



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE *Bursera biflora* (Rose) Standl.
(Burseraceae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ISMAEL CRUZ DONIZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Marisol Avila Romero

LOSREYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO

MAYO 2018



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, así como a todos y cada uno de los profesores que me brindaron sus conocimientos, convenciéndome que la biología era lo que quería y estaba buscando, Al Dr. Elías Piedra Ibarra por mostrarme la biología desde un panorama diferente e iniciar lo bueno de la carrera con más emoción y entusiasmo!!!!

A mi tutora la M. en C. Marisol Avila Romero, por su dedicación, tiempo, conocimiento y ayuda para realizar el presente trabajo, por ser mi guía y siempre apoyarme en todas las dudas e inquietudes, por estar al pendiente de todo y compartirme de su gran sabiduría, así como una invaluable amistad y cariño que por siempre estaré agradecido.

A mis sinodales; la Dra. Ana María García Bores, Dra. Roció Serrano Parrales. Mtra. Julieta Orozco Martínez y la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado por todos sus aportes, consejos y opiniones del presente trabajo.

A los compañeros y amigos de fitoquímica–farmacognosia, Kike, Fernanda, Karina, Gelos, Say, Ary, a la Doc. Monse, Doc Isra, Doc. Anita, Doc. Roció por todos esos buenos momentos y convivencias, así como todos los consejos y la ayuda que me brindaron y enseñarme que siempre hay algo nuevo que aprender, también por todas las fiestas y convivios.

A todos los amigos de la carrera; Kike por apoyarme en las ideas locas, escucharme y aconsejarme te lo agradezco, mi querida Mel por ser una gran amiga y estar ahí y cotorrear, Yaz mi querida gordis también te agradezco mucho por estar ahí y dejarte hacer bullying y caerte en todas las prácticas de campo jaja, Lucero por estar en esos buenos momentos, apoyarme y aconsejarme, regañarme y ser una muy buena amiga, Bryan, Fer, Oscar, Oscar (wi), Itzel, Marcos, Caro les agradezco mucho todas las buenas experiencias, salidas, consejos, enseñanzas así como al resto de nuestro grupo, Migue y dianita también por ser buenos amigos y apoyarme en las ideas, echarme la mano, escucharme regañarme y aconsejarme se los agradezco.

A Alemán y Alfredo por apoyarme al inicio de la carrera y todo CCH, también se los estoy eternamente agradecido.

Finalmente, también estoy eternamente agradecido con toda mi familia que siempre me ha apoyado incondicionalmente me ha aconsejado y me ha enseñado y educado de la mejor manera a todos mis tíos y principalmente a mi madre que me ha dado todo.

Gracias

DEDICATORIAS

A mi madre

Por estar siempre conmigo, por todo el apoyo incondicional que siempre me has dado, por enseñarme que jamás tenemos que rendirnos a pesar de las adversidades, por ser el más grande ejemplo a seguir, ser la razón de todo lo que he hecho hasta el día de hoy y la culminación de este trabajo es todo gracias a tí. Te amo y te estoy eternamente agradecido

A mi familia

A mis tías y tíos; Regina, Alicia, Dalía, Lilia, Luis, Carlos, ya que a lo largo de la vida siempre me han cuidado, apoyado y han visto por mí así como lo hace mi madre, se los agradezco, a Javier que has sido un padre para mí apoyándome y enseñándome mientras iba creciendo te lo agradezco.

A mi abuela

Por estar presente, por existir y haberme dado a una madre tan maravillosa.

A Mariana

Por estar siempre a mi lado, por todo el apoyo que me has dado a lo largo de la carrera, las enseñanzas de vida, impulsarme a lograr mis sueños, apoyarme, cuidar de mí, y amarme como lo has hecho, todo ese maravilloso tiempo que hemos compartido, así como las experiencias han sido invaluable.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS UTILIZADAS	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Estrés oxidativo	2
Radicales libres.....	3
Antioxidantes	4
Antioxidantes en plantas	6
Quimiotaxonomía.....	7
ANTECEDENTES	8
JUSTIFICACIÓN	10
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
ZONA DE COLECTA.....	11
Descripción de la planta	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Obtención del material vegetal	13
Obtención del extracto.....	13
Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios	14
Fraccionamiento del extracto: cromatografía en columna	14
Actividad antioxidante	14
Método de DPPH.....	14
Determinación del contenido de fenoles totales	15
Caracterización de las fracciones activas	15
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	15
Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	16
RESULTADOS.....	16
Identificación de la planta.....	16
Obtención y rendimiento del extracto.....	17
Identificación de los principales grupos de metabolito secundarios	17

Aislamiento: Cromatografía en columna	17
Actividad antioxidante	19
Cuantificación de fenoles totales	21
Análisis por CG-EM de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>B. biflora</i>	22
Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	23
DISCUSIÓN	28
 Rendimiento del extracto.....	28
 Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios	28
 Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales.....	29
 Caracterización de las fracciones activas	31
CONCLUSIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34
ANEXOS.....	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Radicales libres más frecuentemente producidos por los sistemas biológicos que dan origen a especies reactivas, así como el proceso que los origina	3
Cuadro 2. Clasificación de antioxidantes según su origen	5
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>B. biflora</i>	17
Cuadro 4. Pruebas colorimétricas del extracto metanólico de <i>B. biflora</i>	17
Cuadro 5. Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>B. biflora</i>	18
Cuadro 6. Actividad antioxidante media (CA ₅₀) de las fracciones del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> frente al radical DPPH	21
Cuadro 7. Comparación de la actividad AOX de las fracciones frente al radical DPPH y su contenido de FT	22
Cuadro 8. Composición química de la alícuota 7 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> analizada por CG-EM.....	22
Cuadro 9. Composición química de la fracción 2 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> analizada por CG-EM.....	23
Cuadro 10. Tiempos de retención (min) de los constituyentes químicos de las fracciones analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ($\lambda=280\text{nm}$).....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de radicales libres y efectos adversos de estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades.	4
Figura 2. Ubicación geográfica del Poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.	11
Figura 3. <i>B. biflora</i> (Rose) Standl.	12
Figura 4. Mapa de distribución de <i>B. biflora</i> en la República Mexicana.	13
Figura 5. Actividad antioxidante de las fracciones 30, 36, 37 y 38 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> frente al radical DPPH.	20
Figura 6. Actividad antioxidante de las fracciones 39, 41 y 42 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> frente al radical DPPH	20
Figura 7. Curva patrón de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales de las fracciones 30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i>	21
Figura 8. A) Cromatograma de la fracción 30 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.393) de la fracción 30	24
Figura 9. A) Cromatograma de la fracción 36 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.446) de la fracción 36.....	24

Figura 10. A) Cromatograma de la fracción 37 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.344) de la fracción 37	25
Figura 11. A) Cromatograma de la fracción 38 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.373) de la fracción 38.....	25
Figura 12. A) Cromatograma de la fracción 39 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.347) de la fracción 39.....	26
Figura 13. A) Cromatograma de la fracción 41 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.359) de la fracción 41	26
Figura 14. A) Cromatograma de la fracción 42 del extracto metanólico de <i>B. biflora</i> . B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.365) de la fracción 42	27
Figura 15. Curva de absorbancia del radical DPPH en su estado de radical libre (morado) y el no radical (amarillo)	43
Figura 16. Placa de 96 pozos con la reacción de DPPH y el antioxidante de referencia..	44

ABREVIATURAS UTILIZADAS

RL= Radicales libres

AOX= Antioxidantes

DPPH= Radical 2,2 difenil-1picrilhidracilo

CA₅₀= Concentración antioxidante media

FT= Fenoles totales

HPLC= Cromatografía líquida de alta eficiencia

CG-EM= Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

EAG= Equivalentes de ácido gálico

ERO= Especies reactivas de oxígeno

ER= Especies reactivas

BHA= Terbutil hidroxianisol

BHT= Terbutil hidroxitolueno

TBHQ= Terbutil hidroxiquinona

MS= Metabolitos secundarios

CC= Cromatografía en columna

CCF= Cromatografía en capa fina

FDA= Food and drugs administration (USA)

RESUMEN

La generación descontrolada de radicales libres (RL) provoca estrés oxidativo, el cual genera tanto daño celular como enfermedades crónico degenerativas. La principal función de los antioxidantes (AOX) es prevenir, retardar o inhibir la degradación inducida por los RL. Las plantas como fuente de AOX se pueden utilizar previniendo el deterioro de las células. Actualmente se conoce poco acerca de la actividad AOX y composición fitoquímica del género *Bursera*, por lo cual es importante conocerla así como los compuestos responsables de dicha bioactividad. El objetivo del trabajo fue analizar fitoquímicamente y evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *B. biflora*. La colecta del material se realizó en el poblado de San Rafael, ejido de San José Tilapa, perteneciente al municipio de Coxcatlán, Puebla. El extracto metanólico se obtuvo mediante la técnica de maceración a partir de 428.8 g de la parte aérea seca (flor, hoja y fruto) y se obtuvo el rendimiento del extracto. Las pruebas colorimétricas utilizadas para identificar los principales grupos de metabolitos secundarios fueron: Dragendorff y Mayer (alcaloides), cloruro férrico al 1% (fenoles), vainillina-H₂SO₄ (terpenos), prueba de Molisch (glicósidos), gelatina y HCl al 0.5 M (taninos). También se realizó el fraccionamiento en columna abierta del extracto metanólico, las fracciones que presentaron mayor rendimiento se les realizó la prueba de actividad antioxidante frente al radical DPPH para determinar la concentración antioxidante media (CA₅₀) y el contenido de fenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. Las fracciones con mayor actividad AOX fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de acuerdo a su polaridad. Se obtuvo un rendimiento del extracto metanólico de 5.4%, se detectó la presencia de fenoles, terpenos y taninos. Del fraccionamiento se obtuvieron 263 alícuotas agrupadas en 49 fracciones, a estas se les realizó una prueba cualitativa con DPPH mostrando 48 actividad antioxidante y también se aislaron dos compuestos en forma cristalina. Las fracciones seleccionadas fueron la 30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42 de las cuales, las que presentaron una mejor actividad antioxidante cuantitativa y mayor contenido de fenoles totales fueron las fracciones 41 y 42 con una CA₅₀ de 18.04 y 18.23 µg/mL y fenoles totales de 313.3 y 348.8 EAG/g extracto respectivamente, mostrando así un aumento de la capacidad antioxidante proporcional al incremento de fenoles totales. Los resultados del HPLC indican la posible presencia de catequina o compuestos derivados de la misma como compuesto mayoritario en las fracciones estudiadas. La CG-EM de la alícuota 7 tiene como constituyente mayoritario al ácido hexadecanóico y la fracción 2 a ácidos grasos insaturados como: 2,4-decadienal, 2-undecenal, ácido oleico y ácido-hexadecanóico. Se concluye que la actividad antioxidante de *B. biflora* está dada posiblemente por la presencia de ácidos grasos insaturados y compuestos fenólicos de tipo catequina.

INTRODUCCIÓN

Estrés oxidativo

Los seres humanos necesitan oxígeno (O₂) para la producción de energía; sin embargo a partir de esta molécula se generan especies reactivas del oxígeno (ERO) durante su reducción. Para contrarrestar el efecto nocivo y sus derivados, la célula cuenta con sistemas capaces de remover los productos tóxicos producidos. Estos mecanismos de control de daño son conocidos como sistemas antioxidantes (AOX) los cuales están encargados de mantener el equilibrio entre las reacciones de óxido-reducción y la sobrevivencia celular (Sánchez-Valle y Méndez, 2013). El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa AOX. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo (Dorado *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado y participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico degenerativo; por tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular (Constanza y Muños, 2012). El daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas AOX, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas AOX (Venereo, 2002). En el estrés oxidativo reversible, las defensas AOX bastan para reestablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo irreversible se llega a fuertes alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento de DNA, aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartmentalización de iones de Fe⁺² y Cu⁺², daño a los transportadores membranales de iones y otras proteínas específicas y peroxidación de lípidos (Dorado *et al.*, 2003).

En los últimos años ha tomado gran interés el estudio del estrés celular y de los radicales libres (RL) en el campo de la medicina y biología celular, con el fin de conocer a profundidad los mecanismos de autocontrol celular y mejorar la calidad de vida del ser humano (Constanza y Muños, 2012).

Radicales libres

Las especies reactivas (ER) se forman como productos del metabolismo y aunque no todas son RL, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en RL lo que les confiere la característica de ser compuestos dañinos para las células (Cuadro 1) (Dorado *et al.*, 2003). Se consideran RL aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, estos son capaces de existir de forma independiente, dándole una configuración espacial que genera un potencial redox elevado, ya que se encuentra desapareado. Esto los hace muy inestables, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez *et al.*, 2001) y con la capacidad de alterar cualquier tipo de biomolécula (Dorado *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Radicales libres más frecuentemente producidos por los sistemas biológicos que dan origen a especies reactivas, así como el proceso que los origina.

	Radical libre	Proceso que lo origina
$O_2^{\bullet-}$	Superóxido	Intermediario de reducción de O_2 a H_2O . Produce más (ERO) especies reactivas de oxígeno como OH y H_2O_2
$\bullet OH$	Hidroxilo	El más poderoso oxidante en los sistemas biológicos, es generado en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss
RO_2^{\bullet}	Peroxilo	Óxidación de lípidos
RO^{\bullet}	Alcoxilo o fenoxilo	
L^{\bullet}	Peróxido lípidico	
$\bullet NO$	Óxido nítrico	

Fuente: Dorado *et al.*, 2003

Los RL se pueden formar a partir de diversos mecanismos siendo el más común la adición de un electrón a una molécula estable. En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes. Estos son producidos por procesos como: el ejercicio físico extremo, contaminación ambiental, ingesta de medicamentos, cigarrillos, estrés, enfermedades por deficiencias o bloqueos enzimáticos o acúmulo de RL por infecciones crónicas recurrentes (Figura 1) (Sánchez-Valle y Méndez, 2013).



Figura 1. Generación de radicales libres y efectos adversos de estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades. Fuente: Sánchez-Valle y Méndez, 2013

Antioxidantes

Para contrarrestar el efecto nocivo de los RL los organismos cuentan con sistemas de defensas AOX que incluyen moléculas y secuestradores químicos que previenen este daño oxidativo (Sánchez-Valle y Méndez, 2013). La principal función de estos AOX es prevenir, retardar o inhibir la degradación inducida por los RL presentando un donador de hidrógeno/electrón con un apropiado potencial de reducción (Arriaga, 2011).

Los AOX pueden ser clasificados de dos maneras: endógenos y exógenos (Cuadro 2). Los endógenos incluyen enzimas AOX que constituyen la primera línea de defensa frente al daño oxidativo, aunado a éstas también existe un grupo de AOX compuesto por moléculas no enzimáticas que actúan sobre los RL. Los exógenos son aquellos que

proviene de la dieta, actúan neutralizando directamente a los RL por lo que su reposición debe ser continua, mediante la ingestión de alimentos que los contienen, algunos ejemplos son la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β - carotenos (provitamina A) licopenos, flavonoides (polifenoles) y oligoelementos como el cobre, zinc, selenio o magnesio, muchos de estos son AOX de origen natural obtenidos principalmente de plantas vasculares y son de importancia comercial (Cruz, 2016).

Cuadro 2. Clasificación de antioxidantes según su origen.

Origen	Acción
Exógenos	
Vitamina E	-Neutraliza el oxígeno singulete -Captura radicales libres hidroxilo -Neutraliza peróxidos
Vitamina C	-Neutraliza el oxígeno singulete -Captura radicales libres de hidroxilo
Betacarotenos Flavonoides, licopenos	-Neutraliza el oxígeno singulete
Endógenos	
Enzimáticos	
Superóxido dismutasa (SOD)	-Cofactor -Cobre, sodio, manganeso
Catalasa (CAT)	-Hierro
Glutación peroxidasa (GPx)	-Selenio
No enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
Coenzima Q	
Ácido tioctico	Transportadores de metales (transferina y ceruloplasmina)

Fuente: Cruz 2016.

Los AOX de origen natural han cobrado importancia debido a que se ha observado que los sintéticos generan efectos nocivos para la salud al exponerse a altas concentraciones ya que muchos de estos presentan efectos secundarios como desórdenes metabólicos, alergias y son promotores de la actividad cancerígena o mutagénica (Robledo *et al.*,

2007). Algunos ejemplos de los más utilizados en alimentos se encuentran: terbutil hidroxianisol (BHA) que produce aumento del colesterol y degradación de vitamina D; terbutil hidroxitolueno (BHT) provoca alergias así como grietas cutáneas; propilgalato (PG) y terbutil hidroxiquinona (TBHQ) presentan efectos secundarios similares como alergias y degradación de vitamina D (Cruz *et al.*, 2016).

Los AOX naturales están presentes en plantas, hongos y microorganismos, la mayoría son compuestos fenólicos y los más importantes entre ellos son los flavonoides (Cuadro 2), los tocoferoles y los ácidos fenólicos (Arriaga, 2011).

Antioxidantes en plantas

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa en contra de las condiciones de estrés tanto biótico como abiótico (Avalos, 2009), en la cual se incluye la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios (MS). La función de estos compuestos son defender a las plantas contra herbívoros y patógenos, atraer polinizadores, dispersores de semillas, servir como señalizadores en la comunicación entre planta-planta así como prevenir daños producidos por la irradiación solar y ER (Maffei, 2010). Algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, terpenos, fenilpropanoides y compuestos fenólicos participan activamente en la defensa contra los daños producidos por el estrés oxidativo, producto de las ERO que pueden llegar a ser tóxicas para las mismas células y los cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa celular (Sepulveda, 2004).

En los últimos años diversas plantas han sido investigadas por su posible actividad en contra de generación descontrolada de ERO y la capacidad para atrapar RL. Las plantas como fuentes de AOX se pueden utilizar previniendo el deterioro de la célula y para propósitos medicinales. Consecuentemente, es importante determinar la cantidad y el tipo de compuestos fenólicos que puedan presentarse en ellas (Arriaga, 2011).

La mayor parte de la capacidad antioxidante de las plantas puede ser debido a la presencia de compuestos como los polifenoles; estos han sido blanco de un sin número de estudios ya que poseen características biológicas extensas. Este efecto se debe a que contienen en su estructura química, un número variable de grupos hidroxilo, donde los

electrones pueden reducir a los RL y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Martínez, 2007).

Quimiotaxonomía

El aspecto químico de la clasificación de las plantas se basa en sus constituyentes químicos, esto se debe a sus características moleculares, también estas características son controladas genéticamente y tienen la ventaja sobre las morfológicas de que pueden ser descritas exactamente en términos de estructuras definidas y fórmulas químicas conformacionales (Cabeza, 1993).

Los MS son utilizados para elegir los caracteres químicos que pueden definir los taxones, juntamente con los morfológicos y/u otros, o por sí mismos (quimiotipos) (Cabeza, 1993), algunos MS solo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

La elucidación de estructuras y sus configuraciones abren camino para entender su biosíntesis (García, 1992). Por otra parte el aislamiento y determinación de la estructura de los componentes químicos de una planta en ocasiones puede ser bastante difícil y se necesita cierto tiempo para hacerlo, por lo cual se han utilizado métodos y técnicas los cuales facilitan enormemente la separación e identificación, entre las cuales se encuentran; las técnicas de cromatografía, electroforética, de distribución de corriente y la posibilidad de contar con columnas de destilación fraccionada altamente eficaces que permiten la separación de mezclas de compuestos, así como métodos de determinación estructural como por ejemplo la espectrofotometría que indica el arreglo estructural de los compuestos aislados, los cuales en conjunto ayudan a la ampliación del conocimiento de los compuestos químicos y su clasificación (Calderón, 1999).

ANTECEDENTES

La familia Burseraceae comprende 16 géneros y 500 especies que incluyen arbustos y árboles tropicales a pesar de que es una familia con muchas especies pocas han sido estudiadas. Las especies del género *Bursera* contienen triterpenos, lignanos y flavonoides los cuales pueden conferirles capacidad antioxidante (Arriaga, 2011).

Se han realizado estudios en diferentes extractos del género *Bursera*, con el fin de conocer los compuestos y la capacidad antioxidante que estas presentan. Uno de ellos es el de Peraza y cols. (2005), estos autores realizaron una revisión en la cual reportan que en especies del género *Bursera* se han aislado compuestos tales como triterpenos, lignanos del tipo podofilotoxinas y flavonoides.

Robles (2005) aisló e identificó 3 triterpenos tetracíclicos del extracto etanólico de *B. graveolens*, los cuales son el ácido β -elemónico, ácido α -elemónico y ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico.

Campos (2006) elucidó dos compuestos triterpénicos que son la lupenona y lupeol del extracto de acetato de etilo de *B. simaruba*.

Manzano y cols. (2009) identificaron la presencia de triterpenos-esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antocianidinas, saponinas y 11 componentes del aceite esencial extraído de las ramas de *B. simaruba*, El sesquiterpeno denominado viridiflorol resultó el componente mayoritario con 70.82 %. No se realizaron pruebas de efecto AOX, sin embargo el extracto mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de la oreja inducido por aceite de crotón en ratones albinos, dicha bioactividad está relacionado con la actividad antioxidante.

Por otro lado, Serrano y cols. (2012) realizaron una evaluación de la actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante del extracto metanólico obtenido de la corteza de *B. morelensis*. Este extracto mostró una buena capacidad para reducir el radical DPPH, con una concentración antioxidante media (CA_{50}) de 3.05 μ g/mL. La actividad biológica de este extracto se atribuye a la mezcla de compuestos fenólicos (50.5%), en particular a los fenilpropanoides y flavonoides.

Canales y cols. (2014) realizaron la caracterización química de extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* identificando ácidos grasos como metil palmitato, ácido palmítico, metil linoleato, ácido linoleico y ácido esteárico.

Nolasco (2014) realizó un estudio de extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de *B. morelensis*, identificando la presencia de monoterpenos como α pineno, óxido de cariofileno y lupeol, ácidos grasos como el ácido palmítico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico y ácido hexacosanoico, así como flavonoides.

Rodríguez (2014) realizó un estudio del extracto metanólico de *B. aptera* el cual mostró una $CA_{50} = 11.72 \mu\text{g/mL}$ frente al radical DPPH. Esto se correlaciona con el contenido de fenoles totales (FT) 61.2 mg EAG/g y flavonoides 15 mg (eq)/g en proporción al peso utilizado de la planta (0.14% y 0.0035%).

Bah y cols. (2014) realizaron estudios del extracto hexánico y metanólico de la corteza de ramas de *B. simaruba* identificando 17 compuestos entre ellos flavonoides y terpenos. Estos autores utilizaron DPV (Voltametría de Pulso Diferencial) encontrando metabolitos secundarios con buena actividad antioxidante.

Tepec (2017) realizó un estudio preliminar de *B. biflora* en el cual se evaluó el efecto antioxidante de tres extractos (hexánico, metanólico y acetónico) de la parte aérea (hojas, ramas y fruto). Obtuvo en el extracto metanólico una $CA_{50} = 20.44 \mu\text{g/mL}$ frente al radical DPPH, con el ABTS de $3.312 \mu\text{g/mL}$ y $147 \mu\text{mol}$ de EAG/g de extracto con el método FRAP y un contenido de FT de 136.22 EAG/mg de extracto. El extracto acetónico mostró una $CA_{50} = 80.45 \mu\text{g/mL}$ con el radical DPPH, $CA_{50} = 99.2 \mu\text{g/mL}$ frente al radical ABTS, $60.04 \mu\text{mol}$ de EAG/g de extracto con método de FRAP con 30.75 EAG/mg de FT.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se cuenta con pocos estudios relacionados con la actividad antioxidante y composición fitoquímica del género *Bursera*, estas plantas han demostrado ser candidatas ideales para dicha bioactividad, por lo cual es de suma importancia encaminar esfuerzos para conocer la composición química de este género. La especie *B. biflora* no cuenta con ningún tipo de investigación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué compuestos con actividad antioxidante presentará *B. biflora*?

HIPÓTESIS

Diferentes especies del género *Bursera* han mostrado actividad antioxidante, presentando compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos entre otros, por lo cual se espera que en el extracto metanólico de *B. biflora* se aislen algunos compuestos responsables de esta bioactividad.

OBJETIVO GENERAL

-Analizar fitoquímicamente y evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *B. biflora*.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Determinar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *B. biflora*.

-Determinar la actividad antioxidante de las fracciones que presenten bioactividad del extracto metanólico de *B. biflora*.

-Determinar el contenido de fenoles totales de las fracciones activas del extracto metanólico de *B. biflora*.

-Conocer la composición química de las fracciones que presenten la mejor bioactividad

-Contribuir al conocimiento de la fitoquímica de la especie *B. biflora*

ZONA DE COLECTA

La Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán se ubica en el estado de Puebla y Oaxaca, se caracteriza por ser el área más seca y con mayor irradiación solar del sur de México y se encuentra aislada del resto de las regiones áridas del país (Dávila *et al.*, 1993).

Tehuacán-Cuicatlán es una zona que posee una amplia diversidad de especies vegetales, alrededor de 3000 spp. de plantas vasculares (Dávila *et al.*, 1993), destacándose su endemismo y formas biológicas (Casas *et al.*, 2001). Así mismo muchas de las plantas de la región se les ha dado uso medicinal (Dávila *et al.*, 1993).

San Rafael Coxcatlán se encuentra dentro de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán se ubica al sureste del valle de Tehuacán entre las coordenadas $18^{\circ} 08'$ y $18^{\circ} 21'N$, $97^{\circ}01'$ y $97^{\circ} 13'O$, con una altitud de 1217 msnm (Figura 2). La zona tiene un clima semiárido a árido, con una temperatura anual de $22^{\circ}C$ y una precipitación de 294.6 mm anuales (Medina, 2000); presenta un suelo de tipo regosol, principalmente calcáricos, eutrícos y xerosoles principalmente haplicos (Davila y Lira 2002; INEGI, 2009).

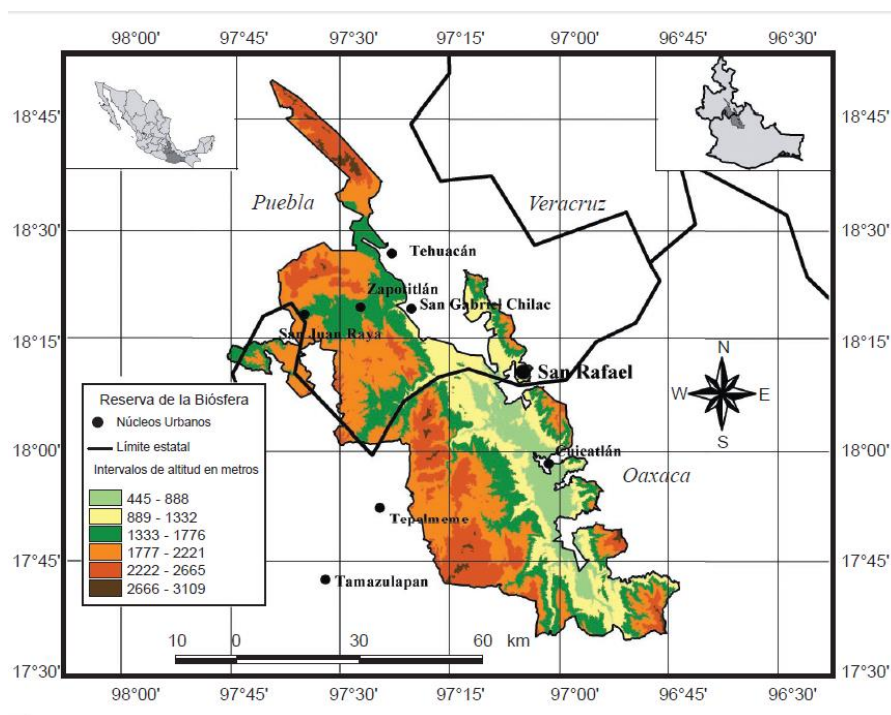


Figura 2. Ubicación geográfica del Poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.

Fuente: Canales *et al.*, 2006.

Descripción de la planta

B. biflora (Figura 3) es conocida comúnmente como copal o copalillo. Es una especie arbórea de hasta 8 m de altura, dioicos, con troncos de hasta 40 cm de ancho, la corteza es grisácea, no exfoliante y lisa, secreta una resina aromática. Las ramas juveniles son de rojizas a negruzcas. Sus hojas miden de 3 a 5 mm de largo, son lineares a angostamente triangulares, son simples o trifoliadas con el borde crenado, dispuestas en roseta en la punta de las ramas. Las inflorescencias son reducidas de hasta 3 cm de largo, ocasionalmente los individuos masculinos presentan una panícula de hasta 15 flores, bracteolas linear-subuladas. Las flores son blanquecinas, las masculinas son tetrámeras, el cáliz con lóbulos 0.5-0.8 mm largo, de forma triangular. Los frutos son de 1-2 con pedúnculos hasta de 7-9 mm de largo (Rzedowski y Calderón, 2006), filiformes, los hay elipsoidales, ovoides y obovoides, rojizos en la madurez, glabros; huesos largo, orbiculares a obovoides, cubiertos por un pseudoarilo anaranjado (Aguilar y García, 2004).



Figura 3. *B. biflora* (Rose) Standl.

Imagen propia

B. biflora es una especie endémica mexicana, que se distribuye en los estados de Puebla y Oaxaca, aunque se conocen colectas de las cuencas superiores de los ríos Balsas y Tehuantepec, así como en Baja California Sur, Tabasco, Veracruz y Jalisco (Figura 4) (Medina-Lemos, 2008).



Figura 4. Mapa de distribución de *B. biflora* en la República Mexicana.
Fuente: <http://www.gbif.org/species/3993010>

B. biflora es quizá la especie de más amplia distribución en la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y también una de las más variables del género en su morfológica (Medina-Lemos, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

La colecta del material se realizó en el poblado de San Rafael, ejido de San José Tilapa, perteneciente al municipio de Coxcatlán, Puebla, por el colector Héctor Hilario Cervantes Maya. Posteriormente se llevó a identificar al Herbario IZTA, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. La determinación taxonómica la realizó la Biól. Patricia Jacquez Ríos. Un ejemplar de herbario se depositó en el herbario IZTA (Tepec, 2017).

Obtención del extracto

La obtención del extracto se llevó a cabo por el método de maceración. El material (ramas fruto y hojas) fue pesado y se procedió a la maceración con metanol. Se dejó reposar por tres días en el solvente. Llevándose a cabo una destilación a presión reducida para concentrar el extracto. El rendimiento del extracto se determinó con referencia del peso del extracto y el peso seco de la planta, con base a la siguiente fórmula (Rodríguez, 2014):

Rendimiento %=(Peso del extracto/Peso seco de la planta)*100

Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios

Para la caracterización cualitativa del extracto metanólico de *B. biflora* se emplearon los siguientes reactivos: la determinación de alcaloides se hizo con los reactivos de Mayer y Dragendorff (Wagner, 2001). Mientras que para fenoles se realizó con una solución de cloruro férrico al 1% (Muños, 2005). Los monoterpenos se detectaron por la prueba de vainillina-H₂SO₄ (Ortuño, 2006). Para los glucósidos se utilizó la prueba de Molisch (Díaz *et al.*, 2006). En el caso de las saponinas se realizó la prueba de la espuma (Martínez, 2001) y por último para taninos se realizaron dos pruebas una con una solución de cloruro férrico y HCl al 0.5 M (Velásquez, 2004) y otra con solución de gelatina (Anexo 1).

Fraccionamiento del extracto: cromatografía en columna

Para el fraccionamiento del extracto metanólico de *B. biflora* se utilizaron las técnicas de cromatografía en columna (CC) y de capa fina (CCF). La fase estacionaria de la CC fue sílica-gel (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck malla 70-230 ASTM), la fase móvil que se seleccionó fue hexano: acetato de etilo: metanol. Para agrupar las alícuotas en fracciones se realizaron cromatografías en capa fina de sílica gel, se observaron con luz UV (254-366 nm) y se revelaron con sulfato sérico en ácido sulfúrico concentrado, para observarse el cambio de color es necesario calentar las placas ligeramente durante algunos segundos (Avila, 2016).

Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad AOX de las fracciones del extracto metanólico de *B. biflora* que se obtuvieron a partir del fraccionamiento biodirigido se les realizó una prueba cualitativa con el radical 2,2 difenil-1picrilhidracilo (DPPH), esto ayudó a detectar las fracciones activas. Posteriormente dependiendo de la cantidad de muestra obtenida en el fraccionamiento, se les evaluó la actividad AOX cuantitativa y se determinó el contenido de FT por los siguientes métodos:

Método de DPPH

El radical DPPH en solución metanólica presenta una coloración violeta la cual se atribuye a la deslocalización de un electrón desapareado y tiene una absorbancia a 517 nm. Cuando la solución de DPPH es mezclada con un sustrato que lo reduzca, la coloración cambia de violeta a amarillo (Nur Alam *et al.*, 2013). Por lo que la actividad del antioxidante puede ser medida por espectrofotometría.

Para el método de decoloración del radical DPPH se utilizó este a una concentración de 250 µM. A partir de una solución stock de 5 mg de las fracciones disueltas en 15 mL de metanol, se prepararon las siguientes concentraciones (2-20 µg/mL;). La curva patrón se realizó con ácido gálico a concentraciones de 1 a 20 µg/mL. Como blanco se usó metanol (200 µL), como control negativo solución metanólica de DPPH (200 µL). La longitud de onda usada fue de 517 nm (Murillo, 2006). Los resultados se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción que se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

C= absorbancia del DPPH

E= absorbancia del experimental (Mezcla de DPPH + extracto)

Para determinar CA₅₀ se obtuvo el porcentaje de decoloración del DPPH y se realizó un análisis de regresión lineal.

Este ensayo se realizó por triplicado con una n=8

Determinación del contenido de FT

El método usado para determinar y cuantificar FT fue el ensayo de Folin-Ciocalteu mediante espectrofotometría con base a una reacción de óxido-reducción. Se realizó la curva patrón con ácido gálico a concentraciones de 5 a 35 µg/mL. Las muestras problema se emplearon a una concentración de 0.5 mg/mL. Estas soluciones se midieron espectrofotométricamente a 725 nm. Posteriormente se interpolaron los resultados obtenidos en la curva patrón de ácido gálico, los resultados finales se expresaron en equivalentes de ácido gálico por mg de extracto (EAG/mg) (Muñoz, 2015).

Caracterización de las fracciones activas

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

Las fracciones no polares obtenidas de la cromatografía en columna abierta (alícuota 7 y la fracción 2) fueron analizadas por CG-EM para conocer la composición química de estas. Este se realizó en un cromatógrafo Agilent Technologies modelo 6850, el cual dispone de una columna HP-5MS (Agilent Technologies) de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro y película de 0.25 µm acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies modelo HP-5MS). El tipo de inyección fue Split o manual. La cantidad de muestra utilizada fue de 3 µg que fueron solubilizados en 1 mL de metanol grado HPLC de

la cual se inyectó 1 μ L. El gradiente de temperatura abarcó un rango de temperatura inicial de 70° C hasta un máximo de 230° C.

El gas empleado como fase móvil fue helio (He). El flujo inicial de la columna fue de 1 mL/min con una presión de 64.85 Kpa (8.77 psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total del análisis fue de 20 min. La identificación de los picos del cromatograma se realizó por la comparación del espectro en la base de datos NIST MS Search 2.0 (Los criterios de probabilidad considerados para tomar en cuenta la identificación de los componentes de las muestras fueron con un match superior a 90%).

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Con el fin de conocer la composición química de los componentes responsables de la actividad AOX se utilizaron las fracciones que presentaron dicha actividad frente al radical DPPH. Las más polares se analizaron mediante HPLC. Para este análisis se utilizó un equipo Hewlett-Packard, modelo 1100 con bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos. La columna utilizada fue allsphere ODS-1 de 250 mm de largo por 4.6 mm de diámetro, tamaño de partícula de 5 μ m. A una temperatura de 23° C, con un flujo constante de 1 mL por minuto por 15 minutos y fase móvil isocrática, conformada por los siguientes eluyentes y proporciones: agua:metanol:acetonitrilo (50-25-25) y 1% de ácido ortofosfórico. El análisis de las señales detectadas en los cromatogramas se determinaron en el espectro UV a 254, 280 y 370 nm con el software Chemstation A. 09.03 y fueron comparadas con los estándares de compuestos fenólicos de la base de datos del equipo. Los análisis por HPLC y CG-EM se llevaron a cabo en el laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala bajo la supervisión del M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla y el Biól. Fernando Abiram García García.

RESULTADOS

Identificación de la planta

El material vegetal fue obtenido el 20 de septiembre del 2015 por el colector Héctor Hilario Cervantes Maya en las coordenadas 18° 12' 24.1" N, 97° 07' 43.3" O en San Rafael, Municipio Coxcatlán, Puebla. La planta fue identificada como *Bursera biflora* (Rose) Standl. El ejemplar de herbario se registró con el número 2491IZTA (Cuadro 3) (Tepec, 2017).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *B. biflora*.

Orden	Sapindales
Familia	Burseraceae
Género	<i>Bursera</i>
Especie	<i>B. biflora</i>
Nombre popular	Copal o copalillo
Número de registro	2491IZTA

*Tomado de Tepec, 2017

Obtención y rendimiento del extracto

La maceración se realizó a partir de 428.8 g de la parte aérea de *B. biflora*, se obtuvieron 19 g de extracto metanólico y el rendimiento fue de 4.5% (Tepec, 2017).

Identificación de los principales grupos de metabolito secundarios

El extracto metanólico de *B. biflora* presentó fenoles, terpenos y taninos como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Pruebas colorimétricas del extracto metanólico de *B. biflora*.

Grupo de metabolitos	Resultado
Alcaloides	-
Fenoles	+
Glucósidos	-
Saponinas	-
Terpenos	+
Taninos	+

*Positivo (+) Negativo (-)

Aislamiento: Cromatografía en columna

A partir del fraccionamiento se obtuvieron un total de 263 alícuotas, las cuales fueron reagrupadas en 49 fracciones de acuerdo al patrón que mostraba en la cromatografía en capa fina (ccf), estas fueron reveladas con luz UV, sulfato sérico y DPPH. El revelado con DPPH indicó la presencia de compuestos con actividad AOX (Cuadro 5).

De las fracciones obtenidas, 48 presentaron actividad antioxidante por el método cualitativo de DPPH, 2 compuestos fueron aislados en forma cristalina correspondientes a la alícuota 7 y 20-22. Se les realizaron pruebas para conocer el punto de fusión así como

la solubilidad en solventes orgánicos, sin embargo debido al bajo rendimiento obtenido no se continuaron con los estudios correspondientes de elucidación. La alícuota 7 fue analizada por CG-EM para conocer los componentes principales ya que presentó actividad AOX cualitativa, mientras que las fracciones que presentaron un mayor rendimiento (30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42) y presentaron actividad AOX cualitativa fueron analizadas mediante HPLC (Cuadro 5).

Cuadro 5. Fraccionamiento del extracto metanólico de *B. biflora*

Fase móvil	Alícuotas	Fracción	AOX	Rendimiento (mg)	
Hexano	1 a 5	1	Si	69.3	
	6 y 8	2	Si	528.2**	
	7		Cristales	**	
	9 a 11	3	Si	80.8	
	12 a 14	4	Si	44.5	
	8-2 Hexano- Acetato de etilo	15 - 18	5	Si	58.7
		19 - 27	6	NO	50.9
		20-22		Cristales	
		28 - 32	7	Si	21.8
		33	8	Si	10.8
34 - 37		9	Si	22.8	
7-3 Hexano-Acetato de etilo	38 - 39	10	Si	21.2	
	40	11	Si	3	
	41 - 43	12	Si	26	
	44 - 47	13	Si	22.7	
	48 - 57	14	Si	70.9	
6-4 Hexano- Acetato de etilo	58 - 61	15	Si	26	
	62 - 67	16	Si	26	
	68	17	Si	31.5	
1-1 Hexano Acetato de etilo	69 -74	18	Si	28.1	
	75 - 79	19	Si	30.4	
	80 - 88	20	Si	34.5	
	89 - 90	21	Si	34.7	
Acetato de Etilo	91 - 94	22	Si	51.4	
	95	23	Si	183	
9-1Acetato de Etilo- MeOH	96 - 97	24	Si	142.4	
	98 - 99	25	Si	166.1	
	100 - 103	26	Si	119.9	
	104	27	Si	64.7	
	105 - 106	28	Si	130.9	

	107-108	29	Si	247.4
	109 - 114	30	Si	344.6*
	115 -117	31	Si	187.1
	118 - 121	32	Si	168.9
	122- 124	33	Si	112.1
	125 - 129	34	Si	161
	130 -131	35	Si	91.9
	132 - 135	36	Si	386.8*
	136 - 144	37	Si	1282.8*
8-2 Acetato de etilo- MeOH	145 - 169	38	Si	2033.6*
	170 - 176	39	Si	736.1*
	177 - 178	40	Si	132.9
7-3 Acetato de Etilo. MeOH	179 -193	41	Si	760.5*
	194 - 200	42	Si	510.6*
	201 - 204	43	Si	180
	205 - 210	44	Si	289.7
6-4 Acetato de etilo- MeOH	211 - 220	45	Si	354.3
	221 - 239	46	Si	1462.8
	240 - 245	47	Si	212.2
1-1 Acetato de etilo - MeOH	246 - 247	48	Si	44.8
MeOH	248 - 263	49	Si	1694.9

* Fracciones seleccionadas para las pruebas de evaluación de actividad AOX frente al radical DPPH y analizadas por HPLC.

** Fracciones analizadas por CG-EM.

Actividad antioxidante

Para el análisis de la actividad antioxidante cuantitativa se utilizaron las fracciones con mayor rendimiento (Cuadro 5). A estas se les realizó el método de reducción del radical DPPH.

Los resultados de las fracciones analizadas se observan en la figura 5 y 6, estos son un promedio de una n=8. Las fracciones que presentaron mejor actividad antioxidante fueron; la fracción 39 con una $CA_{50} = 22.39 \mu\text{g/mL}$, 41= $18.45 \mu\text{g/mL}$ y 42= $18.23 \mu\text{g/mL}$ (Cuadro 6). La actividad AOX del ácido gálico fue de $2.43 \mu\text{g/mL}$.

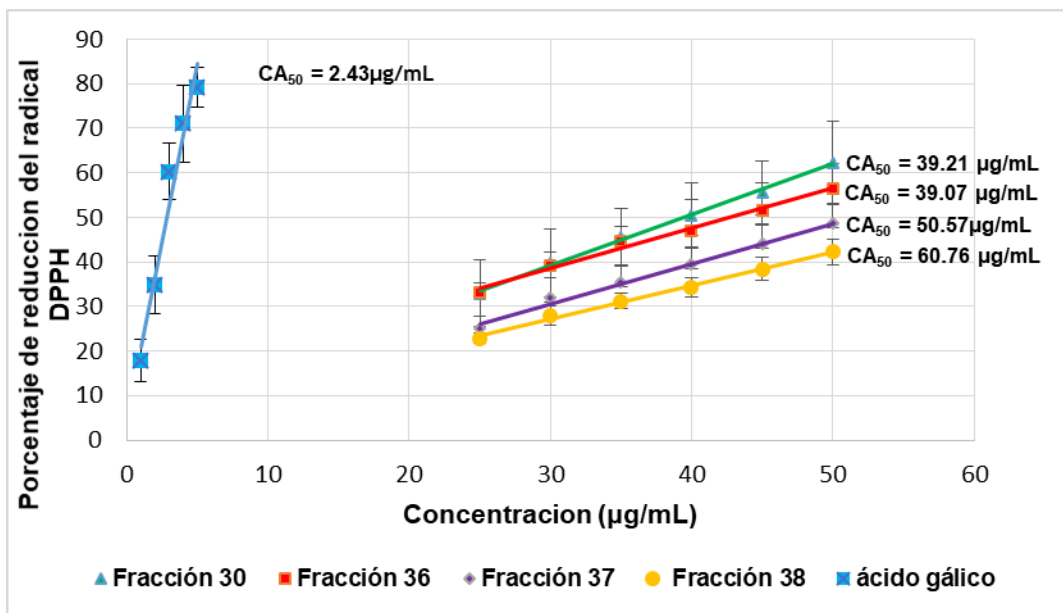


Figura 5. Actividad antioxidante de las fracciones 30, 36, 37 y 38 del extracto metanólico de *B. biflora* frente al radical DPPH.

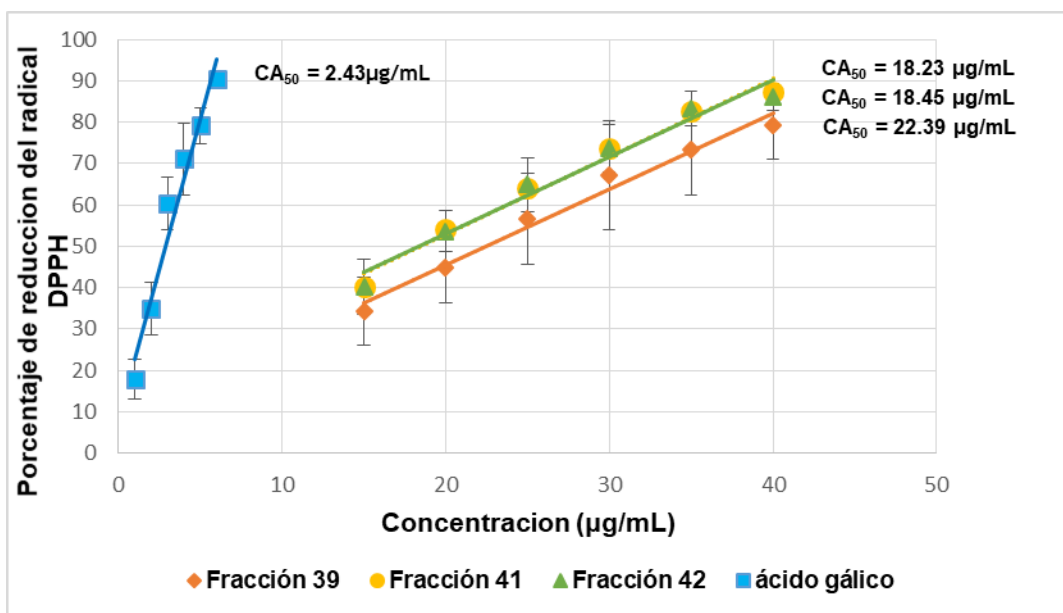


Figura 6. Actividad antioxidante de las fracciones 39, 41 y 42 del extracto metanólico de *B. biflora* frente al radical DPPH.

Cuadro 6. Actividad antioxidante media (CA₅₀) de las fracciones del extracto metanólico de *B. biflora* frente al radical DPPH

Fracción	CA ₅₀ µg/mL
30	39.21
36	39.07
37	50.38
38	58.77
39	22.39
41	18.45
42	18.23

Cuantificación de FT

Los resultados del contenido de FT de las fracciones 30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42 fueron las siguientes; 127.8, 179.2, 136.2, 112.8, 202.6, 313.3 y 348.8 µg EAG/ mg de extracto respectivamente (Figura 7).

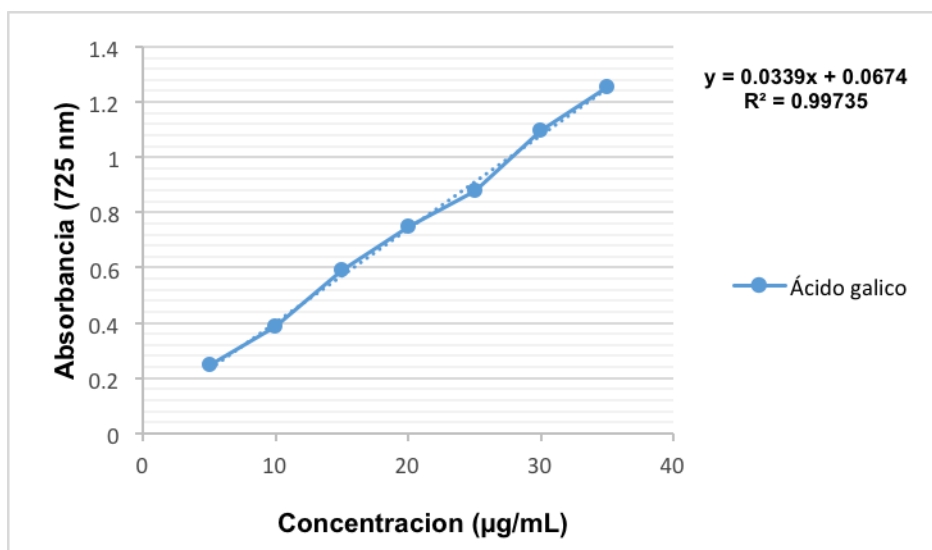


Figura 7. Curva patrón de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales de las fracciones 30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42 del extracto metanólico de *B. biflora*. (Promedio de 3 repeticiones de 2 experimentos diferentes.)

La relación proporcional entre la cantidad de FT y la capacidad antioxidante de las fracciones se puede observar en el cuadro 7, mostrando así un aumento de la capacidad AOX proporcional al incremento de FT. La fracción 39 tiene una CA₅₀ de 22.49 µg/mL mientras que de FT presenta 202.6 µg EAG/mg de extracto, para la fracción 41 ocurre lo mismo la CA₅₀=18.45 µg/mL mientras que FT= 313.3 µg EAG/mg de extracto. Finalmente

la fracción 42 tiene una CA_{50} de 18.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un contenido de FT de 348.8 μg EAG/mg de extracto.

Cuadro 7. Comparación de la actividad AOX de las fracciones frente al radical DPPH y su contenido de FT.

Fracción	AOX (DPPH)($\mu\text{g}/\text{mL}$)	FT (μg EAG/mg de extracto)
30	39.21	127.8
36	39.07	179.2
37	50.38	136.2
38	58.77	112.8
39	22.49	202.6
41	18.45	313.3
42	18.23	348.8

Análisis por CG-EM de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de *B. biflora*

Debido a la apariencia aceitosa de las muestras de la alícuota 7 y la fracción 2 se les realizó una CG-EM para conocer la composición química de las muestras con el fin de conocer el perfil de compuestos de baja polaridad.

En el cuadro 8 podemos observar la composición química de la alícuota 7 esta tiene como constituyentes mayoritarios al ácido hexadecanóico (22.39%), ácido, 9-octadecenóico (E) (20.48%) y ácido octadecanóico (12.95%).

Cuadro 8. Composición química de la alícuota 7 del extracto metanólico de *B. biflora* analizada por CG-EM.

RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
15.051	Ácido Hexadecanóico	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	22.39
16.245	Ácido, 9-Octadecenóico (E)	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	20.48
16.354	Ácido octadecanóico	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	12.95

RT= Tiempo de retención

De la misma manera en el cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis de la fracción 2. Este reveló 19 compuestos principales. La muestra está constituida

principalmente de ácidos grasos insaturados como: 2,4-decadienal E.E (12.56%), 2-undecenal (11.63%), ácido oleico (10.66%), ácido octadecanóico (4.59%), y ácido-n-hexadecanóico (3.66%).

Cuadro 9. Composición química de la fracción 2 del extracto metanólico de *B. biflora* analizada por CG-EM.

RT (min)	Nombre	Fórmula condensada	Abundancia (%)
3.580	2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	1.18
5.954	2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	1.94
7.045	2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	4.00
7.410	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	4.99
7.712	2,4-Decadienal E.E	C ₁₀ H ₁₆ O	12.56
8.610	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	11.63
9.355	Dodecanal	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CHO	0.70
9.618	2,4-Dodecadienal (E,E)	C ₁₀ H ₁₆ O	0.68
11.978	2-Tetradecenal	C ₁₄ H ₂₆ O	0.42
12.575	8-Heptadeceno	C ₁₇ H ₃₄	0.64
12.973	Tetradecenal	C ₁₄ H ₂₈ O	0.41
13.678	cis-9-Hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O	0.42
14.487	9-Octadecenal (Z)	C ₁₈ H ₃₄ O	0.67
14.737	Ácido Hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	3.66
16.251	Ácido Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	10.66
16.360	Ácido octadecanóico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	4.59
17.226	Ácido 9,12-Octadecadienóico (Z,Z)	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	1.75
17.399	Ácido trans-13-Octadecenóico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0.81
21.018	Ácido Tetracosanóico	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	0.50

RT= Tiempo de retención

Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En el análisis por HPLC-DAD de las fracciones (30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42) se observan en los cromatogramas de 3 y 6 picos a una longitud de onda de 280 nm (Figuras 8-14).

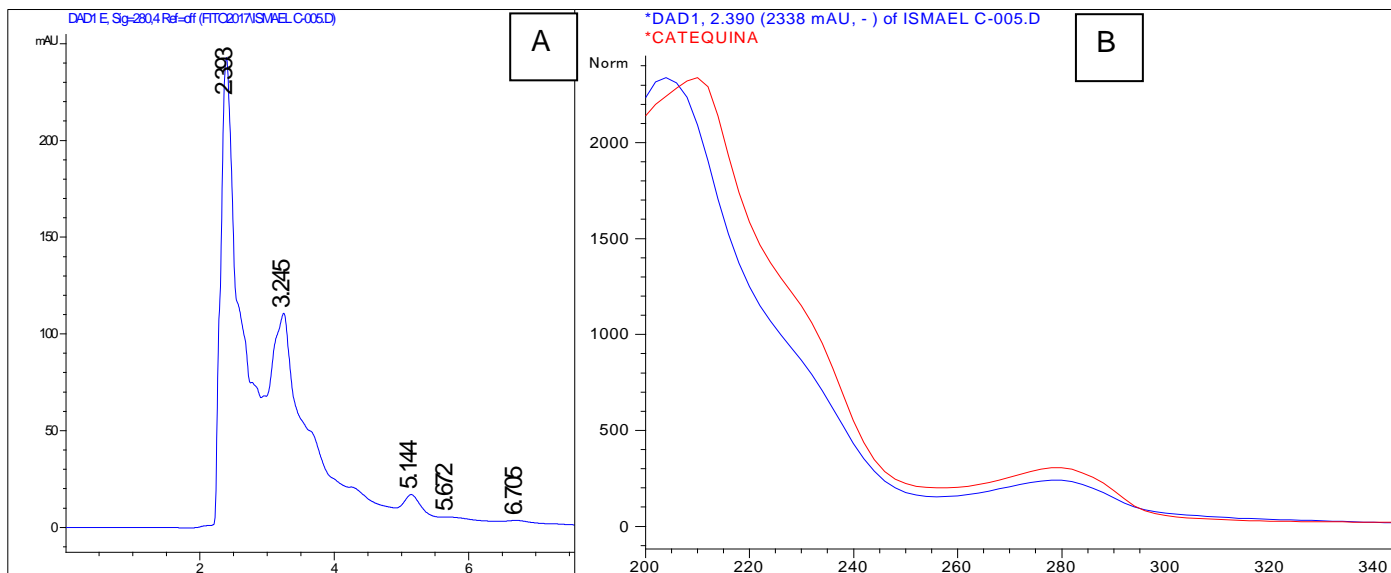


Figura 8.- A) Cromatograma de la fracción 30 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.393) de la fracción 30.

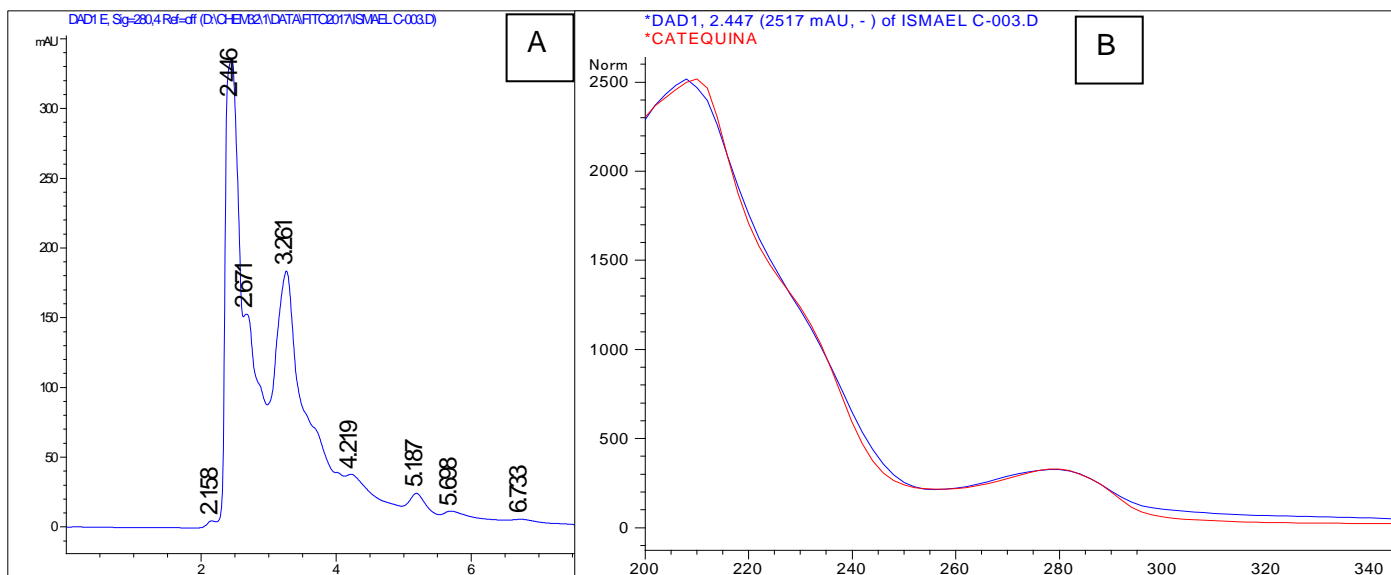


Figura 9.- A) Cromatograma de la fracción 36 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.446) de la fracción 36.

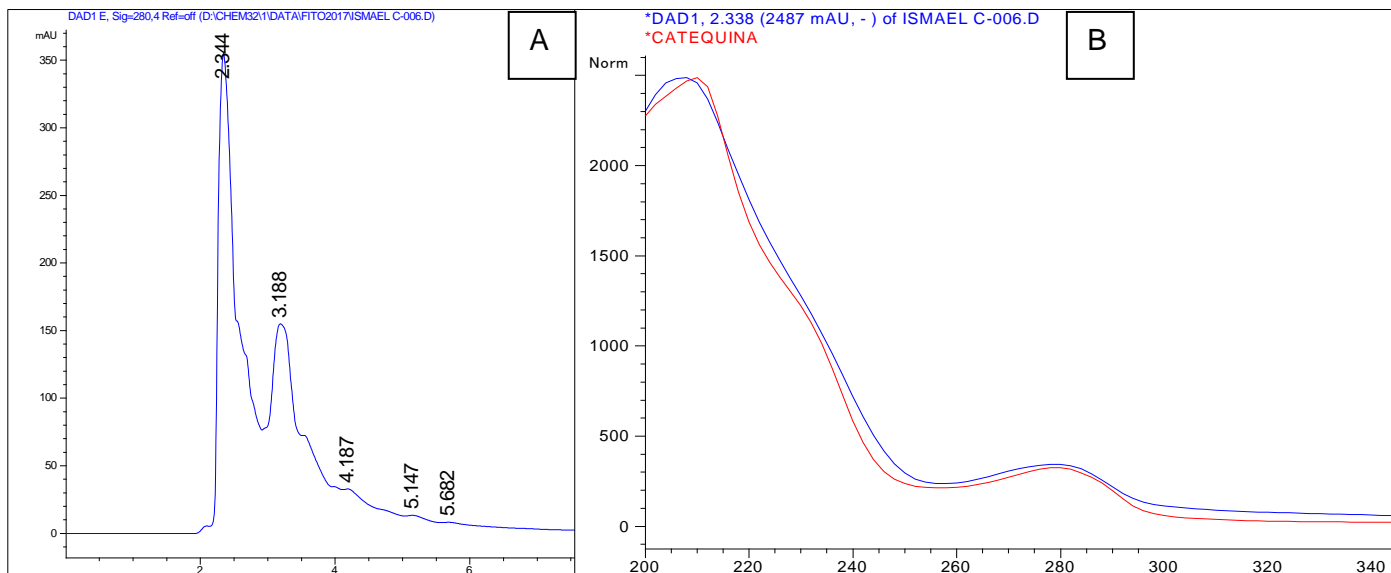


Figura 10.- A) Cromatograma de la fracción 37 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.344) de la fracción 37.

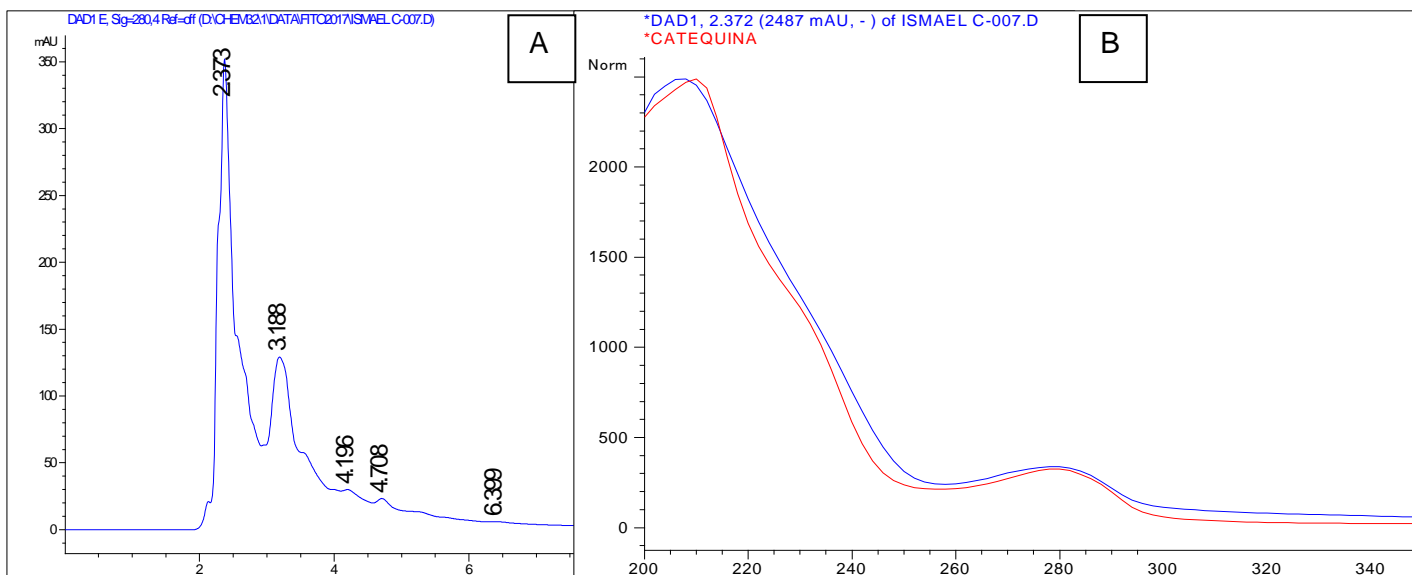


Figura 11.- A) Cromatograma de la fracción 38 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.373) de la fracción 38.

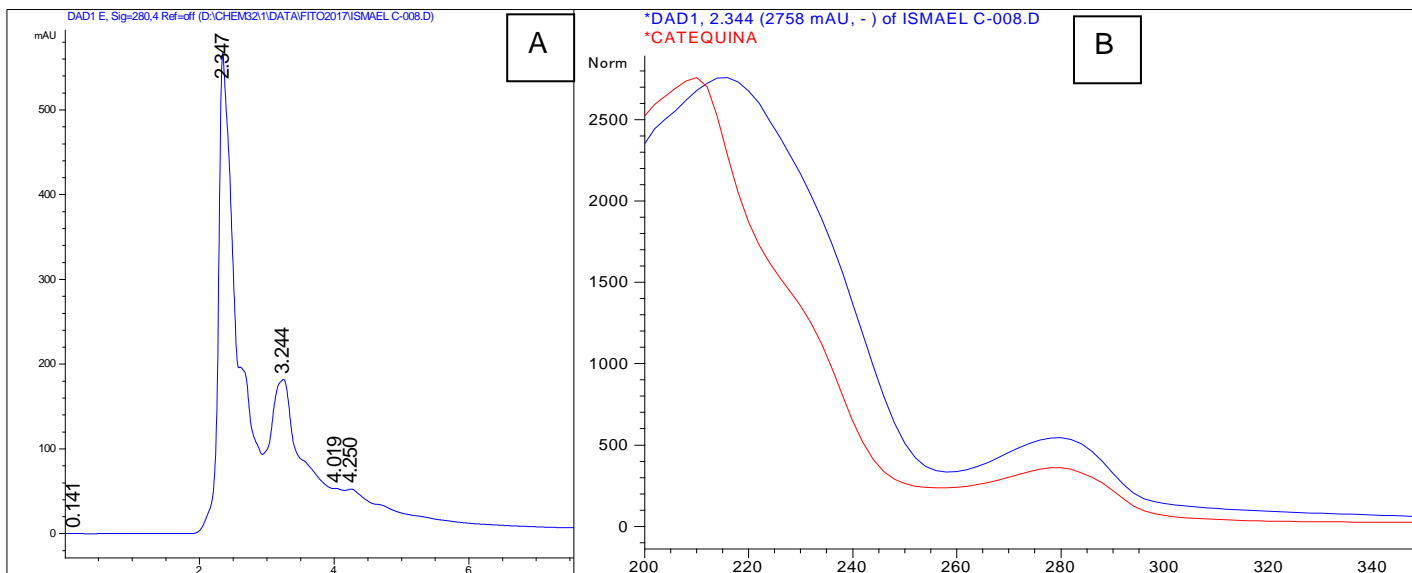


Figura 12.- A) Cromatograma de la fracción 39 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.347) de la fracción 39.

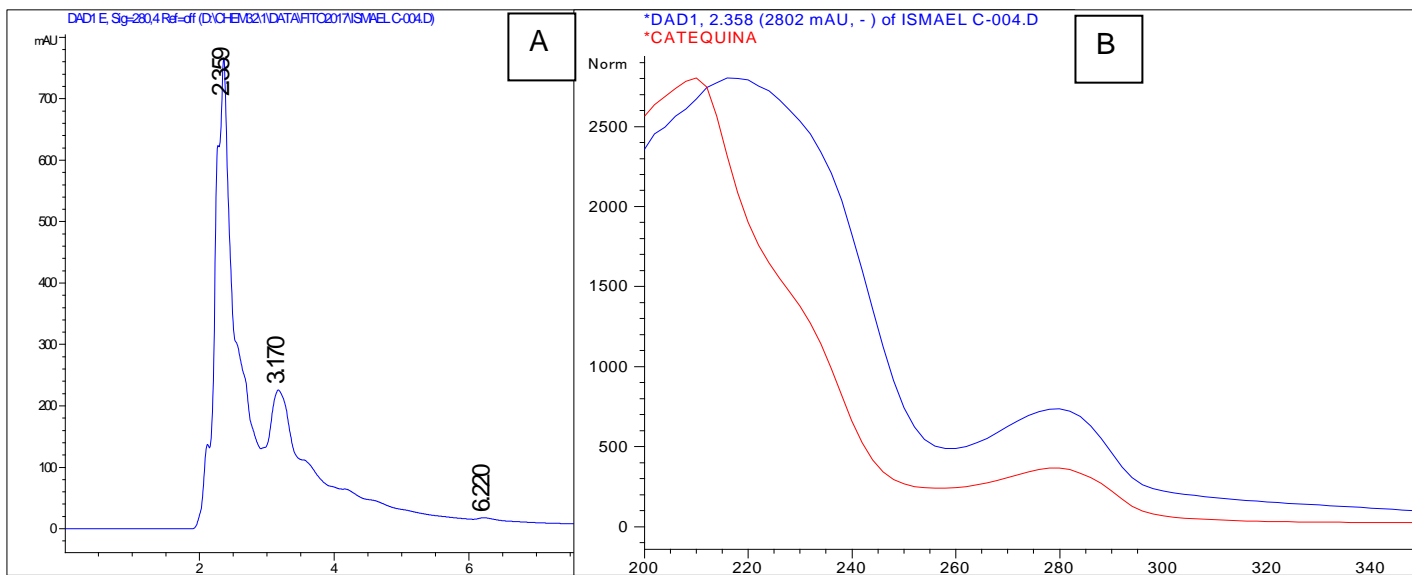


Figura 13.- A) Cromatograma de la fracción 41 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.359) de la fracción 41.

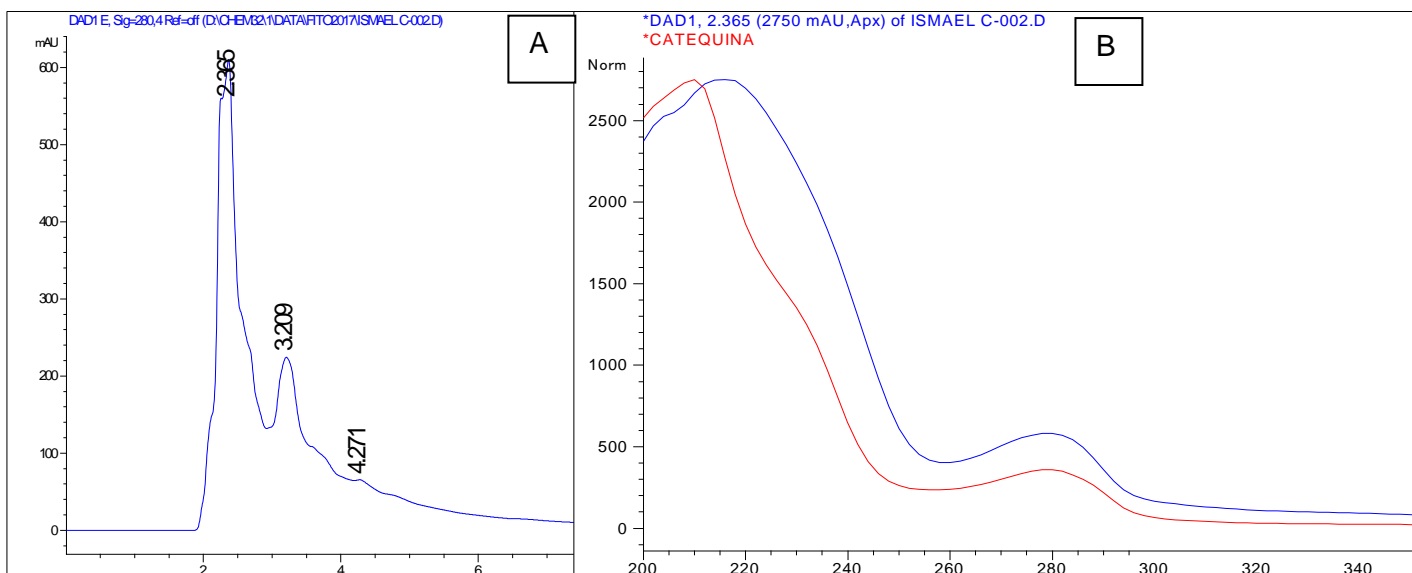


Figura 14.- A) Cromatograma de la fracción 42 del extracto metanólico de *B. biflora*. B) Pico máximo de absorción del pico principal (TR: 2.365) de la fracción 42.

Las fracciones con el menor número de constituyentes analizados en una longitud de onda de 280 nm fueron la 41 y 42, cada una presentando tres compuestos mientras que las que presentaron mayor diversidad de compuestos fueron las fracciones 36 y 38 con 6 compuestos para cada una (Cuadro 10).

Cuadro 10. Tiempos de retención (min) de los constituyentes químicos de las fracciones analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ($\lambda=280\text{nm}$).

No. Constituyentes	Fracción						
	F30	F36	F37	F38	F39	F41	F42
1	2.395	2.446	2.344	2.373	2.347	2.359	2.365
2	3.239	2.671	3.188	3.188	3.244	3.17	3.208
3	5.144	3.261	4.187	4.196	4.019	6.22	4.271
4	5.678	4.219	5.147	4.708	4.25		
5	6.702	5.187	5.682	6.399			
6		5.698		9.041			

La comparación de los patrones de absorción en UV de los compuestos de cada fracción con los compuestos de la base de datos del equipo permitió determinar que las fracciones contienen catequina o compuestos derivados de la misma entre sus constituyentes (Figuras 8-14).

DISCUSIÓN

Rendimiento del extracto

El extracto metanólico de *B. biflora* presentó un rendimiento de 4.5%. Comparando este resultado con otros estudios realizados de especies del mismo género, indica que es menor a lo reportado para *B. arida* 18.54%, *B. morelensis* 19.66% (Rodríguez, 2014), 10.28% (Serrano 2012); sin embargo este resultado es mayor a lo reportado para *B. aptera* 2.37% (Rodríguez, 2014).

La variación de la producción de MS entre especies podría deberse a diferencias en los factores bióticos y abióticos a las que las plantas están expuestas y como resultado dan una respuesta en la defensa química contra el daño que pudieran ocasionar o el ataque de microorganismos patógenos, por lo que se induce la síntesis de compuestos de bajo peso molecular, los cuales tienden a ser acumulados en diferentes concentraciones y zonas de la planta. También otra posible explicación es que se deba a la cantidad de la planta utilizada en el proceso de maceración (Sepúlveda, 2003).

Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios

El extracto metanólico de *B. biflora* presentó fenoles, terpenos y taninos (Cuadro 5). Los MS son compuestos derivados del metabolismo primario pero de limitada distribución en las plantas, se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, pertenecen a un grupo taxonómico particular estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Avalos *et al.*, 2009).

La familia Burseraceae contiene canales resiníferos que están en la mayoría de las especies y muchas de ellas transportan compuestos que tienen efecto antiherbivoría y repelentes que se componen principalmente de terpenos. La resina, el tallo y hojas son una fuente de aceites esenciales, esteroides, terpenos, lignanos y otros tipos de compuestos (Llanos, 2010).

La prueba cualitativa realizada al extracto metanólico de *B. biflora* indica la presencia de terpenos. Autores como Barreto (2009) también reporta la presencia de estos últimos ya que las resinas de las especies de Burseraceae son ricas en estos compuestos, lo cual ha

conducido principalmente al aislamiento e identificación de terpenoides, donde los mono y los triterpenos predominan.

Los fenoles son compuestos aromáticos formados por un anillo bencénico el cual tiene unido, por lo menos un grupo hidroxilo. Por regla general, estos poseen varios sustituyentes y en ocasiones el OH se encuentra modificado. Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos fenólicos ya que están implicados en las interacciones planta-herbívoro y en la defensa contra daños que pudieran generar (Pérez, 2003).

La prueba cualitativa realizada en el extracto metanólico de *B. biflora* indica la presencia de dichos metabolitos. Esto también lo reporta Tepec (2017), este autor encontró compuestos fenólicos en *B. biflora*. Algunos otros autores como Serrano *et al.* (2012) y Bah *et al.* (2014) reportaron la presencia de compuestos fenólicos en el extracto metanólico de *B. morelensis*, en particular fenilpropanoides y flavonoides.

Los taninos hidrolizables son sustancias fenólicas resultado de la combinación de una molécula de azúcar, generalmente glucosa, con un número variable de moléculas de ácidos fenólicos, ácido gálico o su dímero, el ácido elágico. Estos tienen la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y esteroides. Cuentan con efectos benéficos para la salud debido a que poseen propiedades astringentes, antiinflamatorias, cicatrizantes, antioxidantes y antibacterianas (Avalos *et al.*, 2009).

Las pruebas cualitativas realizadas en el extracto metanólico de *B. biflora* indica la presencia de taninos, esto es similar a lo reportado por Serrano (2013) este autor encontró estos compuestos en el extracto metanólico de la corteza de *B. morelensis*, menciona que estos MS son un grupo de compuestos presentes en abundancia en las cortezas vegetales.

Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales

Los resultados de la actividad AOX indican que las fracciones que presentaron una mejor capacidad para reducir el radical DPPH son; 41 con una $CA_{50} = 18.45 \mu\text{g/mL}$ y 42 con $18.23 \mu\text{g/mL}$. Lo cual indica que los componentes presentes en las fracciones son buenos

AOX, esto según lo reportado por la FDA (Food and Drugs Administration USA) la cual menciona que se consideran buenos AOX aquellos que estén por debajo de los 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gardziella *et al.*, 2000).

Comparando los resultados de la actividad AOX de las fracciones antes mencionadas con la AOX del extracto crudo de *B. biflora* reportado por Tepec en 2017 con un $\text{CA}_{50} = 20.44$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente al radical DPPH, indica que las fracciones por separado presentan una mejor actividad AOX en comparación con el extracto completo. Este resultado se puede deber a que en comparación con el extracto completo (mezcla de compuestos) en el que no todos los compuestos son AOX al presentarse una menor cantidad de constituyentes pueden actuar de manera más directa y reaccionar con mayor facilidad con los RL (Jiménez, 2011).

Otra posible explicación de que las fracciones presenten una mejor actividad AOX en comparación con el extracto completo es la concentración de fenoles. El extracto metanólico completo de *B. biflora* presentó 136.22 μg EAG/mg de extracto (Tepec, 2017), mientras que la fracción 41= 313.2 y la fracción 42 tiene 348.8 μg EAG/mg de extracto. Esto indica que existe una mayor concentración de compuestos fenólicos en las fracciones analizadas.

Otro punto importante es que conforme aumenta la polaridad del solvente también aumenta el contenido de FT de las fracciones obtenidas. Esta diferencia de concentración indica que el porcentaje de reducción del DPPH aumenta conforme se incrementa la concentración de FT, ya que como es sabido que a mayor contenido de grupos fenólicos existe una mayor capacidad AOX (Jiménez, 2011). Esto concuerda con lo reportado por Serrano y cols. (2012) los cuales también atribuyen la actividad AOX ($\text{CA}_{50} = 3.05$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) del extracto metanólico de *B. morelensis* al contenido de FT (50.5%).

Dentro del género *Bursera* es conocida la riqueza y diversidad de compuestos fenólicos particularmente los fenilpropanoides y flavonoides (Serrano *et al.*, 2012 y Bah *et al.*, 2014). Metabolitos que se han demostrado presentar actividad AOX en especies como *B. bullockia*, *B. simaruba*, *B. bippinata* y *B. morelensis* (Arriaga, 2011). Sosa (2004), Rodríguez (2014) y Bah y cols (2014) reportaron la presencia de una gran cantidad de

compuestos fenólicos AOX entre los cuales se encuentran flavonoides y taninos en *B. simaruba* y *B. aptera*.

Caracterización de las fracciones activas

De los resultados obtenidos de CG-EM los compuestos que se presentaron en las fracciones estudiadas (fracción 2 y la alícuota 7) tienen como compuestos principales ácidos grasos insaturados como el ácido hexadecanóico y ácido oleico, los cuales se presentan de manera general en la mayoría de las plantas superiores ya que este último es un ácido graso esencial (Orge *et al.*, 2011). Estos compuestos son los que más comúnmente se encuentran en plantas y animales entre ellos están ácido palmítico, oleico, linoléico y ácidos esteáricos (Cruz, 2005).

Los ácidos grasos insaturados en estado libre se presentan en muy bajas cantidades, ya que en su mayoría se encuentran formando parte de la estructura de otros lípidos, estos pueden ser utilizados como compuestos AOX debido a que protegen a las células de la peroxidación lipídica (Neuza *et al.*, 2011).

La peroxidación lipídica es probablemente la reacción mediada por RL más estudiada. Los lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación debido a que sus hidrógenos bis-alílicos son fácilmente “extraíbles” comparados con los hidrógenos alifáticos, lo que provoca un radical centrado en el carbono, el cual después sufre un rearrreglo molecular. Posteriormente entra el O₂ y con esto se forma el lipoperóxido ocasionando que sea más reactivo. Una vez iniciado el proceso, éste continúa como una reacción en cadena, y puede volver a realizar la abstracción de otro átomo de hidrógeno del lípido de la membrana adyacente involucrando las etapas de propagación, ramificación y terminación. De esta manera, cualquier especie oxidante cuyo potencial de reducción se encuentra por encima puede dar inicio a la peroxidación (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Se ha reportado la presencia de ácidos grasos en el extracto metanólico de *B. simaruba* como 2,4-Decadienal E.E y 2-Undecenal, los cuales han sido reportados con actividad AOX de acuerdo a estudios realizados por Bah y cols. en 2014.

Todo esto nos sugiere que los ácidos grasos insaturados obtenidos en la fracción de baja polaridad (fracción 2 y cristales obtenidos de la alícuota 7) del extracto metanólico de *B.*

biflora también tiene actividad AOX, esto corroborado con las pruebas cualitativas de actividad AOX que dieron positivo (Cuadro 5).

Respecto a los resultados de HPLC de las fracciones que fueron analizadas (fracciones 30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42), la comparación de los patrones de absorción en UV de los compuestos con la base de datos identificó la presencia de un compuesto fenólico (flavonoide) como constituyente mayoritario, lo cual indica que las fracciones contienen catequina o compuestos derivados de la misma entre sus constituyentes.

La catequina es un flavonoide el cual tiene actividad AOX debido a la combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras RL, además de la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), el NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO) evitando la generación de ER del oxígeno, así como de hidroperóxidos orgánicos. De esta manera la catequina interfiere en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical (Pérez, 2003).

La presencia de este compuesto (catequina) en el extracto metanólico de *B. biflora*, también ha sido reportado por Castro (1999) el cual lo identificó como epicatequina (estereoisómero de la catequina) en el extracto acetónico de *B. simaruba*, este inhibe la oxidación de lipoproteínas y previene la generación de ERO (Sotelo, 2015).

Los resultados del presente trabajo contribuyen al conocimiento fitoquímico de *B. biflora* debido a que los taninos no habían sido reportados previamente en esta especie, solo se había reportado en otras especies del género tal es el caso de *B. morelesis* (Bah *et al.*, 2014). Se logró la identificación de compuestos fenólicos tipo catequina, la cual presentó actividad AOX, esta no había sido reportada para el género *Bursera*.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *B. biflora* presentó fenoles, terpenos y taninos en las pruebas cualitativas.
- Del fraccionamiento del extracto metanólico de *B. biflora* 263 alícuotas fueron agrupadas en 49 fracciones, de estas 48 tienen actividad AOX cualitativa.
- Las fracciones 41 y 42 fueron las que presentaron la mayor actividad AOX con una CA_{50} de 18.45 y 18.23 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.
- El mayor contenido de FT lo presentaron las fracciones 41 y 42 con 313.3 y 348.8 $\mu\text{g EAG/g}$ de extracto respectivamente.
- La actividad AOX de *B. biflora* está dada por la presencia de ácidos grasos insaturados y compuestos fenólicos que probablemente son derivados de la catequina.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, S. R. y R. García. 2004. Catálogo de plantas reportadas como parte de la dieta de la guacamaya verde (*Ara militaris*) en la región de la cañada oaxaqueña. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, México. 44 p.
- Arango A. G. J. 2008. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia, 84 p.
- Arriaga, W. E. P. 2011. Evaluación del potencial antioxidante de extractos de especies de *Bursera*, *Matricaria* y *Cymbopogon* mediante técnicas electroquímicas. Tesis de Licenciatura, Ingeniería Química en Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 3,4 6-8 pp.
- Avalos, G. A. Pérez-Urrutia, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I. Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. 120-126 pp
- Avila, R.M. 2016. Efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del Sistema Arrecifal Veracruzano. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 91 p.
- Bah, M., D. M. Gutierréz-Avella, S. Mendoza, V. Rodríguez-López y R. Castañeda-Moreno. 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(6): 527-536.
- Barreto, J.J.J 2009. Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las Fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta *Bursera tomentosa* (jacq) Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias. Universidad Javeriana. Bogotá. 56-86 pp.
- Blainski, A., G. C. López y J. C. de M. Palazzo. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of total phenolic content from *Limonium brasiliense*, *L. Molecules*, 18: 6852-6865.
- Calderón G, E. 1999. Químio-taxonomía vegetal (conferencia dictada en el Instituto de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 1(2): 137-149.

- Campos S, L. M. 2006. *Estudio fitoquímico de la resina de Bursera simaruba (Palo Mulato)*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. México. 44p.
- Canales, M.M, Hernández, D. T, Caballero N. j, Romo, V. R., Durán, D.A, Lira, S.R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botanica Mexicana*, 75: 21-43.
- Canales, M. Nieto-Yañez, O. J., Resendiz-Albor, A. A., Ruiz-Hurtado, P. A., Rivera-Yañez, N., Rodríguez-Sosa, M Rodríguez-Monroy, M. A. 2017. *In vivo* and *in vitro* antileishmanial effects of methanolic extract from bark of *Bursera aptera*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2): 188.
- Casas, A., A. Valiente-Banuet, J. L. Viveros, J. Caballero, L. Cortés, P. Dávila, R. Lira y I. Rodríguez-Arévalo. 2001. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlán Valley, México. *Economic Ethnobotany*, 55: 129-166.
- Castro, O. 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3) 35-36.
- Constanza, C.L. Muños, A.M.M. 2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18):135-250.
- Cruz, M.Y.R. 2016. Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos provenientes de los frutos secos de *Acacia farnesiana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 15 p.
- Dávila, A. P. y R. S., Lira. 2002. La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán Salinas, Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. T015. México D. F.
- Dávila, P., J. L., Villaseñor, R. Medina, A. Salinas, J. Sánchez-Kén y P. Tenorio. 1993. Listados florísticos de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México 8 p.
- Díaz, N. A., J. V. Jorrín-Novo, J. A. Bárcena-Ruíz. 2006. Manual de prácticas de reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares.

- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba, Córdoba, España. 9 p.
- Dorado, M.C. Rugerio, V.C. Rivas, A.S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración *Revista Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.* 46(6):229-230.
- Gardziella, A., L. A., Pilato y Knop. 2000. Phenolic Resins. 2da. Edición. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. Alemania. 560 p.
- Halliwell, B. y J. M. C., Gutteridge. 2007. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. 4° edición. E.U.A. 851 p.
- Jiménez, A. M. Román, C. N. García, I. 2011. Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto hexánico y compuestos puros del rizoma de *Aristolochia taliscana*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42 (3):35-41.
- Llanos, A.L, Salinas D.O, Sánchez, M.E, Estrada. V, Gutiérrez O. M, Valladares, C. M.G. 2010. Evaluación bioinsecticida de extractos de *Bursera copallifera* (d.c.) bullock y *Bursera grandifolia* (schltdl.) engl. en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* j.e. smith (lepidoptera: noctuidae) *Revista Mexicana de Botánica*, 29(7):149-158.
- Manzano S, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T. y Orellana, A. 2009. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana y Planch. (Palo santo) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3):45-53.
- Martínez, V.J. B. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *heliocarpus terebinthinaceus*. Tesis Ingeniero de Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León. 4-12 pp.
- Martínez, A. M. 2001. Saponinas esteroides. Universidad de Antioquia. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf> Fecha de consulta: Septiembre, 2016.
- Maffei, M. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76 (4): 612-631
- Medina, J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 48 p.

- Medina-Lemos, R. 2008. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 66. BURSERACEAE. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 82 p.
- Muñoz, C. D. S. 2015. *Larrea tridentata* de dos zonas áridas de México: Análisis fitoquímico y evaluación antioxidante. Tesis de Licenciatura de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 89 p.
- Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante *in vitro* de las bebidas de frutas. *Revista Tecnológica Alfa Editores Técnicos*. 27 pp.
- Neuza, J. 2011. Actividad antioxidante y perfil de ácidos grasos de las semillas de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* BERG). *Acta Biológica Colombiana*, 16 (2): 75-82.
- Nolasco, O. E. 2014. Análisis de la variación temporal de los principales metabolitos secundarios presentes en *Bursera morelensis* (Ramirez) Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 79 p.
- Nur Alam Md., Nusrat, J.B. y Rafiquzzaman Md. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudí Pharmaceutical Journal* 21:143-152.
- Ortuño S. M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. AIYANA. España. 277 p.
- Peraza, S. R., Salazar N.E. y Peña, L.M. 2005. A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 58: 271-274.
- Pérez, T. G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1): 48-57
- Ramos L. E., Castañeda C. B., Ibáñez V. L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista de la Academia Peruana de Salud*, 15(1): 42-46.
- Rivero R. A. y Betancort R. J. 2006. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. Facultad de Ciencias del Mar. Instituto Tecnológico de Canarias. España. 10 p.
- Robledo, S. Bocalón, J. Giacomelli, L. Ceballos, C. Mattea M. 2007. Estudios de la influencia de antioxidantes en aceites vegetales durante la oxidación térmica

- forzada Departamento de Tecnología Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Río Cuarto. 75-94 pp.
- Robles, J. Torrenegra, R. Gray, A. I. Piñeros, C. Ortiz, L. Sierra, M. 2005. Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4):283-286.
- Rodríguez Perón, José Miguel, Menéndez López, José Rogelio, y Trujillo López, Yoel. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1):15-20.
- Rodríguez, L. M. G. 2014. Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de *Bursera aptera* (Ramírez). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 92 p.
- Rzedowski, J. y G. de R. Calderón. 2006. Dos especies nuevas de *Bursera* (Burseraceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, 74: 169-178.
- Sánchez-Valle .V, Méndez-Sánchez. N. 2013 Estrés oxidativo, antioxidante y enfermedad *Revista de Investigación Médica Sur, México*. 20(3):161-168.
- Sepúlveda, J. G., D.H. Porta y S. M., Rocha. 2003. La partición de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):355-363.
- Serrano, P. R. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* (Ramírez) (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 121 p.
- Serrano, R. P., B. C. Vázquez, D. C. Segura, A. L. L. Anaya, M. Jiménez-Estrada y M. M. Canales. 2012. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlan, Puebla (México): *Implications of cutaneous wound healing. Journal of Medical Plants Research*, 6(44): 5609-5615.
- Sosa R. E., Pérez R. D., Ortega R, L., y Zapata B. G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnica Pecuaria en México*, 42 (2):129-144.
- Sotelo, L., Alvis, A., y Arrázola, G. 2017. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1):124-134.

- Tepec, T.K. 2017. Efecto antioxidante de *Bursera biflora* (rose) standl. (Burseraceae) Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 47 p.
- Velásquez Valderrama, Á. 2004. Extracción de taninos presentes en el banano verde. *Revista Lasallista de Investigación*, 1 (2):17-22.
- Venereo G., J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2):126-133.
- Wagner, H. 2001. Plant drug analysis. Second Edition. Springer. Alemania. 15-29 pp.

ANEXOS

Anexo 1.- Reacciones colorimétricas para la determinación de metabolitos secundarios

Reacción para alcaloides (Dragendorff y Mayer)

La técnica de reconocimiento está basada en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal de combinarse con el yodo y metales pesados como el bismuto, mercurio, tungsteno formando así un precipitado.

La reacción de Mayer utiliza bicloruro de mercurio y yoduro de potasio, el positivo es un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol (Arango, 2008).

Procedimiento:

Diluir 1.3 g de HgCl_2 en 60mL de agua, agregar 5 g de KI y aforar a 100 mL

- 1) Diluir los extractos en los solventes en los que se maceraron (1mg/mL).
- 2) Agregar gotas de reactivo resbalando por las paredes del tubo.
- 3) La reacción es positiva si se observa un precipitado blanco-crema.

La reacción de Dragendorff ocupa el tetrayodo bismuto de potasio, donde la presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides. Esta reacción puede dar falsos positivos con algunas sustancias oxigenadas con alta densidad electrónica como las cumarinas, chalconas, acetogeninas, entre otras (Arango, 2008).

Procedimiento:

Preparar una solución con 8 g de nitrato de Bi $(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 al 30% con una solución de 27 g de KI en 50mL de agua.

- 1) Diluye los extractos (1mg/mL) en los solventes de la maceración.
- 2) Agrega gotas del reactivo resbalando por las paredes del tubo y se deja reposar.
- 3) La reacción se considera positiva si se observa un precipitado naranja-rojizo.

Reacción de cloruro férrico para fenoles

Los fenoles sencillos se caracterizan por su solubilidad en medios alcalinos y su insolubilidad en bicarbonato sódico, la mayor parte de los fenoles dan compuestos fuertemente coloreados con las sales férricas (Figura 11). La coloración con el cloruro férrico ayuda a determinar la estructura, la pirocatequina y otros o-hidroxiderivados del benceno dan coloraciones verdes (Muñoz, 2015).

Procedimiento:

- 1) Se diluyen los extractos (1mg/mL) en los solventes donde se destilaron.
- 2) Se agrega gotas de cloruro férrico diluido.
- 3) La reacción es positiva si se obtiene una coloración roja, púrpura, azul y verde.

Reacción de Molisch para glucósidos

El ensayo de Molisch permite detectar la presencia de carbohidratos en una muestra, en base a la acción hidrolizante y deshidratante que ejerce el ácido sulfúrico sobre dichos compuestos. Los ácidos originan deshidratación de los azúcares para rendir furfurales (derivados aldehídicos del furano). Los furfurales se condensan con los fenoles dando como productos derivados coloreados característicos (dando como resultados derivados de color púrpura), empleados frecuentemente en el análisis colorimétrico. A pesar de que es una prueba dirigida a monosacáridos, algunos poli y oligosacáridos también dan positivo, por el medio ácido y la hidrólisis del enlace glucosídico (Díaz *et al.*, 2006).

Procedimiento

- 1) En tubos de ensayo se diluye 1 mg de cada uno de los extractos, en 1 mL de metanol.
- 2) Se agrega reactivo de Molisch (Mezclar α -naftol al 5% y etanol)
- 3) Añade gotas de H_2SO_4 concentrado, por las paredes del tubo.
- 4) Si es positivo se separará un anillo de color morado o violeta del H_2SO_4

Reacción para saponinas (ensayo de espuma)

Las saponinas se originan por la ruta de la acetil Co-enzima, vía ácido mevalónico y escualeno. Las saponinas esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares mediante el ensayo de espuma (Martínez, 2001).

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existe otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides (Martínez, 2001).

Ensayo de vainillina-H₂SO₄ para terpenos

Los terpenos son productos naturales que se encuentran en las plantas, son unidades de isopreno. Estos compuestos existen en variedad de tipos estructurales

La cromatografía en capa fina se utiliza para detectar las manchas de terpenos sobre la placa del cromatograma, ya que si la sustancia es incolora no se verá a simple vista. Otra forma de detectar e identificar manchas es mediante el uso de reveladores, o sustancias pulverizadas sobre la placa cromatográfica, de esta manera se origina una coloración específica sobre alguna de las manchas, debido a que el revelador es una sustancia química que reacciona específicamente con algunos componentes, originando un color visible característico. El reactivo de Gibbs, el ácido sulfúrico y la vainillina son algunas sustancias que se pueden emplear como reveladores de monoterpenos (Ortuño, 2006).

Procedimiento

- 1) En tubos de ensayo se diluye 1 mg de cada uno de los extractos, en 1 mL de metanol.
- 2) En una cromatografía de capa fina se agregan una muestra del extracto con un capilar.
- 3) Agregar los reactivos del ácido sulfúrico y la vainillina. Después se revela con ayuda de una parrilla caliente.

Anexo 3.- Método DPPH

En la actualidad existen diversas metodologías para medir la capacidad AOX, los cuales se basan en la capacidad de reducir RL presentes en el medio. Uno de los métodos más usados es el método de DPPH. El 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es un radical estable que presenta una coloración azul violeta en solución metanólica, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida en espectrofotómetro a 517 nm (Ramos *et al.*, 2008).

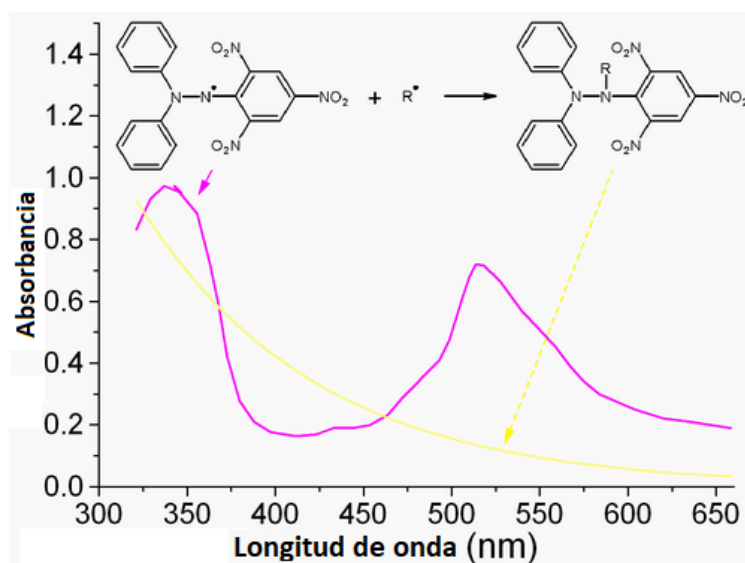


Figura 15- Curva de absorción del radical DPPH en su estado de radical libre (morado) y el no radical (amarillo). Fuente: Ramos *et al.*, 2008

En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible AOX, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en la reducción del DPPH debida a la donación de electrones de la especie AOX (Rivero y Betancort, 2006).

La determinación de la concentración antioxidante media (CA_{50}) con este método se llevó a cabo de la siguiente manera: en una placa de 96 pozos se adicionaron 50 μ L de muestra de las fracciones, a diferentes concentraciones ($M=2-20$ μ g/mL;), posteriormente se adicionaron 150 μ L de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 250 μ M.

Dicha placa fue incubada en la oscuridad por 30 minutos, para después determinar su absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA. Como referencia se utilizó ácido gálico, como control negativo se usaron 200 μ L de metanol. La actividad AOX sobre el DPPH se expresó como porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

C= absorbancia del DPPH

E= absorbancia del experimental (Mezcla de DPPH + extracto)

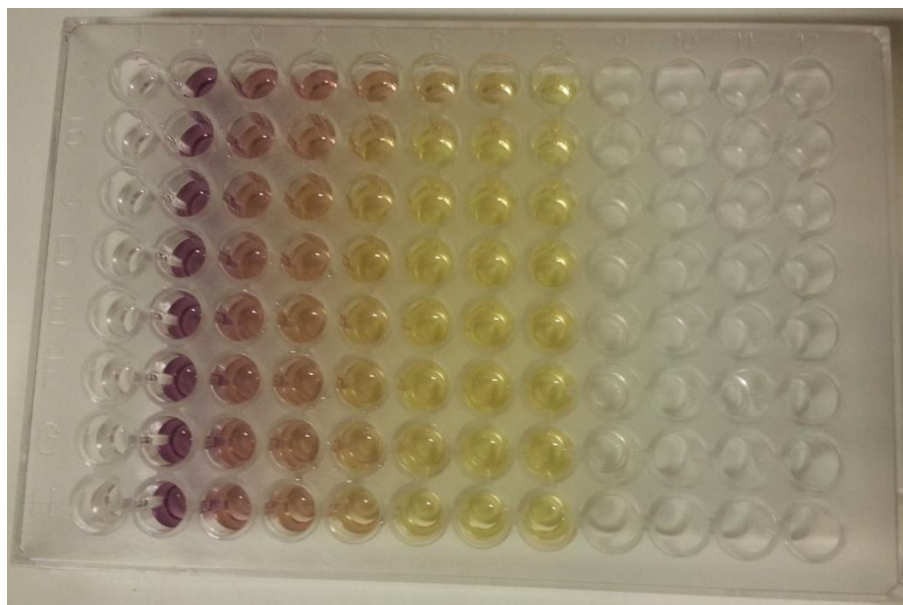


Figura 16.- Placa de 96 pozos con la reacción de DPPH y el antioxidante de referencia
Imagen propia

Anexo 5.- Método de Folin Ciocalteu (cuantificación de fenoles totales)

Este método se utiliza para determinar los FT en una muestra orgánica, se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. El reactivo de Folin Ciocalteu tiene una coloración amarilla que en presencia de fenoles se torna en azul. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008). La intensidad del azul se mide espectrofotométricamente

a 725 nm y los resultados se expresan como EAG que es el estándar de referencia (Blainski *et al.*, 2013).

La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una curva de calibración o patrón con ácido gálico, a partir de una solución stock de 0.5 mg/ 10 mL de metanol y agua (1:1), se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 µg/mL), para un volumen total de 3 mL.

Para el análisis de las fracciones que presentaron actividad AOX (30, 36, 37, 38, 39,41 y 42 se prepararon soluciones stock de cada muestra a una concentración de 0.5 mg/mL de metanol y agua (3:7). Se tomaron alícuotas de 50 µL de cada muestra en tubos de ensayo y se agregaron 2.34 mL de agua destilada. Se añadió a cada tubo 150 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, posteriormente se agitó y se dejó reposar por 10 min., después de este tiempo se añadieron 450 µL de carbonato de sodio (20%), también se agitó y se dejó reposar por 1 hora en la oscuridad para leerlo a 725 nm. En un espectrofotómetro UV/VIS modelo T+80 PG Instruments Ltd.

Anexo 5.- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es empleada en el análisis y separación de mezclas gaseosas y también sobre compuestos líquidos volátiles y sólidos que puedan pasar al estado gaseoso, una muestra del material que se desea separa se inyecta en el flujo de la corriente de un gas inerte, que posteriormente pasa a una columna en la que se efectúa la separación cromatográfica y se obtiene los componentes individuales, de ahí pasa a un detector en el que se genera una señal eléctrica que activa un registro y sale del sistema. La temperatura de inyector, de la columna y del detector se mantienen controladas por medio de resistencias eléctricas acopladas a termostatos para tener todo el sistema bajo condiciones estables.

Para el análisis de la fracción 2 y la alícuota 7 obtenidas en la cromatografía en columna abierta se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 6850GC acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM) marca Agilent Technologies modelo 5975C VL MSD. El análisis se realizó utilizando una columna Agilent 19091s-43E de 30.0 m y diámetro de 250 µm. Las condiciones fueron: temperatura del horno 70-290°C a 15°C por minuto,

temperatura de inyector 250° C, gas de acarreo He, a presión de 7.52 psi y velocidad lineal de 35 cm/s, cantidad de muestra empleada: 1.0 µL.

Anexo 6.- Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria por lo general es sílica y la fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil y los componentes de la solución migran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar.

Para el análisis de las fracciones que presentaron actividad AOX (30, 36, 37, 38, 39, 41 y 42) obtenidas en la cromatografía en columna abierta se utilizó un equipo Hewlett-Packard, modelo 1100 con bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos. La columna utilizada fue allosphere ODS-1 de 250 mm de largo por 46 mm de diámetro, tamaño de partícula de 5 µm. La temperatura de horno fue de 23° C, con un flujo constante de 1 mL por minuto por 15 minutos y fase móvil isocrática, conformada por los siguientes eluyentes y proporciones: agua:metanol:acetonitrilo (50-25-25) y 1% de ácido ortofosfórico. El análisis de los picos en los cromatogramas se determinó en el espectro UV a 254, 280 y 370 nm con el software Chemstation A. 09.03