

Artículo original

Estudio fitoquímico de la resina de *Protium carana* March (Burseraceae), derivados semisintéticos de los triterpenos α/β -amirinas, determinación de su actividad antioxidante y actividad antibacteriana.

Phytochemical study of the resin of *Protium carana* March (Burseraceae), semi-synthetic derivatives of the triterpenes α -, β -amyrins, determination of activity antioxidant and antibacterial activity evaluation.

Bracho-Niño Ismer¹, Rojas-Fermín Luis^{1*}, Usubillaga Alfredo¹, Carmona Juan², Carrero José³, Hernández Johanna¹, Deffieux Denis⁴, Pouységu Laurent⁴, Quideau Stéphane⁴.

¹Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela, ²Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela. ³Departamento de Epidemiología del Hospital Universitario de Los Andes. ⁴Université de Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires (CNRS-UMR 5255), 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France.

Recibido abril 2016 - Aceptado diciembre 2016

RESUMEN

A partir de la resina, obtenida de la corteza, de *P. carana* March (Burseraceae), se aisló una mezcla de α - y β -amirina. Mediante acilación se obtuvo la mezcla de los respectivos derivados acetilados y por oxidación una mezcla de 3-oxo- α -amirina y 3-oxo- β -amirina cuyas estructuras fueron determinadas mediante estudios espectroscópicos (IR, RMN-1H y RMN-13C). Se determinó la actividad antibacteriana de los derivados contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Encontrándose que poseen Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) superiores a 400 μ g/mL. Un estudio de la actividad antioxidante mostró que los derivados son inactivos. La resina contiene una alta concentración de α/β -amirinas.

PALABRAS CLAVE

Protium carana, Burseraceae, mezcla de acetatos de α -y β -amirina, mezcla de 3-oxo- α - 3-oxo- β -amirina, actividad antibacteriana y antioxidante.

ABSTRACT

From *P. carana* March (Burseraceae) resin, a mixture of α -amyrin and β -amyrin was obtained. Acylation of this mixture yielded the mixture of the acetylated derivatives; on the other hand, oxidation yielded a mixture of the 3-oxo- α -amyrin and 3-oxo- β -amyrin. The molecular structures were confirmed by spectroscopic studies (IR, 1H and 13C NMR). The Antimicrobial activity of these compounds were determined against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), it was found that Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were over 400 μ g/mL. It was also determined that the derivatives did not show any anti-oxidant activity. The resin contains a high concentration of α/β -amirinas.

KEY WORDS

Protium carana, Burseraceae, mixture of α -, amyrin and β -amyrin acetates, mixture of 3-oxo- α -, amyrin and 3-oxo- β -amyrin, antimicrobial and antioxidant activity.

*Correspondencia al autor: rojasl@ula.ve

INTRODUCCIÓN

El género *Protium* Burm F. (familia Burseraceae) se encuentra distribuido principalmente en las zonas tropicales de Asia, África y América. En Venezuela, se han reportado varias especies, las cuales han sido utilizadas en la medicina tradicional, contra la inflamación, disentería, urticaria, leishmaniasis, infecciones urinarias y dolores estomacales [1- 3].

De las plantas del género *Protium*, se han aislado diversos tipos de metabolitos secundarios, resaltando los triterpenos pentacíclicos [4]. Estos compuestos poseen una amplia gama de actividades farmacológicas que incluyen la actividad antioxidante, antialérgica, antiinflamatoria, anticancerígena, antiviral, antibacteriana, antinociceptiva, gastroprotectora, hepatoprotectora, citotóxica, y cardioprotectora [1-13]. Actualmente existe gran interés en obtener derivados triterpénicos mediante hemisíntesis, debido a la similitud estructural que poseen los triterpenos con el núcleo esteroidal [4].

Este trabajo describe el aislamiento y caracterización de una mezcla de dos compuestos de naturaleza terpénica, α -amirina y β -amirina, obtenidos de la resina *P. carana* March mediante extracción con hexano y acetato de etilo. A partir de la mezcla de estos dos compuestos naturales se obtuvo una mezcla de los acetatos y luego mediante oxidación, una mezcla de los 3-oxo derivados. Estos derivados fueron sometidos a evaluación de su actividad antibacteriana contra microorganismos de referencia internacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

General. Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Spectrum Two, en pastillas de KBr o en celda de NaCl. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM) marca Hewlett-Packard, modelo 5973, utilizando una columna HP-5M (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de i.d.) y un detector de impacto electrónico (EI, energía e- 70 eV). Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bi dimensionales fueron realizados en los equipos Bruker-Avance de 300 MHz y Bruker-Avance de 400 MHz. Como solventes se empleó $CDCl_3$ y Acetona- d_6 . Las separaciones cromatográficas se hicieron en columnas empacadas con gel de sílice

Merck 60 (63-200 μ m, 70-230 mesh). Para la cromatografía de capa fina (CCF), se utilizaron placas Merck de gel de sílice HF 254 (0,25 mm espesor). Las placas fueron reveladas con una mezcla v/v de ácido acético/agua/ácido sulfúrico, con una proporción 20:4:1 ($CH_3COOH - H_2O - H_2SO_4$) y calentadas sobre placa térmica a 120 °C durante unos minutos.

Material Vegetal. A partir de la corteza del *P. carana* March se recolectaron 196,07 gramos de resina durante el mes de Mayo del 2010, en la vía hacia Tovar, a 12 Km de Santa Cruz de Mora, municipio Antonio Pinto Salinas, estado Mérida, Venezuela. Para la clasificación botánica de la especie se preparó una muestra testigo (Voucher) siguiendo el método de prensado y secado, y una vez etiquetado, este fue depositado en Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Universidad de Los Andes (*voucher specimen* N° IB 001). La especie fue identificada como *P. carana* March, por el Ingeniero Forestal Juan Carmona Arzola.

Aislamiento de la mezcla de α - y β -amirinas. Los 196,07 g de resina del *P. carana* March, se disolvieron en cloroformo ($CHCl_3$) y se mezclaron con 172 g de sílica gel. Parte del solvente se eliminó en un rotavapor y el resto dejando la mezcla húmeda en la estufa a una temperatura no mayor de 40 °C. La mezcla seca se homogenizó en un mortero y se colocó en la cabeza de una columna, que se sometió a cromatografía al vacío, empleando como fase móvil mezclas de n-hexano: acetato de etilo en polaridad creciente, obteniéndose un total de 9 subfracciones de acuerdo al monitoreo en cromatografía de capa fina (CCF). La fracción PC-3 se purificó mediante la cromatografía flash, empleando como fase móvil una mezcla de polaridad creciente de n-hexano: acetato de etilo, obteniéndose 14,7 g (7,24 % de la resina), de una mezcla de compuestos α y β amirina en una proporción 8:2 calculada mediante CG/EM.

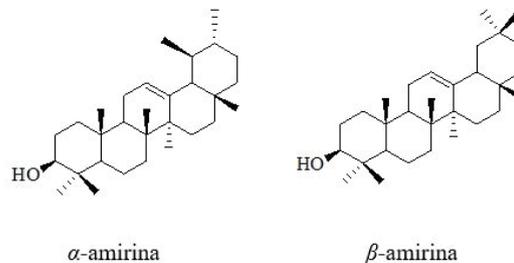


Fig. 1. Estructuras de la mezcla de α -, β -amirina.

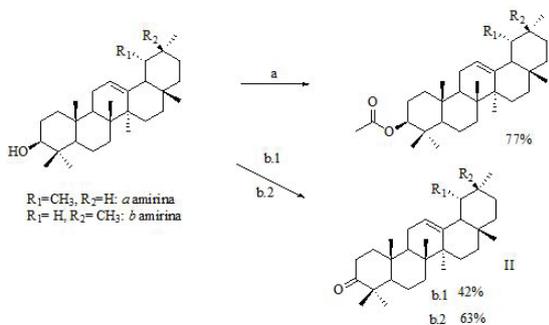


Fig. 2. Derivados obtenidos por hemisíntesis de la mezcla de α/β -amirina.

a) Acetilación de la α/β -amirina [3-acetil- α/β -amirina] (a). En un balón de reacción de 100 mL que contenía 20 mL de anhídrido acético (Ac_2O ; 0,2115 mmol), se agregó una mezcla de α - y β -amirina (100 mg; 0,2347mmol), luego se adicionó 0,5 mL de piridina, y se dejó reaccionar durante 24 horas, a temperatura ambiente con agitación constante. La reacción fue monitoreada por CCF usando una mezcla de n-hexano:Acetato de Etilo 80: 20 como fase móvil. Al producto de la reacción se le añadió 25 mL de agua destilada, hielo y se agitó con 25 mL de cloroformo ($CHCl_3$) en un embudo de separación. La fase orgánica se concentró a presión reducida en un rotavapor para obtener 86,15 mg de un sólido blanco (con un 77 % de rendimiento), El IR (KBr) del producto mostró una fuerte banda a 1735 cm^{-1} ($R-CO-O-R'$; $C=O$), en tanto que el espectro de resonancia ($RMN-^1H$, 300 MHz, $CDCl_3$) muestra a δ 4,50 (t, H-3) y δ : 5,12 (t, H-12) señales de desplazamientos químicos para protones en carbonos insaturados con esqueletos del oleano, en tanto que a δ 4,56 (t, H-3) y δ 5,17 (t, H-12), aparecen los tripletes típicos atribuidos al protón unido al carbón que carga un acetato. Por otra parte, a δ 2,04 se observa un singulete que solapa los grupos metilos tanto del acetato de la α -amirina como de la β -amirina. En el espectro de $RMN-^{13}C$ (300 MHz, $CDCl_3$) se observan 60 señales que corresponden a las dos moléculas isómeras que tienen 32 C cada una, las cuales tienen 8 C con similar δ y 56 carbonos con diferentes δ . Entre estas señales se destaca el δ a 81,0 ppm correspondiente al metino unido ahora al grupo acetilo en la posición C-3. Adicionalmente, en dicho espectro aparecen dos nuevas señales las cuales son congruentes con el grupo acetilo insertado en la nueva molécula, con un δ a 171,1 ppm para el grupo carbonilo o C-1' y 21,5 ppm para el grupo metilo o C-2'.

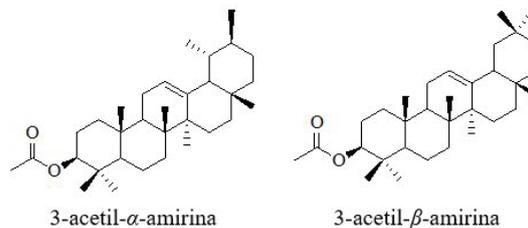


Fig. 3. Derivados por acetilación de la α/β -amirina.

b) oxidación de la α/β -amirina [3-oxo- α/β -amirina].

b.1) Oxidación de la mezcla de α -amirina y β -amirina con trióxido de cromo (CrO_3). Se preparó el reactivo de Sarett, adicionando en un balón de 100 mL, 40 mL de diclorometano (DCM), 4,9 mL (4,8113 mmol) de piridina, y 70,70 mg (0,7071 mmol) de trióxido de cromo (CrO_3), con agitación constante hasta observar la formación de un precipitado anaranjado. A 100 mg (0,2346 mmol) de la mezcla de α y β -amirina disueltos en 10 mL de diclorometano, se le adicionó el reactivo de Sarett recientemente preparado y se mantuvo en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente [13]. La mezcla de reacción se retomó con 10 mL de agua y se extrajo con 20 mL de éter etílico. La fase orgánica se recuperó y evaporó a total sequedad obteniéndose 42 mg de la mezcla de 3-oxo- α y 3-oxo- β -amirina, lo cual equivale a un 42 % de rendimiento.

b.2) Oxidación de la mezcla de α/β -amirina con clorocromato de piridinio (PCC). En un balón de 100 mL, que contenía 10 mL de diclorometano, se agregó 100 mg de la mezcla de α -, β -amirina (0,2347 mmol), 20 mL de anhídrido acético (0,0423 mmol), 9 mL de ácido acético (0,1572 mmol), y finalmente 215 mg de PCC (0,9278 mmol) disueltos en 5 mL de diclorometano. Se calentó a reflujo durante 6 h [14], al cabo de este tiempo continuó con agitación constante durante 24 h. la suspensión resultante se filtró, se le agregó 20 mL de éter etílico y luego 10 mL de agua destilada. La fase orgánica se recuperó y el solvente se evaporó a presión reducida en rotavapor, obteniéndose 63 mg de producto oxidado, donde la relación α/β -amirina es de 8:2 en proporción.

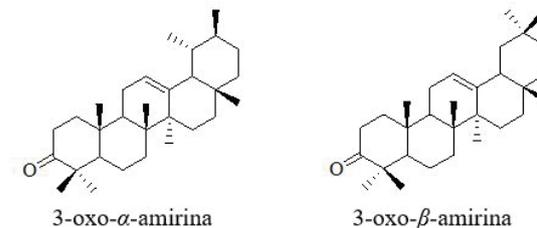


Fig. 4. Derivados obtenidos por oxidación de la α/β -amirina.

Actividad Antibacteriana

Microorganismos. Las bacterianas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Se prepararon preinóculos con 20 mL de caldo nutritivo, los cuales fueron incubados a 37 °C durante 18 horas. El material biológico fue proporcionado por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y mínima bactericida (CBM). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) y las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) fueron determinadas por el método de microdilución en medio líquido descrito por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS), en placas de Elisa de 96 pozos de fondo plano [15,16], ensayando las muestras a una concentración máxima de 400 µg/mL para compuestos puros. Para el ensayo se depositaron 200 µL de cada muestra en caldo Mueller Hinton, a una doble concentración de la requerida en los pozos de la columna 2, y 100 µL de medio en los pozos restantes, para llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µL de una suspensión del microorganismo a ensayar de concentración de 1×10^5 UFC, realizada a partir de los preinóculos preparados (20 mL de caldo nutriente con 200 µL de la suspensión bacteriana). Cada ensayo fue realizado por duplicado, como control negativo se inocularon pozos con la misma técnica, pero carentes de muestra, dimetilsulfóxido a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problema, y como control positivo soluciones antimicrobianas de acuerdo con cada microorganismo (Sultamicilina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina y Vancomicina). El blanco se preparó añadiendo 200 µL de medio a todos los pozos de la primera columna de la placa, se tomaron 100 µL de cada suspensión bacteriana, y se agregaron en placas Petri a fin de saber la concentración inicial de éstas. Tras 24 horas de incubación, a 37 °C en agitación orbital, se determinó la turbidez de los cultivos, de aquellos pozos que mostraron poco crecimiento, se tomaron alícuotas (100 µL) para efectuar un recuento de viables en placas de Petri con agar nutritivo con el fin de establecer la CIM del producto a la cual no hubo crecimiento y CBM de producto que produjo

la muerte del 99,9 % de la población inicial.

Determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH. Para el desarrollo de la actividad antioxidante se utilizó el reactivo DPPH, ácido ascórbico y metanol grado reactivo como solvente. Se probó la actividad antioxidante de la mezcla de α/β -amirina, así como algunos de los derivados obtenidos por semisíntesis, junto con el ácido gálico como patrón de comparación de actividad. El registro de las medidas de absorbancia fueron llevadas a cabo en un espectrofotómetro UV-visible, Marca Thermo Electrón Corporation a una longitud de onda de 517 nm.

Los compuestos obtenidos fueron evaluados a diferentes concentraciones; siendo comparados frente al ácido ascórbico; para llevar a cabo el ensayo en primer lugar se preparó una solución del reactivo de DPPH a una concentración de $6,10^{-2}$ mM en metanol, seguidamente se construyó una curva patrón a partir de la medición de la absorbancia del radical DPPH a diferentes concentraciones. Posteriormente, se tomó una alícuota de 200 µL de cada muestra en diferentes concentraciones, la cual se adicionó a un volumen de 2,8 mL de la solución preparada de DPPH. La reacción se dejó en incubación por un período de 30 minutos a 30 °C en la oscuridad, transcurrido este tiempo se procedió a realizar las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Las mediciones de cada concentración se realizaron por triplicado, luego los valores de absorbancia medidos fueron utilizados para determinar el porcentaje de captación de radicales libres DPPH (porcentaje de DPPH inhibido: %DPPH) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{DPPH}_{\text{inhibido}} = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) \times 100 / A_{\text{control}}$$

En donde:

A_{control} = Absorbancia del patrón de referencia

A_{muestra} = Absorbancia de la muestra

Los valores de Concentración Inhibitoria (CI_{50}) se calcularon a partir de los gráficos del porcentaje de inhibición y las concentraciones de los tratamientos. El ácido ascórbico fue usado como patrón de referencia a una concentración de 1mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mezcla de α/β -amirina (14,70 g), fue obtenida de la resina de *P. carana* March (Bursaceae) como

fue descrito anteriormente, y presentó un punto de fusión 189-190 °C. El espectro de masas mostró un ion molecular a m/z : 426,40 $[M^+]$, congruente con la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. El espectro infrarrojo (IR) presenta bandas características a 3341 cm^{-1} , 2945 cm^{-1} y a 1032 cm^{-1} , señales correspondientes a grupos OH y carbonos sp^3 y sp^2 respectivamente. En el espectro de RMN- ^{13}C ($CDCl_3$; 75,5 MHz) se observan 54 señales que corresponden a los diferentes carbonos que conforman los dos isómeros, los cuales presentan 6 carbonos con desplazamientos iguales para cada isómero y 48 carbonos que se logran diferenciar y poder caracterizar para cada compuestos. Entre estas señales destaca de forma similar el desplazamiento a 79,1 ppm correspondiente a los carbonos que se encuentran unidos a oxígeno en la posición C-3; adicionalmente se observa el δ de C-19 y C-20 a 39,7 ppm para la α -amirina y para la β -amirina a 46,9 ppm para el C-19 y 31,2 ppm para el C-20, lo que determina el tipo de núcleo oleanano. Igualmente a campo bajo se aprecian los δ del metino olefínico del C-12 a 124,5 ppm y el carbono cuaternario olefínico C-13 a 139,7 ppm para la α -amirina; para la β -amirina se observan los mismos carbonos pero con desplazamientos de 121,8 ppm y 145,3 ppm para los C-12 y C-13, respectivamente. En el espectro RMN- 1H ($CDCl_3$; 300 MHz) destacan las señales de los metinos hidroxilados H-3 a un δ de 3,24 ppm para la α -amirina y 3,21 ppm para la β -amirina. En el experimento COSY 1H - 1H ($CDCl_3$; 300 MHz), se aprecian las correlaciones de H-3 (δ_H : 3,24) con H-2 (δ_H : 1,62) para la α -amirina y de H-3 (δ_H : 3,21) con H-2 (δ_H : 1,61) para la β -amirina; asimismo la del protón olefínico H-12 (δ_H : 5,12) con H-11 (δ_H : 1,90) para la α -amirina y el protón olefínico H-12 (δ_H : 5,17) con H-11 (δ_H : 1,81) para la β -amirina. En el experimento HSQC 1H - ^{13}C ($CDCl_3$; 300 MHz), se observan las siguientes correlaciones para la α -amirina: H-3 (δ_H : 3,24) con C-3 δ_C : 79,1); H-5 (δ_H : 0,71) con C-5 (δ_C : 55,3); H-12 (δ_H : 5,12) con C-12 (δ_C : 124,5) y H-15 (δ_H : 1,99) con C-15 (δ_C : 27,4); y para la β -amirina: H-3 (δ_H : 3,21) con C-3 (δ_C : 79,1); H-5 (δ_H : 0,77) con C-5 (δ_C : 55,3); H-12 (δ_H : 5,17) con C-12 (δ_C : 121,8); H-15 (δ_H : 1,92) con C-15 (δ_C : 26,3) y H-16 (δ_H : 1,77) con C-16 (δ_C : 26,1). En el experimento HMBC 1H - ^{13}C ($CDCl_3$; 300 MHz) aparecen las correlaciones correspondientes a los protones alifáticos H-3 α, β ($\delta_{H\alpha}$: 3,24) y ($\delta_{H\beta}$: 3,21) con C-1 α (δ_C :38,9) y C-1 β (δ_C :38,7), C-2 α (δ_C :28,8), C-4 α, β ($\delta_{C\alpha}$:38,9) y ($\delta_{C\beta}$:38,8) y C-23 α ($\delta_{C\alpha}$:28,2) y ($\delta_{C\beta}$:28,1); H-23 α, β ($\delta_{H\alpha}$: 1,06) y ($\delta_{H\beta}$: 0,96) con

C-3 α, β (δ_C :79,1); H-5 α, β ($\delta_{H\alpha}$:0,71) ($\delta_{H\beta}$:0,77) con C-3 α y β (δ_C :79,1) y con C-24 ($\delta_{C\alpha}$:15,7) ($\delta_{C\beta}$: 15,6); H-12 α (δ_H : 5,12) con C-9 (δ_C :47,8), C-11 (δ_C :23,5) y C-13 (δ_C :139,7) figura 5; El análisis de los datos espectroscópicos así como de las distintas correlaciones observadas permitió asignar el patrón de sustitución para ambos compuestos quedando confirmada que la mezcla está compuesta por los isómeros triterpénicos, conocidos comúnmente α -amirina (3β -Urs-12-en-3-ol) y el otro de núcleo oleanano nombrado frecuentemente β -amirina (3β -Olean-12-en-3-ol).

En concordancia con lo anteriormente expuesto, se determinó que el compuesto I corresponde con una mezcla de isómeros triterpénicos, uno de núcleo ursano llamada comúnmente α -amirina (3β -Urs-12-en-3-ol) y el otro de núcleo oleanano nombrado frecuentemente β -amirina (3β -Olean-12-en-3-ol).

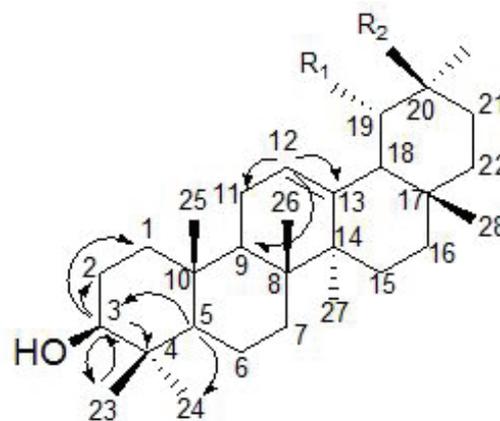


Fig. 5. Correlaciones del experimento HMBC de la α -, β -amirina Compuesto I.

Los derivados acetilados se obtuvieron al tratar la mezcla de α/β -amirina disuelta en piridina con Ac_2O a temperatura ambiente, y fueron caracterizados por: IR (KBr; ν cm^{-1}) = 1735 (R-CO-O-R'; C=O); Espectro de RMN- 1H ($CDCl_3$; 300 MHz) δ = 0,79-1,89 ppm (característica del perfil de la α/β -amirina), δ H-3 α : 4,50 ppm (*t*, H-3 del acetato de α -amirina), δ H-3 β : 4,56 ppm (*t*, H-3 del acetato de β -amirina); δ H-12 α : 5,12 ppm (*t*, H-12 del acetato de α -amirina), δ H-12 β : 5,17 ppm (*t*, H-12 del acetato de β -amirina), δ H-2': 2,04 ppm (*s*, H- éster metilo del acetato de la α/β -amirina). Espectro de RMN- ^{13}C ($CDCl_3$; 300 MHz), destaca de forma similar el desplazamiento a δ C-3 α, β : 81,0 (C-3), δ C-1' α, β : 171,1 (C-1', C=O) y δ C-2' α, β : 171,1 (C-2', CH₃), el resultado

de la mezcla es de 3:1 α/β -amirina de acuerdo a la integración del espectro [3-acetil- α -amirina y 3-acetil- β -amirina].

El análisis espectroscópico de los compuestos B.1 y B.2 mostró: IR (KBr; ν cm^{-1}) = 1703 (C=O); Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) δ (ppm) = 0,74-1,13 (característica de la α/β -amirina), δ H-2 α : 2,54 (m, H-3 del derivado oxo de α -amirina), δ H-2 β : 2,37 (m, H-3 del derivado oxo de β -amirina); δ H-12 α : 5,14 (t, H-12 del derivado oxo de α -amirina), δ H-12 β : 5,19 (t, H-12 del derivado oxo de β -amirina). El espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) δ (ppm) muestra una señal a δ C-3 α,β 218 C-3, la cual evidencia la presencia de un grupo carboxílico correspondiente a una cetona confirmando la oxidación del alcohol secundario sobre C-3, β : 218,0 (C-3) que confirma el cambio del grupo funcional de alcohol a carbonilo. Las señales de los carbonos fueron observadas al δ C-19, 20 α : 39,7 (C-19, C-20), y para la β -amirina δ C-19 β : 46,9 (C-19) δ C-20 β : 31,2 (C-20); el resultado de la mezcla es de 8:2 α/β -amirina [3-oxo- α - β -amirina].

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana, observándose, que los compuestos evaluados están por encima de la concentración 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; verificado por recuento en placas de Petri con agar nutritivo.

TABLA 1

Actividad antimicrobiana de los derivados semisintéticos de los triterpenos α/β -amirinas por el método de microdilución.

MICROORGANISMOS		Muestras evaluadas			Control positivo: compuestos de referencia				
		A	B	C	CRO	VA	CIP	SUL	GM
		(ug/mL)							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CIM	>400	>400	>400	+	+	+	NA	+
	CBM	>400	>400	>400					
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM	>400	>400	>400	NA	+	NA	+	NA
	CBM	>400	>400	>400					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM	>400	>400	>400	+	NA	NA	NA	+
	CBM	>400	>400	>400					
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	CIM	>400	>400	>400	+	NA	NA	NA	+
	CBM	>400	>400	>400					
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CIM	>400	>400	>400	+	NA	NA	NA	+
	CBM	>400	>400	>400					

A: 3-acetil- α/β -amirina; B: 3-oxo- α/β -amirina; C: α/β -amirina; CRO: Ceftriaxona; VA: Vancomicina; CIP: Ciprofloxacina; SUL: Sultamicilina; GM: Gentamicina; CIM: concentración inhibitoria mínima, CBM: concentración bactericida mínima, NA: no activo.

Por último y en conexión con lo expuesto anteriormente podemos indicar que además de la poca actividad antioxidante y anti bacteriana detectada sobre la α/β -amirina, 3-acetil- α/β -amirina (Compuesto A) y el 3-oxo- α/β -amirina

(Compuesto B), la α/β -amirina, y algunos otros derivados obtenidos por hemisíntesis han mostrado poseer diferentes actividades farmacológicas in vitro e in vivo, sobre patologías relacionadas con la salud, estas incluyen actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, en infecciones virales y sobre células cancerígenas [18-20].

CONCLUSIONES

De la resina de *P. carana* March (Burseraceae), se obtuvo la mezcla α/β -amirina, que se identificó mediante el análisis espectroscópico como una mezcla de triterpenos de núcleo ursano y oleanano, adicionalmente, a partir de la mezcla de isómeros aislada se prepararon la mezcla de derivados semisintéticos: el 3-acetil- α/β -amirina (Compuesto A) y el 3-oxo- α/β -amirina (Compuesto B). En base a los resultados obtenidos de la evaluación microbiológica de los compuestos ensayados contra la bacterias Gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis* y Gram negativas *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, se determinó que todos poseen una CIM y CBM superior a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado; en los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método del DPPH, se observó que la α/β -amirina ensayada a una concentración de 1,000 mg/mL posee un 21 % de inhibición de DPPH, lo cual no es representativo de una buena actividad, y los derivados semisintéticos de igual forma no presentaron actividad antioxidante. La resina de *P. carana* March, se puede considerar una fuente de la mezcla α/β -amirina, núcleos importantes por las actividades biológicas que presentan.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT), Proyecto N° 200801594 y por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes (ULA), Proyecto N° FA-578-15-08-A.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Heywood VH. Plantas florecientes del mundo. Oxford: Prensa de la Universidad de Oxford. 1993.
- [2] Weeks A, Daly D, Simpson B. The phylogenetic history biogeography of the frankincense myrrh family (Burseraceae) based on nuclear chloroplast

sequence data. Mol Phylogenet Evol. 2005; 35(1):85-101.

[3] Siqueira JBG. Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero *Protium*: *P. tenuifolium* (Engl.) Engl. e *P. laxiflorum* Engl. (Burseraceae) in Manaus, Manaus Brazil. 1991.

[4] Matsuda PT, Ran X, Gia C, Fazio M. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. Phytochem. 2004; 65(3):261-291.

[5] Susunaga GS, Siani AC, Pizzolatti MG, Yunes RA, Monache FD. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. Fitoter. 2001; 72(6):709-711.

[6] Cruz-Cañizares J, Domenech MT, Gimeno JV, Mateo R, Bosh F. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A. 2005; 1093(1-2):177-194.

[7] Duwiejua M, Zietlin IJ, Waterman PG, Chapman J, Mhango GJ, Provan GJ. Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. Planta Med. 1993; 59(1):12-16.

[8] Harley MM, Song U, Banks HI. Pollen morphology and systematics of Burseraceae. Grana. 2005; 44(4):282-299.

[9] Mabberley DJ. Mabberley's Plant-Book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses. 3ra ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

[10] Lawrence GHM. Taxonomy of Vascular Plants. New York: The MacMillan Company. Field and Herbarium Technique. 1951. Chapter XI. p. 823.

[11] Tamai M, Watanabe M, Someya H, Kondoh S, Omura ZP, Ling R, et al. New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. Planta Med. 1989; 55(1): 44-47.

[12] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. XIII.

New York: Springer-Verlag. 1984. p. 320.

[13] Cannon JR, Chow PW, Jefferies PR, Meehan GV. Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic acid and 15 β -hydroxy(-)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude* Bartl. Aust. J Chem. 1966; 19(5):861-867.

[14] Corey EJ, Suggs W. Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compound. Tetrahedron Lett. 1975; 16(31):2647-2650.

[15] Wink M, Reichling J, Zimmermann S, Sporer F, Mulyaningsih S. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine. 2010; 17(13):1061-1066.

[16] Jorgensen J, Turnidge J. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. 11va ed. Washington: ASM Press; 2015. p. 1253-1273.

[17] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. The use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995; 28(1):25-30.

[18] Pinto H, Pinto L, Cunha, G, Chaves M, Santos F, Rao V. Anti-inflammatory effect of α,β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. Inflammopharmacology. 2008; 16:48-52.

[19] Johann S, Soldi C, Lyon J, Pizzolatti M, Resende M. Antifungal activity of the amyirin derivatives and In vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial. Lett Appl Microbiol. 2007; 45:148-153.

[20] Hernández L, Palazon J, Navarro-Ocaña A. The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities. In: Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. InTech, China 2012:487-502.