancia inicial del radical.  
Af= absorbancia después de adicionar la muestra.

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana.**

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el método de dilución en caldo basado en la metodología descrita por Martínez *et al.* (2003) y Mann y Markham

(1998) con algunas modificaciones. Para realizar el ensayo, las muestras se pesaron y se disolvieron en DMSO (1.75 mL, 5 % del volumen final), se agregaron 33.25 mL de medio de cultivo. Posteriormente, se tomaron 5 mL de la solución y se agregaron 5 mL de medio de cultivo para obtener concentraciones finales entre 0.1 y 1 mg/mL. Las cepas de microorganismos se mantuvieron en TSB a 38°C durante 48 h, posteriormente se ajustaron al tubo No. 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^9$  UFC/mL). Un mL de esta suspensión se agregó a los tubos con 10 mL de medio de cultivo y con la muestra a evaluar, estos fueron incubados 24 h a 38°C. Transcurrido el tiempo de incubación, a los tubos se les determinó su densidad óptica a 420 nm. Como controles positivos se utilizó gentamicina y estreptomycin (5 µg/mL) y como control negativo medio de cultivo, DMSO y el microorganismo. El blanco fue medio de cultivo sin inocular más la muestra a evaluar disuelta en DMSO.

Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se reportan como la concentración mínima inhibitoria (CMI), a la cual la muestra inhibe por completo el crecimiento de los microorganismos. Para determinar la CMI o porcentaje de los microorganismos muertos en cada concentración se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{ microorganismos muertos} = \frac{A1 - A2}{A1} * 100$$

A1= Absorbancia del control negativo.  
A2= Absorbancia del medio de cultivo inoculado con la muestra.

### **Determinación de la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos.**

Para esta determinación se utilizaron 80 ratones Balb/C de ambos sexos que fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de 10 animales por sexo, siguiendo el método propuesto por la OECD TG407. El grupo I fue el blanco (agua inyectable), el



grupo II control de vehículo (aceite de olivo extravirgen, previamente filtrado con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y EtOH al 10%), el grupo III y IV fueron tratados con el compuesto a dosis de 5 y 10 mg/kg, previamente solubilizado en EtOH al 10% y aceite de olivo extravirgen, la administración se realizó por vía subcutánea diariamente excepto sábados y domingos hasta completar 35 días de administración. Los animales fueron marcados y pesados al inicio del experimento y cada semana, con la finalidad de tener el registro del peso hasta el término del estudio; además se mantuvieron en observación diaria para detectar alguna anomalía sobre su conducta. Los animales de cada grupo se colocaron en cajas independientes de acuerdo a su grupo y sexo, y se mantuvieron durante observación en el Bioterio del CMN S. XXI a 27°C con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, con acceso libre a alimento y agua. El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) revisada en 2001.

Al finalizar el estudio, los animales se sometieron a un ayuno de 12 horas, se pesaron y anestesiaron por vía intramuscular con xilazina y ketamina para tomar una muestra de sangre. Un mL de sangre se colocó en un tubo con heparina para realizar el estudio de biometría hemática y otro mL de sangre se colocó en tubos sin anticoagulante para el estudio de química sanguínea. Después de la toma de muestra sanguínea, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los siguientes órganos: hígado, riñones, intestino delgado, bazo, corazón y pulmón, los cuales fueron pesados.

Los análisis hematológicos se realizaron utilizando un equipo automatizado Coulter T890, en el que se determinaron los siguientes parámetros: ERI= eritrocitos, Hb= hemoglobina, Hto= hematocrito, V.C.M.= volumen corpuscular medio, C.H.C.M.=

concentración de hemoglobina corpuscular media, PLA= plaquetas, LEU= leucocitos, LIN= linfocitos, SEG= segmentados, EOS= eosinófilos, MON= monocitos, BAN= bandas y BAS= basófilos.

El análisis de química sanguínea se realizó utilizando un equipo automatizado Selectra II empleando reactivo Randox determinando los siguientes parámetros: GLU= glucosa, GOT/AST= transaminasa glutámico oxalacética, GPT/ALT= transaminasa glutámico pirúvica, AcU.= ácido úrico, CREAT= creatinina, COL= colesterol total, TRI= triglicéridos y HDL= lipoproteínas de alta densidad.

Los resultados se reportan como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (S.E.M.). Los datos fueron analizados utilizando el programa Sigma Stat 3.5 empleando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con una  $p < 0.05$  para determinar las diferencias significativas entre los grupos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En una evaluación previa se encontró que el extracto metanólico de *B. ternifolia*, se encontró que es inactivo contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium in vitro* (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003). Sin embargo en algunos reportes se describe que esta especie biosintetiza ácidos triterpénicos como el ácido ursólico y/o ácido oleanólico (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005b; Pérez *et al.*, 1998); tomando en cuenta que se ha reportado una importante actividad antimicobacteriana *in vitro* y actividad antituberculosa *in vivo* para estos triterpenos, se decidió realizar el estudio químico del extracto metanólico, con la finalidad de aislar estos triterpenos e identificar otros compuestos presentes en el extracto, así como explorar otras actividades biológicas para el extracto y sus compuestos aislados.

Cabe mencionar que en la literatura científica reciente, existen reportes sobre diversos compuestos aislados de plantas medicinales con importante actividad antimicobacteriana. Se han descrito alcaloides, flavonas, terpenoides y cumarinas entre otros (Okunade *et al.*, 2004) algunos ejemplos de compuestos muy activos se citan a continuación.

La 7-metiljuglona aislada de *Euclea natalensis* mostró una CMI= 0.5 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv y contra cepas farmacorresistentes un rango entre CMI's= 0.32 – 1.25 µg/mL (Lall *et al.*, 2005); de *Camchaya calcarea* se aisló la isogoyasensolida (CMI= 1.5 µg/mL) compuesto con mayor actividad contra el mismo microorganismo (Vongvanich *et al.*, 2006); de *Clavija procera* se obtuvo la aegicerina activo contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI= 3.12 µg/mL) y cepas farmacorresistentes (CMI's= 1.6 - 3.12 µg/mL) (Rojas *et al.*, 2006); de *Sapium haematospermum* se aisló 3β-hidrosolean-12-eno con una CMI= 4 µg/mL

(Woldemichael *et al.*, 2004); de las flores de *Chrysanthemum morifolium* se aislaron 27 triterpenoides, de estos el maniladiol, 3-epilupeol (CMI= 4 µg/mL) y 4,5- $\alpha$ -eoxihelianol (CMI= 6 µg/mL), resultaron ser los más activos (Akihisha *et al.*, 2005).

Recientemente, de *Juniperus communis* se aislaron longifoleno (CMI= 92.4 µg/mL) y totarol (CMI= 21.1 µg/mL) compuestos activos contra *M. tuberculosis* H37Rv (Gordien *et al.*, 2009), también el ácido difractaico (CMI= 15.6 µg/mL) y ácido úsnico (CMI= 62.5 µg/mL) provenientes de *Usnea subcavata* (Honda *et al.*, 2009), eritrofloina C (CMI= 50 µg/mL) y suberosol B (CMI= 28.9 µg/mL) aislados de *Beilschmiedia erythrophloia* resultaron activos (Yang *et al.*, 2009); de *Azorella compacta* se aislaron 13- $\beta$ -hidroxi-azorellano y azorellanona con una CMI= 12.5 µg/mL para *M. tuberculosis* H37Rv y contra cepas farmacorresistentes una CMI= 25 µg/mL, también se aisló azorellanol, y 17-acetoxi-13 $\alpha$ -hidroxi-azorellano con una CMI= 12.5 µg/mL para *M. tuberculosis* H37Rv como contra cepas farmacorresistentes (Molina-Salinas *et al.*, 2010).

De *Lindera akoensis* se aislaron 18 compuestos donde el litseakólido A resultó más activo contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI= 15 µg/mL) (Chang *et al.*, 2008). Los ácidos tiriantínicos I y II aislados de *Ipomoea tyrianthina* mostraron una CMI= 25 µg/mL, así como los tirantinios 8 y 9 (León-Rivera *et al.*, 2008); de *Elateriospermum tapos* se aisló el ácido 2,3-seco-taraxer-14-eno-2,3,28-trioico 2,3 dimetil éster con una CMI= 3.13 µg/mL (Pattamadilok y Suttisri, 2008), y celahina C y salasol A (CMI= 15 µg/mL) aislados de *Microtropis japonica* (Chou *et al.*, 2008) contra *M. tuberculosis* H37Rv.

### **Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *B. ternifolia*.**

Mediante este proceso se obtuvieron 15 grupos de fracciones primarias que se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico mostrado en ccf. En dos de ellas se observó la presencia de los compuestos mayoritarios; en la fracción BDT6 se detectó un triterpeno y en la fracción BDT9 se detectó una mezcla de compuestos polares que al revelar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> desarrollan una mancha azul (Rf= 0.9) y amarilla (Rf = 0.2) (Tabla 1). Cabe mencionar que por antecedentes químicos de la especie (Jolad *et al.*, 1977; Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005b, Pérez *et al.*, 1998) y por la forma de revelar los compuestos en ccf se sospechó de la presencia de triterpenos y de hexapéptidos en estas fracciones.

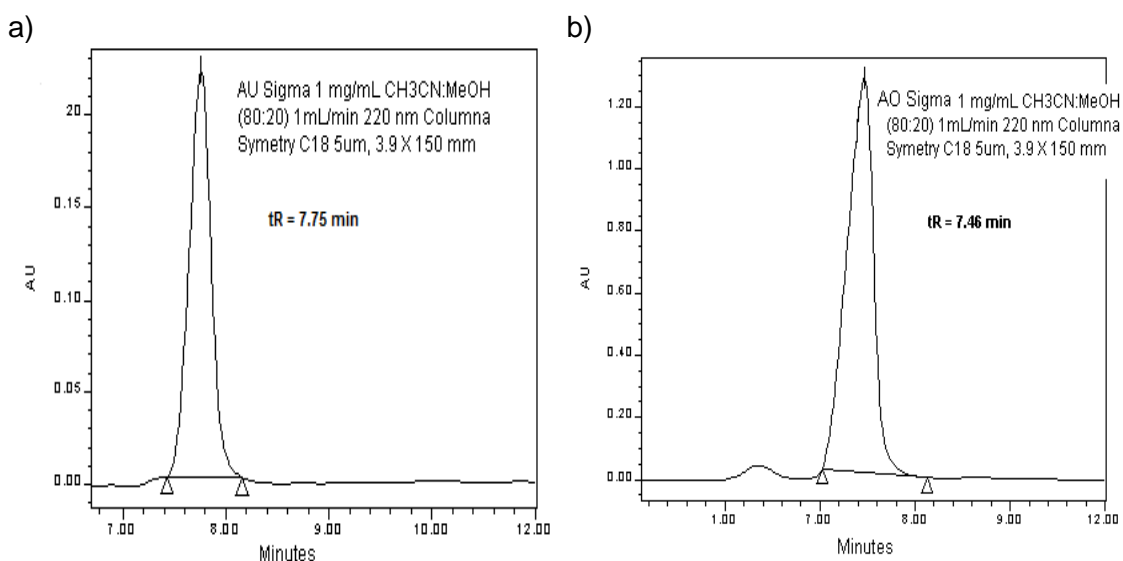
### **Obtención del triterpeno**

La fracción BDT6 que contenía los triterpenos, se sometió a una recromatografía en CC, obteniéndose 16 grupos de fracciones secundarias. En las fracciones de mediana polaridad (BDT6-11 a BDT6-13, 2.46 g) se concentraban los triterpenos y en las fracciones polares (BDT6-15 a BDT6-16, 9.85 g) se observó la mezcla de hexapéptidos (Tabla 3).

Las fracciones secundarias BDT6-11 a BDT6-13 fueron sometidas a lavados sucesivos con MeOH y carbón activado (ver metodología), mediante este procedimiento se lograron obtener 2.0 g de polvo blanco soluble en MeOH, con punto de fusión de 245°C y Rf de 0.65 en ccf utilizando un sistema de elución CHCl<sub>3</sub>:Éter (85:15). El Rf observado fue idéntico al de los estándares comerciales (ácido ursólico y ácido oleanólico, marca Sigma).

Se realizó un análisis por HPLC a la mezcla de triterpenos aislados comparándola con estándares comerciales, observando que los  $t_R$  para el AU sigma y AO sigma son de 7.75 min y 7.46 min respectivamente. Mientras que la mezcla tiene un  $t_R$  de 7.67 min (Fig. 4).

En el cromatograma de la mezcla de triterpenos se aprecia un hombro, lo que indica la presencia de otro compuesto o posible contaminación. Con la finalidad de determinar si el compuesto natural obtenido corresponde a la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico (ya que la presencia de esta mezcla es muy común en las especies vegetales, incluyendo *B. ternifolia*) se decidió analizar por HPLC la mezcla de estos compuestos comerciales obteniendo un  $t_R$  de 7.37 y 7.69 min, valor muy similar al obtenido para el compuesto aislado de *B. ternifolia*.



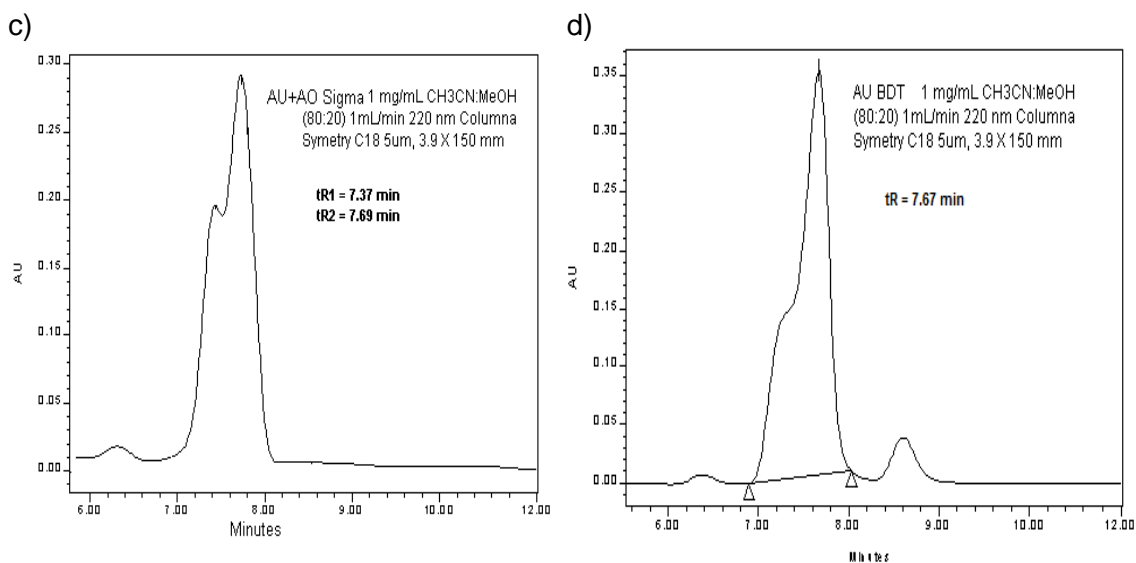


Figura 4. Cromatogramas de HPLC de ácido ursólico comercial (a), ácido oleanólico comercial (b), mezcla de triterpenos comerciales (c) y mezcla de triterpenos aislados de *B. ternifolia* (d).

Cabe mencionar que el cromatograma de la mezcla comercial (c) resultó muy similar al obtenido por la mezcla natural, este análisis nos muestra de forma preliminar que el compuesto obtenido de *B. ternifolia* corresponde a la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico. Con la finalidad de confirmar la estructura de la mezcla de triterpenos se realizó el análisis de sus datos de RMN-<sup>1</sup>H y de EM-IE. En el espectro de masas (Espectro 1) se observa un fragmento de masa carga (m/z) en 456 (10%) que corresponde al peso molecular esperado para el ácido ursólico o ácido oleanólico; además, se observan fragmentos de m/z en 248 (100%) y 203 (50%) idénticos a lo obtenido para la mezcla comercial. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 2) se observa el perfil típico de un triterpeno y fue similar a la mezcla de los estándares AU + AO (Espectro 3).

Esta mezcla de AU y AO obtenida por fraccionamiento químico, ha sido previamente reportada en el extracto hexánico y metanólico de las raíces y en el

extracto clorofórmico del tallo de *B. ternifolia* a los cuales se atribuye el efecto hipoglucémico observado en la especie (Pérez *et al.*, 1998; Andrade-Cetto y Henrich, 2005; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 1998). Cabe mencionar que la cantidad de compuesto obtenido (mezcla de AU/AO, 2 g) es significativo (rendimiento del 4 % respecto a extracto empleado), ya que esta mezcla será empleada en una siguiente etapa que consiste en evaluarlo en el modelo murino de tuberculosis progresiva, induciendo la enfermedad con cepas MFR de *M. tuberculosis* y tratarlos por dos meses con la mezcla obtenida. Cabe aclarar que la mezcla de estos compuestos reduce la carga bacilar y la neumonía en los ratones tratados con TB avanzada, al inducir la enfermedad con la cepa de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv) (Patente/A/2006/080653). Con este resultado podemos concluir que el extracto metanólico de las partes aéreas de *B. ternifolia* constituye una fuente potencial de compuestos antituberculosos.

### **Obtención de los hexapéptidos**

Dado que en la fracción primaria BDT9 (Tabla 1) se detectó la presencia de una mezcla de hexapéptidos y con la finalidad de aislarlos, dicha fracción fue objeto de sucesivas CC. Una primer recromatografía permitió obtener los grupos de fracciones secundarias BDT9-7 a BDT9-15 (Tabla 2) donde se concentraba esta mezcla de interés y en los grupos de fracciones secundarias BDT6-15 a BDT6-16 (Tabla 3) también se detectó la misma mezcla. Un siguiente fraccionamiento en CC de 22.6 g de ambos grupos de fracciones, permitió la obtención de las fracciones terciarias FT9 a FT11 (Tabla 4) que contenían la mezcla de dos compuestos (A y B, mezcla de hexapéptidos y flavonoide, respectivamente). Estos



compuestos fueron detectados al revelar las ccf de FR con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla de hexapéptidos presentó un Rf= 0.9 (compuesto A, ver metodología) y el flavonoide un Rf= 0.2 (compuesto B, ver metodología) empleando como sistema de elución H<sub>2</sub>O:MeOH (4:1) en ccf de FR. Cabe mencionar que estos compuestos también se detectaron en la fracción FT10, por lo que parte de esta muestra se empleó para determinar cantidad de polifenoles, actividad antioxidante, y para la reacción de hidrólisis.

La fracción terciaria FT11 se sometió a una cromatografía preparativa de FR (ver metodología), para la separación y la purificación de los compuestos presentes, aunque el sistema de elución utilizado para la separación resultó aparentemente efectivo en la ccf, en la cromatografía preparativa no lo fue, ya que los compuestos no se obtuvieron en forma pura y hubo pérdida del compuesto durante el proceso. Se obtuvieron 15 mg de la mezcla de hexapéptidos y 2.19 mg del flavonoide.

### **Hidrólisis de los hexapéptidos.**

Debido a que la mezcla de hexapéptidos no pudo obtenerse en forma pura después de los diversos procesos cromatográficos realizados, se procedió a realizar la hidrólisis de la fracción terciaria FT10. Mediante esta reacción se detectó L-alanina a las 2 h de reacción. Este aminoácido presentó un Rf= 0.3 al eluir las ccf con el sistema ButOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (4:1:1) y al revelarlas con ninhidrina (Fig. 5). Al dejar más tiempo la hidrólisis, el aminoácido ya no se detecta por ccf en la mezcla de reacción, esto se corroboró al realizar la hidrólisis de la L-alanina en las mismas condiciones de reacción, en donde se observa que el aminoácido se

detecta a las 2 h de reacción y después ya no es posible detectarlo. Esta prueba nos permitió confirmar la presencia de hexapéptidos; sin embargo, no se pudo determinar con exactitud si en la muestra estaban presentes dos los isómeros mayoritarios que previamente se han reportado en la especie (Jolad *et al.*, 1977, Bates *et al.*, 1983).

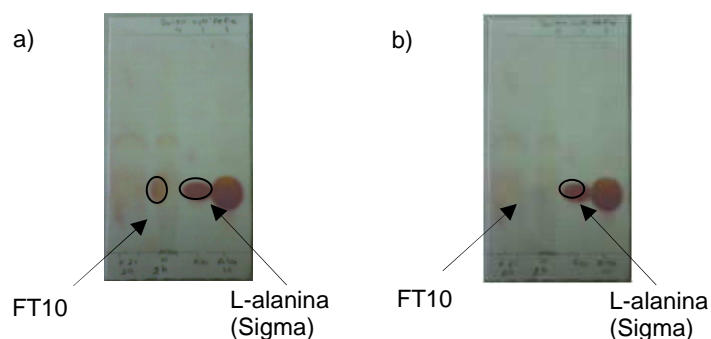


Figura 5. Cromatografía en capa fina de hidrólisis de la fracción FT10, a las 2 h (a) y a las 4 h (b) de reacción.

#### **Determinación de polifenoles totales y de la actividad antioxidante.**

De manera adicional a la obtención del compuesto de interés (los triterpenos); también se exploraron otras actividades biológicas tanto en el extracto, como en las fracciones primarias que contenían los compuestos mayoritarios. En primer término, se determinó el contenido de polifenoles totales (PT) en la fracción FT10 (Tabla 4) y en la mezcla de triterpenos (AU/AO) empleando el método de Folin-Ciocalteu, utilizando como control positivo vitamina C, los resultados se expresan en mg de vitamina C/g de muestra. Se encontró que la concentración de polifenoles para la fracción FT10 fue de  $15.9 \pm 3.2$  mg vitamina C/g de muestra a la concentración de 10 mg/mL y para la mezcla AU/AO fue de  $307.6 \pm 0.4$  mg vitamina C/g muestra a la concentración de 1mg/mL, los valores obtenidos para estas muestras fueron menores al obtenido por la referencia positiva, vitamina C =

998.9 mg/g muestra, a la concentración de 0.422 mg/mL (Tabla 6). Se esperaba que en la fracción FT10 la cantidad de polifenoles fuera mayor, debido a que en ella se detecta la presencia de un flavonoide, resultado que no se obtuvo experimentalmente.

También, se determinó la actividad antioxidante (AAO) de estas muestras, los resultados obtenidos están expresados como actividad antioxidante equivalente a vitamina C (AAEVC), ya que este compuesto se utilizó como referencia a la concentración de 0.422 mg/mL (2.4 mM). La vitamina C está presente en diversos productos de origen vegetal y es uno de los antioxidantes naturales mayormente empleado como control positivo para este ensayo (Kim *et al.*, 2002); además, los resultados también se encuentran reportados como porcentaje de inhibición. En la Tabla 6 se encuentran los valores de la AAO determinados por los métodos de ABTS, DPPH y DMPD. En los tres ensayos, la fracción FT10 evaluada a la concentración de 10 mg/mL, presentó una actividad menor respecto al control positivo. Por el contrario, la mezcla AU/AO evaluada a la concentración de 1 mg/mL presenta mejor AAO que la fracción FT10; sin embargo, es menos activo que el control positivo tomando en cuenta la concentración de vitamina C fue de 0.422 mg/mL. Cabe mencionar que la AAO mostrada por la mezcla de AU/AO es similar a la encontrada para la fresa, mango y manzana (Kuskoski *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2002).

Existen trabajos donde se ha relacionado la cantidad de PT de la muestra y la AAO que presenta, es decir, que a mayor cantidad de polifenoles la AAO es mayor (Kuskoski *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2008; Wang y Lin, 2000), pero también existen trabajos en los que no se encuentra relación alguna (Ruíz *et al.*, 2008;

Emmons y Peterson, 1999), estas diferencias pueden deberse al tipo de muestra que se está analizando, al método de extracción empleado, método utilizado para determinar la AAO, a la estructura química del compuesto y su interacción con los reactivos o también puede deberse a la presencia de otros contaminantes que contrarresten la AAO. En este trabajo se encontró una relación entre PT y AAO; la fracción FT10 mostró poca cantidad de polifenoles y baja AAO y para la mezcla de AU/AO se encontró mayor cantidad de polifenoles y mayor AAO.

Tabla 6. Determinación de PT y AAEVC de la fracción FT10 y mezcla de AU/AO por los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH y DMPD.

Muestra (mg/mL)	PT	ABTS		DPPH		DMPD
		1 min	7 min	30 min	60 min	10 min
FT10 <sup>a</sup> (10)	15.9 ± 3.2	6.7 ± 0.5	8.4 ± 0.6	6.2 ± 0.2	6.2 ± 1.0	8.6 ± 1.5
AU/AO <sup>b</sup> (1)	307.6 ± 0.4	225.4 ± 2.9	233.4 ± 3.1	291.9 ± 0.8	31.4 ± 0.3	168 ± 11.0
Vit C <sup>c</sup> (0.422)	998.9 ± 28.7	999.9 ± 31.1	999.4 ± 32.8	1046.4 ± 8.4	1041.3 ± 8.9	958 ± 4.3

PT (polifenoles totales) y AAEVC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C) expresados en mg vitamina C/g muestra. Valores expresados como promedio ± desviación estándar (D.E.), n= 3. Concentraciones evaluadas: <sup>a</sup>10 mg/mL, <sup>b</sup>1 mg/mL, <sup>c</sup>0.422 mg/mL (2.4mM).

Además se determinó el porcentaje de inhibición de los radicales para cada muestra (Tabla 7). Para la fracción FT10 los valores obtenidos fueron mucho menores al obtenido para la vitamina C. Para la mezcla de AU/AO el porcentaje de inhibición se encuentra en un promedio del 50% por los métodos ABTS y DPPH, y de 30% por el método DMPD, por lo que la mezcla de AU/AO a la concentración de 1 mg/mL presenta una buena AAO, pero esta actividad no fue mayor a la presentada por el control, debido a que una menor concentración de la referencia se logra un porcentaje de inhibición mayor.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la fracción FT10 y mezcla de AU/AO, por los métodos ABTS, DPPH y DMPD.

Muestra (mg/mL)	ABTS		DPPH		DMPD
	1 min	7 min	30 min	60 min	10 min
FT10 <sup>a</sup> (10)	17.7 ± 1.2	21.7 ± 1.3	24.6 ± 0.8	24.1 ± 0.8	17.5 ± 1.9
AU/AO <sup>b</sup> (1)	51.3 ± 0.7	53.4 ± 0.7	48.2 ± 0.1	51.8 ± 0.5	30.0 ± 1.7
Vit C <sup>c</sup> (0.422)	93.3 ± 2.2	94.8 ± 2.3	70.9 ± 0.4	70.3 ± 1.5	67.1 ± 0.2

Valores expresados como promedio ± desviación estándar (D.E.), n= 3  
Concentraciones evaluadas: <sup>a</sup>10 mg/mL, <sup>b</sup>1 mg/mL, <sup>c</sup>0.422 mg/mL (2.4 mM).

En un estudio realizado por Ramachandran y Prasad (2008), reportan que por los métodos de ABTS y DPPH a la concentración de 6.76 y 5.95 µg/mL el AU presenta un porcentaje de inhibición del 50%. También, se ha evaluado la AAO del AU por otros métodos *in vitro* y diferentes controles positivos (trolox, α-tocoferol), aunque con estos métodos no se puede hacer una comparación de la actividad antioxidante obtenida, debido a las pequeñas cantidades y pureza del AU, y por los métodos empleados, los cuales se enfocaban a medir la disminución del anión superóxido, efecto quelante del compuesto, así como la actividad sobre las enzimas oxidativas (GPX, SOD, catalasa) (Yin y Chang, 2007; Tsai y Yin, 2008). También, se tiene que tomar en cuenta que los investigadores utilizaron un producto comercial para realizar sus estudios, mientras que en este trabajo se utilizó la mezcla de AU/AO aislada de *B. ternifolia*.

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana.**

La actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *L. monocytogenes* y *P. fluorescens* se realizó por el método de dilución en caldo. El extracto metanólico y la fracción

primaria BDT1 mostraron moderada actividad (CMI= 0.8 mg/mL) contra las tres bacterias y la fracción BDT10 resultó inactiva (CMI> 1mg/mL) (Tabla 8) ya que a esta concentración sólo se obtuvo un porcentaje de inhibición menor a 50. La fracción primaria BDT4 presentó la mejor actividad antimicrobiana, con una CMI= 0.3 mg/mL (Tabla 8). La mezcla de triterpenos y la fracción BDT3 presentaron una moderada actividad al mostrar una CMI= 1.0 mg/mL.

La actividad antimicrobiana no se ha descrito anteriormente para esta especie, pero dentro de los compuestos presentes en ella se encuentra la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico, los cuales han mostrado una importante actividad antimicrobiana en otros estudios (Fontay *et al.*, 2008; Shai *et al.*, 2008).

En los resultados obtenidos, la mezcla de triterpenos presentó una menor actividad a la esperada, mientras que la fracción BDT4 presentó la mejor actividad. El análisis del espectro de CG-EM y por ccf de la fracción activa (BDT4) mostraron que en esta se encuentra presente el ftalato como compuesto mayoritario y el  $\beta$ -sitosterol como otro constituyente; por lo que el efecto antimicrobiano observado probablemente se deba a la presencia de este contaminante (ftalato).

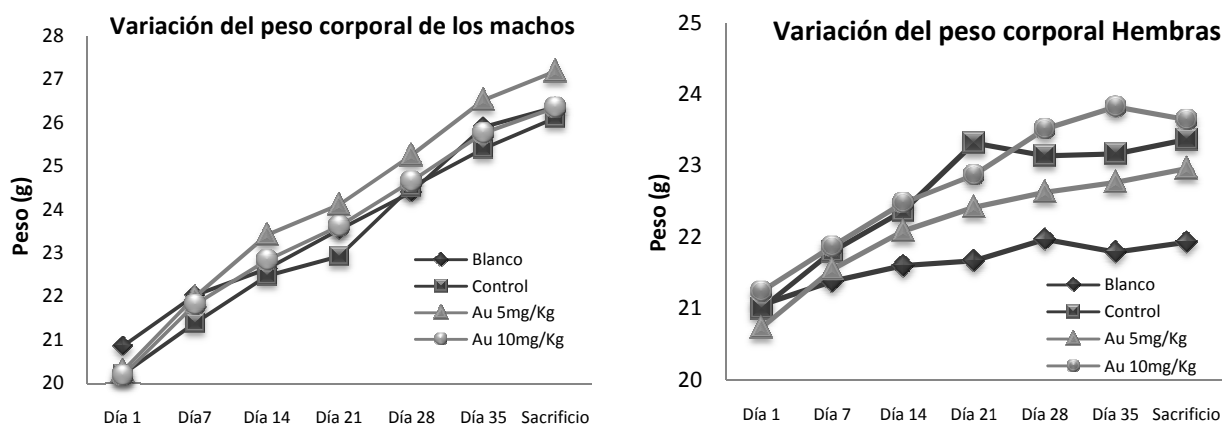
Tabla 8. CMI del extracto metanólico, de algunas fracciones primarias y de la mezcla de AU/AO de *B. ternifolia*.

Cepa	Extracto metanólico	Concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL)				Mezcla AU/AO
		BDT1	BDT3	BDT4	BDT10	
<i>E. coli</i>	0.8	>0.8	1.0	0.3	>1.0	1.0
<i>L. monocytogenes</i>	0.8	0.8	1.0	0.3	>1.0	1.0
<i>P. fluorescens</i>	0.8	0.8	1.0	0.3	>1.0	1.0

Controles positivos: gentamicina y estreptomina (5 µg/mL)

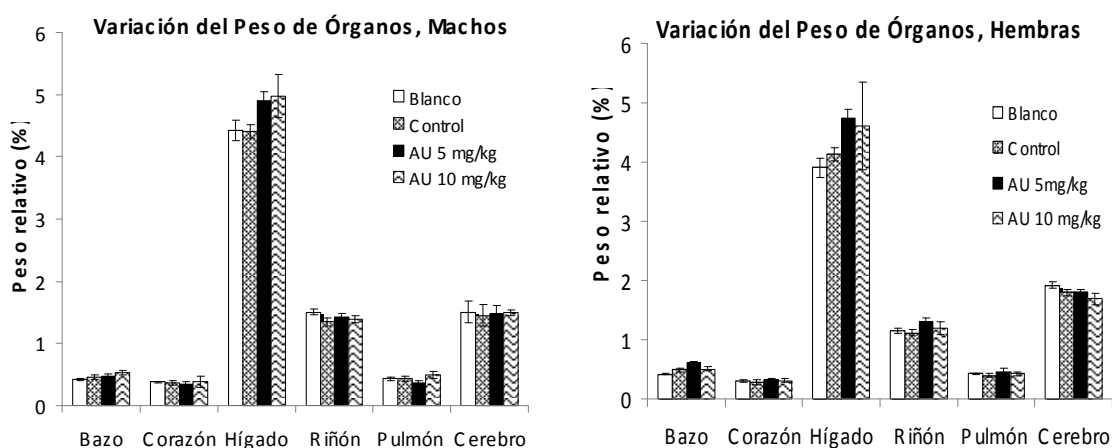
### Determinación de la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos.

El estudio de la toxicidad subaguda se determinó solo para la mezcla de triterpenos, que es la que reporta actividad antimicobacteriana. Al administrar la mezcla de AU/AO por 35 días vía subcutánea en ratones Balb/C de ambos sexos, no se observaron alteraciones macroscópicas en piel, pelo, ojos y mucosas, tampoco se observaron cambios en el comportamiento de los animales, y ningún animal murió durante el estudio. Los animales se pesaron semanalmente hasta finalizar el tratamiento, al realizar el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas entre los pesos de los animales tratados con respecto a los grupos blanco y control (Gráfica 1); además se observa un incremento normal del peso corporal durante el periodo del tratamiento. A pesar de las variaciones observadas en los pesos de las hembras tanto de los grupos control como los tratados respecto al blanco, estas variaciones no resultaron significativas.



Gráfica 1. Incremento del peso semanal de ratones macho y hembra Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.

Al finalizar el estudio, se obtuvieron muestras sanguíneas para realizar los análisis de química sanguínea y biometría hemática, también se extrajeron órganos, los cuales fueron pesados y guardados para estudios histopatológicos posteriores. Al extraer los órganos no se observaron daños macroscópicos en ninguno de ellos y en cuanto al peso tampoco presentaron diferencias significativas al comparar los grupos tratados con AU/AO y los grupos control y blanco (Gráfica 2).

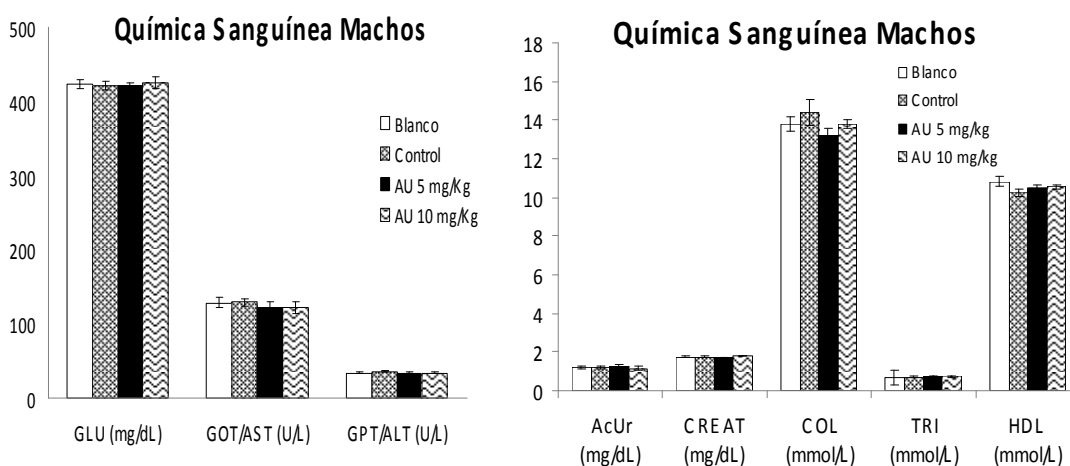


Gráfica 2. Peso relativo de los órganos de ratones macho y hembra Balb/C tratados con la mezcla de AU/AO.

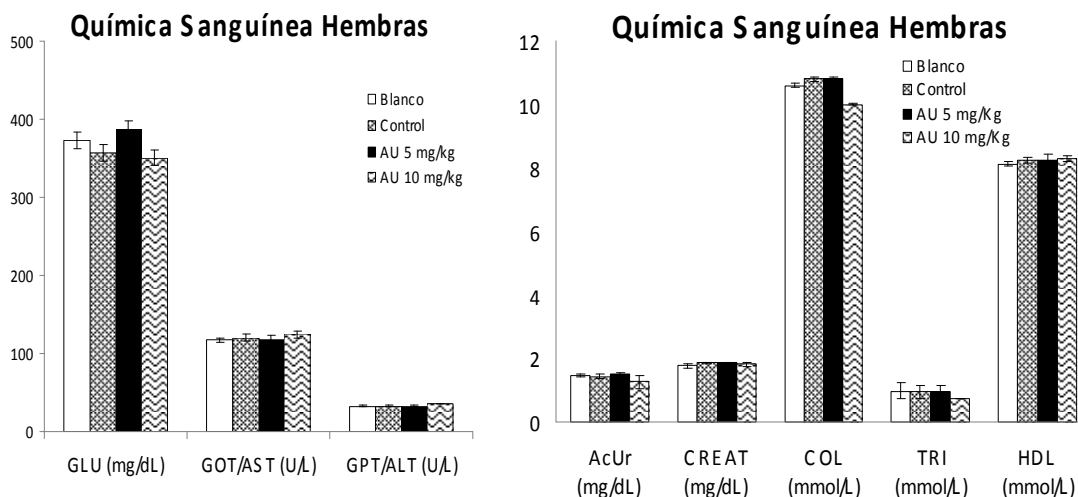
Para determinar si se presentó un daño hepático y/o renal durante el tratamiento con la mezcla de AU/AO, se realizó un análisis de química sanguínea determinando algunos marcadores de metabolismo de carbohidratos, perfil lipídico, función hepática y renal. En las Gráficas 3 y 4, se pueden observar los valores de los diferentes marcadores evaluados, donde se puede observar que no se presentó alteración en los valores de GOT/AST y GPT/ALT en los animales tratados respecto a los grupos blanco y control, pudiendo descartar un daño hepático. En los parámetros de CREAT y AcUr de los grupos tratados tampoco se



observó alteración de sus valores al ser comparados con los grupos blanco y control, es decir, el compuesto no provocó daño renal. En cuanto a los valores de GLU, COL, HDL y TRI, tampoco se observaron cambios significativos entre los grupos tratados respecto a los grupos blanco y control, descartando alteraciones en los metabolismos de carbohidratos y lípidos. Con estos datos se puede concluir que la mezcla de triterpenos no provoca toxicidad al ser administrado por vía subcutánea para ambos sexos, ya que ninguno de los valores se encuentra alterado.



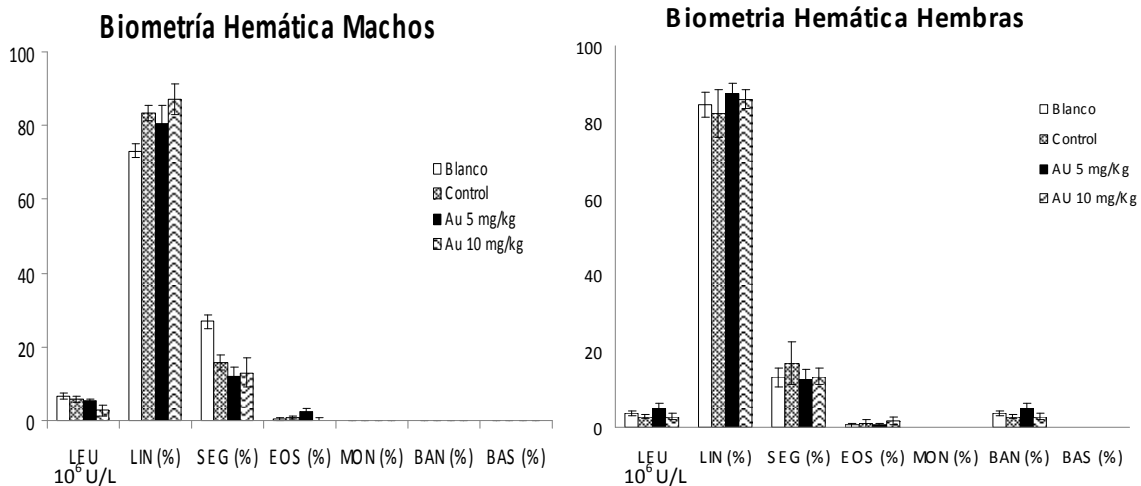
Gráfica 3. Química sanguínea de ratones macho Balb/C tratados con la mezcla AU/AO.



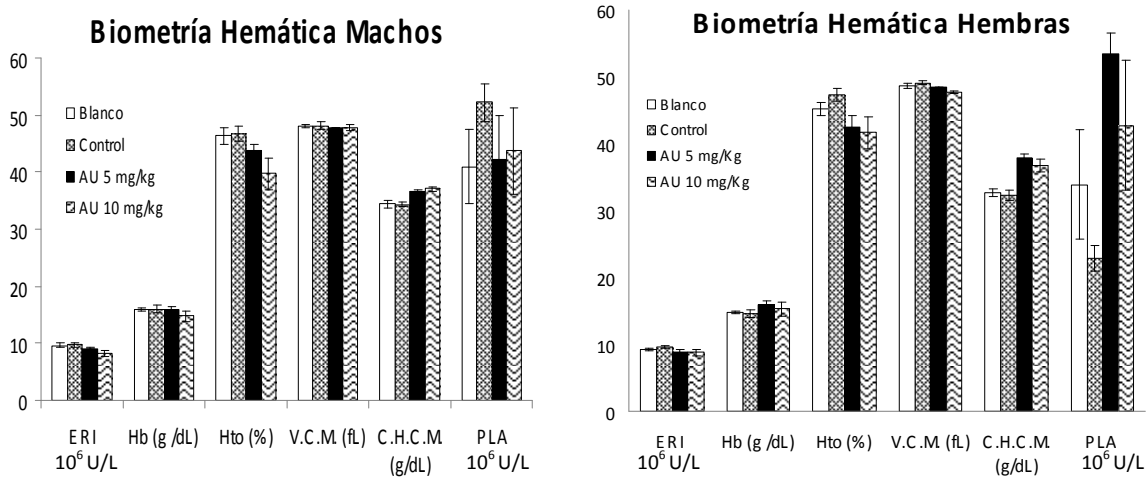
Gráfica 4. Química sanguínea de ratones hembra Balb/C tratados con la mezcla AU/AO.

En cuanto al análisis de biometría hemática se realizó una cuenta diferencial de células blancas (Gráfica 5) y se determinaron valores hematológicos (Gráfica 6), donde no se observaron cambios significativos en los parámetros evaluados de los grupos tratados respecto a los grupos blanco y control, indicando que la mezcla de triterpenos no provoca efecto tóxico al ser administrado por vía subcutánea. En caso de que la mezcla hubiera provocado un proceso inflamatorio o de infección se observarían variaciones en los valores de las células blancas y en caso de que la mezcla provocará la presencia de alguna anemia se presentarían alteraciones en los parámetros de V.C.M y C.H.C.M.

Cabe mencionar que este es el primer trabajo que describe la toxicidad subaguda de la mezcla de triterpenos, a pesar de las diversas actividades biológicas que se describen para estos compuestos.



Gráfica 5. Biometría hemática, cuenta diferencial de células blancas de ratones macho y hembra Balb/C tratados con la mezcla AU/AO.



Gráfica 6. Biometría hemática de ratones macho y hembra Balb/C tratados con la mezcla AU/AO.

## CONCLUSIONES.

- ❖ Se obtuvieron 2.0 g de una mezcla AU/AO, fueron identificados por HPLC y por el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y EM-IE.
- ❖ Se obtuvieron 15 mg de la mezcla de hexapéptidos, su presencia se corroboró por hidrólisis ácida, al detectar L-alanina como producto de reacción.
- ❖ La FT10 no presentó actividad antioxidante, ni presencia de polifenoles. La mezcla de triterpenos presentó mínima actividad antioxidante respecto al control (vitamina C) y tampoco fue significativo el resultado en la prueba de polifenoles.
- ❖ La mezcla de triterpenos mostró una CMI= 1.0 mg/mL contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomas fluorescens* y el extracto mostró una CMI = 0.8 mg/mL.
- ❖ La administración subcutánea de la mezcla de triterpenos por 35 días no provocó alteraciones en el peso de los animales, ni en los pesos de los órganos, tampoco se observó diferencia significativa sobre los parámetros de química sanguínea y biometría hemática.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abe, F; Yamauchi, T; Nagao, T; Kinjo, J; Okabe, H; Higo, H; Akahane, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in Rosemary. *Biol Pharm Bull.* 2002, 25: 1485-1487.
- Aguilar, A; Camacho, J; Chino, S; Jácquez, P; López ME. Plantas medicinales del herbario IMSS: cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. 1ª ed., *Instituto Mexicano del Seguro Social*, México, 1994; p 218.
- Aguilar, A; Camacho, J; Chino, S; Jácquez, P; López-Villa, M.E. Plantas medicinales del Herbario IMSS: su distribución por enfermedades. 1ª ed, *Instituto Mexicano del Seguro Social, Grupo Roche Syntex de México, S.A. de C.V.*, México, 1998; p 94.
- Akashi, T; Furuno, T; Takahashi, T; Ayabe, S. Biosynthesis of triterpenoids in cultures cells, and regenerated and wild plant organs of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry.* 1994, 36: 303-308.
- Akihisha, T; Franzblau, S; Urika, M; Okuda, H; Zhang, F; Yasukawa, K; Suzuki, T; Kimura, Y. Antitubercular activity triterpenoids form *Asteraceae* flowers. *Biol Pharm Bull.* 2005, 28: 158-160.
- Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2005, 99: 325-348.
- Balunas, M.J. y Kinghorn, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 2005, 78: 431-441.
- Banno, N; Akihisa, T; Tokuda, H; Yasukawa, K; Higashihara, H; Ukiya, M; Watanabe, K; Kimura, Y; Hasegawa, J; Nishino, H. Triterpene acid from leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004, 68: 85-90.
- Baricevic, D; Sosa, S; Loggia, R; Tubaro, A; Simonovska, B; Krasna, A; Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 2001, 75: 125-132.
- Bates, R; Cole, J; Hoffmann, J; Kriek, G; Linz, G; Torrance, S. Solution forms of bouvardin and relatives from NMR studies. 6-O-methylbouvardin. *J Am Chem Soc.* 1983, 105: 1343-1347.
- Butler, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* 2004, 67: 2141-2153.

- Cantrell, C; Franzblau, S; Fischer, N. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* 2001, 67: 685-694.
- Cárdenas, C; Quesada, A; Medina, M. Effect of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 320: 402-408.
- Cha, H-J; Bae, S-K; Lee, H-Y; Sato, H; Seiki, M; Park, B; Kim, K-W. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* 1996, 56: 2281-2284.
- Chang, S; Cheng, M; Peng, C; Chang, H; Chen, I. Antimycobacterial butanolides from the root of *Lindera akoensis*. *Chem Biodivers.* 2008, 5: 2690- 2698.
- Chen, I-H, Lu, M-C; Du, Y-C, Yen, M-H; Wu, C-C; Chen, Y-H; Hung, C-S; Chen, S-L, Chang, F-R; Wu, Y-C. Cytotoxic triterpenoids from the stems of *Microtropis japonica*. *J Nat Prod.* 2009, 72: 1231-1236.
- Chou, T; Chen, I; Peng, C; Sung, P, Chen, J. A new dihydroagarofuranoid sesquiterpene and antituberculosis constituents from the root of *Microtropis japonica*. *Chem Biodivers.* 2008, 5: 1412-1418.
- Déciga-Campos, M; Rivero-Cruz, I; Arriaga-Alba, M; Castañeda-Corral, G; Angeles-López, G; Navarrete, A; Mata, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2007, 110: 334-342.
- Echavarría, B; Franco, A; Martínez, A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe colombiano. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 2009, 16: 126-131.
- Emmons, C. y Peterson, D. Antioxidant activity and phenolic contents of oats, groats and hulls. *Cereal Chem.* 1999, 76: 902-906.
- Ferrer-Hernández, A.E; Hernández-Escalona, M; Pérez-Martínez, C; Basterrechea-Rey, M; Fuentes-Fiallo, V; Torres-Ferrer, M. Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *Revista CENIC Ciencias Químicas.* 2007, 38: 243-247.

- Filho, A; Resende, D; Fukui, M; Santos, F; Pauletti, P; Cunha, W; Silva, M; Gregório, L; Bastos, J; Nanayakkara, N. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia*. 2009.
- Finlay, H; Honda, T; Gribble, G; Danielpour, D; Benoit, N; Suh, N; Williams, C; Sporn, M. Novel A-ring cleaved analogs of oleanolic and ursolic acid which affect growth regulation in NRP.152 prostate cells. *Bioorg Med Chem Letters*. 1997, 7: 1769-1772.
- Fogliano, V; Verde, V; Randazzo, G; Ritieni, A. Method of measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem*. 1999, 43: 1035-1040.
- Fontay, S; Grare, M; Mayer, J; Finance, C; Duval, R. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectives indexes. *J Ethnopharmacol*. 2008, 120: 272-276.
- Gordien, A; Gray, A; Franzblau, S; Seide, V. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *J Ethnopharmacol*. 2009, 126: 500-504.
- Gu, J-Q, Wang, Y; Franzblau, S; Montenegro, G; Yang, D; Timmermann, B. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med*. 2004a, 70: 509-514.
- Gu, J-Q, Wang, Y; Franzblau, S; Montenegro, G; Yang, D; Timmermann, B. Constituents of *Quinchamalium majus* with potential antitubercular activity. *Z Naturforsch*. 2004b, 59c: 797-802.
- Higuchi, C; Pavan F; Fujimura, C; Sannomiya, M; Vilegas, W; de Andrade, S; Sacramento, L; Nakamura, D. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. *Quim Nova*. 2008, 31: 1719-1721.
- Hollósy, F; Mészáros, G; Bökönyi, G; Idei, M; Seprödi, A; Szende, B; Kéri, G. Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A431 human tumor cells. *Anticancer Res*. 2000, 20: 4563-4570.
- Honda, N; Pavan, F; Coelho, R; de Andrade Leite, S; Micheletti, A; Lopes, T; Misutsu, A; Beatriz, A; Brum, R; Leite, C. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*. 2009 (en impresión).

- Hsu, L; Kuo, P; Lin, C. Proliferative inhibition cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci.* 2004, 75: 2303-2316.
- Huang, M; Ho, C; Wang, Z; Ferraro, T; Lou, Y; Stauber, K; Ma, W; Georgiadis, C; Laskin, J; Conney, A. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* 1994, 54: 701-708.
- Ikeda, Y; Murakami, A; Nishizawa, T; Ohigashi, H. Ursolic acid enhances cyclooxygenases and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in mouse skin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006, 70: 1033-1037.
- INI (Instituto Nacional Indigenista). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. 1<sup>a</sup> ed. Vol II y III. México, 1994.
- Ismaili, H; Milella, L; Fkih-Tetouani, S; Ildrissi, A; Camporese, A; Sosa, S; Altinier G; Loggia, R; Aquino, R. In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethnopharmacol.* 2004, 91: 31-36.
- Jiménez-Arellanes, A; Meckes, M; Ramírez, R; Torres, J; Luna-Herrera, J. Activity against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res.* 2003, 17: 903-908.
- Jiménez-Ferrer, E; Reynosa-Zapata, I; Pérez-Torres, Y; Tortoriello, J. The secretagogue effect of the poison from *Centuroides limpidus limpidus* on the pancreas of mice and antagonistic action of the *Bouvardia ternifolia*. *Phytomedicine.* 2005a, 12: 65-71.
- Jiménez-Ferrer, E; Pérez-Terán, Y; Román-Ramos, R; Tortoriello, J. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine.* 2005b, 12: 116-122.
- Jolad, S; Hoffmann, J; Torrance, S; Wiedhopf, R; Cole, J; Arora, S; Bates, R; Gargiulo, R; Kriek, G. Bouvardin and deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). *J Am Chem Soc.* 1977, 99: 8040-8044.
- JRC. Methods for the determination of physico-chemical properties, toxicity and ecotoxicity. Part B. Methods for the determination of toxicity. *European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection.* 2004.



- Kim, D; Lee, K; Lee, H; Lee, C. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem.* 2002, 50: 3713-3717.
- Kim, K; Lee, J; Park, H; Kim, J; Kim, C; Shim, I; Kim, N; Han, S; Lim, S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. *Life Sci.* 2004, 74: 2769-2779.
- Kosuge, T; Yokota, M, Sugiyama, K; Mure, T, Yamazawa, H; Yamamoto, T. Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic disease in traditional Chinese medicine. III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem Pharm Bull.* 1985, 33: 5355-5357.
- Kuskoski, E; Asuero, A; Troncoso, A; Mancini-Filho, J; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol Aliment, Campinas.* 2005, 25: 726-732.
- Lall, N; Meyer, J; Wang, Y; Bapela, N; van Rensburg, C; Fourie, B; Franzblau, S. Characterization of intracellular activity of antitubercular constituents from the roots of *Euclea natalensis*. *Pharma Biol.* 2005, 43, 353–357.
- León-Rivera, I; Mirón-López, G; Molina-Salinas, G; Herrera-Ruiz, M; Estrada-Soto, S; Gutiérrez, M; Alonso-Cortes, D; Navarrete-Vázquez, D; Ríos, M; Said-Fernández, S. Tyrianthinic acids from *Ipomoea tyrianthina* and their antimycobacterial activity, cytotoxicity, and effects on the Central Nervous System. *J Nat Prod.* 2008, 71; 1686-1691.
- Li, J; Guo, W-J; Yang, Q-Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol.* 2002, 8: 493-495.
- Liu, J. Oleanic and ursolic acid: Research perspectives. *J Ethnopharmacol.* 2005, 100: 92-94.
- Liu, J. Pharmacology of oleanic and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 1995, 49: 57-68.
- Mann, C.M. y Markham, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol.* 1998, 84: 538-544.
- Martín-Aragón, S; De las Heras, B; Sanchez-Reus, M; Benedi, J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Toxic Pathol.* 2001, 53: 199-206.

- Martínez, J; Sulbarán de Ferrer, B; Ojeda de Rodríguez, G; Ferrer, A; Nava, R. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev Fac Agron (LUZ)*. 2003, 20: 502-512.
- Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. 1ª ed, *Fondo de Cultura Económica*, México, 1979; p 1220.
- Meng, Y-Q; Liu, D; Cai, L-L; Chen, H; Cao, B; Wang, Y-Z. The synthesis of ursolic acid and derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorg Med Chem*. 2009, 17: 848-854.
- Molina-Salinas, G; Bórquez, J; Ardiles, A; Said-Fernández, S; Loyola, L; San-Martín, A; González-Collado, I; Peña-Rodríguez, L. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*. 2010, 81: 50-54.
- Monroy, A. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos polifenólicos de romero y chile ancho y su aplicación en sistema cárnico. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. TESE. 2007
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [www.sagarpa.gob.mc/Dgg/NOM/062zoo.pdf](http://www.sagarpa.gob.mc/Dgg/NOM/062zoo.pdf)
- O'Gorman H. Plantas y flores de México. 1ª ed. *Dirección General de Publicaciones, UNAM*, México, 1963.
- OECD. Manual for investigation of HPV chemicals. Annex 1: OECD Test guidelines for studies included in the SIDS. Toxicity. Repeated dose study (14-28 days). París, 2001.
- Okunade, A; Elvin-Lewis, M; Lewis, W. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. 2004, 65: 1017-1032.
- Padilla, F; Rincón, A; Bou-Rached, L. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Arch Latinoam Nutr*. 2008, 58: 303-308.
- Patente PA/E/2006/080653. Jiménez-Arellanes, A; Meckes-Fischer, M; Luna-Herrera, J; Torres, J; Hernández-Pando, R. Composición farmacéutica que comprende ácido ursólico y ácido oleanólico útil para el tratamiento de la tuberculosis (aceptado 2009)

- Pattamadilok, D. y Suttisri, R. Seco-terpenoids and other constituents from *Elateriospermum tapos*. *J Nat Prod*. 2008, 71: 292–294.
- Pérez, R; Pérez, C; Pérez, S; Zavala, A. Effect of triterpenoids of *Bouvardia ternifolia* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine*. 1998, 5: 475-478.
- Pérez-Gutiérrez, R; Pérez-González, C; Zavala-Sánchez, M; Pérez-Gutiérrez, S. Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia ternifolia*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud Pública de México*. 1998, 40: 354-358.
- Ramachandran, S y Prasad, N. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem Biol Interac*. 2008, 176: 99–107.
- Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice-Evans, E. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999, 26: 1231-1237.
- Ringbom, T; Segura, L; Noreen, Y; Perera, P; Bohlin, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod*. 1998, 61: 1212-1215.
- Rodríguez-Fragoso, L; Reyes-Esparza, J; Burchiel, S; Herrera-Ruíz, D; Torres, E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008, 227: 125-135.
- Rojas, R; Caviedes, L; Aponte, JC; Vaisberg, AJ; Lewis, WH; Lamas, G; Sarasara, C; Gilman, RH; Hammond, GB. Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. *J Nat Prod*. 2006, 69: 845-846.
- Ruiz, N; Rincón, F; Hernández, V; Figueroa, J; Loarca, M. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. *Rev Fitotec Mex*. 2008, 31: 29-34.
- Rzedowski, G.C. de; Rzedowski, J. Flora fanerogámica del valle de México. 2ª ed, *Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad*. Pátzcuaro Michoacán, México, 2001.
- Sellappan, S; Akoh, C; Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem*. 2002, 50: 2432-2438.

- Seo, S; Yoshimura, Y; Uomori, A; Takeda, K; Sero, H; Ebizuka, Y; Sankawa, U. Biosynthesis of triterpenes, ursolic acid, and oleanolic acid in tissue cultures of *Rabdosia japonica* Hara Fed [5-<sup>13</sup>C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] mevalonolactone and [2-<sup>13</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>] acetate. *J Am Chem Soc.* 1988, 110: 1740-1745.
- Shai, L; McGaw, L; Aderogba, M; Mdee, L; Eloff, J. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentate* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol.* 2008, 119: 238-244.
- Shishodia, S; Majumdar, S; Benerjee, S; Aggarwal, B. Ursolic acid inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D. *Cancer Res.* 2003, 63: 4375-4383.
- Slowikowski, D. y Schram, K. Fast atom bombardment mass spectrometry of bouvardin and selected analogs. *Biom Mass Spec.* 1985, 12: 72-78.
- Somova, L; Nadar, A; Rammanan, P; Shode, F. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 2003, 10: 115-121.
- Somova, L; Shode, F; Mipando, M. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine.* 2004, 11: 121-129.
- Tanachatchairatana, T; Bremer, J; Chokchaisiri, R; Suksamrarn, A. Antimycobacterial activity of cinnamante-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem Pharm Bull.* 2008, 56: 194-198.
- Tokuda, H; Ohigashi, H; Koshimizu, K; Ito, Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.* 1986, 33: 279-85.
- Torres-Santos, E; Lopes, D; Rodrigues, R; Carauta, J; Bandeira, C; Kaplan, M; Rossi-Bergmann, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine.* 2004, 11: 114-120.
- Tsai, S y Yin, M. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J Food Sci.* 2008, 73: H174-H178.
- Villarreal, A. Malezas de Buenavista Coahuila. 1<sup>a</sup> ed. *Universidad Autónoma Agraria, "Antonio Narro"*. Coahuila, México, 1983.

- Villaseñor, J.L. y Espinosa, J. Catálogo de malezas de México. *Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica*. México, D.F., 1998.
- Vongvanich ,N; Kittakoop ,P; Charoenchai, P; Intamas, S; Sriklung, K; Thebtaranonth, Y. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. *Planta Med.* 2006, 72: 1427-1430.
- Wächter, G; Valcic, S; Flagg, M; Franzblau, S; Montenegro, G; Suarez, E; Timmermann, B. Antitubercular pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomedicine*. 1999, 6: 341-345.
- Wang, S. y Lin, H-S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem.* 2000, 48: 140-146.
- Woldemichael, G; Gutierrez-Lugo, M.T; Franzblau, S; Wang, Y; Suarez, E; Timmermann, B. *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibition by constituents of *Sapium haematospermum*. *J Nat Prod.* 2004, 67: 598-603.
- Yang, P; Cheng, M; Peng, C; Chen, J; Chen, I. Endiandric Acid Analogues from the Roots of *Beilschmiedia erythrophloia*. *J Nat Prod.* 2009, 72: 53–58.
- Yin, M. y Chan, K. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J Agric Food Chem.* 2007, 55: 7177-7181.
- Zalacaín, M; Zaera, E; Vázquez, D; Jiménez, A. The mode of action of the antitumor drug bouvardin, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells. *FEBS letters.* 1982, 148: 95-97.

[ Mass Spectrum ]

Date : Dr-Jimenez-Adelina-IMSS-046 Date : 09-Sep-120 15:57

Sample: 155 STE-1618 M237 MSBDT Jeo1AX505HA

Note : Javier-Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.40 min

Scan# : (9,13)

Temp : 78.5 deg.C

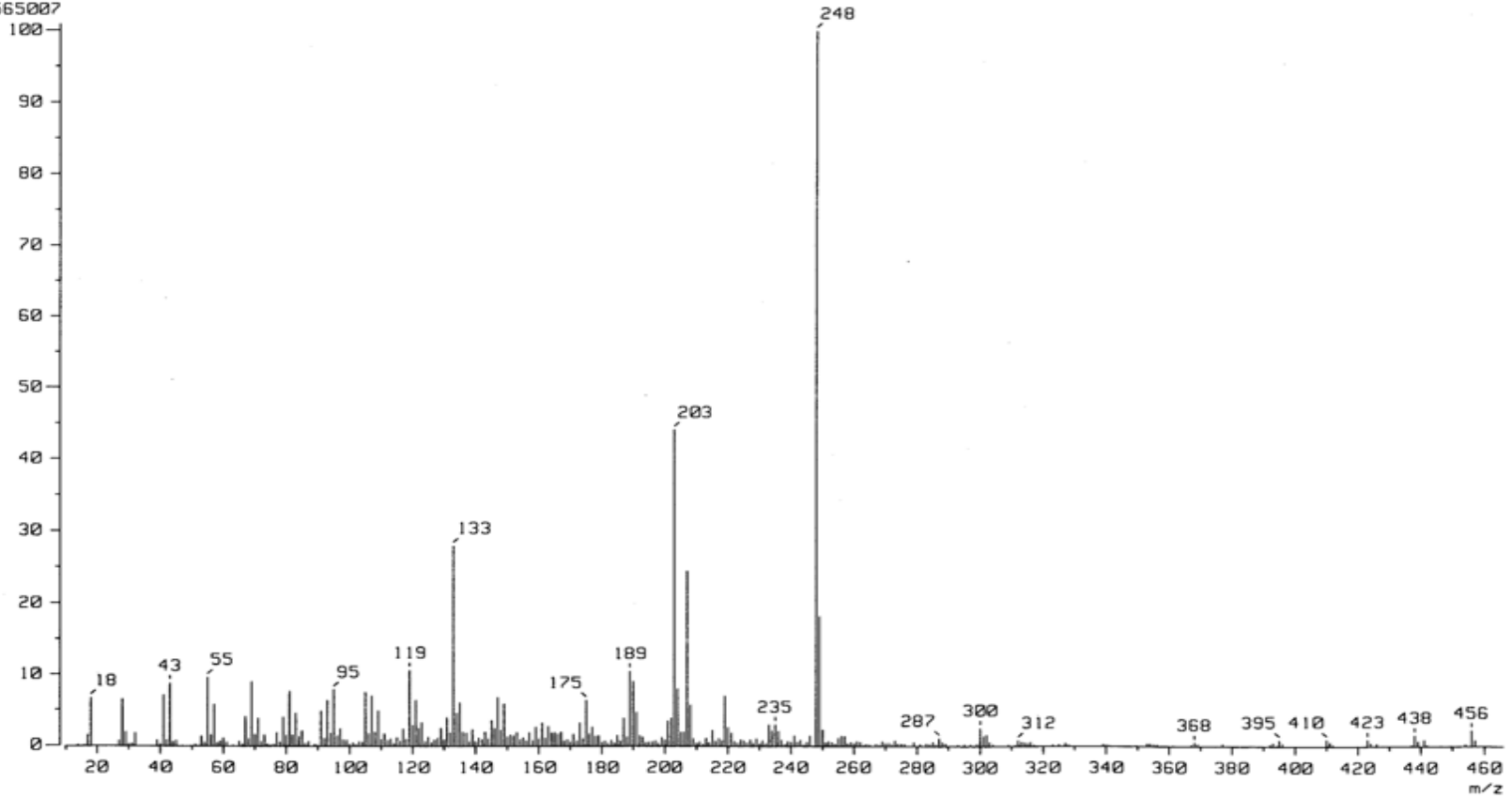
BP : m/z 248.0000

Int. : 1187.99

Output m/z range : 10.0000 to 465.9496

Cut Level : 0.00 %

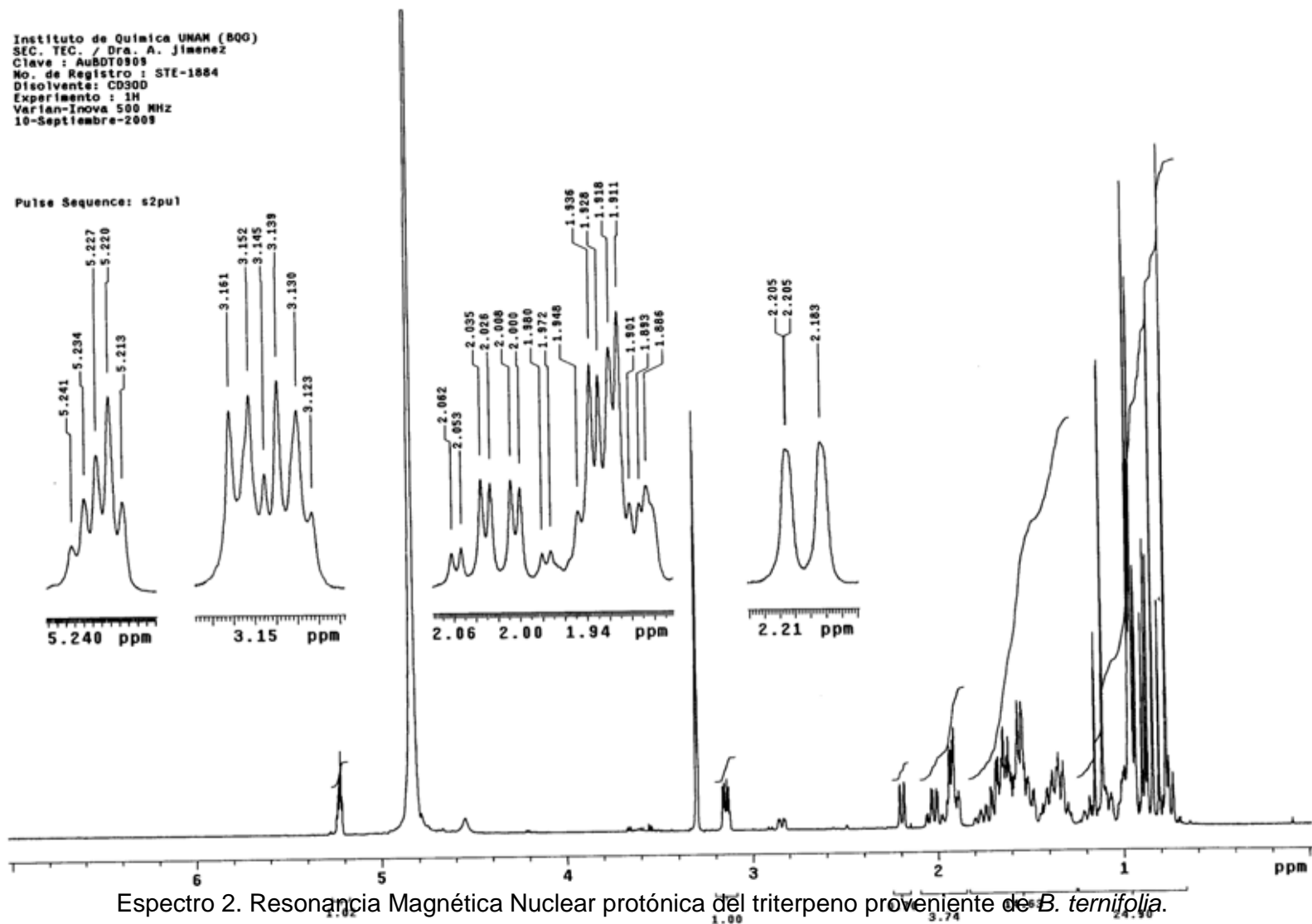
12565007



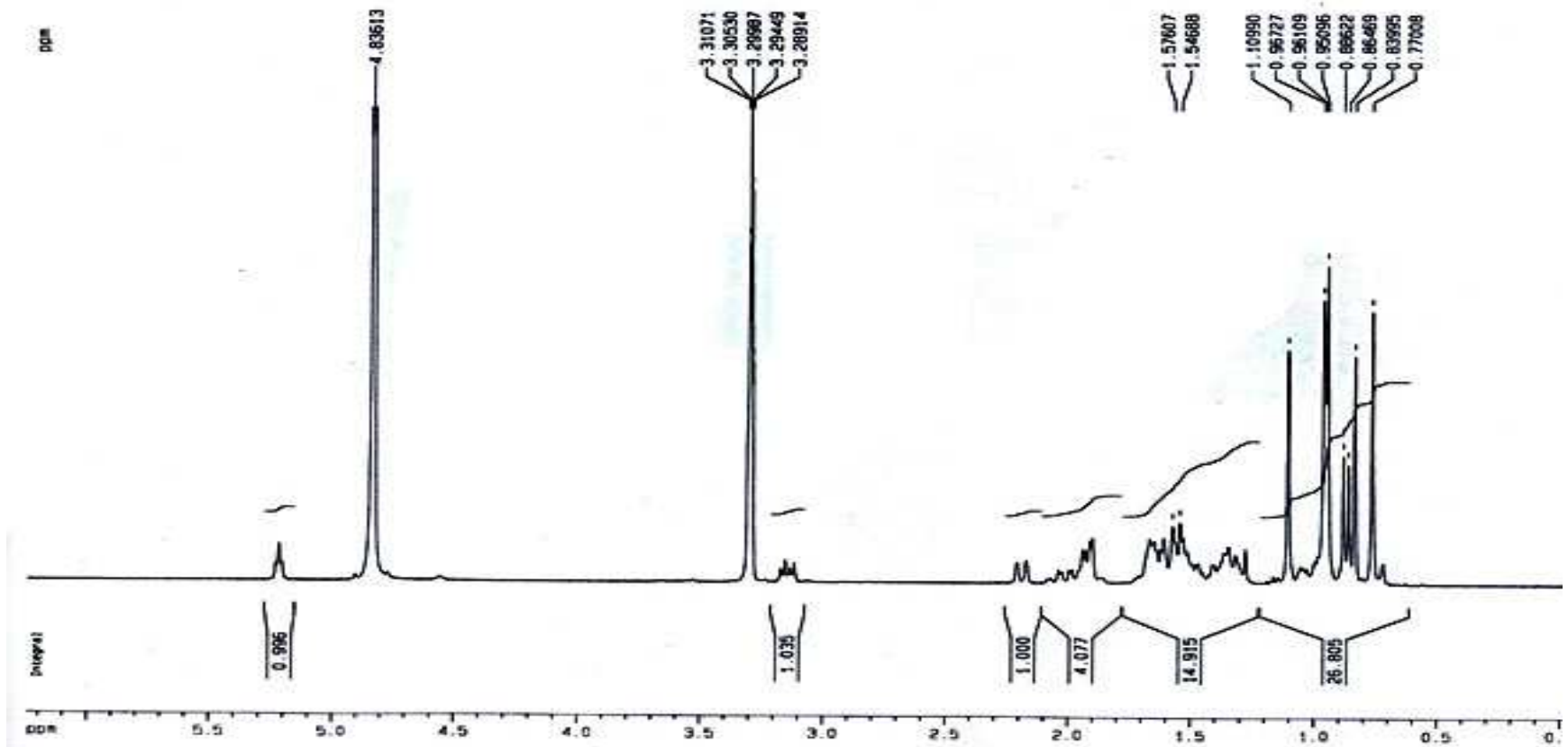
Espectro 1. Espectro de Masas por Impacto Electrónico del triterpeno proveniente de *B. ternifolia*.

Instituto de Química UNAM (800)  
SEC. TEC. / Dra. A. Jiménez  
Clave : AuBDT0909  
No. de Registro : STE-1884  
Disolvente: CD3OD  
Experimento : 1H  
Varian-Inova 500 MHz  
10-Septiembre-2009

Pulse Sequence: s2pu1



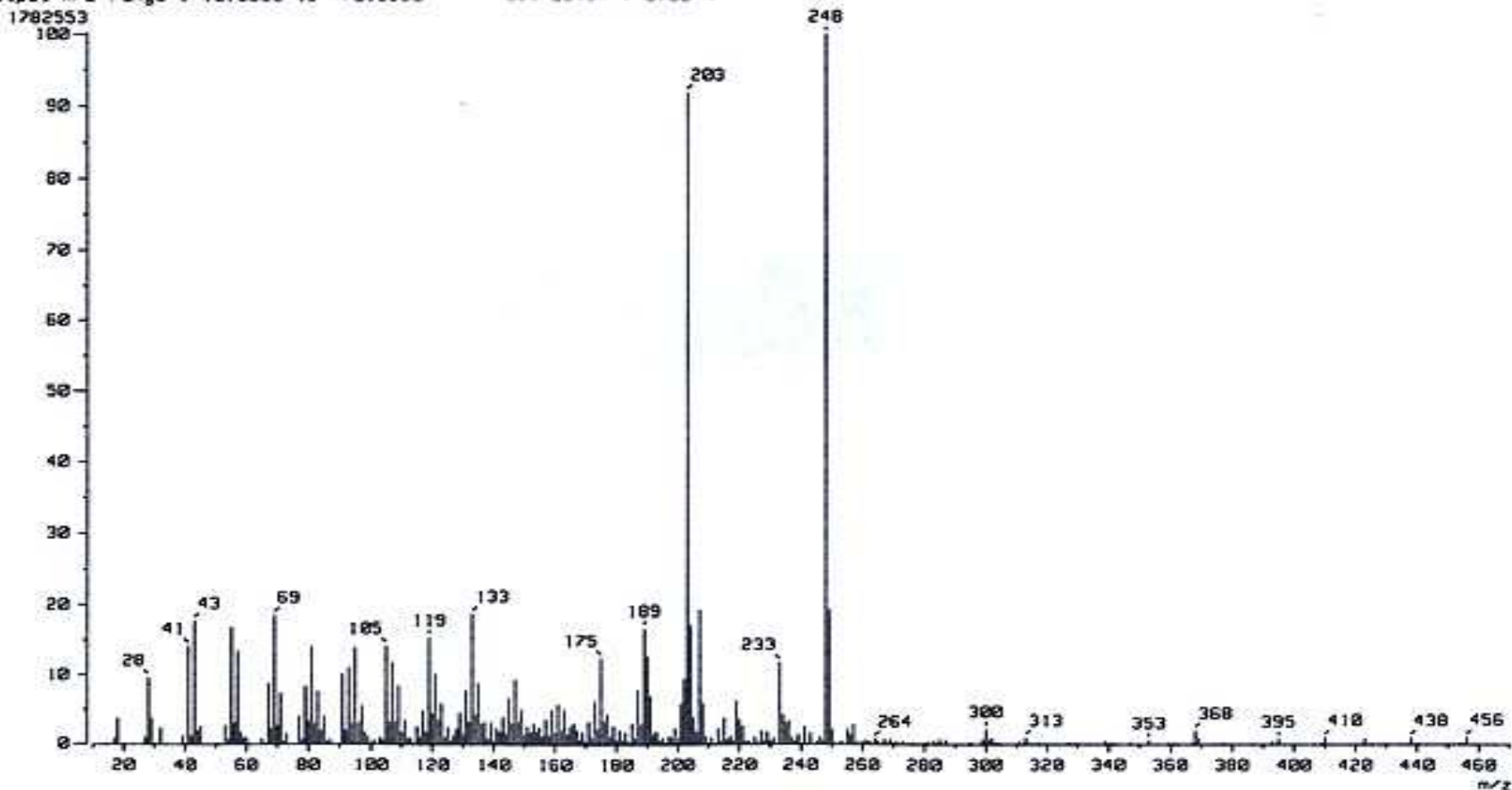
Instituto de Química UNAM N2  
Dra. Adelina Jimenez  
Clave: M1S1  
C0300  
Bruker Avance-300MHz-F  
No. de registro: SIE-1621  
1H A. Sigma  
9-09-08



Espectro 3. Resonancia Magnética Nuclear protónica del ácido ursólico comercial (Sigma).



[ Mass Spectrum ]  
Data : Dr-Jimenez-Adelina-083 Date : 01-Oct-120 12:02  
Sample: 160 STE-1619 M230 M3S Jeol RXS05HR  
Note : Javier-Perez  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)  
RT : 0.44 min Scan# : 15,20 Temp : 272.1 deg.C  
BP : m/z 248.0000 Int. : 169.51  
Output m/z range : 10.0000 to 470.6380 Cut Level : 0.00 %



Espectro 4. Espectro de Masas por Impacto Electrónico del ácido ursólico comercial (Sigma).