



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTA DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**COMPARACIÓN TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
*Beiselia mexicana* FORMAN (BURSERACEAE)**

**TESIS**

QUE PARA EL GRADO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

Morales Reyna Marcos

Directora de tesis: Dra. Rocío Serrano Parrales

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice general

Resumen .....	IV
Introducción.....	1
Objetivos.....	6
Materiales y Métodos.....	7
1. Colecta .....	7
2. Extracción .....	7
3. Perfil fitoquímico de polifenoles en los extractos.....	7
3.1. Cuantificación de fenoles totales .....	7
3.2. Cromatografía líquida de alta presión (por sus siglas en inglés: HPLC) .....	8
3.3. Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (CG-MS) .....	8
4. Actividad antioxidante .....	9
4.3. Método de reducción férrica FRAP.....	10
5. Análisis estadísticos .....	10
Resultados y análisis.....	11
1. Datos etnobotánicos de la especie de estudio.....	11
2. Extracción .....	11
3. Perfil fitoquímico de los extractos.....	12
3.1. Determinación de polifenoles totales .....	12
3.2. Cromatografía líquida de alta presión (por sus siglas en inglés: HPLC) .....	13
3.3. Cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (CG-MS) .....	16
4. Actividad antioxidante .....	17
4.1. Método de reducción del radical DPPH .....	17
4.2. Método de reducción del radical ABTS <sup>•+</sup> .....	19
4.3. Método de reducción férrica FRAP.....	21
Discusión .....	22
Conclusiones.....	27
Apéndice 1 Descripción botánica de <i>B. mexicana</i> .....	28
Apéndice 2 Método de maceración (Domínguez, 1973).....	29
Apéndice 3 Método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).....	30
Apéndice 4 Método de reducción del radical DDPH.....	31
Apéndice 5 Método de reducción del radical ABTS .....	32
Apéndice 6 .....	33
Anexo 1 .....	34

Literatura citada..... 35

## Índice de cuadros

Cuadro 1 Datos generales de <i>B. mexicana</i> .....	11
Cuadro 2 Rendimiento de los extractos de <i>B. mexicana</i> .....	11
Cuadro 3 Determinación de fenoles totales de los extractos de <i>B. mexicana</i> .....	12
Cuadro 4 Datos del HPLC-fase reversa correspondiente a los extractos acetónicos de la colecta en temporada de seca y de lluvias.....	13
Cuadro 5 Datos de HPLC-fase reversa correspondiente a los extractos metanólicos de la colecta en temporada de seca y de lluvias.....	14
Cuadro 6 Datos obtenidos por cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas de los extractos hexánicos.....	16
Cuadro 7 Actividad antioxidante de los extractos de <i>B. mexicana</i> sobre el radical DPPH... ..	17
Cuadro 8 Actividad antioxidante de los extractos de <i>B. mexicana</i> sobre el radical ABTS <sup>•+</sup> .....	19
Cuadro 9 Actividad antioxidante de los extractos de <i>B. mexicana</i> sobre el ión férrico.....	21

## Indice de figuras

Figura 1 Ejemplar de <i>B. mexicana</i> .....	4
Figura 2 Curva de calibración de ácido gálico .....	5
Figura 3 Comparación HPLC-fase reversa de los extractos acetónicos y metanólicos en la temporada de lluvias y seca.....	12
Figura 4 Comparación del perfil de compuestos fenólicos en los extractos de <i>B. mexicana</i> .....	14
Figura 5 Efecto antioxidante de los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de ambas colectas de <i>B. mexicana</i> , sobre el radical DPPH.....	15
Figura 6 Efecto antioxidante de los extractos a) acetónicos y b) metanólicos de ambas colectas de <i>B. mexicana</i> , sobre el radical ABTS.....	18

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formarme dentro de sus aulas

A mi tutora la Dra. Rocío Serrano Parrales, por todo el tiempo, esfuerzo y dedicación empleados en la realización de esta tesis, por su paciencia para resolver todas mis dudas y corregir mis errores, por su amistad y buena disposición ante cualquier situación, pero sobre todo por creer y confiar en mí para la realización de este proyecto.

A mis sinodales:

- Dra. María Félix Ordoñez Ramos
- Dr. José Guillermo Ávila Acevedo
- Dra. Rocío Serrano Parrales
- Mtra. Julieta Orozco Martínez
- Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

Por tomarse el tiempo para revisar y hacer crecer este trabajo con sus comentarios enriqueciendo mi formación académica.

A mis amigos y familiares que estuvieron conmigo apoyándome durante la duración de mis estudios; Ernesto, Anabel, Gisela les agradezco por su amistad sincera e incondicional por ser partícipes de mi crecimiento académico y personal, saben que siempre pueden contar conmigo.

A Lucero, Kike, Isma, Mariana, Migue, Itzel, Bryan, Fernando, Yaz por formar parte de todas las experiencias que viví durante gran parte de esta carrera, por su amistad y por todos los buenos momentos.

A mi novia Leslie por su apoyo incondicional, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por ayudarme a recorrer este camino, por darme ánimo para seguir adelante y ayudarme a concluir y alcanzar todo lo que me propuse.

Gracias

## *Dedicatorias*

A mis padres a quienes admiro demasiado, por estar conmigo en cada parte de mi formación académica, por apoyarme siempre en todo lo que necesitaba ayudándome a crecer como persona, por enseñarme a perseguir mis sueños y a nunca rendirme por difícil que sea la situación, por todos sus consejos y cada palabra de aliento que me han dado, pero sobre todo gracias por el amor incondicional que siempre me brindan, sin ustedes no sería la persona que soy ahora, de verdad gracias por todas sus enseñanzas y consejos, los amo.

A mis abuelos Elena, Marcos, Emiliano e Isabela que en paz descanse por ser siempre un claro ejemplo de vida, por siempre cuidar de mí y por procurar mi bienestar, por sus sabias palabras y consejos, gracias por darme una niñez llena de alegría y por todo el amor que me brindan, gracias por enseñarme a siempre ser humilde y a disfrutar de cada momento mi vida.

Gracias por todo.

“Tratando de explicarme, como siempre, me enredé  
El cambio es la única constante que encontré en el tiempo  
Me he equivocado ayer y sé que hoy me equivocaré de nuevo  
Hay que caer mil veces antes de emprender el vuelo

Y tengo el corazón en llamas  
El alma en la canción que escribo  
Y me queda algo de humor para burlarme de mi mismo  
Y no le temo a aquello que vendrá  
Da igual si escampa o vuelve el huracán  
La intensidad es lo que me hace sentir vivo”

*Rodrigo Rojas*

## Resumen

Los radicales libres son especies químicas que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo, se producen durante las reacciones metabólicas y también por exposición a determinados agentes externos, un exceso de radicales libres rompen el equilibrio produciendo estrés oxidativo, el daño causado por los radicales libres está implicado en una amplia gama de enfermedades y desordenes. Una forma de reducir los daños ocasionados por los radicales libres en el organismo es mediante la acción de antioxidantes. En los últimos años se han realizado estudios espectrofotométricos y cromatográficos en diferentes extractos de plantas, con el propósito de conocer los compuestos y la capacidad antioxidante que éstas presentan, entre ellas se encuentran especies de la Familia Burseraceae. En el presente trabajo se evaluó comparativamente el efecto antioxidante de *Beiselia mexicana* en dos épocas del año (temporada de lluvias y seca). La corteza de *B. mexicana* se colectó en el municipio de Aquila, en el estado de Michoacán (México). El material vegetal resultante del secado de la corteza de *B. mexicana* se extrajo mediante la aplicación sucesiva con hexano, acetona y metanol. A los extractos se les determinó el rendimiento, contenido de fenoles totales, perfil fitoquímico por HPLC y CG-MS, además de la capacidad captadora de radicales mediante los métodos de DPPH, ABTS<sup>•+</sup> y FRAP. Los extractos con el mayor contenido de fenoles fueron el acetónico-*t<sub>seca</sub>* y el metanólico-*t<sub>lluvias</sub>*, con 223.81 y 76.721 mgEAG/g de extracto. En el análisis de la muestras por HPLC detectaron siete compuestos en el extracto acetónico-*t<sub>lluvias</sub>* mientras que en el extracto acetónico-*t<sub>seca</sub>* fueron seis. En el análisis de composición química de los extractos hexánicos por CG-MS se identificaron seis compuestos para el extracto hexánico-*t<sub>lluvias</sub>*, los cuales son principalmente hidrocarburos saturados, para el extracto hexánico-*t<sub>seca</sub>* se identificaron tres ácidos orgánicos. La mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH la mostraron los extractos metanólicos de ambas colectas y el acetónico-*t<sub>seca</sub>* con valores de 47.22, 28.35 y 21.01 µg/mL respectivamente, los extractos metanólicos de ambas colectas mostraron mayor actividad antioxidante al reducir el 50% del radical ABTS<sup>•+</sup> en menores concentraciones (*t<sub>lluvias</sub>* CA<sub>50</sub> = 151.80 µg/mL; *t<sub>seca</sub>* CA<sub>50</sub> = 158.65 µg/mL), para la prueba FRAP los que presentaron mayor capacidad de reducción férrica fueron los extractos metanólicos (110.42 y 117.68 µg ET/g), que corresponden con 11.0 y 11.8% de reducción para las colectas *t<sub>lluvias</sub>* y *t<sub>seca</sub>* respectivamente. Los resultados confirman el efecto antioxidante de *B. mexicana* encontrando una mejor actividad en los extractos acetónico-*t<sub>seca</sub>* y metanólico-*t<sub>lluvias</sub>* frente al radical DPPH, y un mejor desempeño de los extractos metanólicos de ambas colectas frente al radical ABTS<sup>•+</sup>, lo cual permite la posibilidad de utilizarla en el tratamiento de enfermedades causadas por estrés oxidativo.

**Palabras clave:** Burseraceae; *Beiselia mexicana*; actividad antioxidante; fenoles.

## Abstract

Free radicals are chemical species that have at least one unpaired electron in their outermost orbital, occur during metabolic reactions and by exposure to certain external agents, an excess of free radicals break the balance producing oxidative stress, the damage caused by free radicals are involved in a wide range of diseases and disorders. One way to reduce the damage caused by free radicals in the body is through the action of antioxidants. In recent years, spectrophotometric and chromatographic studies have been carried out on different plant extracts with the purpose of knowing the compounds and the antioxidant capacity they present, including species of the family Burseraceae. The present work evaluated comparatively the antioxidant effect of *Beiselia mexicana* in two seasons (rainy and dry seasons). *B. mexicana* bark was collected in the municipality of Aguila, in Michoacan's state (Mexico). The plant material resulting from the drying of *B. mexicana* bark was extracted by successive application with hexane, acetone and methanol. The extracts were evaluated for yield, total phenol content, phytochemical profile by HPLC and CG-MS, in addition to the radical scavenging capacity by DPPH •, ABTS • + and FRAP methods. The extracts with the highest content of phenols were acetonic-t<sub>dry</sub> and the methanolic-t<sub>rains</sub>, with 223.81 and 76,721 mgEAG/g of extract, the analysis of the samples by HPLC detected seven compounds in the acetonic-t<sub>rains</sub> extract while in the acetonic-t<sub>dry</sub> extract they were six, in the analysis of chemical composition of the hexanic extracts by CG-MS, six compounds were identified for the hexanic-t<sub>rains</sub> extract, for the hexanic-t<sub>dry</sub> extract, three compounds were identified, The highest DPPH radical capture activity corresponded to the methanolic extracts from both collections and the acetonic-t<sub>dry</sub> extract with values lower than 47.22, 28.35 and 21.01 µg / mL respectively, the methanolic extracts from both collections showed greater antioxidant activity, reducing at 50% of the radical ABTS • + in lower concentrations ( t<sub>rains</sub> CA50 = 151.80 µg / mL, t<sub>dry</sub> CA50 = 158.65 µg / mL), for the FRAP test those with the highest iron reduction capacity were the methanolic extracts (110.42 and 117.68 µg ET /g), which correspond with 11.0 and 11.8% reduction for the t<sub>rains</sub> and t<sub>dry</sub> collections respectively. The results obtained point to a good possibility of using *B. mexicana* for the isolation of phenolic substances with antioxidant activity.

**Keywords:** Burseraceae; *Beiselia*; antioxidant activity; phenols.

## Introducción

Los radicales libres son especies químicas (átomos, moléculas o iones) que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extraordinariamente reactivos, se producen durante las reacciones metabólicas mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta. Los radicales libres también se encuentran en el humo de cigarro, las emisiones de motores que usan combustibles fósiles y los humos industriales (Konigsberg, 2008).

Si bien las reacciones de óxido reducción son importantes, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas, un exceso de radicales libres rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo (Guerra, 2001). El daño causado por los radicales libres está implicado en una amplia gama de enfermedades y desordenes, como trombosis coronaria, angina de pecho, fallo cardiaco, apoplejía, daño cerebral y envejecimiento (Robert, 2003).

Una forma de reducir los daños ocasionados por los radicales libres en el organismo es mediante la acción de antioxidantes, un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, estos pueden ser clasificados en dos grupos: los antioxidantes endógenos que son generados por el organismo como el glutatión, el ácido alfa-lipoico, el ácido úrico, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, entre otras enzimas. El segundo grupo comprende los antioxidantes exógenos, estos se encuentran en los alimentos e incluyen determinadas vitaminas, oligoelementos, carotenoides, terpenos y polifenoles (Causse, 2010).

Debido a la diversidad de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres, se han creado terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes que parecen prevenir, o al menos disminuir, el deterioro funcional orgánico originado por un el estrés oxidativo (Guerra, 2001). Este efecto protector de los alimentos de origen vegetal se ha atribuido a diversos nutrimentos y fitoquímicos con actividad antioxidante, lo cual es frecuentemente olvidado en las recomendaciones alimentarias (Arraya *et al.*, 2006).

Una de las fuentes de obtención de fitoquímicos con propiedades antioxidantes son las plantas de uso medicinal, cuyo uso se remonta al principio de la humanidad. El ser humano recurría a la naturaleza en busca de alimento y como fuente de sustancias para conservar la salud, de forma que por acierto y error aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia (Hernández y Gally, 1981)

El uso de plantas también tiene importantes aplicaciones en la medicina moderna, ya que son fuente directa de agentes terapéuticos que se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos cada vez más complejos. La estructura química de los principios activos de las plantas se ha empleado para la producción de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos en especies filogenéticamente relacionadas.

Los principios activos de las plantas generalmente pertenecen a alguno de los grupos derivados del metabolismo secundario, por lo que son llamados metabolitos secundarios y poseen naturaleza química diversa; son compuestos de bajo peso molecular que tienen importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas y frutos. Además, desempeñan funciones de defensa frente a condiciones de estrés biótico y abiótico, así mismo, se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros (Sepúlveda *et al.*, 2003; Ávalos y Pérez, 2009).

La síntesis de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, tales como el consumo por herbívoros, el ataque por microorganismos, la competencia por el espacio de suelo, la luz, los nutrimentos entre las diferentes especies de plantas, la exposición a la luz solar u otro tipo de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003). Cada uno de los metabolitos secundarios aporta propiedades especiales y características a cada grupo de plantas que los produce. Algunos aportan sabores o aromas desagradables para los herbívoros, mientras que otros llegan a provocar su muerte (Valverde *et al.*, 2005).

Se han descrito más de 30,000 estructuras de compuestos o productos derivados del

metabolismo secundario, los cuales se clasifican en distintas categorías. Según su estructura química, se reconocen al menos tres grandes grupos de metabolitos secundarios con distintos efectos: los terpenoides, los compuestos nitrogenados (alcaloides y glucósidos cianogénicos) y los compuestos fenólicos (Valverde *et al.*, 2005).

El grupo de los compuestos fenólicos tienen alto interés nutricional, principalmente por sus propiedades antioxidantes, que se asocian con funciones protectoras en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Berra *et al.*, 1995). Químicamente, los fenoles se definen como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos se subdividen en varios grupos, entre los que se encuentran: fenoles simples, fenilpropanoides, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos, ligninas y antocianinas (Shahidi y Naczki, 2004). La producción y diversidad de estructuras de compuestos fenólicos en las plantas se debe a las condiciones (factores bióticos y abióticos) en las que crecen (Sepúlveda *et al.*, 2003).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se relaciona con su capacidad para quelar metales y reducir radicales libres causantes de estrés oxidativo en los organismos (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009). Entre las especies vegetales que tienen potencial como fuente de producción y obtención de compuestos con propiedades antioxidantes se encuentran las de la Familia Burseraceae (Arriaga, 2011; Bah. M *et al.*, 2014), las cuales son nativas principalmente de América tropical, pero algunas especies se encuentran en África y Asia. La familia comprende 18 géneros y 649 especies que incluyen arbustos y árboles tropicales (The plant list, 2013).

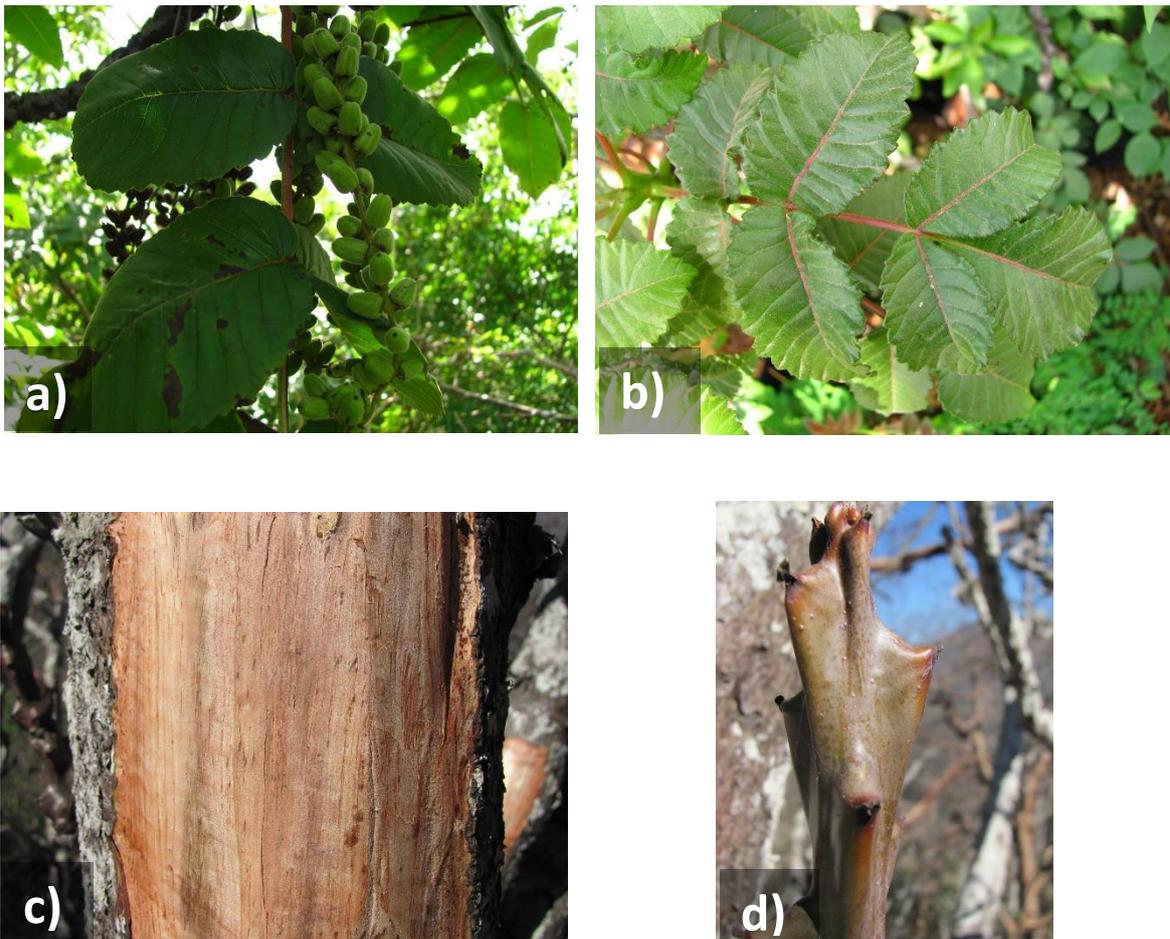
Las especies de la familia Burseraceae, se caracterizan por ser árboles de porte bajo a medio, muy ramificados con una altura aproximada de 5 a 15 metros, su corteza varía de gris, amarilla a roja, dependiendo de las especies. Debido a esto, en algunos lugares se les conoce como cuajotes rojos o amarillos, algunos tienen la corteza exfoliante, son caducifolios en la temporada seca y florecen cuando comienza la temporada de lluvias.

Las especies de la familia Burseraceae que son endémicas de México suman a nivel genérico el 20% y a nivel de especie el 80%. Los géneros que se encuentran en México son: *Protium* (una especie), *Beiselia* (una especie), *Terebinthus* (una especie), *Commiphora* (dos especies) y *Bursera* (aproximadamente 80 especies), lo que da un

total de 85 especies (Cházaro *et al.*, 2010).

Por lo mencionado, es evidente que el género *Bursera* es de los más representativos en México por la diversidad de especies con las que se cuenta y además es de gran importancia en la medicina tradicional, debido a que contienen triterpenos y flavonoides, los cuales pueden conferirle capacidad antioxidante. Este efecto se encuentra documentado, ya que se han realizado estudios sobre la actividad antioxidante en extractos de *B. simaruba*, *B. bipinnata* y *B. copallifera*, estos presentaron una elevada capacidad antioxidante (Arriaga, 2011).

De igual forma, se ha medido la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de otros representantes de la familia Burseraceae, como *Protium heptaphyllum*, *Trattinnickia rhoifolia*, *Tetragastris panamensis* y han mostrado efectos antioxidantes (Tafurt *et al.*, 2015). Sin embargo, hay representantes de la familia Burseraceae de las cuales no se han realizado estudios para evaluar su potencial antioxidante, como es el caso de *Beiselia mexicana* Forman (figura 1 y apéndice 1), que es una especie con endemismo estrecho que ha sido descrita únicamente en Aquila Michoacán (figura 2) y es considerada especie relicto por sus características morfológicas primitivas (Forman, 1989, Becerra 2012, Ramos-Ordoñez 2013; citado en Medel, 2014).



**Figura 1.** *B. mexicana* Forman. a) frutos, b) hojas, c) corteza, d) tallo. (Imágenes tomadas y adaptadas de NaturaLista, Conabio, 2018. <http://goo.gl/KPBc43>).



**Figura 2.** Ubicación geográfica de *B. mexicana*. Imagen adaptada de Naturalista, Conabio, 2018 (Disponible en <http://goo.gl/zJCXc7>).

*B. mexicana* estuvo incluida en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) de 1997, bajo la categoría de “Rara”, actualmente ya no se encuentra listada, por lo que se encuentra en proceso una solicitud para incluirla en la NOM-059-SEMARNAT (Medel, 2014).

En cuanto a estudios de la especie, existen pocos trabajos publicados (Beisel, 1982; Forman, 1987; Forman *et al.*, 1989), entre ellos se encuentran los siguientes:

Beisel en 1982 publicó un breve artículo en la revista *Kakteen und andere Sukkulenten* (“Cactus y otras suculentas”) llamado: *La emocionante historia del árbol de los dioses*, donde describe las circunstancias en las que obtuvo este primer encuentro. Por otra parte, Forman, en 1982, describió a la especie como un nuevo género; años más tarde, junto a sus colaboradores, amplió la descripción del género y aportó la descripción completa de la morfología, anatomía, polen y número de cromosomas de *B. mexicana*, concluyó que esta pertenece a la familia Burseraceae.

Por lo mencionado, es evidente que los trabajos reportados sobre la especie hacen referencia únicamente a su descripción botánica y no aportan datos cuantitativos de sus poblaciones, de sus relaciones ecológicas, de su composición química ni de sus propiedades biológicas. Por lo que en el presente trabajo se evaluó comparativamente el efecto antioxidante de *B. mexicana* en dos épocas del año.

## **Hipótesis**

Existen trabajos en los que se han reportado las propiedades antioxidantes de algunas especies de la Familia Burseraceae. El efecto antioxidante se atribuye a que son ricas en polifenoles, los cuales son producidos de manera diferencial en las especies, de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se desarrollan. Por lo que, al pertenecer *Beiselia mexicana* a esta Familia, es muy probable que presente actividad antioxidante.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar y comparar el efecto antioxidante de la corteza de *Beiselia mexicana* colectada en la temporada de lluvias y seca.

### **Objetivos particulares**

- Obtener los extractos hexánico, acetónico y metanólico de la corteza de *B. mexicana*.
- Determinar el perfil fitoquímico de los polifenoles en los extractos.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos en pruebas *in vitro*.
- Comparar y relacionar la actividad antioxidante de los extractos con la época de colecta del material vegetal.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Colecta**

La corteza de *B. mexicana* se colectó en la población de La Virgen, municipio de Aquila, en el estado de Michoacán (México), en dos temporadas: lluvias (septiembre 2016) y seca (noviembre de 2016). Se depositó un ejemplar de la especie en el herbario IZTA de la FES Iztacala para obtener un número de registro.

### **2. Extracción**

Los extractos hexánico, acetónico y metanólico se obtuvieron mediante el método de maceración (Domínguez, 1973; apéndice 2), a partir de 290 y 265 g de corteza, para las colectas de la temporada de lluvias y seca respectivamente. La selección de los solventes empleados en la extracción se realizó tomando en cuenta que son solventes con los que es posible extraer compuestos de diferentes polaridades (baja, media y alta para el hexano, acetona y metanol, respectivamente).

El material vegetal seco y fragmentado se colocó en matraces de vidrio y se le agregaron solventes en orden de polaridad ascendente (hexano, acetona y metanol). Los extractos se filtraron y el exceso de solvente se destiló a presión reducida, posteriormente se colocaron en charolas de vidrio para permitir la evaporación del residuo de solvente y se determinó el rendimiento total, por diferencia de peso entre los sólidos obtenidos y el peso seco del material vegetal de partida. Los extractos se almacenaron en la oscuridad para su posterior uso.

### **3. Perfil fitoquímico de polifenoles en los extractos**

#### **3.1. Cuantificación de fenoles totales**

Para la determinación de polifenoles totales se usó el Método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965; apéndice 3). El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla, que en presencia de un fenol se torna azul.

Se preparó una curva de calibración con ácido gálico a partir de una solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 y 0.12 mg/mL) para un volumen final de 1 mL.

Se prepararon soluciones estándar de cada muestra con una concentración de 0.2

mg/mL. Se transfirieron 300  $\mu$ L de cada una de las concentraciones (ácido gálico y sustancia a evaluar) a tubos de ensaye, con 1800  $\mu$ L de agua destilada, posteriormente se adicionaron 150  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu a cada tubo. Después de cinco minutos de incubación, se añadieron 450  $\mu$ L de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) y agua, hasta completar un volumen de 3000  $\mu$ L. Los tubos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Cada concentración se determinó por triplicado.

Tras el tiempo de reacción, se leyó la absorbancia a 760 nm y se graficó la concentración contra la absorbancia. Para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y, a partir de la ecuación de la recta, se determinó la concentración de fenoles en cada extracto. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mgEAG/g).

### **3.2. Cromatografía líquida de alta presión (por sus siglas en inglés: HPLC)**

La determinación del perfil fitoquímico de los compuestos fenólicos en el extracto se llevó a cabo mediante HPLC-fase reversa, para ello se utilizó un equipo Hewlett Packard, modelo 1100, con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos (DAD), columna Allsphere ODS-1, 25 cm de largo, diámetro 4.6 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m, temperatura de horno 23 °C, velocidad de flujo en gradiente (0-5 min 1 mL/min; 5-20 min 1.5 mL/min) y fase móvil isocrática: MeOH:AcOH:H<sub>2</sub>O, en proporción 30:5:65 y 1% de ácido fosfórico. El análisis de las señales en los cromatogramas se determinó en el espectro UV a 280 nm, con el software Chemstation A.09.03.

### **3.3. Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (CG-MS)**

El análisis cuantitativo de los extractos hexánicos se realizó mediante cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (CG-MS), para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 equipado con columna capilar HP-5MS (30 m x .25 mm). Las temperaturas empleadas para el análisis fueron: columna, inyector y detector a 325, 250 y 290 °C respectivamente. El gas acarreador fue helio, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La muestra se inyectó manualmente y consistió en 1  $\mu$ L del extracto disuelto en hexano (1 mg de extracto en 200  $\mu$ L de solvente). Las áreas de las señales detectadas, que corresponden con los componentes de la

muestra, fueron reguladas por integración electrónica. La concentración relativa de los componentes individuales de la muestra se basó en el área de los picos de los cromatogramas. Por otra parte, el análisis de masas se realizó en un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C. Las temperaturas de la columna y del inyector fueron las mismas que las empleadas para el CG. Los espectros de masas se registraron a 70 eV. Los componentes de los extractos se identificaron por comparación de los espectros de masas con la librería interna de NIST08.L Mass Spectral (Match  $\geq$  90%).

#### **4. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se evaluó mediante los métodos DPPH (apéndice 4), ABTS<sup>•+</sup> (apéndice 5) y FRAP (apéndice 6) que consisten en reacciones de óxido-reducción, en las que los extractos reducen a los radicales mencionados.

Para estas pruebas, se evaluaron distintas concentraciones de los extractos, las cuales se determinaron de acuerdo con la concentración de fenoles totales de cada uno de ellos. Para los extractos hexánico se evaluaron concentraciones de 100 a 700  $\mu\text{g/mL}$ , para los acetónicos de 30 a 300  $\mu\text{g/mL}$  y los metanólicos de 10 a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

##### **4.1. Método de reducción del radical DPPH**

El método de reducción del radical DPPH se realizó en placas 96 pozos donde se adicionaron por triplicado 50  $\mu\text{L}$  de los extractos a diferentes concentraciones y 150  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de DPPH (100  $\mu\text{M}$ ). Las placas se incubaron en la oscuridad a 37 °C. Se leyó la absorbancia a 515 nm y se determinó el porcentaje de reducción del DPPH. El estándar de referencia fue quercetina y como control negativo se incluyeron pozos con 200  $\mu\text{L}$  de metanol. La actividad antioxidante se expresó en porcentaje de reducción del DPPH y se determinó la concentración antioxidante media ( $\text{CA}_{50}$ ) (Murillo, 2006).

##### **4.2. Método de reducción del radical ABTS<sup>•+</sup>**

El radical ABTS<sup>•+</sup> se obtuvo a partir de ABTS (7 mM/L) y persulfato de potasio (2.45 mM/L) en proporción 1:1. La mezcla se dejó 16 horas, a temperatura ambiente y en la oscuridad. La solución se diluyó con metanol hasta obtener una absorbancia de 0.7, a 734 nm. Para la determinación de la actividad antioxidante, se hicieron reaccionar por triplicado 20  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones de cada extracto con

180  $\mu\text{L}$  de la solución ABTS $\bullet^+$ . Después de 7 minutos de reacción en la oscuridad se leyó la absorbancia a 734 nm. Como estándar de referencia se usó Trolox. Finalmente se calculó el porcentaje de reducción del radical ABTS $\bullet^+$  y se determinó la concentración antioxidante media ( $\text{CA}_{50}$ ) (Re *et al.*, 1999).

#### **4.3. Método de reducción férrica FRAP**

En tubos de ensaye se adicionaron por triplicado 300  $\mu\text{L}$  de cada extracto, en diferentes concentraciones, y 3700  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción FRAP. Después de 10 min de incubación, a temperatura ambiente, las placas se leyeron a 593 nm. La absorbancia de las muestras se comparó con una curva estándar de trolox. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de trolox por gramo de muestra fresca (mgET/g) (Benzie y Strain, 1999).

#### **5. Análisis estadísticos**

La significancia de los datos se determinó mediante ANOVA unifactorial, tomando como factor los extractos. La comparación en el efecto antioxidante de los extractos frente a los radicales empleados se analizó mediante ANOVA bifactorial ( $p < 0.05$ ), en este caso los factores fueron los extractos y los radicales. La determinación de la  $\text{CA}_{50}$  de los extractos sobre los radicales empleados se realizó mediante análisis de regresión lineal, considerando una  $R^2 > 0.9$ .

## Resultados y análisis

### 1. Datos etnobotánicos de la especie de estudio

**Cuadro 1.** Datos generales de *B. mexicana*.

Familia	Buseraceae
Nombre científico	<i>Beiselia mexicana</i> Forman
Nombre común	Copal de piedra
Número de registro	IZTA 3218
Parte utilizada	Corteza
Forma de uso	Infusión o agua de uso
Fecha de colecta	Septiembre y Noviembre de 2016
Lugar de colecta	Mpio. Aquila, “La Virgencita” límites entre las localidades de Ostula y Aquila, Michoacán.
Coordenadas	18°36'52.97"N y 103°29'2.97"O
Altitud	614 msnm
Colector	Héctor Cervantes Maya

### 2. Extracción

En los rendimientos de los extractos se obtuvieron resultados distintos en las colectas de ambas temporadas ( $P < 0.5$ ). El mayor rendimiento se obtuvo para los extractos metanólicos de ambas colectas: 60.00 y 25.48 g, para las colectas de la temporada de lluvias y seca respectivamente, que corresponden con 20.69 y 9.62% (cuadro 2). Los menores rendimientos fueron los obtenidos para el extracto acetónico- $t_{lluvias}$  y el del extracto hexánico- $t_{seca}$ .

**Cuadro 2.** Rendimiento de los extractos de *B. mexicana*

Colecta (temporada)	Extracto	(g)	%
Lluvias	Hexánico	5.17	1.78
	Acetónico	0.74	0.25
	Metanólico	60.00	20.69
Seca	Hexánico	4.28	1.62
	Acetónico	11.71	4.42
	Metanólico	25.48	9.62

Los valores de rendimiento en gramos y porcentual se calcularon a partir de 290 y 265 g de corteza seca y fragmentada, para las colectas de la temporada de lluvias (septiembre de 2016) y la temporada seca (noviembre de 2016), respectivamente.

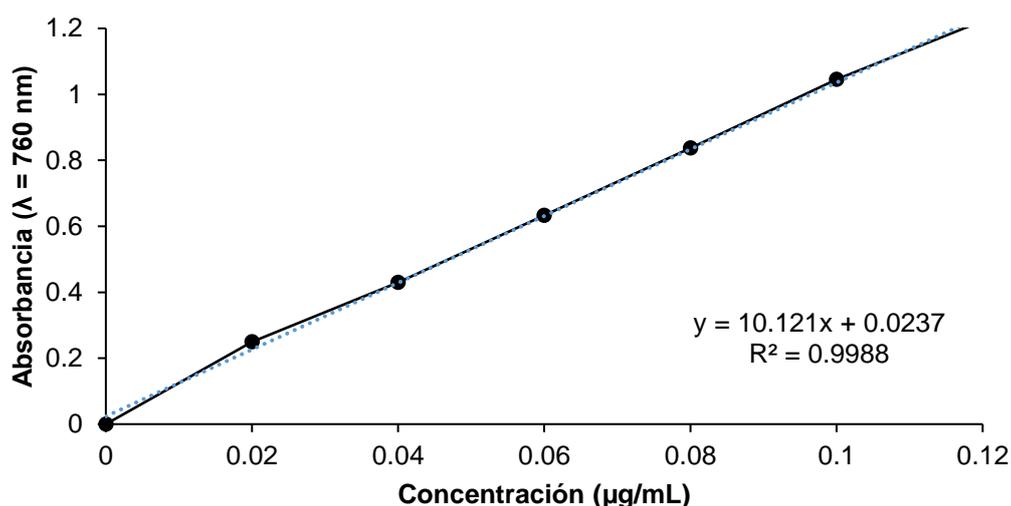
### 3. Perfil fitoquímico de los extractos

#### 3.1. Determinación de polifenoles totales

En la evaluación del contenido total de fenoles, los extractos con el mayor contenido de fenoles fueron el acetónico-*t<sub>seca</sub>* y el metanólico-*t<sub>lluvias</sub>*, con 223.81 y 76.721 mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg EAG/g) (cuadro 3), que corresponden con 22.38 y 7.67% de fenoles, respectivamente. Los datos mencionados se obtuvieron a partir de la curva de calibración de ácido gálico, la cual mostró una  $R^2$  de 0.99 (figura 3).

**Cuadro 3.** Determinación de fenoles totales de los extractos de *B. mexicana*

Colecta (temporada)	Extracto	Fenoles totales (mgEAG/g de extracto)	% Fenoles
Lluvias	Hexánico	1.81 ± 0.49	0.01
	Acetónico	43.14 ± 2.96	4.31
	Metanólico	76.72 ± 0.66	7.67
Seca	Hexánico	10.70 ± 2.48	1.07
	Acetónico	223.81 ± 1.19	22.38
	Metanólico	37.51 ± 0.82	3.75



**Figura 3.** Curva de calibración de ácido gálico empleada para el cálculo de la concentración de fenoles totales en los extractos. Valores promedio de tres repeticiones.

### 3.2. Cromatografía líquida de alta presión (por sus siglas en inglés: HPLC)

El análisis por HPLC-fase reversa permitió detectar compuestos similares en los extractos acetónicos y metanólicos de ambas temporadas, sin embargo, estos se encontraron en diferentes concentraciones (figura 4). Lo mencionado se pudo constatar, ya que las señales de los compuestos en los extractos se detectaron en tiempos de retención similares que varían en abundancia, lo cual es evidente en el eje Y de los cromatogramas, que indica las miliunidades (mU) de absorbancia.

Así mismo, se detectaron siete compuestos en el extracto acetónico- $t_{lluvias}$ , mientras que en el extracto acetónico- $t_{seca}$  fueron seis (cuadro 4). Por otra parte, para el extracto metanólico- $t_{lluvias}$  se observaron siete compuestos y cinco para el metanólico- $t_{seca}$  (cuadro 5).

Con respecto a la abundancia, los compuestos que se encontraron en mayor proporción fueron los números 3 y 4, que corresponden con los extractos acetónico- $t_{lluvias}$  y acetónico- $t_{seca}$  respectivamente, con porcentajes de área de 40 y 29% (cuadro 4). Para los extractos metanólicos, los más abundantes fueron el 2 y 4, correspondientes a los extractos acetónico- $t_{lluvias}$  y acetónico- $t_{seca}$  respectivamente, con porcentajes de área de 23.97% y 16% (cuadro 5).

**Cuadro 4.** Datos del HPLC-fase reversa correspondiente a los extractos acetónicos de la colecta en temporada de seca y de lluvias

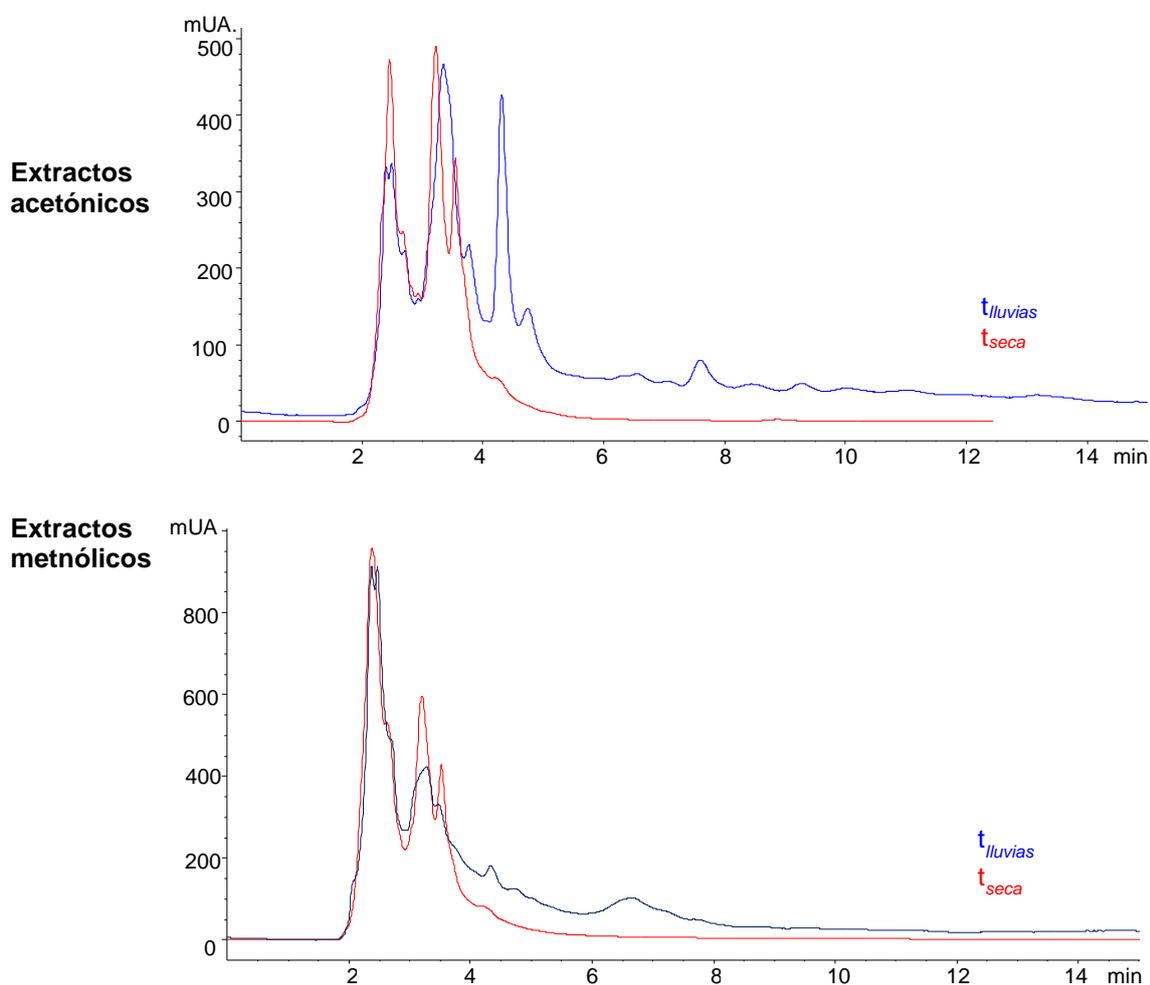
No.	TR		% Área		$\lambda$ max (nm)	
	Lluvias	Seca	Lluvias	Seca	Lluvias	Seca
1	2.38	2.449	9.09	28.421	222, 280 <sup>fp</sup>	288 <sup>fp</sup>
2	2.48	2.668	10.29	9.918	224, 282 <sup>fp</sup>	286 <sup>fp</sup>
3	3.34	2.922	40.28	3.804	230, 280 <sup>fp</sup>	228, 288 <sup>fp</sup>
4	3.76	3.217	9.13	29.339	228, 280 <sup>fp</sup>	216, 230, 290 <sup>flv</sup>
5	4.309	3.539	16.59	22.337	230, 278, 310 <sup>flv</sup>	230, 290 <sup>fp</sup>
6	4.73	4.188	6.25	6.045	230, 278, 312 <sup>flv</sup>	232, 290 <sup>fp</sup>
7	7.59		1.89		216, 266, 304 <sup>flv</sup>	

TR: tiempo de retención;  $\lambda$  max: absorbancia máxima; fp: Fenilpropanoide; flv: Flavonoide

**Cuadro 5.** Datos de HPLC-fase reversa ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) correspondiente a los extractos metanólicos de la colecta en temporada de seca y de lluvias.

No.	TR		% Área		$\lambda \text{ max (nm)}$	
	Lluvias	Seca	Lluvias	Seca	Lluvias	Seca
1	2.37	2.376	16.41	0.2725	280 <sup>fp</sup>	216,282 <sup>fp</sup>
2	2.46	2.617	23.97	15.188	280 <sup>fp</sup>	286 <sup>fp</sup>
3	3.27	3.204	17.73	0.2722	230, 280 <sup>fp</sup>	230, 290 <sup>fp</sup>
4	3.46	3.52	16.10	16.828	228, 280 <sup>fp</sup>	230 290 <sup>fp</sup>
5	4.33	4.185	5.64	6.074	228, 278 <sup>fp</sup>	290 <sup>fp</sup>
6	4.72	-	9.12	-	232, 280 <sup>fp</sup>	-
7	6.66	-	11	-	226, 280 <sup>fp</sup>	-

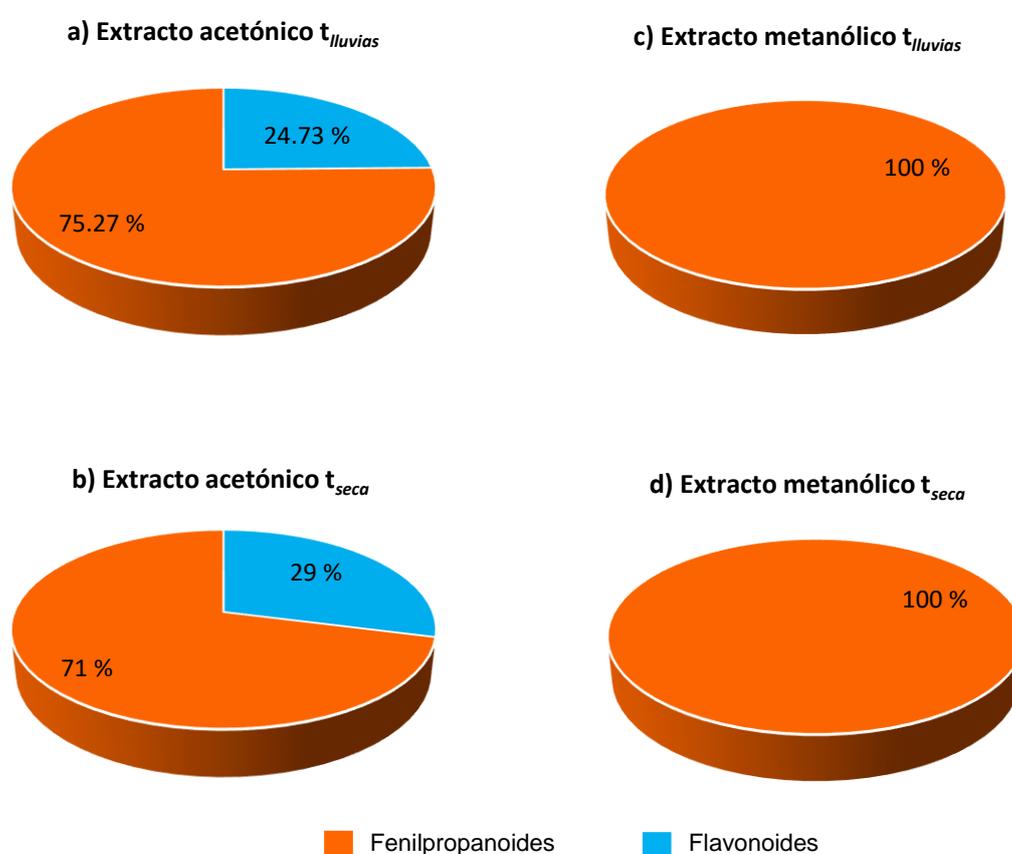
TR: tiempo de retención;  $\lambda \text{ max}$ : absorbancia máxima; fp: Fenilpropanoide; flv: Flavonoide



**Figura 4.** Comparación HPLC-fase reversa de los extractos acetónicos y metanólicos en la temporada de lluvias y seca (ODS,  $\lambda=280 \text{ nm}$ ).

En cuanto a la composición química de los extractos, de los compuestos detectados en el extracto acetónico- $t_{lluvias}$  el 24.73% corresponde a flavonoides, mientras que el 75.27% corresponden fenilpropanoides (figura 5a), en el caso del extracto acetónico- $t_{seca}$  un 29% de la composición corresponde a flavonoides y 71% son fenilpropanoides (figura 5b).

En el caso de los extractos metanólicos de ambas temporadas el 100% de su composición corresponde con fenilpropanoides (figura 5c y 5d).



**Figura 5.** Comparación del perfil de compuestos fenólicos en los extractos de *B. mexicana*.

### 3.3. Cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (CG-MS)

En el análisis de la composición química de los extractos hexánicos, se identificaron seis compuestos para el extracto hexánico-*t*<sub>Lluvias</sub>, de los cuales destaca el *oximax-N-2-trifluorometil-fenil-piridina-3-carboxamida*, con 2.57% de abundancia (cuadro 6 y anexo 1), el resto de los compuestos son hidrocarburos saturados, tales como *tetradecano*, *hexadecano*, *octadecano* y *eicosano*.

Para el extracto hexánico-*t*<sub>seca</sub> se identificaron tres compuestos, de los cuales el *ácido metil-éster-cis-13-octadecenoico* presento el mayor porcentaje de abundancia, con 0.98% (cuadro 6 y anexo 1), los dos compuestos restantes fueron identificados como *ácido palmítico* y *ácido linoléico*.

**Cuadro 6.** Datos obtenidos por cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (CG-MS) de los extractos hexánicos.

Colecta (Temporada)	No.	TR	Abundancia (%)	Compuesto
Lluvias	1	10.529	0.26	tetradecano
	2	12.274	0.62	hexadecano
	3	13.826	0.46	octadecano
	4	15.231	0.32	eicosano
	5	21.531	2.57	oximax-N-2-trifluorometil-fenil-piridina-3-carboxamida
Seca	1	14.737	0.81	ácido palmítico
	2	15.898	0.52	ácido linoléico
	3	15.924	0.98	ácido metil-éster-cis-13-octadecenoico

TR: tiempo de retención (min).

## 4. Actividad antioxidante

### 4.1. Método de reducción del radical DPPH

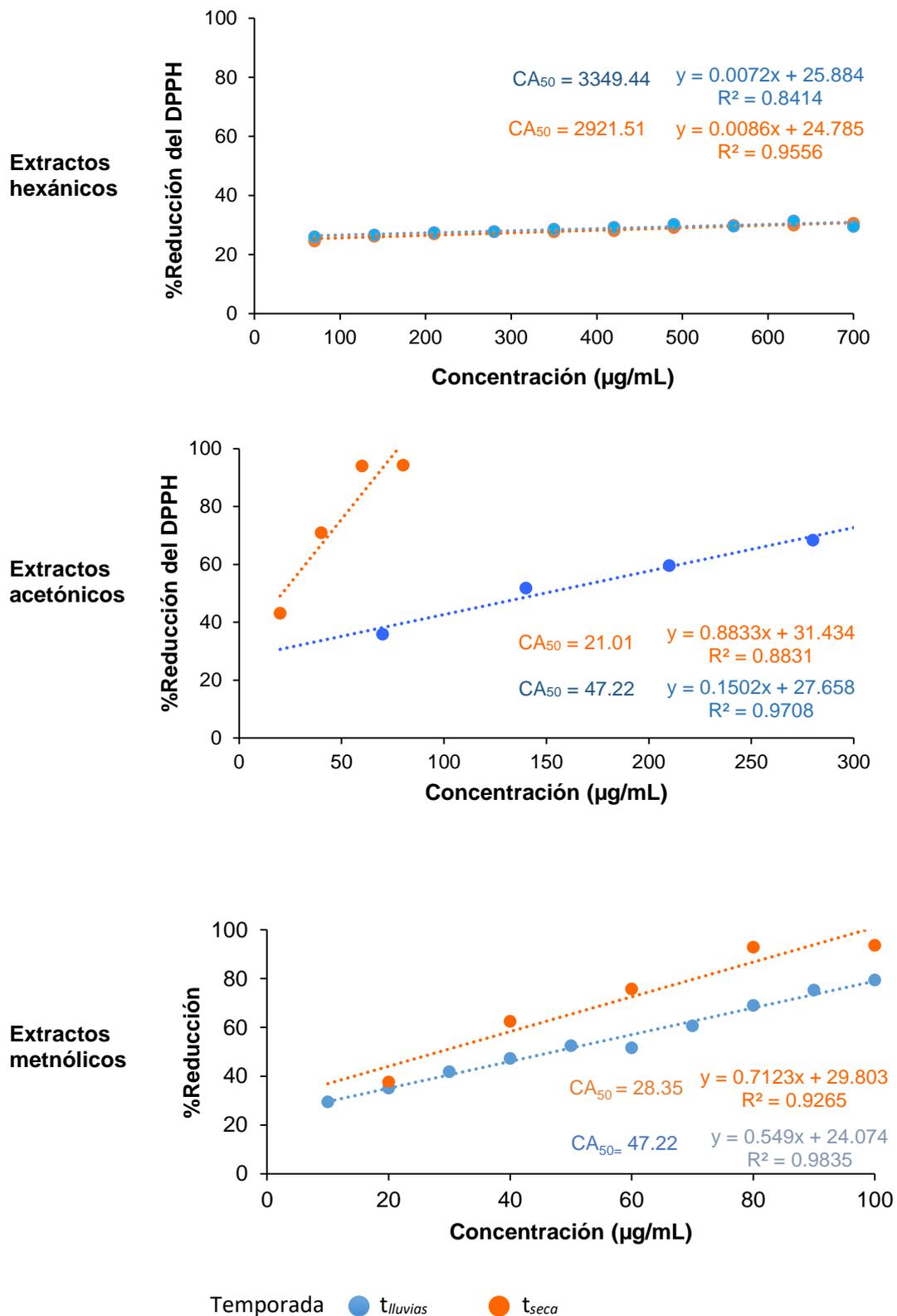
Los extractos acetónicos y metanólicos mostraron efecto antioxidante al reducir el radical DPPH con valores de  $CA_{50}$  menores a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Los que presentaron mayor actividad fueron los metanólicos de ambas colectas y el acetónico- $t_{seca}$ , con valores menores de 47.22, 28.35 y 21.01  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (cuadro 7 y figura 6). Los extractos que mostraron mayor porcentaje de reducción del radical fueron el acetónico- $t_{seca}$  y el metanólico- $t_{seca}$  con 98 y 90%, en las concentraciones de 60 y 80  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (Figura 6b y c)

Por otra parte, los extractos hexánicos únicamente redujeron al radical DPPH un 30% con las concentraciones evaluadas (70 a 700  $\mu\text{g/mL}$ ) (figura 6a), por lo que la  $CA_{50}$ , calculada mediante el modelo de regresión lineal, fue muy alta en comparación con los valores obtenidos con los demás extractos.

Cabe mencionar que los extractos mostraron diferencias significativas en la actividad antioxidante con respecto al estándar de referencia (quercetina), del que se determinó una  $CA_{50}$  de 5.3  $\mu\text{g/mL}$ , este valor es menor comparado con los obtenidos para los extractos de *B. mexicana* ( $P < 0.5$ ).

**Cuadro 7.** Actividad antioxidante de los extractos de *B. mexicana* sobre el radical DPPH

Colecta (temporada)	Estándar de referencia	Extracto	$CA_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Quercetina		5.30
Lluvias		Hexánico	3349.44
		Acetónico	148.75
		Metanólico	47.22
Seca		Hexánico	2921.51
		Acetónico	21.01
		Metanólico	28.35



**Figura 6.** Comparación del efecto antioxidante de los extractos de *B. mexicana*, de ambas colectas, sobre el radical DPPH.

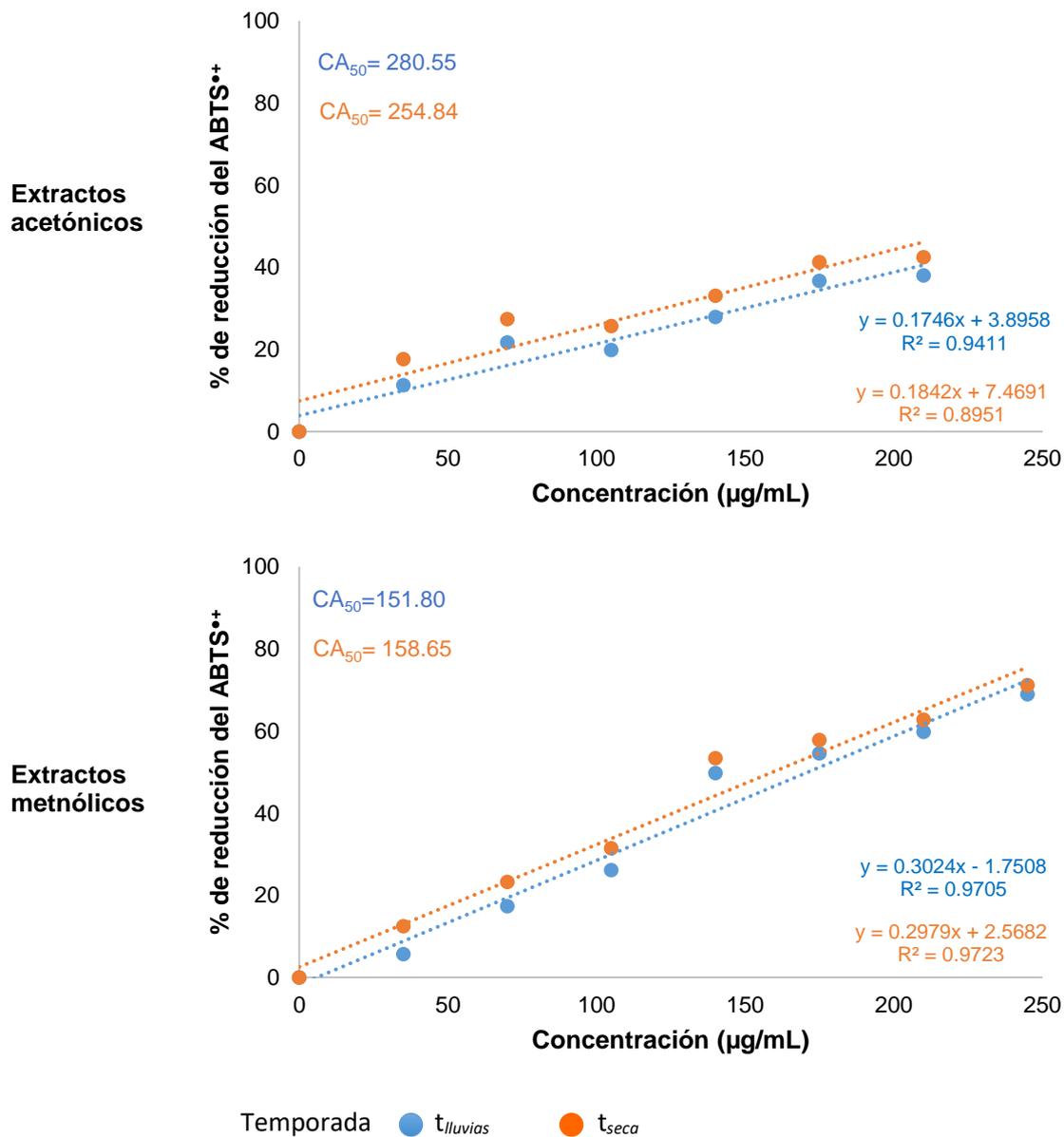
## 4.2. Método de reducción del radical ABTS<sup>•+</sup>

La prueba solo fue realizada para los extractos acetónicos y metanólicos debido a la baja capacidad antioxidante mostrada por los extractos hexánicos. Los resultados de esta prueba se muestran en el cuadro 8 y en la figura 7, donde se observa que los extractos metanólicos de ambas colectas mostraron mayor actividad antioxidante, al reducir el 50% del radical ABTS<sup>•+</sup> en concentraciones menores ( $t_{\text{Lluvias}} CA_{50} = 151.80 \mu\text{g/mL}$ ;  $t_{\text{seca}} CA_{50} = 158.65 \mu\text{g/mL}$ ), en comparación con los extractos acetónicos, los cuales mostraron valores de  $CA_{50}$  mayores a  $250 \mu\text{g/mL}$ .

Los extractos mostraron diferencias significativas en la actividad antioxidante con respecto al trolox ( $P < 0.5$ ), empleado como estándar de referencia, del que se obtuvo un valor de  $CA_{50}$  de  $5.3 \mu\text{g/mL}$ , este valor es menor comparado con los obtenidos para los extractos de *B. mexicana*.

**Cuadro 8.** Actividad antioxidante de los extractos de *B. mexicana* sobre el radical ABTS<sup>•+</sup>

Colecta (temporada)	Estándar de referencia	Extracto	$CA_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	Quercetina		5.20
Lluvias		Acetónico	280.55
		Metanólico	151.80
Seca		Acetónico	254.84
		Metanólico	158.65



**Figura 7.** Comparación del efecto antioxidante de los extractos a) acetónicos y b) metanólicos de ambas colectas de *B. mexicana*, sobre el radical ABTS<sup>•+</sup>.

### 4.3. Método de reducción férrica FRAP

Para la prueba de reducción del ión férrico (FRAP) los extractos de *B. mexicana* obtenidos de ambas colectas mostraron valores similares (cuadro 9). Los que presentaron mayor capacidad de reducción férrica fueron los metanólicos, con valores de 110.42 y 117.68 mgET/g, que corresponden con 11.0 y 11.8% de reducción para las colectas  $t_{lluvias}$  y  $t_{seca}$  respectivamente.

**Cuadro 9.** Actividad antioxidante de los extractos de *B. mexicana* sobre el ión férrico

Colecta (Temporada)	Extracto	mgET/g	% de reducción férrica
Lluvias	Hexánico	18.34 ± 0.06	1.83
	Acetónico	63.46 ± 0.19	6.34
	Metanólico	110.42 ± 8.55	11.0
Seca	Hexánico	10.06 ± 0.28	1.00
	Acetónico	76.60 ± 6.74	7.66
	Metanólico	106.09 ± 3.04	10.6

mgET/g: mg equivalentes de Trolox por gramo de extracto.

## Discusión

La especie *Beiselia mexicana* tiene importancia etnobotánica y económica para la población humana en la que se encuentra. En el presente trabajo se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de la especie colectada en diferentes épocas del año, los resultados mostraron diferencias notables, lo que permite evidenciar que los extractos metanólicos son productos de uso potencial como agentes antioxidantes, como se detalla a continuación.

Respecto a los rendimientos, los extractos metanólicos mostraron mayor rendimiento, en comparación con los acetónicos y hexánicos (cuadro 2), lo que indica que la especie presenta una alta proporción de compuestos polares. En cuanto al contenido de compuestos fenólicos en los extractos, se obtuvo que la concentración de este grupo de metabolitos secundarios en la corteza de *B. mexicana* presentó una alta variación, que fue desde 1.81 hasta 223.81 mgEAG/g de extracto, y que los extractos acetónicos y metanólicos mostraron mayor concentración de fenoles, en comparación con los hexánicos.

La mayor concentración de compuestos fenólicos la presentó el extracto acetónico- $t_{seca}$ , con 223.81 mgEAG/g, seguido del extracto metanólico- $t_{seca}$  con 37.51 mgEAG/g. Los resultados obtenidos son diferentes, en comparación con lo mencionado por otros autores, quienes han reportado mayor concentración de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos, como lo es el trabajo de Prabhakar y colaboradores, en el 2017, quienes trabajaron con tallos de *Bursera penicillata* y reportaron una cifra de 174.9 mgEAG/g para el extracto metanólico.

De igual forma, se observaron diferencias en las concentraciones de compuestos fenólicos entre las distintas temporadas de colecta, ya que se obtuvo mayor concentración en los extractos de las muestras colectadas durante la temporada seca. Las diferencias mencionadas pueden atribuirse a los factores bióticos y abióticos con los que interactúa la planta. Respecto a lo mencionado, Gracia, en el 2009, reportó que durante la temporada seca las especies vegetales sintetizan una mayor cantidad de compuestos fenólicos, como los flavonoides, los cuales son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes agresores externos del medio en el que se desarrollan, como la radiación UV, los microorganismos y animales herbívoros. En este caso, al existir condiciones más

agresivas para la especie durante la temporada de seca, esta podría verse en la necesidad de generar una mayor cantidad de fenoles para ayudarse a resistir los diversos agentes externos.

En los análisis por HPLC se pudo observar la presencia de grupos fenólicos en los extractos acetónicos y metanólicos obtenidos de la corteza de *B. mexicana*. Específicamente, en los extractos acetónicos se detectaron flavonoides y fenilpropanoides, en comparación con los metanólicos, en los cuales únicamente se detectaron fenilpropanoides. Las proporciones de los grupos de fenoles mencionados fueron muy similares para los extractos obtenidos de la corteza colectada en ambas temporadas (29% flavonoides y 71% fenilpropanoides en el extracto acetónico-*t<sub>seca</sub>* y 24.73% flavonoides y 75.27% fenilpropanoides en el extracto acetónico-*t<sub>lluvias</sub>*; 100% fenilpropanoides en ambos extractos metanólicos), lo que sugiere que la síntesis de estos grupos de metabolitos secundarios no se ve afectada por los factores abióticos con los que interactúa la especie, sin embargo, la estructura química de los flavonoides y fenilpropanoides en los extractos si puede ser diferente, lo que se evidencia por los resultados obtenidos de la actividad antioxidante, ya que el extracto acetónico-*t<sub>seca</sub>* fue el que mostró la mayor actividad antioxidante ( $CA_{50} = 21.01 \mu\text{g/mL}$  para el radical DPPH). La alta concentración de fenoles totales en los extractos acetónicos y metanólicos sugieren, en primera instancia, el potencial antioxidante que se puede esperar de los extractos obtenidos de la corteza de *B. mexicana*.

De acuerdo con los resultados de la cromatografía de gases, realizada a los extractos hexánicos, seis compuestos fueron identificados en el extracto hexánico-*t<sub>lluvias</sub>* y tres en el extracto hexánico-*t<sub>seca</sub>* (cuadro 6). Los compuestos encontrados fueron, en gran parte, hidrocarburos saturados en el extracto hexánico-*t<sub>lluvias</sub>* y ácidos orgánicos en el hexánico-*t<sub>seca</sub>*. En este sentido, la baja concentración de fenoles en los extractos mencionados explica el bajo poder antioxidante presentado en las pruebas realizadas, ya que los compuestos fenólicos representan uno de los principales grupos de metabolitos secundarios cuya concentración se correlaciona con la capacidad antioxidante que tienen las especies vegetales (Kuskoski *et al.*, 2005).

En el caso particular de las especies del género *Bursera*, se han reportado principalmente grupos de fenoles como fenilpropanoides y flavonoides (Bah *et al.*, 2014), a los cuales se les atribuye la actividad antioxidante, sin embargo, es

importante mencionar que pueden presentarse interacciones antagonistas o sinergistas entre compuestos fenólicos y otros grupos de metabolitos secundarios, que pueden potenciar o inhibir la actividad antioxidante (Guevara *et al.*, 2017).

En el presente trabajo el efecto antioxidante de los extractos fue evaluada por tres métodos, debido a que los compuestos antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o el tipo de radicales libres que se forman en los sistemas biológicos (Palomino *et al.*, 2009). Los extractos acetónicos y metanólicos mostraron actividad antioxidante con valores de  $CA_{50}$  menores a 200  $\mu\text{g/mL}$ , lo que sugiere que son buenos agentes antioxidantes, de acuerdo con lo reportado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Gardziella *et al.*, 2000).

En la prueba de reducción del radical DPPH, la mayor actividad antioxidante se observó en el extracto acetónico- $t_{seca}$ , que de igual manera fue el que presentó mayor contenido de fenoles totales, lo que hace evidente la relación existente entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante. Sin embargo, en las pruebas de la actividad de los extractos frente al radical  $ABTS^{\bullet+}$  y con el reactivo FRAP, los extractos metanólicos presentaron mayor poder antioxidante en comparación con los acetónicos.

La diferencia en la actividad antioxidante de los extractos frente a los radicales DPPH y  $ABTS^{\bullet+}$  se puede deber a que el radical DPPH es más selectivo que el radical  $ABTS^{\bullet+}$  y, a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Palomino *et al.*, 2009), de esta forma la reactividad de los compuestos presentes en los extractos aportan información relevante sobre su naturaleza química.

En el caso de los extractos hexánicos, éstos presentaron valores de  $CA_{50}$  de 3349.44 y 2921.51, para los extractos  $t_{lluvias}$  y  $t_{seca}$  respectivamente frente al radical DPPH, estos valores son muy superiores a los que se requieren para que los extractos puedan considerarse buenos antioxidantes, lo que permite afirmar que los extractos hexánicos no poseen actividad antioxidante. Además, el contenido de fenoles totales en los extractos hexánicos fue muy bajo en comparación con los metanólicos y acetónicos, lo que evidencia la relación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante en los extractos vegetales.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con Moustapha y colaboradores, quienes en el 2014 reportaron que el extracto hexánico, obtenido de la corteza de *Bursera simaruba*, produjo un poder reductor insignificante para los ensayos DPPH, ABTS<sup>•+</sup> y FRAP.

Por otra parte, los extractos metanólicos y acetónicos presentaron una mayor actividad antioxidante en las pruebas DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, en comparación con lo reportado por otros autores, como Prabhakar *et al.*, quienes en el 2017 reportaron que el extracto etanólico de *Bursera penicillata* mostró valores de CA<sub>50</sub> de 131.75 y 149.34 µg/mL, frente a los radicales DPPH y ABTS<sup>•+</sup> respectivamente. En su estudio mencionaron que el extracto metanólico mostró el mayor poder antioxidante de los extractos que evaluaron.

A diferencia de lo mencionado, en el presente estudio los valores más altos de CA<sub>50</sub> fueron los obtenidos por los extractos acetónico-t<sub>seca</sub> (21.01 µg/mL) y metanólico-t<sub>seca</sub> (28.35 µg/mL). Los resultados reportados por Prabhakar *et al* y los obtenidos en el presente estudio muestran que los extractos acetónico y metanólico de *B. mexicana* poseen mayor actividad antioxidante, en comparación con otras especies del género *Bursera*, lo que permite sugerir que la especie tiene importancia medicinal confirmada y que puede ser usada como antioxidante.

Estos resultados indican que el uso de los extractos de la corteza de *B. mexicana* puede ayudar a generar medicamentos, con el fin de reducir los radicales producidos en las células y generados por las reacciones propias del metabolismo en las que interviene el oxígeno molecular y trazas de iones metálicos, tales como Fe<sup>+3</sup> y Cu<sup>+2</sup>, que atacan los dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, dando como consecuencia la producción de diferentes radicales (González, 2006). Un ejemplo de esto es la peroxidación de lípidos de las membranas biológicas, proceso conocido como lipoperoxidación, que tiene como producto final al malondialdehído. La toxicidad de este producto se debe a su alta reactividad con proteínas y ADN para formar productos modificados de bases nitrogenadas como la pirimidopurinona, que es altamente mutagénica y carcinogénica (Gutiérrez *et al.*, 2014).

Los resultados contribuyen con información relevante que amplía el conocimiento de las propiedades medicinales de *B. mexicana* que permite evidenciar el efecto antioxidante de la especie al interactuar con diferentes condiciones ambientales. La

evaluación de la actividad antioxidante de la especie abre un parteaguas para la investigación dirigida a la obtención de productos del metabolismo secundario con propiedades antioxidantes en la especie, lo que es de importancia debido a la problemática mundial que representan las enfermedades causadas por estrés oxidativo, como el cáncer de la que se ha reportado un aumento en la incidencia de casos, tanto en México como en el mundo.

## Conclusiones

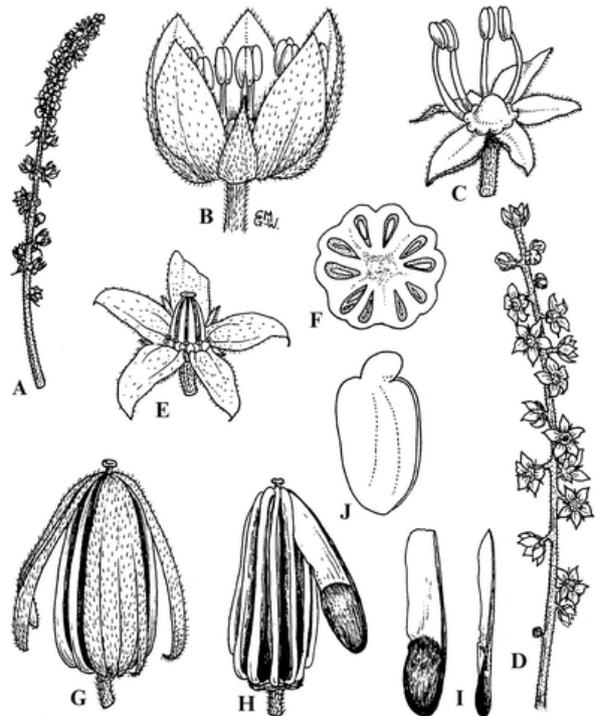
- Los extractos *Beiselia mexicana* posee actividad antioxidante.
- Los extractos con mayor rendimiento fueron los metanólicos.
- El extracto acetónico- $t_{seca}$  mostró el mayor contenido de fenoles totales (22.38%), seguido de los metanólicos de ambas colectas (7.67 y 3.75% para  $t_{lluvias}$  y  $t_{seca}$  respectivamente).
- Las proporciones de los grupos de fenoles en los extractos fueron muy similares para los extractos obtenidos de la corteza colectada en ambas temporadas.
- Los fenoles en los extractos acetónicos son fenilpropanoides y flavonoides; en los extractos metanólicos son únicamente fenilpropanoides.
- El extracto hexánico- $t_{lluvias}$  está constituido principalmente por hidrocarburos saturados; el hexánico- $t_{seca}$  contiene principalmente ácidos orgánicos.
- Los extractos acetónico- $t_{seca}$  y metanólico- $t_{lluvias}$  presentaron la mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH.
- Los extractos metanólicos de ambas colectas mostraron mayor actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup> y mayor poder reductor frente al ión Fe<sup>+3</sup>.
- La concentración de compuestos fenólicos en los extractos mostró una relación directa con la actividad antioxidante, ya que el extracto acetónico- $t_{seca}$  presento la mayor capacidad antioxidante y el mayor contenido de fenoles totales.
- Los resultados confirman el efecto antioxidante de *B. mexicana* y sugieren la posibilidad de utilizarla en el tratamiento de enfermedades causadas por estrés oxidativo.

## Apéndice 1

### Descripción botánica de *B. mexicana*

*B. mexicana* es un árbol resinífero de 8 a 10 m de alto, posee un tronco de hasta 1 m de diámetro, de corteza coriácea y coloración rojiza a marrón oscuro, armada lateralmente con protuberancias puntiagudas en la base de los peciolo, estos últimos poseen un largo de 7mm aproximadamente, los cuales persisten a la caída de hojas. La corteza vieja se torna de color gris, las hojas son estipuladas, imparipinnadas y deciduas; la hoja terminal presenta un peciolo que es más extendido dorsoventralmente en la base, las hojas laterales son sésiles y con márgenes dentados (Forman *et al.*, 1989).

La planta es dioica con inflorescencia axilar, pseudorracemosa, presenta flores masculinas cimosas compuestas de 1-3 fascículos, y flores femeninas a lo largo del eje (Forman *et al.*, 1989) (figura 7). El fruto es dehiscente, presenta un exocarpo delgado con abundantes tricomas glandulares y 11-13 líneas de dehiscencia, cuando el fruto madura las líneas de dehiscencia se abren dejando ver de 10 a 12 pirenos separados por tabiques mesocárpicos, al centro del fruto se observa una columnela amplia (Forman *et al.*, 1989 y Ramos-Ordoñez *et al.*, 2015). El embrión es recto, de color blanco, los cotiledones son planos y enteros. La germinación es epigea, el hipocótilo es elongado y las primeras hojas son simples (Forman *et al.*, 1989)



**Figura 7.** *B. mexicana*. **A:** inflorescencia masculina. **B:** flor masculina. **C** y **E:** flor femenina. **D:** inflorescencia femenina. **F:** sección transversal del ovario. **G, H, I, J:** estructuras del fruto. (Forman *et al.* 1989; dibujo de C. Grey-Wilson; citado en Daly *et al.*, 2010).

## **Apéndice 2**

### **Método de maceración (Domínguez, 1973)**

El método de maceración consiste en la obtención del extracto con solventes orgánicos a partir del material vegetal. Para ello se coloca el material vegetal seco y pulverizado en un matraz y se agrega el solvente apropiado, de acuerdo con el extracto que se desea obtener (hexano, acetona, metanol, etcétera).

Se deja reposar durante 24 horas, se filtra el extracto y se evapora el exceso de solvente a presión reducida. La extracción se realiza cuantas veces sea necesario para obtener el máximo rendimiento. Finalmente se permite que el solvente se evapore totalmente, el extracto se pesa y con ello se determina el rendimiento del extracto, expresándolo en gramos y en porcentaje.

### **Apéndice 3**

#### **Método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965)**

El método de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los fenoles totales en una muestra orgánica. El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que, en presencia de un fenol, se torna azul. La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 760 nm. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico, que es utilizado como estándar de referencia. En el presente trabajo el método se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una curva de calibración con ácido gálico, a partir de una solución estándar con una concentración de 0.2 mg/mL, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 y 0.12 mg/mL) para un volumen final de 1 mL. Para el análisis de fenoles totales en los extractos, se prepararon soluciones estándar de cada muestra con una concentración de 0.2 mg/mL. Se colocó una alícuota de 300  $\mu$ L de cada muestra en tubos de ensayo con 1800  $\mu$ L de agua destilada, posteriormente se adicionaron 150  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu a cada tubo. Después de cinco minutos de incubación, se añadieron 450  $\mu$ L de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) y agua, hasta completar un volumen de 3000  $\mu$ L. Los tubos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Cada concentración se determinó por triplicado. Después del tiempo de reacción, se determinó la absorbancia a 760 nm y se graficó la concentración contra la absorbancia. Para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realizó un análisis de regresión lineal y se interpoló la absorbancia de las muestras a evaluar. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco.

## Apéndice 4

### **Método de reducción del radical DPPH** (Método modificado de Murillo, 2006)

El método de reducción del radical DPPH se utiliza para evaluar la actividad antioxidante de las sustancias de interés (compuestos o extractos) y consiste en una reacción de óxido-reducción en la que el radical DPPH se reduce al aceptar un electrón de la sustancia antioxidante. La reacción puede observarse por el cambio de color, de violeta intenso a amarillo claro, que puede medirse espectrofotométricamente a 515 nm.

En el presente trabajo el procedimiento fue el siguiente: en una placa de 96 pozos se adicionaron por triplicado 50 µl de los extractos a diferentes concentraciones, a cada pozo se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 µM. La placa se incubó en la oscuridad y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 515 nm en un lector de ELISA. Se determinó el porcentaje de decoloración del DPPH, correspondiente con el porcentaje de reducción. Como estándar de referencia se utilizó quercetina (2 a 20 µg/mL) y como blanco se incluyeron pozos con 200 µL de metanol. La actividad antioxidante 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 de los pozos con extractos (Mezcla DPPH + compuesto problema).

## Apéndice 5

### Reacción con el radical 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolin- 6- sulfonato de amonio (ABTS<sup>•+</sup>) (Método modificado de Re *et al.*, 1999)

La capacidad antioxidante de los extractos se evalúa mediante la cuantificación de la decoloración del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>, lo cual se debe a su reducción al interaccionar con moléculas donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> es un cromóforo color verde-azulado, estable que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio.

El radical ABTS<sup>•+</sup> se produce utilizando una mezcla de reacción que contiene solución de ABTS (7 mM/L) y solución de persulfato de potasio (2.45 mM/L) en agua destilada. La solución de trabajo se prepara mezclando las dos soluciones stock en cantidades iguales y se deja 16 horas a temperatura ambiente en la obscuridad. La disolución ABTS<sup>•+</sup> se diluye mezclando 1 mL de solución ABTS<sup>•+</sup> con 60 mL de metanol para obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  unidades a 734 nm. En tubos de ensaye se hacen reaccionar por triplicado 300  $\mu$ L de la muestra de extracto o fracción con 2700  $\mu$ L de la solución ABTS<sup>•+</sup>. La mezcla resultante se agita y se permite su reacción en la obscuridad por 7 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lee la absorbancia de la mezcla de reacción a 734 nm (se mide el cambio de absorbancia a 734 nm de la solución ABTS<sup>•+</sup> cuando alcanza el estado estacionario). El Trolox se usa como estándar de referencia el cual se prepara en metanol al 80% y se prepara bajo las mismas condiciones del extracto. El porcentaje de reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ reducción} = (A_c - A_m) / A_c \times 100$$

Donde:  $A_c$  = media aritmética de la absorbancia del control;  $A_m$  = la media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Se reporta la  $CA_{50}$  del compuesto antioxidante frente al radical ABTS<sup>•+</sup>. La disminución de la coloración es expresada como el porcentaje de reducción de ABTS<sup>•+</sup>.

## Apéndice 6

### Poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP por sus siglas en inglés)

(Método modificado de Benzie y Strain, 1996)

El método FRAP determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se fundamenta en la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar un electrón al  $\text{Fe}^{3+}$  (oxidado) para pasar a  $\text{Fe}^{2+}$  (reducido). El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del  $\text{Fe}^{2+}$ . De tal manera que cuanto más antioxidante es la sustancia mayor es la reducción y mayor es la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y es más alta la señal de absorbancia.

En este ensayo se preparan las siguientes soluciones:

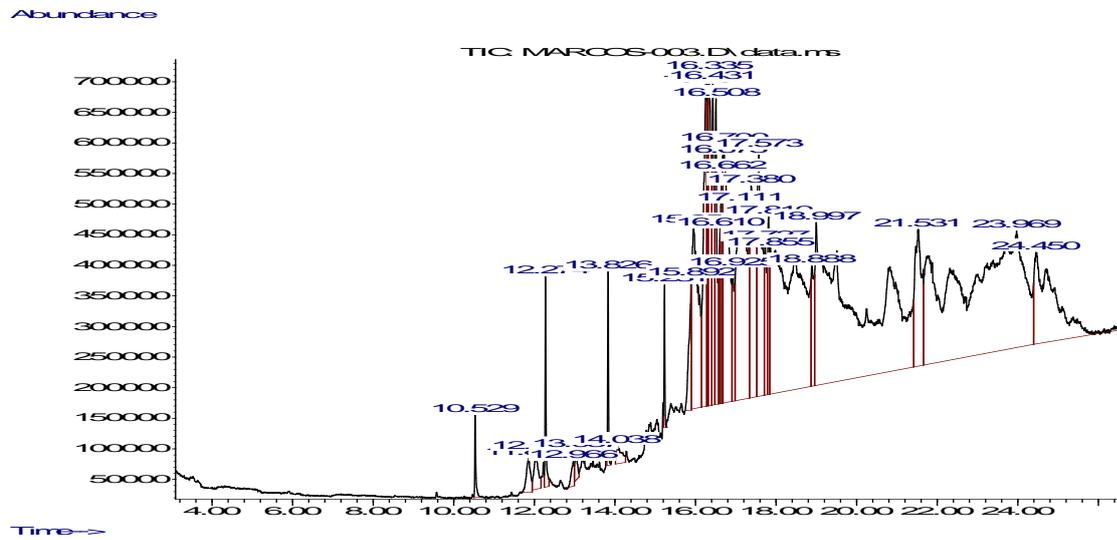
- a) 300 mM de amortiguador de acetato pH 3.6 (acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial).
- b) 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridol-s-triazina) en 40 mM de HCl
- c) 20 mM  $\text{FeCl}_3$

Procedimiento:

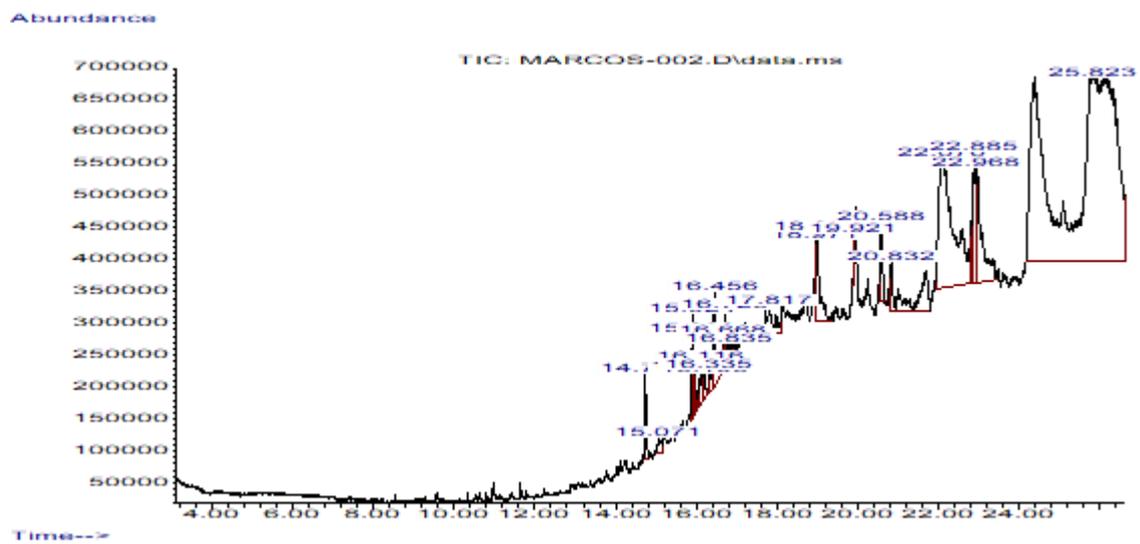
Las soluciones descritas se mezclan en una relación a:b:c 10:1:1 (v/v/v) para obtener la mezcla de reactivos FRAP, la cual debe mantenerse durante todo el proceso en un baño a 37 °C. En tubos de ensaye se adicionan por triplicado 300  $\mu\text{L}$  de extracto (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 2700  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reactivos (FRAP), el blanco consiste en 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 2700  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP. Los tubos se incuban 10 min a temperatura ambiente y se lee a una absorbancia de 593 nm. La absorbancia final de las muestras se compara con la una curva estándar de trolox. Los resultados se expresan como mg equivalentes de trolox por gramo de extracto (mgET/g).

Anexo 1  
Cromatogramas (CG-MS)

a)



b)



**Figura 8.** Cromatograma obtenido del análisis por CG-MS a los extractos hexánicos. Colecta de la temporada de a) lluvias, b) seca

## Literatura citada

- Arraya, H., Clavijo, C., y Herrera, C. (2006). *Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivadas en Chile*. Archivos latinoamericanos de nutrición, 56. Disponible en <http://goo.gl/uchRTT> (Consulta: mayo de 2018).
- Arriaga, H. (2011) *Evaluación del potencial antioxidante de extractos de especies de bursera, matricaria y cymbopogon mediante técnicas electroquímicas*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México. Disponible en <http://goo.gl/nuZzKw> (Consulta: mayo de 2018).
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, 2 (3): 119-145.
- Bah. M., Gutiérrez-Avella, D. M., Mendoza, S., Rodríguez-López, y Castañeda-Moreno R. (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.
- Becerra, J. X., Noge, K., Olivier, S. y Venable, D. L. (2012) *The monophyly of Bursera and its impact for divergence times*. Taxon, 61 (2): 333-343. Disponible en <http://goo.gl/HhcRLy>.
- Beisel, W. K. (1982). *Die aufregende Geschichte vom Götterbaum. Kakteen und andere Sukkulente*, 33 (9): 210-211. Disponible en <http://goo.gl/ZGSsqU>
- Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. (1996). *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay*. Analytical Biochemistry, 239: 70-76. Disponible en <http://goo.gl/UCUqL1>.
- Berra, B., Caruso, D., Cortesim N., Fedeli, E., Rasetti, M. F. y Galli, G. (1995) *Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol on human LDL*. Revista Italiana Sost Grasse, 72: 285-291.
- Causse, C. (2010). *Los secretos de salud de los antioxidantes*. España: Hispano Europea.
- Chazaro, B. M., Mostul B. L. y García. L. F. (2010) *Los copales mexicanos (Bursera spp.)*, Bouteloua, 7: 57-70.
- CONABIO, NaturaLista (2018). *Beiselia mexicana*. Disponible en <http://goo.gl/gcHMYo>.
- Daly, D. C., Harley, M. M., Martínez-Habibe, M. C., Weeks, A (2010). Burseraceae. En: Kubitzki, K. (eds) Flowering Plants. Eudicots. The Families and Genera of

- Vascular Plants, Vol 10. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Domínguez, X. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México. Ed. Limusa.
- Forman, L. L. (1987). *A new genus of Burseraceae from Mexico*. Kew Bulletin, 42(1): 262. Disponible en <http://goo.gl/ZLmeS8>.
- Forman, L. L. Branham, P. E., Harley, M. M. y Lawrence, T.J. (1989). *Beiselia mexicana (Burseraceae) and its affinities*. Kew Bulletin, 44(1): 1-31. Disponible en <http://goo.gl/FA2Uu7>.
- Gardziella, A., Pilato, L. A. y Knop (2000). *Phenolics Resins*. Segunda edición. Alemania: Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- González, I. (2006). *Radicales libres Algunas consideraciones clínicas*. Gaceta Médica de Caracas.
- Gracia M. A. (2009). *Cuantificación de Fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. Universidad Autónoma de Querétaro. Revista Académica, pp. 1-4.
- Guerra, E. (2001). *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. Anales de Medicina Interna, 18: 326-335.
- Guevara, F., Muñoz, O., Llanos, R., Zuñiga, R., Cárdenas, V., Contreras, J., y Ocampo, B. (2017). *Flavonoides de trece especies del género Bursera con potencial antioxidante*. Polibotánica, 44:185-193. Disponible en <http://goo.gl/GP9f8s>.
- Gutiérrez, J., Mondragon, P., García, L., Hernández, S., Ramírez, S. y Núñez, N. (2014). *Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno*. Revista de Especialidades Médico Quirúrgicas, 19: 446-454. Disponible en <http://goo.gl/jyEB6q>.
- Hernández, R. y Gally, J. (1981). *Plantas medicinales*. México: Pax México.
- Konigsber, M. (2008) *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas*. México: El Manual Moderno.
- Kuskoski, E. Marta, Asuero, Agustín G., Troncoso, Ana M., Mancini-Filho, Jorge, y Fett, Roseane. (2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos*. Food Science and Technology, 25(4), 726-732.
- Medel J. (2014). *Solicitud de inclusión a la NOM-059-SEMARNAT de la especie Beiselia mexicana Forman*. Disponible en <http://goo.gl/E7ps3Q>.
- Moustapha, B., Gutiérrez, D., Mendoza, S., Rodríguez, V. 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. Disponible en <http://goo.gl/BjdZ3Y>.
- Murillo, F. E. (2006). *Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas*. Universidad de Panamá, Instituto de Alimentación y Nutrición (IANUT), Laboratorio Bioquímica de Alimentos y Nutrición.
- Palomino, G., García, P., Gil, G., Rojano, A. y Durango, R. (2009). *Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de antioquia (colombia)*. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 16: 388-395. Disponible en <http://goo.gl/Y4YCSQ>
- Porras-Loaiza, A. P. y López-Malo, A. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Temas selectos de Ingeniería de alimentos. 3: 121-134.
- Prabhakar, T., Sridhar, G. y Rajashekhar, A. (2017). *Study on in vitro assessment of antioxidant activity of bursera penicillata engl (burseraceae) STEM*. International Journal of Pharmacy & Technology. Disponible en <http://goo.gl/giMXdX>.
- Ramos-Ordoñez, M. F., Arizmendi, M. C. y Márquez, J. G. (2015). *Síndrome de dispersión de semillas de Beiselía mexicana basado en sus características estructurales*. Memorias del V Congreso Mexicano de Ecología. Sociedad Científica Mexicana de Ecología A.C. México. Disponible en <http://www.scme.mx/v-congreso-ecologia/images/memorias-final.pdf>
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. A. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS•+ radical cation decolorization assay*. Free radical Biology and Medicine. 26: 1231-1237. Disponible en <http://goo.gl/qeNsge>.
- Robert, Y. (2003). *The antioxidant health plan*. España. Madrid: EDAF.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H. y Rocha Sosa, M. (2003). *La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas*. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(3): 355-363.
- Shahidi, F. y Naczki, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Londres: CRC Press. Londres.
- Singleton V. y Rossi J. (1965). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents*. American Journal of Ecology and Viticulture, 144-153. Disponible en <http://goo.gl/CxLReA>.
- Taufert, G., Jiménez, L. y Calvo, A. (2015). *Capacidad antioxidante y contenido de*

*fenoles totales de Hyptis spp., P. Heptaphyllum, T. Panamensis, T. Rhoifolia, y Ocotea sp.* Orinoquía's Science Research Group, Universidad Nacional de Colombia. Disponible en <http://goo.gl/ZNV4wd>.

The plant list. (2013). Burseraceae. Disponible en <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Burseraceae>

UICN. (1997) *UICN Red List of Treatedened Plants*. Disponible en <http://goo.gl/gZvpx2>.

Valverde, T., Meave, J., Carabias, J. y Cano, Z. (2005). *Ecología y medio ambiente*. México: Pearson.