



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO *IN VITRO* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE  
CORTEZA DE DIEZ ESPECIES DEL GÉNERO *Bursera*  
SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ALFA-  
AMILASA Y ACETILCOLINESTERASA de *Tenebrio*  
*molitor*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

PATRICIA DENNIS RODRÍGUEZ TOVAR



DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. PATRICIA GUEVARA FEFER  
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.

**1. Datos del alumno.**

Rodríguez  
Tovar  
Patricia Dennis  
55 30 10 57 40  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310211000

**2. Datos del asesor**

Dra  
Patricia  
Guevara  
Fefer

**3. Datos del sinodal 1**

Q.A.  
Verónica  
Muñoz  
Ocotero

**4. Datos del sinodal 2**

Dr.  
René de Jesús  
Cárdenas  
Vázquez

**5. Datos del sinodal 3**

M. en C.  
Ramiro  
Cruz  
Durán

**6. Datos del sinodal 4**

Biol.  
Jorge Fernando  
Rojas  
Gutiérrez

**7. Datos del trabajo escrito**

Efecto *in vitro* de extractos orgánicos de corteza de diez especies del género *Bursera* sobre la actividad enzimática de alfa-amilasa y acetilcolinesterasa de *Tenebrio molitor*.

58 páginas.

2019

## **Agradecimientos**

A la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero por el apoyo técnico brindado durante la obtención de los extractos y la realización de las pruebas biológicas.

Al M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero por el apoyo técnico brindado en el análisis químico de los extractos.

Al M. en C. Fidel Ocampo por el apoyo técnico brindado durante la recolecta de las especies.

Al M. en C. Rubén San Miguel Chávez, por el apoyo brindado en la determinación de ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, por su enseñanza y apoyo durante los ensayos biológicos.

Al jurado asignado por la revisión del trabajo y por los acertados comentarios.

Gracias mi asesora, la Dra. Patricia Guevara Fefer, por todo su apoyo tanto académico como personal durante todo este tiempo, por su enorme comprensión y enseñanza continua.

Gracias a mi familia, a mis padres y mi hermana, por todos los principios y valores que sembraron en mí desde pequeña, por todo aquello que han hecho por mí, los admiro y los amo.

A todas esas personas especiales que encontré durante mi paso por la facultad y fuera de ella, a mis compañeros del laboratorio por dejarme aprender tanto de ustedes, pero sobre todo a amigos Paulina, Priscila, Jocelynn y Yersain por siempre estar presentes, por vivir junto a mí tantas experiencias, han sido parte fundamental de esto.

Principalmente gracias a Dios, por mostrarme su sabiduría y su amor siempre:

“Todas vuestras cosas sean hechas con amor” 1<sup>a</sup>Corintios 16:14

# Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes .....	3
3.1 Metabolismo secundario en plantas.....	3
3.1.1 Metabolismo secundario como defensa en plantas.....	5
3.1.2 Uso e importancia de los metabolitos secundarios.....	9
3.2 Compuestos con actividad insecticida.....	12
3.3 Inhibidores enzimáticos.....	17
3.4 El género <i>Bursera</i> .....	19
3.4.1 Composición química y actividad biológica del género <i>Bursera</i> .....	21
4. Justificación.....	26
5. Objetivo general.....	27
5.1 Objetivos generales.....	27
6. Materiales y métodos.....	28
6.1 Análisis químico de los extractos.....	30
6.2 Evaluación de la actividad biológica.....	33
7. Resultados y discusión .....	35
7.1 Rendimiento de los extractos.....	35
7.2 Análisis de los extractos.....	36
7.3 Evaluación de la actividad biológica.....	44
8. Conclusiones.....	49
9. Bibliografía.....	50

## Resumen

Diferentes especies del género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) han sido reportadas por presentar compuestos que exhiben actividad biológica tanto *in vivo* como *in vitro* frente a insectos y microorganismos, así como actividad citotóxica y antiinflamatoria. Dentro del perfil químico del género se incluyen metabolitos secundarios como flavonoides, triterpenos, sesquiterpenos, lignanos, ésteres, entre otros.

En el presente trabajo se obtuvieron extractos vegetales de *Bursera* empleando disolventes de distinta polaridad (diclorometano y metanol) de cortezas recolectados en el estado de Morelos durante el mes de septiembre de 2015. Se evaluó la actividad biológica a partir de un ensayo de inhibición enzimática *in vitro* de alfa amilasa y acetilcolinesterasa sobre *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), cuyos resultados mostraron que en cinco de las diez especies hubo una disminución en la actividad en al menos una de las enzimas evaluadas, siendo alfa amilasa la que tuvo los menores índices de concentración mínima inhibitoria.

El análisis cromatográfico para los extractos de diclorometano, detectó un perfil rico en terpenos a partir del patrón de coloración en presencia del revelador anisaldehído y con diferentes porcentajes relativos de cada una de las manchas observadas en la placa y la presencia de los estándares utilizados como alfa amirina, lupeol, ácido ursólico y ácido oleanólico.

El análisis de los extractos metanólicos reveló la presencia de flavonoides con un contenido significativo para cada extracto, mientras que en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), los flavonoides empleados como estándares:(rutina, florizidina, mirecetina, quercetina, naringenina, floretina, galangina, apigenina) estuvieron presentes en todas las especies aunque en distintita abundancia; sin embargo, de los estándares de ácidos fenólicosempleados en el HPLC su presencia fue limitada (ácido gálico, clorogénico, siríngico, caféico y ferúlico) solo para ciertos extractos y en diversas concentraciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos muestran que el género *Bursera* representa una alternativa para la obtención de compuestos con actividad biológica importante.

## Introducción

En los últimos años, productos derivados de las plantas, han sido considerados como una alternativa importante para el control de insectos plaga (Pillmoor *et al.*, 1993) debido a que sintetizan compuestos para defenderse del ataque de herbívoros (Harbone, 1997), demostrando que la aplicación de extractos obtenidos a partir de ellas tiene la capacidad de producir algún efecto inhibitorio sobre éstos organismos (Grainge y Ahmeds, 1988 en Philogene *et al.*, 2004). Dicho efecto ha sido atribuido a los metabolitos secundarios, los cuales son compuestos biosintetizados del metabolismo primario y a menudo tienen un papel ecológico, siendo atractores para la polinización, representando adaptaciones químicas al estrés ambiental, o como defensa química contra microorganismos, insectos, bacterias u otros depredadores e incluso otras plantas (aleloquímicos). (Balandrin *et al.*, 1985)

En el caso del género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae), estudios fitoquímicos han reportado la presencia de metabolitos secundarios como lignanos, bilignanos, flavonoides, flavonoides glucosílicos, esteroides, alcanos alifáticos de cadena corta, acetatos, alcoholes, cetonas y terpenos. (Alonso-Castro *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2000; Evans y Becerra, 2006; Hernández-Hernández *et al.*, 2005; Peraza-Sánchez *et al.* 1995 en Cárdenas *et al.* 2012) por lo que han sido investigados para un amplio rango de actividades biológicas y para el caso de potencial como insecticidas, dichos extractos exhiben diferentes modos de acción como el arresto de aminoácidos, disrupción de la ecdisis e inhibición de ciertas enzimas (Cárdenas *et al.*, 2012).

En este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de los extractos orgánicos como bioinsecticida de diez especies del género *Bursera* (*B. lancifolia*, *B. fagaroides*, *B. grandifolia*, *B. longipes*, *B. morelensis*, *B. copallifera*, *B. submoniliformis*, *B. biclor*, *B. bipinnata*, *B. linanoe*) sobre larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), así como llevar a cabo un análisis químico para comparar los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto.

Las enzimas probadas fueron acetilcolinesterasa y alfa-amilasa, las cuales son enzimas de gran importancia en la fisiología de los insectos, responsables de la transmisión de impulsos nerviosos y la correcta digestión.

Para identificar la presencia de terpenos, fenoles, flavonoides y ácidos fenólicos se llevaron a cabo distintas pruebas como la cuantificación, cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia, con el fin de correlacionar los efectos de su actividad biológica con la composición química de las especies evaluadas.

## **Antecedentes**

### **Metabolismo secundario en plantas**

Un rasgo característico de las plantas es su capacidad para sintetizar una enorme variedad de compuestos de bajo peso molecular, éstos son llamados metabolitos secundarios. A pesar de la enorme variedad de metabolitos secundarios, el número de las correspondientes rutas biosintéticas básicas es restringido y distinto. Los precursores usualmente derivan de las vías metabólicas básicas, como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato (Figura 1).

Los principales grupos de metabolitos secundarios son:

#### Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). La biosíntesis de este grupo de estos compuestos proviene de la ruta del ácido mevalónico o del metileritritol fosfato, a partir de la cual se forman las unidades de isopreno (5 átomos de carbono) y a partir del número de unidades que contienen se clasifican de la siguiente manera: los terpenos de 10 carbonos contienen dos unidades C<sub>5</sub> y se llaman monoterpenos; los de 15 carbonos tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 carbonos tienen cuatro unidades C<sub>5</sub> y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 carbonos, los tetraterpenos tienen 40 carbonos y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

#### Compuestos fenólicos

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran los flavonoides y se conoce que muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro y sus dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos son la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico.

#### Compuestos nitrogenados (alcaloides)

Los alcaloides, son compuestos orgánicos de origen natural, nitrogenados (generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de distribución restringida por lo que contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. Respecto a su biosíntesis, los aminoácidos precursores son:

- Aminoácidos precursores de la ornitina y la lisina
- Aminoácidos aromáticos el ácido nicotínico, la fenilalanina, la tirosina, el triptófano, el ácido antranílico y la histidina.
- Además de estos aminoácidos, intervienen también bases púricas, unidades terpénicas y derivadas del acetato.

La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) y se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

### Glicósidos

Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiotónicos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos.

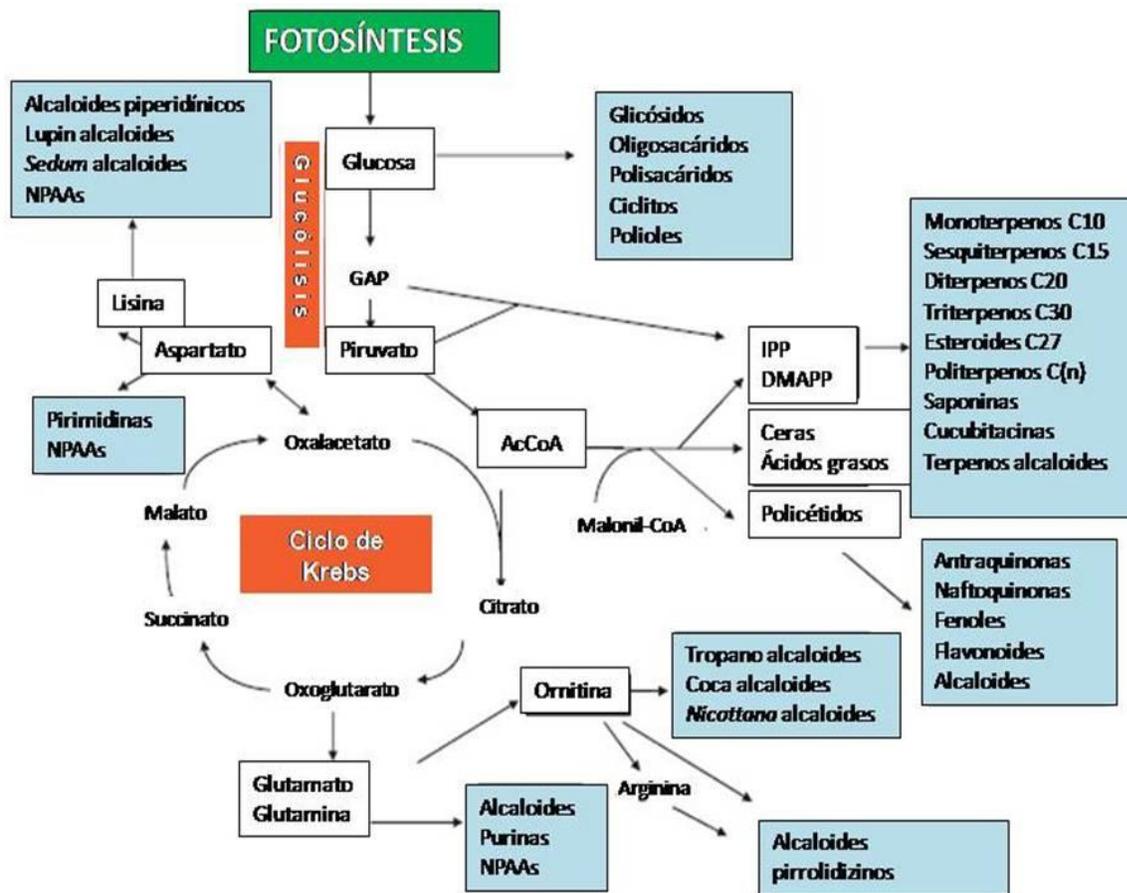


Figura 1. Principales vías que conducen a la síntesis de metabolitos secundarios. IPP, Isopentenildifosfato; GAP, gliceraldehído-3- fosfato; NPAAs, aminoácidos no protéicos; AcCoA, Acetil coenzima A.

Tomado y modificado de Annual plant review (Wink, Michael. 2010)

## Metabolismo secundario como defensa en plantas

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa frente a condiciones de estrés biótico y abiótico como la síntesis de metabolitos secundarios, de los cuales se tiene un numeroso registro hasta la fecha (Tabla 1) y los cuales son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran 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 las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico.

Tabla 1. Número de metabolitos secundarios conocidos en plantas superiores.

Tipo de metabolito secundario	Número <sup>a</sup>
<i>Contienen un grupo nitrogenado</i>	
Alcaloides	21 000
Aminoácidos no protéicos	700
Aminas	100
Glucósidos cianogénicos	60
Glusinolatos	100
Alcamidas	150
Lectinas, péptidos y polipéptidos	2000
<i>Sin nitrógeno</i>	
Monoterpenos (C10)	2500
Sesquiterpenos (C15)	5000
Diterpenos (C20)	2500
Triterpenos, esteroides, saponinas (C30, C27)	5000
Tetraterpenos (C40)	500
Flavonoides, taninos	5000
Fenilpropanoides, lignina, cumarinas, lignanos	2000
Poliacetilenos, ácidos grasos, ceras	1500
Policétidos	750
Carbohidratos, ácidos orgánicos	200

<sup>a</sup> Número aproximado de estructuras conocidas. Tomado de *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition* (Wink, Michael 2010).

## Función de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas.

La herida que se produce tanto por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, con condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de la invasión de microorganismos patógenos. Estos genes codifican para proteínas involucradas en a) la fortificación de la pared celular, como son la formación de calosa, lignina y las proteínas ricas en hidroxiprolina, b) la producción de inhibidores de proteasas y de enzimas líticas tales como las quitinasas y glucanasas, y c) la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y/o antioxidante (Peña-Cortés y Willmitzer, 1995 en Harborne, 2003). Para estos últimos, la actividad biológica, el modo de acción y el nivel al que estos actúan se puede agrupar de la siguiente forma:

- Toxinas

Las toxinas adquieren su toxicidad porque son capaces de alterar los procesos metabólicos normales en el organismo. Éstos adquieren carácter de mortales dependiendo de factores, como la concentración de la toxina o el estado físico del organismo (Harborne, 1993).

- Hormonas de insecto

Las hormonas juveniles son indispensables en el crecimiento larval, así como en las etapas previas a la metamorfosis, éstas se encuentran relacionadas estructuralmente con los terpenos. En las plantas podemos encontrar varios análogos de las hormonas juveniles, el desequilibrio que éstas provocan en el ciclo de vida de los insectos puede tener distintas consecuencias, que pueden ir desde detener las etapas larvales hasta alcanzar la muerte por efectos secundarios (Harborne, 1993). Adicionalmente, algunas plantas presentan compuestos anti hormonas, como el precoceno, estos compuestos inhiben la síntesis de hormonas alterando el desarrollo normal del ciclo de vida del insecto acelerando el paso de larva a adulto, lo que deriva en adultos imperfectos (Bowers, 1991 en Harborne, 1993) y en algunos casos también infértiles (Brooks *et al.*, 1979 en Harborne 1993).

- Disuasores de la alimentación

Los disuasores de la alimentación (fago-inhibidores) son metabolitos secundarios de origen natural que, al contacto con los palpos labiales y maxilares de los insectos, producen un rechazo de consumo, de manera que modifican su comportamiento alimenticio, evitando el consumo de las plantas por parte de los insectos herbívoros. La eficacia de los disuasores de la alimentación dependerá del estado fisiológico del insecto, así como de su respuesta conductual al entrar en contacto por primera vez con el disuasor y en los encuentros subsecuentes.

Adicionalmente se debe considerar que muchos disuasores de la alimentación pierden efectividad tras la exposición prolongada frente al herbívoro; ejemplo de éstos son algunas especies de la familia Convolvulaceae (Foster y Harris, 1997).

- Antialimentarios

Desde investigaciones realizadas en el siglo pasado, la investigación en este campo ha crecido tanto que se cuenta ya con un registro de cerca de 900 compuestos con actividad antialimentaria (Koul, 2005). Este tipo de sustancia producen un cambio en la afinidad de ciertas especies para ser consumidas principalmente por insectos, ejemplos de estos son la azadiractina y los diterpenos del clerodano (Isman, 2006).

- Inhibidores de proteasas

Algunas plantas son capaces de sintetizar inhibidores de proteasas como respuesta a un daño por insectos herbívoros. Este tipo de sustancias interfieren con la digestión de las proteínas e indirectamente disminuyen el valor nutricional de la planta. Al evitar que el depredador sea capaz de aprovechar los aminoácidos contenidos en las proteínas de la planta, disminuye el aprovechamiento de las mismas por parte de éste (Lawrence y Koundal, 2002 en Harborne, 1993).

- Volátiles atraentes de depredadores

En algunas ocasiones la depredación de tejido vegetal por parte de los herbívoros libera al ambiente sustancias volátiles características que son capaces de alertar a un predador del herbívoro en cuestión, es decir se dispara una relación tritrófica planta-herbívoro-depredador. Cabe señalar que este tipo de moléculas no sólo son detectadas por los depredadores, sino también por otras plantas de la misma especie, que reaccionan a dicha señal previendo una posible depredación por parte de un herbívoro.

- Ligandos de receptores e inhibidores de enzimas

Existe un grupo de compuestos químicos de carácter hidrofóbico con una gran afinidad por los receptores nicotínicos de acetilcolina en insectos, estas sustancias tienen una relación estructura-actividad con dichos receptores; esto provoca una excitación que desencadena parálisis y con el tiempo la muerte. Estos compuestos son altamente selectivos debido a la alta afinidad que tienen hacia estos receptores específicos de los insectos (Tomizawa, 1995 en Ishaaya, 2001).

Muchos compuestos hidrofóbicos están asociados con la inactivación de proteínas e inhibición de enzimas; una particularmente susceptible es la acetilcolinesterasa (Hansch y Deutsch, 1996 en Ryan y Byrne, 1998). La acetilcolinesterasa es la enzima responsable de la hidrólisis de la acetilcolina transformándola en colina y ácido acético, en las sinapsis colinérgicas del sistema nervioso central y el periférico. La inhibición de esta enzima aumenta la concentración y la acción de acetilcolina (Rollinger *et al.*, 2004 en Di Giovanni *et al.*, 2008).

Los canales dependientes de voltaje y del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) así como los receptores de glutamato son sitios de acción para cierto tipo de compuestos insecticidas. La excitación o inhibición de éstos provoca una alteración de las señales nerviosas en el sistema nervioso central, lo que produce contracciones involuntarias y temblores (Ishaaya, 2001).

## Uso e importancia de los metabolitos secundarios

Algunos de los usos más comunes de las plantas a partir de la obtención de sus compuestos secundarios son los siguientes:

### Aditivos

Los aceites esenciales son mezclas altamente concentradas, volátiles e hidrofóbicas de productos químicos extraídos de las plantas. Los aceites generalmente consisten en una mezcla compleja de decenas a cientos de terpenos de bajo peso molecular.

Los aceites esenciales tienen propiedades características de sabor y fragancia, y muchos también poseen otras actividades biológicas. La industria alimentaria los usa como aromatizantes (por ejemplo, refrescos, alimentos, confitería), la industria cosmética los utiliza para su fragancia (por ejemplo, perfumes, productos para el cuidado de la piel y el cabello) y la industria farmacéutica los usa para propiedades funcionales (por ejemplo, la actividad antimicrobiana).

### Medicinal

- Etnobotánica

Las medicinas en forma de extractos, tés, tinturas o cápsulas producidas a partir de plantas se conocen como fitofármacos, fitomedicinas o hierbas y se han realizado ensayos clínicos para muchas hierbas medicinales, donde en su mayor parte se sabe qué componentes son responsables del efecto medicinal (Houghton, 2001). Los medicamentos fitofarmacéuticos están estandarizados en términos de los componentes activos. Ejemplos de fitofármacos populares son el extracto de *Ginkgo biloba* para mejorar la función cognitiva (O'Hara *et al.*, 1998), la hierba de San Juan para el tratamiento de la depresión leve (Bilia *et al.*, 2002), ginseng como tónico general y potenciador cognitivo (Attele *et al.*, 1999), el jengibre contra las náuseas y los vómitos (Ernst y Pittler, 2000) y la palma enana americana para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna sintomática (Kaplan, 2005). Algunos ejemplos más de hierbas medicinales populares se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Ejemplos de hierbas medicinales de uso común en las plantas. (Lubbe y Verpoorte, 2011)

Planta	Compuestos activos	Fuente	Uso terapéutico
<b>Equinácea</b>	Alquilamidas y otros compuestos	<i>Echinacea purpurea</i> (Asteraceae)	Modulador inmune
<b>Ginseng</b>	Ginsenósidos, eleuteroides	<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Fatiga, estrés
<b>Palma enana</b>	Fitoesteroles, ácidos grasos	<i>Serenoa repens</i> (Arecaceae)	Hiperplasia prostática benigna
<b>Ginkgo</b>	Ginkgólidos (terpenotrilactonas), flavonol glucósidos	<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	Fatiga mental, deterioro cognitivo

Continuación Tabla 2

<b>Planta</b>	<b>Compuestos activos</b>	<b>Fuente</b>	<b>Uso terapéutico</b>
<b>Hierba de San Juan</b>	Hiperforinas	<i>Hypericum perforatum</i> (Hypericaceae)	Depresión ligera
<b>Valeriana</b>	Glicósidos iridoides, terpenoides, ácido valeriánico e isovalérico	<i>Valeriana officinalis</i> (Caprifoliaceae)	Ansiolítico, mejora del sueño
<b>Ajo</b>	Alicina	<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae)	Colesterol alto, hipertensión, infecciones respiratorias
<b>Santa María</b>	Lactonas sequiterpénicas	<i>Tanacetum parthenium</i> (Asteraceae)	Migrañas, inflamación
<b>Efedra</b>	Alcaloide	<i>Ephedra sinica</i> (Ephedraceae)	Congestión, estimulante, supresor del apetito
<b>Hierba de San Cristóbal</b>	Triterpeno glucósidos	<i>Cimicifuga racemosa</i> (Ranunculaceae)	Síntomas premenstruales, dismenorrea
<b>kava</b>	Kavalactones	<i>Piper methysticum</i> (Piperaceae)	Ansiolítico

- Productos farmacéuticos

- 

En la industria farmacéutica convencional, las compañías farmacéuticas producen medicamentos a partir de compuestos extraídos de material vegetal, o utilizan compuestos derivados de plantas como material de partida para producir fármacos de forma semi-sintética (Houghton, 2001). Los compuestos derivados de plantas juegan un papel importante en la producción de medicamentos y más del 25% de los medicamentos farmacéuticos que se usan en el mundo hoy en día se derivan de productos vegetales naturales (Farnsworth, 1979 en Schmidt *et al.*, 2008).

Tabla 3. Ejemplos de compuestos aislados usados comúnmente en plantas. (Lubbe y Verpoorte, 2011)

Compuesto	Clase química	Fuente	Uso terapéutico
<b>Morfina, codeína</b>	Alcaloides	<i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)	Analgésico, antitusivo
<b>Paclitaxel</b>	Alcaloide diterpeno	<i>Taxus spp.</i> (Taxaceae)	Anticanceroso (ovárico y otros)
<b>Quinina</b>	Alcaloide quinina	<i>Cinchona spp.</i> (Rubiaceae)	Antimalaria
<b>Vinblastina, vincristina</b>	Alcaloide bis-indol	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)	Anticanceroso (leucemia)
<b>Camptotecina</b>	Alcaloide indol	<i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)	Antineoplásico
<b>Galanthamine</b>	Alcaloide isoquinolina	Varios miembros de Amaryllidaceae	Contra la enfermedad de Alzheimer leve, la demencia
<b>Artemisinina</b>	Lactona sesquiterpénica	<i>Artemisia annua</i> (Asteraceae)	Antimalaria
<b>Podofilotoxina</b>	Lignano	<i>Podophyllum spp.</i> (Berberidaceae)	Antiviral, antineoplásico
<b>Pilocarpina</b>	Alcaloide Imidazol	<i>Pilocarpus spp.</i> (Rutaceae)	Glaucoma, xerostomía
<b>Escopolamina</b>	Alcaloides de tropano	<i>Atropa belladonna</i> (Solanaceae)	Sedante, contra el mareo por movimiento
<b>Atropina</b>	Alcaloides de tropano	<i>Hyoscyamus spp.</i> (Solanaceae)	Antiespasmódico, dilatador de la pupila

### Fitoprotectores

Existe una larga historia de uso de plantas como fuente de productos fitosanitarios contra insectos, microbios y malezas. A mediados del siglo XX, los pesticidas químicos sintéticos se volvieron dominantes y el uso de botánicos disminuyó. La acción potente y rápida de los productos sintéticos condujo a grandes aumentos en los rendimientos de los cultivos en muchas partes del mundo. Sin embargo, con

estas mejoras surgieron efectos no deseados como la destrucción de organismos benéficos, la interrupción de la polinización, contaminación del agua subterránea, envenenamiento humano crónico y agudo, y resistencia en poblaciones de plagas. En los últimos años, las preocupaciones sobre estos problemas han resultado en la prohibición o restricción de compuestos peligrosos, y un movimiento hacia el uso de otros menos dañinos.

Las plantas son una fuente atractiva ya que su metabolismo se ha adaptado para tratar las plagas en su entorno. Algunos compuestos o extractos se pueden utilizar directamente, y otros sirven como precursores para la producción de agentes utilizados como malas hierbas, insectos o patógenos de plantas protectores (Copping y Duke, 2007 en Dayan *et al.*, 2009). Varios productos derivados de plantas se utilizan actualmente para controlar plagas de insectos, patógenos microbianos y malas hierbas.

### **Compuestos de plantas con actividad insecticida**

La investigación básica sobre la ecología química de los insectos ha demostrado que la actividad de los metabolitos secundarios es variada y que muchos de ellos poseen actividad biológica sobre los insectos, alterando su alimentación, desarrollo, reproducción o comportamiento (Schoonhoven, 1982, en Sepúlveda *et al.*, 2004). Sin embargo, sólo un bajo porcentaje de las plantas terrestres han sido evaluadas como fuente de aleloquímicos para el control de insectos (Bowers, 1993, en Sepúlveda *et al.*, 2004).

Sin embargo, han reportado ser candidatos por poseer compuestos insecticidas que podría ser una alternativa efectiva para el manejo de insectos plaga. Los metabolitos secundarios (como flavonoides, terpenos, fenoles, alcaloides, esteroides, ceras, lípidos, taninos, azúcares, gomas, suberinas, resinas, carotenoides, etc) actúan como defensa contra microorganismos patógenos y plagas de invertebrados. (Wink y Schimmer, 1999). Los aceites vegetales de varias plantas son tóxicos para diferentes tipos de insectos plaga, algunos ejemplos son: *Artemisia judaica* mostró actividad antialimentaria contra *Spodoptera littoralis* (Abdelgaleil *et al.*, 2008), *Nigella sativa* contra *Callosobruchus schinensis* (Chaubey, 2008), *Eucalyptus tereticornis* contra organismos maduros de *Anopheles stephensi* (Nathan *et al.*, 2008), *Litsea pungens* y *Listea cubeba* contra *Trichoplusia ni* (Jiang *et al.*, 2009), *Chloroxylon swietenia* contra *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* (Kirany Devi, 2007), *Calocedrus decurrens* y *Juniperus occidentalis* contra adultos de *A. aegypti*, *Xenopsylla cheopis* *Ixodes scapularis* (Dolan *et al.*, 2007), *Chenopodium ambrosioides* contra *Planococcus citri*, *Frankliniella occidentalis* (Cloyd y Chiasson, 2007), romero contra *Agriotes obscurus* (Waliwitiya *et al.*, 2005) etc. Esto se debe a que, a partir de estudios realizados a aceites de origen vegetal, se ha demostrado su complejidad, efectos ecológicos y económicos y su potencial para manejo de plagas. (Rattan, 2010)

Dentro de las especies con actividad biológica con efecto insecticida se reportan las siguientes tres clases químicas de metabolitos secundarios:

Alcaloides. Estos compuestos son insecticidas a bajas concentraciones y también tóxico para vertebrados. Su modo de acción varía, pero la mayoría afecta los receptores de acetilcolina en el sistema nervioso o la membrana de los canales de sodio. Ejemplos de esto incluyen la nicotina (*Nicotiana spp.*), anabasina (*Anabasis aphylla*), veratrina (*Schoenocaulon officinale*) y rianodina (*Ryania speciosa*). Estos químicos no son volátiles y han sido encontrados en grandes cantidades en muchos miembros de las familias Berberidaceae, Fabaceae, Solanaceae y Ranunculaceae, todas las cuales han sido extensamente usadas como repelentes de insectos tradicionales (Secoy y Smith, 1983; Johnson, 1998 en Rattan, 2010).

Fenoles. Los compuestos fenólicos se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo (-OH), unido a un anillo bencénico o a otra estructura compleja de anillos aromáticos, por ejemplo: catecol, resorcinol, hidroquinona, pirogalol, etc.

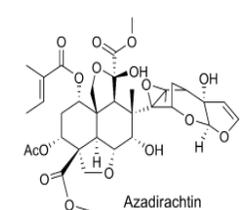
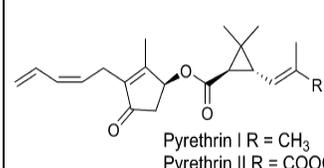
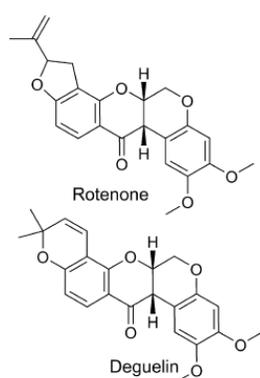
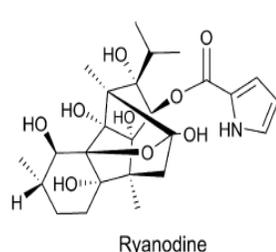
Van desde un simple fenol (encontrado en aceite esencial de *Pinus sylvestris*) a polifenoles como los pigmentos antocianinas y taninos. Los taninos hidrolizables del roble son bien conocidos como fenólicos, los cuales pueden influir negativamente el crecimiento de organismos como la polilla gitana (Rossiter *et al.*, 1988 en Rattan, 2010). Los fenoles por lo anterior, han sido reconocidos como una de las defensas más importantes contra insectos en diversos estudios (Berbehenn y Martin, 1994; Berbehenn *et al.*, 1996; Henn, 1997 en Rattan, 2010). Sin embargo, su modo de acción en específico no es totalmente claro hasta el momento.

Terpenos. Son extensamente usados en alimentos, en sectores farmacéuticos y de belleza, así como en un amplio rango de aplicaciones farmacológicas. Los terpenos son el grupo más grande de productos naturales en plantas y abarcan aceites esenciales, saborizantes, fragancias y pigmentos vegetales liposolubles. Estos compuestos hidrofóbicos están usualmente contenidos en plantas dentro de canales resiníferos, células lipídicas o tricomas glandulares (Wink y Schimmer, 1999 en Rattan, 2010). Son derivados de unidades de isopreno de 5 carbonos.

Las mezclas de terpenos que contienen compuestos con propiedades físicas diferentes pueden ser más tóxicas y con mayor persistencia. Los terpenos sinergizan los efectos de otras toxinas actuando como solventes para facilitar su paso a través de las membranas. Un ejemplo de sinergismo ocurre en resinas de coníferas, las cuales son mezclas de monoterpenos con actividad de anti herbivoría y anti patógenos y diterpenos que son tóxicos para herbívoros.

Algunos de los insecticidas de origen vegetal más utilizados y comercializados se muestran en la siguiente tabla: (Dayan *et al.* 2009)

Tabla 4. Productos naturales para el manejo de insectos (Dayan, *et al.* 2009)

Producto	Descripción	Actividad	Estructura
Productos basados en Neem	Se obtiene de las semillas del árbol <i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae). La semilla de neem contiene numerosos análogos de azadiractinas.	A nivel fisiológico, la azadiractina bloquea la síntesis y liberación de hormonas responsables de la muda (ecdisteroides) y actúa de manera similar en las hembras conduciendo a la esterilidad	 <p>Azadirachtin</p>
Pyrethrum	Oleorresinas extraídas de las flores secas de <i>Tanacetum cinerariifolium</i> (Asteraceae) y es la fuente de piretrinas, crisantematos y piretratos.	Acción neurotóxica, la cual bloquea cerrando los canales de voltaje de sodio-potasio en axones nerviosos.	 <p>Pyrethrin I R = CH<sub>3</sub> Pyrethrin II R = COOCH<sub>3</sub></p>
Rotenona	Son preparaciones provenientes de las plantas del género <i>Derris</i> o <i>Lonchocarpus</i> (Leguminosae). El principal insecticida comercial proviene del extracto de la raíz de <i>Lonchocarpus utilis</i> y <i>Lonchocarpus urucu</i> .	Bloquea la respiración por la inhibición del transporte de electrones al complejo I.	 <p>Rotenone Deguelin</p>
Preparaciones de <i>Ryania speciosa</i>	Ryania es un insecticida obtenido de raíces y tallos de <i>Ryania speciosa</i> . Ryania contiene entre 0.16-0.2% de la ryanodina bioactiva, un complejo policíclico, diterpeno polihidroxilico.	Es efecto tanto por contacto como por ingesta. Afecta el flujo de calcio.	 <p>Ryanodine</p>

Continuación Tabla 4

Producto	Descripción	Actividad	Estructura
Sabadilla	Derivado de semillas de plantas del género <i>Schoenocaulon</i> predominantemente de <i>Schoenocaulon officinale</i> . La actividad es atribuida a los alcaloides cevadina y veratridina.	Actúan por contacto o por ingesta afectando de manera neurotóxica.	<p>Cevadine R = <chem>CC(=C)C</chem></p> <p>Veratridine R = <chem>COc1ccc(O)c(O)c1</chem></p>
Nicotina	Provenientes extractos de <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>N. glauca</i> o <i>N. rustica</i> que contienen el alcaloide nicotina.	La nicotina actúa mimetizándose con la acetilcolina, e interactuando con los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), uno de los mayores neurotransmisores excitatorios en insectos, activando un canal catiónico intrónseco.	<p>Nicotine, Eugenol, 1,8-Cineole, Borneol, Camphor, Capsaicin</p>

## Nuevos plaguicidas botánicos con posibilidades de empleo

### Acetogeninas

Tradicionalmente se han utilizado insecticidas de origen botánico elaborados a partir de las semillas de especies de *Annona* spp. Investigaciones detalladas llevadas a cabo en la década de los ochenta guiaron al aislamiento de un gran número de derivados de ácidos grasos de cadena larga, denominados *acetogeninas*, responsables de la actividad plaguicida. La principal acetogenina obtenida de las semillas de *A. squamosa* es la annonin I y un compuesto muy similar conocido como *asimicina*, aislado de la *Asimina tribola* (L.) Dun. (Johnson *et al.*, 1999; McLaughlin *et al.*, 1997 en Isman *et al.*, 2006).

Estudios en otras especies revelaron que en *Annona muricata* L. aparece también la asimicina, junto a la esquamocina y la anonacina, acetogeninas de gran actividad bioplaguicida (Florez y Mesa, 2007 en Isman *et al.*, 2006). El modo de acción de las acetogeninas es idéntico al de la rotenona, bloquea la producción de energía en las mitocondrias, tanto en insectos como en mamíferos (Londershausen *et al.*, 1991).

En su forma pura ciertas acetogeninas son tóxicas para los mamíferos (LD50 < 20 mg/kg), un impedimento para la aprobación de su uso, incluso cuando los extractos estándares de semillas de *Annona* y tallos de *Asimia* son mucho menos tóxicos (Isman *et al.*, 2006).

### Ésteres de sacarosa

A inicios de la década de los noventa del pasado siglo científicos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos se percataron de que los ésteres de azúcar, que normalmente se producen en las hojas de tabaco salvaje (*Nicotiana glauca*), presentaban acción insecticida contra ciertos insectos de cuerpo blando y ácaros (Pittarelli *et al.*, 1993 en Isman, 2006), y patentaron varios productos que emplean estos compuestos como ingrediente activo, destinados fundamentalmente a la jardinería.

### Tendencias actuales en el empleo de plaguicidas de origen vegetal

A nivel mundial se ha extendido el uso de insecticidas de origen natural debido a las tantas ventajas que reporta su uso, las cuales van desde menor riesgo para la salud hasta la rápida degradación y la no presencia de residuos en los cultivos. En la Tabla 5 se evidencia el amplio uso de los plaguicidas de origen vegetal, y es importante destacar que en los países desarrollados se ha apostado también por una agricultura sana y sostenible. A pesar de los cientos de reportes que han aparecido en las últimas tres décadas sobre plantas con actividad plaguicida, solo dos productos se comercializaron exitosamente, aquellos que utilizan la azadiractina del neem y aceites esenciales (Isman *et al.*, 2006).

Tabla 5. Principales productos de origen vegetal empleados como plaguicidas en el mundo. (Isman *et al.*, 2006)

<b>País</b>	<b>Piretro</b>	<b>Rotenona</b>	<b>Nicotina</b>	<b>Nim</b>	<b>Otros</b>
Australia	X	X	-	-	Aceite cítrico
India	X	X	X	X	Ryania
Hungría	X	-	-	-	Quassia
Dinamarca	X	X	-	-	Aceite de limón, clavo de olor y eucalipto
Alemania	X	-	-	X	
Holanda	X	-	-	-	
Inglaterra	X	X	X	-	
Sudáfrica	X	-	-	-	
Brasil	X	X	-	X	Ajo
Estados Unidos	X	X	X	X	Aceites esenciales, ryania y sabadilla
Canadá	X	X	X	-	
México	X	X	-	X	Ajo

## **Inhibidores enzimáticos**

### Inhibidores de acetilcolinesterasa

Se ha reportado que el bloqueo de acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7; acetilcolina hidrolasa) por los compuestos organofosforados, como los insecticidas y otras sustancias, ocasiona rápidamente la muerte por fallas respiratorias (Chatonnet *et al.*, 2003 en Rocha, 2006). La acetilcolina (AChE), participa en la neurotransmisión en sinapsis neuromusculares, y su concentración en las hendiduras sinápticas está regulada por la enzima AChE. La AChE está presente en el tejido nervioso, músculos y células rojas, y cataliza la hidrólisis de acetilcolina a colina y ácido acético, permitiendo la transmisión del impulso neuronal a través de la sinapsis (Chatonnet *et al.*, 2003 en Rocha, 2006). Este mecanismo es utilizado para la neurotransmisión por diversos grupos de animales.

Con el uso rutinario de los inhibidores de AChE, desde mediados del siglo XX, se han reportado más de 500 especies de artrópodos considerados plaga que presentan resistencia ante ellos, demostró que la resistencia de la araña *Tetranychus urticaea* los compuestos organofosforados, estaba relacionada a un cambio estructural en la acetilcolinesterasa, que hacía a la enzima menos reactiva a dichos compuestos. De igual manera, estudios realizados sobre la especie de barrenador de granos resistente a insecticidas organofosforados, *Rhyzopertha dominica*, demostraron que no existían compuestos detoxificantes en el organismo, sino que la resistencia se lograba a causa de la insensibilidad de la enzima ante las sustancias (Guedes y Dover, 1997 en Rocha, 2006).

Para entender el mecanismo de la resistencia de acetilcolinesterasas de insectos hacia sus inhibidores, se ha recurrido al estudio tanto de las proteínas, como de los genes que las codifican.

La presencia de dos acetilcolinesterasas con funciones diferentes en insectos, ha propiciado una serie de investigaciones que buscan definir cuál de las dos es responsable de la resistencia que presentan algunas especies ante insecticidas organofosforados y carbamatos (Kim *et al.*, 2006), lo cual permitiría el desarrollo de sustancias que actúen específicamente inhibiendo la enzima deseada. El estudio de la interacción de inhibidores con la acetilcolinesterasa ha sido útil para resolver el problema de las pérdidas de cultivos por insectos; sin embargo, el uso de pesticidas sintéticos va en descenso (Thacker, 2002 en Rocha, 2006), debido a que existen otro tipo de compuestos que ofrecen alternativas para el control de plagas, que reducirían el daño que provocan los pesticidas convencionales al ambiente.

Una de ellas, es la utilización de reguladores del crecimiento de insectos. Estos compuestos, actúan bloqueando algunas rutas del metabolismo de los insectos alterando la muda.

Aunque el mecanismo de algunos de ellos no es comprendido adecuadamente, se sabe que afectan la síntesis de la quitina, ya sea directamente sobre la enzima quitín sintasa, o bien sobre procesos relacionados a ella.

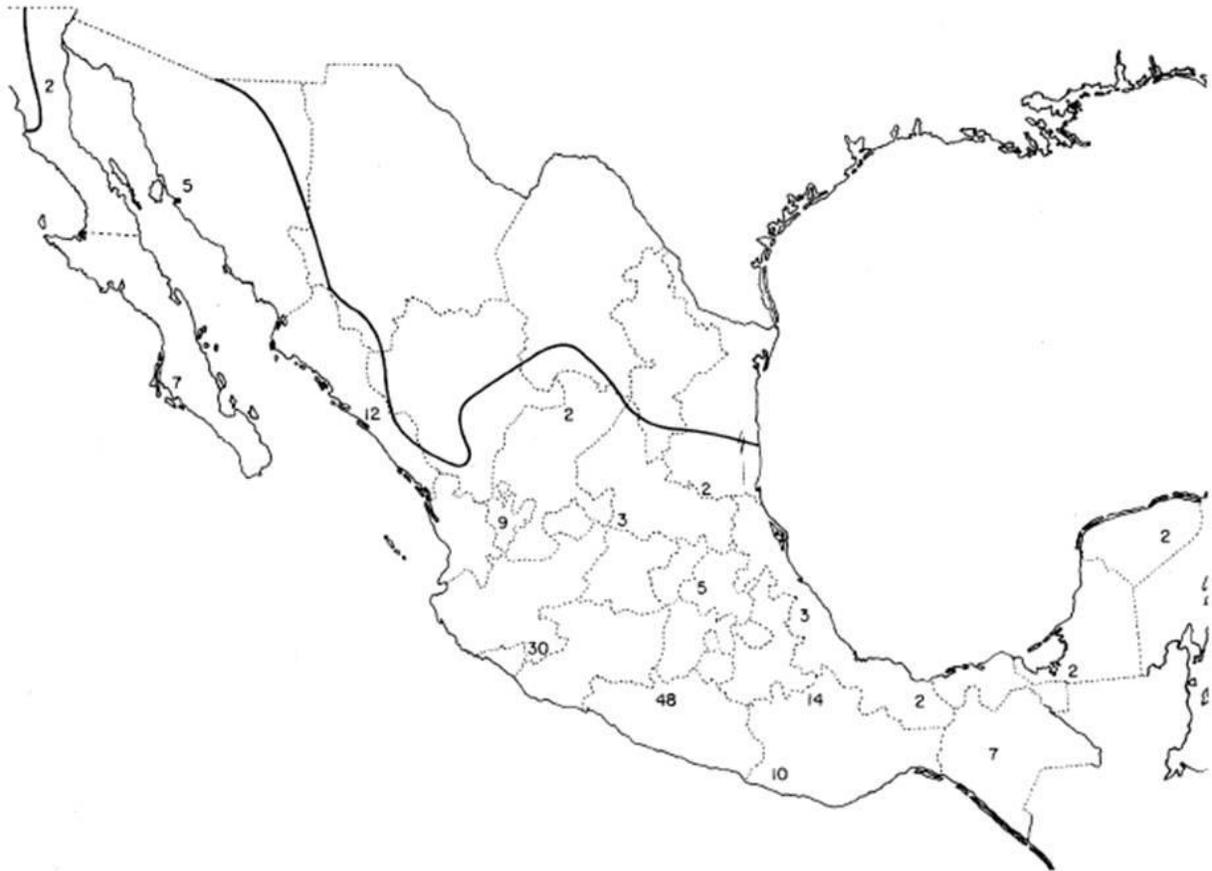
### Inhibidores de $\alpha$ -amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1;  $\alpha$ -1,4,-glucano-4- glucanohidrolasas) son enzimas hidrolíticas ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontradas en animales, plantas y microorganismos. Pertenecen a la familia 13 de las glicanohidrolasas y están encargadas de la degradación de polisacáridos unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4, como lo son el almidón y el glucógeno. También tienen utilización biotecnológica para la degradación de almidón, y en química sintética para la producción de oligosacáridos por transglicosilación. La  $\alpha$ -amilasa más conocida es la de páncreas porcino (PPA, Porcine Pancreatic Amylase). Por lo tanto, los estudios involucrados con la actividad e inhibición de la actividad de  $\alpha$ -amilasas de diversas especies toman como referencia las características de la PPA, cuyo mecanismo ha sido ampliamente descrito (Koukiekolo *et al.*, 1999; Oudjeriouat *et al.*, 2003 en Rocha, 2006). Las  $\alpha$ -amilasas pueden ser inhibidas por una serie de compuestos proteicos y no proteicos (Franco *et al.*, 2000). Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas presentes naturalmente en plantas han sido menos estudiados. La enzima blanco,  $\alpha$ -amilasa, juega un rol crucial en los organismos, entre ellos los que son considerados plagas, por lo tanto el conocimiento del mecanismo de inhibición y la relación entre estructura y función es objeto de diversos estudios. Se han descrito inhibidores presentes en plantas que actúan selectivamente sobre amilasas de insectos sin afectar amilasas de mamíferos (Martins *et al.*, 2001 en Rocha, 2006). Esta característica es una de las más importantes para considerar la utilización de un inhibidor natural como pesticida.

Algunas de las plantas que contienen inhibidores de  $\alpha$ -amilasas son el frijón, amaranto, papa, maíz, trigo y cebada. Estos inhibidores son responsables de la toxicidad de algunas plantas hacia insectos, y su conocimiento es relativamente reciente. Se ha comprobado que la contaminación con un inhibidor de  $\alpha$ -amilasas, y no la lectina fitohemaglutinina, ocasionaba que el producto fuera tóxico contra insectos. En 1990, Moreno *et al.* purificaron y caracterizaron un inhibidor de  $\alpha$ -amilasas, tipo lectina, de la misma especie de frijón. Este inhibidor se encuentra en forma de agregados ( $M_r=32,000$ ) de 5 cadenas peptídicas de  $M_r=14,000$  a 19,000, cuatro de las cuales se encuentran glicosiladas. Este polipéptido es capaz de inhibir  $\alpha$ -amilasas tanto de mamíferos como de insectos, pero no de plantas, por lo que se sabe que es una proteína con funciones de defensa contra depredadores. Para ser activo, el inhibidor debe pasar por un procesamiento postraduccion o activación.

## El género *Bursera*

El género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae), está representado por especies del bosque tropical caducifolio de México, principalmente en la vertiente pacífica, entre Sinaloa y Oaxaca. Su importancia alcanza apogeo a altitudes medias (500-1500m) en la Cuenca del Balsas, donde las especies de *Bursera* son a menudo las dominantes absolutas de la comunidad. Cabe hacer constar que el bosque tropical caducifolio de la Cuenca del Balsas constituye realmente el área de máxima concentración de las especies de *Bursera* (Rzedowski *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa de distribución geográfica conocida del género *Bursera* en México. Los números indican las cantidades de especies registradas para diferentes regiones del país (Rzedowski *et al.*, 2005).

Se reporta que 84 especies pertenecientes al género habitan naturalmente en México, de las cuales, 80 habitan exclusivamente las selvas mexicanas. Es la familia de plantas mexicanas con mayor porcentaje de especies endémicas (95%). Su mayor riqueza y abundancia se encuentra a lo largo de la vertiente del Pacífico, particularmente en la Cuenca del Río Balsas (Rzedowski *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista ecológico, el género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) asume un papel interesante en los ecosistemas de selva baja caducifolia, ya que son los elementos cuantitativamente más importantes y dominantes. Este grupo podría utilizarse como un indicador de climas y quizás de algunos factores ambientales, disminuyendo su frecuencia en sitios alterados ya que suelen ser más abundantes en suelos someros de cerros con laderas de gran pendiente.

Las plantas pertenecientes a este género son típicamente árboles bajos o de estatura mediana (5-15 m de altura). La corteza de sus troncos varía de gris a amarillo y rojo, es delgada y con frecuencia exfoliante. Son notables por su contenido de resina y la mayoría de las especies se destaca por sus sustancias aromáticas volátiles del grupo de los terpenos, de olores más o menos agradables.

Todas las especies de *Bursera* parecen ser plantas rigurosamente caducifolias, perdiendo sus hojas en la temporada seca del año y en general floreciendo al final de la misma, más o menos simultáneamente con la aparición de órganos foliares nuevos.

La forma más característica de las plantas maduras está dada por una ramificación profusa del tronco a poca distancia (0.5-3m) del suelo, de tal manera que el tallo principal pierde pronto su identidad y la copa tiene a ser ancha y redondeada.

Uno de los rasgos que sin duda es el más destacado en un gran conjunto de especies de este género es la corteza de colores vivos, cuyo peridermo está sujeto a una renovación acelerada, pues su capa externa se desgarrá constantemente en tiras de material papiráceo. Sin embargo, las especies de *Bursera* que no presentan el fenómeno de exfoliación, la corteza externa del tronco también es delgada.

Las hojas de *Bursera* son típicamente pinnadas y están constituidas por un número impar de folíolos, que en general suelen ser de consistencia membranácea y color verde claro. Aunque la mayoría de las especies hay 5 o más hojuelas, existen varias trifolioladas y unifolioladas en que este carácter se mantiene constante, así como otras en que el número de tales órganos puede variar entre 1 y 3, 3 y 5 y aún entre límites más amplios.

Respecto a las flores, éstas son más bien pequeñas (2 a 8 mm de diámetro) y se agrupan en inflorescencia de tipo cimoso, que generalmente también son pequeñas, no rara vez reducidas a una sola flor, pero a veces paniculadas o bien fasciculadas. Las flores suelen ser trímeras, tetrámeras o pentámeras en cuanto al cáliz y la corola, mientras que los estambres son numerosos. El ovario es de dos o tres carpelos y lóculos y hay invariablemente dos óvulos por cada lóculo.

En *Bursera* sólo uno de los óvulos se convierte normalmente en semilla y el fruto es una drupa, en la cual puede distinguirse un exocarpio carnoso, un endocarpio óseo y un mesocarpio que asume un papel análogo al de un arilo, variante entre color amarillo, anaranjado o rojo (Rzedowski y Kruse 1979).

## **Composición química y actividad biológica del género *Bursera***

Dentro del género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) son notables las secreciones de terpenos en los canales resiníferos del árbol (Becerra y Venable, 1990; Becerra, 1994), pues es conocido que la composición química del género *Bursera* presenta terpenos, en su mayor parte monoterpenos y sesquiterpenos (Evans *et al.*, 2000). Por otro lado, los compuestos monoterpénicos en especies de *Burseras*, son reportados como biocidas y respecto a su actividad biológica se ha observado un efecto tóxico, el cual puede ser atribuido a un mecanismo de inhibición competitiva reversible por la acetilcolinesterasa, al ocupar el sitio hidrofóbico del centro activo de la enzima (Obeng-Ofori y Amiteye, 2005).

Otros estudios fitoquímicos del género *Bursera* han reportado también la presencia de lignanos, bilignanos, flavonoides, flavonoides glucósidos, esteroides, alcanos alifáticos de cadena corta, acetatos, alcoholes, cetonas y terpenos (Alonso-Castro *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2000; Evans y Becerra, 2006; Hernández-Hernández *et al.*, 2005; Peraza-Sánchez *et al.*, 1995; Souza *et al.* 1989; Zúñiga *et al.*, 2005).

Algunos de los antecedentes más relevantes de los estudios realizados a las especies del género se presentan en el siguiente cuadro:

Tabla 6. Estudios previos de actividad biológica y evaluación fitoquímica para el género *Bursera*

ESPECIE(S) Y PARTE VEGETAL	EVALUACIÓN BIOLÓGICA	EVALUACIÓN FITOQUÍMICA	REFERENCIA
Cortezas de <i>B. grandifolia</i> , <i>B. lancifolia</i> , <i>B. morelensis</i> , <i>B. aptera</i> , <i>B. glabrifolia</i> , <i>B. velutina</i> , <i>B. aloexylon</i> y <i>B. submoniliformis</i>	Actividad antiinflamatoria, mostrándose moderadamente activos <i>B. lancifolia</i> con 16.71% de inhibición.	Identificados en su mayoría monoterpenos, donde alfa-terpinol, terpeno-4-ol, alfa-tujeno, linalool y limoneno fueron los más frecuentes. Algunos extractos con presencia de sesquiterpenos y otros alcanos.	Zúñiga <i>et al.</i> (2005)
Hojas de <i>B. lancifolia</i> y <i>B. copallifera</i> .	Administrado en la dieta, donde hubo una reducción significativa en talla y peso de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Así como inhibición enzimática sobre acetilcolinesterasa por parte de los extractos de acetato de etilo y metanólicos.	Un análisis cromatográfico mostró la presencia de terpenos en extractos de hexano y de acetato de etilo. Flavonoides como la quercetina, detectados en extractos de acetato de etilo y metanol.	Cárdenas <i>et al.</i> (2012)
Hojas y tallos de <i>B. copallifera</i> y <i>B. grandifolia</i> .	Ensayos alimentarios en <i>S. frugiperda</i> donde extractos hexánicos y acetónicos de <i>B. copallifera</i> mostraron efecto en mortalidad y deformidad en el insecto, mientras que los extractos metanólicos de <i>B. grandifolia</i> mostraron mortalidad y deformidad.	No se realizó.	Llanos <i>et al.</i> (2010)
Resinas de <i>B. bipinnata</i> , <i>B. stenophylla</i> , <i>B. copallifera</i> , <i>B. excelsa</i> , <i>B. penicillata</i> , <i>B. grandifolia</i> y <i>B. simaruba</i> .	No evaluado	Estudio de la composición de los triterpenos de los ejemplares de <i>Bursera</i> usando cromatografía de gases y comparándolos con 9 estándares de triterpenos.	Lucero <i>et al.</i> (2014)

Continuación Tabla 6

ESPECIE(S) Y PARTE VEGETAL	EVALUACIÓN BIOLÓGICA	EVALUACIÓN FITOQUÍMICA	REFERENCIA
Resina de <i>B. microphylla</i>	No evaluado	Extractos metanólicos, hexánicos y de diclorometano que presentaron terpenos y lignanos, entre los triterpenos se encontró lupano, ácido oleanólico y damarana.	Gigliarelli <i>et al.</i> (2015)
Corteza, tallo y hoja de <i>B. simaruba</i> <i>B. fagaroides</i> <i>B. microphylla.</i>	No evaluado	Se observó la presencia de lignanos de diferente composición.	Velázquez <i>et al.</i> (2011)
Resina de <i>B. fagaroides</i>	No evaluado	En la resina se identificaron 2 lignanos arytetralin y 2 lignanos dibenzil butirolactona.	Morales-Serna <i>et al.</i> (2013)
Corteza y hoja de <i>B. graveolens</i>	Extracto etanólico presentaron inhibición frente a bacterias. La actividad antiinflamatoria de extracto etanólico y la fracción de éter de petróleo de corteza presentó inhibición, así como el extracto etanólico de hoja.	En fracciones de éter de petróleo y diclorometano se aislaron tres triterpenos tetracíclicos. Identificados como ácido beta-elemónico, alfa-elemónico y ácido 3 alfa-hidroxilirilulaca-7-2,4-denzi-oico.	Robles <i>et al.</i> 2005
Tallos y hojas de <i>B. grandifolia</i> <i>B. aleoxyllon</i> <i>B. lancifolia</i> <i>B. longipes</i> <i>B. aptera.</i>	Actividad antialimentaria y efecto significativo de los aceites esenciales y extractos orgánicos sobre el crecimiento de <i>S. frugiperda</i> .	Detección de monoterpenos, como limoneno, alfa- terpenol, 4-ol-terpineno, alfa- tujerno y linanool como los más abundantes. Algunas especies con presencia de sesquiterpenos e hidrocarburos de cadena larga.	Guevara <i>et al.</i> (2017)

Continuación Tabla 6

ESPECIE(S) Y PARTE VEGETAL	EVALUACIÓN BIOLÓGICA	EVALUACIÓN FITOQUÍMICA	REFERENCIA
Hojas y tallos de <i>B. fagaroides</i>	Extracto clorofórmico con actividad antitumoral.	Aislamiento de los compuestos a los que se atribuye la actividad biológica evaluada, éstos fueron: $\beta$ -peptatina, $\alpha$ -metileter y 5'-desmetoxi- $\beta$ -peltatina $\alpha$ -metileter	Bianchi <i>et al.</i> (2002)
Hojas de <i>B. fagaroides</i>	No evaluado	Se aisló un terpeno glicosado llamado 3'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido de luteolina	Hernández <i>et al.</i> , (2002)
Exudado seco de <i>B. morelensis</i>	Presentaron actividad anticancerosa	Se separó e identificó adeoxipodofilotoxina y un nuevo lignano denominado "morelensino"	Jolad <i>et al.</i> , (1979)
Resina de <i>B. copallifera</i>	Se realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria	Aislamiento de triterpenos pentacíclicos.	Romero, Antonio; <i>et al.</i> (2011)
Extractos de cortezas de <i>B. simaruba</i> <i>B. copallifera</i> <i>B. bipinnata</i> .	Evaluación de actividad antiinflamatoria.	No evaluado	Puebla-Pérez <i>et al.</i> , (2011)
Extracto metanólico de corteza de <i>B. simaruba</i> .	Evaluación de su potencial citotóxico.	Identificación de terpenos, podofilotoxina y ácidos grasos libres.	Moustapha Bah, <i>et al.</i> (2011)

Continuación Tabla 6

ESPECIE(S) Y PARTE VEGETAL	EVALUACIÓN BIOLÓGICA	EVALUACIÓN FITOQUÍMICA	REFERENCIA
Extractos de <i>B. bipinnata</i> <i>B. copallifera</i> <i>B. schelechtendalii</i> <i>B. simaruba</i> .	Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos.	Obtención de las sustancias químicas responsables de la actividad biológica.	Escobedo-Martínez, Carolina <i>et al.</i> ,(2011)
Extracto hexánico de corteza y hojas de <i>B. simaruba</i> .	No evaluado	Identificación de ácidos tetracosanoico, hexacosanoico, octacosanoico, triacontanoico, la beta-amirina, el moretenol, el cicloartanol, el 2, 4-decadienal, y los ftalatos de diisobutilo y dibutilo.	Gutiérrez Avella, Dora Marina <i>et al.</i> ,(2011)

## **Justificación**

El género *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) se caracteriza por la presencia de compuestos como lignanos, flavonoides y terpenos, productos naturales con actividad biológica, por lo que este grupo de plantas es relevante para la búsqueda de compuestos que funcionen como plaguicidas, sin ser contaminantes ni citotóxicos, en el presente trabajo se evaluarán los extractos de corteza de diez especies frente a *Tenebrio molitor* (L.) para determinar su efecto inhibitorio enzimático.

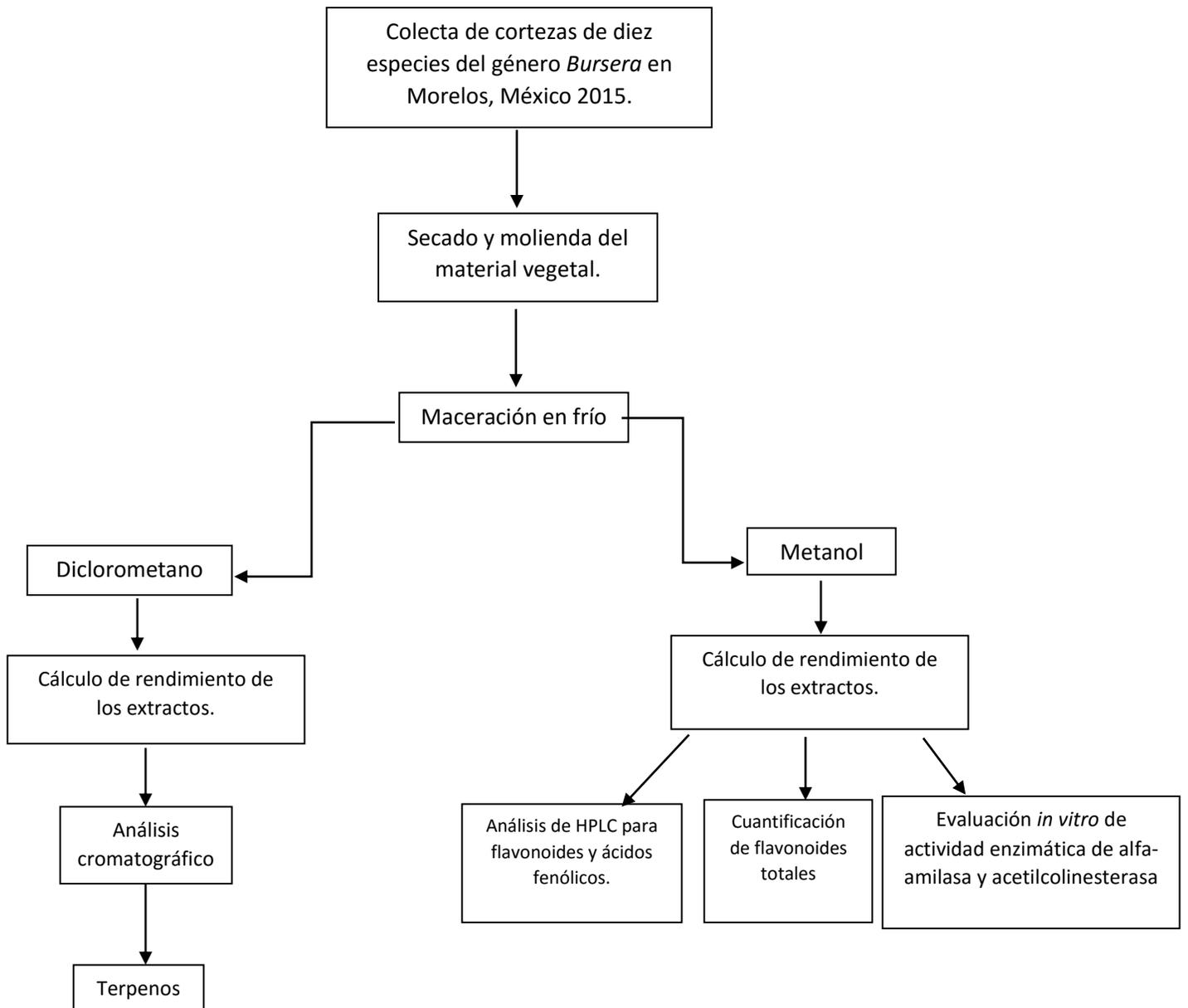
## Objetivo general

Ampliar el conocimiento sobre especies del género *Bursera* con actividad biológica, y el potencial de los compuestos contenidos en extractos orgánicos, sobre la inhibición de las enzimas del modelo biológico *Tenebrio molitor*.

### Objetivos particulares

- Obtención de extractos orgánicos de diclorometano y metanol de las muestras de corteza de diez especies del género *Bursera* recolectadas.
- Llevar a cabo un análisis fitoquímico a fin de comparar el perfil de terpenos y compuestos fenólicos presentes en las diferentes especies.
- Evaluación de la actividad biológica *in vitro* del efecto inhibitorio de los extractos orgánicos sobre las enzimas alfa-amilasa y acetilcolinesterasa de *Tenebrio molitor*.

## Materiales y métodos



## **Recolecta de Material**

El material vegetal de las especies de estudio fue recolectado en el mes de septiembre de 2016 en el estado de Morelos, México. Se recolectaron las cortezas de diez especies de *Bursera*: *B. bicolor* (Willd. ex Schltdl.) Engl., *B. bipinnata* (DC.) Engl (FCME130010), *B. copallifera* (DC.) Bullock (FCME130611), *B. fagaroides* (Kunth) Engl. (FCME162071), *B. grandifolia* (Schltdl.) Engl. (HUAP11769), *B. lancifolia* (Schltdl.) Engl. (HUAP11771), *B. linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina, *B. longipes* (Rose) Standl. (HUAP11779), *B. morelensis* Ramirez (HUAP11780) y *B. submoniliformis* Engl. (HUAP11777), para cada una se preparó un ejemplar de herbario para su posterior identificación taxonómica llevada a cabo por el Biol. Fidel Ocampo y fueron depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

## **Secado del material y obtención de extractos**

Las cortezas recolectadas se dejaron secar a temperatura ambiente, para posteriormente fragmentarse en trozos pequeños y transferirse a frascos de vidrio en los cuales se realizó la maceración en frío con disolventes de polaridad creciente (diclorometano y metanol). El tiempo de maceración con cada disolvente fue de tres días, con tres repeticiones para cada muestra.

La evaporación del disolvente se llevó a cabo por medio de una destilación a presión reducida utilizando el rotavapor (Buchi R-205) para la obtención de extractos secos. Posteriormente se realizó el cálculo de rendimiento de los extractos para cada una de las especies (Tabla 7).

## **Análisis químico de los extractos**

### Cromatografía de capa fina (CCF)

- Extractos de diclorometano

Se realizó una placa cromatográfica con los extractos de corteza y estándares, los cuales fueron: alfa-amirina, beta-sitosterol y lupeol (Mallick, 2014), éstos últimos fueron redisolventes en metanol a una concentración de 1 mg/mL (alfa amirina- 0.6, beta sitosterol- 0.48, lupeol-0.61 y triaconato (0.91), mientras que los extractos se redisolviéron en acetona obteniendo la misma concentración de 1mg/mL, se buscó el mejor sistema de elución, el cual consistió en éter de petróleo: acetato de etilo: acetonitrilo (8.2: 1.8: 0.1), y La placa obtenida fue observada con luz ultravioleta, a distintas longitudes de onda (254 nm, 365 nm y 535 nm) y posteriormente se utilizó el revelador específico para terpenos de anisaldehído (p-anisaldehido, Sigma-Aldrich) (Figura 3).

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados mediante un software de densitometría plana, VideoScan (Wincats) (Tabla 8, figura 4).

- Extractos metanólicos

### **Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC**

Para la identificación de flavonoides, los análisis se llevaron a cabo sobre una columna Hypersi ODS (12540 mm) Hewlett Pakcard Column con una gradiente de agua a un pH 2.5 con TFA (ácido trifluoroacético) y acetonitrilo junto con los siguientes parámetros: flujo de 1mL/min; 30°C de temperatura; volumen de inyección variable y el tiempo de análisis de 25 minutos. Los estándares utilizados fueron Rutina, Florizidina, Mirecetina, Quercetina, Naringenina, Floretina, Galangina, Apigenina (Tabla 9, figura 5).

Para la identificación de ácidos fenólicos, se utilizó una columna Symmetry Shield RP18 (4.63 mm) y un se llevó a cabo mediante un análisis isocrático que fue conducido usando una fase de agua:metanol:acetonitrilo (50:30:20) cuyos parámetros experimentales fueron: flujo de 1mL/min; 179 bar de presión; 20°C de temperatura; volumen de inyección de 20µL; longitud de onda 235nm y un tiempo de análisis de 50 minutos. Los estándares utilizados fueron Ácido gálico, Ácido clorogénico, Ácido siríngico, Ácido vainillílico, Ácido p-hidroxibenzóico, Ácido caféico, Ácido ferúlico y Ácido p-coumárico (Tabla 10, figura 6).

## **Cuantificación de flavonoides totales**

Con el fin de complementar el análisis se utilizaron dos técnicas colorimétrica de flavonoides totales a partir de dos métodos:  $\text{AlCl}_3$  y 2,4-DNPH (Chang *et al.*, 2002; Silva y Paiva, 2012) para flavonas y flavonoles, así como flavanonas y flavanonoles respectivamente.

### *Método del 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Chang *et al.*, 2002)*

Para llevar a cabo este método se comenzó con la preparación de los reactivos como la solución de DNPH, disolviendo 1g de DNPH en 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96% y posteriormente en metanol, así como la solución stock de naringenina mezclando 20 mg de ésta en metanol para la obtención de diferentes concentraciones a partir de diluciones; finalmente se preparó hidróxido de potasio (KOH) al 1% en metanol al 70%.

Para la calibración, a cada alícuota (200 $\mu\text{L}$ ) de las soluciones de DNPH y stock de estándar se añadieron 0.4mL de DNPH 1%, 0.5mL metano para posteriormente incubarse a 50°C durante 50 minutos, transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 1.25mL de KOH 1% en metanol al 70% para ser nuevamente incubados a temperatura ambiente por 2 minutos. A 0.15 mL de la mezcla anterior, se añadió 1 mL de metanol y se centrifugó a 7000 rpm por 5 minutos, seguido de esto se recuperó el sobrenadante y se ajustó a 4mL para su lectura de absorbancia a 495 nm en el espectofotómetro.

Para la cuantificación en el caso de las muestras vegetales, se suspendieron 10mg de muestra en 2.5mL de etanol al 95% y se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de solución de extracto para después realizar el mismo procedimiento que con naringenina (Tabla 11, figura 7).

*Método del  $AlCl_3$  (Silva y Paiva, 2012)*

A partir de la preparación de los reactivos stock de rutina con 1.5 mg/mL en etanol al 95%, una solución de acetato de potasio 1 M y una solución de  $AlCl_3$  10%. A partir de la disolución stock de rutina se realizaron diluciones para obtener las concentraciones finales de 30, 60 y 90  $\mu$ g/mL. A cada alícuota (0.5mL) de las disoluciones anteriores se le añadió 1.5mL de etanol al 95%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M, 2.8 mL de agua destilada y 0.1 mL de  $AlCl_3$ , así como la preparación de un blanco cuyo volumen de  $AlCl_3$  fue reemplazado por agua destilada. Posteriormente se homogeneizó en el vórtex y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para al finalizar el tiempo leer cada tubo a 415 nm.

Una vez concluido el procedimiento se obtiene la ecuación de calibración por regresión lineal. Abscisas= concentraciones. Ordenadas = absorbancia.

Para llevar a cabo la cuantificación con las muestras, se pesaron 10 mg de extracto para disolverse en 2.5 mL de etanol al 95% ajustando con este mismo disolvente a un volumen final de 10 mL. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de solución de extracto, y se llevó a cabo el mismo procedimiento que con rutina en calibración, con lecturas por triplicado, una vez obtenidas las lecturas se reemplazaron los valores de absorbancia en ecuación de calibración (Tabla 12, figura 8).

## Evaluación de la actividad biológica

### Extractos metanólicos

#### Ensayos de inhibición enzimática *in vitro*

##### *Inhibición de acetilcolinesterasa.*

El ensayo se llevó a cabo a partir de una prueba colorimétrica adaptada a microplaca, la cual es una modificación del método de Ellman (Ellman *et al.* 1961) se inició con la obtención de la enzima de adultos de *Tenebrio molitor* (L) en el homogenado de cabeza y tórax de los organismos provenientes de una colonia criada bajo condiciones de laboratorio. Para ello se colocaron en un homogeneizador Dounce con buffer de NaPO<sub>4</sub> (100mM, pH 6.8), posteriormente el homogenado fue centrifugado a 1000 G durante 5 minutos y conservado a 4°C.

La mezcla de reacción contenía buffer de NaPO<sub>4</sub> (100mM, pH8), ácido 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzoico) (0.32mM), yoduro de acetilcolina (0.51 mM) y sobrenadante de homogenado, en un volumen final de 250 uL por pozo. La reacción se inició con la adición de la enzima acetilcolinesterasa y se monitoreó a 405 nm en un lector de microplacas (ELx800, BioTek, USA) durante 5 minutos. Después de ajustar la actividad de la AChE, se sondeó la potencial inhibición de los extractos, para lo cual se pesaron 10 mg disueltos en 200 uL de MeOH y 100 uL de agua (50 mg/mL) también se incluyó un blanco como control (solo adicionando Buffer, acetilcolina y DTNB a la enzima). Aquellos extractos que resultaron activos, fueron evaluados a distintas concentraciones (30.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ug/mL) para calcular la IC<sub>50a</sub> partir del método gráfico (Tabla 13, gráficas 1 y 2).

##### *Inhibición de alfa-amilasa*

Para el ensayo con alfa amilasa, el homogenado se obtuvo a partir de 3 intestinos de organismos adultos de *Tenebrio molitor* (L.) en 2 mL de buffer NaPO<sub>4</sub> (pH 7.2 10 mM), con un homogeneizador Dounce y centrifugado por 10 min a 4000 rpm para su posterior refrigeración a 4°C. Se utilizó un kit comercial (Spinreact S.A., Spain), la absorbancia a 405 nm se cuantificó con un lector de microplacas ELx800 (BioTek, USA) durante 5 minutos.

En el ensayo inicial después de comprobar la actividad enzimática de alfa-amilasa, se agregaron a cada pozo 235 µL de reactivo (Spinreact), 5 µL de solución stock de extracto y 10 µL de homogenado en dilución 1/10 (Tabla 14, gráficas 3-5).

### Tipo de inhibición

Para determinar el modo de inhibición se realizaron ensayos de velocidad inicial contra concentración de sustrato en presencia y ausencia del extracto inhibidor en concentración igual a su  $IC_{50}$  antes calculada. Aplicando el método gráfico de Hanes-Wolf se determinó el tipo de inhibición. La  $IC_{50}$  de los extractos se ensayó bajo las condiciones de la prueba de Ellman usando distintas concentraciones de sustrato. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se analizaron con software (Prism 6.01, GraphPad Software Inc.)

## Resultados y Discusión

### Rendimiento de los extractos

Los resultados acerca del rendimiento de los extractos se presentan en la Tabla 7, en la cual se observa que el mayor rendimiento se presentó en los extractos metanólicos, excepto para *B. bicolor*.

Tabla 7. Rendimiento de los extractos de cada especie de *Bursera* para los diferentes disolventes empleados.

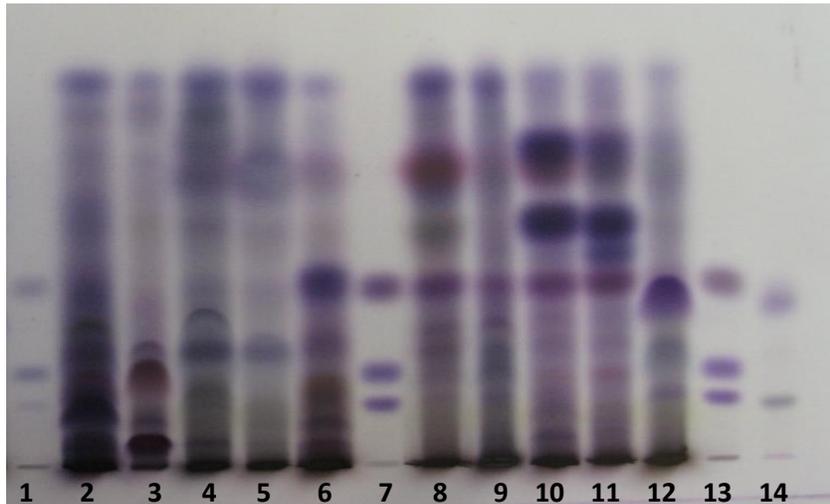
Especie	Peso seco cortezas (g)	Rendimiento diclorometano (%)	Rendimiento metanólicos (%)	Sección
<i>B. lancifolia</i>	118.2	2.196	15.594	Bursera
<i>B. fagaroides</i>	373.6	2.666	3.173	Bursera
<i>B. grandifolia</i>	396	0.154	2.878	Bursera
<i>B. longipes</i>	227.9	0.166	2.319	Bursera
<i>B. morelensis</i>	230.7	1.467	2.349	Bursera
<i>B. copallifera</i>	207.7	0.801	0.914	Bullockia
<i>B. submoniliformis</i>	201.7	0.527	0.737	Bullockia
<i>B. bicolor</i>	136.3	0.535	0.400	Bullockia
<i>B. bipinnata</i>	206.8	0.339	0.584	Bullockia
<i>B. linanoe</i>	227.1	0.207	0.504	Bullockia

Considerando el rendimiento obtenido para cada una de las especies, los extractos metanólicos ofrecen la posibilidad de determinar el tipo de compuestos polares que la planta sintetiza, sin embargo, es importante considerar la importancia de los compuestos no polares presentes en los extractos de diclorometano, por lo que es importante caracterizar estos extractos.

## Análisis cromatográfico

### Extractos de diclorometano

Se muestra la presencia y abundancia de compuestos terpénicos, que de acuerdo a la coloración e intensidad de la misma corresponden principalmente monoterpenos y sesquiterpenos (Figura 3).



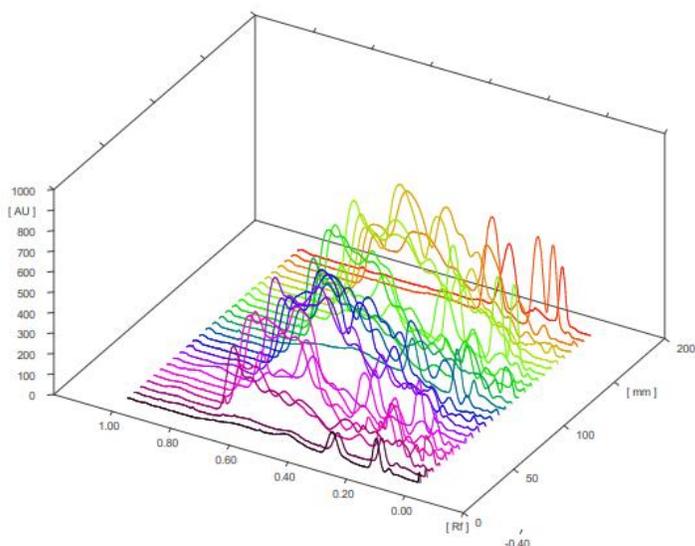
**Fig 3.** Placa cromatográfica de extractos de diclorometano. 1. Estándar A 0.500 $\mu$ L de aplicación; 2. Extracto de *Bursera lancifolia*; 3. Extracto de *Bursera fagaroides*; 4. Extracto de *Bursera grandifolia*, 5. Extracto de *Bursera longipes*; 6. Extracto de *Bursera morelensis*; 7. Estándar B 2.00 $\mu$ L de aplicación; 8. Extracto de *Bursera copallifera*; 9. Extracto de *Bursera submoniliformis*; 10. Extracto de *Bursera bicolor*; 11. Extracto de *Bursera bipinnata*; 12. Extracto de *Bursera linanoe*; 13. Estándar C 2.00 $\mu$ L de aplicación; 14. Estándar C 1.00 $\mu$ L de aplicación.

Del análisis densitométrico, de acuerdo a los Rf, calculados, se detectaron 19 compuestos distribuidos en las diez especies, con una variación en el porcentaje relativo de dichos compuestos.

Respecto a los estándares, la alfa amirina (Rf 0.31) fue detectada en todos los extractos, con excepción de *Bursera fagaroides*, los porcentajes de dicho estándar varían en las diferentes especies, encontrando, que *B. morelensis* y *B. linanoe* presentan 22%, para *B. lancifolia* y *B. bipinnata* su porcentaje es cercano al 12% y por último *B. copallifera* y *B. submoniliformis* presentan un 10%. Esta diferencia sugiere que, a pesar de estar presente en un porcentaje relativo distinto para cada especie, es un compuesto común dentro de la composición química del género.

El Lupeol (Rf 0.27) solo fue detectado en *Bursera fagaroides* y *Bursera grandifolia* en un porcentaje menor al 5%. Para el ácido oleanólico (Rf 0.16) se presentó en cinco de los diez extractos analizados (*B. lancifolia*, *B. fagaroides*, *B. submoniliformis*, *B. bicolor* y *B. bipinnata*) con porcentajes menores al 7%, y en *B. fagaroides* está presente casi en un 14%.

El ácido ursólico (Rf 0.11), se detectó en todos los extractos, excepto en *B. fagaroides* y *B. bipinnata*, sin embargo, los porcentajes están por debajo del 6%.



**Fig 4.** Densitograma obtenido de la placa de extractos de diclorometano

**Tabla 8.** Se muestran los Rfs y porcentajes relativos de cada compuesto presente en los extractos de diclorometano correspondientes a las muestras aplicadas en la placa cromatográfica, la "X" representa la presencia del compuesto, leída a 580 nm.

Rf	B-1		B-2		B-3		B-4		B-5		B-6		B-7		B-8		B-9		B-10		
	Rf	%	Rf	%																	
<b>0.01</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.2
<b>0.04</b>	X	0.39	X	5.1	X	0.39	-	-	X	0.34	-	-	-	-	X	0.34	-	-	-	-	-
<b>0.07</b>	-	-	X	2.02	X	0.33	X	1.07	X	1.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>0.11</b> (ácido ursólico)	X	5.07	-	-	X	1.72	X	0.83	X	5.63	X	0.26	X	0.51	X	0.64	-	-	X	1.02	-
<b>0.16</b> (ácido oleanólico)	X	2.62	X	13.97	-	-	-	-	-	-	-	-	X	6.83	X	0.36	X	0.77	-	-	-
<b>0.2</b>	X	5.26	X	3.86	X	4.82	X	6.69	-	-	X	5.66	X	5.66	X	1.49	X	1.6	X	7.09	-
<b>0.23</b>	X	5	-	-	-	-	-	-	X	8.58	X	4.03	X	3.6	X	2.08	-	-	-	-	-
<b>0.27</b> Lupeol	-	-	X	2.29	X	3.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>0.31</b> (alfa-amirina)	X	12.28	-	-	X	2.59	X	5.51	X	22.77	X	10.8	X	10.34	X	11.48	X	12.09	X	22.37	-
<b>0.37</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	7.68	-	-	-
<b>0.4</b>	-	-	X	5.18	-	-	X	9.28	X	3.49	X	15.38	-	-	-	-	X	25.8	X	11.49	-
<b>0.44</b>	X	20.53	X	8.03	X	9.16	-	-	-	-	-	-	X	14.7	X	26.51	-	-	-	-	-
<b>0.53</b>	-	-	X	23.52	X	23.2	X	46.43	X	32.22	X	33.89	X	51.15	-	-	-	-	X	34.9	-
<b>0.56</b>	X	15.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	38.38	X	40.5	X	37.99	X	22.23	-
<b>0.62</b>	X	13.72	X	26.33	X	33.61	-	-	X	8.95	X	11.25	-	-	-	-	X	18.43	-	-	-
<b>0.67</b>	X	21.19	X	15.44	X	21.03	X	30.08	X	15.4	X	24.03	X	19.52	X	17.59	X	17.24	X	11.67	-
<b>0.8</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.52	X	0.25	-	-	-	-	-	-	-
<b>0.89</b>	-	-	X	1.39	-	-	-	-	X	1.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>0.98</b>	X	0.26	X	0.37	X	0.2	X	0.24	X	0.38	X	0.17	X	0.22	X	0.15	X	0.18	X	0.26	-

Los resultados anteriores indican una producción diferencial de terpenos y de los compuestos utilizados como estándares para cada una de las especies analizadas, de éstos últimos ha sido reportada actividad biológica en condiciones *in vivo* e *in vitro*, algunas de ellas relacionadas al aspecto farmacológico y de importancia ecológica como defensa al ataque de herbívoros. Por lo que cobra importancia el estudio químico de los extractos, a fin de caracterizar el tipo de terpenos en cada una de las especies. La presencia detectada de cada uno de los estándares utilizados brinda la posibilidad del uso de las cortezas como fuente potencial de compuestos con actividad biológica, (citotóxica, antimicrobiana, insecticida, antiinflamatoria, etc.)

### Extractos metanólicos.

- **Flavonoides**

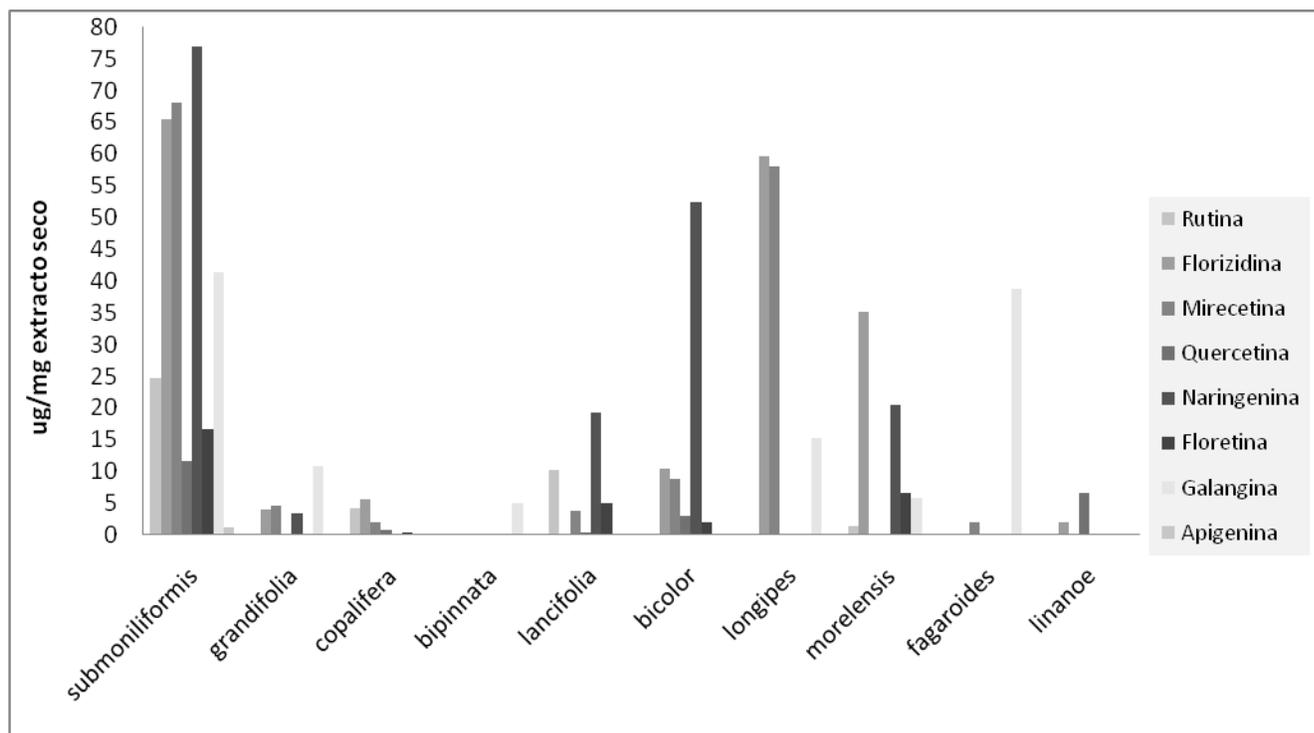
Los resultados del análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) se presentan en la tabla 9 donde se muestra que solo *B. submoniliformis* presenta los 8 flavonoides utilizados como estándares.

De los flavonoides usados como estándares en este ensayo, se ha reportado que la quercetina inhibe la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa en preparaciones de ninfas de *Triatoma infestans* Klug. (Wood *et al.*, 1990) y también inhibe la actividad de piruvato quinasa y de la ATPasa, mitocondrial (Lang y Racker, 1974), por lo que la quercetina podría jugar un papel importante como insecticida al actuar sobre enzimas importantes para funciones vitales de los organismos (Wood *et al.*, 1990).

Otro de los flavonoides usado como estándar fue la rutina, uno de los glucósidos de flavonol más ampliamente estudiados, el cual se reporta como fagoestimulante de muchos insectos polívoros, incluida la langosta *Schistocerca americana* y la oruga *Heliothis virescens* (Blaney y Simmonds, 1983).

**Tabla 8.** Se muestran los Rfs y porcentajes relativos de cada compuesto presente en los extractos de diclorometano correspondientes a las muestras aplicadas en la placa cromatográfica, la "X" representa la presencia del compuesto, leída a 580 nm.

		Flavonoide (ug/mg extracto seco)							
		Rutina	Florizidina	Mirecetina	Quercetina	Naringenina	Floretina	Galangina	Apigenina
<b>Bursera</b>	<b>submoniliformis</b>	24.687	65.375	68.125	11.545	77.000	16.650	41.350	1.125
	<b>grandifolia</b>	-	3.995	4.588	-	3.426	0.224	10.845	-
	<b>copallifera</b>	4.111	5.616	1.959	0.744	-	0.453	-	-
	<b>bipinnata</b>	0.074	-	-	-	0.163	-	4.989	-
	<b>lancifolia</b>	10.133	-	3.775	0.352	19.349	4.976	-	-
	<b>bicolor</b>	-	10.396	8.779	2.948	52.325	1.878	-	-
	<b>longipes</b>	-	59.584	58.075	-	-	-	15.310	-
	<b>morelensis</b>	1.411	35.136	-	-	20.558	6.640	5.719	-
	<b>fagaroides</b>	-	-	1.965	-	-	-	38.659	-
	<b>linanoe</b>	0.213	2.057	-	6.564	-	-	-	-



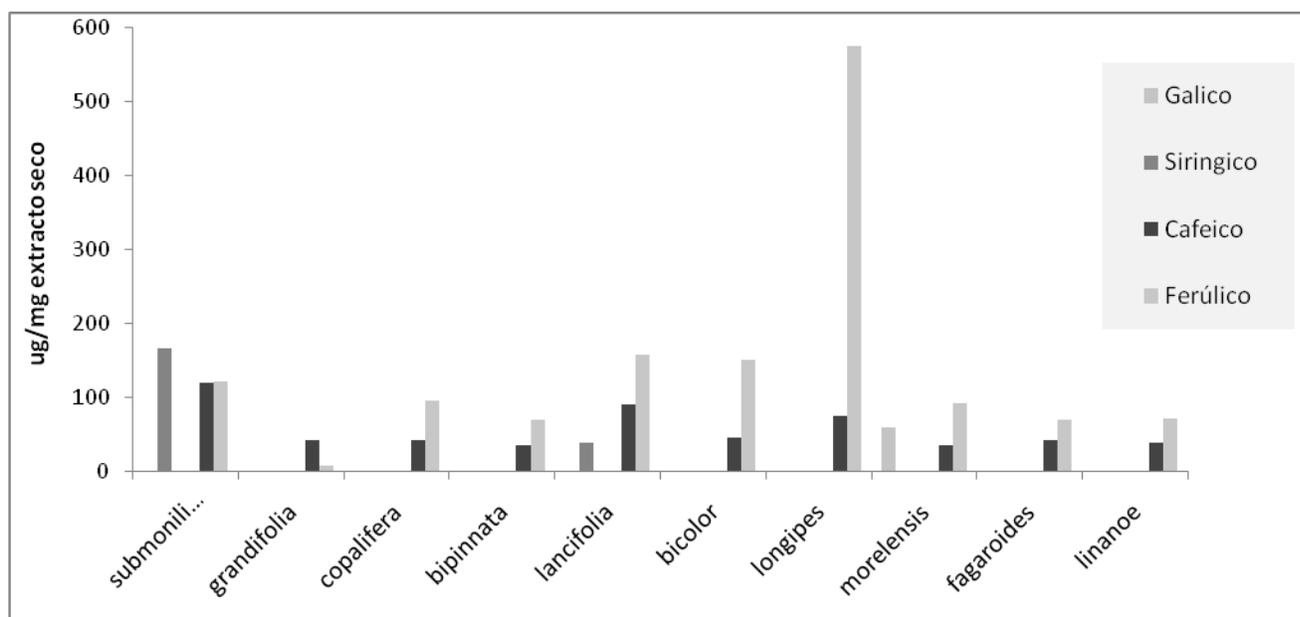
**Figura 5.** Gráfica ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco) de los flavonoides probados en HPLC para cada uno de los extractos metanólicos de corteza en las especies de *Bursera* evaluadas.

- **Ácidos fenólicos**

Los resultados del análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para ácidos fenólicos se muestran en la tabla 10

**Tabla 10.** Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco) de los ácidos fenólicos probados en HPLC para cada uno de los extractos metanólicos de corteza en las especies de *Bursera* evaluadas. (El “-“significa que no hay una cantidad cuantificable de dichos ácidos fenólicos)

		Ácido fenólico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ extracto seco)				
		Gálico	Clorogenico	Siringico	Cafeico	Ferúlico
<b>Bursera</b>	<i>submoniliformis</i>	-	1652.324	165.969	119.099	120.934
	<i>grandifolia</i>	-	374.285	-	40.923	7.091
	<i>copalifera</i>	-	515.279	-	40.923	94.545
	<i>bipinnata</i>	-	180.180	-	34.562	68.838
	<i>lancifolia</i>	-	1332.616	38.690	90.604	156.762
	<i>bicolor</i>	-	500.000	-	44.768	150.670
	<i>longipes</i>	-	338.776	-	74.045	575.034
	<i>morelensis</i>	58.210	725.241	-	34.814	92.407
	<i>fagaroides</i>	-	-	-	41.964	69.536
	<i>linanoe</i>	-	222.060	-	37.386	70.812



**Figura 6.** Gráfica ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto seco) de los ácidos fenólicos probados en HPLC para cada uno de los extractos metanólicos de corteza en las especies de *Bursera* evaluadas.\*No se muestran los resultados de ácido clorogénico en el gráfico debido a que está en mayor cantidad y abundancia con respecto a los otros ácidos fenólicos usados como estándares.

Respecto a los estándares usados, ácidos como el clorogénico, caféico y gálico han mostrado actividad antialimentaria y tienen un papel importante como defensa contra insectos herbívoros. Por otro lado, estudios previos por Leszczyński *et al.* (1985) y Chrzanowski (2007) confirmaron que los ácidos fenólicos pueden afectar la alimentación y desarrollo de los organismos como *Rhopalosiphum padi* y *Sitobion avenae*. El ácido gálico mostró una capacidad de inhibir la alimentación del pulgón de la avena.

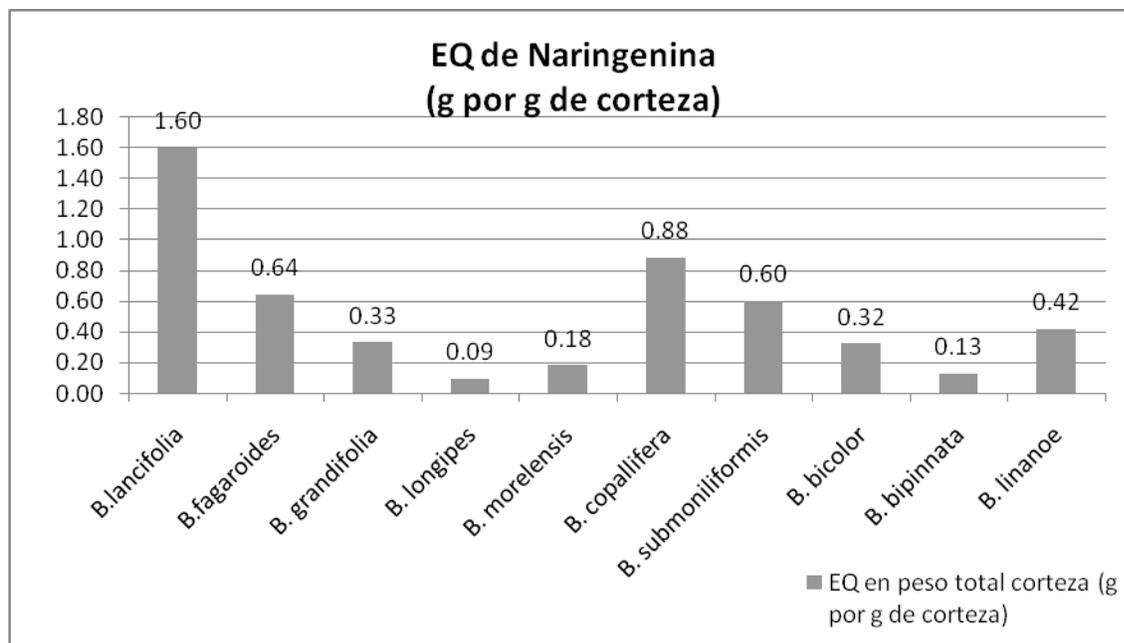
Por su parte el ácido caféico ha reportado reducir la fecundidad y el ritmo intrínseco de crecimiento de ciertos insectos como los áfidos (Chrzanowski *et al.*, 2012).

### Cuantificación de flavonoides totales en los extractos metanólicos

Los resultados de esta determinación, Tabla 11, muestran la mayor concentración de flavanonas y flavonoles, es mayor en *B. copallifera*, *B. submoniliformis*, *B. bicolor* y *B. linanoe*.

Tabla 11. Equivalentes (EQ) de naringenina en µg/mL para cada extracto de *Bursera*

<b>Especie</b>	<b>concentración µg/mL</b>
<i>B. lancifolia</i>	51.250
<i>B. fagaroides</i>	101.250
<i>B. grandifolia</i>	57.500
<i>B. longipes</i>	20.000
<i>B. morelensis</i>	38.750
<i>B. copallifera</i>	482.500
<i>B. submoniliformis</i>	407.500
<i>B. bicolor</i>	405.417
<i>B. bipinnata</i>	109.583
<i>B. linanoe</i>	413.750

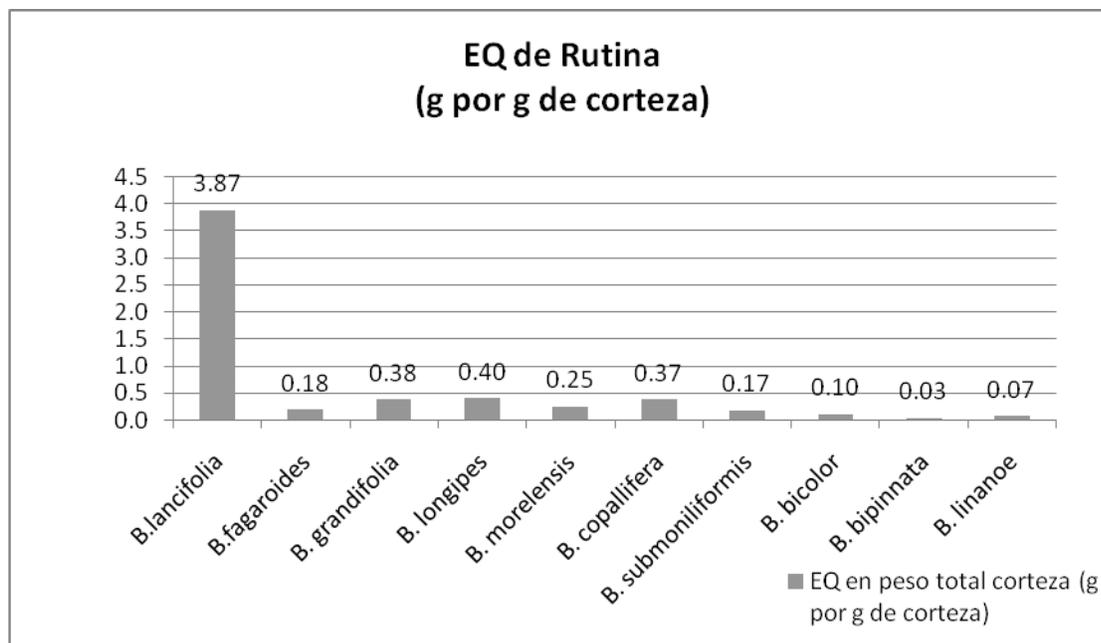


**Figura 7.** Estimación de equivalentes de Naringenina en gramos por g de corteza seca.

Los resultados de esta determinación, tabla 12, muestran la mayor concentración de flavonas y flavonoles, es mayor en *B. copallifera*, mientras que en mucho menor concentración, pero con un valor significativo fueron *B. lancifolia*, *B. submoniliformis* y *B. bicolor*.

**Tabla 12.** Equivalentes (EQ) de rutina en  $\mu\text{g/mL}$  para cada extracto de *Bursera*

Especie	concentración $\mu\text{g/mL}$
<i>B. lancifolia</i>	48.500
<i>B. fagaroides</i>	10.333
<i>B. grandifolia</i>	24.833
<i>B. longipes</i>	31.667
<i>B. morelensis</i>	23.833
<i>B. copallifera</i>	88.000
<i>B. submoniliformis</i>	42.500
<i>B. bicolor</i>	47.833
<i>B. bipinnata</i>	10.833
<i>B. linanoe</i>	26.167



**Figura 8.** Estimación de equivalentes de Naringenina en gramos por g de corteza seca.

La detección de flavonoides y ácidos fenólicos sugiere una función importante como fotoprotectores y antioxidantes frente al estrés por luz y temperatura, características de los ambientes donde se distribuyen las especies.

## Evaluación de la actividad biológica

### Extractos de diclorometano

La actividad *in vitro* no fue posible determinarla, debido a la imposibilidad para solubilizar los extractos en Triton X100, y que al aumentar la concentración podrían llegar alterarse los extractos e impedir una correcta interpretación en el lector de microplacas.

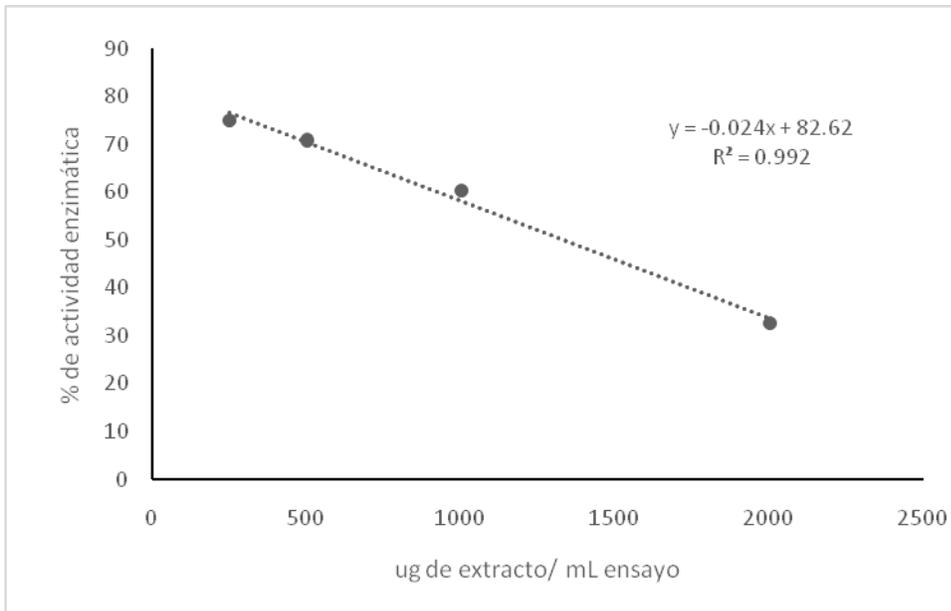
### Extractos metanólicos

- Evaluación *in vitro* de acetilcolinesterasa

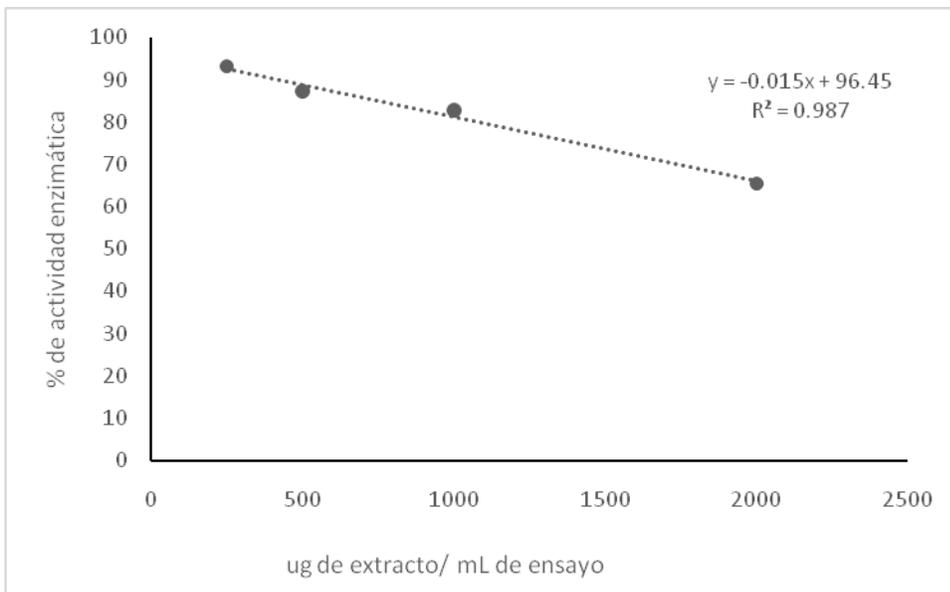
En el ensayo realizado con los extractos metanólicos de las diez especies del género *Bursera*, se realizó la prueba para conocer el porcentaje de actividad enzimática en presencia del extracto (Tabla 13, gráficas 1-2) a partir de la cuál fue posible observar que sólo dos de las especies mostraron actividad inhibitoria enzimática significativa como es el caso de *Bursera submoniliformis* con una IC<sub>50</sub> de 1.18 mg/ml. Mientras que el segundo extracto metanólico con actividad inhibitoria fue *Bursera bicolor* con una IC<sub>50</sub> de 9.16 mg/ml. Las gráficas de actividad se muestran a continuación.

**Tabla 13.** Porcentaje de actividad enzimática de acetilcolinesterasa para cada extracto vegetal a una concentración de 1 mg/mL.

Extracto/especie		Absorbancia promedio±SE	% de actividad enzimática
1	<i>B. lancifolia</i>	0.4835±0.13	83.83
2	<i>B. fagaroides</i>	0.0440±0.09	76.3
3	<i>B. grandifolia</i>	0.04764±0.15	82.61
4	<i>B. longipes</i>	0.0552±0.14	95.82
5	<i>B. morelensis</i>	0.0522±0.11	90.6
6	<i>B. copallifera</i>	0.0520±0.12	90.27
7	<i>B. submoniliformis</i>	0.0364±0.08	60.06
8	<i>B. bicolor</i>	0.0406±0.16	70.47
9	<i>B. bipinnata</i>	0.0583±0.11	101.1
10	<i>B. linanoe</i>	0.0440±0.37	76.33



**Gráfica 1.** Porcentaje de actividad de la enzima acetilcolinesterasa por el extracto metanólico de *B. submoniliformis* en *T. molitor*. Se muestra valores de la ecuación de la recta y línea de tendencia.



**Gráfica 2.** Porcentaje de actividad de la enzima acetilcolinesterasa por el extracto metanólico de *B. bicolor* en *T. molitor*. Se muestra valores de la ecuación de la recta y línea de tendencia.

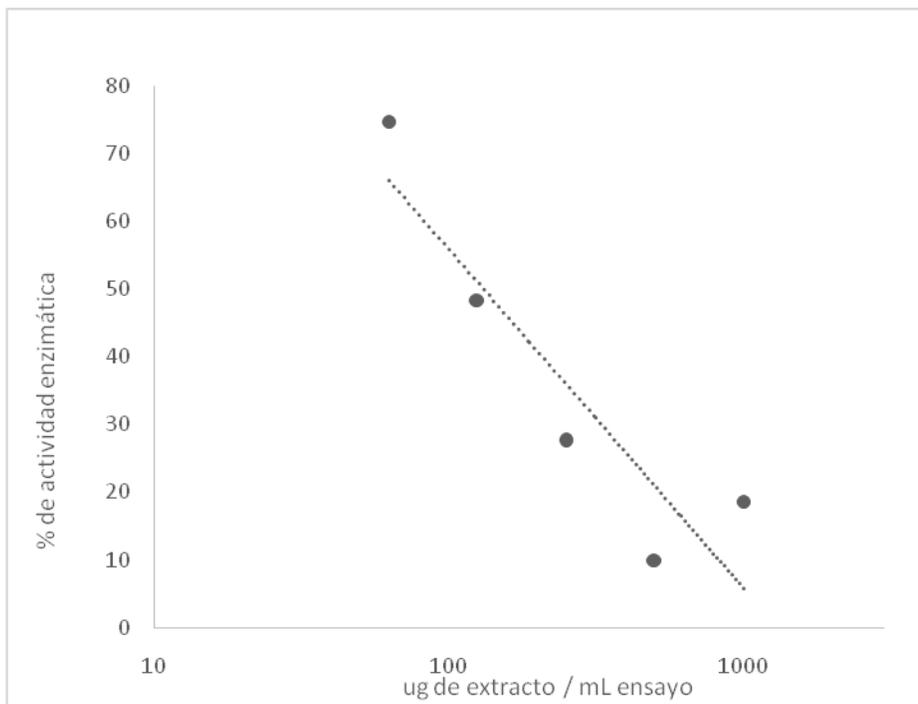
- Evaluación *in vitro* extractos metanólicos alfa-amilasa

Para los extractos metanólicos probados en el ensayo *in vitro*, los extractos de *B. lancifolia*, *B. grandifolia* y *B. linanoe* fueron los que mostraron disminuir la actividad enzimática sobre alfa amilasa después de realizar el ensayo preliminar para cada una de las diez especies (Tabla 14, gráficas 3-5).

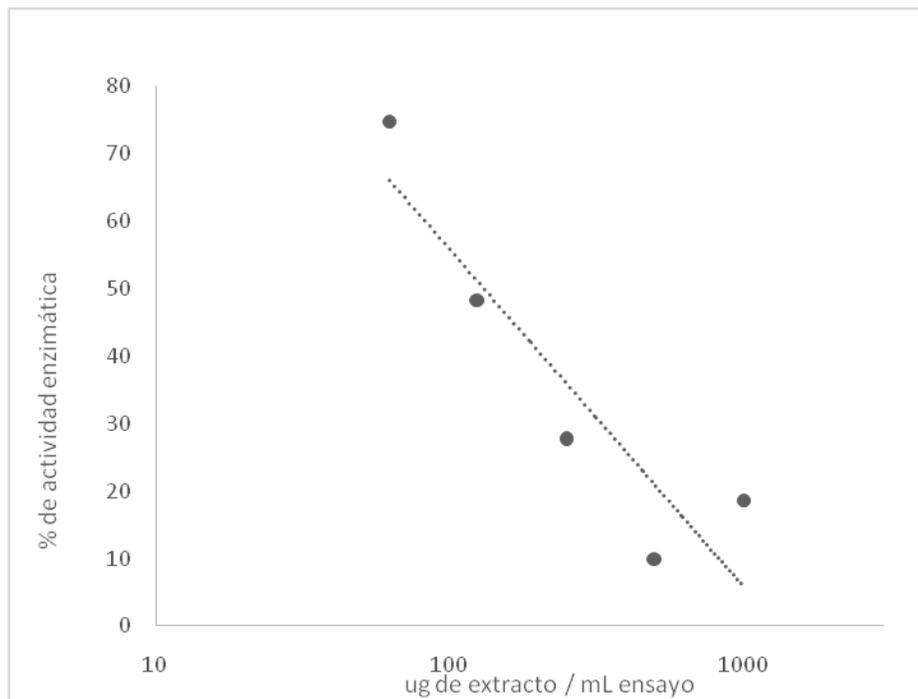
**Tabla 14.** Porcentaje de actividad enzimática de alfa amilasa para cada extracto vegetal a una concentración de 1 mg/mL.

Extracto/especie		Absorbancia promedio±SE	% de actividad enzimática
1	<i>B. lancifolia</i>	0.0029±0.06	3.75
2	<i>B. fagaroides</i>	0.0221±0.12	28.59
3	<i>B. grandifolia</i>	0.0145±0.05	18.76
4	<i>B. longipes</i>	0.0318±0.06	41.14
5	<i>B. morelensis</i>	0.0509±0.08	65.85
6	<i>B. copallifera</i>	0.0345±0.06	44.63
7	<i>B. submoniliformis</i>	0.0602±0.1	77.88
8	<i>B. bicolor</i>	0.0277±0.04	35.83
9	<i>B. bipinnata</i>	0.0781±0.13	101.03
10	<i>B. linanoe</i>	0.0076±0.03	9.83

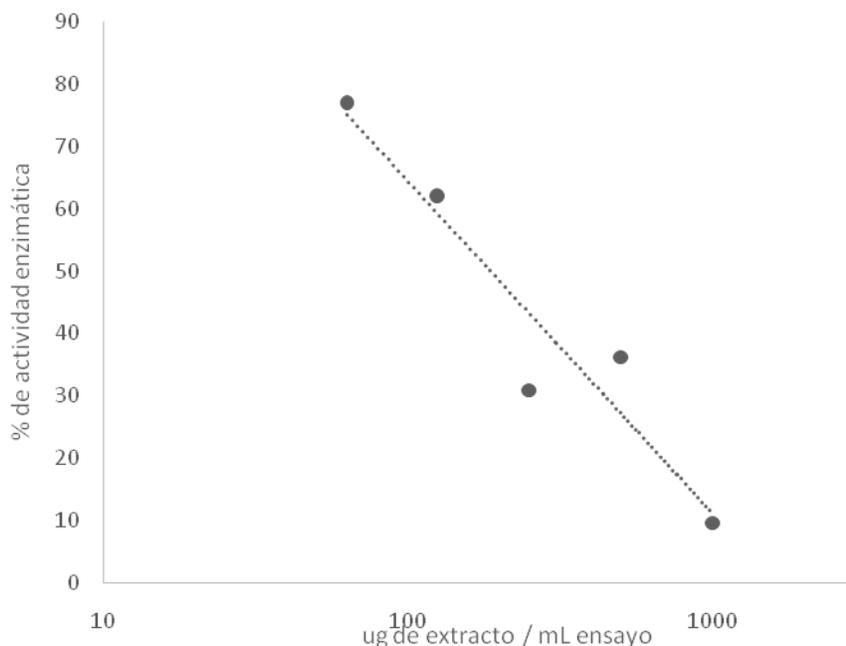
Después de llevar a cabo en ensayo a diferentes concentraciones con las especies seleccionadas del primer ensayo se obtuvo a *Bursera lancifolia* con una IC<sub>50</sub> de 132ug/ml, para *Bursera grandifolia* con una IC<sub>50</sub> de 162ug/ml y para el extracto de *Bursera linanoe* presentando una IC<sub>50</sub> de 186 ug/ml. Las gráficas se muestran a continuación:



**Gráfica 3.** Porcentaje de la actividad de alfa amilasa por el extracto metanólico de *B. lancifolia* en *T. molitor*. Se muestra valores de la ecuación de la recta y línea de tendencia.



**Gráfica 4.** Porcentaje de la actividad de alfa amilasa por el extracto metanólico de *B. grandifolia* en *T. molitor*. Se muestra valores de la ecuación de la recta y línea de tendencia.



**Gráfica 5.** Porcentaje de la actividad de alfa amilasa por el extracto metanólico de *B. linanoe* en *T. molitor*. Se muestra valores de la ecuación de la recta y línea de tendencia.

Los datos obtenidos del ensayo de evaluación enzimática *in vitro* reportan que los extractos metanólicos actúan de manera más eficiente inhibiendo la enzima alfa-amilasa en comparación con el ensayo para acetilcolinesterasa, ya que las  $IC_{50}$  son menores para los casos donde se obtuvo mayor porcentaje de inhibición. Se conoce que los extractos de plantas exhiben diferentes modos de acción cuando son administrados a insectos como se menciona anteriormente, por ejemplo, el arresto de aminoácidos, la interrupción de la ecdisis, inhibición de proteasas intestinales, entre otros (Martins *et al.*, 2001).

Para el caso del ensayo con acetilcolinesterasa, las  $IC_{50}$  fueron mayores, aunque con un porcentaje de inhibición entre el 80-90% para las especies con respuesta durante el ensayo y solo presente en dos de las especies, existe evidencia acerca del efecto inhibitorio de los compuestos de tipo terpénico sobre la acetilcolinesterasa como compuestos de defensa o alomonas (Ryan *et al.*, 1988). Mientras que hay pocos estudios que reporten la actividad inhibitoria de compuestos secundarios sobre alfa amilasa.

Sin embargo, existen grupos de metabolitos secundarios capaces de actuar sobre algún proceso fisiológico en insectos, por lo que su actividad sobre el sistema nervioso o digestivo de los organismos demuestra la necesidad de continuar con la evaluación de la respuesta de insectos en ensayos *in vivo* y en distintas etapas de desarrollo, de manera que pueda mostrarse la actividad biológica presente en el género *Bursera*.

## Conclusiones

En los extractos de diclorometano se detectaron 19 terpenos, entre ellos la alfa-amirina, el ácido ursólico, el ácido oleanólico y el lupeol, usados como estándares e importantes por su actividad biológica con efecto antialimentario, biocida y sobre el desarrollo de insectos. La mayoría de las especies presentó 11 de los terpenos con un máximo de 12 en *Bursera fagaroides*. Por lo que éste trabajo confirmó la presencia de terpenos importantes que estarían involucrados en caso de mostrar actividad biológica sobre insectos, usando otro ensayo biológico.

Compuestos importantes de tipo flavonoide como la quercetina reportada con efecto inhibitorio de enzimas relacionadas a funciones vitales como la digestión, se detectó en los extractos metanólicos de *B. submoniliformis*, *B. bicolor*, *B. lancifolia*, *B. linanoe* y *B. copallifera*.

Los extractos metanólicos, contienen ácidos fenólicos, siendo el más relevante el ácido clorogénico, debido a su efecto antialimentario sobre insectos, éste fue detectado en todas las especies activas en el ensayo biológico.

Los extractos de *B. submoniliformis*, *B. bicolor*, *B. lancifolia*, *B. linanoe*, y *B. grandifolia* causaron los mayores efectos de inhibición enzimática para al menos uno de los ensayos, aunque se observó que las especies son más activas frente a alfa-amilasa, ya que, las IC50 son casi 9 veces menores con respecto a las de acetilcolinesterasa a la misma concentración (1mg/mL).

Respecto al tipo de inhibición enzimática por parte de los extractos, se determinó que se trataba de una inhibición acompetitiva, sin embargo, se tendrían que realizar más ensayos que lo confirmen.

Finalmente el género *Bursera* Jacq. Ex L. y en específico las especies que mostraron tener actividad a partir de sus extractos metanólicos (*B. submoniliformis*, *B. bicolor*, *B. lancifolia*, *B. grandifolia* y *B. linanoe*) demostraron ser un alternativa en la búsqueda de compuestos insecticidas de origen vegetal, sin embargo es necesario conocer más acerca del modo de acción de los extractos polares mediante ensayos in vivo para comprobar que los extractos conservan el mismo efecto, así como extenderlo hacia otras especies de insectos plaga que afectan plantas con importancia agrícola.

## Referencias bibliográficas

- ❖ Aldana-Llanos, L., Salinas-Sánchez D.O., Valdés-Estrada M.E., Gutierrez-Ochoa M., Valladares-Cisneros M.G. 2009. Evaluación bioinsecticida de extractos de *Bursera copallifera* (D.C.) Bullock y *Bursera grandifolia* (Schtdl.) Engl. En gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). Polibotánica; 29:149-158.
- ❖ Alonso-Castro A.J., Villarreal M.L., Salazar-Olivo L.A., Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. 133 (3). 945-972.
- ❖ Attele, A.S., Wu, J.A., Yuan, C.-S., 1999. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. Biochem. Pharmacol. 58, 1685:1693.
- ❖ Ávalos A., Pérez-Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegeta [internet]. [Consultado Ene 2018]. 2 (3):119-145. Disponible en <http://revistareduca.es>
- ❖ Ávila-Juárez L., Torres-Pacheco I., Ocampo-Velazquez R.V., Feregrino-Pérez A.A., Cruz A., Guevara-González R.G. 2017. Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Protection and Human Health: Int. J. Agric. Biol. 19 (3): 391-402.
- ❖ Balandrin M.F., Klocke J.A., Wurtele E.S., Bollinger H. 1985. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. Science. 228 (47):1154-1160.
- ❖ Becerra J.X., Venable D.L., Evans P.H., Bowers W.S. 2001. Interactions between Chemical and Mechanical Defenses in the Plant Genus *Bursera* and Their Implications for Herbivores. Amer. Zool. 41 (7):865-876.
- ❖ Bilia, A.R., Gallori, S., Vincieri, F.F., 2002. St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability. Life Sci. 70, 3077:3096.
- ❖ Blaney, W.M., Simmonds, M.S.J, Delle-Monache, F. *et al.* J. 1990. Chem Ecol 16: 365. <https://doi.org/10.1007/BF01021771>
- ❖ Bounocore V., Poerio E., Silano V., Tomasi M. 1976. Physical and Catalytic Properties of  $\alpha$ -Amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. Biochem. J. 153:621-625.
- ❖ Cárdenas R., Reguera-Serrano J.J., Llanos-Romero E., Aguirre-Hernández E., Herrera-Santoyo J., Zúñiga B., Rodarte B., Alba-Lois L., Guevara-Fefer P. 2012. Effects of Organic Extracts of *Bursera copallifera* and *B. lancifolia* Leaves in the Development of *Spodoptera frugiperda*. J. Entomol. 1-8.
- ❖ Case R.J., Tucker A.O., Maciarelllo M.J., Wheeler K.A. 2003. Chemistry and Ethnobotany of Commercial Incense Copals, Copal Blanco, Copal Oro, and Copal Negro of North America. Economic botany. 57 (2):189-202.
- ❖ Casida J.E., Quistad G.B. 1998. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future. Rev. Entomol. 43:1-16.
- ❖ Chang, C.-c., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis 10, 178-182.

- ❖ Chrzanowsky G., Leszcynski B., Czerniewicz P., Sytykiewicz H, Matok H., Krzyzanowski R., Sempruch C.2012. Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development. *Crop protection*. 35:71-77.
- ❖ Copping L.G., Menn J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag.* 56: 651-676.
- ❖ Damborsky M.P., Sandrigo-Ybran T., Bar M.E., Oscherov E. 1999. [Internet] Ciclo de vida de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) en Condiciones Experimentales. *Catedra de Artrópodos (UNNE)*.6:1-4
- ❖ Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17:4022-4034.
- ❖ Di Giovanni S., Borloz A., Urbain, A., Marston, A., Carrupt P. y Reist, M. 2008. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 33 (2): 109-119.
- ❖ Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88–90.
- ❖ Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetilcolinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.
- ❖ Ernst, E., Pittler, M.H., 2000. Efficacy of ginger for nausea and vomiting: a systematic review of randomized clinical trials. *Br. J. Anaesth.* 84, 367:371.
- ❖ Evans P.H., Becerra J.X., Venable D.L., Bowers W.S. 2000. Chemical analysis of squirt-gun defense in *Bursera* and counter defense by Crysomelid Beetles. *J. Chem. Ecol.* 26 (3):745-754.
- ❖ Foster S. P, Harris M. O.1997. Behavioral manipulation methods for insect pest management. *Annual Review of Entomology*. 42 (1) 123-146.
- ❖ Gigliarelli G., Becerra J.X., Curini M., Marcotullio M.C. 2015. Chemical Composition and Biological Activities of Fragrant Mexican Copal (*Bursera*) (Review). *Molecules*. 20:22383-22394.
- ❖ <http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.44.14>.
- ❖ Guevara-Fefer, P., Muñoz-Ocotero, V., Llanos-Romero, R.E., Zúñiga-Ruiz, B., Cárdenas-Vázquez, R.J., Contreras-Jiménez, J.L., Ocampo-Bautista, F. 2017. Flavonoides de trece especies del género *Bursera* con potencial antioxidante. *Polibotánica*, 44:185-193.
- ❖ Grainge, M, Ahmed, S. 1988. *Handbook of Plants with Pest-Control Properties.*, 470 p Hoboken, Nueva Jersey. John Wiley & Sons
- ❖ Granados-Sánchez D., Ruíz-Puga P., Barrera-Escorcia H. 2008. Ecología de la Herbívora. *Rev Chapingo Ser Cie.* 14 (1):51-63.
- ❖ Harborne, J. 1997. Biochemical plant ecology. En Dey, P. y Harborne J. (eds.). *Plant biochemistry*. p.337. California, USA. Academic Press,
- ❖ Harborne, J.B., 1993. *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press. 4° Edición. San Diego, California, USA.
- ❖ Hernández L., Palazon J., Navarro-Ocaña A. 2012. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ - amyryns: A Review of Sources and Biological Activities. [Internet]. *Phytochemicals- A Global Perspective of Their Role in Nutrition and*

- Health, Dr. Venketeshwer Rao (Ed.), Intech, Disponible en: <http://www.intechopen.com>
- ❖ Houghton, P.J., 2001. Old yet new—pharmaceuticals from plants. *J. Chem. Educ.* (78) 175:184.
  - ❖ Huesing J.E., Shade R.E., Chrispeels M.J., Murdock L.L. 1991. a-amilase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiology* 96: 993-996.
  - ❖ Ishaaya, I. 2001. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Springer. Berlin, Alemania. 360.
  - ❖ Isman M.B. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 45-66.
  - ❖ Jetter. 2005. The Formation, Structure and Activity of Phytochemicals. Springer. Vancouver (BC).
  - ❖ Kaplan, S.A., 2005. Updated meta-analysis of clinical trials of *Serenoa repens* extract in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 173, 516.
  - ❖ Khan R. 2018. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharm J.* 26:739-753.
  - ❖ Koul, O. 2005. Insect antifeedants. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
  - ❖ Lubbe A., Verpoorte R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for speciality industrial materials, Review. *Ind. Crop. Prod.* 34: 785-801.
  - ❖ Lucero-Gómez, P.; Mathe, C.; Vieillescazes, C.; Bucio-Galindo, L.; Belio-Reyes, I.; Vega-Aviña, R. 2014. HPLC: Molecular profiles for the discrimination of copals from Mesoamerica. Application to objects from Aztec offerings. *J. Archaeom.* 38:119–133.
  - ❖ Mareggiani G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo integrado de Plagas.* 60: 22-30.
  - ❖ Morales-Serna, J.A.; Cruz-Galicia, E.; Garcia-Rios, E.; Madrigal, D.; Gavino, R.; Cardenas, J.; Salmon, M. 2013. Three new diarylbutane lignans from the resin of *Bursera fagaroides*. *Nat. Prod. Res.* 27: 824–829.
  - ❖ Navarro-Hoyos M., Moreira-González I., Arnáez-Serrano E., Murillo-Masís R., Rivera-Méndez W., Zamora-Ramírez W., Saravia-Arguedas A.Y., Vargas-Huertas F. 2017. Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica. *Tecnol. Marcha.* 30 (1):4-13.
  - ❖ O'Hara, M., Kiefer, D., Farrell, K., Kemper, K., 1998. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch. Fam. Med.* 7, 523:536.
  - ❖ Pérez-López E. 2012. Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad.* 16 (1):51-59.
  - ❖ Philogene B.J., C. Regnault, R. y Vincent, C. 2004. Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. En Regnault-R., C., Philogene, B.J. y C. Vincent, C. (eds.). *Biopesticidas de origen vegetal.* p.337 Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa,
  - ❖ Pillmoor, J.B., Wright K. y Terry, A.S. 1993. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pest Manag Sci.* 39 (2) 131-140.

- ❖ Pontis J.A., Costa L.A., Silva S.J., Flach A. 2014. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food. Sci. Technol.* 34 (1): 69-73.
- ❖ Rattan R.S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin (Review). *Crop Prot.* 29:913-920.
- ❖ 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. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (4):283-286.
- ❖ Rocha-Estrada J., García-Carreño F.L. 2006. Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: avances en el entendimiento de su mecanismo de acción. *Bio Tec.* 12 (1):50-62.
- ❖ Ryan M.F., Byrne O. 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol.* 14 (10):1965-1975.
- ❖ Ryan, M. F. y Byrne, O. 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology.* 14: 1965-1975.
- ❖ Rzedowski, J., Medina R. y G. Calderón. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Act. Bot. Mex.* 70: 85-111.
- ❖ Rzedowski, J., Kruse, H. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon*, 28(1/3), 103-116.
- ❖ Schmidt, B., Ribnicky, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T., Raskin, I., 2008. A natural history of botanical therapeutics. *Metab. Clin. Exp.* 57, S3:S9.
- ❖ Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H., Rocha-Sosa M. 2003. La participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21 (3):355-363.
- ❖ Silva, M. C., Paiva, S. R., 2012. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. amp; Triana. *An Acad Bras Cienc* 84, 609-616.
- ❖ Simmons M.S.J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry.* 56: 245-25.
- ❖ Sívori, J.L., Casabé, N., Zerba, E.N., Wood, E.J. (1997). Induction of Glutathione S-transferase Activity in *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(6), 797-802.
- ❖ Sosa M.E., Guerreiro E., Giordano O.S., Tonn C.E. 2000. Bioactividad de flavonoides sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Review). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 59 (1-4):179-184.
- ❖ Talapatra S.K., Talapatra B. 2015. Chemistry of Plant Natural Products [internet], Kolkata (India), University of Calcutta. [Consultado ene 2018]. Disponible en [www.springer.com](http://www.springer.com)
- ❖ Tripathi A., Upadhyat S., Bhuiyan M., Bhattacharya P.R. 2009. A review on prosects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharmacognosy Phytother.* 1 (5):052-063.
- ❖ Velázquez-Jiménez, R.; Torres-Valencia, J.M.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Hernández-Hernández, J.D.; Román-Marín, L.U.; Manríquez-Torres, J.J.; Gómez-Hurtado, M.A.; Valdez-Calderón, A.; Motilva, V.; García-Mauriño, S.; et al. 2011. Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry.* 72: 2237–2243.

- ❖ Wink M. 2010. Annual Plant Reviews Volume 40. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Segunda edición. Wiley-Blackwell.
- ❖ Wink, M., and Schimmer, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. 17:134. En: M. Wink. (ed.). Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology. 307. England. Sheffield Academic Press.
- ❖ Winn-Deen E.S., David H., Sigler G.y Chavez R. 1988. Development of a Direct Assay for  $\alpha$ -Amylase. Clin. Chem. 34 (10): 2005-2008.
- ❖ Zuñiga B., Guevara-Fefer P., Herrera J., Contreras J.L., Velasco L., Pérez F.J., Esquivel B. 2005. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Volatile Fractions from the Bark of Eight Mexican *Bursera* Species. Planta Med. 71: 825-828.