



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA  
DEL EXTRACTO DE *Bursera aptera* Ramírez

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

RODRÍGUEZ LÓPEZ MARLENE GUADALUPE

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **RECONOCIMIENTO**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) campus Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

M. en C. Ángel Durán Díaz

Biól. Luis Barbo Hernández Portilla

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

UNAM PAPIIT IN218511

UNAM PAPIIT IN213713

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis Dra. Ma. Margarita Canales, por todas sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio para la realización de esta tesis y en este camino llamado vida, gracias por ser una excelente persona de gran calidad humana y demostrar que se puede lograr el éxito siendo fieles a nuestros principios, un ejemplo de perseverancia y grandeza.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por todo su apoyo y enseñanzas para la terminación de esta tesis, gracias por mostrar que todo depende del cristal con que se mire y que una buena actitud frente a los retos lo cambia todo, por ser una gran persona y brindar su confianza, un gran papá académico o tío, el título no demerita el sentimiento.

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz, por sus acertadas observaciones, sin las cuales no hubiese sido posible la finalización de este proyecto, gracias.

Al M. en C. Ángel Durán Díaz por su ayuda para realizar los cálculos estadísticos y observaciones para el enriquecimiento de esta tesis, muchas gracias.

Al Biol. Luis Barbo Hernández Portilla, por sus observaciones para la finalización de este proyecto, muchas gracias.

## DEDICATORIAS

A mi familia, por su apoyo, paciencia y cariño incondicional; a mis padres Ma. del Carmen López y José R. Rodríguez por todo el esfuerzo realizado a pesar de las dificultades y por mostrar que las cosas más valiosas de la vida son las más sencillas, sin ustedes no lo hubiera logrado, gracias por tanto.

A mi hermana Karina Rodríguez L. por estar siempre cuando te necesito y saber mirar la vida con optimismo por alegrar mis días y ser la mejor hermana.

A mi tío Pedro, la persona más noble y contenta, por todos los buenos momentos que compartimos con él.

A la familia López por sus enseñanzas además de la eterna fiesta y alegría; David, Juanita, Ma. de Lourdes, Héctor, Lulú, Cuauhtémoc, Maricela, Griselda, Gabriel, Rosario y Antonio, y los que faltan.

A mis amigos y hermanos: Diana, Mairim, Jonathan, Anel, Abraham, Julio, Valentín, Maritza y Diego, por los buenos momentos y por seguir conservando aquello que nos conecta a pesar de las circunstancias espacio temporales.

A Inmuno-Farma que más que profesores y compañeros conocí grandes personas que me han brindado su amistad, a la maestra Margarita, al profe Marco, a Ana por enseñarme las técnicas dentro y fuera del lab, a Lesslie por hacerme los días más alegres, a Rebeca, Javier, Miriam, Michael, Mario, Itzel, Charly y Ale.

*“Si las puertas de la percepción quedaran depuradas todo se habría de mostrar al hombre tal cual es: infinito” W. Blake*

---

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN .....	14
INTRODUCCIÓN .....	15
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
Colecta del material .....	21
Obtención del extracto metanólico.....	21
<b>Pruebas Biológicas</b> .....	<b>22</b>
Actividad antibacteriana.....	22
Evaluación cualitativa.....	22
Evaluación cuantitativa.....	22
Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano .....	22
Actividad antifúngica.....	23
Hongos levaduriformes .....	23
Evaluación cualitativa .....	23

---

Hongos filamentosos.....	24
Evaluación cualitativa.....	24
Evaluación cuantitativa.....	24
Citotoxicidad.....	25
<b>Pruebas Químicas.....</b>	<b>25</b>
Actividad antioxidante del extracto.....	25
Fenoles totales.....	25
Flavonoides.....	26
Caracterización fitoquímica del extracto.....	26
Análisis estadístico.....	26
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
Rendimiento.....	27
Actividad antibacteriana.....	27
Evaluación cualitativa.....	27
Evaluación cuantitativa.....	30
Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	31
Actividad antifúngica.....	32
Evaluación cualitativa.....	32

---

Evaluación cuantitativa.....	33
<i>Aspergillus niger</i> CDBB-H-179.....	34
<i>Aspergillus</i> sp. FES Iztacala.....	35
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265.....	36
<i>Fusarium sporotrichioides</i> NRLL3299.....	37
<i>Rhizoctonia lilacina</i> CBBB-H-306.....	38
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CDBB-H-1112.....	39
Citotoxicidad .....	40
Actividad antioxidante del extracto .....	41
Fenoles y flavonoides totales.....	42
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	42
DISCUSIÓN .....	46
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS.....	54
APÉNDICE 1 .....	55
Familia Burseraceae .....	55
APÉNDICE 2.....	56
Antecedentes del género <i>Bursera</i> .....	56



---

APÉNDICE 3 .....	60
<i>Bursera aptera</i> Ramírez.....	60
APÉNDICE 4 .....	64
Zona de colecta .....	64
APÉNDICE 5 .....	67
Método de difusión en agar de Kirby-Baüer.....	67
APÉNDICE 6 .....	69
Microtécnica de dilución en caldo .....	69
APÉNDICE 7 .....	70
Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano .....	70
APÉNDICE 8 .....	72
Inhibición del crecimiento radial.....	72
APÉNDICE 9 .....	73
Citotoxicidad .....	73
APÉNDICE 10 .....	75
Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) .....	75
APÉNDICE 11 .....	76
Conteo de fenoles totales .....	76

APÉNDICE 12.....	77
Cuantificación de flavonoides totales.....	77
APÉNDICE 13.....	78
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) ..	78
LITERATURA CITADA.....	79

---

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas bacterianas utilizadas.....	23
Cuadro 2. Cepas de hongos levaduriformes utilizadas. ....	23
Cuadro 3. Cepas de hongos filamentosos utilizadas.....	24
Cuadro 4. Halos de inhibición en bacterias frente al extracto y frente a cloranfenicol. ....	27
Cuadro 5. CMI y CBM del extracto metanólico de <i>B. aptera</i> para las cepas bacterianas.....	30
Cuadro 6. CF <sub>50</sub> del extracto metanólico de <i>B. aptera</i> para las cepas de hongos filamentosos. ....	33
Cuadro 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre <i>Aspergillus niger</i> . ....	34
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre <i>Aspergillus</i> sp....	35
Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre <i>Fusarium moniliforme</i> .....	36
Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre <i>Fusarium sporotrichioides</i> . ....	37
Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre <i>Rhizoctonia lilacina</i> . ....	38
Cuadro 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	39

---

Cuadro 13. Compuestos encontrados en el extracto metanólico de <i>B. aptera</i> con el análisis CG-EM. ....	44
Cuadro 14. Antecedentes de <i>Bursera</i> . ....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Maceración de <i>B. aptera</i> . ....	21
Figura 2. Destilación del extracto metanólico crudo en el rotavapor. ....	21
Figura 3. Extracto metanólico de <i>B. aptera</i> ....	21
Figura 4. Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición por tipo bacteriano. ....	28
Figura 5. Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición por cepa bacteriana. ....	29
Figura 6. Actividad del extracto metanólico de <i>B. aptera</i> sobre la curva de crecimiento de <i>E. faecalis</i> . ....	31
Figura 7. Actividad del extracto metanólico de <i>B. aptera</i> sobre la curva de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	32
Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> . ....	34
Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus</i> sp. ....	35
Figura 10. Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium moniliforme</i> . ....	36
Figura 11. Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium sporotrichioides</i> . ....	37
Figura 12. Inhibición del crecimiento radial de <i>Rhizoctonia lilacina</i> . ....	38

Figura 13. Inhibición del crecimiento radial de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . ....	39
Figura 14. Curva de mortalidad en macrófagos P-388 frente al extracto metanólico de <i>B. aptera</i> .....	40
Figura 15. Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico de <i>B. aptera</i> ..	41
Figura 16. Cromatograma del análisis CG-EM del extracto metanólico de <i>B. aptera</i> . ....	43
Figura 17. <i>Bursera aptera</i> en la zona de colecta.....	63
Figura 18. Hojas de <i>B. aptera</i> .....	63

## **ABREVIATURAS**

<b>CA<sub>50</sub></b>	Concentración Antioxidante media
<b>CF<sub>50</sub></b>	Concentración Fungicida media
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria media
<b>CBM</b>	Concentración Bactericida Mínima
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CFM</b>	Concentración Fungicida Mínima
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en ingles)
<b>DPPH</b>	Radical 2,2 – difenil-1- picrilhidracil
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino (por sus siglas en ingles)
<b>eag</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>ec</b>	Equivalentes de catequina
<b>eq</b>	Equivalentes de quercetina

## RESUMEN

Las plantas como recurso medicinal representan el medio terapéutico para el 80% de la población mundial y se estima que el 15% de la flora en México posee propiedades medicinales. El presente estudio se fundamentó en los usos etnomedicinales y estudios fitoquímicos reportados para el género *Bursera*, al que es perteneciente *B. aptera*, la cual es originaria de la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán reserva de la biosfera. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto. Se realizaron los siguientes ensayos: a) se obtuvo el extracto metanólico, b) se evaluó cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto, c) se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM), d) se delimitó la actividad bacteriostática empleando una cinética bacteriana con las cepas bacterianas *V. cholerae* y *E. faecalis*, e) se determinó cualitativamente y cuantitativamente la actividad antifúngica, f) se evaluó la citotoxicidad del extracto, g) se determinó la actividad antioxidante, h) se cuantificó la cantidad de fenoles totales y flavonoides, i) se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El extracto mostró actividad tanto en bacterias Gram positivas, como en Gram negativas, los mayores halos de inhibición en *V. cholerae* y *E. faecalis* y *V. cholerae*, las cuales presentaron las CMI (2 mg/mL y 4 mg/mL respectivamente) y CMB (8 mg/mL) más bajas, además de un comportamiento bacteriostático en la curva de crecimiento. Presentó actividad antifúngica, siendo las 6 cepas sensibles, destacando *F. sporotrichioides* y *R. lilacina*. La alta capacidad antioxidante media (11.72 µg/mL) se correlaciona con el contenido de fenoles totales y flavonoides en proporción al peso de la planta (0.145% y 0.035%). El compuesto detectado en mayor abundancia en la GC-MS fue la Podofilotoxina. Dados los resultados obtenidos es evidente el potencial para posibles investigaciones basadas en las propiedades de los extractos de la especie frente a otros microorganismos o agentes patógenos, en el tratamiento contra enfermedades crónico degenerativas, así como en futuras investigaciones quimiotaxonómicas.

## INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud menciona que las infecciones por microorganismos patógenos (principalmente bacterias y hongos) ocupan la tercera causa de muerte en el mundo, sobre todo en países con altos índices de marginación, en vías de desarrollo (OMS, 2010).

Desde el descubrimiento de la penicilina, se han producido numerosos antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, lo que fue disminuyendo su incidencia y en consecuencia, el número de muertes por esta causa. Sin embargo, los antibióticos pueden provocar efectos adversos en el organismo como: alergias, disbacteriosis, sobrecrecimientos, resistencia y toxicidad (Panilio et al., 1992), aunado a lo anterior el uso generalizado e indiscriminado de los antimicrobianos aceleró el desarrollo de mutaciones en los microorganismos, lo que llevó a que éstos se volvieran cada vez más resistentes a tales compuestos. Dicha resistencia se fue propagando a través de las diferentes poblaciones microbianas y con ello se vio comprometida seriamente la habilidad de los antimicrobianos para tratar dichas infecciones (Muñoz et al., 2004).

Actualmente la utilización de compuestos puros aislados, incluyendo fármacos sintéticos, está bien difundida; no obstante, ha renacido el interés de la ciencia médica por los sistemas fitoterapéuticos que utilizan recursos vegetales para remediar múltiples afecciones, fundamentando su eficacia, en parte, en la acción biológica de sus componentes químicos. Por ello, son objeto de considerable atención científica las plantas utilizadas en la medicina tradicional de países como India, China y México (Trease y Evans, 1991).

Otro factor que impulsa el interés renovado en los antimicrobianos vegetales en los últimos 20 años ha sido el rápido ritmo de extinción de las especies vegetales, dado que hay una multitud de productos naturales con estructuras fitoquímicas potencialmente útiles que podrían ser sintetizados químicamente y están en riesgo de perderse irremediablemente (Cowan, 1999). Aunado a lo anterior su estudio



podría servir como instrumento de apoyo médico-social para un mayor grupo poblacional, principalmente el más carente. Es de esta manera como el conocimiento tradicional de las plantas ha contribuye al estudio científico en diversas áreas de investigación (Araujo y Salas, 2008), siendo parte fundamental para su conservación, rescate y difusión, así como para la preservación de la biodiversidad (Puerta y León, 2009).

Las plantas medicinales constituyen la suma de un conocimiento ancestral que ha sido transmitido de generación en generación y les ha valido su eficacia la permanencia dentro de cada cultura cuya fuente podría ser disímil pero el mismo principio activo (Ocampo y Jiménez, 1993). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002) la medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales, ya sea mediante el uso de plantas, partes de animales y/o minerales. En este sentido se estima según datos de la OMS 2003, que el uso de extractos o principios activos de las plantas medicinales representan el medio rutinario terapéutico para el 80% de la población mundial (Akerle, 1993; Osorio, 2009).

En México las plantas medicinales son el medio terapéutico por excelencia, al ser el recurso más abundante, accesible y conocido (Mata et al., 2009). Una aproximación estima que en el país se encuentra al menos 10% de la diversidad terrestre del planeta (Mittermeier y Goettsch, 1992), con la cual conviven 52 etnias. Dicho atributo deriva de poseer una de las floras más complejas y variadas; el número de especies oscila entre 22 000 y 31 000, mismas que en parte le confieren el carácter megadiverso al país (Llorente y Ocegueda, 2008). De estas especies 4 000 (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (Ocegueda et al., 2005).

La diversidad de recursos naturales y culturales no es el único rasgo distintivo de México, sino también lo es, su alto índice de endemismos, es decir, de especies originarias dentro de los límites geopolíticos del país (INE, 2007). Un ejemplo es la región del valle de Tehuacán–Cuicatlán decretada Reserva de la Biosfera (CONANP, 1998) la cual representa una variedad de comunidades vegetales que albergan un alto porcentaje de especies de plantas endémicas (Smith, 1965a; Smith, 1965b; Villaseñor, 1992; Dávila et al., 1995; Dávila et al., 2002; Méndez et al., 2004).

En este contexto, el género *Bursera* perteneciente a la familia Burseraceae (Apéndice 1) que ha sido una fuente importante de resinas, aceites esenciales y perfumes (Rojas, 2012), es uno de los más representados de la familia; 84 de las 100 especies existentes, se encuentran presentes en el país principalmente en temperaturas cálidas en la costa del Pacífico y algunas son de distribución limitada (Rzedowski y Kruse, 1979). Diferentes especies del género han sido utilizadas en la medicina tradicional mexicana (Canales et al., 2005; Canales et al., 2006; Mora, 2009) y se han demostrado propiedades farmacológicas importantes entre las que destacan antioxidantes, antimicrobianas, antiprotozoarias, bioinsecticidas, citotóxicas y antitumorales (Apéndice 2).

Estas propiedades están asociadas a la composición química de cada especie, la cual depende de factores bióticos y abióticos, ya que la mayoría de los compuestos de interés farmacológico sintetizados y acumulados por las plantas son derivados de su metabolismo secundario como parte de la respuesta en la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos además del estrés ocasionado por las condiciones abióticas. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente inhibiendo directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en

ingles), las cuales son radicales libres como el ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el alcoxilo ( $RO\cdot$ ), el peroxilo ( $ROO\cdot$ ) y el óxido de nitrógeno ( $NO\cdot$ ), o pueden ser precursores de radicales libres como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singulete ( $\cdot O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y que son tóxicas para la misma célula vegetal (Sepúlveda et al., 2003). Lo anterior explicaría en parte la amplia variedad de productos naturales de bajo peso molecular (más de 100.000) sintetizados por las plantas, muchos de los cuales han evolucionado para conferirles una ventaja selectiva contra el ataque microbiano (Dixon, 2001).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono, se agrupan en cuatro clases principales; terpenos, entre los que se encuentran hormonas, pigmentos y aceites esenciales; compuestos fenólicos, donde se encuentran flavonoides, lignanos, quinonas y taninos; glicósidos, donde se agrupan saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. Por este motivo se cree que las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar metabolitos secundarios, la mayoría de estos compuestos están relacionados con el fenol y sus derivados, sin embargo lo realizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

En este sentido la química de *Bursera* está dominada por terpenoides, en su mayoría monoterpenos y sesquiterpenos (Evans et al., 2000) mientras que diterpenos y triterpenos se producen en menor medida, esto debido a que realizan mezclas complejas que contienen muchos compuestos individuales, a menudo pertenecientes a varios tipos de terpenos (Becerra et al., 2001), ocasionando una gran variación en la composición química terpenoide (el número, la identidad, y las cantidades relativas de terpenoides individuales) (Domínguez et al., 1973; Syamasundar et al., 1991).

Otros compuestos relacionados a las especies de *Bursera* son los ácidos fenólicos, lignanos, saponinas, y sus derivados, muchos de los cuales presentan

potencial farmacológico. (Apéndice 2). Es por ello que es preciso desarrollar estudios científicos más profundos para conocer su composición y actividad biológica para su posible uso sustentable.

En el caso de *Bursera aptera*, ésta es una especie abundante y endémica de la región de Tehuacán-Cuicatlán (Rzedowski et al., 2004) donde el látex de la planta es utilizado mezclado con pomada para el tratamiento de picaduras de mosquitos (Aguilar et al., 1994). Vásquez, 2012 realizó un estudio preliminar donde encontró que el extracto metanólico de *B. aptera* en una colecta en el 2008 presenta actividad antibacteriana y una composición rica en ácidos fenólicos y sesquiterpenos. Gómez et al., 2012 encontraron actividad tóxica del extracto metanólico de *B. aptera* de otra colecta frente a *Artemia salina*. Es por este motivo que en el presente estudio se pretende ampliar el conocimiento sobre esta especie a partir de su extracto metanólico, al determinar su actividad antibacteriana frente a algunas cepas de bacterias, ya sean Gram negativas o Gram positivas, así como la actividad antifúngica frente a cepas de levaduras y hongos filamentosos, su citotoxicidad, su capacidad antioxidante, la cuantificación de sus compuestos fenólicos y flavonoides, además de la caracterización de algunos de sus compuestos químicos para su futuro aislamiento y potencial uso sustentable.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar el efecto antibacteriano y antifúngico de *Bursera aptera*.

### Objetivos particulares

- Obtener el extracto metanólico por maceración.
- Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antimicótica sobre hongos levaduriformes del extracto de *Bursera aptera* mediante el método de difusión en agar.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), así como la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) a partir del método de microdilución en caldo.
- Identificar la actividad bacteriostática o bactericida empleando una curva de crecimiento bacteriano.
- Evaluar cualitativamente y cuantitativamente la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos por el método de inhibición del crecimiento radial.
- Evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de *B. aptera* mediante la prueba de viabilidad celular *in vitro* con Cristal Violeta.
- Definir la actividad antioxidante mediante el método de reducción del radical DPPH.
- Cuantificar la cantidad de fenoles totales a partir del método de Folin-Ciocalteu.
- Cuantificar la cantidad de flavonoides mediante el método de Dowd.
- Caracterizar fitoquímicamente el extracto usando una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta del material

La colecta del material de estudio se realizó a finales del año 2011 y principios de 2012 en la región de Tehuacán-Cuicatlán, Reserva de la Biosfera (Apéndice 4).

### Obtención del extracto metanólico

La obtención del extracto se llevó a cabo por el método de maceración (Domínguez, 1973). El material colectado (ramas, troncos y corteza) fue pesado y colocado en trozos en un matraz con metanol (Figura 1), para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo el cual se filtró y fue destilado a presión reducida en un rotavapor (Figura 2). El rendimiento del extracto se determinó con relación al peso seco de la planta (Figura 3).



**Figura 1.** Maceración de *B. aptera*.



**Figura 2.** Destilación del extracto metanólico crudo en el rotavapor.



**Figura 3.** Extracto metanólico de *B. aptera*

## ***Pruebas Biológicas***

### **Actividad antibacteriana**

#### *Evaluación cualitativa*

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se realizó mediante método de difusión en agar de Kirby-Baüer, en el cual los discos fueron impregnados con 2000 µg del extracto a probar; como control positivo se utilizaron discos con 25 µg de cloranfenicol, y como control negativo se utilizaron discos con 10 µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 5).

#### *Evaluación cuantitativa*

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) así como la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó la microtécnica de dilución en caldo, con concentraciones de 0.5, 1, 2, 4,6 y 8 mg/mL del extracto metanólico. Las cajas se inocularon con 50 µL de un cultivo bacteriano a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL y se incubaron durante 24 horas (Koneman et al., 1985) (Apéndice 6).

#### *Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano*

El efecto bactericida o bacteriostático de los extractos se identificó sobre una curva de crecimiento bacteriano. Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa (aquellas que presentaron los valores menores en las pruebas cuantitativas, es decir una mayor sensibilidad al extracto). Se monitoreó su crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ( $\frac{1}{2}$  CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Muroi et al., 1993) (Apéndice 7).

**Cuadro 1.** Cepas bacterianas utilizadas.

<b>Tipo</b>	<b>Cepa</b>	<b>ATCC, clasificación o donadas por:</b>
Gram positivas	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hospital Los Ángeles
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Gram negativas	<i>Enterobacter cloacae</i>	FES Cuautitlán
	<i>Proteus mirabilis</i>	Caso clínico
	<i>Salmonella typhimurium</i>	FES Cuautitlán
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V12 (El Tor)
	<i>Vibrio cholerae</i>	Caso clínico

\* El nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC), su clasificación o por quien fueron donadas.

## Actividad antifúngica

### Hongos levaduriformes

#### *Evaluación cualitativa*

Se realizó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 5). Los discos se impregnaron con 2000 µg del extracto metanólico. Para el control positivo se utilizaron discos impregnados con Nistatina (25 µg por cada disco). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

**Cuadro 2.** Cepas de hongos levaduriformes utilizadas.

<b>Cepa</b>	<b>*ATCC, clasificación o donadas por:</b>
<i>Candida albicans</i>	14065
<i>Candida albicans</i>	Laboratorio de Análisis clínicos de la CUSI, FES Iztacala
<i>Candida albicans</i>	ATCC 32354
<i>Candida tropicalis</i>	Hospital Los Ángeles



---

<i>Cryptococcus neoformans</i>	Laboratorio de Micología y Parasitología de la facultad de Medicina de la UNAM
--------------------------------	--

---

\* El nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC), su clasificación o por quien fueron donadas.

## Hongos filamentosos

### *Evaluación cualitativa*

Se realizó mediante la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 8) usando una concentración de 2000 µg por disco del extracto metanólico y como control positivo Ketoconazol (7 µg) y como control negativo se utilizaron discos impregnados con 10 µL de metanol (Wang y Bun, 2002).

### *Evaluación cuantitativa*

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y la concentración fungicida mínima (CFM), se realizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, 2002 (Apéndice 8). Las concentraciones para los bioensayos fueron: 0.5, 1, 2, 4,6 y 8 mg/mL, cada bioensayo se realizó por triplicado.

**Cuadro 3.** Cepas de hongos filamentosos utilizadas.

<b>Cepa</b>	<b>*ATCC, clasificación o donadas por:</b>
<i>Aspergillus niger</i>	CDBB-H-179
<i>Aspergillus sp.</i>	Fes Iztacala*
<i>Fusarium moniliforme</i>	CDBB-H-265
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	NRLL3299
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	CBBB-H-306
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112

---

\*El nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC), su clasificación o por quien fueron donadas.

\* Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, Laboratorio de Microbiología UBIPRO, Fes Iztacala.

## **Citotoxicidad**

Se utilizó la línea de macrófagos P-388 de ratón leucémico.

La prueba de toxicidad celular *in vitro* se llevó a cabo mediante el método de Cristal Violeta (Badisa et al., 2003), sembrando las células en placas de cultivo de 96 pozos, las cuales fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *B. aptera* (20 – 0.004 mg/mL), los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 9).

## ***Pruebas Químicas***

### **Actividad antioxidante del extracto**

Se definió con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se cuantificó la Concentración Antioxidante media (CA<sub>50</sub>), utilizando las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/mL. Como control positivo se utilizó catequina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se utilizaron pozos con 200 µL de MeOH grado HPLC (Okusa *et al.*, 2007) (Apéndice 10).

### **Fenoles totales**

La concentración de fenoles totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de Singleton et al., 1999. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en una solución estándar de 2.0 mg/mL. A partir de ésta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/ml) (Apéndice 11).

## **Flavonoides**

El contenido total de flavonoides presentes en el extracto se determinó utilizando el método de Dowd modificado de Praveen y Awang, 2007. Donde 1 mL de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 2 % en metanol se mezclaron con el mismo volumen del extracto en solución (2 mg/mL). Las lecturas de absorción a 415 nm se tomaron después de 10 minutos de reacción, contra un blanco que consiste en 1 mL de la solución del extracto con 1 mL de metanol sin  $\text{AlCl}_3$ . El contenido total de flavonoides se determinó utilizando una curva de calibración con quercetina en una solución estándar de 1mg/mL (1-100 ppm) (Apéndice 12).

## **Caracterización fitoquímica del extracto**

La composición química se estudió mediante una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) (Apéndice 13).

## **Análisis estadístico**

Para los datos obtenidos de las pruebas cualitativas bacterianas, fueron calculadas por especie y tipo bacteriano, las siguientes medidas descriptivas: mediana, media, cuartil 1 ( $q_1$ ), cuartil 3 ( $q_3$ ), mínimo y máximo. Así mismo se obtuvieron los diagramas de caja.

Para determinar si existieron o no diferencias significativas en las variables antes mencionadas, se utilizó un análisis de varianza factorial, en el cual los factores considerados fueron: extracto y cepas bacterianas.

Todo el análisis realizado fue hecho con el paquete de cómputo estadístico Minitab versión 16.

## RESULTADOS

### Rendimiento

Se colectaron y pesaron 2 516 g de la planta (peso seco), de lo cual se obtuvo 59.78 g de extracto metanólico (rendimiento de 2.37%).

### Actividad antibacteriana

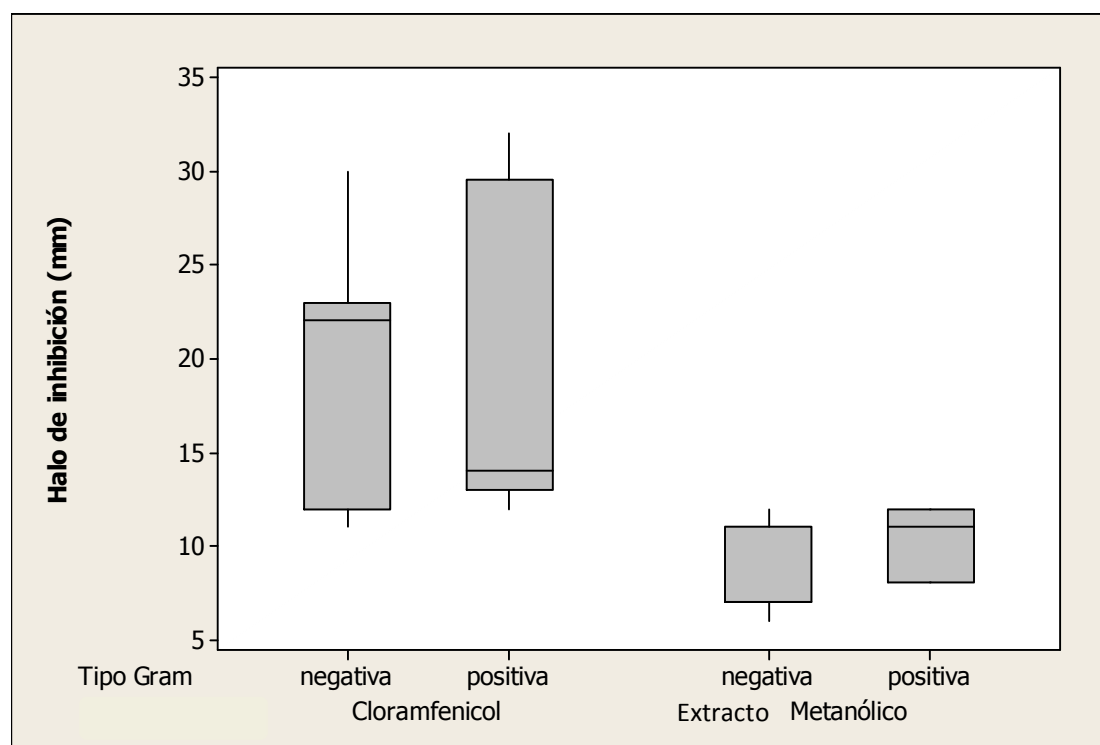
#### *Evaluación cualitativa*

Se obtuvieron los halos de inhibición que presentaron las diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas frente al extracto metanólico de *B. aptera* y frente al cloranfenicol, los cuales se muestran en el cuadro 4 y las diferencias se pueden observar gráficamente en la figura 4 y 5.

**Cuadro 4.** Halos de inhibición en bacterias frente al extracto y frente a cloranfenicol.

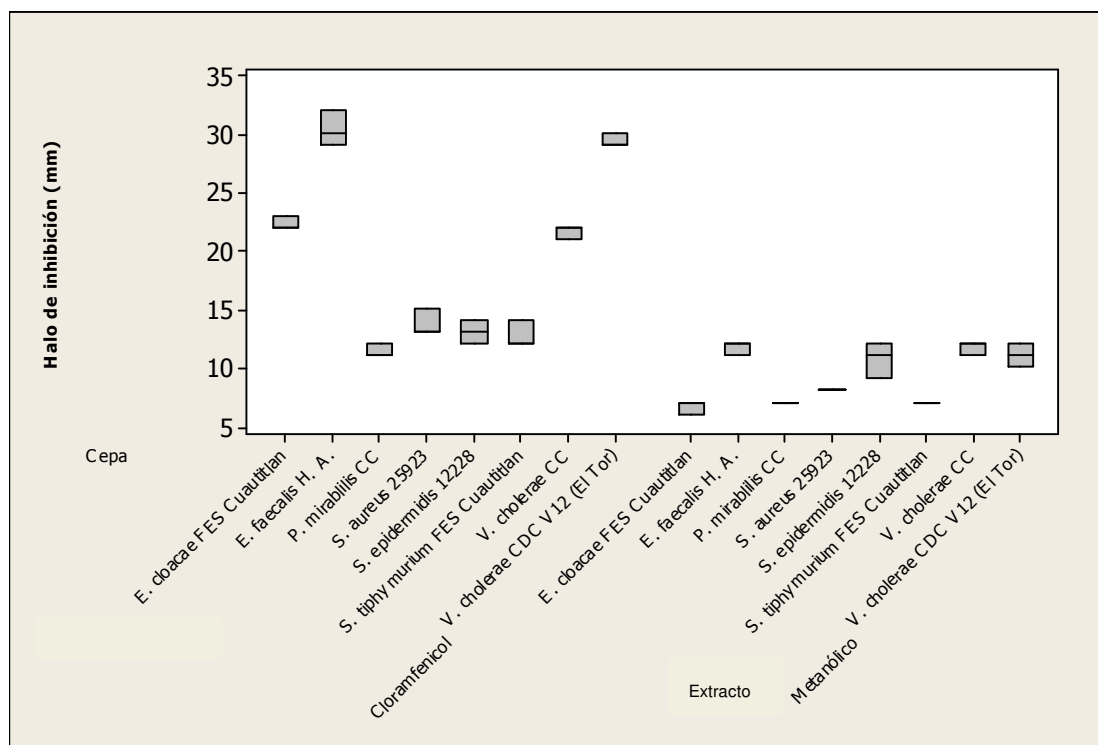
Tipo	Cepa	ATCC, clasificación o donadas por:	Extracto	Cloranfenicol
Gram positivas	<i>Enterococcus faecalis</i>	H. Á.	11.7 ± 0.6	30.3 ± 1.5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	8.0 ± 0	13.7 ± 1.1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	10.7 ± 1.5	13.0 ± 1.0
Gram negativas	<i>Enterobacter cloacae</i>	FES Cuautitlán	6.7 ± 0.6	22.3 ± 0.6
	<i>Proteus mirabilis</i>	CC	7.0 ± 0	11.3 ± 0.6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	FES Cuautitlán	7.0 ± 0	12.7 ± 1.1
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V12 (El Tor)	11.0 ± 1.0	21.7 ± 0.6
	<i>Vibrio cholerae</i>	CC	11.7 ± 0.6	29.3 ± 0.6

\* Longitud promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición ± la desviación estándar.



**Figura 4.** Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición por tipo bacteriano.

Como se puede observar, los mayores halos de inhibición los presentaron las cepas frente al cloranfenicol, tanto en bacterias tipo Gram negativas como en Gram positivas, siendo éstas últimas donde se mostró una menor variación en los datos. Ambos tipos presentaron una mediana muy similar de 19.47 mm y de 19 mm respectivamente, a diferencia del comportamiento de las cepas frente al extracto metanólico de *B. aptera*, en el cual se registró una menor variación y valor en los halos de inhibición, tanto en Gram negativas como en Gram positivas, obteniendo una mediana para ambos tipos de 8.66 mm y 10.11 mm respectivamente. Por lo tanto, para el cloranfenicol, como para el extracto metanólico las cepas bacterianas que presentaron la menor variación en los halos de inhibición fueron las Gram positivas, del mismo modo los mayores valores, siendo de 32 mm para el tipo Gram positivo frente a cloranfenicol y de 12 mm para ambos tipos frente al extracto metanólico.



**Figura 5.** Diagrama de caja de la longitud promedio de los halos de inhibición por cepa bacteriana.

Los mayores valores se presentaron frente al cloranfenicol, obteniendo una media en el caso de *E. faecalis* H. A. de 30.33 mm, *V. cholerae* CC de 29.33 mm, *E. cloacae* FES C de 22.33 y *V. Cholerae* CDC de 21.66 mm. En el caso del extracto metanólico también los valores medios más altos los presentaron *E. faecalis* H. A. y *V. Cholerae* CC con 11.7+/- 0.6 mm para ambos casos.

El análisis de varianza realizado mostró que existieron diferencias significativas entre el extracto y cloranfenicol ( $F=1673.26$ ,  $P=0.0$ ), así mismo existieron diferencias significativas entre las cepas ( $F=175.54$ ,  $P=0.0$ ).

### *Evaluación cuantitativa*

Al comprobar que las cepas fueron sensibles al efecto del extracto se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto de *B. aptera*, los resultados indicaron las concentraciones a las cuales el extracto provocó un efecto inhibitorio, es decir, una reducción drástica de la población bacteriana y/o un efecto bactericida, el cual refiere una mortalidad de la mayor parte de la población bacteriana, haciendo evidente una mayor sensibilidad en las cepas pertenecientes a las bacterias Gram negativas, tal como se observa en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** CMI y CBM del extracto metanólico de *B. aptera* para las cepas bacterianas.

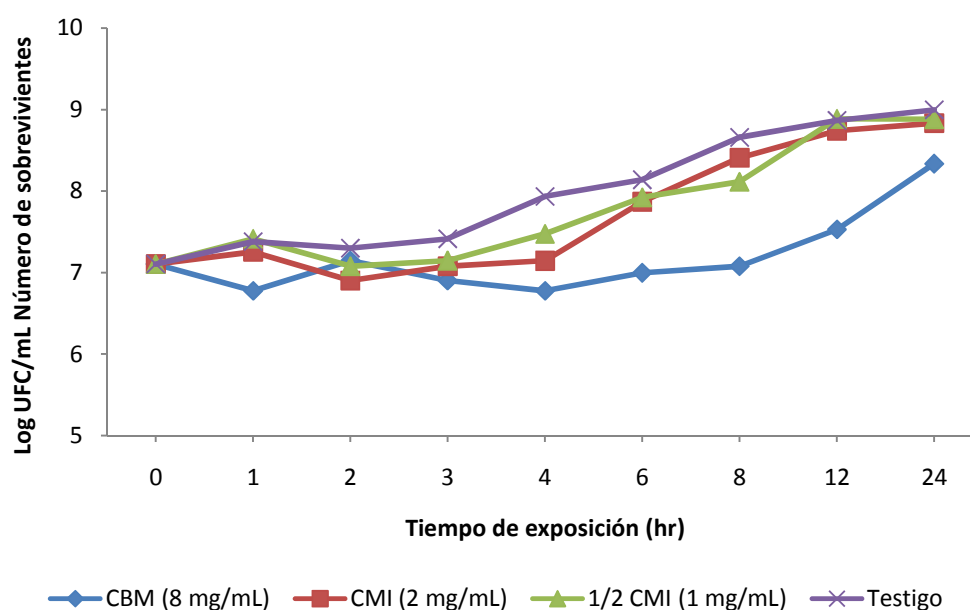
<b>Cepa</b>	<b>ATCC, clasificación o donadas por:</b>	<b>CMI (mg/mL)</b>	<b>CBM (mg/mL)</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Hospital Los Ángeles	2.0	8.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	2.0	> 8.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	> 8.0	> 8.0
<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V12 (El Tor)	4.0	8.0
<i>Vibrio cholerae</i>	CC	4.0	8.0
<i>Enterobacter cloacae</i>	FES Cuautitlán	> 8.0	> 8.0
<i>Proteus mirabilis</i>	CC	> 8.0	> 8.0
<i>Salmonella typhimurium</i>	FES Cuautitlán	> 8.0	> 8.0

Como se puede observar, con respecto a las bacterias Gram positivas, como lo son; *Enterococcus faecalis* H. A. y *Staphylococcus epidermidis* 12228, ambas mostraron una CMI de 2.0 mg/mL y una CBM de 8.0 mg/mL y >8.0mg/mL respectivamente, por lo tanto la menor CBM la registró *E. faecalis* H. A., en relación con *S. epidermidis* 12228 y *S. aureus* 25923, que muy probablemente su CBM sea superior a los 8.0 mg/mL. En el caso de las bacterias Gram negativas se

observó la menor CMI en las dos cepas de *Vibrio cholerae*, siendo en ambas de 4 mg/mL y una CBM de 8.0 mg/mL.

### *Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano*

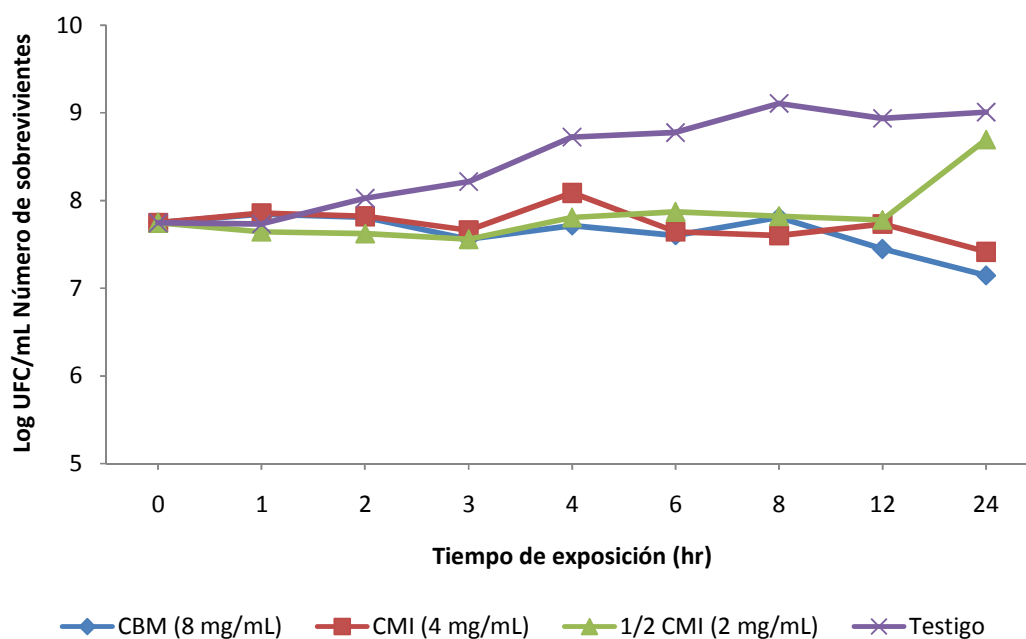
Las cepas bacterianas tipo Gram positiva y Gram negativa que presentaron las menores concentraciones tanto inhibitorias como bactericidas fueron *E. faecalis* H. A. y *V. cholerae* CDC V12 (el Tor), por lo tanto se estudió la actividad del extracto de *B. aptera* sobre la curva de crecimiento bacteriano, mediante lo cual se pudo observar una reducción de la población y un comportamiento bacteriostático respectivamente (Figura 6 y 7).



**Figura 6.** Actividad del extracto metanólico de *B. aptera* sobre la curva de crecimiento de *E. faecalis*.

El comportamiento de *E. faecalis* H. A. muestra una reducción apreciable de la población bacteriana durante los primeras horas de tratamiento y un incremento de la misma a partir de las ocho horas de la exposición al extracto metanólico.





**Figura 7.** Actividad del extracto metanólico de *B. aptera* sobre la curva de crecimiento de *Vibrio cholerae*.

En la figura 7 se puede observar en el comportamiento de *V. cholerae* CDC V 12 (El Tor) un efecto bacteriostático, además una tendencia a la reducción paulatina de la población bacteriana, tanto en la CBM como en la CMI, pues redujeron significativamente el número de Unidades Formadoras de Colonias respecto del testigo y de la  $\frac{1}{2}$  MIC.

## Actividad antifúngica

### *Evaluación cualitativa*

En el caso de los hongos levaduriformes en ninguna cepa se observó actividad antifúngica del extracto metanólico de *B. aptera*, sin embargo, al respecto de los hongos filamentosos, en todas las cepas se observó actividad antifúngica. Es por ello que la evaluación cuantitativa sólo se efectuó para las cepas de hongos filamentosos.

### *Evaluación cuantitativa*

Las concentraciones fungicidas al 50% (CF<sub>50</sub>) de las diferentes cepas ensayadas se muestran en el cuadro 6, en donde se aprecian aquellas que necesitaron las concentraciones más bajas del extracto para inhibir su crecimiento, tales como, *Rhizoctonia lilacina* con 3.81 mg/mL y *Fusarium sporotrichioides* con 4.05 mg/mL. Un caso particular fue *Aspergillus sp.*, en el cual se obtuvo la CF<sub>25</sub> de 1.02 mg/mL debido a que no alcanzó a inhibir al 50% el crecimiento del hongo.

**Cuadro 6.** CF<sub>50</sub> del extracto metanólico de *B. aptera* para las cepas de hongos filamentosos.

<b>Cepa</b>	<b>ATCC, clasificación o donadas por:</b>	<b>CF<sub>50</sub> mg/mL</b>
<i>Aspergillus niger</i>	CDBB-H-179	4.48
<i>Aspergillus sp.</i>	Fes Iztacala	1.02*
<i>Fusarium moniliforme</i>	CDBB-H-265	5.67
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	NRLL3299	4.05
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	CBBB-H-306	3.81
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112	5.68

\* En *Aspergillus sp.* se muestra la concentración fungicida al 25% (CF<sub>25</sub>).

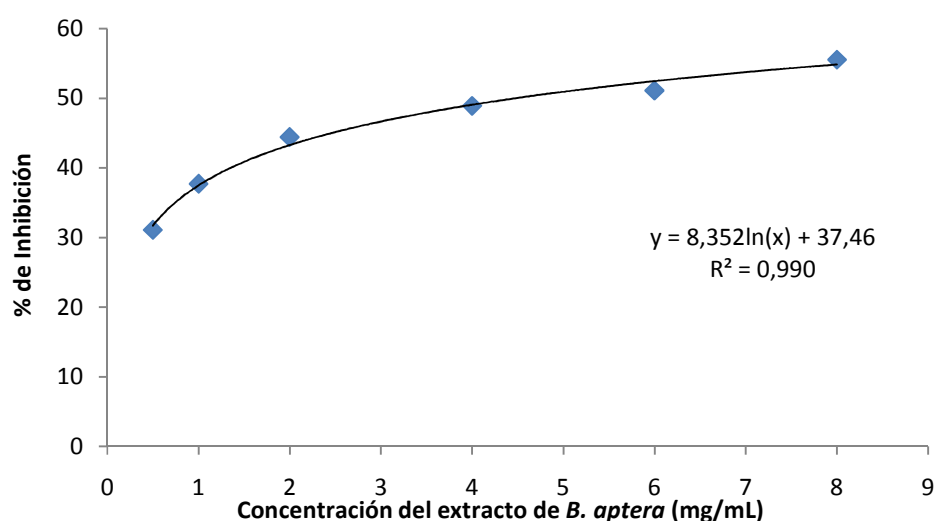
A continuación se presenta cada una de las cepas ensayadas, la concentración del extracto utilizada y el respectivo porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

***Aspergillus niger*** CDBB-H-179

Las concentraciones del extracto y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se pueden observar en el cuadro 7, en donde se alcanza el 50% a partir de los 6 mg/mL y el máximo porcentaje de inhibición fue de 55.5%. En la figura 8 se observa el comportamiento del hongo frente al extracto en donde queda de manifiesto una tendencia logarítmica en la inhibición del crecimiento radial y una  $CF_{50}$  de 4.48 mg/mL.

**Cuadro 7.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Aspergillus niger*.

Concentración mg/mL	% de Inhibición
0.5	31.1
1	37.7
2	44.4
4	48.9
6	51.1
8	55.5



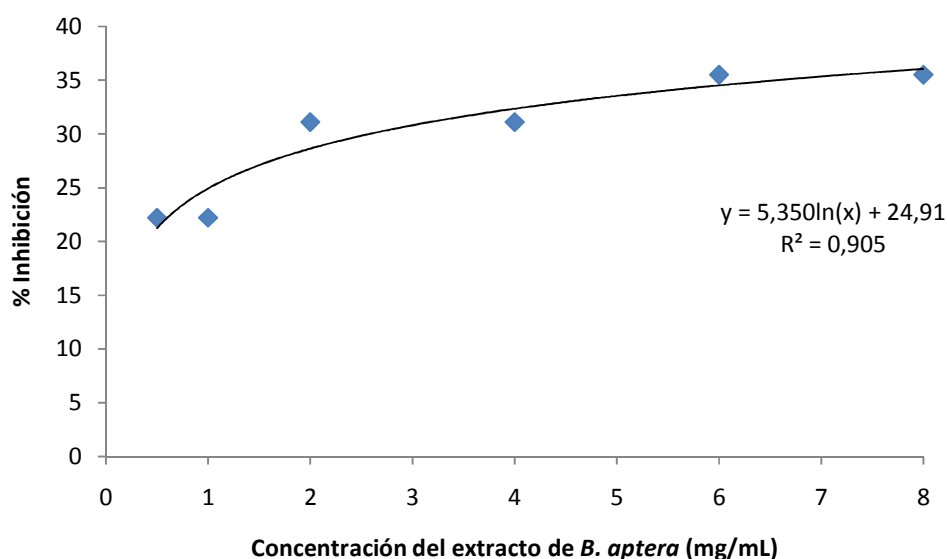
**Figura 8.** Inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus niger*.

***Aspergillus sp.*** FES Iztacala

El porcentaje de inhibición para cada concentración evaluada se muestra en el cuadro 8, en donde se observa que a partir de una concentración de 2 mg/mL se alcanza una inhibición de más del 25% y la máxima de inhibición fue de 35.5 %. En la figura 9 se muestra el comportamiento logarítmico de la inhibición del crecimiento radial del hongo frente al extracto, el cual presenta una  $CF_{25}$  de 1.02 mg/mL.

**Cuadro 8.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Aspergillus sp.*

Concentración mg/mL	% de Inhibición
0.5	22.2
1	22.2
2	31.1
4	31.1
6	35.5
8	35.5



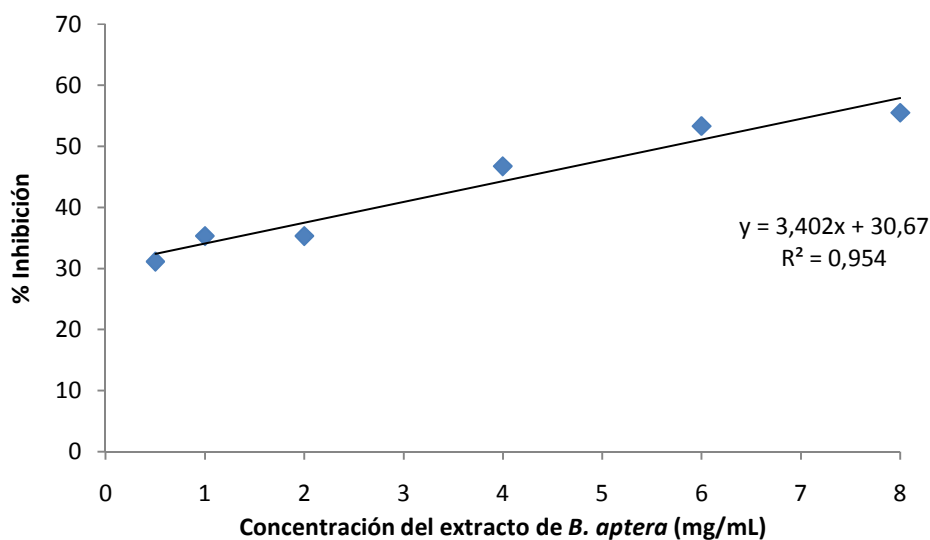
**Figura 9.** Inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus sp.*

***Fusarium moniliforme* CDBB-H-265**

De las concentraciones evaluadas (cuadro 9), el 50% de la inhibición se alcanza a partir de los 6 mg/mL y la máxima inhibición es del 55.5%. En la figura 10 se muestra el comportamiento de la cepa frente al extracto, en la cual se observa un comportamiento lineal en la inhibición del crecimiento radial y una  $CF_{50}$  de 5.67 mg/mL.

**Cuadro 9.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Fusarium moniliforme*.

Concentración mg/mL	% de Inhibición
0.5	31.1
1	35.3
2	35.3
4	46.7
6	53.3
8	55.5



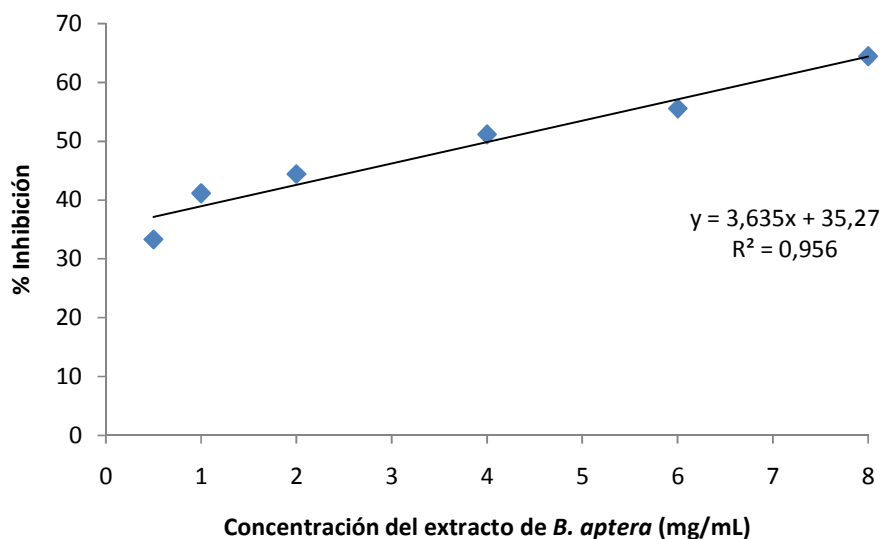
**Figura 10.** Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium moniliforme*.

### *Fusarium sporotrichioides* NRLL3299

Las concentraciones del extracto y respectivos porcentajes de inhibición se muestran en el cuadro 10, en donde se puede observar que a partir de la concentración de 4 mg/mL se alcanza más del 50% de inhibición, la máxima inhibición fue de 64.4%. En la figura 11 se muestra el comportamiento de *F. sporotrichioides*, en donde se manifiesta una tendencia lineal de inhibición del crecimiento radial frente al extracto en donde se obtuvo una  $CF_{50}$  de 4.05 mg/mL.

**Cuadro 10.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Fusarium sporotrichioides*.

Concentración mg/mL	% de Inhibición
0.5	33.3
1	41.1
2	44.4
4	51.1
6	55.5
8	64.4



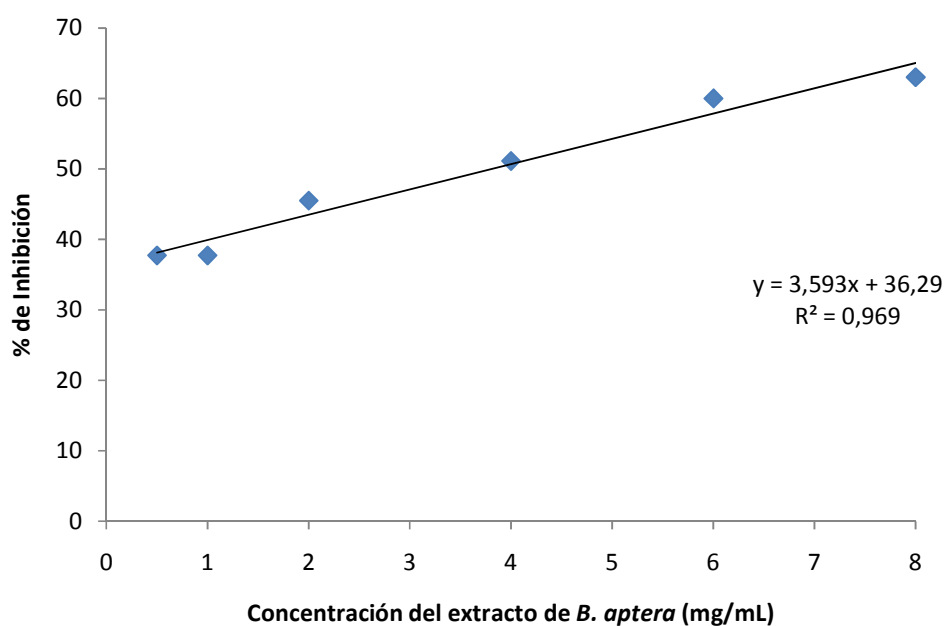
**Figura 11.** Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sporotrichioides*.

***Rhizoctonia lilacina* CBBB-H-306**

En las concentraciones evaluadas (cuadro 11) se muestra que a los 4 mg/mL se alcanza más del 50 % de inhibición y la máxima inhibición fue de 63%. En la figura 12 se observa el comportamiento lineal en la inhibición del crecimiento radial que presentó el hongo frente al extracto con una  $CF_{50}$  de 3.81 mg/mL.

**Cuadro 11.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Rhizoctonia lilacina*.

Concentración mg/mL	% de Inhibición
0.5	37.7
1	37.7
2	45.5
4	51.1
6	60
8	63



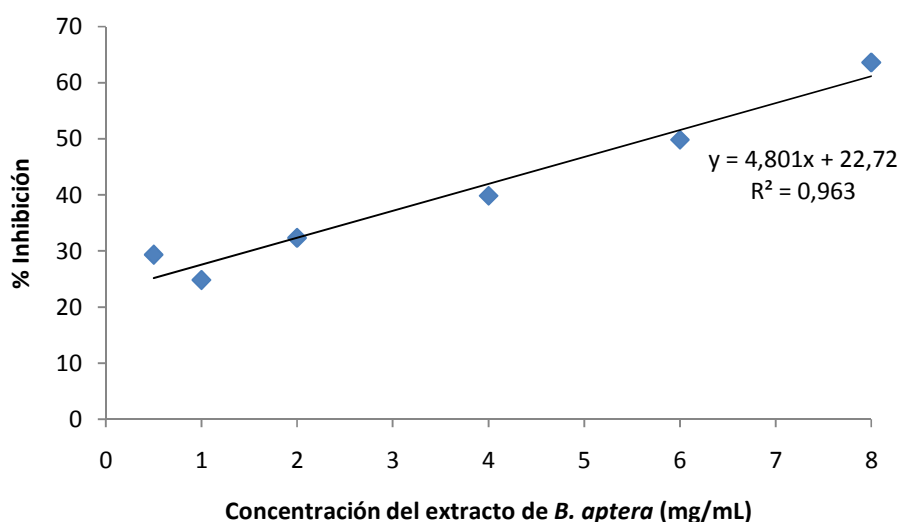
**Figura 12.** Inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia lilacina*.

***Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112**

En el cuadro 12 se observa que se alcanza más del 50% a partir de la concentración de 8 mg/mL, la máxima inhibición fue de 63.6%. En la figura 13 se muestra el comportamiento del hongo frente al extracto en donde queda de manifiesto una tendencia lineal en la inhibición del crecimiento radial y una  $CF_{50}$  de 5.68 mg/mL.

**Cuadro 12.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial sobre *Trichophyton mentagrophytes*.

Concentración mg/mL	% de Inhibición
0.5	29.3
1	24.8
2	32.3
4	39.8
6	49.8
8	63.6



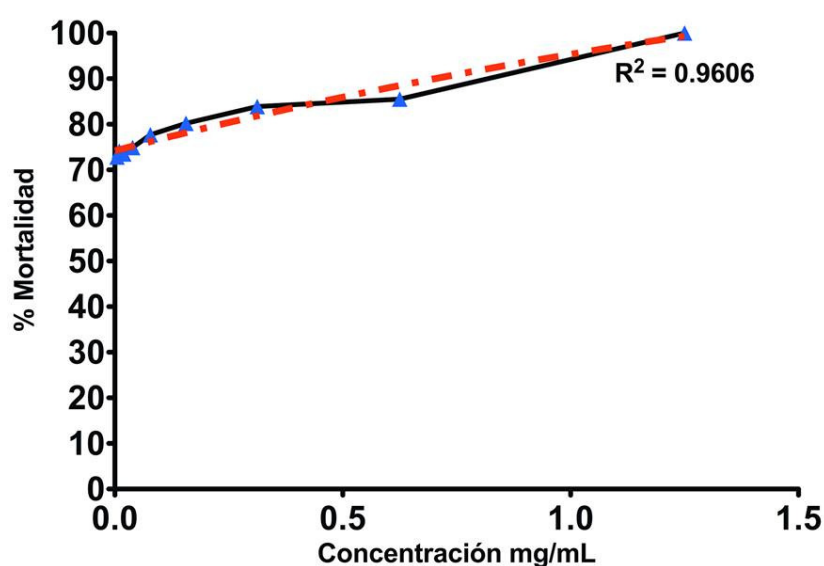
**Figura 13.** Inhibición del crecimiento radial de *Trichophyton mentagrophytes*.



## Citotoxicidad

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores que demuestran la actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos filamentosos del extracto de *B. aptera*, fue necesario conocer la toxicidad de esta especie para un posible uso posterior sin efectos adversos.

Los resultados de la actividad citotóxica fueron interpretados de acuerdo al criterio del Instituto Nacional de cáncer NCI (por sus siglas en inglés), el cual establece que las concentraciones consideradas como activas o tóxicas son de  $\leq 20\mu\text{g/mL}$  para los extractos y para los compuestos puros de  $\leq 4\mu\text{g/mL}$  (Geran et al., 1972 y Swanson et al. 1990). Con base en este criterio, el extracto de *B. aptera* resultó ser tóxico al presentar un porcentaje de mortalidad del 72.82% con la concentración mínima que fue de 0.004 mg/mL y el 100% de mortalidad con 1.295 mg/mL (figura 14).

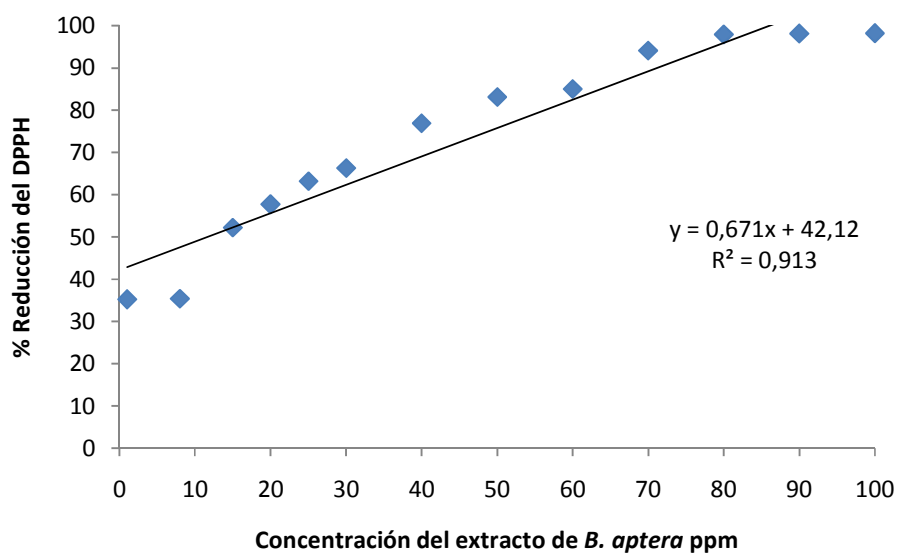


**Figura 14.** Curva de mortalidad en macrófagos P-388 frente al extracto metanólico de *B. aptera*.

### Actividad antioxidante del extracto

Dadas las propiedades biológicas mostradas, es sabido que algunas de ellas están relacionadas con los compuestos antioxidantes que la planta sintetiza.

La Capacidad Antioxidante media ( $CA_{50}$ ) del extracto de *B. aptera*, fue de 11.72  $\mu\text{g/mL}$ , obtenida a partir de la reducción en un 50% del radical DPPH (figura 15) y como control positivo se utilizó quercetina, misma que presentó una  $CA_{50}$  de 4.3  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 15.** Reducción del radical DPPH por el extracto metanólico de *B. aptera*.

### **Fenoles y flavonoides totales**

Los compuestos fenólicos así como sus derivados flavonoides están correlacionados en parte con la capacidad antioxidante mostrada, por lo cual se evaluó su contenido presente en el extracto metanólico de *B. aptera*.

Se registró un contenido por cada gramo de extracto de 61.2 mg (eag)/g de fenoles totales, correspondientes al 0.145 % respecto la planta seca. En cuanto a los flavonoides, se cuantificó un contenido de 15 mg (eq)/g por gramo de extracto, correspondiente al 0.035 % de la planta.

### **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

Con respecto al estudio de la caracterización química del extracto de *B. aptera* mediante CG-EM, se encontraron 13 compuestos (Figura 16), en su mayoría ácidos grasos, aunque en menor abundancia respecto de los otros, también terpenoides en un porcentaje importante y sus derivados, un lignano y un fenilpropanoide (Cuadro 13).

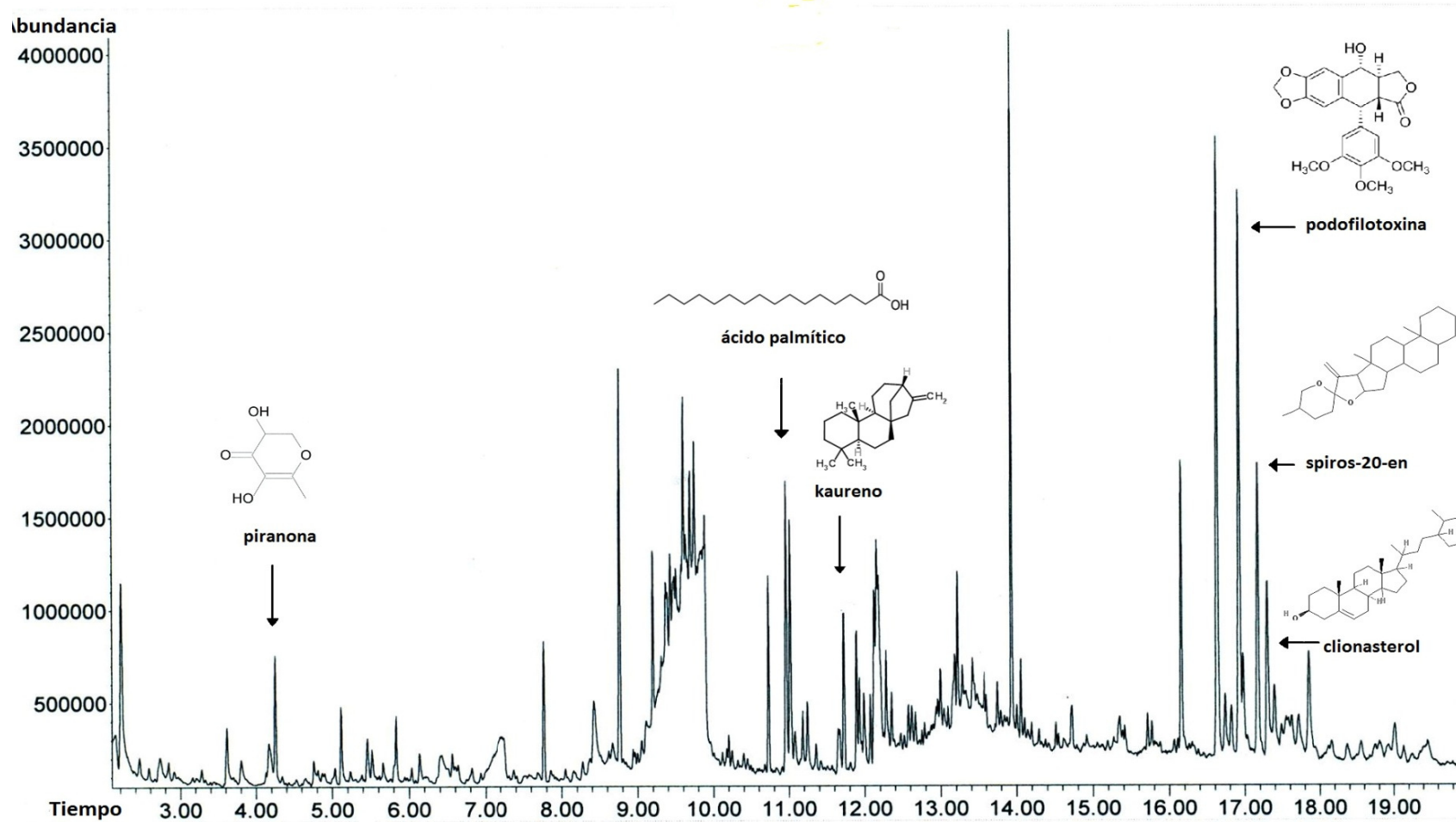
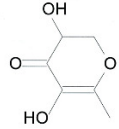

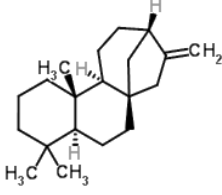
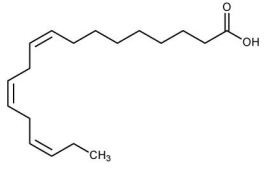
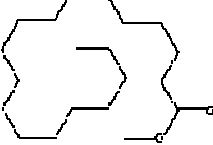
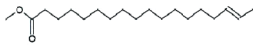
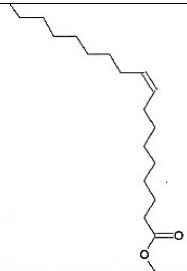
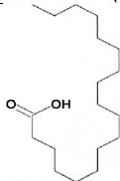
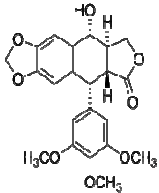
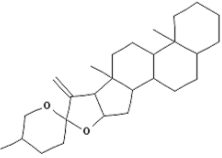
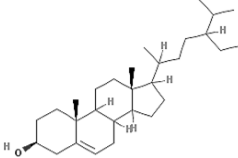
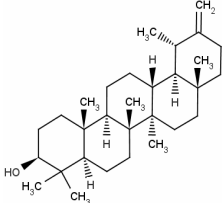


Figura 16. Cromatograma del análisis CG-EM del extracto metanólico de *B. aptera*.

**Cuadro 13.** Compuestos encontrados en el extracto metanólico de *B. aptera* con el análisis CG-EM.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia %	Quality	Fórmula	Actividad
Piranona	4.253	3.18	96		Pro-apoptótico y antiproliferativo en células de cáncer de colón humanas (Ban et al., 2007).
Ácido palmítico	10.729 y 10.960	9.69	99		Antinflamatorio (Saeed et al., 2012). Apoptotico en células neurales y del endotelio (Jiang et al., 2010).
Kaureno	11.720	4.03	99		Antibacteriano, leishmanicida, antiinflamatorio, antiparasitario, citotóxico (Mendoza et al., 1997; Brito et al., 2006; Hueso-Falcón, 2011).
Ácido linoleico	11.892 y 12.124	4.93	99		Antibacteriano (Zheng et al., 2005). Anticancerígeno (Kumar et al., 2010).
Metil estearato	12.070	2.42	97		
Ácido metil éster 16-octadecaenoico	11.928	2.67	96		

<b>Metil éster del ácido oléico</b>	12.183	4.93	91		Analgésico y antiinflamatorio (Badoni y Kumar, 2012).
<b>Ácido esteárico</b>	12.278	3.26	99		Antimicrobiano (Jubie et al., 2012).
<b>Trans-metilpluviatólido</b>	16.154	7.52	83		
<b>Podofilotoxina</b>	16.925	13.79	93		Antimitótico, citotóxico (Boluda et al., 2005; Santiago, 2008).
<b>Spirost-20-en</b>	17.175	7.49	97		Neuroprotector (derivado) (Tillement et al., 2006).
<b>Clionasterol</b>	17.299	4.60	94		Antidiabético, antimicrobiano (Mora et al., 2008; Sujatha et al., 2010).
<b>Taraxasterol</b>	17.851	3.22	84		Antiinflamatorio (Zhang et al., 2012), Antitumoral (Takasaki et al., 1999; Harrewijn et al., 2001).

---

## DISCUSIÓN

Las plantas elaboran una amplia gama de productos naturales de bajo peso molecular (más de 100 000), conocidos como metabolitos secundarios, muchos de los cuales han evolucionado para conferirles una ventaja selectiva contra el ataque microbiano (Dixon, 2001), análogamente ésta cualidad se ha aprovechado ancestralmente para contrarrestar el ataque de diversos patógenos al ser humano, siendo actualmente un desafío su validación como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En este sentido diferentes especies del género *Bursera* han sido utilizadas en la medicina tradicional mexicana, algunas de las cuales se han reportado activas contra agentes microbianos en ensayos *in vitro* a partir de extractos, aceites esenciales o resinas (Canales et al., 2005; Mora, 2009; Vásquez, 2012), esto probablemente se debe a su alta incidencia en el país, principalmente en temperaturas cálidas en la costa del Pacífico (Rzedowski y Kruse, 1979). Además de que se ha observado que resulta de importancia para el aprovechamiento de sus propiedades medicinales la parte anatómica de la cual se obtiene el extracto o aceite esencial, e inclusive la época del año en que se realiza la colecta y el modo en el que se efectúa (López, 2011; Espinosa, 2012; Rojas, 2012), esto debido a que la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en las plantas está relacionada con las estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, de tal manera que actúan restringiendo la invasión y/o inhibiendo directamente al microorganismo patógeno, o bien, por su capacidad antioxidante contribuyen al mantenimiento del estado de óxido reducción de la célula vegetal (Sepúlveda et. al., 2003).

La mayoría de estos compuestos contienen un grupo fenol y/o sus derivados de oxígeno sustituidos; consisten en un anillo aromático con un grupo hidroxilo, cuya posición y número en el anillo están relacionados con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad (Cowan, 1999; Domingo y López-Brea, 2003), esta característica

también puede conferir la capacidad de captación de radicales libres, ejemplo de ello son los fenilpropanoides simples y los flavonoides (Rice-Evans et al., 1997; González et al., 2007).

Con respecto al extracto metanólico de *B. aptera* objeto del presente estudio, tuvo un importante contenido de compuestos fenólicos totales, siendo de 61.2 mg (eag)/g, mismos que como ya se ha mencionado están correlacionados con la capacidad antioxidante donde el extracto mostró una  $CA_{50}$  relativamente baja, siendo de 11.72  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 15), al compararla con el compuesto puro quercetina que fue de 4.7  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual cobra importancia al tratarse de un extracto, debido a que este es una mezcla compleja de varios componentes y su capacidad antioxidante se acerca mucho a la capacidad antioxidante del compuesto puro (quercetina).

Por otro lado, el extracto de *B. aptera* tuvo 1.5mg (eq)/g equivalentes a los flavonoides totales, de los cuales se han descrito diversas propiedades como antimicrobianas, contra enfermedades crónico degenerativas y virales (Rice-Evans et al., 1997; Pérez, 2003; González 2007), además se ha referido que su acción contra las bacterias ocurre mediante la formación de complejos con las proteínas solubles y extracelulares, y con las células de la pared, así como de la membrana celular (Cowan 1999; Araujo y Salas, 2008), en este sentido se ha registrado que ciertos flavonoides como la catequina inhiben el crecimiento de *V. cholerae* O1 (Yildirim et al., 2000). Esto coincide con lo obtenido en lo referente a la actividad antibacteriana, ya que el extracto fue activo frente a las diferentes cepas utilizadas (Cuadro 4), sin embargo afectó en diferente magnitud a cada cepa, lo cual se corroboró en el análisis estadístico que determinó diferencias significativas entre cada cepa ( $F=175.54$ ,  $P=0.0$ ), también entre cepas y el control positivo ( $F=1673.26$ ,  $P=0.0$ ) (Figura 4 y 5), de tal forma que los mayores halos de inhibición los presentaron *E. faecalis* H.A. y *V. cholerae* CC con 11.7 mm en los dos casos.



Para evaluar la magnitud con que afectó el extracto de *B. aptera* a cada cepa se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja de un antimicrobiano a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano (donde es visible una reducción drástica del mismo) y a concentración bactericida mínima (CBM) que es la concentración más baja de un antimicrobiano a la cual se inhibe el 99.9% de la población. El ensayo indicó en algunos casos bajas CMI del extracto (Cuadro 5) que van desde los 2.0 mg/mL, ya que de acuerdo a pruebas de sensibilidad *in vitro*, altas CMI son consideradas de 100-1000 mg/mL (Domingo y López-Brea, 2003). Destacaron las CMI y CBM del extracto frente a *E. faecalis* con 2.0 mg/mL y 8.0 mg/mL respectivamente. Así como en el caso de *V. cholerae* CDC V12 (El Tor) con una CMI de 4.0 mg/L y una CBM de 8.0 mg/mL.

Los resultados obtenidos coinciden con otros estudios, donde se encontró que algunas de las cepas más sensibles contra el extracto metanólico de *B. aptera* fueron *V. cholerae* CDC V12 (El Tor) y *E. faecalis*, mostrando una CMI de 0.5 mg/mL y una CBM de 4 mg/mL para ambas cepas (Vásquez, 2012), sin embargo, en este caso la colecta se realizó en agosto del 2008 y probablemente este espécimen pudo estar sometido a un mayor estrés (biótico y/o abiótico), por lo tanto a una mayor producción de metabolitos secundarios, lo cual explicaría que las CMI y CBM fueran menores a las obtenidas en este ensayo. En otros estudios se evaluó la actividad antibacteriana de otras especies de *Bursera*; en el extracto metanólico de hoja y tallo de *B. submoniliformis*, observando también los mayores halos de inhibición frente a *V. cholerae* y *E. faecalis* (Gómez et al., 2012); en el aceite esencial de *B. morelensis* frente a diferentes cepas, destacando *V. cholerae* (caso clínico) con una CMI de 0.125 mg/mL (López, 2011); en el aceite esencial de *B. schlechtendalii* de una colecta destacó *V. cholerae* con una CMI de 0.25 mg/mL y *E. faecalis* con una CMI de 0.5 mg/mL (Espinosa, 2012); el aceite esencial de *B. fagaroides* mostró los mayores halos de inhibición frente a *V. cholerae*, sin embargo una CMI de 8.0 mg/mL (Nicolas, 2013). En cuanto a las bajas CMI obtenidas podrían explicarse por la composición química de los aceites esenciales, debido a que en su mayoría son terpenos y estos están asociados

a actividades antimicrobianas (Cowan, 1999), de los cuales se hablará más adelante. En lo referente a la sensibilidad mostrada en *E. faecalis* H.A. frente al extracto de *B. aptera* podría relacionarse con su estructura, ya que posee una pared celular más accesible a la acción lítica de las sustancias generadas por las plantas y en las cuales los compuestos anfipáticos que actúan en su defensa como bombas de expulsión tienen menos acción (Tegos et al., 2002).

Por otro lado, frente a las cepas de *E. faecalis* H.A (Figura 6) y *V. cholerae* CDC V12 (El Tor) (Figura 7) el extracto mostró un comportamiento bacteriostático sobre las curvas de crecimiento, en este sentido el control positivo utilizado contra las bacterias en las pruebas cualitativas fue el cloranfenicol y se sabe que tiene un comportamiento bacteriostático; éste es un antimicrobiano de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis proteica en bacterias a las que penetra por difusión facilitada, debido a que se une reversiblemente a la unidad ribosomal 50s, así mismo la mayoría de los agentes antimicrobianos bacteriostáticos actúan a nivel ribosomal inhibiendo la síntesis proteica como por ejemplo los aminoglucósidos, estos lo hacen en la unidad ribosomal 30s y/o 50s (Pascuzzo et al., 2008).

Se ha referido que algunos compuestos fenólicos simples actúan como agentes antimicrobianos bacteriostáticos (Cowan, 1999) y se sabe que estos compuestos son parte de la composición química de la especie en otras colectas (Vásquez, 2012) y en la composición del extracto del presente estudio, aunado a lo anterior en el análisis CG-EM del extracto se encontró en alto porcentaje el lignano podofilotoxina (13.79 %) (Cuadro 13), éste se ha descrito con actividad sobre la división celular en células eucariotas (Boluda et al., 2005) y pudiera afectar a las células metabólicamente activas provocando el comportamiento bacteriostático, sin embargo es preciso evaluar el comportamiento individual del compuesto en una curva de crecimiento bacteriano para corroborar si éste afecta de manera similar a las células procariotas.

Otros compuestos sintetizados y dominantes en la composición química del género *Bursera* son los terpenoides, principalmente monoterpenos y

sesquiterpenos (Evans et al., 2000), lo cual quedó de manifiesto en la CG-EM donde se encontraron varios terpenoides y derivados como taxasterol, kaureno, clionasterol y spirost-20 en (Cuadro 13), así mismo Vásquez, 2012 realizó un CG-EM encontrando una importante presencia de sesquiterpenos como el Alfa-Bisabolol y (E,E)-Germacrona en el extracto metanólico de *B. aptera*. Además se ha registrado que los terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios (Sepúlveda et al., 2003; Araujo y Salas 2008), se especula que su mecanismo de acción podría involucrar la disrupción de la membrana por los compuestos lipofílicos, dado que encontraron que un incremento en la hidrofiliidad del diterpenoide kaureno redujo su actividad antimicrobiana (Mendoza et al., 1997), al respecto cabe señalar que el compuesto kaureno fue encontrado en el análisis de CG-EM con una abundancia del 4.03% (Cuadro 13), mismo que en parte podría explicar la actividad antimicrobiana observada del extracto de *B. aptera*.

Con respecto a la actividad antifúngica el extracto metanólico de *B. aptera* fue activo frente a las seis cepas de hongos filamentosos (Cuadro 6), misma que probablemente esté asociada con la presencia de terpenoides, dado que la disrupción de la membrana es uno de los mecanismos de acción de los antifúngicos comerciales, como polienos, azoles y alilaminas, estos actúan inhibiendo o interactuando directamente con el ergosterol (Cuenca-Estrella, 2010), el cual cumple una función análoga a la del colesterol en células animales. Ejemplo de ello es el ketoconazol, mismo que se utilizó como control positivo para las pruebas contra hongos filamentosos; éste es un fármaco antimicótico azólico, de la clase imidazol que actúa a nivel de la membrana citoplasmática inhibiendo la enzima citocromo P-450 que intervine en la síntesis de ergosterol y al no estar presente este compuesto en células animales resulta un blanco excelente para la terapia antifúngica (Escobar y Zuluaga, 2004).

De acuerdo con lo obtenido en las pruebas cuantitativas, la cepa más sensible fue *Rhizoctonia lilacina*, éste es un hongo que infecta al cultivo de la papa causando

necrosis en sus tejidos, frente al cual el extracto alcanzó la  $CF_{50}$  con 3.81 mg/mL (Cuadro 11 y Figura 12). La cepa menos sensible fue *Aspergillus* sp., puesto que no se alcanzó la  $CF_{50}$ , sin embargo se determinó la  $CF_{25}$  con 1.02 mg/mL del extracto (Cuadro 8 y Figura 9). En este sentido, el extracto de *B. aptera* no alcanzó el 100% de inhibición frente a ninguna cepa de hongos filamentosos con las concentraciones utilizadas (éstas fueron de los 2 mg/mL a los 8 mg/mL) (Cuadro 7-12), esto sugiere que el extracto podría tener un efecto fungistático, al igual que muchos de los antifúngicos conocidos, sin embargo se tendrían que realizar otros estudios complementarios para confirmarlo.

En comparación con otros estudios, en el aceite esencial de *B. morelensis* se encontró actividad similar frente a hongos filamentosos, destacando *F. moniliforme* y *R. lilacina* donde presentó una  $CF_{50}$  de 3.32 mg/L y en ningún caso se inhibió al hongo en un 100% (López, 2011). En otra investigación del extracto metanólico de *B. submoniliformis* encontraron que las cepas más sensibles fueron *T. mentagrophytes* y *F. moniliforme* (Gómez et al., 2012), mismos resultados se mostraron en el aceite esencial de *B. fagaroides*, donde sólo se observó cualitativamente esta inhibición en el crecimiento de ambas cepas (Nicolas, 2013). En el caso del extracto metanólico de *B. aptera* también estas cepas mostraron sensibilidad al extracto, siendo la  $CF_{50}$  de 5.67 mg/mL en *F. moniliforme* (Cuadro 9 y Figura 10) y la  $CF_{50}$  de 5.68 mg/mL en *T. mentagrophytes* (Cuadro 12 y Figura 13).

En cuanto a la actividad contra levaduras el extracto metanólico de *B. aptera* no fue activo, sin embargo, se ha reportado actividad frente a levaduras en aceites esenciales de otras especies del género; en *B. schlechtendalii* encontrando los mayores efectos sobre *Candida albicans* y *Candida glabrata*, y ningún efecto sobre hongos filamentosos (Espinosa, 2012); en *B. arida* se destacó frente a *Candida albicans* y solamente cualitativamente sobre hongos filamentosos (Rojas, 2012), ya que los aceites esenciales son conocidos por sus propiedades antifúngicas *in vitro* y/o *in vivo* atribuida a algunos compuestos mayoritarios como

terpenos, además de que muchos de los aceites esenciales han mostrado una actividad inhibitoria moderada sobre levaduras (Espinosa, 2012).

Es sabido que muchas levaduras y en menor medida hongos filamentosos han desarrollado resistencia a fármacos como los azoles, tal es el caso de *Candida* y *Aspergillus* sp., donde alteraciones en sus genes como mutaciones puntuales, sobreexposición del gen, amplificación genética y recombinación mitótica producen una enzima alterada, con un descenso en la afinidad a estos fármacos (Sanglard, 2002 citado en Cuenca-Estrella, 2010), lo cual podría explicar la inactividad del extracto frente a levaduras y baja actividad en el caso de *Aspergillus* sp.

De tal forma que la mayoría de los fármacos comerciales utilizados contra hongos como la anfotericina B, fluorocitosina, ketoconazol y nistatina, por mencionar algunos, son de amplio espectro pero de una toxicidad muy alta, además de que pueden favorecer el desarrollo de resistencias. En el caso de la nistatina ésta fue utilizada como control positivo contra levaduras, la cual produce efectos tóxicos tan graves que no puede emplearse en infusión parental y sólo se emplea en forma de ungüentos o soluciones en infecciones superficiales (Cuenca-Estrella, 2010), es por ello que resulta de gran importancia la búsqueda de terapias alternativas contra las infecciones fúngicas, así como la ampliación del conocimiento en cuanto a los mecanismos de acción de los antifúngicos y de los mecanismos de resistencia que han desarrollado a éstos.

De acuerdo con la actividad biológica mostrada del extracto metanólico de *B. aptera* frente a bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas y frente a hongos filamentosos, se procedió a evaluar su citotoxicidad sobre la línea de macrófagos P-388 de ratón leucémico. Con base en el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (NCI por sus siglas en ingles) (Geran et al., 1972 y Swanson et al. 1990), el extracto resultó ser tóxico al presentar un porcentaje de mortalidad del 72.82% con la concentración mínima que fue de 0.004 mg/mL y el 100% de mortalidad con 1.295 mg/mL (Figura 14).

En este sentido se ha reportado que el aceite esencial de *B. aptera*, *B. subminiliformis* y *B. morelensis* presentaron toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina* Leach, otras especies del género *Bursera* también han mostrado actividad citotóxica; tal es el caso de *B. tomentosa* en la subfracción de un extracto en éter de petróleo de hojas, sobre líneas tumorales humanas Colo 205 y CSC-1595 (Robles et al., 2010), en *B. fagaroides* en la fracción B asociada a la presencia de saponinas, del extracto hidroalcohólico de la corteza sobre linfoblastos murinos L5178Y a la concentración de 0.2-2.0 mg/ $\mu$ L (Delgado et al., 2006), en *B. tonkinensis* en la subfracción 4 del extracto metanólico de las raíces, perteneciente al compuesto 4'-dimetildesoxipodofilotoxina sobre células de carcinoma epidermoide oral humano (KB), células de cáncer de próstata humano (LNCaP) y células cancerígenas de colon humanas (Col2) (Jutiviboonsuk et al., 2005).

Como se puede observar algunos de los compuestos a los que han sido atribuidas las propiedades citotóxicas se encuentran como parte de la composición química analizada del extracto metanólico de *B. aptera* (Cuadro 13), en específico el lignano podofilotoxina podría estar relacionado con la actividad citotóxica, debido a sus propiedades antimitóticas ya mencionadas, además de encontrarse en una proporción importante (13.79 %), dicho compuesto también fue encontrado en un análisis de CG-EM como mayoritario en extractos metanólicos de otras burseras, en *B. fagaroides* (24.36 %) y en *B. schlechtendalii* (20.72%) (Vásquez, 2012). En adición se han realizado estudios a partir de la podofilotoxina, de la cual se han sintetizado compuestos derivados con potente actividad anticancerígena y baja toxicidad, de los cuales se conocen el etopósido y tenipósido, sin embargo se busca la síntesis y semisíntesis de otros compuestos derivados debido a que presentan limitaciones tales como resistencias, mielosupresión y pobre biodisponibilidad oral (Santiago, 2008).

Varios de los compuestos encontrados en el extracto han sido reportados como antioxidantes, antimicrobianos, antiparasitarios, analgésicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, neuroprotectores, citotóxicos y anticancerígenos (Cuadro 13).

No cabe duda de la importancia y perspectivas que surgen de la presente investigación, ya que la actividad biológica del extracto y de sus compuestos en particular enriquecen el conocimiento contra diversos patógenos, no sólo bacterias y hongos filamentosos, además de la posibilidad de un tratamiento contra enfermedades crónico degenerativas.

## CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *B. aptera* presenta actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- El extracto es bacteriostático sobre *V. cholerae* y *E. faecalis*.
- El extracto presenta actividad antifúngica sobre hongos filamentosos, pero no hubo actividad en hongos levaduriformes.
- El extracto es citotóxico sobre la línea de macrófagos P-388 de ratón leucémico.
- El extracto presenta importante actividad antioxidante.
- El extracto presenta una cantidad importante de compuestos fenólicos totales y flavonoides.
- El compuesto de mayor abundancia fue la podofilotoxina.

## PERSPECTIVAS

- Separar los compuestos presentes en el extracto mediante una cromatografía en columna abierta.
- Probar las fracciones con mayor actividad biológica frente a diferentes líneas celulares.
- Determinar la concentración y tipo de moléculas con actividad biológica.
- Purificar y aislar los compuestos responsables de dicha actividad presentes en el extracto y determinar su estructura química.

---

**APÉNDICE 1****Familia Burseraceae**

La familia Burseraceae se encuentra distribuida en las regiones más cálidas del planeta, con una mayor diversidad en las regiones tropicales de América, en el norte y sur de África y en Malasia. En México es representada por tres de los 18 géneros existentes, los cuales son: *Beiselia* (una especie), *Protium* (dos especies) y más ampliamente por el género *Bursera* (85 especies) (Gillett, 1980; Rzedowski et al., 2005), cabe resaltar que este último cuenta con 100 especies a nivel mundial, de las cuales la mayoría son endémicas del país, distribuyéndose principalmente en la costa del Pacífico (Rzedowski y Kruse, 1979).

Los representantes de *Bursera* son mayormente árboles o algunas veces arbustos, deciduos o perennifolios, que constituyen un elemento característico y no pocas veces dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México, donde habitan preferentemente en altitudes entre 0 y 1800 m. Pueden ser dioicos o poligamodioicos, corteza con conductos resiníferos y laticíferos. Hojas alternas, rara vez opuestas, pinnado-compuestas, ocasionalmente bipinnadas, 3-folioladas o 1-folioladas, exstipuladas. Inflorescencias axilares o terminales, cimosas, paniculadas, pseudoracimos, fasciculadas o flores solitarias. Flores generalmente unisexuales, actinomorfas, 3-5(-6)-meras, imbricadas o valvadas; sépalos connatos o libres; pétalos, libres o fusionados en un tubo, rara vez ausentes; estambres 1-2 series, en igual número que los pétalos o el doble (estaminodios en flores femeninas), filamentos libres, insertos debajo o encima del disco, anteras ditecas, dehiscencia longitudinal, disco anular, cupuliforme o inconspicuo; ovario súpero, 2-5-carpelar (-12 en *Beiselia*), 2-5-locular, placentación axilar, óvulos (1-)2 por lóculo, estilo corto o ausente, estigma 2-5-lobulado (pistilo vestigial en flores masculinas). Frutos drupáceos 2-5-valvados, con pericarpo carnoso, luego dehiscentes, o cápsulas; huesos 1-5, generalmente monospermos, con endocarpo leñoso, cubiertos frecuentemente por un



pseudoarilo; semillas sin endospermo, embrión recto, ocasionalmente aladas (Medina, 2008).

## APÉNDICE 2

### Antecedentes del género *Bursera*

**Cuadro 14.** Antecedentes de *Bursera*.

Espece	Parte utilizada	Estudio	Resultados	Referencia
<b><i>B. aloexylon</i></b>	Hojas (aceite esencial)	Actividad antimicrobiana	Antimicrobiano frente a <i>Rhodococcus equi</i> (0.60 mg/ml) y <i>Staphylococcus epidermidis</i> (0.15 mg/ml).	Queiroga et al., 2007
<b><i>B. arida</i></b>	Hojas, frutos, ramas y corteza (aceite esencial)	Actividad antimicrobiana y composición química	Variación temporal en la composición química y actividad biológica.	Rojas, 2012
<b><i>B. delpechiana</i></b>	Resina	Composición	Dos terpenoides fueron encontrados.	Syamasundar et al., 1991
<b><i>B. delpechiana</i></b>	Resina (Extractos hexánico y metanólico)	Composición	Dos nuevos triterpenos fueron encontrados.	Syamasundar y Mallavarapu, 1995

<b><i>B. fagaroides</i></b>	Corteza de tallo (extracto etanólico)	Actividad in vitro sobre el crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i>	Fuerte inhibición del cultivo mostrando CL <sub>50</sub> en 0.05 mg/mL.	Rosas et al., 2008
<b><i>B. fagaroides</i></b>	Fracciones en Sephadex LH-20 del extracto hidroalcohólico	Actividad citotóxica y antioxidante	Actividad citotóxica y antioxidante en flavonoides y saponinas.	Delgado et al., 2006
<b><i>B. fagaroides</i></b>	Corteza, frutos y ramas (aceite esencial)	Variación en composición química y actividad antimicrobiana	Actividad antimicrobiana con variación temporal y prevalencia del α-pineno.	Nicolas, 2013
<b><i>B. graveolens</i></b>	Hojas y corteza (extracto etanólico)	Triterpenos aislados de la corteza y su actividad biológica	Efecto inhibitorio frente <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> , anti-inflamatorio.	Robles et al., 2005
<b><i>B. graveolens</i></b>	Ramas secas (extracto hidroalcohólico y aceite esencial)	Efecto antiinflamatorio y composición química	Se determinaron 11 componentes del aceite esencial y el extracto inhibió la inflamación.	Manzano et al., 2009
<b><i>B. microphylla</i></b>	Hojas, tallos y semillas (extracto)	Relación de: terpenos, morfología y distribución.	La similitud entre las poblaciones de este a oeste se debe a la	Mooney y Emboden, 1968

			influencia selectiva, paralela y contemporánea.	
<b><i>B. morelensis</i></b>	Ramas (aceite esencial)	Composición química y actividad antibacteriana y antifúngica	Actividad antimicrobiana y componentes principales $\alpha$ -felandreno, $\beta$ -felandreno, $\alpha$ -cimeno, isocariofileno y $\alpha$ -pineno.	López, 2011
<b><i>B. schlechtendalii</i></b>	Ramas de la parte aérea (aceite esencial)	Composición química y actividad antimicrobiana	Actividad antimicrobiana con variación temporal en su composición y actividad biológica.	Espinosa, 2012
<b><i>B. schlechtendalii</i> <i>B. fagaroides</i> <i>B. submoniliformis</i> <i>B. biflora</i> <i>B. morelensis</i> <i>B. aptera</i> y <i>B. arida</i></b>	Corteza (extracto metanólico)	Actividad antibacteriana	Destacó <i>B. arida</i> y <i>B. aptera</i> encontrando compuestos fenólicos, terpenos y sesquiterpenos.	Vásquez, 2012
<b><i>B. simaruba</i></b>	Corteza (extracto)	Actividad antibacterial	Actividad en <i>E. coli</i> y <i>P. aureoginosa</i>	Camporese et al., 2003

<b><i>B. simaruba</i></b>	Hojas (extracto)	Actividad antiinflamatoria	Presentó actividad	Noguera et al., 2004
<b><i>B. simaruba</i></b>	Hojas (extracto)	Antiinflamatorio	Presentó actividad y composición rica en lignanos	Carretero et al., 2008
<b><i>B. simaruba</i></b>	Corteza (extracto metanólico)	compuestos fenólicos	Rica en compuestos fenólicos y buena fuente de lignanos	Maldini et al., 2009
<b><i>B. tomentosa</i></b>	Extracto y fracciones	Efecto citotóxico frente a líneas celulares tumorales humanos	Actividad citotóxica en fracciones	Robles et al., 2010
<b><i>B. tonkinensis</i></b>	Raíces (extracto metanólico)	Componentes bioactivos	Se aislaron 12 compuestos de los cuales uno exhibe actividad citotóxica	Jutiviboonsuk et al., 2005
<b><i>B. copalifera y B. grandifolia</i></b>	Hojas y tallos (extracto hexánico, acetónico y metanólico)	Bioinsecticida	Presentan actividad antialimentaria, así como insecticida y deformidad en pupas y adultos.	Aldana et al., 2010

**APÉNDICE 3*****Bursera aptera* Ramírez****(Rzedowski et al., 2004)**

Conocida como copalillo, cuajote, cuajote amarillo, cuajote verde, coxinyotl iztac (legua náhuatl), cuachital o cuajote blanco.

Árbol o a veces arbusto dioico, hasta de 8 m de alto, con resina abundante, aromático y glabro; tronco con corteza interna verde mate o verde brillante, la externa amarillenta y exfoliante en láminas papiráceas, ramillas glabras; hojas imparipinnadas, peciolo de ca. 0.5 cm de largo, glabro, lámina de 1 a 7 (8.5) cm de largo y 0.6 a 3cm de ancho, raquis sin alas, foliolos 7 a 19, sésiles a subsésiles, elípticos a ovados u obovados, de 4 a 12(15) mm de largo y 2 a 5(6) mm de ancho, ápice agudo a redondeado, base cuneada a redondeada, margen generalmente entero, de textura membranácea a cartácea, glabros, nervadura principal oscura y poco evidente en el haz, en el envés amarillenta y prominente, las secundarias inconspicuas; flores por lo general solitarias o a veces dispuestas en grupos de 2 o 3, glabras, bractéolas triangular-acuminadas, de 1 a 1.2 mm de largo, de base ensanchada, glabras, pedicelos de 1 a 1.2 mm de largo, glabros; flores masculinas trímeras o a veces tetrámeras, hasta de 8 mm de largo (incluyendo el pedicelo), lóbulos del cáliz triangulares, desiguales, de 1.5 a 3 mm de largo, glabros, borde al secar con escasos tricomas cortos, pétalos de color amarillo, rojizo o blanquecino, elíptico-oblongos, de ca. 5 mm de largo y 1 a 1.5 mm de ancho, cuculados, coriáceos, ápice encorvado, glabros, estambres 6, filamentos de ca. 1.5 mm de largo, anteras oblongas, de ca. 2 mm de largo; flores femeninas trímeras, hasta de 6 mm de largo (incluyendo el pedicelo), lóbulos del cáliz iguales, cuculado deltoides, de 1.2 a 1.6 mm de largo, reflexos en la madurez, pétalos cuculado aquillados, de 4 a 5mm de largo, estaminodios con anteras de ca. 1 mm de largo, ovario trilocular, estilo de menos de 1 mm de largo, estigmas 3; frutos solitarios o agrupados por varios en los ápices de ramillas

cortas, trivalvados, globosos a ovoides, apiculados, escasamente triquetros, de 6 a 7 mm de largo y de 5 a 6 mm de ancho, rojizos a pardos en la madurez, glabros, hueso de 5 a 6 mm de diámetro, totalmente cubierto por un pseudoarilo amarillo o blanquecino.

Habita en el bosque tropical caducifolio y en el matorral xerófilo, preferentemente en suelos de origen calizo, en altitudes entre 550 y 1950 m. A veces se encuentra compartiendo el hábitat con *B. fagaroides*, *B. morelensis* y *B. schlechtendalii*. Florece de finales de abril a mediados de julio. Sin follaje de noviembre a mayo.

El látex es utilizado mezclado con pomada para el tratamiento de picaduras de mosquitos. La goma que secreta el tallo se usa como veneno para perros, mezclada con el alimento del animal.

## **Taxonomía**

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

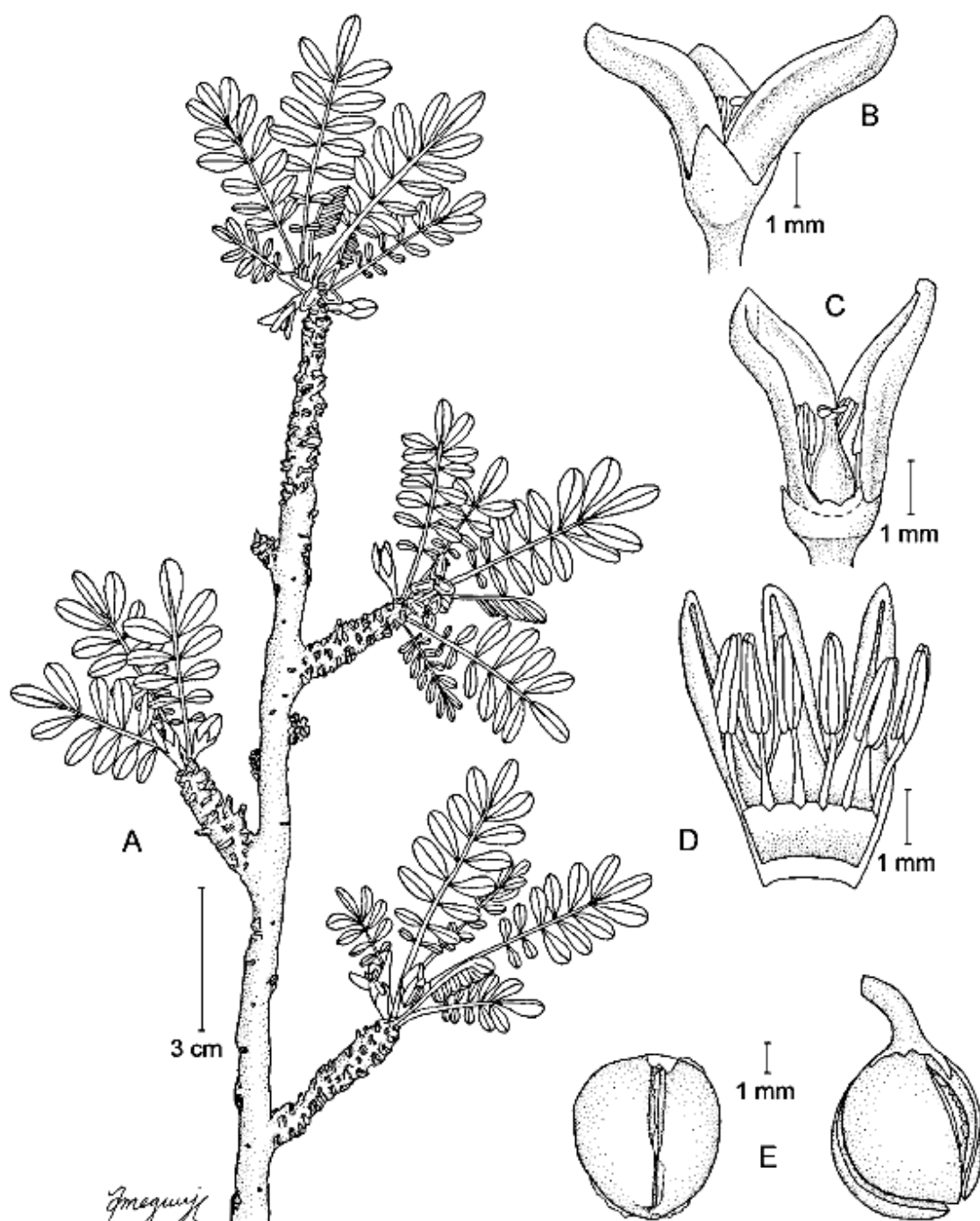
Subclase Rosidae

Orden Sapindales

Familia Burseraceae

Género *Bursera*

Especie *B. aptera*



**Figura 14.** Anatomía vegetal de *Bursera aptera* Ramírez. A. rama con hojas y flores masculinas; B. flor femenina en vista externa; C. flor femenina desprovista de un pétalo y 3 estaminodios; D. flor masculina disecada; E. frutos. Ilustrado por Megumi Andrade (Rzedowski et al., 2004).





**Figura 17.** *Bursera aptera* en la zona de colecta.



**Figura 18.** Hojas de *B. aptera*.



## APÉNDICE 4

## Zona de colecta

La especie *Bursera aptera* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de San Rafael Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 17).

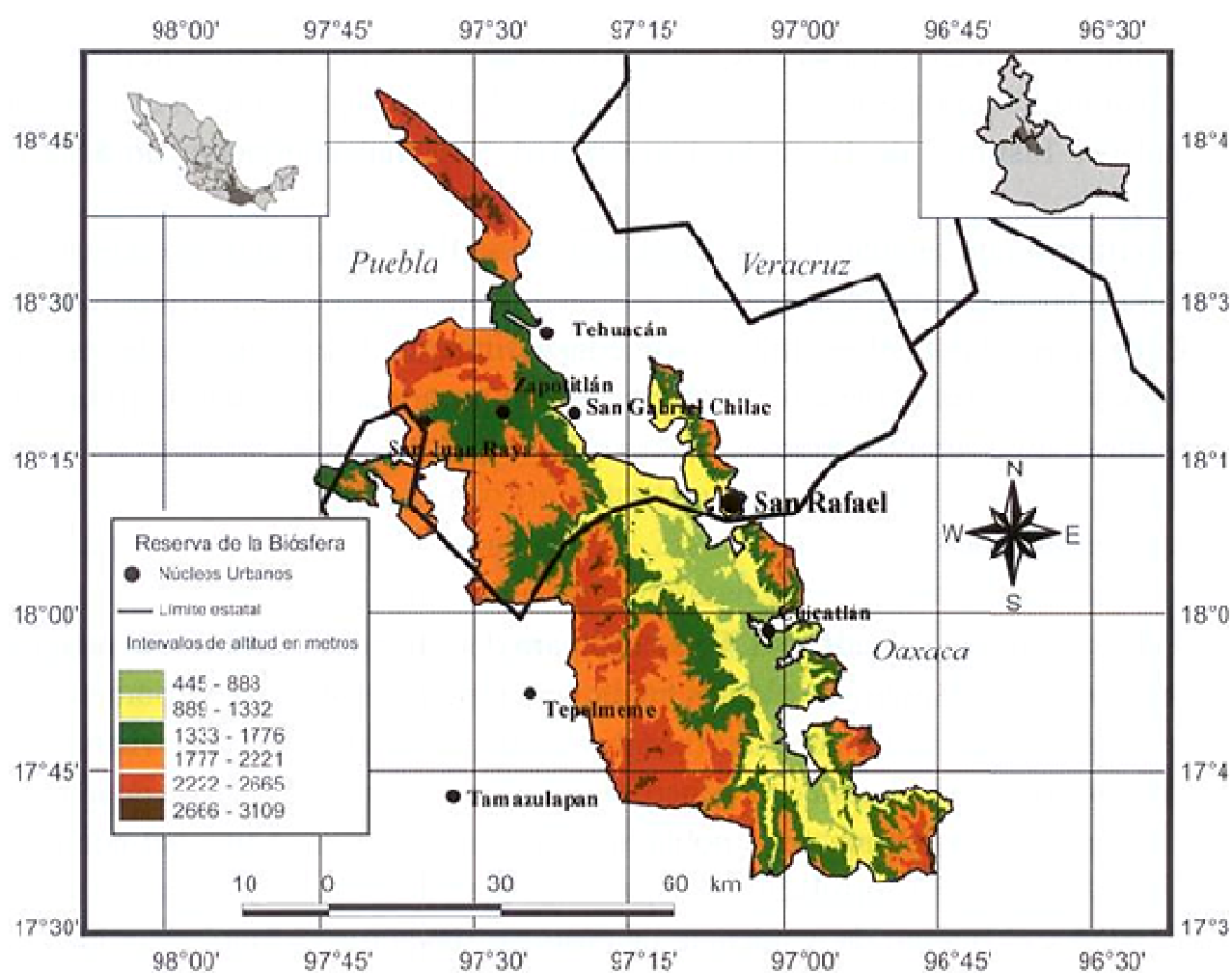


Figura 17. Ubicación geográfica del poblado.

---

### *Clima*

El clima es de tipo Bs (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

### *Hidrografía*

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

### *Edafología*

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

---

### *Vegetación*

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouquieria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouquieria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

### *Población*

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

## **APÉNDICE 5**

### **Método de difusión en agar de Kirby-Baüer**

#### **(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)**

Método para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (de las levaduras) del extracto.

- *Medio:* Para los ensayos con las cepas fúngicas se utiliza como medio de cultivo el agar PDA y caldo Sabouraud, para las cepas bacterianas agar y caldo Müeller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.
- *Aplicación de sustancias:* Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocarán manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril, deben colocarse por lo menos a 22 mm uno del otro y a 14 mm del

borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

- *Preparación de las muestras:* En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10  $\mu$ L del solvente correspondiente a cada extracto. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.
- *Control positivo:* Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos para la bacteria con 5  $\mu$ L de cloranfenicol (25 $\mu$ g) y para las levaduras con 25  $\mu$ g de nistatina.
- *Control negativo:* Sensidiscos a los que se les agrega 10  $\mu$ L del solvente empleado para disolver el extracto a evaluar.
- *Incubación:* Las levaduras y bacterias son cultivadas en una caja de Petri con 20 mL de agar, se colocan en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>.
- *Interpretación de resultados:* En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

---

**APÉNDICE 6****Microtécnica de dilución en caldo****(Koneman, 1985)**

La microtécnica de dilución en caldo se utiliza para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM) y concentración fungicida mínima (CFM) para levaduras.

- *Medio*: La susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 concavidades (placa de cultivo con fondo en “u”), una placa para cada caso (bacterias y levaduras). La placa se prepara colocando 50 µL de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) (bacterias) y 50 µL de caldo Sabouraud (levaduras) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 mg/mL).
- *Inóculo*: Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) (bacterias) y una suspensión de levaduras inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Sabouraud (levaduras) posteriormente se incuba a 35°C durante 24 horas (produciendo en el caso de las bacterias una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  organismos) y se diluyen en caldo Müller-Hinton y Sabouraud respectivamente para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^5$  organismos/mL. En cada una de las 96 concavidades se colocaron 50 µL de las suspensiones diluidas.
- *Control negativo*: Como control negativo se coloca 50 µL de caldo Müeller-Hinton (bacterias) con el solvente empleado para disolver el extracto y 50 µL de caldo Sabouraud (levaduras) con el solvente empleado para el extracto.

- *Testigo*: El testigo se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton en las concavidades más 50 µL del cultivo bacteriano.
- *Incubación*: Una vez cargadas las placas con la suspensión microbiana, se cubren con una tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas.
- *Interpretación de resultados*: Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 µL de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC). La placa se incuba 30 min. En las concavidades donde se desarrollen organismos, el colorante es reducido a color rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara. La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Fungicida Mínima. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado.

## APÉNDICE 7

### Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano

(Muroi et al., 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

- *Medio*: Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. El medio se coloca en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.

- *Inóculo:* Se prepara el inóculo con aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).  
Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 mL de la suspensión bacteriana en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa a 35 °C sin presión de CO<sub>2</sub>.
- *Aplicación de sustancias:* Se prepara en tubos con 10 mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI, ½ CMI y CBM. Se muestrea cada hora durante los primeros 4 tiempos: T0-0, T1-1, T2-2, T3-3, T4-4 (tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 hrs y finalmente a las 24 hrs. En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo.
- *Testigo:* Se prepara un tubo sin extracto como testigo.
- *Incubación:* Las cajas se incuban durante 24 hrs a 35 °C.
- *Interpretación de resultados:* Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el logaritmo base 10 del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.



**APÉNDICE 8****Inhibición del crecimiento radial****(Wang y Bun, 2002)*****Método Cualitativo***

El ensayo para evaluar la actividad contra los hongos filamentosos se realiza en cajas Petri (100 X 15 mm) con 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inocula un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se desarrolla, se colocan los discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es similar a la técnica de difusión en agar (apéndice 4). Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelial.

- *Incubación:* Las placas se incuban a 23 °C durante 72 horas (hasta que el crecimiento micelial se desarrolle).
- *Controles negativos:* Discos a los que se les agrega 10 µL del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).
- *Controles positivos:* Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 25 µg/disco de Ketoconazol.
- *Interpretación de resultados:* Si existen zonas de inhibición, se reporta el extracto como activo, en todos los casos la prueba se realiza por triplicado.

***Método Cuantitativo***

El ensayo contra hongos filamentosos se efectúa en cajas de cultivo de 24 pozos, cada pozo con 1.5 mL de agar papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 2.00, 1.50, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL, posteriormente se coloca un botón de micelio de 1 mm de diámetro.

- *Incubación:* Las placas se incuban a 23°C durante 72 horas (hasta que se desarrolla el crecimiento micelial).
- *Controles positivos:* Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/mL.
- *Interpretación de resultados:* Los resultados se reportan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición fue aquella en la que ya no se observó crecimiento, la cual corresponde a la CFM; mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF<sub>50</sub>. El cálculo de la CF<sub>50</sub> se realiza con un modelo matemático.

## APÉNDICE 9

### Citotoxicidad

#### Línea celular y medio de cultivo

La línea de macrófagos P-388 de ratón leucémico, fue mantenida en medio DMEM-F12 (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 µg/mL de antimicótico (Anfotericina B). Las células se cultivaron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y se despegaron con Tripsina-Verseno 0.5%.

#### Prueba de citotoxicidad del extracto sobre macrófagos P-388 con el método de Cristal Violeta (Badisa et al., 2003)

Se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una densidad de 15,000 células por pozo y se dejaron incubar por 2 horas antes del tratamiento. Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *B. aptera* (20–0.004 mg/mL); se obtuvo la concentración inicial mediante dilución en DMSO, asegurándose que la concentración final del solvente

no fuera superior al 1% (v/v); los ensayos se realizaron por triplicado. La placa fue incubada por 48h a 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Como control positivo se utilizó Doxorubicina; los pozos con células sin ningún tratamiento fueron considerados como control negativo. Al finalizar el periodo de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción de Cristal Violeta con base al protocolo reportado por Badisa et al., (2003). Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) en el cual se considera que para que un extracto tenga un efecto citotóxico activo el valor de CI<sub>50</sub>, tras la incubación entre 48-72 h debe ser de 20 µg/ml o menos y para un compuesto puro es de 4 µg/ml o menos (Geran et al., 1972 y Swanson et al. 1990).

Tinción de Cristal Violeta:

- Se elimina el medio de la placa de cultivo de 96 pozos sacudiéndola, después de lo cual se lava dos veces suavemente con PBS 1X estéril.
- Con 50 µL de glutaraldehído 1.1% por 5 minutos se fijan las células.
- Se retira el resto de glutaraldehído y se lava suavemente dos veces con PBS 1X estéril y se agregan 100 µL de solución de Cristal Violeta a todos los pozos.
- Se incuba de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se elimina el exceso de colorante sacudiendo la placa.
- Nuevamente se lava la placa con solución salina o PBS 1X. con 50 µL de ácido acético al 10% se solubilizan las células y se procede a leer en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

**APÉNDICE 10****Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)****(Okusa et al., 2007)**

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS.

- Aplicación de sustancias: En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-100 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz y se mantiene en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA.
- Blanco: Pozos con 200 µL de metanol.
- Control positivo: Se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema. (o el DPPH)
- Interpretación de resultados: Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema)

---

**APÉNDICE 11****Conteo de fenoles totales****(Método modificado de Singleton et al., 1999)**

La concentración de fenoles (CFT) totales se mide por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica de óxido-reducción, dónde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu que actúa como agente oxidante. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación  $6^+$ . La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre  $5^+$  y  $6^+$ , formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para la cuantificación de fenoles totales. Se utiliza una solución estándar ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de ésta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), de la cual se toma una alícuota de 250  $\mu$ L y se agregan 750  $\mu$ L de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL. Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se

determina por triplicado. Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

## **APÉNDICE 12**

### **Cuantificación de flavonoides totales**

#### **(Método de Dowd modificado de Praveen y Awang, 2007)**

La concentración de flavonoides totales se mide por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ). El catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides en metanol, produciendo en el análisis espectrofotométrico un desvío a longitudes de onda más largas y una intensificación de la absorción. Por lo tanto, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, en particular los ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Esto se hace en un espectrofotómetro a 425 nm utilizando cloruro de aluminio al 2% en metanol. En estas condiciones, el complejo flavonoide-aluminio absorbe a una longitud de onda mucho mayor que el flavonoide sin la presencia del agente complejante. Los ácidos fenólicos, incluidos los que forman complejos con  $\text{AlCl}_3$  absorben longitudes de onda mucho más bajas evitando así la interferencia con las medidas de absorbancia.

Se prepara una curva de calibración con quercetina, que es un flavonol muy abundante en la naturaleza dentro del grupo de los flavonoides y destaca por su elevada actividad antioxidante, consiste de 3 anillos y 5 grupos hidroxilo. Se utiliza una solución estándar de quercetina (1mg/mL), a partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para las diferentes concentraciones (1-100 ppm), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de metanol para alcanzar el

volumen de 1 mL, posteriormente se adiciona a cada una 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol, para alcanzar el volumen final de 2 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar de 0.2 mg/mL en 1 mL de metanol, a la cual se adiciona 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2% en metanol, para alcanzar el volumen final de 2 mL. El blanco se prepara con 1 mL del extracto en solución más 1 de metanol sin  $\text{AlCl}_3$ . El control negativo se prepara con 1 mL de metanol más 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  al 2 % en metanol. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

## APÉNDICE 13

### **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

La identificación de los componentes químicos de las muestras del extracto metanólico de *B. aptera* se realizaron en el cromatógrafo de gases HP 6890 usando un detector de masas selectivo HP 5973, equipado con la base de datos Chemstation y Wiley 275 Spectra Data. Se utilizó una columna capilar de HP-5 5% de fenil metil siloxano (30 mx 0,32 mm; 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de la columna 70°C (0.5 min), 70-150°C (15°C/min), 150-220 °C (20°C/min), 220-310°C (25°C/min), 310°C (5 min), la interface 180°C; gas acarreador He, split 1:10 , tasa de flujo 1.6 mL/min (3.43 Psi); energía de ionización 70 eV; intervalo de masas 30-550; volumen inyectado 2.0  $\mu\text{L}$ .

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, A., Argueta, A. y Cano, L., 1994. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. *Bursera aptera*. Tomado el 17 de agosto del 2012. [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&po=popoloca&te=Nta\\_danichua&id=6202&clave\\_region=21](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&po=popoloca&te=Nta_danichua&id=6202&clave_region=21)
- Akerele O., 1993. Las plantas medicinales: un Tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud 14, 390-395.
- Aldana Ll., L., Salinas S., D. O., Valdés E., Ma. E., Gutiérrez O., M., Valladares C., M.G., 2010. Evaluación bioinsecticida de extractos de *Bursera copallifera* (d.c.) bullock y *Bursera grandifolia* (Schltdl.) Engl. en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: noctuidae). Polibotánica 29, 149-158.
- Araujo, D. J. y Salas, A. R., 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. Revista Científica 6, 6-18.
- Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C.E., 2009. Metabolismo secundario de las plantas. Recursos Educativos (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2 (3), 119-145.
- Badisa, R.B., Tzakou, O., Couladis, M. and Pilarinou, E., 2003. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. Phytotherapy Research 17, 472-476.
- Badoni, S., and Kumar, S., 2012. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Fatty Acids from *Celtis australis* L. The Natural Products Journal 2, 323-327.
- Ban, J. O., Hwang, I. G., Kim, T. M., Hwang, B. Y., Lee, U. S., Jeon, H. S., Yoon, Y. W., Kim, D. J. y Hong, J. T., 2007. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through



- inactivation of NF- $\kappa$ B in Human Colon Cancer Cells. *Archives of Pharmacal Research* 30(11), 1455-1463.
- Becerra, X. J., Venable, D. L., Evans, P. H. y Bowers, W. S., 2001. Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoology* 41, 865-876.
- Boluda, J. C., Duque, B., Gulyas, G., Aragón, Z., Duque, M. y Díez, F., 2005. Lignanos (2) actividad farmacológica. *Revista de Fitoterapia* 5(2), 135-147.
- Brito, S., Crescente, O., Fernández, A., Coronado, A. y Rodriguez, N., 2006. Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomédica* 26(1), 1-7.
- Camporese A., Balick M.J., Arvigo R., Esposito R.G., Morsellino N., De Simone F., Tubaro A., 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology* 87, 103-107.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. y Lira, R., 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan Puebla, México. *Journal of Etnofarmacology* 97, 426-439.
- Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de V. R. A., Durán, D. Á., Lira S. R., 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75, 21-43.
- Carretero, M. E., López-Pérez, J. L., Abad, M. J., Bermejo, J., Tillet, S., Israel, A., Noguera-P., B., 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 11-15.

CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), 1998. Decreto por el que se declara de área natural protegida con el carácter de Reserva de la Biosfera, la región denominada Tehuacán-Cuicatlán ubicada en los estados de Oaxaca y Puebla. <http://www.conanp.gob.mx/sig/decretos/reservas/Tehuacan.pdf> Tomado el 16 de agosto del 2012.

Cowan, M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology 12, 564-582.

Cuenca-Estrella, M., 2010. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista Española de Quimioterapia* 23(4), 169-176.

Dávila, A. P., Medina, L. R., Ramírez, R. A., Salinas, T. A. y Tenorio, P., 1995. Análisis de la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: endemismo y diversidad. Citado en Linares, E., Dávila P., Chiang, F., Bye, R. y Elias, T. (eds.). *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 33-41 pp.

Dávila, A. P., Arizmendi, M. Del C, Valiente-Banuet A., Villaseñor, J. L, Casas, A. y Lira R., 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation* 11, 421-442.

Delgado, S. J., Villaseñor, G. M., Rodríguez, M. A., Herrera, H. R., Santerre, A., Puebla, P. A., 2006. Actividad citotóxica y antioxidante de los flavonoides y saponinas de las fracciones obtenidas de *Bursera fagaroides*. *Revista de Fitoterapia* 6 (1), 103 pp.

Dixon, R. A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

- Domingo, D. y López-Brea, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16 (4), 385-393.
- Domínguez, X. A., 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa. México. 281 pp.
- Escobar, C. y Zuluaga, A., 2004. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana* 32, 231-240.
- Espinosa, E. L., 2012. Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schelechtendalii* Engler. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México 71 pp.
- Evans, P. H., J. X. Becerra, D. L. Venable, and W. S. Bowers., 2000. Chemical analysis of squirt-gun defense in *Bursera* and counter defense by Chrysomelid beetles. *Journal Chemical Ecology* 26, 745–754.
- Fernández, B. Ma. N., 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 98 pp.
- García, E., 1981. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, UNAM, México. 252 pp.
- Geran, R. I., Greenberg, H. S., McDonald, M. M., Schumacher, A. M., Abbott, B. J., 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemother Rep* 3, 17-19.
- Gillet, J. B., 1980. *Commiphora* (Burseraceae) in South America and its relationships to *Bursera*. *Kew Bulletin* 34, 569-587.

- Gómez, S., Saucedo, B., Criollo, L., Rosas, L., Canales, M., Aburto, A., 2012. Evaluación fitoquímica y biológica de algunas burseras de la cañada oaxaqueña. *Revista Latinoamericana de Química* 39 (Suplemento especial), 298.
- González, G., Soto, H., Kite, G. y Martínez, V., 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens HBK var. berlandieri Schauer*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 30(1), 43-49.
- Harrewijn, P., Van Oosten, A. M., Piron P. G. M., 2001. Natural Terpenoids as Messengers. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 147-173 pp.
- Hueso-Falcón, I., Cuadrado, I., Cidre, F., Amaro-Luis, M., Ravelo, G., Estevez-Braun, A., Heras, B. y Hortelano, S., 2011. Synthesis and anti-inflammatory activity of ent-kaurene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 1291-1305.
- INE (Instituto Nacional de Ecología), 2007. Diversidad ecológica y biológica de México. México D. F. disponible en línea: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/2/int.html>. Última actualización 15/11/2007.
- Jiang, H., Liang, C., Liu, X., Jiang, Q., He, Z., Wu, J., Pan, X., Ren, Y., Fan, M., Li, M. and Wu, Z., 2010. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis* 210(1), 71-77.
- Jubie, S., Nilesh, R., Palanichamy, D., Rajagopal, K., Nithyanantham, M., Anthoniswamy, S., 2012. Synthesis, antidepressant and antimicrobial activities of some novel stearic acid analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* 54, 931-935.

- Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Teng Tan. G., Ma, Cuiying., Van Hung, N., Manh Cuong, N., Bunyaphatsara, N., Doel Soejarto, D., Fong H., H. S., 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry* 66, 2745–2751.
- Koneman, W. E., 1985. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 439 pp.
- Kumar, P. P., Kumaravel, S. y Lalitha, C., 2010. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal Biochemistry Research* 4(7), 191-195.
- López, H. L. R., 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 64 pp.
- Llorente-Bousquets, J., y S. Ocegueda., 2008. Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, 283-322 pp.
- Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., Pizza C., 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 70, 641-649.
- Manzano S., P.; Miranda, M.; Gutiérrez, Y.; García, G.; Orellana, T.; Orellana, A., 2009. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch. (palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14(3), 45-53.
- Mata, S., Zolla, C., Arguete, A., 2009. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, Tomado el 4 de Noviembre del 2010 <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

- Medina, L. R., 2008. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 66. Burseraceae. Primera edición. Instituto de biología, UNAM. 1-76.
- Medina, S. J., 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Ciencias, México. 35 pp.
- Méndez, L. I., Ortiz, E., Villaseñor, J. L., 2004. Las Magnoliophyta endémicas de la porción xerofítica de la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. Serie Botánica 75(1), 87-104.
- Mendoza, L., Wilkens, M. y Urzúa, A., 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean Pseudognaphalium* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology 58(2), 85-88.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch., 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En: Sarukhán, J. y R. Dirzo (comps.). México ante los retos de labiodiversidad. Conabio. México.
- Mooney H. A., y Emboden, W. A., Jr., 1968. The relationship of terpene composition, morphology, and distribution of populations of *Bursera microphylla* (Burseraceae), Department of Botany Science, University of California, Los Angeles Brittonia 20, 44-51.
- Mora, C., Newmark, U., Santos, A., Sánchez, N., 2008. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. Revista Española de Quimioterapia 21(3), 174-179.
- Mora, L. M. E., 2009. Género *Bursera* usos y metabolitos secundarios. Tesina licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 13 pp.

- Muñoz, K., Arango, G., Jaramillo, M., 2004. Los antibióticos y su situación actual. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 11, 21-33.
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. y Takatsuki A., 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of VATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Structure and Function* 18, 139–149.
- Nicolas, C. R. M., 2013. Variación en la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera fagaroides*. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 99 pp.
- Noguera, B., Díaz, E., García, M.V., San Feliciano, A., López P., J.L., Israel A., 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92, 129–133.
- Ocampo, A. A., Jiménez, E. M., 1993. La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. *Veterinaria México* 24 (4), 291-295.
- Ocegueda, S., Moreno, E. y Koleff, P., 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas* 62, 12-15.
- Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112, 476-481.
- Organización Mundial de la Salud, 2002. Medicina tradicional necesidades crecientes y potencial, *Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS*, 2, 1-6.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra, 2003. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Suiza.
- Organización Mundial de la Salud, 2010. <http://www.who.int/es/>, consultada en Febrero de 2011.
- Osorio, D. E. J., 2009. Aspectos básicos de farmacognosia. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. 129 pp.
- Panilio, A. L., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Banerjee, S., Henderson, T. S., Tolson, J. S. and Martone, W. J., 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infection control and hospital epidemiology* 10, 582-586.
- Pascuzzo, L. C., Colmenares, R. L., Lugo, V. N., Maradei, I. I., Pascuzzo, L. M., Ramírez, S. M. y Segnini, N. V., 2008. *Farmacología Básica*. 916 pp.
- Pérez, T.G., 2003. Los flavonoides: antioxidantes o proantioxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22 (1), 48-57.
- Praveen, K. R. y Awang, B., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2(1), 70-80.
- Puerta, D., y León, M., 2009. Uso de las plantas medicinales en la comunidad de Higuera del estado Yaracuy. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Divulga* 13, 13-16.
- Queiroga, C. L., Teixeira D., M. C., Ribeiro, B. B., Melillo de Magalhães, P., 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia* 78, 327–328.



- Rice-Evans, C. A., Miller J. N. y Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2(4), 154-159.
- Robles, J., Torrenegra, R., Gray, A.I., Piñeros, C., Ortiz, L., Sierra, M., 2005. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15(4), 283-286.
- Robles, J., Téllez, A., Rojas, R., Castro, C., Riveros, T., 2010. Efectos citotóxicos in vitro de extractos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20 (4), 588-593.
- Rojas, S. B., 2012. Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (Rose) Standl., y validación de su actividad antimicrobiana. Tesis Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 71 pp.
- Rosas, L. R., 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México. 94 pp.
- Rosas, A., P., Arteaga N., P., Reynoso O., R., Villagómez C., J. C., Sabanero L., M., Puebla P., A. M., Calvo M., C., 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 119, 398–402.
- Rzedowski, J. y Kruse, H., 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxón* 28 (1,2/3), 103-116.
- Rzedowski, J., Medina, L. R., y Calderón, R. G., 2004. Las especies de *Bursera* de la cuenca del río Papaloapan, México. *Acta Botánica Mexicana* 66, 23-151.

- Rzedowski, J., Medina, R., y Calderón, R, G., 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 70, 85-111.
- Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel- Rahman, H. M., Algandaby, M.M., Al-Abbasi, F. A., Abdel- Naim, A.B., 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and applied pharmacology* 264(1), 84-93.
- Salcedo-Sánchez, B., 1997. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias 6-10 pp.
- Santiago, D. C., 2008. Obtención de agentes anticancerosos mediante la transformación química de la podofilotoxina. Tesis de Licenciatura. Universidad de los Andes, Venezuela 85 pp.
- Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., Rocha, S. M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3), 355-363.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Smith, C. E., 1965a. Flora, Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany* 31, 50-100.
- Smith, C. E., 1965b. Agriculture, Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany* 31, 101-143.
- Sujatha, S., Anand, S., Sangeetha, K.N., Shilpa, K., Lakshmi, J., Balakrishnan, A., Lakshmi, B.S., 2010. Biological evaluation of (3b)-STIGMAST-5-EN-3-OL as

- potent anti-diabetic agent in regulating glucose transport using *in vitro* model. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2, 101–109.
- Swanson, S. M, Pezzuto, J. M., 1990. Bioscreening technique for cytotoxicity potential and ability to inhibit macromolecule biosynthesis. In: Thompson EB, Ed VCH, editors. *Drug bioscreening: drug evaluation techniques in pharmacology*. New York 273-297.
- Syamasundar, K. V., Mallavarapu G. R., Murali K.E., 1991. Triterpenoids of The resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemrsny* 30, 362-363.
- Syamasundar K. V., Mallavarapu G. R., 1995. Two triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytocheraistry* 40, 337-339.
- Takasaki, M., Konoshima T., Tokuda H., Mashuda K., Arai Y., Shiolima K., Ageta H., 1999. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant II. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 22, 606-610.
- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., Lewi, K., 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobials Agent Chemother* 46, 3133-3141.
- Tillement, L., Lecanu, L., Yao, W., Greeson, J., Papadopoulos, V., 2006. The spirostenol (22S,25S)-(20S)-spirost-5-en-3 $\beta$ -yl hexanoate prevents A $\beta$ -induced impairment of mitochondrial function and blocks mitochondrial A $\beta$  uptake into neuronal cells. *Steroids* 71(8), 725-735.
- Trease, G. E. y Evans, W. C., 1991. *Farmacognosia*. 13 ed. Interamericana. México. 901 pp.
- Valiente, B. L., 1991. *Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México*. Tesis de Licenciatura, Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 65 pp.

- Valiente- Banuet, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A., 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México 67, 25-75.
- Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. In: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P. M. Academic Press. New York, USA 47-71 pp.
- Vásquez, V. M., 2012. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana del extracto de la parte aérea de algunas especies del género *Bursera*. Trabajo profesional. Universidad Nacional Autónoma de México 14 pp.
- Villaseñor, J. L., 1992. Los parques nacionales y otras áreas protegidas y su papel en la conservación de la riqueza florística. Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara 1, 119-130.
- Wang, H. y Bun, T. N., 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. Phytochemistry 61, 1-6.
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, O.F., Bilaloglu, V., 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea*), sage (*Salvia triloba l*) and black tea (*Camelia sinensis*) extracts. Journal Agriculture Food Chemistry 48, 5030-5034.
- Zhang, X., Xiong, H., Liu, L., 2012. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. Journal of Ethnopharmacology 141, 206-211.
- Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., Kim, W. G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. Federation of European Biochemical Societies 579, 5157-5162.