



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES
DE ALGUNAS PLANTAS UTILIZADAS EN LA
MEDICINA TRADICIONAL DEL VALLE DE
TEHUACÁN-CUICATLÁN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

ALMA OFELIA REYNA CAMPOS



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ana María García Bores

Los Reyes Iztacala, Estado De México, 2015



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.

Decidiste tomar mi mano para enseñarme a caminar por este mundo, con tu amor infinito me diste las herramientas que necesitaría para cuando tuvieras que soltarme. Aprendí de ti a mantenerme en pie, a disfrutar de cada instante que la vida nos da, a agradecer por los días vividos y a aprovechar la oportunidad de vivir un día más. Fuiste amor, comprensión, fuerza, sabiduría, justicia, luz, fuiste mi guía. Este logro también lleva tu nombre.

Mamá Tere

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por el apoyo que siempre me ha brindado, por tu paciencia y comprensión, por la enorme mujer que eres, por la confianza que ha depositado en mí, por haber sido padre y madre. Por ser mi ejemplo de bondad, superación y valentía.

A Rafael, por las ilusiones, enojos, llantos, risas y juegos compartidos, por las ideas en común, por la complicidad que tenemos, por los consejos, por alentarme siempre a continuar con mis sueños y por esa inmensa fortaleza que posees.

A Toño, por el cariño que siempre me ha brindado, por su apoyo y su paciencia.

A César, por tu amistad, por tu amor incondicional, por escucharme tanto, por cuidarme siempre, por ser mi fuente de alegría y tranquilidad, por el tiempo compartido, por la confianza y por acompañarme en este camino.

A mi familia, por el apoyo y cariño que me brindan, día con día.

A Abril, Brenda, Erika, Gabriela, Pamela y Rebeca, por su amistad, por ser cómplices en muchas aventuras, por sus consejos, por su apoyo, por las risas, y por hacer que esta etapa de mi vida se llenara de locura.

A la Dra. Ana María García Bores, por su infinita paciencia, por sus consejos y sobre todo por el gran apoyo que siempre me brindó.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	5
Radicales libres	5
<i>Formación de radicales libres</i>	5
<i>Fuentes de radicales libres</i>	5
<i>Mecanismos de reacción de los radicales libres</i>	6
Especies Reactivas de Oxígeno	6
a) <i>Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)</i>	7
b) <i>Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)</i>	8
c) <i>Radical hidroxilo ($OH\cdot$)</i>	8
d) <i>Oxígeno singlete (1O_2)</i>	9
Estrés oxidativo	10
<i>Daño oxidativo celular</i>	10
Antioxidantes.....	12
<i>Mecanismo de acción de los antioxidantes</i>	13
<i>Clasificación de antioxidantes</i>	13
Género <i>Bursera</i>.....	17
<i>Bursera morelensis</i> Ramírez.....	19
Género <i>Lippia</i>.....	21
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	21
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO.....	23
MATERIAL Y MÉTODO.....	24
1. Material vegetal y extractos	24
2. Actividad antioxidante.....	24
3. Cuantificación de fenoles totales	26
RESULTADOS.....	27
Efecto neutralizador del DPPH\cdot.....	27
Actividad neutralizadora del $O_2^{\cdot-}$.....	29
Efecto neutralizador del $OH\cdot$.....	31

Poder reductor	33
Fenoles totales	34
DISCUSIÓN.....	35
Efecto neutralizador del DPPH'	35
Actividad neutralizadora de O₂^{•-}	38
Actividad neutralizadora del OH[•]	39
Poder reductor	40
Fenoles totales	41
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44
APÉNDICE	52

Índice de Figuras.

Figura 1. Ruptura homolítica.....	5
Figura 2. Reacción de Fenton.....	5
Figura 3. Abstracción de un átomo.....	6
Figura 4. Reacción de adición entre un RL y una molécula no radical.....	6
Figura 5. Reacción de adición entre dos RL.....	6
Figura 6. Formación de ERO por reducción univalente del O ₂	7
Figura 7. Generación del radical anión superóxido.....	7
Figura 8. Reacción de Haber-Weiss.....	7
Figura 9. Reacción de dismutación del radical superóxido.....	8
Figura 10. Reacción del H ₂ O ₂ con el Cl ⁻	8
Figura 11. Formación del OH [*] por lisis de H ₂ O ₂	9
Figura 12. Formación del OH [*] por ruptura homolítica del H ₂ O ₂	9
Figura 13. Formación del OH [*] en el proceso inflamatorio.....	9
Figura 14. Formación del OH [*] producto de la descomposición del ONOOH.....	9
Figura 15. Reacción fotosensible.....	10
Figura 16. Formación de ¹ O ₂ en el proceso de lipoperoxidación.....	10
Figura 17. Respuesta de la célula al estrés oxidativo (EO).....	11
Figura 18. Clasificación de antioxidantes.....	14
Figura 19. Reacción que cataliza la enzima glutatión peroxidasa.....	15
Figura 20. Estructura química de un fenol (A) y un flavonoide (B).....	16
Figura 21. <i>B. morelensis</i> Ramírez.....	20
Figura 22. Porcentaje de decoloración de DPPH• de los extractos metanólicos de <i>L. graveolens</i> (I) y <i>B. morelensis</i> (II), además de la quercetina (III).....	28
Figura 23. Porcentaje de decoloración de la mezcla de reacción generada en el ensayo del O ₂ ^{•-} por parte de los extractos metanólicos de <i>L. graveolens</i> (I) y <i>B. morelensis</i> (II), además de la quercetina (III).....	30
Figura 24. Porcentaje de decoloración de la mezcla de reacción generada en el ensayo de OH• por parte de los extractos de <i>L. graveolens</i> (I), y <i>B. morelensis</i> (II), además del ácido gálico (III).....	32
Figura 25. Poder reductor de los extractos metanólicos de <i>L. graveolens</i> y <i>B. morelensis</i> y del control quercetina.....	34
Figura 26. Ubicación geográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.....	52

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) en cantidades excesivas generan diversas patologías degenerativas. Una opción para prevenir o disminuir los daños causados por las ERO es la quimioprevención mediante productos naturales utilizados en la medicina tradicional. En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán prospera entre el 10% y 12% de la flora mexicana, la información disponible sugiere que la riqueza de recursos vegetales aprovechados, en dicho sitio, es muy elevada. Entre las especies que forman parte de la flora del Valle y que son empleadas en la medicina tradicional se encuentran *Lippia graveolens* y *Bursera morelensis*. En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante *in-vitro* frente al radical DPPH, superóxido e hidroxilo. También se determinó el poder reductor y el contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Los resultados muestran que *L. graveolens* presentó mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH en comparación con *B. morelensis* con una capacidad/concentración eficaz media de (CE₅₀) de 21.89 µg/mL y 24.83 µg/mL respectivamente, a diferencia de la actividad frente al radical superóxido, en la cual, *B. morelensis* presentó mayor actividad (CE₅₀ = 61.11 µg/mL), sin embargo, para las dos pruebas la actividad antioxidante fue menor en comparación con la quercetina (estándar de referencia). El poder antioxidante frente al radical hidroxilo de ambos extractos resultó mayor en comparación con el ácido gálico (estándar de referencia), siendo *B. morelensis* la especie de mayor actividad. El poder reductor de *L. graveolens* fue mayor en comparación con *B. morelensis*, aunque menor con respecto a la quercetina. Finalmente *L. graveolens* presentó mayor concentración de fenoles totales que *B. morelensis* con 304.28 y 224.90 mg de equivalentes de ácido gálico, respectivamente. Por lo cual, los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* presentan actividad antioxidante frente a los radicales DPPH, superóxido e hidroxilo.

INTRODUCCIÓN

El oxígeno se produjo en cantidades significativas en la atmósfera terrestre hace aproximadamente 2 200 millones de años debido al surgimiento de organismos fotosintéticos. Actualmente, los niveles de oxígeno en la atmósfera constituyen el 21%. Excepto por las especies anaerobias todos los organismos requieren oxígeno para la producción eficiente de energía, ya que es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, sin embargo, el oxígeno es un gas tóxico (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los organismos aerobios pueden sobrevivir en presencia de este gas porque paralelamente a la evolución de la cadena transportadora de electrones se dio la evolución de sistemas antioxidantes que brindan un mecanismo de protección frente a tal toxicidad (Aruoma, 1994).

La toxicidad del oxígeno se debe principalmente a los productos de la reducción parcial del mismo, las especies reactivas de oxígeno (ERO). Entre las ERO se encuentran los radicales libres, especies químicas capaces de existir independientemente con uno o más electrones desapareados, como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), además de especies no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que genera fácilmente radicales libres (Aruoma, 1994; Ray *et al.*, 2012; Carocho y Ferreira, 2013). En los organismos las ERO se generan de forma natural como consecuencia del metabolismo aeróbico, a través de la xantina oxidasa, en los peroxisomas, en procesos inflamatorios, durante la fagocitosis, entre otros. Factores externos como la contaminación ambiental, la exposición a radiación, el consumo de drogas, solventes industriales, entre otros también promueven su producción (Carocho y Ferreira, 2013). Las ERO juegan un papel crucial en los procesos fisiológicos normales incluyendo la fosforilación de proteínas, activación de factores de transcripción, diferenciación celular, apoptosis e inmunidad celular. No obstante son capaces de deteriorar la funcionalidad celular cuando se producen en exceso llegando a un estado denominado estrés oxidativo (Seifried *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2014).

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de ERO y los sistemas de defensa antioxidante. Este genera daño a biomoléculas y está implicado en

la génesis y el desarrollo de una variedad de patologías como carcinogénesis, enfermedades cardíacas y neurodegenerativas (Ray *et al.*, 2012).

Las células poseen diversos sistemas de defensa antioxidante que las protegen del daño oxidativo causado por las ERO, a través de complejos mecanismos, tales como la prevención de las reacciones en cadena, la quelación de metales de transición, la descomposición de peróxidos y la neutralización del radical mediante la donación de un electrón o la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (Ardestani y Yazdarnparast, 2006). Los antioxidantes son definidos como cualquier sustancia que a bajas concentraciones previene o retrasa el daño causado por las ERO; estos se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos (Rajendran *et al.*, 2014).

Actualmente, hay un creciente interés en los antioxidantes derivados de células vegetales especialmente fenoles como quercetina, carnosol, timol, ácido gálico, taninos, ácido elágico y eugenol, entre otros, no sólo porque se utilizan para prevenir la oxidación de productos alimenticios, también porque podrían proveer beneficios a la salud humana atenuando el daño oxidativo (Halliwell *et al.*, 1995; Ardestani y Yazdarnparast, 2006). Una fuente potencial de dichos compuestos son las plantas utilizadas en la medicina tradicional, las cuales representan una alternativa, lo que contribuye a mejorar la calidad de vida, posponiendo o previniendo el desarrollo de enfermedades degenerativas, a través del control de las ERO (Embuscado, 2015). En México, aproximadamente el 15% de la flora total es utilizada en la medicina tradicional (Ocegueda *et al.*, 2005).

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán adquiere especial atención al ser una de las áreas más importantes de México, debido a la alta riqueza específica, diversidad biológica y endemismos de diversos grupos vegetales (Ríos *et al.*, 2004). En esta zona prospera entre el 10 y 12% de la flora mexicana. Entre las causas de su elevada diversidad destacan su compleja historia geológica, la actual influencia de las zonas biogeográficas, Neártica y Neotropical, así como la cercanía de áreas húmedas de varios estados como Oaxaca y Guerrero. Así mismo, el Valle se caracteriza por la presencia de un complejo escenario fisiográfico y un diverso rango altitudinal que tiene como consecuencia la formación de diferentes tipos de suelo y por lo tanto de vegetación (Dávila *et al.*, 2002).

Además, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán posee una importante diversidad biocultural, la información disponible sugiere que la riqueza de recursos vegetales aprovechados por los habitantes locales es muy elevada. En un estudio realizado en una pequeña zona de esta región se identificaron 280 especies útiles de las cuales 90 fueron reportadas como medicinales, entre ellas se encuentran *Lippia graveolens* y *Bursera morelensis* (Hernández, 2005).

L. graveolens, comúnmente llamada orégano, es una planta aromática nativa del meridiano norte de América, México, Guatemala, Nicaragua y Honduras (Rocha *et al.*, 2008). Desde tiempos antiguos se han utilizado diversas especies del género *Lippia* como analgésicos antipiréticos, antidiarreicos, antifúngicos, antígenotóxicos, antimicrobianos vasodilatadores y antihipertensivos (Soto *et al.*, 2012). En 2005, Hernández y colaboradores en un estudio etnobotánico en Zapotitlan Salinas, Puebla, México reportaron que la población local utiliza infusiones de la parte aérea de *L. graveolens* para tratar enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Posteriormente, investigaron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *L. graveolens* (Hernández *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados se han enfocado en las actividades biológicas de los aceites esenciales y no en los extractos polares (Rocha *et al.*, 2008).

Por otra parte *B. morelensis* es una especie endémica de México distribuida en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí (Rzedowski *et al.*, 2005). De acuerdo con lo reportado por Hernández y colaboradores en 2005, *B. morelensis* es utilizada por la población para curar heridas. Además Serrano en 2013 demostró que dicha especie presentó actividad cicatrizante, bactericida y antioxidante, sin embargo, aún son escasos los estudios realizados de *B. morelensis* acerca de su actividad biológica.

MARCO TEÓRICO

Radicales libres

Los radicales libres (RL) son especies químicas capaces de existir de manera independiente con uno o más electrones desapareados en el orbital externo lo que les confiere una gran inestabilidad (Halliwell, 2006; Carochó y Ferreira, 2013; Pisoschi y Pop, 2015)

Formación de radicales libres

La formación de RL está dada por dos mecanismos (González, 2011):

- I) Ruptura homolítica: generada por termólisis o fotólisis, ocurre en algunos enlaces lábiles (figura1).

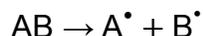


Figura 1. Ruptura homolítica.

- II) Transferencia de electrones: ocurre en moléculas neutras o cargadas (figura 2).



Figura 2. Reacción de Fenton.

Fuentes de radicales libres

Los RL son producidos continuamente de forma endógena en procesos que incluyen: respiración celular, fagocitosis, proceso de inflamación y durante el ejercicio físico; muchos de estos RL son necesarios para llevar a cabo ciertas reacciones biológicas. En cantidades pequeñas funcionan como moléculas de señalización involucradas en la regulación del proceso de proliferación celular, apoptosis y expresión genética, además su producción en fagocitos es esencial como mecanismo de defensa contra varios microorganismos. Sin embargo cuando se presenta una sobreproducción de RL puede generarse daño celular. Factores externos como: radiación, consumo de drogas, pesticidas, solventes industriales, contaminación ambiental y ozono promueven la producción de RL (Carochó y Ferreira, 2013).

Mecanismos de reacción de los radicales libres

Los RL son generalmente muy reactivos, buscan con avidez completar su par electrónico, esto se logra mediante dos tipos de reacción (Li, 2012):

1. Abstracción de un átomo: Un RL tiene la capacidad de quitar un átomo de hidrógeno (H) a un enlace C-H de una biomolécula. Debido a que el H tiene un solo electrón, al ser sustraído del enlace C-H el carbono (C) quedará con un electrón desapareado, dando lugar a un radical centrado en el C (figura 3).

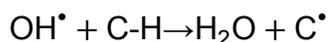


Figura 3. Abstracción de un átomo de H por el OH[•] a un enlace C-H generando un radical centrado en el carbono (C[•]).

2. Adición radicalaria: Hay dos tipos de reacciones por adición de radicales, una ocurre entre un RL y una molécula no radical; y otra entre dos RL.

- Reacción de adición entre un RL (A[•]) y una molécula no radical (B). Se produce cuando un RL se une a una molécula no radical formando un aducto radicalar (figura 4).

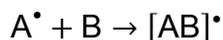


Figura 4. Reacción de adición entre un RL y una molécula no radical.

- Reacción de adición entre dos RL. Es generada cuando un RL (A[•]) se une a otro RL (B[•]) formando una molécula no radical (figura 5).



Figura 5. Reacción de adición entre dos RL.

Especies Reactivas de Oxígeno

Existen muchos tipos de RL, entre estos se encuentran aquellos que se generan con el oxígeno molecular (O₂). El O₂ es considerado un RL debido a que presenta un par de electrones desapareados, sin embargo, es un radical estable ya que dichos electrones tienen espines paralelos. Sí el O₂ oxidará una molécula no radical debería recibir un par de electrones con el mismo espín cedidos por dicha molécula, no obstante, un orbital atómico o molecular no puede cumplir con dicho criterio, es decir, solo presenta un par de electrones con espines opuestos. Dicha restricción genera que el O₂ solo pueda

aceptar un electrón a la vez y explica porque reacciona lentamente con moléculas no radicales. En contraste el O_2 reacciona rápidamente con otros RL por transferencia de un solo electrón. No obstante la reducción parcial de O_2 genera RL y moléculas no radicales, ambas se conocen como especies reactivas de oxígeno (ERO) (figura 6) (Halliwell, 2006).

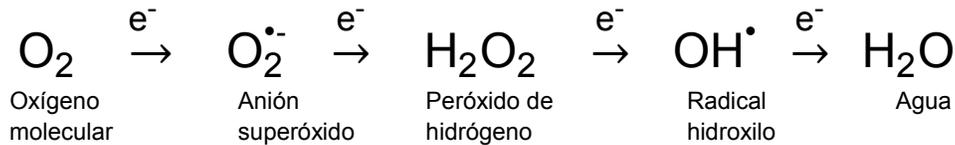


Figura 6. Formación de ERO por reducción univalente del O_2 .

Existen diferentes tipos de ERO entre las más conocidas se encuentran (Halliwell, 2006; Li, 2012; Piscochi y Pop, 2015):

a) **Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)**

El $O_2^{\bullet-}$ es un radical cargado negativamente, se genera cuando el O_2 es reducido con un electrón (figura 7).



Figura 7. Generación del radical anión superóxido.

A pesar de ser llamado “superóxido” no es un fuerte agente oxidante debido a su bajo potencial de reducción, actúa en mayor medida como agente reductor. Sin embargo, genera daño a las células, este se relaciona con sus propiedades químicas asociadas a las de un RL (Halliwell y Gutteridge, 2007):

- El $O_2^{\bullet-}$ reacciona con el óxido nítrico (NO^\bullet) para formar peroxinitrito (ONOO), un potente agente oxidante que causa daño a biomoléculas.
- En presencia de metales de transición, como el hierro, el $O_2^{\bullet-}$ en conjunto con el H_2O_2 , dan lugar al OH^\bullet una ERO altamente dañina, dicho proceso recibe el nombre de reacción de Haber-Weiss (figura 8).



Figura 8. Reacción de Haber-Weiss.

- Aunque el $O_2^{\bullet-}$ actúa generalmente como agente reductor, algunas veces lo hace como agente oxidante de los grupos hierro-azufre de varias enzimas, permitiendo la liberación del hierro y la inactivación de la enzima.
- El $O_2^{\bullet-}$ puede sufrir dismutación generando H_2O_2 y O_2 (figura 9).

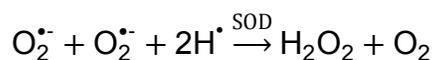


Figura 9. Reacción de dismutación del radical superóxido.

El término dismutación hace referencia a la reacción química en la cual el mismo reactante es oxidado y reducido.

b) **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**

El H_2O_2 puede ser generado por dismutación del $O_2^{\bullet-}$ o por la transferencia de dos electrones al O_2 . El H_2O_2 no es considerado un RL pues no cuenta con electrones desapareados, no obstante, puede dar lugar a RL. Varios mecanismos explican el efecto dañino del H_2O_2 (Halliwell, 2006):

- El H_2O_2 reacciona con los grupos tiol (SH) de ciertas enzimas, generando la inactivación de estas últimas.
- La reacción del H_2O_2 con iones metálicos de transición como el Fe^{2+} o el Cu^{1+} produce el radical OH^{\bullet} , a dicho proceso se le denomina reacción de Fenton (figura 2).
- El H_2O_2 reacciona con el anión Cl^- formando ácido hipocloroso (HOCl) una molécula altamente oxidante. Dicha reacción es catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO) (figura 10).

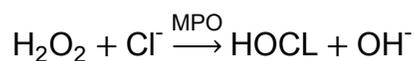


Figura 10. Reacción del H_2O_2 con el Cl^- .

c) **Radical hidroxilo (OH^{\bullet})**

Es considerada la ERO más reactiva debido a sus potencial redox, por lo que dicho radical es responsable del daño oxidativo de la mayoría de las biomoléculas (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Es generado por diversas fuentes (Halliwell y Gutteridge, 2007):

- La reducción del H₂O₂ por un electrón induce la formación del OH[•], dicha reducción se puede llevar a cabo mediante la reacción de Fenton (figura 2).
- La radiación ionizante (RI) promueve la lisis del agua generando OH[•] (figura 11), por su parte la radiación ultravioleta (UV) induce la ruptura homolítica del H₂O₂ obteniendo como producto OH[•] (figura 12).

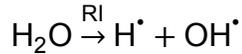


Figura 11. Formación del OH[•] por lisis de H₂O₂.

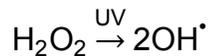


Figura 12. Formación del OH[•] por ruptura homolítica del H₂O₂.

- La reacción de HOCl con el O₂^{•-} produce OH[•]. Esta reacción se presenta como respuesta en el proceso inflamatorio (figura 13).

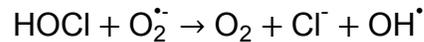


Figura 13. Formación del OH[•] en el proceso inflamatorio.

- La protonación del ONOO⁻ conduce a la formación de ácido peroxinitroso (ONOOH). La descomposición de este último produce OH[•] y radical dióxido de nitrógeno (NO₂[•]) (figura 14).

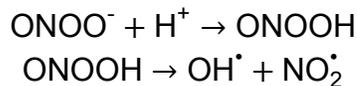


Figura 14. Formación del OH[•] producto de la descomposición del ONOOH.

d) **Oxígeno singulete (¹O₂)**

Forma energéticamente excitada del O₂, hay dos tipos de ¹O₂: (¹Δ_g) ¹O₂ y (¹Σ_g⁺) ¹O₂, este último es un RL de alta energía que presenta corta duración. Sin embargo, la forma (¹Δ_g) es a la que usualmente se refieren como oxígeno singulete, no es considerado un radical libre, y se genera por diversos mecanismos (Halliwell y Gutteridge, 2007):

- Reacción fotosensible. En esta reacción una molécula fotosensible (FS) es excitada (FS^{*}) por energía lumínica, posteriormente la energía de excitación es transferida al O₂, formándose el ¹O₂ (figura 15).

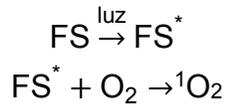


Figura 15. Reacción fotosensible.

- En células fagocíticas durante la explosión respiratoria la NADPH oxidasa reduce el O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$, el cual sufre dismutación produciendo H_2O_2 . La MPO de fagocitos cataliza la reacción entre H_2O_2 y Cl^- formando HOCl , este último reacciona con otra molécula de H_2O_2 obteniendo como producto final ${}^1\text{O}_2$.
- La lipoperoxidación genera radicales peróxilos (ROO^\bullet), estos reaccionan entre ellos generando ${}^1\text{O}_2$, alcohol (LOH) y cetonas (LO).



Figura 16. Formación de ${}^1\text{O}_2$ en el proceso de lipoperoxidación.

El ${}^1\text{O}_2$ reacciona por dos vías: 1) reacción química directa con sistemas biológicos y 2) por transferencia de energía del ${}^1\text{O}_2$ a una molécula aceptora sin cambios químicos en esta última.

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se refiere a una condición de la célula en la cual los niveles de ERO sobrepasan la capacidad de los sistemas antioxidantes para contrarrestarlos (Moller *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 2012; Piscochi y Pop, 2015). Dicha condición puede ser causada por el incremento en la producción de ERO o por una disminución de los sistemas de defensa antioxidante (Li, 2012).

Daño oxidativo celular

A nivel celular el estrés oxidativo genera daños que incluyen: disfunción, senescencia, transformación y muerte (figura 17). Se asocia a varios procesos patológicos y está implicado en el daño a biomoléculas por ERO (Halliwell *et al.*, 2006).

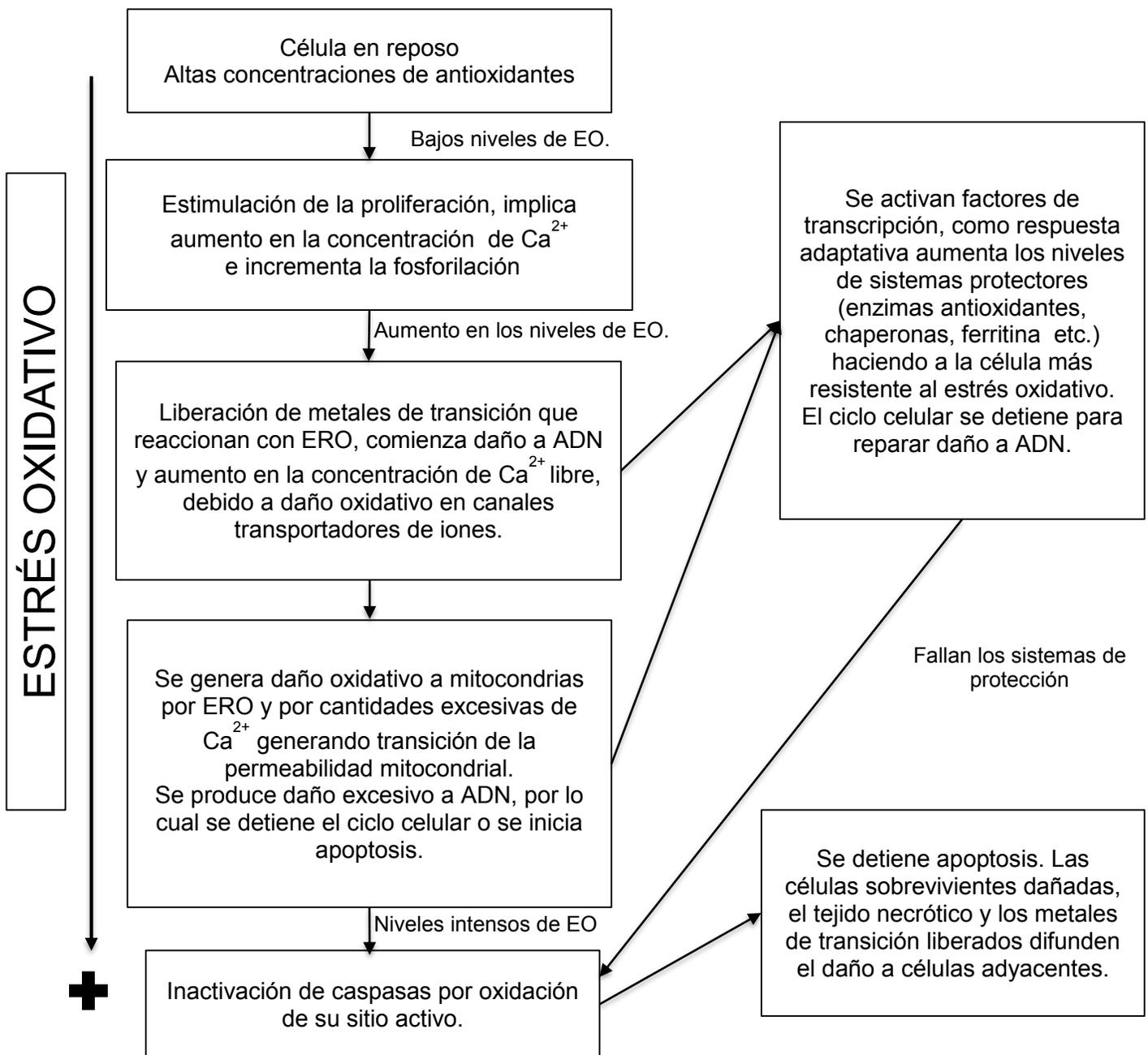


Figura 17. Respuesta de la célula al estrés oxidativo (EO). Adaptado de Halliwell, 2006.

Daño oxidativo a lípidos

El proceso de oxidación de lípidos por ERO se denomina lipoperoxidación. Las ERO que la causan incluyen radicales libres como OH^{\bullet} , RO^{\bullet} y ROO^{\bullet} , también incluyen moléculas no radicales como ONOO^- y $^1\text{O}_2$. La lipoperoxidación genera diversos productos, entre ellos hidroperóxidos lipídicos que en presencia de metales de transición pueden ser convertidos en RO^{\bullet} y ROO^{\bullet} . Además causa daño a la membrana celular, asimismo los

productos de dicho proceso generan daño a otras biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos (Halliwell *et al.*, 2006; Li, 2012; Piscochi y Pop, 2015).

Daño oxidativo a proteínas

La oxidación de proteínas se puede dar por oxidación en residuos de aminoácidos como cisteína y metionina, o por daño al centro activo de varias enzimas como oxidación del centro hierro-azufre. Las consecuencias del daño por ERO a proteínas incluye la alteración de su estructura y función, su agregación y el aumento en su degradación por proteosomas. Bajo ciertas circunstancias la oxidación de proteínas por ERO causa la activación de enzimas (Halliwell *et al.*, 2006; Li, 2012; Piscochi y Pop, 2015).

Daño oxidativo a ácidos nucleicos

El daño que ejercen las ERO a los ácidos nucleicos se manifiesta por modificación de bases nitrogenadas, por ruptura de la cadena de nucleótidos y por entrecruzamientos entre ácido nucleico-ácido nucleico o ácido nucleico-proteína (Halliwell *et al.*, 2006; Li, 2012; Piscochi y Pop, 2015).

Las consecuencias del daño a ácidos nucleicos por ERO son principalmente dos: 1) después de replicar el ácido desoxirribonucleico (ADN) dañado, las células sobrevivientes sufren alteraciones génicas o aberraciones cromosómicas, ambos eventos incrementan el riesgo de desarrollar cáncer y, 2) el daño al ADN interfiere con los procesos de transcripción o induce la detención del ciclo celular ocasionando muerte o senescencia celular contribuyendo al envejecimiento o al desarrollo de enfermedades (Halliwell *et al.*, 2006; Li, 2012; Piscochi y Pop, 2015).

Antioxidantes

Existen diversas definiciones del término antioxidante:

En 1995 Halliwell *et al.*, definieron antioxidantes como: “una sustancia que presente en concentraciones menores a las de un sustrato oxidable reduce o inhibe la oxidación de dicho sustrato”.

Khlevnicob *et al.* (2007) define antioxidantes como: “cualquier sustancia que neutralice directamente a las ERO o actué de forma indirecta regulando las defensas antioxidantes

o inhibiendo la producción de ERO”. En el mismo año Halliwell los definió como “cualquier sustancia que retrase, prevenga o remueva el daño oxidativo a una molécula”.

Mecanismo de acción de los antioxidantes

Distintos mecanismos pueden ser empleados por los antioxidantes para proteger a las células contra el daño oxidativo (Charles, 2012):

- Previniendo la formación de ERO (ej. quelación de metales).
- Por neutralización de ERO, actuando como agentes reductores o catalíticos.
- Mediante la reparación de biomoléculas dañadas.

Clasificación de antioxidantes

Los antioxidantes comprenden diferentes tipos de compuestos, por esta razón se clasifican en dos grupos principales (figura 18): enzimáticos (ej. superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y no enzimáticos que incluyen: cofactores (Q10), compuestos nitrogenados (ácido úrico), péptidos (glutatión), fenoles (flavonoides, ácidos fenólicos), taninos y lignanos entre otros (Soobratte *et al.*, 2005; Halliwell, 2006; Carocho y Ferreira, 2013; Piscochi y Pop, 2015; Oroian y Escriche, 2015).

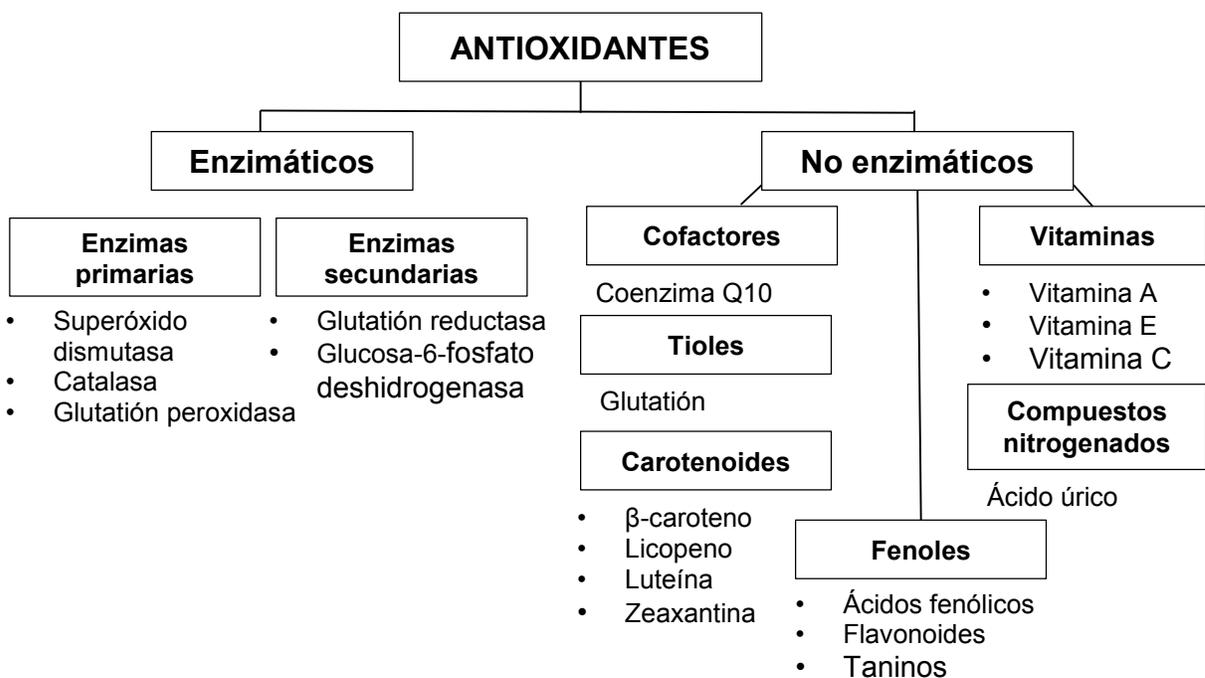


Figura 18. Clasificación de antioxidantes. Adpatado de Carocho y Ferreira., 2013.

Superóxido dismutasas (SODs). Enzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, es decir, un $O_2^{\bullet-}$ es reducido a H_2O_2 y otro es oxidado generando O_2 (figura 9). Se conocen diferentes tipos de SODs; en animales existen SODs que contienen manganeso (MnSOD) en su sitio activo y se localizan en la matriz mitocondrial, otras contienen cobre y zinc (CuZnSOD) y se encuentran en el espacio intermembranal de la mitocondria y en el resto de la célula. Las plantas tienen además SODs con hierro (FeSOD) en su sitio activo y están presentes en cloroplastos. Las bacterias a menudo presentan MnSOD, CuZnSOD, y/o FeSOD, algunas contienen níquel. Sin embargo todas las SODs catalizan la misma reacción (Carocho y Ferreira, 2013).

Catalasa. Representan a las enzimas involucradas en la descomposición del H_2O_2 generando agua y O_2 . Presentan las tasas más altas de reacción ya que una molécula de catalasa puede descomponer 6 billones de moléculas de H_2O_2 . En plantas y animales se encuentran en abundancia en los peroxisomas (Halliwell, 2006).

Glutación peroxidasa. Enzima que utiliza selenio como cofactor, cataliza la reducción de peróxidos orgánicos a agua (figura 19). El glutación reducido (GSH) funciona como

donador de electrones en dicho proceso, debido a que contiene grupos tioles, estos son oxidados, generando puentes disulfuro (Pisochi y Pop, 2015).

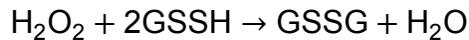


Figura 19. Reacción que cataliza la enzima glutatión peroxidasa.

El glutatión oxidado (GSSG), está formado por dos GSH ligados por un puente disulfuro, y pueden ser reconvertidos a GSH con la enzima glutatión reductasa (Pisochi y Pop, 2015).

Antioxidantes no enzimáticos

Vitamina A. Carotenoide producido en el hígado, resultado de la ruptura del β -caroteno. Su actividad antioxidante se confiere a su capacidad de combinarse con el $\text{ROO}\cdot$ antes de que se propague la peroxidación lipídica. Tiene mayores beneficios en piel, ojos y órganos internos (Oroian y Escriche, 2015).

Vitamina E. Presenta ocho isoformas cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. El α -tocoferol es considerado el de mayor potencial antioxidante y el más abundante en sistemas biológicos. Su actividad antioxidante se debe a que detiene la peroxidación lipídica generando radicales estables incapaces de continuar con el proceso de oxidación. El grupo hidroxilo (OH^-) del α -tocoferol dona un electrón al $\text{OH}\cdot$, estabilizando el radical al formar OH^- (Carocho y Ferreira, 2013).

Vitamina C. Incluye dos compuestos con actividad antioxidante: L-ácido ascórbico y L-ácido dehidroascórbico. La vitamina C neutraliza a los $\text{OH}\cdot$, $\text{RO}\cdot$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$, y regenera el α -tocoferol actuando como agente reductor. Sin embargo a concentraciones altas (0.3 – 20 mM) presenta actividad prooxidante que depende de metales de transición como Fe^{2+} y Cu^{2+} a través de los cuales se forma el $\text{OH}\cdot$ (Carocho y Ferreira, 2013).

Coenzima Q. Importante transportador de electrones en la cadena respiratoria. Sin embargo, se ha demostrado que protege la membrana celular y las lipoproteínas del plasma sanguíneo contra el daño por ERO, ya que previene la formación de $\text{ROO}\cdot$ o los neutraliza. Otra importante función es su capacidad para regenerar el α -tocoferol (Soobratte *et al.*, 2005).

Glutati3n. Trip3ptido (glu-cys-gly) que protege a las c3lulas del da1o por ERO, debido a su capacidad de donar electrones. Adem3s es importante en la regeneraci3n de otros antioxidantes como el ascorbato (Pisocho y Pop, 2015).

3cido 3rico. Producto final del metabolismo de las purinas, previene la sobreproducci3n de hemooxidantes que resultan de la reacci3n de oxidaci3n de hemoglobina por per3xidos, adem3s previenen la lisis de eritrocitos por peroxidaci3n y es un potente neutralizador del 1O_2 y del OH^\bullet (Oroian y Escriche, 2015).

Prote3nas de uni3n a metales. Prote3nas como transferrina, ferritina, lactoferrina y ceruloplasmina consideradas como antioxidantes no enzim3ticos, debido a que act3an secuestrando iones met3licos responsables de la generaci3n de varias ERO (Carocho y Ferreira, 2013).

Antioxidantes derivados de las plantas

Carotenoides. Grupo de pigmentos naturales sintetizados por plantas y algunos microorganismos. Se dividen en dos grupos: carotenoides hidrocarbonados conocidos como carotenos (licopeno, β -caroteno), y carotenoides oxigenados conocidos como xantofilas, zeaxantina y lute3na. La principal propiedad antioxidante de los carotenoides se debe a su habilidad para neutralizar el 1O_2 (Oroian y Escriche, 2015).

Fenoles (figura 20). Compuestos arom3ticos producto del metabolismo secundario de plantas, constituyen uno de los grupos de productos naturales m3s numerosos con aproximadamente 8000 diferentes estructuras fen3licas conocidas hasta la fecha. Se clasifican en: 3cidos fen3licos, flavonoides, taninos, estilbenos, cumarinas, lignanos, quinonas y otros de acuerdo al n3mero de anillos fen3licos y de elementos estructurales enlazados a estos anillos (Carocho y Ferreira, 2013).

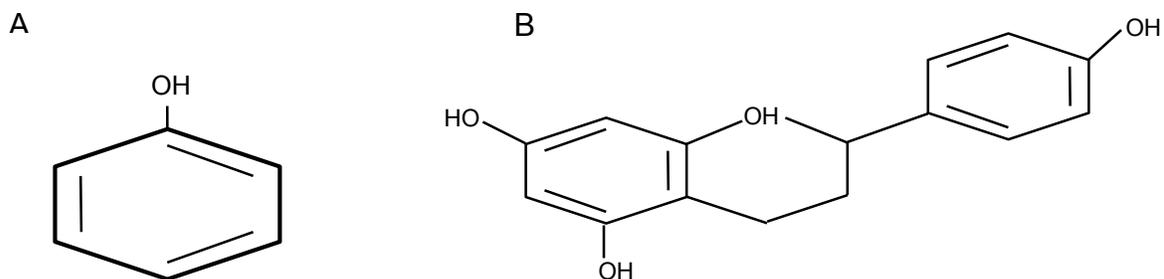


Figura 20. Estructura qu3mica de un fenol (A) y un flavonoide (B)

- Ácidos fenólicos. Se dividen en dos categorías de acuerdo a su estructura: derivados de ácido benzóico y derivados de ácido cinámico. Estos compuestos se estructuran por un anillo bencénico unido a un grupo carboxilo (ácido benzóico) o por un ácido propenóico (ácido cinámico). Los principales ácidos hidroxibenzóicos incluyen ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, dentro de los ácidos hidroxicinámicos se encuentran ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, todos estos presentan actividad antioxidante principalmente contra OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y ROO^\bullet (Carocho y Ferreira, 2013).
- Flavonoides. Grupo de compuestos cuya estructura base consiste en un esqueleto de difenilpropano ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$). Las principales subclases de flavonoides son: flavonas, flavonoles, flavanoles, chalconas, flavononas, isoflavonoides y antocianinas. Sus propiedades antioxidantes se deben principalmente a los grupos hidroxilo que actúan como agentes reductores. Además activan enzimas antioxidantes, inhiben oxidasas, e incrementan los niveles de ácido úrico y de moléculas de bajo peso molecular (Oroian y Escriche, 2015).
- Taninos. De acuerdo a su estructura se clasifican en: taninos hidrolizables (polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos y azúcares) y taninos condensados (polímeros de antocianidina), son poderosos antioxidantes debido a que presentan gran número de grupos hidroxilo (Oroian y Escriche, 2015).
- Lignanos. Compuestos formados por dos o más unidades de fenilpropanoides, presentes en plantas en forma libre y como glicósidos. Son uno de los dos grupos principales de fitoestrógenos y funcionan como antioxidantes (Carocho y Ferreira, 2013).

Género *Bursera*

El género *Bursera* está representado por árboles y arbustos semi-suculentos de uno a más de 15 metros de alto, de hojas alternas, simples a bipinadas, deciduas la mayor parte

del año, variables en tamaño y forma aún en la misma planta, la floración ocurre generalmente al inicio de la época de lluvias. La mayor parte de las especies son dióicas. Se trata de un grupo exitoso dentro de la comunidad del bosque tropical caducifolio, aunque también se puede encontrar en matorrales xerófilos. Dadas estas características su distribución se restringe al continente americano, siendo México su centro de diversidad con un total de 82 especies, de las cuales 70 son endémicas, aunque queda un amplio contingente por descubrir, estudiar y describir (León y Pérez, 2010). La mayor parte de las especies mexicanas de *Bursera* se establecen en la vertiente pacífica de la república, con una concentración máxima en la cuenca del río Balsas (Rzendowski *et al.*, 2004).

El género *Bursera* es un componente muy importante de la vegetación de México. Desde el punto de vista ecológico domina la selva baja caducifolia principalmente en lugares no perturbados. Además otro aspecto significativo del género es el uso medicinal, artesanal y ritual del cual es objeto (Loeza *et al.*, 2013).

Dentro de la medicina tradicional algunas especies del género *Bursera* son utilizadas para tratar ciertos malestares. Así *B. galeottiana* es utilizada como desinfectante, analgésico y para sellar el ombligo de recién nacidos (Arias *et al.*, 2000), *B. simaruba* se emplea para el alivio de diarrea y resfriados (Rojas y Rodríguez, 2008), además los extractos etanólicos de *B. graveolens* son utilizados para lavar heridas y en forma oral son utilizados contra el asma y la diarrea (Robles *et al.*, 2005); con base en dichos antecedentes se han realizado varias investigaciones con especies del género *Bursera* que evalúan diferentes actividades biológicas, y que buscan dilucidar los metabolitos secundarios responsables de dichas propiedades. En 2005 Zuñiga y colaboradores aislaron los compuestos volátiles de varias especies mexicanas del género *Bursera*, reportando al limoneno y linalol como los compuestos con mayor abundancia. A su vez, Robles *et al.*, (2005) demostraron que *B. graveolens* mostró actividad antiinflamatoria. Por otra parte Queiroga *et al.*, (2007) investigaron que el linalol extraído de *B. aloexylon* presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Finalmente Rojas *et al.*, (2012) aislaron podofilotoxina de *B. fagaroides* reportando actividad citotóxica para dicho compuesto.

En cuanto a la actividad antioxidante de dicho género, son escasos los estudios que se han realizado. Loeza y colaboradores en 2013 mencionaron que debido al alto contenido en terpenos, principalmente limoneno, varias especies del género *Bursera* tienen propiedades antioxidantes. Rafikul *et al.*, (2014) reportaron que *B. serrata* presenta capacidad reductora. Por otra parte, Sánchez *et al.*, (2001) y Bah *et al.*, (2014) reportaron actividad antioxidante para *B. simaruba*.

***Bursera morelensis* Ramírez**

Esta especie se conoce comúnmente como copalillo o cuajote. Es un árbol dióico de 3 a 10 metros de alto, el tronco llega a medir hasta 40 centímetros de diámetro, presenta una corteza exfoliante rojiza en láminas delgadas, hojas imparipinadas de 5 a 11 cm de largo y de 1.5 a 4.5 cm de ancho, pecióslos acanalados de 1 a 2 cm de largo, foliólos sésiles o subsésiles de 7 a 22 mm de largo y de 1.4 a 25 mm de ancho, ápice agudo, margen entero, nervadura central evidente, flores masculinas dispuestas en inflorescencias racimosas hasta de 5 cm de largo, flores femeninas generalmente solitarias rara vez en pares o en panículas cortas, fruto trivalado y oblicuamente ovoide. Florece de abril a junio y permanece sin hojas entre noviembre y mayo. Se distribuye en un rango de altitud que va de los 600 a los 1500 msnm, se presenta con mayor abundancia en la parte oriente de la cuenca del Balsas, particularmente en Guerrero, Oaxaca y Puebla. En Oaxaca se extiende hacia los ríos Tehuantepec y Papaloapan, se encuentra en menor abundancia en San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Rzedowski *et al.*, 2004).

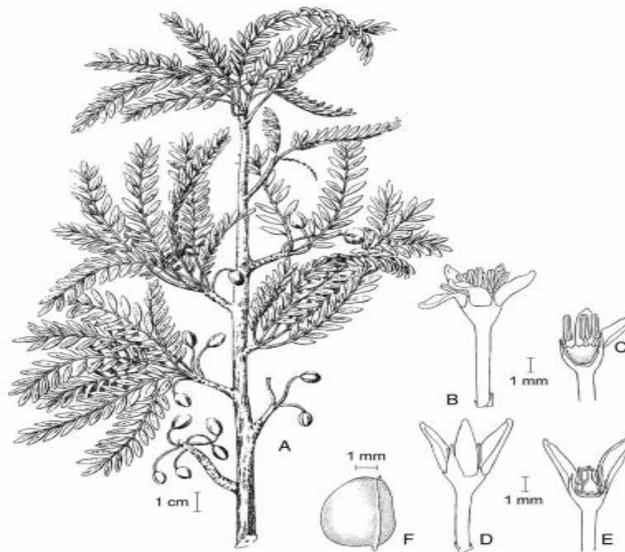


Figura 21. *B. morelensis* Ramírez. A. rama con hojas y frutos; B. flor masculina desprovista de 2 pétalos y de 5 estambres; D. flor femenina en vista externa; E. flor femenina desprovista de un pétalo y de varios estaminodios; F. hueso. Tomado de Rzendowski et al., 2004.

B. morelensis es utilizada en la medicina tradicional; su resina es empleada como tratamiento de infecciones causadas por hongos y bacterias en la piel, además la corteza macerada en alcohol o en infusión es utilizada para la curación de heridas (Serrano, 2013).

Con respecto a la actividad biológica de esta especie son escasos los estudios realizados. Jolad *et al.*, (2006) aislaron desoxipodofilotoxina y 5´desmetoxidesoxipodofilotoxina, ligandos con actividad citotóxica. En 2011, López y colaboradores reportaron que el aceite esencial de dicha especie presentó actividad bactericida frente a *Vibrio cholerae* y fungicida frente a *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia lilacina*. Serrano en 2013 demostró la actividad antiinflamatoria y Rodríguez, (2014) la actividad amebicida del extracto metanólico. En cuanto a su actividad antioxidante, Serrano en 2013 reportó actividad antioxidante del extracto metanólico frente al radical DPPH.

Género *Lippia*

El género *Lippia* está representado aproximadamente por 200 especies de árboles y arbustos, distribuidos en Centro y Sudamérica además de algunos lugares de África tropical. Dentro de dicho género se encuentran un gran número de especies utilizadas en la medicina tradicional, principalmente contra enfermedades gastrointestinales y respiratorias (Betancour, 2012). En estudios realizados, estas especies presentan actividades analgésicas, antiinflamatorias, antifúngicas, diuréticas, antihipertensivas, antivirales y antiespasmódicas (Pascual *et al.*, 2001).

***Lippia graveolens* Kunth**

Lippia graveolens conocida comúnmente como orégano, es un arbusto de hasta 3 m de altura, a menudo con corteza exfoliante. Las ramas son cortas y pilosas, presenta hojas opuestas, ovales y anchas de entre 2 a 5 cm de largo con bordes enteros o ligermante dentados, peciolo delgado de 2 mm a 1 cm de largo, las flores se encuentran agrupadas en forma de espigas cortas cónicas o cilíndricas, de 4 a 12 mm de largo en las axilas de la hojas sobre pedúnculos de 2 a 15 mm de largo, brácteas comúnmente ordenadas en 4 hileras generalmente son ovaladas o lanceoladas, el cáliz de 1 a 2 mm de largo, glandular y veloso, corola blanca a amarilla con tubo de 3 a 6 cm de largo, frutos pequeños y encerrados en el cáliz. Florece de julio a enero (Rzedowski y Rzedowski 2002).

Esta especie es abundante en algunos matorrales xerófilos y del bosque tropical caducifolio. Se distribuye desde los 300 a los 1200 msnm, desde el suroeste de Estados Unidos hasta Costa Rica. En México *L. graveolens* se encuentra a lo largo del litoral del Golfo, en la vertiente del Pacífico, en la Península de Yucatán, en las depresiones y valles interiores (Balsas, Tehuacán, Istmo de Tehuantepec), en las zonas áridas de Tamaulipas e Hidalgo así como en el desierto Chihuahuense (Rzedowski y Rzedowski 2002).

L. graveolens es utilizada como condimento alimenticio y en la medicina tradicional para aliviar el dolor abdominal, infecciones estomacales y enfermedades respiratorias, además, se emplea como antiinflamatorio y abortivo (Arias, *et al.*, 2000; Pascual, *et al.*, 2001). Los estudios de *L. graveolens* se enfocan principalmente a la actividad biológica de sus aceites esenciales; son escasos los estudios dirigidos a los extractos, sin

embargo, en estos se han encontrado diversidad de flavonoides y fenoles (Rastrelli *et al.*, 1998; Arcila *et al.*, 2004; Long- Ze *et al.*, 2007), principales responsables de sus propiedades antioxidantes (Rocha *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2012)

HIPÓTESIS

Las especies vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán están expuestas a condiciones ambientales extremas, lo que propicia en ellas la producción de radicales libres, y a su vez la activación de mecanismos de defensa, como la síntesis de metabolitos secundarios antioxidantes, por lo tanto, los compuestos de las plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán presentarán actividad antioxidante

OBJETIVO

Evaluar la actividad antioxidante *in-vitro*, y determinar el contenido de fenoles totales de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Material vegetal y extractos

Las partes aéreas de *L. graveolens* (IRA 28) se colectó en el paraje Rincón de la Monja, en Zapotitlan de las Salinas, Puebla. Con respecto a la corteza de *B. morelensis* (IZTA 42123), está fue colectada en las cercanías de la localidad de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, Puebla. Ambas especies fueron colectadas en el mes de septiembre de 2013.

Los extractos metanólicos se obtuvieron a partir de 1 kg de las partes aéreas de *L. graveolens* y la corteza de *B. morelensis*, por maceración con metanol y posterior concentración a presión reducida. Finalmente se lavaron con hexano obteniéndose las fases hexánicas y los extractos metanólicos libres de grasa.

2. Actividad antioxidante

El efecto antioxidante de los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* se evaluó mediante 4 métodos diferentes.

Actividad neutralizadora del radical difenil-picril-hidrazilo (DPPH[•])

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por López y Denicola, 2013 basado en la reducción del radical DPPH por el extracto a evaluar. El DPPH es un radical que presenta una coloración púrpura con un máximo de absorción a 515 nm, cuando este es reducido por un compuesto antioxidante la coloración se torna amarilla. Para llevar a cabo dicho método, se realizaron diluciones de cada uno de los extractos (10-60 µg/mL), enseguida se agregaron 50 µL de cada dilución a 150 µL de una solución de DPPH (250 µM) disuelto en metanol, dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en obscuridad, finalmente se midió la absorción a 515 nm. Como control positivo se utilizó quercetina (1-10 µg/mL).

Los datos se expresaron como porcentaje de decoloración, obtenido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de decoloración} = \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{DPPH}} \times 100$$

Con el porcentaje de decoloración se obtuvo la concentración eficaz media (CE_{50}), es decir, la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% los radicales libres, por lo tanto, un valor bajo de (CE_{50}) representa una alta capacidad antioxidante.

Radical superóxido

Este ensayo se realizó de acuerdo con lo descrito por Alam *et al.*, 2013. El $O_2^{\bullet-}$ fue generado por reacción no enzimática, con la reacción de metosulfato de fenanzina (PMS) 0.1 mM en presencia de NADH (1 mM), éstos radicales reducen el azul de tetrazolio (NBT) 100 μ M presentando un máximo de absorción de 560 nm. En este caso el extracto compite con el NBT por los radicales superóxido inhibiendo la reacción. La mezcla de reacción consistió de 3 mL de buffer de Tris-HCl (16 mM pH 8) con 0.5 mL de NBT (0.3 mM), 0.5 mL de la solución de NADH (1 mM), 1 mL del extracto a evaluar (10-100 μ g/mL) y 0.5 mL de buffer Tris-HCl (16 mM pH 8). La reacción fue iniciada con la adición de 0.5 mL de PMS (0.12 mM), posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, finalmente se midió la absorbancia a 560 nm. Como control positivo se utilizó quercetina (1-10 μ g/mL). Los datos se expresaron como porcentaje de decoloración y en términos de (CE_{50}).

Radical hidroxilo

El efecto antioxidante frente al radical hidroxilo se basa en la reacción de $Fe^{3+} + EDTA + H_2O_2$ en ácido ascórbico para generar un flujo constante de radicales hidroxilo. Estos radicales degradan la molécula de desoxiribosa, los productos reaccionan con calor y ácido tiobarbitúrico generando un cromógeno rosado el cual presenta un máximo de absorción a 532 nm. Si un compuesto antioxidante se agrega a la mezcla de reacción, éste inhibe la degradación de la desoxiribosa, a través de la neutralización del radical hidroxilo, evitando la formación del cromógeno rosa. La mezcla de reacción consistió de 100 μ L de desoxiribosa previamente disuelta en buffer $KH_2 PO_4$ -KOH pH 7.4, 500 μ L de extracto (0.063-1 μ g/mL), 200 μ L de EDTA (1.04 mM) y (200 μ M) cloruro férrico (1:1 v/v), 100 μ L de H_2O_2 (1 mM) y 100 μ L de ácido ascórbico (1mM), enseguida se incubó la mezcla a 37 $^{\circ}C$ por 1 hora, posteriormente se adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico y 1mL de ácido tricloroacético y se incubó por 15 minutos a 100 $^{\circ}C$, por último se midió la

absorbancia a 532 nm (Alam *et al.*, 2013). Como control positivo se utilizó ácido gálico (1-10 mg/mL). Los resultados se expresaron en términos de CE₅₀.

Poder reductor

En este método descrito por Alam *et al.*, 2013 compuestos antioxidantes reaccionan con el ferrocianuro de potasio (Fe³⁺), ácido tricloroacético, y cloruro férrico, dicha mezcla tiene una absorción máxima de 700 nm. La mezcla de reacción consistió de 2.5 mL de buffer de fosfatos (0.2 M pH 6.6) y 2.5 mL de K₃Fe (CN)₆ (1% w/v) añadidos a 1 mL de la muestra del extracto (4-20 µg/mL), posteriormente se incubó a 50 °C por 20 minutos enseguida se agregaron 2.5 mL de ácido tricloroacético y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 0.5 mL de FeCl₃, finalmente se midió la absorbancia a 700 nm. Como control positivo se utilizó quercetina (1-5 mg/mL). Los resultados se expresan en términos de absorbancia. El incremento en la absorbancia de la mezcla de reacción indica mayor poder reductor.

3. Cuantificación de fenoles totales

El método de Folin-Ciocalteu (Sinlgeton *et al.*, 1999) fue utilizado para determinar el contenido de fenoles totales de cada extracto. Dicho método se fundamenta en la reducción del fosfomolibdato y el fosfotungstato en medio alcalino por parte de los fenoles contenidos en los extractos, formando un complejo azul que se puede detectar a 750 nm. Para lo cual se preparó una curva de calibración con ácido gálico (10-60 mg/L). Posteriormente 100 µL de cada extracto se mezclaron con 900 µL de agua destilada, 500µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de carbonato de sodio (20%), dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, enseguida se midió la absorbancia a 750 nm. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico/ g de extracto (mg de EAG/g de extracto).

Análisis estadístico

Los resultados representan el promedio de 3 repeticiones independientes de cada experimento y fueron analizados mediante análisis de varianza de un factor.

RESULTADOS

La actividad antioxidante de los extractos se expresa como la concentración eficaz media (CE_{50}) es decir, la concentración del extracto capaz de neutralizar el 50% de radicales libres. Por lo tanto, se considera que el valor de CE_{50} es inversamente proporcional a la capacidad antioxidante.

Efecto neutralizador del DPPH^{*}

La capacidad de los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* para neutralizar el radical DPPH^{*} se determinó midiendo el porcentaje de decoloración de este último con diferentes concentraciones de cada extracto y obteniendo el valor de CE_{50} .

En la figura 23 se muestra la eficacia en la decoloración de la solución de DPPH^{*} por parte de ambos extractos y del estándar de referencia que fue quercetina. El efecto del extracto de *L. graveolens* frente al DPPH^{*} en un principio se presentó con un aumento significativo en el porcentaje de decoloración, sin embargo, entre 22 y 28 $\mu\text{g/mL}$ no se presentaron diferencias significativas, llegando a presentarse una disminución en el porcentaje de decoloración en 28 $\mu\text{g/mL}$. No obstante, con el siguiente incremento en la concentración del extracto, el porcentaje de decoloración volvió a aumentar hasta llegar a un punto máximo de decoloración de 71.5% en 32 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a *B. morelensis* su eficacia en la decoloración del DPPH^{*} presentó un comportamiento dependiente de la concentración alcanzando un punto de decoloración máxima de 63.4% a 32 $\mu\text{g/mL}$.

En lo que respecta al estándar de referencia presentó un punto máximo de decoloración de 90.78 % a 10 $\mu\text{g/mL}$, esto indica que ambos extractos presentan menor eficacia para neutralizar el radical DPPH^{*} con respecto a la quercetina.

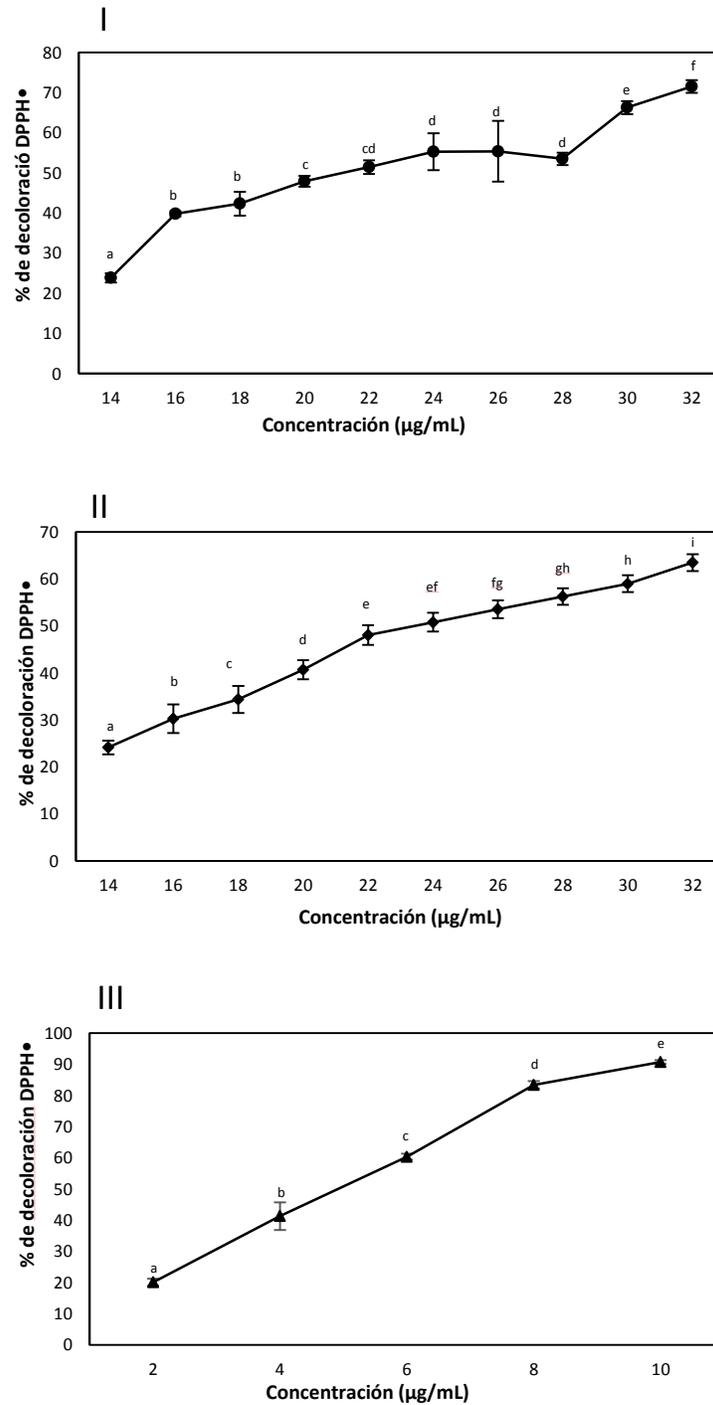


Figura 22. Porcentaje de decoloración de DPPH• de los extractos metanólicos de *L. graveolens* (I) y *B. morelensis* (II), además de la quercetina (III) Las letras sobre cada marcador indican diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto a las diferentes concentraciones de cada especie.

Con respecto a la actividad antioxidante de ambos extractos frente al DPPH[•] en términos de CE₅₀ se observa en la tabla 1 que el extracto de *L. graveolens* (21.89 ± 0.63) presentó mayor capacidad para neutralizar el radical DPPH[•] con respecto al extracto de *B. morelensis* (24.83 ± 0.76) con diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, dichos valores son significativamente mayores en comparación con la quercetina (5 ± 0.15) lo cual indica que ambos extractos muestran menor actividad antioxidante frente al radical DPPH[•] en comparación con este flavonoide.

Tabla 1. Capacidad neutralizadora del DPPH[•] en términos de CE₅₀ por parte de los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* además del control quercetina.

SUSTANCIA	Concentración eficaz media (µg/mL)
Extracto metanólico de <i>L. graveolens</i>	21.89 ± 0.63*
Extracto metanólico de <i>B. morelensis</i>	24.83 ± 0.73*
Quercetina	5.00 ± 0.15*

*diferencia significativa P<0.05.

Actividad neutralizadora del O₂^{•-}

En la figura 24 se ilustra la habilidad de los extractos y de la quercetina para atrapar al radical O₂^{•-}. Los resultados representan el porcentaje de decoloración de la mezcla de reacción generada en el ensayo del O₂^{•-}. Se observa que la capacidad de los extractos de *L. graveolens* y *B. morelensis* para atrapar al O₂^{•-} fue dependiente de la concentración, alcanzando un punto máximo de decoloración en 130 µg/mL de 70.97 y 77.69 % respectivamente, con diferencia significativa entre ambos valores. Por lo cual el extracto de *B. morelensis* fue el que presentó mayor capacidad para neutralizar el radical O₂^{•-}. Además, se observa que el estándar de referencia presentó un punto máximo de decoloración de 81.9 % a 10 µg/mL, esto indica que ambos extractos son menos eficientes en la neutralización del radical O₂^{•-} con respecto a la quercetina.

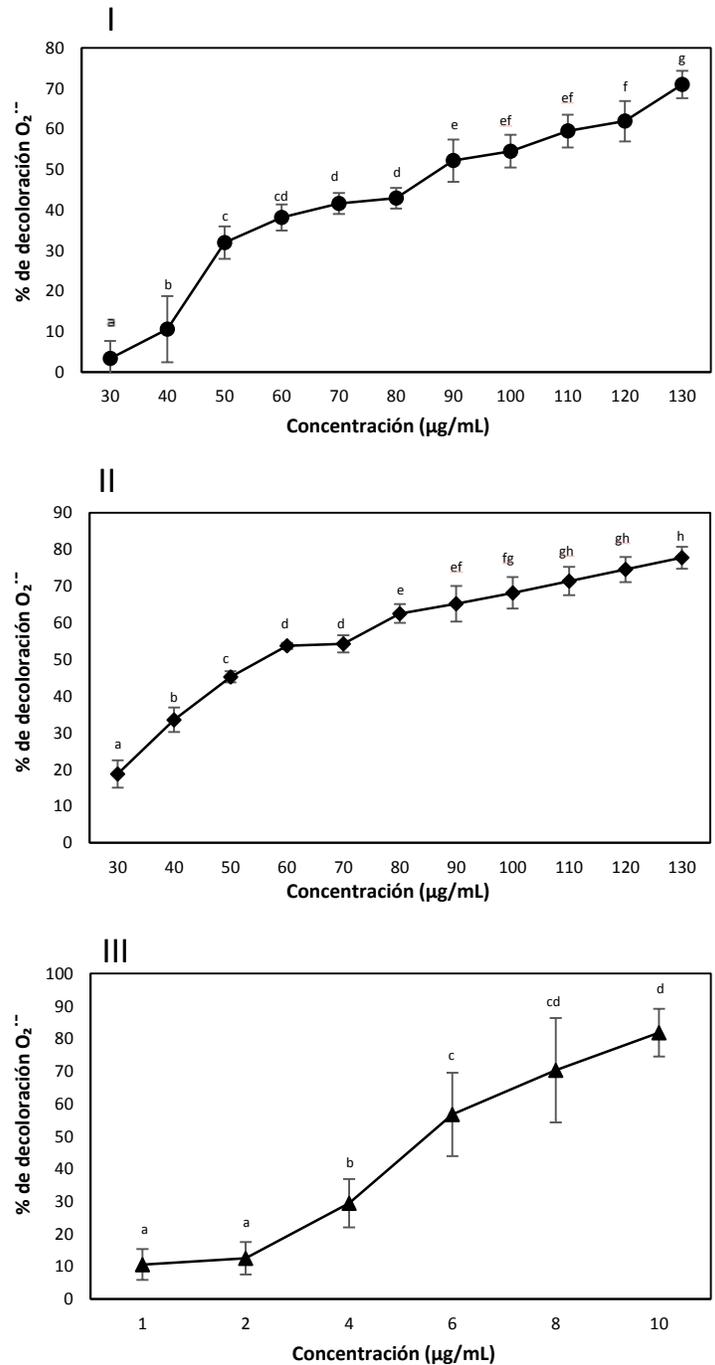


Figura 23. Porcentaje de decoloración de la mezcla de reacción generada en el ensayo del O₂^{-•} por parte de los extractos metanólicos de *L. graveolens* (I) y *B. morelensis* (II), además de la quercetina (III), evaluados a diferentes concentraciones. Las letras sobre cada barra indican diferencia significativa P < 0.05 con respecto a las diferentes concentraciones por cada especie.

Por otra parte la actividad antioxidante frente al $O_2^{\bullet-}$ en términos de CE_{50} de ambos extractos y de la quercetina se muestra en la tabla 2, donde se observa que el extracto de *B. morelensis* (61.11 ± 2.04) presentó un valor menor de CE_{50} con respecto al extracto de *L. graveolens* (86.61 ± 5.26), existiendo diferencia significativa entre dichos valores. Esto indica que el primero tiene mayor capacidad antioxidante en comparación con el segundo, con lo anterior se confirma lo mostrado en la figura 24.

Tabla 2. Capacidad atrapadora del $O_2^{\bullet-}$ en terminos de CE_{50} por parte de los extractos metanólicos de *L. graveplens* y *B. morelensis* ademas del control quercetina.

SUSTANCIA	Concentración eficaz media ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto metánolico de <i>L. graveolens</i>	$86.61 \pm 5.26^*$
Extracto metánolico de <i>B. morelensis</i>	$61.11 \pm 2.04^*$
Quercetina	$5.91 \pm 0.58^*$

*diferencia significativa $P < 0.05$.

Sin embargo, los valores de CE_{50} de los dos extractos son significativamente mayores en comparación con el de la quercetina (5.91 ± 0.58). Es decir, ambos extractos presentaron menor poder antioxidante frente al radical $O_2^{\bullet-}$ con respecto al estándar de referencia.

Efecto neutralizador del OH^{\bullet}

La capacidad de los extractos de *L. graveolens* y *B. morelensis* para neutralizar al radical OH^{\bullet} se ilustra en la figura 25 con el porcentaje de decoloración de la mezcla de reacción generada. En esta figura se observa que ambos extractos son capaces de neutralizar al radical OH^{\bullet} . Esta capacidad aumenta conforme incrementa la concentración, sin embargo dichos aumentos no son significativos. Además tanto el extracto de *L. graveolens* como el de *B. morelensis* a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$ alcanzan un punto máximo de porcentaje de decoloración de 64.99 y 70.39 % respectivamente.

Con respecto al ácido gálico, este presentó un punto máximo de porcentaje de decoloración de 65.70% a $1 \mu\text{g/mL}$, lo anterior comparado con ambos extractos indica que *L. graveolens* presentó menor actividad antioxidante frente al radical OH^{\bullet} , a diferencia de *B. morelensis* que mostró mayor capacidad antioxidante frente a dicho radical.

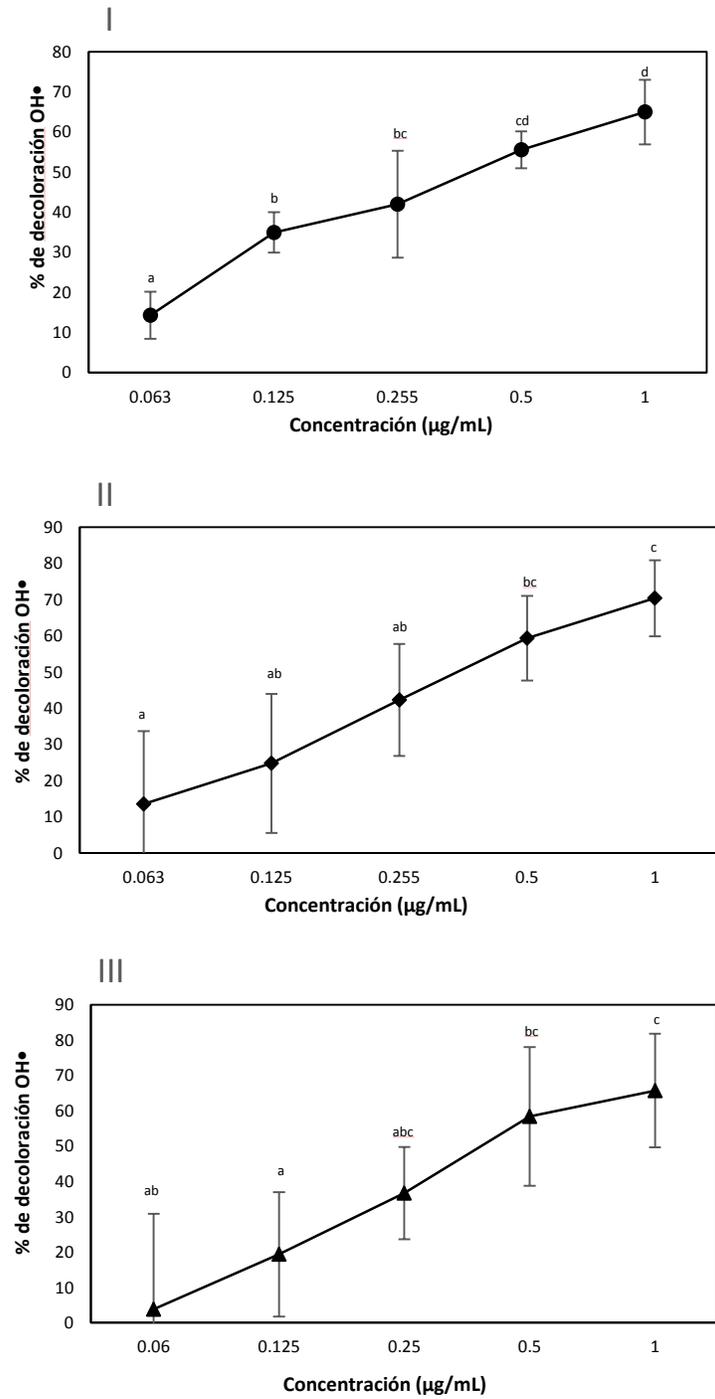


Figura 24. Porcentaje de decoloración de la mezcla de reacción generada en el ensayo de OH• por parte de los extractos de *L. graveolens* (I), y *B. morelensis* (II), además del ácido gálico (III), evaluados a diferentes concentraciones. Las letras sobre cada barra indican diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto a las diferentes concentraciones por cada especie.

Los valores de CE₅₀ de ambos extractos mostrados en la tabla 3, confirman lo dicho anteriormente *B. morelensis* (0.362 ± 0.25) tiende a presentar mayor capacidad antioxidante frente al OH[•] con respecto a *L. graveolens* (0.387 ± 0.15) sin diferencia significativa entre ellos.

Tabla 3. Capacidad neutralizadora del OH[•] en terminos de CE₅₀ por parte de los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* además del control ácido gálico.

SUSTANCIA	Concentración eficaz media (µg/mL)
Extracto metánolico de <i>L. graveolens</i>	0.387 ± 0.15
Extracto metánolico de <i>B. morelensis</i>	0.362 ± 0.25
Ácido gálico	0.438 ± 0.28

*diferencia significativa P<0.05.

Por otra parte el ácido gálico mostró un valor de CE₅₀ superior a los de ambos extractos, sin embargo no existen diferencias significativas entre tales valores, por lo tanto ambos extractos son igual de eficaces que el ácido gálico.

Poder reductor

El poder reductor de los extractos de *L. graveolens* y *B. morelensis* se evaluó a través de su habilidad para reducir el ión férrico (Fe³⁺) a ión ferroso (Fe²⁺) mediante la donación de un electrón. La capacidad reductora de ambos extractos y de la quercetina se muestra en la figura 26. El incremento en la absorbancia indica mayor poder reductor. En dicha figura se observa que el poder reductor de ambos extractos es dependiente de la concentración, sin embargo, el extracto de *L. graveolens* mostró significativamente mayor capacidad reductora con respecto al extracto de *B. morelensis*. A pesar de que los valores de absorbancia en un principio no mostraron diferencias significativas, a una concentración de 12.5 µg/mL se evidencia que los valores de absorbancia del extracto de *L. graveolens* son significativamente mayores a los de *B. morelensis* llegando ambos a un punto máximo de absorbancia de 1.128 y 0.60 nm respectivamente en una concentración de 20 µg/mL.

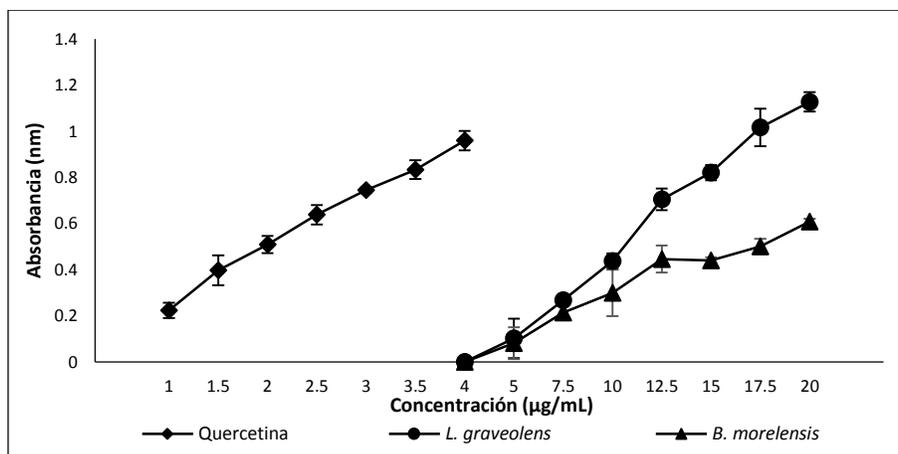


Figura 25. Poder reductor de los extractos metánolicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* y del control quercetina. .

En cuanto al poder reductor de la quercetina, está alcanzó un punto máximo de absorbancia de 0.96 nm en 4 µg/mL, por lo tanto, ambos extractos presentaron menor poder reductor en comparación con el estándar de referencia.

Fenoles totales

La actividad antioxidante de los extractos de *L. graveolens* y *B. morelensis* probablemente se deba al contenido de fenoles de cada extracto. Es por esto que se determinó el contenido de fenoles totales de cada extracto. Los resultados se muestran en la tabla 4. En ella se observa que el extracto de *L. graveolens* presentó mayor concentración de fenoles en comparación con el extracto de *B. morelensis* 304.28 y 224.91 mg de EAG/g de extracto respectivamente.

Tabla 4. Contenido de fenoles totales.

Extracto	Fenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/gramo de extracto)
<i>L. graveolens</i>	304.28 ± 0.02
<i>B. morelensis</i>	224.91 ± 0.04

DISCUSIÓN

La evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* requiere el uso de diversos métodos que proporcionen información diferente y complementaria (Lozano, 2010). Debido a lo anterior en el presente trabajo se eligieron cuatro métodos distintos en base a algunos de los criterios propuestos por Prior *et al.*, 2005 para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*, dichos criterios incluyen: I) ensayos técnicamente simples, II) un punto final definido y con un mecanismo químico, III) instrumentación de fácil disponibilidad, VI) con buena reproducibilidad, V) utilización de moléculas biológicamente relevantes y V) adaptable al análisis.

Efecto neutralizador del DPPH*

El DPPH* no es un radical biológicamente relevante, sin embargo, se encuentra entre los métodos que evalúan la actividad antioxidante utilizados con mayor frecuencia, debido en gran parte a que no requiere preparación especial, es simple y rápido, además de ser un radical estable y comercial, por lo cual, este ensayo da un primer enfoque para evaluar la actividad antioxidante (Abdeelaty *et al.*, 2014). Dicho método se basa en la reducción del DPPH* a través de la transferencia de electrones y la donación de átomos de hidrógeno por parte del compuesto antioxidante, la reacción produce un cambio de coloración que actúa como indicador de la eficacia antioxidante (Williams *et al.*, 1995).

El extracto metanólico de *L. graveolens* es capaz de neutralizar al DPPH* presentando un valor de CE₅₀ de 22.670 µg/mL esta concentración refleja hasta 5 veces mayor eficacia antioxidante en comparación a lo descrito en el estudio de Rocha *et al.* (2008) usando extractos metanólicos de las partes aéreas de *L. graveolens* de los Estados de Guanajuato, Querétaro y Puebla, en donde se encontraron valores de CE₅₀ de 207.96 ± 1.43, 152.76 ± 1.48 y 172.58 ± 1.47 µg/mL respectivamente. Por su parte Soto y colaboradores (2012) estudiaron el efecto antioxidante del extracto acuoso de *L. graveolens* del Estado de Coahuila reportando la mayor actividad antioxidante a 160 µg/mL. Dicho valor es mayor al encontrado en el presente trabajo que fue de 32 µg/mL esto indica que el extracto metanólico de *L. graveolens* evaluado en este trabajo tiene mayor potencial antioxidante. Las variaciones del potencial antioxidante que se observan entre plantas de distintos estados probablemente se debe a que *L. graveolens* presenta

una composición y cantidad de metabolitos secundarios que dependen de la zona geográfica, factores climáticos, altitud, época de cosecha y su estado de crecimiento (Soto et al., 2012).

Además, Gonzáles *et al.*, (2007) reportaron un valor de CE_{50} de $16.40 \pm 1.31 \mu\text{g/mL}$ y un punto máximo de actividad de 91.5% a $100 \mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico del tallo de *L. graveolens* del Estado de Durango. Lo anterior permite suponer que la actividad antioxidante de *L. graveolens* varía de acuerdo a la parte de la planta evaluada, siendo menos eficaz la parte aérea.

Por otra parte, la habilidad del extracto de *L. graveolens* para neutralizar el DPPH^{*} resultó ser mayor en comparación con ciertas especies del género como *L. pseudoteha* y *L. hermanioides*, (CE_{50} = 89 y 39 $\mu\text{g/mL}$) y menor con respecto a *L. alba*, *L. rubella* y *L. sidoides* (CE_{50} = 9, 7, 5 $\mu\text{g/mL}$) (Fabri et al., 2011). Tomando en cuenta lo anterior se podría considerar a *L. graveolens* entre las especies del género *Lippia* con mediano potencial antioxidante frente al radical DPPH^{*}.

Cabe destacar que el extracto metanólico de *L. graveolens* evaluado en el presente estudio presentó una disminución significativa del porcentaje de decoloración en 28 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 23), lo cual podría deberse a un efecto prooxidante del extracto o a la presencia de sustancias capaces de absorber en la región de luz visible del espectro electromagnético cercana a los 517 nm (García, 2010).

Con respecto al extracto metanólico de *B. morelensis*, resultó ser capaz de neutralizar al DPPH^{*} de manera dosis-dependiente (Figura 23). Obteniendo una CE_{50} de $24.83 \pm 0.73 \mu\text{g/mL}$ (tabla 1). Sin embargo dicho valor es mayor en comparación con la CE_{50} de 3.05 $\mu\text{g/mL}$ reportada para la partición metanólica de esta especie (Serrano, 2013). Es decir, la capacidad para neutralizar el DPPH^{*} del extracto metanólico de *B. morelensis* evaluado en este trabajo es menor en comparación con lo reportado para la partición metanólica de esta especie, esto podría indicar que el efecto antioxidante se debe principalmente a compuestos altamente polares entre ellos algunos fenoles.

A diferencia de lo anterior el extracto de *B. morelensis* presentó mayor eficacia para neutralizar el DPPH^{*} en comparación con otra especie del género, *B. serratum*, cuyo valor

de CE₅₀ reportado es de 52 µg/mL (Prakash *et al.*, 2013). También resultó más eficaz con respecto a un compuesto llamado podofilotoxina (CE₅₀ 396.75 µg/mL) lignano presente en varias especies del género (Rojas *et al.*, 2012; Riyaz *et al.*, 2013), y del cual deriva la desoxipodofilotoxina presente en *B. morelensis* (Jolad *et al.*, 2006). A ambos compuestos se les atribuyen diversas propiedades biológicas como citotoxicidad, efectos antiinflamatorios, y antioxidantes (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Es importante considerar que los extractos de ambas especies estudiadas presentaron menor capacidad para neutralizar el radical DPPH[•] con respecto al estándar de referencia (Tabla 1).

Se debe tomar en cuenta que parte de las variaciones entre los valores de CE₅₀ obtenidos en el presente trabajo y los reportados para la misma especie en otros estudios, también podrían estar relacionadas con la diferencia de condiciones en las cuales se llevaron a cabo los ensayos. Om y Tej en 2009 realizaron un análisis de las publicaciones recientes que utilizaron el método del DPPH[•] para estimar la actividad antioxidante, encontrando múltiples protocolos los cuales difieren en la concentración del DPPH[•], el tiempo de incubación y tipo de solvente.

El DPPH[•] se encuentra entre los radicales libres centrados en átomos de nitrógeno que reaccionan con fenoles a través de dos mecanismos distintos: 1) por abstracción directa de átomos de H de los compuestos fenólicos y 2) por transferencia de electrones del fenol al DPPH[•]. La contribución de alguno de estos mecanismos dependerá de la naturaleza del solvente. Generalmente en solventes apolares predomina el primer mecanismo, mientras que en solvente polares como el metanol utilizado en esta prueba prepondera el segundo (Villano *et al.*, 2006).

El intervalo de tiempo necesario para completar la reacción de neutralización del radical DPPH[•] depende en gran medida de la muestra. La aplicación de tiempos cortos de incubación podría subestimar los valores de la actividad antioxidante esto ocurre frecuentemente con extractos de plantas o compuestos aislados que presentan una reacción lenta frente al DPPH[•]. Tal como sucede con el ácido gálico, cuando se mide la reacción después de 30 minutos de incubación la CE₅₀ presenta un valor de 0.272 µM

valor que representa una actividad antioxidante 7.5% menor que la presentada después de 2 horas de incubación. Estas diferencias se aprecian pequeñas pero resultan significativas desde el punto de vista estadístico (Om y Taj, 2009).

Por otro lado, la concentración inicial del DPPH• es también un factor que afecta la estimación de la actividad antioxidante por el DPPH•. Se ha demostrado que un incremento en la concentración inicial de DPPH•, incrementa el consumo de este por parte del antioxidante. Como resultado de estas diferencias en las condiciones de la reacción los valores de CE₅₀ de los compuestos antioxidantes son extremadamente variables entre los distintos trabajos reportados (Fadda *et al.*, 2014).

Actividad neutralizadora de O₂^{•-}

El O₂^{•-} es generado como resultado de la reducción univalente del O₂. El aumento en la producción de dicho radical es consecuencia de diferentes procesos metabólicos, este altera a biomoléculas. El daño por O₂^{•-} es muy selectivo, generalmente involucra reacciones con otros radicales como NO• o iones hierro; produce principalmente daño a membranas, aunque también inactiva enzimas y genera otros radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2007). En el presente trabajo el O₂^{•-} fue producido por una reacción no enzimática en la cual los compuestos antioxidantes compiten con el NBT por el O₂^{•-}.

En el caso del extracto metanólico de *L. graveolens* no hay estudios que reporten su habilidad para neutralizar el O₂^{•-}, siendo este el primero, en el cual se evidencia su capacidad para neutralizar dicho radical, aumentando su eficacia conforme aumenta la concentración (Figura 24), obteniendo una CE₅₀ de 86.61 ± 5.26 µg/mL (Tabla 2). Sin embargo dicha capacidad es inferior a la reportada para otra especie del género, *L. citriodora*, de la cual se obtuvo una CE₅₀ de 22.8 µg/mL (Valentao *et al.*, 2002). Además se ha reportado que el compuesto naringenina presente en el extracto de *L. graveolens* muestra baja eficacia neutralizando el O₂^{•-} (Türkkan *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere que el extracto metanólico de *L. graveolens* exhibe baja eficacia neutralizando el O₂^{•-}.

En lo que se refiere al extracto metanólico de *B. morelensis* tampoco existen reportes de la capacidad de esta especie para neutralizar el O₂^{•-}. Por lo tanto los resultados aquí presentes son los primeros en su tipo. Estos muestran que *B. morelensis* es capaz de

neutralizar al $O_2^{\bullet-}$, dicha capacidad es dependiente de la concentración, obteniendo una CE_{50} de $61.11 \pm 2.04 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 2). Esta capacidad es mayor en comparación a lo reportado por Prakash et al., (2013) para *B. serratum* ($CE_{50} = 2.96 \text{ mg/mL}$), y con respecto al compuesto podofilotoxina ($275.3 \mu\text{g/mL}$) cuya capacidad neutralizadora del $O_2^{\bullet-}$ fue determinada generando dicho radical por reducción electroquímica del $O_2^{\bullet-}$ (Riyaz, 2013).

Actividad neutralizadora del OH^{\bullet}

Debido a sus propiedades redox el OH^{\bullet} es considerado la ERO con mayor reactividad, es tan alta que en sistemas biológicos reacciona rápidamente con las biomoléculas de su alrededor generando RL de inestabilidad variable (Lozano, 2010). En el presente estudio el OH^{\bullet} se generó a través de la reacción de Fenton (figura 2). Este radical descompone la desoxirribosa, por lo cual, los compuestos antioxidantes adicionados a la mezcla de reacción compiten con la desoxirribosa por el OH^{\bullet} (Aruoma, 2003).

El extracto metanólico de *L. graveolens* mostró ser capaz de neutralizar el OH^{\bullet} incrementando su capacidad conforme aumenta su concentración, aunque dicho incremento no es significativo (Figura 25). Esto probablemente se deba a que el OH^{\bullet} reaccionó con bajas concentraciones del extracto llegando a alcanzar a $1 \mu\text{g/mL}$ 64.9% de eficiencia, obteniendo un valor de CE_{50} de $0.387 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 3). Dicho eficacia es mayor en comparación con lo reportado para otras especies del género como *L. alba* que a $100 \mu\text{g/mL}$ presentó una eficacia de 9.06% (Ramos et al., 2002), y *L. citriodora* que a $4 \mu\text{g/mL}$ mostró una eficacia de 38.3% (Valentao et al., 2002). Lo anterior y el bajo valor de CE_{50} permite suponer que el extracto metanólico de *L. graveolens* es un efectivo neutralizador del OH^{\bullet}

Con respecto al extracto metanólico de *B. morelensis*, este mostró ser capaz de neutralizar el OH^{\bullet} de forma concentración dependiente, sin encontrarse diferencias significativas entre las distintas concentraciones empleadas (Figura 25) y obteniendo una CE_{50} de $0.362 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ (tabla 3). Dado que dicho valor es bajo comparado con lo reportado para otras especies de la familia Burseracea (Atawoodi et al., 2009) se puede considerar a *B. morelensis* como un potente neutralizador de OH^{\bullet} .

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los extractos de ambas especies ni con respecto al estándar de referencia, esto indica que los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* presentan alta capacidad neutralizadora del OH[•].

Poder reductor

El poder reductor de un compuesto es considerado un buen indicador de su potencial antioxidante debido a que la donación de electrones es uno de los medios por los cuales los antioxidantes combaten a los RL. En el presente estudio la capacidad reductora de los extractos se determinó basándose en su habilidad para reducir al Fe⁺³ a Fe⁺² mediante la donación de un electrón. Cabe destacar que el poder reductor de los compuestos está relacionado con la hidroxilación de los compuestos fenólicos, y son los flavonoides los que poseen gran habilidad para donar electrones (Lue *et al.*, 2010)

El extracto metanólico de *L. graveolens* mostró ser capaz de reducir al Fe⁺³; presentando un punto máximo de absorción de 1.128 nm a 20 µg/mL (Figura 26), dicho valor es superior a lo reportado para otras especies del género como *L. alba*, *L. rubella* y *L. sidoides*, las cuales a 110, 109 y 107 µg/mL alcanzan 0.5 nm de absorción (Fabri *et al.*, 2011). En base a lo anterior se puede suponer que el extracto metanólico de *L. graveolens* es un eficaz donador de electrones.

En lo que se refiere al extracto metanólico de *B. morelensis*, este fue capaz de reducir al Fe⁺³ con un punto máximo de absorción de 0.6 nm a 20 µg/mL (Figura 26). Tal capacidad es superior a la reportada para *B. serratum* la cual a 125 µg/mL presentó valores de absorbancia superiores a 0.5 nm (Rafikul *et al.*, 2014). Lo anterior indica que el extracto metanólico de *B. morelensis* es eficiente donando electrones.

Se debe considerar que la eficiencia de ambos extractos para donar electrones fue menor en comparación con el estándar de referencia.

Un punto importante a tomar en cuenta además de la habilidad de ambas especies para reducir el Fe⁺³ es el producto de esta reacción, es decir el Fe⁺², un potente agente pro-oxidante, por lo que los resultados mostrados con respecto al poder reductor de ambos

extractos no solo muestran la capacidad de estos para donar electrones, también son evidencia de sus efectos prooxidantes (Magalhães *et al.*, 2008).

Fenoles totales

Los compuestos fenólicos poseen diversos efectos biológicos incluyendo antibacterial, antiinflamatorio, antialérgico, hepatoprotector, antitrombótico, antiviral y anticarcinogénico, muchos de estos efectos han sido atribuidos a sus propiedades antioxidantes (Soobrate *et al.*, 2005). Los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antioxidante resultan de una combinación de su capacidad quelante, de su habilidad para inhibir oxidasas y de su capacidad para neutralizar RL (Perez, 2003); esta última se basa principalmente en las propiedades óxido reducción de los grupos OH y la relación estructural de los diferentes grupos funcionales (Lozano, 2010). Debido a lo anterior se midió el contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis*.

El extracto metanólico de *L. graveolens* mostró poseer altas concentraciones de compuestos fenólicos (304.28 mg de EAG/g de extracto). Tal concentración es superior a lo descrito por Rocha *et al.*, (2008) para los extractos metanólicos de *L. graveolens* colectados en Guanajuato, Querétaro y Puebla cuyas concentraciones fueron 211 ± 2.5 , 270.25 ± 4.1 y 265.42 ± 2.9 mg de EAG/g de extracto respectivamente. Esto podría explicar porque el extracto de *L. graveolens* utilizado en el presente trabajo resultó ser más eficaz en la neutralización del DPPH[•] comparado con lo reportado por Rocha y colaboradores (2008).

Además el contenido de fenoles totales de *L. graveolens* también resultó ser mayor en comparación con algunas especies del género como *L. pseudo-thea* y *L. hermanioides* (93 y 133 mg de equivalentes de ácido tánico) y menor con respecto a otras como *L. alba*, *L. rubela* y *L. sidoides* cuyas concentraciones fueron 334, 406 y 695 mg de equivalentes de ácido tánico (Fabri *et al.*, 2011). Esto coincide con lo obtenido en el ensayo de neutralización del DPPH[•].

Es importante mencionar que existen reportes de los compuestos fenólicos presentes en *L. graveolens*; tales como: ácido rosmarínico, naringenina, kaempferol, luteolina,

pinocembrina, laphachenol taxifolina y galangina (Long-Ze *et al.*, 2007; García *et al.*, 2012; Pascual *et al.*, 2001)

Con respecto al extracto metanólico de *B. morelensis* este presentó una concentración de fenoles totales (224.91 mg de EAG/g de extracto) menor en comparación con lo reportado por Serrano, 2013 (504.54 mg de EAG/g de extracto) para la partición metanólica del extracto de *B. morelensis*. Esto podría explicar porque el extracto de *B. morelensis* utilizado en el presente estudio presento menor capacidad para neutralizar al DPPH^{*} en comparación con el utilizado por Serrano.

Contrario a lo anterior, el extracto metanólico de *B. morelensis* presentó mayor concentración de fenoles con respecto a lo reportado para otra especie del género, *B. serrata*, cuya concentración fue de 55.53 mg de EAG/g de extracto (Rafikul, 2014). Este mismo presentó menor poder reductor en comparación con *B. morelensis*, por lo cual se puede atribuir el poder reductor de esta especie al contenido de fenoles totales.

Es importante mencionar que el extracto de *L. graveolens* resultó ser significativamente más eficaz en la neutralización del DPPH^{*} y el poder reductor con respecto al extracto de *B. morelensis*, lo cual, se atribuye a la superioridad de *L. graveolens* en el contenido de fenoles totales. De acuerdo con Magalhães *et al.*, (2008) en diversos estudios se ha mencionado que existe una fuerte correlación entre el efecto neutralizador del DPPH^{*} y el contenido de fenoles totales y entre este último y el poder reductor.

Finalmente, es importante mencionar que ambos extractos presentan capacidad antioxidante frente a los DPPH^{*}, O₂^{•-}, además del poder reductor, sin embargo esta es significativamente menor en comparación con la quercetina Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la quercetina es un compuesto puro a diferencia de los extractos que son una mezcla de diferentes compuestos.

CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* tienen actividad antioxidante.
- Los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* son capaces de neutralizar el radical DPPH[•], sin embargo dicha capacidad es menor con respecto a la quercetina.
- *L. graveolens* es más eficiente en la neutralización del radical DPPH[•] en comparación con *B. morelensis*.
- Los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* tienen la capacidad de neutralizar el radical O₂^{•-}, aunque dicha capacidad es menor en comparación con la quercetina.
- *B. morelensis* fue más eficiente en la neutralización del radical O₂^{•-} en comparación con *L. graveolens*.
- Los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* son igual de eficaces que el ácido gálico neutralizando el radical OH[•].
- Los extractos metanólicos de *L. graveolens* y *B. morelensis* tienen poder reductor, aunque este es menor con respecto a la quercetina.
- *L. graveolens* tiene mayor poder reductor en comparación con *B. morelensis*.
- *L. graveolens* contiene mayor concentración de fenoles totales con respecto a *B. morelensis*.
- Existe una relación entre el contenido de fenoles totales del extracto metanólico de *L. graveolens* y *B. morelensis* con su capacidad para neutralizar el radical DPPH[•] y su poder reductor.

REFERENCIAS

- Abdelaaty, A., Abeer Y. y Mansour, S. 2014. Polyphenolic content and antioxidant activity of some wild Saudi Arabian asteraceae plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 545-551.
- Alam, N., Bristi, J., y Rafiquzzaman, M. 2013. Review *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 153-152.
- Arcila, L., Loarca, P., Lecona, y Gonzáles, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54, 100-111.
- Ardestani, A. y Yazdanparast, R. 2006. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*. 104:21-29.
- Arias, T., Valverde, V. y Reyes, S. 2000. Las plantas de Zapotitlán Salina, Puebla. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Aruoma I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 32(7) 671-683.
- Aruoma I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 523(524):9-20.
- Atawodi, S., Atawodi, J., Idakwo, P., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. y Owen, R. 2009. Evaluation of polyphenol composition and antioxidant activity of African variety of *Dacryodes edulis* (G.Don) H.J Lam Fruit. *Journal Medical Food*. 12(6):1321-1325.
- Bah, M., Gutierrez, M., Mendoza, M., Rodríguez, L. y Castañeda, M. 2014. Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 13: 527-536.
- Betancour, L., Ariza, N., Díaz, G. y Afanador, T. 2012. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides* kunth en pollos de engorde. *MVZ Cordoba*. 17(2):3033-3040.

- Blancas, J., Casas, A., Rangel, L., Moreno, C., Torres, I., Pérez, N., Solís, L., Delgado, L., Parra, F., Arellanes, Y., Caballero, J., Cortéz, L., Lira, R. y Dávila, P. 2010. Plant management in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Economyc Botany*. 64(4):287-302.
- Canales, M., Hernández, D., Caballero, N., Romo de Vivar, R., Duran, D. y Lira S. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*. 75:21-46.
- Carocho, M. y Ferreira, I. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51:15-25.
- Casas, A., Valiente, B., Viveros, J., Caballero, J., Cortéz, L., Dávila, P., Lira, R. y Rodríguez, I. 2001. Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Economic Botany*. 55(1):129-166.
- Charles, D. 2012. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer. New York. 39-64 pp.
- Dávila, P., Arizmendi, C., Valiente, A., Villaseñor, L., Casas, A., y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation*. 11:421-442.
- Embuscado, M. 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*. doi: 10.1016/j.jff.2015.03.005
- Fabri, R., Silva, N., Reis, J., Morcef, B. y Scio, E. 2011. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *Journal Medical Food*. 14:840-846.
- Fadda, A., Serra, M., Molinu, M., Azara, E., Barberis, A. y Sanna D. 2014. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *Journal of Food Composition and Analysis*. 35:112-119.
- García, B.A. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa Baker*. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

- García, P., Castro, F., Gutiérrez, A. y García, L. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(2):339-353.
- Gonzáles, G., Soto, H., Geoffrey, K. y Martínez, V. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de oregano mexicano de (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30:43-49
- Gonzáles, R. 2011. Estudio de la deslocalización electrónica y la reactividad de radicales libres orgánicos. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias biológicas. Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Halliwell, B., Aeschbachl, R., Loliger, J. y Aruoma, I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 36(7):601-617.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141:312-322.
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 35:1147-1150.
- Halliwell, B. y Gutteridge J. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4° edición Oxford University Press. 888 p.
- Hernández, T., Canales, M., Caballero, J., Duran, A. y Lira, R. 2005. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Interciencia*. 30(9):17-27.
- Hernández, T., M. Canales, J.G. Ávila, A.M. García, S. Meráz, J. Caballero y R. Lira. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8(4), 295-300.
- Jolad, S. D., Wiedhopf, R. y Cole, J. 2006. Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): Deoxypodophyllotoxin and new lignin, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66: 892-893.

- Khlebnikov, A., Schepetkin, I., Domina, N., Kirpotina, L. y Quinn, M. 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidants activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 15:1749-1770.
- León, J. L. y Pérez, J. J. 2010. Dos nuevas taxa de *Bursera* (Burseraceae) de Baja California Sur, México. *Acta Botánica Mexicana*. 91:37-49.
- Li, Y. 2012. Free radical of biomedicine: principles, clinical correlations, and methodologies. Bentham Science Publishers. USA. 10-39 pp.
- Loeza, C., Díaz, L., Campos, P. y Orlando, G. 2013. Efecto de lignificación de estacas sobre enraizamiento de *Bursera morelensis* Ram. y *Bursera galeottiana* Engl. en la Universidad de la Cañada en Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México. *Ciencia Ergo Sum*. 20:222-226.
- Long-Ze, L, Sudarsan, M., Robbins, J. y Harnly, M. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 361-369.
- López, A. y Denicola, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chemical Acta*. 763, 1-10.
- López, H. L. 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lozano, P. 2010. Revisión bibliográfica de los ensayo para evaluar la capacidad antioxidante mediante técnicas electroquímicas. Tesis para obtener el grado de Química. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lue, B., Nielsen, S., Jacobsen, C., Hellgren, L., Guo y Z., Xu, X. 2010. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assay. *Food Chemistry*. 123:221-230.
- Magalhães, M., Segundo, A., Reis, S. y Lima, L.F.C. 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 613:1-19

- Moller, P., Wallin, H. y Knudsen, L. 1996. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interactions*. 102:17-36.
- Ocegueda, S., Moreno, E. y Koleff, E. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. *Biodiversitas*. 62:12-15.
- Om, P. y Tej, K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113:1202-1205.
- Oroian, M. y Escriche, I. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraxtion and analysis. *Food Research International*. 74:10-36.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez, M. y Villar, A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 201-214.
- Pérez, T. 2003. Los flavonoids: antioxidants o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 22(1):48-57.
- Pisoschi, M., y Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicine and Chemistry*. 97:55-74.
- Prakash, D., Upadhyay, G. y Gupta, C. 2013. Total phenol and antioxidant activity of some fruits and their underparts. *Internaccional Food Research Journal*. 20(4):1717-1724.
- Prior, R., Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. 2005. *Agricultural Food Chemistry*. 53:4290-4302.
- Queiroga, L., Texeira, D., Baesa, D., y Melillo, M. 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*. 78: 327-328.
- Rafikul, I., Mohammed, F., Rashedul, A., Dhar, R., Nasiruddin, R., Ekramul, I., Shahnaj, P. y Aslam, H. 2014. Sedative, membrane stability, cytotoxic and antioxidant properties of methanol extract of leaves of *Protium serratum* Wall. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4: 5928-5933.

- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, N., Lakshminarasiah, U., Gopas, J. y Nihisgaki, I. 2014. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. 436:332-347.
- Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., García, A., Rodríguez, C. y Rivero, R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 87:241-246.
- Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., Simone, F. y Aquino R. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*. 49(6):1829-1832.
- Ray, D., Huang, B.W. Y Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 24:981-990.
- Rios, C., Valiente, B. y Rico, G. 2004. Las hormigas del Valle de Tehuacán (Hymenoptera: Formicidae): una comparación con otras zonas áridas de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 20(1):37-54.
- Riyaz, A., Pradeep, K., Khurana, N., Wagay, A., Zahoor, A., Mohd, A. y Krishna S. 2013. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, and biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal Chemistry*.
- Robles. J., Torrenegra, R., Gray, I., Piñeros, C., Ortiz, L. y Sierra, M. 2005. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15(4):282-286.
- Rocha, M., R. Puga, S. Hernández, P. Loarca y S. Mendoza. 2008. Antioxidant and antimutagenic activities of mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plants Foods for Human Nutrition*. 63, 1-5.
- Rodríguez, C. M. 2014. Efecto amebicida de los extractos metanólicos de tres especies del género *Bursera* contra *Naegleria fowleri*. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rojas, H. y Rodriguez, U. 2008. Actividad antimicrobiana de *Tectona grandis* L.f., *Bursera simaruba* (L.) Sarg., y *Cedrela odorata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 13:4.

- Rojas, S., Mendieta, S., Antúnez, M., Salas, V., Marquina, S., Villareal, M., Puebla, M., Delgado, J. y Alvarez, L. 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*. 17:9506-9519.
- Rzedowski J. Medina, R. y Calderón R. 2004. Las especies de bursera (Burseraceae) en la cuenca superior del Río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana*. 63:23-151.
- Rzedowski, J., Medina, L. y Calderon, G. 2005. Inventario del conocimiento taxónomico así como de la diversidad y endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana*. 70:85.111.
- Rzedowski, J. y Rzedowski C. 2002. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Familia Verbenaceae, Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío A.C., Michoacán Méx., 78-79 pp.
- Sánchez, M., García, S., May, P. y Peña, R. 2001. Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine. Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*. 8:144-151.
- Seifried, H., Anderson, D., Fisher, E. y Milner, J. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18:567-579.
- Serrano, P. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Singleton, L.V., Orthofer, R. y Lamuela, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.
- Soobratte, A., Neergheen, V., Luximon, A., Aruoma, O. y Bahorun. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 579:200-213.
- Soto, D., G. García, C. Ramírez, M. Morán y G. Serrano. 2012. El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del Norte de México tiene actividad

- antioxidante sin mostrar un efecto tóxico *in vitro e in vivo*. *International Journal of Morphology*. 30(3):937-944.
- Türkkan, B., Özyürek, M., Bener, M., Güclü, K. y Apak, R. 2012. Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 85:235:240.
 - Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Branquinho, A., Seabra, R.M. y Bastos, M.L. 2002. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citrifolia* infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical y hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25(10):1324-1327.
 - Villano, D., Fernández, M.S., Moya, M., Troncoso, A. y García, M. 2006. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71:230-235.
 - Villaseñor, J., Dávila, P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 50:135-149.
 - Williams, B., Cuvelier, M. y Berset, C. 1995. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*. 28:25-30.
 - Zhang, J., Zhang, Z., Hui, L., Chen, W. y Tian, X. 2010. Novel semisynthetic spin-labeled derivatives of podophyllotoxin with cytotoxic and antioxidative activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 20:983-986.
 - Zhang, Z., Zhang, J., Hui, L., Chen, W. y Tian, X. 2010. First synthesis and biological evaluation of novel spin-labeled derivatives of deoxypodophyllotoxin. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45:1673-1677.
 - Zuñiga, B., Guevara, F., Herrera, J., Contreras, J., Velasco, L., Pérez, F., y Esquivel, B. 2005. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species. *Planta Médica*. 71: 825-828.

APÉNDICE

Zona de colecta

Valle de Tehuacán-Cuicatlán

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán se localiza en la parte sureste del Estado de Puebla y noreste del Estado de Oaxaca, cubriendo un área total de 10,000 km², conformada por dos zonas fisiográficas la Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico Transversal, representa un complejo mosaico fisiográfico con valles internos separados por numerosas cordilleras (Villaseñor *et al.*, 1990).

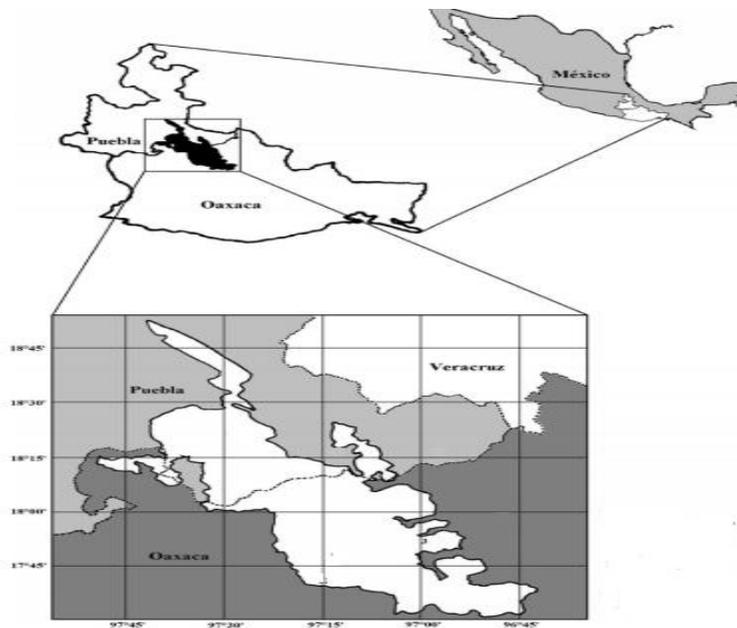


Figura 26. Ubicación geográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. (Tomado de Blancas *et al.*, 2010)

El clima es principalmente semiárido, con una temperatura media anual de 21° C y una precipitación media anual de 300-500 mm (Villaseñor *et al.*, 1990). La aridez de la región se debe al efecto de sombra orográfica que produce la Sierra Madre Oriental (Dávila *et al.*, 2002).

El Valle presenta una alta heterogeneidad ambiental que incluye 36 tipos de vegetación, siendo los principales la selva baja caducifolia, bosque de encino y matorral xerófilo (Villaseñor *et al.*, 1990). Por su diversidad y endemismos esta región fue declarada en 1998 como reserva de la biosfera, ya que cuenta con el 10% de la flora de México (Dávila

et al., 2002), con aproximadamente 2700 especies de plantas vasculares, de las cuales 808 especies son útiles para la población local. Incluye además una alta diversidad cultural con siete grupos étnicos indígenas que poseen amplios conocimientos respecto a la utilización de plantas nativas. Por lo tanto, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán podría estar entre las zonas más ricas de México, en cuanto a plantas útiles (Casas *et al.*, 2001).