



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

"Zaragoza"

**AISLAMIENTO Y EVALUACION FARMACOLOGICA
PRELIMINAR DE ACIDOS TRITERPENICOS DE
SEMILLAS DE Schinus molle (PIRUL)**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

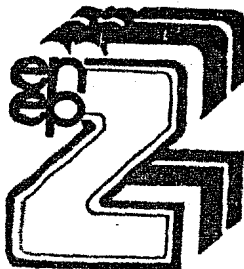
P r e s e n t a n

NORA E. BALLESTEROS UGALDE

PATRICIA ALPIDE NAVA

México, D. F.

1984





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.

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
II.a ANTECEDENTES.....	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
IV. OBJETIVO.....	9
V. HIPOTESIS.....	
VI. MATERIAL Y METODOS.....	10
VI.a MATERIAL Y EQUIPO PARA EL ESTUDIO QUIMICO.....	
VI.b MATERIAL Y EQUIPO PARA EL ESTUDIO FARMACOLOGICO.....	13
VI.c METODOS PARA EL ESTUDIO QUIMICO.....	15
VI.d METODOS PARA EL ESTUDIO FARMACOLOGICO.....	
VII. DESARROLLO DEL TRABAJO.....	18
VII.a DESARROLLO DEL ESTUDIO QUIMICO.....	20
VII.b DESARROLLO DEL ESTUDIO FARMACOLOGICO.....	25
VIII. RESULTADOS.....	31
VIII.a RESULTADOS DE LAS PRUEBAS QUIMICAS.....	
VIII.b RESULTADOS DE LAS PRUEBAS FARMACOLOGICAS.....	33
IX. DISCUSION.....	35
IX.a DISCUSION DE RESULTADOS DEL ESTUDIO QUIMICO.....	
IX.b DISCUSION DE RESULTADOS DEL ESTUDIO FARMACOLOGICO..	39
X. CONCLUSIONES.....	48
XI. APENDICES.....	50
XII. BIBLIOGRAFIA.....	51

I. INTRODUCCION

El colesterol es el más abundante de los esteroides animales, el cual tiene la base estructural del cicloentanoperhidrofenantreno, que es común a todos los grupos esteroides. Es necesario para la formación de membranas celulares, sales biliares y hormonas de tipo esteroidea. Fundamentalmente procede de dos fuentes: Una como parte de la dieta y otra de tipo endógena; ésta última es la principal fuente, donde se sintetiza a partir de la reserva de Acetil-CoA proveniente del metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y grasas; encontrándose normalmente en el plasma del 60-70%, en forma esterificada (1) (2) y (3).

Una elevación suficiente de la concentración de colesterol y de otros lípidos en el organismo puede producir hipercolesterolemia, la cual es un factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis. Esta enfermedad, se caracteriza por lesiones elevadas de color gris perla y comienza en la túnica íntima de las arterias; éstas lesiones contienen depósitos blandos de lípidos, colesterol y principalmente ésteres de colesterol llamados ateromas. La importancia clínica de esta enfermedad se debe a su predilección por las arterias coronarias, cerebrales, renales y periféricas, constituyendo uno de los problemas principales en la medicina contemporánea -- (4) y (5). En estudios realizados por COPLAMAR, se encontró que México es el quinceavo país con una mortalidad elevada debido a ésta enfermedad -- (6).

Los agentes hipocolesterolemiantes usados actualmente para disminuir la -- concentración elevada de colesterol en plasma, son fármacos de origen sintético, que tienen un uso limitado debido a su poca efectividad terapéuti-

ca y reacciones adversas importantes (7) y (8). Por lo que es necesario la búsqueda de compuestos que presentan dicha actividad con un mínimo de efectos indeseables.

Recientemente se han llevado a cabo estudios de compuestos aislados de productos naturales que mostraron actividad hipocolesterolémica (9) y (10).

En el presente estudio se intenta encontrar la relación entre la estructura química y el efecto hipocolesterolémico de compuestos triterpénicos que se encuentran en las semillas del Schinus molle.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

El colesterol ha sido considerado uno de los factores importantes en el desarrollo de la aterosclerosis y sus diferentes complicaciones clínicas, como angina de pecho, arritmias, infecciones cardiacas y oclusión arterial periférica, donde el desarrollo de la enfermedad coronaria está directamente relacionada con la concentración sanguínea del colesterol (7).

Los fármacos usados para disminuir la concentración de colesterol en sangre lo hacen en forma ligera y temporal, estos fármacos poseen efectos adversos, que deben considerarse; lo que limita su uso clínico (8).

En la actualidad el desarrollo de los agentes hipocolesterolemiantes, ha consistido, en modificar la estructura de los ya existentes, de lo que se ha obtenido pocos avances con respecto a su efectividad farmacológica (7) y (8).

En los últimos años, se ha iniciado en nuestro país la búsqueda de agentes hipocolesterolemiantes de origen natural.

Dentro de estos se pueden citar el estudio del árbol del Yumel (Gutteria gaueri), del que se ha aislado y comprobado el efecto hipocolesterolemiantes de la Asarona (1, 2, 4-trimetoxi-5-(1-propenil)benceno) (9) y (11), y el estudio de la corteza del cuachalalate (Juliana adstringens), del cual se aislaron los ácidos 3 α -hidroximasticadiénónico y el masticadiénónico, mostrando éste último un efecto hipocolesterolemiantes (10). Este mismo ácido se encuentra en las semillas del Schinus molle, junto con otros ácidos triterpénicos (12), (13) y (14), por lo que la evaluación farmacológica de estos ácidos resulta de muchos interés.

IIa. ANTECEDENTES

Son pocos los estudios que se tienen de las propiedades terapéuticas del árbol de Schinus molle (pirul), del que se conoce su clasificación botánica y algunos estudios sobre sus componentes químicos.

El árbol del pirul, es una planta originaria del Perú, cuya aclimatación en México data de unos 370 años, siendo clasificado en 1735 por el naturalista Lineo entre la especie Schinus de la familia de las Anacardiaceas, del género de las Anacardieas, clase dicotiledonea, tipo Angiospermas (15). Árbol siempre verde de tronco tortuoso, que mide de 4-8 mts. de altura, con ramas colgantes y flores paniculadas pequeñas, el fruto es globoso de color rojo con una sola semilla, encontrándose en racimos colgantes. Florece de Marzo a Mayo (16) y (17). Su área de vegetación es abundante en el Valle de México (15). Según los lugares de la República en que crece, se le conoce por: "árbol del Perú", "Pirú", "Pirul" y "Copalaxtle", del mexicano "copalachtle" -- compuesto de dos palabras "copalli", resina, lágrima o zumo y "achtli", semilla o pepita y Schinus molle del griego Schinus, nombre del Lentisco es decir, planta parecida al Lentisco (18).

El libro "Historia de las plantas de la Nueva España" (19) menciona que en Paraguay el árbol del pirul, tiene propiedades terapéuticas.

En México se tienen referencias, que éste árbol es considerado como una planta medicinal. Donde las hojas del pirul se utilizan contra la estrechez y la uretritis de origen blenorragico, en forma de infusión. Hacen también un cocimiento con los frutos hasta la consistencia de jarabe, administrándose una cucharada 3 o 4 veces al día para curar la retención de orina. La emul-

si3n de la goma se emplea para curar enfermedades de los ojos, como cataratas y manchas de la c3rnea; en trastornos respiratorios y la resina masticada, -- ayuda a fortalecer las enc3as (18), (20) y (21).

Maximino M. (16) y (20), cita en su libro la clasificaci3n bot3nica del arbol del pirul, partes usadas, lugares de vegetaci3n y composici3n qu3mica.

En una t3sis realizada en 1926 en la Facultad de Qu3mica (22), se llev3 a cabo un estudio qu3mico de las semillas y corteza del 3rbol del pirul, determinando un an3lisis cualitativo de los productos que pueden obtenerse de los -- frutos de la planta como son: glucosa, alcohol, una resina 3cre y amarga, - - aceite esencial, poca cantidad de t3ninos, un 3cido mineral y sustancias minerales.

Dom3nguez K. A., realiz3 el aislamiento e identificaci3n del Acido Lignos3 -- rico y otros compuestos como el B-sisterol de las hojas del 3rbol del pirul - (23).

En 1976, Pozzo-Balbi (12), realiz3 un estudio qu3mico de las semillas del - - Schinus molle, aislando e identificando dos estructuras, una corresponde al -- metil 3ster del 3cido masticadienonico y la otra al metil 3ster del 3cido -- masticadienonico, pertenecientes a los 3cidos triterp3nicos (24), (25) y - (26).

En 1978, Pozzo-Balbi y colaboradores (13) reportaron nuevas estructuras co -- rrespondientes a los 3cidos triterp3nicos encontrados en las semillas del --- Schinus molle, aparte de los ya mencionados anteriormente, 3stas fueron identificadas por sus propiedades f3sicas y m3todos espectrom3tricos de ultravioleta, infrarrojo y resonancia magn3tica prot3nica ¹H.

Por otra parte, los fármacos empleados inicialmente en el tratamiento de la aterosclerosis fueron las vitaminas y antibióticos, los cuales presentan un efecto mínimo en pacientes hipercolesterolémicos; otros fármacos empleados son hormonas de tipo estrogénico y progestacional (8), (27) y (28), - - como acetato de nortindrona y oxaladrona, que disminuyen los niveles de triglicéridos de baja densidad; su uso se vió limitado por efectos indeseables entre los que se encuentra el efecto feminizante (29).

Posteriormente, se emplearon otros compuestos que disminuyen los niveles de lípidos por inhibición de la absorción de los ácidos biliares y/o colesterol, como es, la terapia con medicamentos antihiperlipidémicos del tipo de resinas de intercambio iónico, como la colestiramina, acolestipol y poli- - doxina. Estas resinas, reducen los niveles de colesterol en plasma por - - adhesión a los ácidos biliares en el intestino delgado, resultando la interrupción de la circulación enterohepática normal de los ácidos biliares y - - aumentado su excreción fecal, por esto la conversión de colesterol a ácidos biliares es aumentado y los niveles de colesterol disminuyen.

Uno de los medicamentos que se emplean con mayor frecuencia es el clorfibrato que se considera agente hipotrigliceridémico, ya que su primer efecto es causar la inhibición completa de la síntesis de triglicéridos hepáticos. - - permitiendo la reducción de triglicéridos exteriores. También son utilizados análogos y derivados del clorfibrato, existiendo además, agentes estructuralmente diferentes a éste, los cuales tienen un mecanismo de acción similar al clorfibrato, como son el ácido tibrico, tiadenol y gemcadiol.

Todos estos compuestos cuando son administrados por periodos largos producen hepatomegalia (8).

Recientemente, se han efectuado estudios de compuestos de origen natural que tienen una actividad hipocolesterolemia, como son la Asarona, aislada del árbol del Yumel (Gautteria gauneri) y el ácido masticadienónico aislado de la corteza del cuachalalate (Juliana adstringens). Existe también un estudio comparativo de los siguientes triterpenoides: Glicirinato de sodio, glicirram, ácido úrsólico y acetato de ácido úrsólico, que tienen actividad - - hipolipidémica y antiateroesclerótica en conejos y ratas (30).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al uso limitado de fármacos utilizados como agentes hipocolesterolemiantes y por la importancia que tienen actualmente las enfermedades relacionadas con la aterosclerosis, se han efectuado estudios sobre compuestos obtenidos de productos naturales que mostraron un efecto farmacológico. El presente estudio consiste en probar si los ácidos triterpénicos aislados -- del Schinus molle tienen un efecto biológico al ser comparados estructural y farmacológicamente con el ácido masticadienónico (figura 1), el cual presenta un efecto hipocolesterolemiante (10).

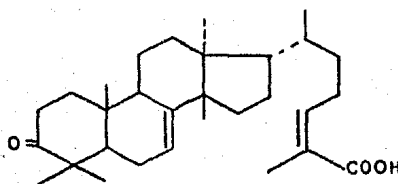


Fig. 1. Acido masticadienónico, compuesto perteneciente a los ácidos triterpénicos, aislado de la corteza del cuachalalate (Julia na adstringens).

IV. OBJETIVO

- Realizar el aislamiento e identificación de los ácidos triterpénicos de las semillas de Schinus molle por métodos espectrométricos.
- Evaluar la acción farmacológica de los ácidos aislados como agentes hipocolesteremiantes, mediante la cuantificación de los niveles de colesterol sérico en ratas.

V. HIPOTESIS

Se espera que debido a la relación estructural tan estrecha que existe entre los ácidos triterpénicos, contenidos en las semillas de Schinus molle (pirul) y el ácido masticadienónico, al cual se le ha encontrado efecto hipocolesterolemiantes, alguno de ellos presenten el mismo efecto farmacológico.

VI. MATERIAL Y METODOS

VI.a Material y equipo para el estudio químico.

M A T E R I A L	M A R C A
1. Placas para cromatografía en capa fina de 3X8 cm.	
2. Columnas de vidrio para cromatografía de 2 tamaños diferentes, en diámetro por longitud (5X83 cm y 3X40cm.)	
3. Vasos de precipitado de 1,000, 250, 100, 50 y 10 ml. de capacidad.	
4. Matraces de bola de tres bocas esmeriladas de - - 5,000 y 1,000 ml. de capacidad, de vidrio.	Pyrex
5. Matraces de bola de boca esmerilada de 500, 250, - 125 ml. de capacidad, de vidrio.	Pyrex
6. Matraces erlenmeyer de 1,000, 250, 125, 50 y 25 -- ml. de capacidad.	Pyrex y Kimax
7. Matraces kitazato de 1,000, 250 y 25 ml. de capacidad.	Pyrex y Kimax
8. Embudos de extracción de 250, 125 y 60 ml. de capacidad.	Pyrex
9. Espatulas de diferentes tamaños.	
10. Probetas de 500, 100, 50 y 10 ml. de capacidad.	
11. Barras magnéticas para agitación, de diferentes tamaños.	
12. Embudos buchner de diferentes tamaños.	

M A T E R I A L

M A R C A

13. Embudos de filtración de tallo corto.
14. Frascos ámbar de vidrio con tapón de rosca de plástico de 3 ml. de capacidad.
15. Soportes universal.
16. Refrigerantes de diferentes tamaños.
17. Pinzas de tres dedos con nuez.
18. Trampas para vacío.
19. Canastillas de calentamiento.
20. Anillos de diferentes diámetros.
21. Vidrios de reloj.
22. Capilares para punto de fusión.
23. Papel filtro.

E Q U I P O

1. Evaporador rotatorio BUCHI
ROTAVAPOR-R, BRIN-
KMAN.
2. Parrilla de calentamiento.
THERMOLYNE 7,200.
3. Bombas para vacío.

EQUIPO

MARCA

- | | |
|--|---------------------------------|
| 4. Lámpara de luz ultravioleta. | |
| 5. Balanza analítica. | SARTORIUS 2462 |
| 6. Balanza granataria | METTLER PB 300. |
| 7. Aparato para determinar punto de fusión | BUCHI SMP-20 Y
FISHER-JOHNS. |
| 8. Molino de compresión y fricción. | |
| 9. Estufa de secado con aire caliente. | |
| 10. Estufa de secado con vacío. | |
| 11. Espectrómetro de infrarrojo. | PYE UNICAM |
| 12. Espectrómetro de ultravioleta | PYE UNICAM |
| 13. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear. | EM-360 |
| 14. Potenciómetro. | |

REACTIVOS

- | | |
|--|-------|
| 1. 2 kg. de gel de sílice de 70-230 mallas (tamaño de partícula 0.063-0.20 mm), para cromatografía en columna. | MERCK |
| 2. 500 g. de gel de sílice para cromatografía en - capa fina F ₂₅₄ . | MERCK |

R E A C T I V O S

M A R C A

3. Disolventes orgánicos: heptano, hexano, benceno, cloroformo, acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, éter etílico, éter de petróleo.

BEACKER

4. Carbonato de sodio, hidróxido de potasio, cloruro de sodio, sulfato de calcio anhidro.

5. N-nitroso-N-metil urea

MERCK

6. Acido clorhídrico.

7. Hielo y hielo seco.

VI.b Material y equipo para el estudio farmacológico.

M A T E R I A L

M A R C A

1. Tubos de ensayo de 10 X 75 mm.

Pyrex y Kimax.

2. Pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml.

3. Pipetas volumétricas de 25, 20, 15, 10, 5, 2 y 1 - ml.

4. Micropipetas de 200 y 100 μ l.

5. Gradillas.

6. Matraces volumétricos de 100, 50, 25 y 10 ml. de - capacidad.

EQUIPO

MARCA

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1. Espectrómetro para visible. | PYE UNICAM SP6-500. |
| 2. Centrifuga. | |
| 3. Tabla de disección. | |
| 4. Balanza granataria | METTLER |
| 5. Pinzas para marcar ratas. | |

REACTIVOS

- | | |
|------------------------------------|---------|
| 1. Valerato de estradiol | Syntex |
| 2. Solución estándar de colesterol | |
| 3. Acido sulfúrico. | Beacker |
| 4. Acido acético glacial | Beacker |
| 5. Acido acético | Beacker |
| 6. Anhídrido acético | Beacker |
| 7. Acido para-toIuensulfónico | Merck |

MATERIAL BIOLÓGICO

- 3 kg. de semilla de pirul (S. molle)
- Ratas macho Winstar (cepa C₂ZV) con peso de 210 a 300 g.

VI.c Métodos para el estudio químico.

1. **Recolección:** La recolección de las semillas del árbol de pirul se efectúa en el mes de Enero, este árbol se encuentra en los alrededores de la E.N. E.P. Zaragoza, Campus 2.
2. **Separación:** El método que se utiliza para el estudio químico de las semillas secas y molidas del pirul es la Extracción, ésta se efectúa con dos disolventes poco polares, hexano y heptano, metilando el extracto de hexano y separando ambos por cromatografía en columna, utilizando como soporte gel de sílice (31) y (32), y como eluyentes varios disolventes de menor a mayor polaridad y mezclas de ellos. Se realiza cromatografía en capa fina de sílica gel de las fracciones obtenidas, juntando aquellas que presenten el mismo Rf.
3. **Purificación:** En la purificación de los compuestos aislados se usa la cristalización.
4. **Identificación:** Para la identificación de los productos que se obtengan se utilizan los siguientes métodos (33), (34), (35), (36) y (37):
 - a) determinación de punto de fusión.
 - b) espectrometría de ultravioleta.
 - c) espectrometría de infrarrojo.
 - d) espectrometría de resonancia magnética nuclear ^1H .

VI.d Métodos para el estudio farmacológico.

La acción hipocolesterolemica de las sustancias extraídas de las semillas de pirul, se evalúa de la siguiente manera:

1. Determinación de la dosis.

Se toma como referencia un fármaco de acción hipocolesterolémica conocida. Para determinar la dosis a usar de las sustancias extraídas e identificadas del pirul, se hace una relación equimolar con dicho fármaco, utilizando el valerato de estradiol a una dosis de 13 mg/kg.

2. Formación de lotes de animales.

Los animales de experimentación que se utilizan son ratas normales Wistar macho (cepa C₂ZV) con un peso de 210 a 300 g. En el estudio farmacológico se usan 8 lotes de ratas en grupos de 6 animales cada uno. Un lote se utiliza como testigo positivo (tratado con valerato de estradiol), otro lote como blanco, al cual solo se le administra el vehículo empleado; un lote de referencia, al cual no se le administra ninguna sustancia y los demás lotes se tratan con las sustancias aisladas de las semillas del pirul.

Las sustancias se administran en una sola dosis por vía subcutánea. A las 24 horas se toman muestras de sangre, para la cuantificación del colesterol total.

3. Toma de muestras.

A las ratas anestesiadas, se les hace una incisión en la axila derecha - utilizando un bisturí, recogiendo las muestras de sangre en tubos de ensayo, la cual se centrifuga por 10 min. a 3,000 rpm. obteniendo el suero para determinar el colesterol.

4. Determinación de colesterol total sérico.

El colesterol se determina mediante el método descrito por Pearson y colaboradores (38), en donde el ácido para-toluensulfónico en ácido acético -- reacciona con el colesterol para formar un complejo que con anidrido acético y ácido sulfúrico concentrado da una coloración verde, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de colesterol presente.

VII. DESARROLLO DEL TRABAJO

Este trabajo se efectuó en dos partes:

La primera consistió en la extracción y aislamiento de los ácidos triterpénicos de las semillas de pirul.

La segunda parte consistió en el estudio farmacológico de los compuestos (ácidos triterpénicos) mediante el método de Pearson y colaboradores.

En el diagrama A se resume el desarrollo de estas dos partes.

DIAGRAMA "A"

DESARROLLO QUIMICO

RECOLECCION Y MONDADO DE SEMILLAS

SECADO Y MOLIENDA DE SEMILLAS

EXTRACCION CON HEPTANO

SEPARACION DE ACIDOS GRASOS

PASAR EL EXTRACTO POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

CRISTALIZACION

COMPUESTOS OBTENIDOS

EXTRACCION CON HEXANO

METILACION DEL EXTRACTO OBTENIDO

SEPARACION DE LOS COMPUESTOS METILADOS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

CRISTALIZACION

COMPUESTOS OBTENIDOS

DETERMINACION DE :

PUNTO DE FUSION

-- ESPECTROMETRIA DE IR

-- " " RMP

-- " " U.V.

IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS

DESARROLLO FARMACOLOGICO

PESAR Y MARCAR ANIMALES DE EXPERIMENTACION (ratas wistar)

DETERMINACION DE LA DOSIS

PREPARACION DE LOTES

ADMINISTRACION DE LAS SUSTANCIAS

TOMA DE MUESTRAS SANGUINEAS A LAS 24 Hs DE LA ADMINISTRACION

OBTENCION DEL SUERO

DETERMINACION DEL COLESTEROL TOTAL SERICO

RECOPILACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

CONCLUSIONES

VII.a DESARROLLO DEL ESTUDIO QUIMICO

- Extracción y Aislamiento de los Compuestos.

Obtención y separación del extracto heptánico

Se efectuó la recolección de las semillas de pirul, a las cuales se les quitó la cascara. Se colocaron en charolas de aluminio para secarlas en una estufa con aire caliente durante 12 horas a una temperatura de 40°C. Las semillas se molieron en un molino de compresión y fricción. Se pesó 1,000 g. de semilla, éstas se refluieron con 3 porciones de 2 lt. de heptano cada una, durante 2 horas; las porciones se filtraron. El filtrado se concentró en un rotavapor, obteniéndose 145 g. de un líquido aceitoso oscuro. Al extracto obtenido se le agregó 400 ml. de acetona dejándolo una noche a 0°C., en el que se formó un precipitado café claro, separándolo por filtración en celita. El filtrado se concentró en un rotavapor, obteniéndose 127 g. de extracto. De aquí se pesaron 66 g. que fueron percolados en una columna con 500 g. de gel de sílice (70-230 mallas) se comenzó a eluir con heptano, aumentando poco a poco la polaridad con mezclas de heptano-acetato de etilo hasta que se llegó a acetato de etilo.

Las fracciones recolectadas fueron de 125 ml. cada una. En la fracción No. 120, que correspondió a una polaridad del eluyente heptano-acetato de etilo 98:2 (v/v), se obtuvieron 25 g. de un aceite claro, que en cromatoplasmas de sílica gel F₂₅₄ presentó dos manchas.

De la fracción 131-146 que correspondió a una polaridad del eluyente heptano-acetato de etilo 80:20 (v/v) se obtuvieron 307.5 mg. de un producto, que se

purificó por cristalización en acetato de etilo y hexano, dando un sólido blanco cristalino de estructura no conocida, con p.f. = 204-206°; cuyos datos espectrométricos son los siguientes: IR (KBr) 3650 a 2400 (ancha), 2960, 1720, 1700, 1660, 1375 cm^{-1} (ver apéndice 1); $^1\text{H RMP}$ (CDCl_3) δ 0.83s, 0.90s, 1.06s, 1.1s, 1.6s, 1.7s, 2.03 y 5.10 tq. ppm. (ver apéndice 2); U.V. λ_{max} = 235 nm.; en el espectro de masas se identificó el ión molecular M^+ a m/z 454 (36.9%), el ión isotópico $\text{M}+1$ a m/z 455 (9.8%), el ión isotópico $\text{M}+2$ a m/z 456 (2.4%), el pico base a m/z 439.5 (100%) y las señales m/z y porcentajes a 313 (2.4%), 107.1 (59.4%), 69.2 (85%), y 41.1 (64.1%), (ver apéndice 3).

De las fracciones 147-156, que correspondieron a la polaridad del eluyente heptano-acetato de etilo 70:30 (v/v) se obtuvo un producto que se purificó por cristalización en metanol y acetato de etilo, dando 207 mg. de un sólido blanco cristalino que fue identificado como el ácido 3-epi-isomasticadienólico (compuesto I, fig. 2) con p.f. = 161-165°, cuyos datos espectrométricos son: IR (KBr) 3440, 2960, 2930, 1700, 1650, 1380, 1050 cm^{-1} ; $^1\text{H RMP}$ (CDCl_3) δ 0.80s, 0.90s, 1.0s, 1.93d, 3.45, 6.05 tq ppm. U.V. λ_{max} = 236 nm. (CHCl_3), $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ PM = 456.

De la fracción 157-160 que correspondió a la polaridad del eluyente heptano-acetato de etilo 65:35 (v/v) se obtuvo un producto que se purificó por cristalización en acetato de etilo dando 127 mg. de un sólido blanco cristalino identificado como el ácido isomasticadienólico (compuesto II, fig. 3) con p.f. = 157-160°; cuyos datos espectrométricos son los siguientes: IR (KBr)

s = singulete.

d = dobléte.

tq = triple cuarteteado.

3410, 2940, 2860, 1680, 1630, 1450, 1375, 1150 cm^{-1} ; ^1H RMP (CDCl_3), δ 0.78s, 0.80s, 0.86s, 0.96s, 1.16s, 1.9d, 3.43, 5.93tq ppm. U.V. $\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ nm}$. - -
(CHCl_3) $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ PM = 456.

Obtención y separación del extracto hexánico

Se pesó 1300 g. de semillas de pirul, secas y molidas en un molino de compresión y fricción. Estas se mantuvieron a reflujo con hexano durante 1 hora, haciendolo en 3 porciones de 1 lt. cada una, reuniéndose estas porciones por filtración y posteriormente se concentraron en un rotavapor, obteniéndose 77-g. de un extracto líquido de color amarillo. Al extracto obtenido se le agregó 400 ml. de acetona, dejándolo una noche a 0°C , formándose un precipitado café claro, el cual se separó por filtración al vacío. El filtrado se concentró en un rotavapor, obteniéndose 74.73 g. de un líquido aceitoso claro. Este filtrado fue disuelto en 60 ml. de éter etílico, se le hicieron extracciones con carbonato de sodio al 5% en agua. La fase acuosa se acidificó con ácido clorhídrico al 5% hasta $\text{pH} \approx 7$, donde se formó un precipitado blanco cremoso de consistencia chiclosa, ésta fase fue lavada con éter etílico, separando la fase acuosa y la orgánica, ésta última fase se concentró en un rotavapor y se obtuvo 12.72 g. de producto, los cuales fueron disueltos en 50 ml. de éter etílico, colocandolo en un baño de hielo, agregando a la mezcla lentamente la solución etérea de diazometano para metilar, la solución etérea de diazometano, fue preparada de acuerdo a la técnica Organic Synthesis (39), que consistía en lo siguiente: en un matraz erlenmeyer se co-

locaron 50 ml. de solución acuosa de hidróxido de potasio al 50% y 200 ml. de éter etílico, la mezcla se enfrió a 5°C, y se adicionó poco a poco 5.02 g. de N-nitroso-N-metil urea, con agitación constante, una vez terminada la adición se pasó la mezcla a otro matraz que contiene lentejas de hidróxido de potasio, éste último paso se repitió tres veces.

La mezcla de la reacción con la solución etérea de diazometano se dejó durante la noche. Los productos metilados fueron separados por cromatografía en columna, utilizando como soporte 600 g. de gel de sílice (70-230 mallas), se comenzó a eluir con hexano y después con benceno, aumentando poco a poco la polaridad hasta que se llegó a acetato de etilo.

De una de las fracciones obtenidas que correspondió a benceno, se obtuvo un producto que se purificó por cristalización en metanol, dando 440 mg. de un sólido blanco cristalino que correspondió el metil ester del ácido isomasticadienólico (compuesto V, fig. 5), con p.f. = 127-130°; cuyos datos espectrométricos fueron los siguientes: IR (KBr) 3380, 2940, 2860, 1710, 1635, 1445, 1370, 1250, 1190, 1150 cm^{-1} ; $^1\text{H RMP}$ (CDCl_3) δ 0.76s, 0.85s, 0.97s, 1.03s, -- 1.9d, 3.4, 3.7s, 5.93 tq ppm. U.V. $\lambda_{\text{max}}=241$ nm. (CHCl_3) $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$ PM = 470.

De las fracciones que se eluyeron con benceno acetato de etilo 95:5 (v/v) se obtuvieron dos productos, uno que se purificó por cristalización en metanol, dando un sólido blanco cristalino que correspondió a 690 mg. de metil ester del ácido isomasticadienonálico (compuesto IV, fig. 4) con p.f. = 132-136°; cuyos datos espectrométricos fueron los siguientes: IR (KBr) 2940, 2860, -- 1700, 1680, 1630, 1445, 1360, 1245, 1190, 1100 cm^{-1} ; $^1\text{H RMP}$ (CDCl_3) δ 0.73s,

0.90s, 1.03s, 1.1s, 1.87d, 3.70. 5.87 tq, 9.6d ppm. U.V. λ_{\max} = 238 nm. - - -
(CHCl₃), C₃₁H₄₆O₄ PM = 482.

Y otro, que se purificó por cristalización en metanol, donde se obtuvo 150 --
mg. de metil ester del ácido 3-epi-isomasticadienolalico (compuesto VI, fig.
6) con p.f. = 137-141°; cuyos datos espectrométricos son: IR (KBr) 3520, - -
2920, 2860, 1700, 1630, 1440, 1370, 1230, 1190, 1140 cm⁻¹; ¹H RMP (CDCl₃) -
0.76s, 0.83s, 0.87s, 0.93s, 1.87d, 3.40, 3.73s, 5.86 tq, 9.5d ppm. U.V. λ_{\max} =
240 nm. (CHCl₃). C₃₁H₄₈O₄ PM = 484.

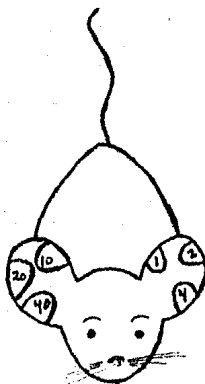
VII.b DESARROLLO DEL ESTUDIO FARMACOLOGICO

Se usaron ratas macho adultas, raza Winstar (cepa C₂ZV) con un peso de 210 a - 300 g, procedentes del bioterio de la E.N.E.P. Zaragoza. El procedimiento fue el siguiente:

1. Las ratas fueron pesadas y numeradas progresivamente. Para numerarlas se utilizaron pinzas sacabocado, con las que se hicieron pequeñas muescas en diferentes partes del borde de las orejas.

El dibujo 1, muestra una rata vista de frente, donde los números que aparecen en los bordes de las orejas corresponden a las muescas que se hicieron para la identificación de cada una de las ratas. Para dar el número que se desea, se hace una sumatoria de los números observados, por ejemplo: el número que se observa en el dibujo es el siguiente: 77

D I B U J O 1



Orejas que presentan una rata
vista de frente.

2. Los animales se distribuyeron en lotes completamente al azar, colocando 6 ratas por cada caja. Realizando dos experimentos (A y B) que se maneja--ron de la siguiente manera:

EXPERIMENTO A.

- Tratamiento A₁ - Blanco (aceite de maíz).
- Tratamiento A₂ - Referencia (no tratadas).
- Tratamiento A₃ - Testigo (valerato de estradiol).
- Tratamiento A₄ - Compuesto I (ac. 3-epi-isomasticadienolico).
- Tratamiento A₅ - Compuesto II (ac. isomasticadienolico).
- Tratamiento A₆ - Compuesto III (ac. β -elemonico).
- Tratamiento A₇ - Compuesto IV (metil ester del ácido isomasticadienonali--co).

EXPERIMENTO B.

- Tratamiento B₁ - Compuestó IV (metil ester del ácido isomasticadienonolico)
- Tratamiento B₂ - Compuesto V (metil ester del ácido isomasticadienolico).
- Tratamiento B₃ - Compuesto VI (metil ester del ácido 3-epi-isomasticadieno--lilico).
- Tratamiento B₄ - Testigo (valerato de estradiol).
- Tratamiento B₅ - Blanco (aceite de maíz).

En donde el valerato de estradiol se utilizó como testigo positivo, debido a --que disminuye los niveles de colesterol en plasma. La variable de respuesta a medir fué la concentración de colesterol total sérico, dada en mg/100 ml. de --suero.

3. La vía de administración que se utilizó en todos los casos fué la subcutánea, aplicando las substancias en la pata posterior izquierda.

4. Obtención del suero.

A las 24 horas, después de haber administrado las substancias, las ratas fueron tratadas de la siguiente manera:

- Fueron anestesiadas con éter etílico, después se colocaron en una tabla de disección sobre su dorso, haciéndoles una incisión en la axila derecha, donde se encuentra la arteria, colectando de ahí la sangre en tubos de ensayo, previamente marcados con el número de la rata correspondiente, sacrificando inmediatamente al animal.
- Con palillos de madera, de 25 cm. de largo, se desprendió el coagulo formado en el tubo de ensayo, utilizando uno para cada tubo.
- Se centrifugó por 10 min. a 3000 rpm., obteniéndose el suero.
- El suero obtenido se pasó a otro tubo de ensayo limpio con pipetas -- pasteur.

5. El procedimiento para la determinación de colesterol total sérico fue el siguiente:

- Preparación de la curva estándar de colesterol.

Se hizo una solución que contenía 400 mg. de colesterol en 100 ml. de ácido acético glacial, de donde se tomó 5, 10, 15 y 20 ml. y se aforó

a 25 ml. con ácido acético glacial, para obtener las concentraciones correspondientes a 80, 160, 240, 320 y 400 mg/100 ml.

- Se preparó una solución de ácido para-toluensulfónico al 12% (p/v) - en ácido acético glacial.
- Se marcaron los tubos correspondientes a blanco, estándar, y problema.
- Al tubo estándar se le agregó 0.1 ml. de la solución estándar de colesterol correspondiente a 160 mg/100 ml.
- Al tubo blanco se le agregó 0.1 ml. de agua destilada.
- Al tubo problema se le agregó 0.1 ml. de suero.
- Se agregó al tubo blanco y problema 0.1 ml. de ácido acético glacial.
- Al tubo de la solución estándar de 160 mg/100 ml., se le agregó 0.1 ml. de agua destilada.
- A todos los tubos se les agregó los siguientes reactivos:
 1. 0.5 ml. de ácido para-toluensulfónico.
 2. 1.5 ml. de anhídrido acético y dejándolos reposar hasta que se enfrien, sin agitación.
 3. 0.2 ml. de ácido sulfúrico concentrado y se agitó vigorosamente, dejándolos reposar por 20 min.
- Se leyó a una longitud de onda de 550 nm., ajustando el aparato con el blanco.

VIII. RESULTADOS

VIII. a Resultados de las pruebas químicas.

Los compuestos aislados e identificados del extracto de heptano de las semillas del pirul fueron: Compuesto I (ac. 3-epi-isomasticadienolico) (fig. 2), Compuesto II (ac. isomasticadienolico) (fig. 3). En el de hexano fueron: Compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonolico) (fig. 4), Compuesto V (metil ester del ac. isomasticadienolico) (fig. 5) y el Compuesto VI - (metil ester del ac. 3-epi-isomasticadienolalico) (fig. 6) - - (ver diagrama B).

DIAGRAMA "B"

ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE LAS SEMILLAS DEL PIRUL.

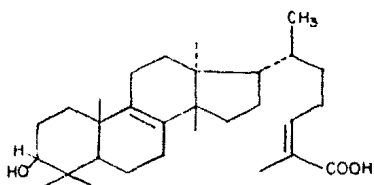


Fig. 2 Compuesto I Ac. 3-epi-isomasticadienolico.

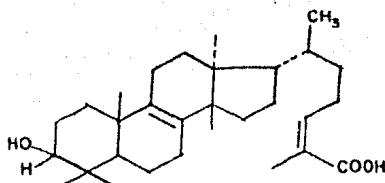


Fig. 3 Compuesto II Ac. isomasticadienolico.

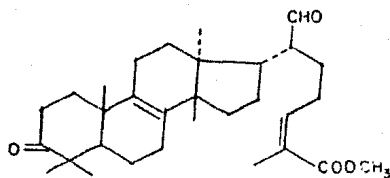


Fig. 4 Compuesto IV Metil ester del ácido isomasticadienolico.

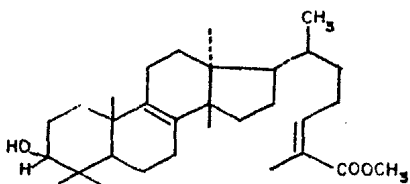


Fig. 5 Compuesto V Metil ester del ácido isomasticadienólico.

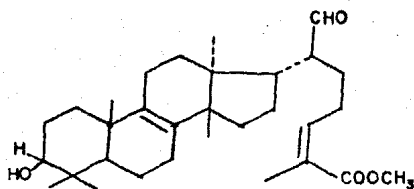


Fig. 6 Compuesto VI Metil ester del ácido 3-epi-isomasticadienólico

Además, se aisló un compuesto del extracto heptánico que no está descrito en la literatura para las semillas del pirul. Compuesto III, que se identificó como "Acido β -elemónico"(fig. 3), por la comparación de sus datos espectrométricos y sus propiedades descritas en la literatura para este compuesto. (41), (42), (43), (44), (45), (46) y (47).

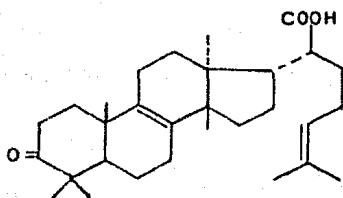


Fig. 3 Compuesto III Ac. β -elemónico aislado por primera vez del Smolle.
Constituyente también de la resina de Cenarium Schweinfurthii

VIII.b Resultados de las Pruebas Farmacológicas.

La tabla 1 muestra la dosis que se empleó al evaluar el efecto hipocolesterolemiante de los compuestos aislados de las semillas del pirul.

Tabla 1. DOSIS EMPLEADA Y PESO PROMEDIO DE LOS ANIMALES EN LOS EXPERIMENTOS A Y B

Tratamiento	S u b s t a n c i a	Dosis (mg/kg)	Promedio de peso Corporal de rata (g.)		
A	Blanco (aceite de maíz).	* 1.0	218.0	±	29.85
A	Testigo (valerato de estradiol).	13.0	217.0	±	16.45
A	Referencia (no tratadas).	-----	211.0	±	23.82
A	Compuesto I (ac. 3-epi-isomasticadienolico).	16.5	228.5	±	16.61
A	Compuesto II (ac. isomasticadienolico).	16.5	224.0	±	21.05
A	Compuesto III (ac. β-elemonico).	16.5	224.0	±	30.33
A	Compuesto IV (metil ester del ac.-isomasticadienonolico).	17.3	224.0	±	19.33
B	Blanco (aceite de maíz).	* 1.0	291.0	±	44.8
B	Testigo (valerato de estradiol).	13.0	290.6	±	45.80
B	Compuesto IV (metil ester del ac.-isomasticadienonolico).	17.3	286.0	±	46.12
B	Compuesto V (metil ester del ac.-isomasticadienolico).	17.0	280.0	±	44.92
B	Compuesto VI (metil ester del ac.-3-epi-isomasticadienolico).	17.4	282.0	±	42.91

* A los animales de los lotes blanco se les administró aceite de maíz a una dosis de 1 ml/kg.

Las tablas 2 y 3, muestran los resultados de las pruebas farmacológicas de las sustancias que fueron probadas en los experimentos A y B, donde se evaluó el efecto hipocolesterolemiante en ratas normales Winstar macho, por medio del método colorimétrico de Pearson y colaboradores (38), para la cuantificación de colesterol total sérico en plasma.

TABLA 2. VALORES DE LA CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL SERICO DEL EXPERIMENTO A EN MG/100 ML.

T R A T A M I E N T O S						
A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇
120.13	78.80	110.05	114.08	87.87	108.03	111.05
125.17	106.01	114.08	130.21	119.12	119.12	102.94
110.97	85.85	108.03	137.26	125.17	98.96	106.01
114.08	88.88	116.09	120.13	139.28	126.17	104.00
96.94	82.83	120.13	116.09	108.03	125.17	110.05
		119.12	121.13	114.08	96.94	98.96

TABLA 3. VALORES DE LA CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL SERICO DEL EXPERIMENTO B EN MG/100 ML.

T R A T A M I E N T O S				
B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
84.86	97.89	107.91	63.82	81.86
89.87	99.89	87.87	67.83	86.87
78.85	71.84	95.89	61.82	86.87
86.37	112.92	94.88	56.81	91.88
86.87	104.90	83.86	61.82	97.89

IX. DISCUSION

IX. a Discusión de resultados del estudio químico.

De acuerdo a las propiedades físicas y espectrométricas se identificaron los compuestos I, II, IV, V y VI (tabla 4 y 5) descritos en literatura (12) y -- (13).

El compuesto III, se identificó como el Acido β -elemónico al analizar los siguientes espectros: Espectro de infrarrojo (apéndice 1), muestra la banda de absorción de $3650-2400\text{ cm}^{-1}$ ancha que correspondió al protón del ácido -- carboxílico, a 2960 cm^{-1} al alargamiento C-H alifático, a 1720 cm^{-1} a la cetona de la posición 3 de un anillo de 6 miembros, a 1700 cm^{-1} al carbonilo -- del ácido no conjugado, a 1660 cm^{-1} es la señal de la doble ligadura C=C de la cadena lateral en la posición 24 y a 1375 cm^{-1} la presencia de los meti-- los geminales del carbono 4 de la molécula (36) y (37). En el espectro de -- RMP (apéndice 2), se asignó las señales de la siguiente manera: Las señales -- que aparecen a 0.83, 0.90 y 1.1 ppm. a los grupos metilos terciarios unidos -- a los carbono 13, 14 y 10 respectivamente. La señal a 1.06 ppm. se asignó a -- los metilos geminales unidos al carbono 4; a 1.6 y 1.7 ppm. a los metilos vi -- nílicos unidos al carbono 25; a 5.1 ppm. es del protón único unido al carbo -- no 24 y la señal que apareció a 2.03 ppm. es del protón del carbono 20 (base -- del carboxilo).

En el espectro de masas (apéndice 3) señala el ión molecular a $m/z\ M + = 454$ que se ajustó a la fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_3$, indicando la presencia de 8 -- insaturaciones; 4 pertenecen a los anillos, 2 a los dobles enlaces, una al --

carbonilo de la cetona y otra al carboxilo. Correspondientes a la estructura propuesta, también se observó una señal m/e a 313 (2.4%) que es característico del ión en el que se ha perdido la cadena lateral, afirmando la estructura tetracíclica con los cinco metilos (49). El resto de las señales a 439.5 (100%) 107 (59.4%), 69.2 (85%) y 41.1 (64.1%) corresponden a los descritos en la literatura (40).

DATOS ESPECTROMETRICOS DE LOS COMPUESTOS

I, II, IV, V, VI.

TABLA 4. SEÑALES DE INFRARROJO

COMPUESTO	NOMBRE	O - H	C - H	C = O	C = C	$\text{CH}_3-\overset{\text{C}}{\text{C}}-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_2-$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{C} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{R}' \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	R°
I	Ac. 3-epi-isomasticadienolico.	3440 1050	2960 2930	-	1650	1380	-	1700	-
II	Ac. isomasticadienolico	3410 1150	2940 2860	-	1630	1375	1450	1680	-
IV	Metil ester del ac. isomasticadienonalico.	-	2940 1860	1700	1630	1360	1445	1680	1245 1190 1100
V	Metil ester del ac. isomasticadienolico.	3380 1150	2940 2860	-	1635	1370	1445	1710	1250 1190 1100
VI	Metil ester del acido 3-epi-isomasticadienolalico.	3520	2920	-	1630	1370	1440	1700	1230 1190 1140

R' = CH₃ ó COOH.
R° Bandas características de los esteres.

TABLA 5. SEÑALES DE RMP 'H.

COMPUESTO	N O M B R E	Me,4ax	Me,4eq	Me,10	Me,13	Me,14	R,20	H,24	Me,27	H,3	COOMe
I	Ac. 3-epi-isomastioadienolico.	0.80s	1.00s	0.90s	0.80s	0.90s	0.90d	6.05tq	1.93d	3.45	-
II	Ac. isomasticadienolico	0.96s	0.80s	1.16s	0.78s	0.86s	0.96d	5.93tq	1.90d	3.43	-
IV	Metil ester del ac. iso masticadienonolico.	1.03s	1.03s	1.10s	0.73s	0.90s	9.60d	5.87tq	1.87d	-	3.7s
V	Metil ester del ac. iso masticadienolico.	0.97s	0.85s	1.03s	0.76s	0.86s	0.97d	5.93tq	1.90d	-	3.7s
VI	Metil ester del ácido - 3-epi-isomasticadienolico.	0.83s	0.93s	0.93s	0.76s	0.87s	9.50d	5.86tq	1.87d	-	3.7s

NOTA: s = singulete ; d = doblete ; tq = triplete cuartetado. 60 MHz

IX.b Discusión de resultados del estudio farmacológico.

Por contar con ratas de la misma camada se decidió emplear el tratamiento denominado "completamente al azar", en este caso los tratamientos fueron diseñados de tal manera que permitieran evaluar el efecto hipocolesterolemico.

Para el análisis de los resultados del experimento A (tabla 3) se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu_i + \tau_{ij} + \epsilon_j(i) \quad \text{--- ec (1)}$$

Donde: Y_{ij} = variable de la respuesta.

μ_i = media general para cada tratamiento.

τ_{ij} = efecto de los tratamientos.

$\epsilon_j(i)$ = error experimental

Donde las hipótesis a probar son:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 \quad \text{y}$$

H_a : al menos una es diferente.

La regla de decisión es si $F_{ca} < F_{reportada}$ (0.05) entonces las medias calculadas de las respuestas de cada compuesto es la misma.

A continuación se presenta la tabla 5 de análisis de varianza:

TABLA 5.

ANALISIS DE VARIANZA DEL EXPERIMENTO A.

F.V.	g.l.	S.C.	M.C.	F _{cal.}
σ_i	6	3815.78	635.96	5.29
$\epsilon_{j(i)}$	33	3965.13	120.55	

Donde:

F.V. = variable a medir.

g.l. = grados de libertad.

S.C. = sumatoria de cuadrados.

M.C. = cuadrado medio.

F_{rep} = constante de la prueba de Fisher (48).

En este caso H₀ se rechaza con un nivel de significancia de 0.05.

Al encontrarse que las medias de las respuestas son diferentes se procedió a detectar que tratamientos eran diferentes, por lo que se utilizó la técnica de Contrastes Ortogonales para probar las siguientes hipótesis:

A. Efecto hipocolesterolemiante del valerato de estradiol con respecto al blanco (aceite de maíz) y referencia (no tratadas).

$$H_0 : \frac{u_1 + u_2}{2} = u_3$$

B. Efecto hipocolesterolemiante de los compuestos I (ac. 3-epi-isomasticadienolico), II (ac. isomasticadienolico) y III (ac.β-elemonico) con respecto

al compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonalico).

$$H_0 : \frac{u_4 + u_5 + u_6}{3} = u_7$$

C. Observar si tiene el mismo efecto el compuesto I y III.

$$H_0 : u_4 = u_6$$

TABLA 6 MODELO ESTADISTICO QUE SE UTILIZO PARA EL CONTRASTE DE HIPOTESIS DEL EXPERIMENTO A.

T R A T A M I E N T O S

Hipótesis	1	2	3	4	5	6	7
A	-5	-5	10	0	0	0	0
B	0	0	0	-1	-1	-1	3
C	0	0	0	-1	1	0	0

A continuación se presenta el análisis por contraste ortogonal de los resultados obtenidos de concentración de colesterol total sérico de acuerdo al modelo anterior.

TABLA 7. ANALISIS POR CONTRASTE ORTOGONAL DE LA CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL SERICO DEL EXPERIMENTO A

Contraste	Y	Y ²	S.C.	$\sum n_i c_i^2$	F _{cal.}
A	1357.8	18438838	2095.2	880	17.55*
B	207.6	43122.6	598.9	72	5.01
C	64.54	4161.5	346.7	12	2.90

Donde: $F_{cal} < F_{0.95}$ no se puede rechazar H_0 .

* Hay una alta significancia estadística.

Faltando por comparar el efecto hipocolesterolemiante del valerato de estradiol con respecto a los compuestos aislados del píruul por los que se procedió a utilizar la técnica de tuckey para probar las siguientes hipótesis:

a) El testigo (valerato de estradiol) con respecto al Compuesto I (ac. 3-epi-isomasticadienolico).

$$H_0 : u_3 = u_4$$

b) El testigo (valerato de estradiol) con respecto al compuesto II (ac. isomasticadienolico).

$$H_0 : u_3 = u_5$$

c) El testigo (valerato de estradiol) con respecto al compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonolico).

$$H_0 : u_3 = u_7$$

$$\text{Si: } |Y_i - Y_j| < q \sqrt{\frac{\text{CME}}{2} \left[\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right]} \quad \text{----- ec (2)}$$

Donde:

Y = media de los tratamientos.

CME = cuadrado medio del error.

n = número de datos.

q = constante de Tuckey para dicho tratamiento.

Donde:

H_0 no se puede rechazar.

Los resultados que se obtuvieron de esta prueba fueron los siguientes:

- a) 34.68 > 17.88 se rechaza H_0
- b) 27.12 > 17.88 se rechaza H_0
- c) 17.03 < 17.88 se acepta H_0

Para el análisis de los resultados obtenidos en el experimento B (ver tabla 4) se empleó el mismo diseño experimental y modelo estadístico del experimento anterior, ecuación (1).

Las hipótesis que se formularon fueron las siguientes:

$$H_0 : u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5 \quad \text{y}$$

H_a : al menos una es diferente.

Donde: $F_{cal} < F_{0.05}$ entonces las medias de las respuestas de cada compuesto es la misma.

A continuación se presenta la tabla 8 del análisis de varianza:

TABLA 8. ANALISIS DE VARIANZA DE LA CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL SERICO DEL EXPERIMENTO B

F. V.	g.l.	S. C.	M. C.	F_{cal} .
\bar{z}_i	4	3812.7	953.175	11.803
$\epsilon_{j(i)}$	20	1615.13	80.756	

En este caso se rechaza H_0 con un nivel de significancia de 0.05

Al encontrarse que las medias de las respuestas son diferentes se procedió a detectar que tratamientos eran diferentes por los que se utilizó la técnica de Contraste Ortogonal para probar las siguientes hipótesis:

a) Efecto hipocolesterolemiante del testigo (valerato de estradiol) con respecto a los compuestos IV, V y VI.

$$H_0 : \frac{u_1 + u_2 + u_3}{3} = u_4$$

b) Efecto hipocolesterolemiante del compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonálico) con respecto a los compuestos V y VI.

$$H_0 : \frac{u_2 + u_3}{2} = u_1$$

TABLA 9. MODELO ESTADISTICO QUE SE UTILIZO PARA EL CONTRASTE DE HIPOTESIS DEL EXPERIMENTO B

T R A T A M I E N T O S

Hipótesis	1	2	3	4	5
a	-1	-1	-1	3	0
b	-2	1	1	0	0

A continuación se presenta el análisis por contraste ortogonal de los resultados obtenidos de concentración de colesterol total sérico de acuerdo al modelo.

TABLA 10. ANALISIS POR CONTRASTES ORTOGONAL DE LA CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL SERICO DEL EXPERIMENTO B

Contraste	Y	Y ²	S.C.	$\sum n_i c_i^2$	F _{cal.}
a	450.87	203283.7	3388.06	60	41.95*
b	9.21	9842.62	328.08	30	4.062

* Hay una alta significancia estadística.

Donde:

$F_{cal.} < F_{0.95}$ no se puede rechazar H_0 .

En este caso también se utilizó la técnica de Tuckey para observar el efecto - hipocolesterolemiante entre:

1. El compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonálico) con respecto - al testigo (valerato de estradiol).

$$H_0 : u_1 = u_4$$

2. Compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonálico) con respecto al - blanco (aceite de maíz).

$$H_0 : u_1 = u_5$$

3. Testigo (valerato de estradiol) con respecto al blanco (aceite de maíz).

$$H_0 : u_4 = u_5$$

Empleando la ecuación (2)

Donde:

H_0 no se puede rechazar.

Los resultados que se obtuvieron de esta prueba fueron los siguientes:

1. $23.44 > 14.38$ se rechaza H_0
2. $3.21 < 14.38$ se acepta H_0
3. $26.65 > 14.38$ se rechaza H_0

Después de realizar la evaluación farmacológica de los compuestos obtenidos y de llevar a cabo el análisis estadístico de los experimentos A y B se obtuvo

lo siguiente, en la tabla 3 y 4 se encuentran los valores obtenidos de la concentración de colesterol total sérico. El primer análisis que se realizó al experimento A fue para observar si hay una igualdad de los valores de las medias entre los tratamientos, pero la hipótesis planteada se rechazó, ya que, la F_{ca} fué mayor que la F reportada en tablas; el siguiente paso fue detectar si hay o no efecto hipocolesterolemiante de los compuestos, en este caso se encontró que el valerato de estradiol tiene este efecto, el Compuesto IV (metil ester del ac. isomasticadienonálico) mostró una ligera disminución de los niveles de colesterol y los compuestos I (ac. 3-epi-isomasticadienolico), II (ac. isomasticadienolico) y III (ac. β -elemónico) presentaron un ligero aumento de los niveles de colesterol en plasma. Indicando, el último análisis estadístico que el compuesto IV tiene un efecto parecido al del valerato del estradiol, por lo tanto tiene efecto hipocolesterolemiante.

Y el análisis realizado a los resultados del experimento B fue el siguiente: El primer análisis estadístico que se realizó fue el mismo que el anterior; pero la hipótesis planteada se rechazó ya que, la F_{ca} fué mayor que la F reportada en tablas, en el segundo análisis se probó si había un efecto hipocolesterolemiante entre los metil ester, donde el compuesto IV (metil ester del ácido isomasticadienonálico), mantiene la ligera disminución de la concentración de los niveles de colesterol en plasma del 10%, los compuestos V y VI tuvieron una respuesta parecida a la del blanco (aceite de maíz). Y en el último análisis se observó que el compuesto IV tiene un efecto intermedio entre el efecto hipocolesterolemiante del valerato de estradiol y el blanco (aceite de maíz).

X. C O N C L U S I O N E S

1. Los compuestos aislados de las semillas del Schinus molle fueron los siguientes:

Compuesto I (ac. 3-epi-isomasticadienolico).

Compuesto II (Ac. isomasticadienolico).

Compuesto III (Ac. β -elemonico).

Compuesto IV (Metil ester del ac. isomasticadienonalico).

Compuesto V (Metil ester del ac. isomasticadienolico).

Compuesto VI (metil ester del ac. 3-epi-isomasticadienolalico).

2. El Acido β -elemonico se aisló e identificó por primera vez de las semillas del Schinus molle.

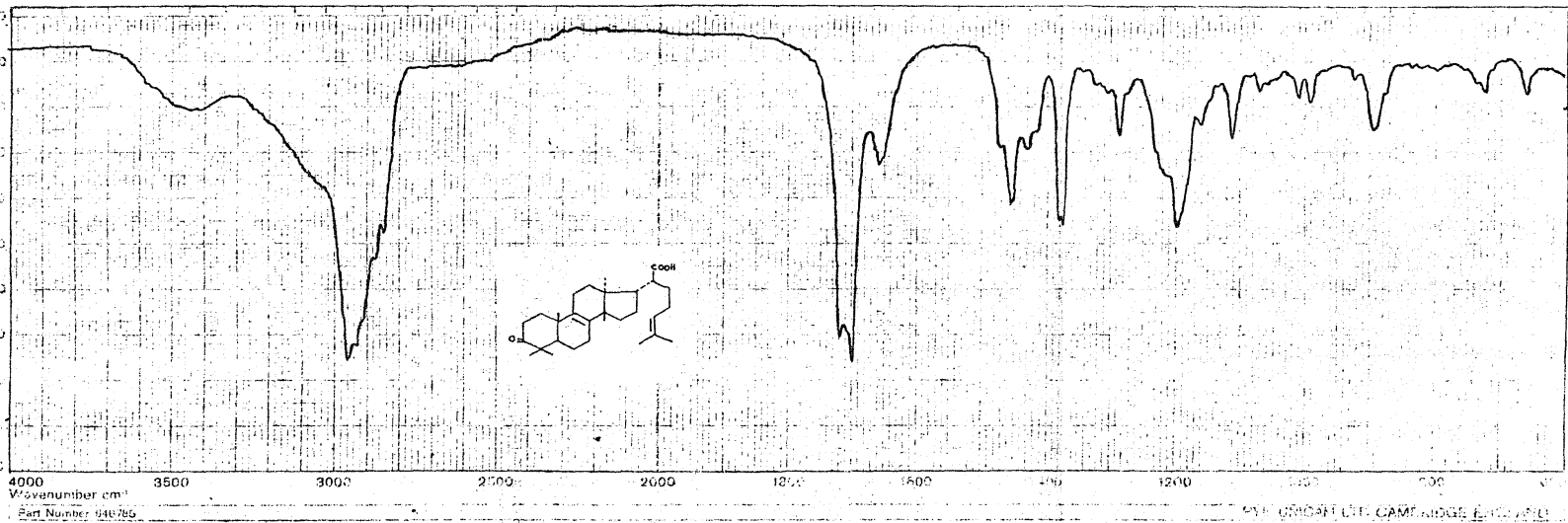
3. El ensayo farmacológico preliminar de los compuestos obtenidos mostró que los ácidos 3-epi-isomasticadienolico, isomasticadienolico, β -elemonico no presentan el efecto hipocolesterolemiante esperado, en ratas Winstar normales.

4. De los tres esteres metilados aislados el que presentó una ligera acción hipocolesterolemiante fué el metil ester del ácido isomasticadienonalico.

5. De acuerdo a la relación estructura-actividad de los compuestos obtenidos se observó que la doble ligadura en la posición 8-9 del anillo B de estos

y los diferentes grupos funcionales que se encuentran en las posiciones - 3, 21 y 27 probablemente alteran la actividad farmacológica; con respecto a la estructura del ácido masticadienónico.

XI. A P E N D I C E S

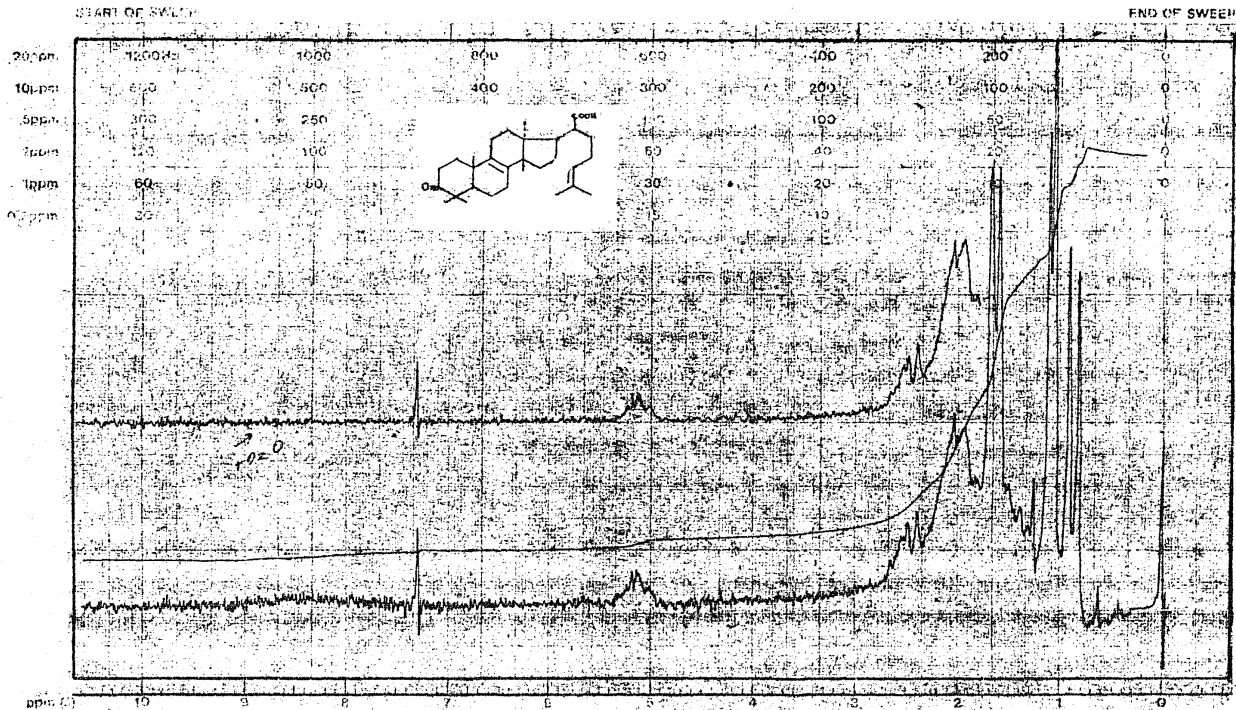


MADE IN U.S.A.

Varian Instrument Division



Varian Instrument Division Palo Alto, California



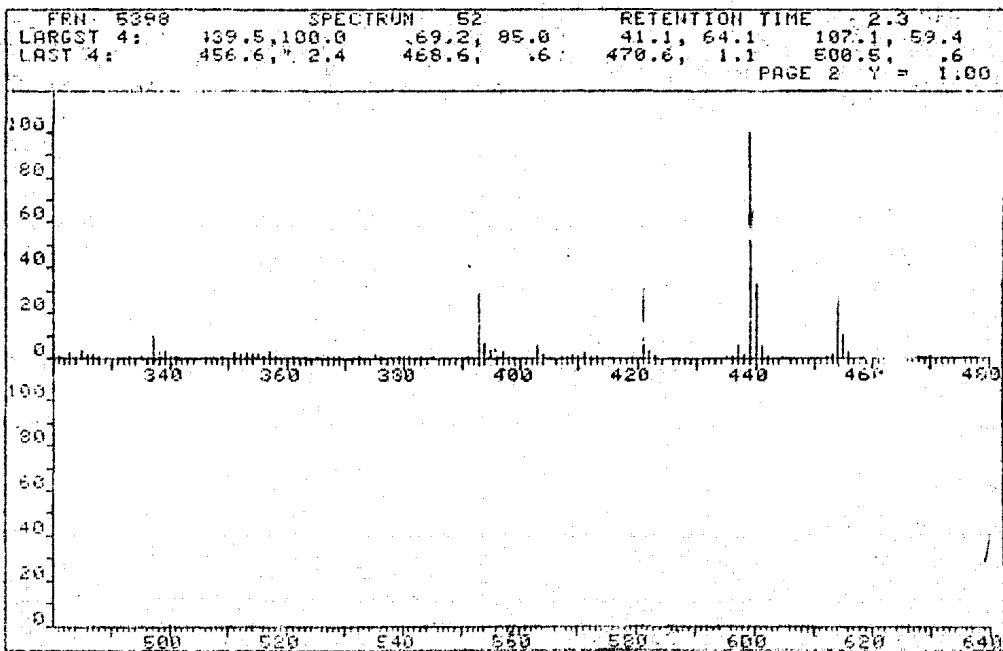
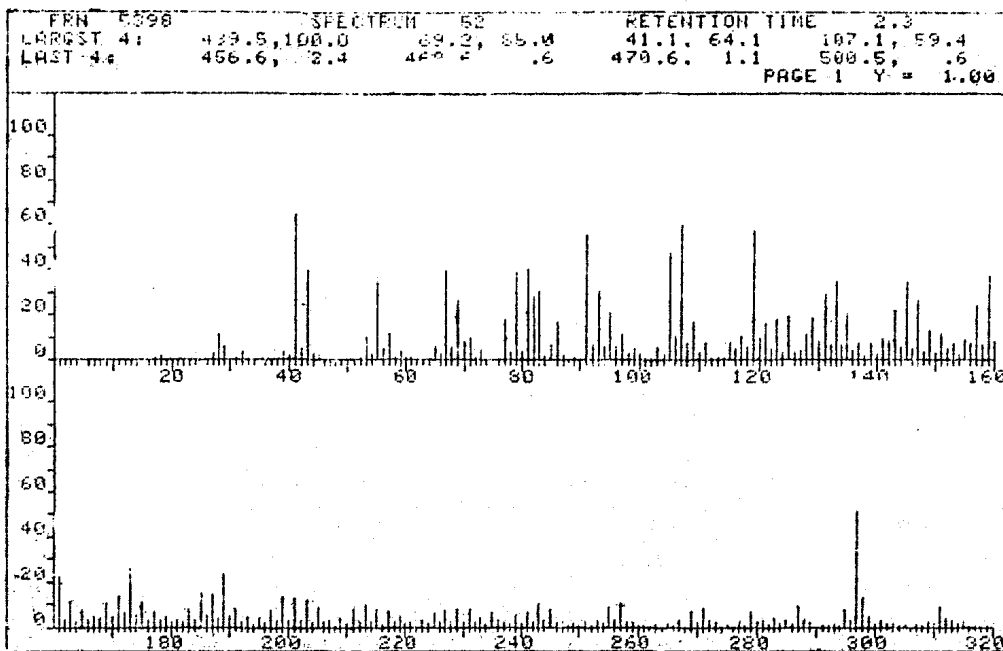
LOCK POS. _____ ppm SPECTRUM AMPL. 5000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H^1 SAMPLE NP-a OPERATOR L. Coe III

LOCK POWER _____ mW FREQ. 0.05 sec SWEEP WIDTH 20 ppm ZERO REF. TMS DATE 8-1-62

DECOUPLE POS. _____ ppm RE-POWER 0.05 mW END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. 70 °C SOLVENT: $CCl_4 +$ SPECTRUM NO. 62

DECOUPLING POWER _____ mW 0.20 17-97m

Apéndice 3. Espectro de Masas.



XII. BIBLIOGRAFIA

1. Donoy, K. y Rosenleer, E. B., Enfermedades del Metabolismo, tomo I, Ed. Salvat, México (1979), pp 424.
2. Lowental, T. D. y Major, A. D., Clinical Therapeutics, ed. 47ava, Ed. - Grun & Stratton-Inc, N. Y., (1978), pp 3-13.
3. Litter, M., Farmacología experimental y clínica, ed. 5a, Ed. "El Ateneo" México (1975), pp 1003-1009.
4. Howard, A. E., Substancias usadas en la profilaxia y el tratamiento de la Aterosclerosis, en Goodman, L. S. y Gilman, A. (Ed) Bases Farmacológicas de la terapéutica, ed. 5a, Ed. Interamericana, México (1978).
5. Berkow, R., El manual Merck de diagnóstico y terapéutica, ed. 6a, Ed. - Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, N.Y. (1978). pp 416-419.
6. Necesidades esenciales en México. Economía y Demografía, Situación actual y perspectivas al año 2000, Vol. 4, Ed. Coplamar Siglo XXI, México (1982), pp 291-293.
7. Levy, R. I., Drogas usadas en el tratamiento de la hiperlipoproteinemia en Goodman, L. S. y Gilman, A. (Ed), las bases farmacológicas de la terapéutica, ed. 6a, Ed. Medica Panamericana, México (1981), pp 830-835.
8. Holland, G., Antihyperlipidemic Agents, en Burger, A. N. (Ed) Medicinal Chemistry, ed. 4a. Ed. J. W. (1980), pp 1225-72.
9. Sánchez, R., Lerdo de Tejada, A., González, V., Acción Hipocolesterolemizante de Gutteria gaunerii, Med. Trad. 9,22 (1980).
10. Navarrete, C. A., Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de Juliana adstringens (cuachalalate), Tesis E. N. E. P. Zaragoza, UNAM (1982).
11. Enriquez, R. G., Chávez, M. A., y Jauregui, J. F., Propenylbenzenes - - from Gutteria gaunerii, Phytochemistry 19, 2024-2025 (1980)
12. Pozzo-Balbi, T., Nobile, L., Scapini, G. y Cini, M., Triterpenoid - - - cetoacid of Schinus molle, Gazz. Chem. Ital. 106, 785-789 (1976).
13. Pozzo-Balbi, T., Nobile, L., Scapini, G. y Cini, M., The Triterpenoid - acid of Schinus molle, Phytochemistry, 17, 2107-2110 (1978)
14. Hashim, P. M., El-Hossary, G. A., y El-Sakhawy, F. S., Preliminary - - phytochemical study of Schinus molle L. growing in Egypt, J. Pharm. Sci. 19(1-4), 235-246 (1978).

15. Reiche, C., Flora excursoria en el Valle central de México, Ed. Porrúa México (1977), pp 90-91.
16. Martínez, M., Plantas medicinales de México, ed. 5a. Ed. Botas, México (1969), pp 261-265.
17. Sánchez, S. O., La flora del Valle de México, ed. 6a. Ed. Herrero, México (1968), pp 244-245.
18. Mendoza, M. R. y Rodríguez, C. R., Apuntes de Botánica forestal, México (1959), pp 188.
19. Hernández, F., 'Historia de las plantas de la Nueva España' tomo I, Ed. Imprenta Universitaria, México (1942), p 281.
20. Martínez, M., Flora medicinal del Estado de México, Ed. Dirección de recursos naturales, Toluca, México (1958), pp 40-41.
21. Patiño, V. M., Plantas cultivadas y animales domésticos de América - equinoccial, tomo III, México (1967), pp 236-238.
22. Cortés, E., El árbol del pirul y posibilidades de industrializar sus productos, Tesis, Facultad de Química, UNAM, México (1926).
23. Domínguez, X., Carmona, J. y Venegas R., Lignoceric acid and other compounds of Schinus molle, Phytochemistry, 10, 1687 (1971).
24. Caputo, R. y Mangoni L., Acidic triterpenici dalle galle di Pistacia terebinthus, Gazz. Chim. Ital. 100, 317 (1970).
25. Seoane, E., Further crystalline constituents of gum mastic, J. Chem.-Soc. 4158 (1956).
26. Barton, B. H. R. y Seoane, E. J., Chem Soc. 4150 (1965).
27. Segura, M. M., Estudio del efecto hipocolesterolemiante de la 2a.-metil-17b-hidroxi metilandrostan-3-ona (metadona) en enfermos con cardioangiosclerosis y arteroesclerosis generalizada, Tesis, Facultad de Química, UNAM, México (1970).
28. Reyes, V. M., La acción de diversos estrógenos sintéticos sobre la colesteroemia de la rata, Tesis, Facultad de Química, UNAM, México (1970).
29. Gutiérrez, R. M., La tiroides y el efecto hipocolesterolemiante de los estrógenos., Tesis, Facultad de Química, UNAM, México (1965).
30. Vasilenco, Y., Ponomarev, V. D., Oganesyanyan, E. T., Comparative study of the hypolipidemic properties of triterpenoids, Khim. --- Farm. Zh (15-5), 50-8 (1981).

31. Sheriner, R. L., Fuson, R. C. y Cutin, D. Y., Identificación sistemática de compuestos orgánicos, Ed. Limusa, México (1977).
32. Bates, R. B. y Schaefer, J. P. Técnicas de investigación en química orgánica, Ed. Prentice/Hall Internacional, España (1977).
33. Dyer, J. R. Aplicación de espectroscopia en absorción en compuestos orgánicos, Ed. Prentice/Hall, España (1965).
34. Nathan, J. y Díaz, E., Introducción a la resonancia magnética nuclear, Ed. Limusa, México (1980).
35. Pretsh, E., Clerc, T., Seibl, J. y Simon, W., Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos., Ed. Alhambra, España (1980).
36. Nakanishi, K. y Solomon, P. H., Infrared absorption spectroscopy ed. 2a. Ed. Holde-Day Inc., U.S.A. (1977).
37. Silverstein, R. M., Blaser, G. C. y Marril, T. C., Identificación espectrométrica en compuestos orgánicos, Ed. Diana, México (1980).
38. Pearson, S., MacGavack, T., Rapid procedure for the determination of serum cholesterol., J. Clin. Endocrinology, 12, 1245 (1953).
39. Organic Synthesis, vol. 2, 165 (1943).
40. Jackman y Sternhell. Applications of R.M.N. spectroscopy in organic chemistry, ed. 2a. Ed. Pergamon Press, Oxford London (1969).
41. Connolly, J. D., Triterpenoids, en Overton, R.H. (Ed) Terpenoids and Steroids, vol. 1, Ed. The Chemical Society, London (1971), pp 171-172.
42. Cotterrell, G., Halsall, T. G., y Wriglesworth, M. J. The chemistry of triterpenes and related compounds. Part XLVII, Clarification of the nature of the tetracyclic triterpene acids of Elemi resin. J. Chem. Soc. 739-743 (C), (1970).
43. Devon, I. K. y Scott, A. I., Handbook of naturally occurring compounds, - vol. 11, Ed. Academic Press, N. Y. (1972).
44. Arigoni, D., Wyler, H., y Jeger, O., Zur Renntnis der Triterpene Uber die gegen seitigen Beziehungen bei Elemadienol Soure. Helv. Chim. Acta, 37, 1553 (1954).
45. Menard, E., Wyler, H., Hiestand, A., Arigoni, D., Zur Renntnis der Triterpene. Helv. Chim. Acta, 38, 1517 (1955).
46. Bilham, P., y Kong, G. A., Sapogenins, Pate XVI, The acids of Elemiresin, J. Chem. Soc. 544 (1942).

47. Bhuvanendrom, R., Monsom, W., Spring, F., Triterpene resinols and related acids. Parte XIX. Isolation of a triterpene Diol from *Canarium schwiinfurthii* resin., J. Chem. Soc. 3472 (1950).
48. Remington, R. D. y Schork, M. A., Estadística Biométrica y Sanitaria, Ed. Prentice Hall Internacional, México (1974) pp 356.
49. Domínguez, X. A., Métodos de investigación Fitoquímica, Ed. Limusa, México (1979), pp 184.