



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

EFECTO ANTIOXIDANTE DE *Bursera  
biflora* (Rose) Standl. (Burseraceae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KAREN TEPEC TINOCO

Tutora :

M. en C. Marisol Avila Romero

Febrero, 2017

Los Reyes Iztcala,  
Tlalnepantla



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por permitirme crecer profesional, académica y emocionalmente.

A los excelentes profesores que me motivaron a amar a la Biología, cada uno desde su área del saber biológico.

A la M. en C. Marisol Avila Romero, por aceptarme en el laboratorio y no sólo ser mi tutora, sino una gran amiga y una inspiración, gracias por apoyarme y creer en mí en todo momento.

A la Dra. Ana María García Bores, por ser un ejemplo a seguir, gracias Doc. Por estar presente en todos los momentos, apoyarme y enseñarme que el crecimiento profesional va ligado a ser mejor persona. Gracias por brindarme todo su conocimiento.

Al Dr. Guillermo Ávila Acevedo, por tener siempre el conocimiento más actualizado y certero, por sus aportaciones a mi trabajo y por ser un gran ser humano y un excelente enciclopedista.

A la M. en C. Julieta Orozco Martínez, por los aportes al presente trabajo y por ser una gran y alegre persona.

A la Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado, por ser una excelente persona y siempre dar consejos sabios en todos los ámbitos.

A la Doc. Mons por ayudarme a encontrar algo más cada vez que platicábamos.

Al Doc. Isra, por hacer de nuestros jueves toda una tradición. Gracias por llegar al laboratorio y ser una parte tan importante para nosotros.

A la Señora Betty por hacer de mi estancia en el laboratorio más agradable, por su confianza en mí y por todos los consejos y pláticas, por hacer más llevadera esa clase que no nos gustaba. Gracias infinitas.

A los laboratorios de Fitoquímica y Farmacognosia que fueron mi segundo hogar durante casi 2 años. Gracias a todos y cada uno de los que conforman este hermoso y excelente equipo de trabajo, porque hacen que el trabajo y las pachangas sean divertidas.

A Pedro, por ser mí amigo incondicional a lo largo de la carrera, por aguantarme y hacer más ligeras las jornadas de trabajo.

A Mafer, por hacer de mi estancia de laboratorio un momento divertido y por ser tan alegre e incondicional.

A mi George, por enseñarme a ser una mejor persona, por regalarme siempre una sonrisa y alegrar a todo el laboratorio.

A Jonathan Flores, mi Jonhy! por ser mi gran y risueño amigo a lo largo de 3 años, gracias amigo por ser parte de toda nuestra aventura como Biólogos. Te quiero muchísimo.

A Lucero, por alegrar cada uno de las clases de francés y motivarme a seguir adelante, gracias por todos los momentos chistosos y tu alegría eterna, te quiero muchísimo.

A Viri y Lucy por ser el par de amigas más unidas y divertidas de toda la historia, gracias por estar ahí para mí.

A mis amigos que a lo largo de la carrera estuvieron Ceci, Zyanya, Majo, Brenda, Toño, Tao, Yabin, Sandy, Vale, Dani, Laura, Ubaldo y muchas personas más que estuvieron cuando más los necesite, GRACIAS.

## DEDICATORIAS

*A mi mamá*

*Por ser la luz en mi camino y mi guía en todo momento, por hacerme la persona que soy y por estar siempre atenta a lo que pase. Gracias por ser Bióloga conmigo y aprender de todo lo que te contaba. Te amo siempre!*

*A mi papá*

*Por ser el más grande ejemplo a seguir, por amarme siempre, porque cada día me has enseñado a superarme y a crecer y seguir adelante. Gracias por ser el mejor padre del universo. Te amo infinito!*

*A mi hermano Noé*

*Por ser el más locochón de los hermanos, por amarme y soportarme, por enseñarme a ser niña siempre y hacer de mi vida algo interesante y divertido. Te amo infinito.*

*A mis abuelas y abuelos*

*Por darme a los padres más maravillosos de la existencia y por enseñarme un poco más de la vida. Los amo.*

*A mis tíos Rene, Lety, Gema, Javier*

*Por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se puede llegar a donde uno quiera.*

*A Manuel*

*Por estar aquí, este tiempo ha sido hermoso e invaluable, gracias por apoyarme, ayudarme y amarme como lo has hecho. Gracias por enseñarme que el amor es algo eterno e inquebrantable, te amo.*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>Estrés oxidativo</b> .....	<b>2</b>
<b>Radicales libres</b> .....	<b>2</b>
<b>Antioxidantes</b> .....	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>8</b>
<b>Zona de colecta</b> .....	<b>9</b>
<b>Descripción de la planta</b> .....	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	<b>12</b>
<b>Obtención del material vegetal</b> .....	<b>12</b>
<b>Obtención de los extractos</b> .....	<b>12</b>
<b>Caracterización preliminar de los compuestos presentes en los extractos</b> .....	<b>12</b>
<b>Actividad antioxidante</b> .....	<b>13</b>
<b>Método de DPPH</b> .....	<b>13</b>
<b>Método ABTS</b> .....	<b>13</b>
<b>Método FRAP</b> .....	<b>14</b>
<b>Cuantificación del contenido de fenoles totales</b> .....	<b>14</b>
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>15</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>

**CONCLUSIONES..... 26**  
**BIBLIOGRAFÍA ..... 27**  
**APÉNDICES..... 35**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Procesos de generación de radicales libres.....	<b>3</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de sistemas antioxidantes.....	<b>5</b>
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica de <i>B. biflora</i> .....	<b>15</b>
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento de los extractos de <i>B. biflora</i> .....	<b>16</b>
<b>Tabla 5.</b> Resultados de las pruebas colorimétricas de los extractos de <i>B. biflora</i> .....	<b>16</b>
<b>Tabla 6.</b> Cuadro comparativo de estudios realizados sobre pruebas antioxidantes y contenido de fenoles totales en diferentes especies del género <i>Bursera</i> .....	<b>25</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica del poblado de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.....	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Bursera biflora</i> (Rose) Standl.....	<b>11</b>
<b>Figura 3.</b> Mapa de distribución de <i>B. biflora</i> .....	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Comparación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico de <i>B. biflora</i> (DPPH), así como de la sustancia de referencia (ácido gálico).....	<b>17</b>
<b>Figura 5.</b> Comparación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico de <i>B. biflora</i> frente al radical ABTS+, así como del ácido gálico.....	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Curva patrón del ácido gálico frente al radical FRAP.....	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> Curva patrón del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.....	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Método de maceración.....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema del rotavapor.....	<b>36</b>
<b>Figura 10.</b> Formación de furfurales en la reacción de Molish.....	<b>37</b>
<b>Figura 11.</b> Reacción de FeCl <sub>3</sub> con un fenol.....	<b>38</b>
<b>Figura 12.</b> Curva de absorbancia del radical DPPH en su estado de radical libre (morado) y el no radical (amarillo).....	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b> Placa de 96 pozos con la reacción de DPPH y el antioxidante de referencia.....	<b>41</b>
<b>Figura 14.</b> Reacción de ABTS a ABTS <sup>+</sup> .....	<b>43</b>
<b>Figura 15.</b> Reacción de FRAP de su estado oxidado al reducido.....	<b>44</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

**ABTS:** 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AOX:** Antioxidante

**BHA:** Butilhidroxianisol

**BHT:** Butilhidroxitolueno

**CA<sub>50</sub>:** Capacidad media antioxidante

**CAT:** Catalasa

**DPPH:** Difetil-picril-hidracilo

**EAG:** Equivalentes de ácido gálico

**ER:** Especies reactivas

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**ERN:** Especies reactivas de nitrógeno

**FDA:** Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration)

**FRAP:** Poder antioxidante reductor de hierro (Ferric Reductor Antioxidant Power)

**GPX:** Glutación peroxidasa

**GRX:** Glutación reductasa

**RL:** Radical(es) libre(s)

**SOD:** Superóxido dismutasa

## RESUMEN

A nivel celular son necesarios los procesos reductores y oxidativos, cuando se favorecen estos últimos se llega a un estado denominado estrés oxidativo, donde se producen abundantes radicales libres o disminuye el nivel de los antioxidantes. Para estabilizar a los radicales existen sustancias denominadas antioxidantes, algunos han sido obtenidos de las plantas, las cuales generan metabolitos secundarios con dicha actividad. Los metabolitos secundarios con capacidad antioxidante son producidos en mayor cantidad por estas plantas cuando crecen en zonas donde la irradiación solar y las condiciones climáticas son extremas como lo es el municipio de San Rafael Coxcatlán, ubicado en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán. *Bursera biflora* es una especie arbórea que se desarrolla en esta zona, por lo que es un excelente candidato para buscar sustancias antioxidantes, aunado a que diversos estudios con el género *Bursera* han demostrado que estas especies tienen buena capacidad antioxidante. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *B. biflora*. En el presente trabajo se estudiaron tres extractos de *B. biflora* (hexánico, acetónico y metanólico) obtenidos por el método de maceración y se obtuvieron sus rendimientos; se realizaron pruebas colorimétricas para identificar los principales grupos de metabolitos secundarios y se realizaron tres pruebas antioxidantes *in vitro* frente a los radicales libres DPPH, ABTS y FRAP, así como la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos para los rendimientos de los extractos son de 4.5% para el extracto metanólico, 1.5% del acetónico y 2.9% del hexánico. Todos los extractos fueron positivos para terpenos, así mismo fueron negativos para saponinas; los extractos hexánico y acetónico fueron positivos para glucósidos, los de mediana y alta polaridad (acetónico y metanólico) presentaron fenoles. Los resultados de las pruebas antioxidantes son: el extracto metanólico mostró una capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ) de 20.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente al radical DPPH,  $CA_{50}$  con el ABTS de 43.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 147  $\mu\text{mol}$  de EAG/g de extracto con el método FRAP, y la cuantificación de fenoles totales de 136.22 EAG/mg de extracto. El extracto acetónico obtuvo los siguientes valores de  $CA_{50}$  80.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con el radical DPPH,  $CA_{50}$  99.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente al radical ABTS, 60.04  $\mu\text{mol}$  de EAG/g de extracto con método de FRAP y 30.75 EAG/mg de extracto de fenoles totales. Por lo tanto se concluye que los extractos acetónico y metanólico de *B. biflora* tienen actividad antioxidante frente a los tres radicales analizados en este estudio.

## INTRODUCCIÓN

### **Estrés oxidativo**

A nivel celular son necesarios los procesos oxidantes y reductores para mantener la homeostasis, cuando se presenta algún desbalance se produce un estado denominado estrés oxidativo. Dicho estrés puede provocar daños a biomoléculas e incluso la muerte celular debido a la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas (ER) de oxígeno (ERO) o nitrógeno (ERN) (Kehrer *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo también puede generarse por: a) disminución de antioxidantes, tanto exógenos como endógenos o b) incremento en la producción de ER, por la exposición a altos niveles de oxígeno o contaminantes, presencia de toxinas, por tener una dieta desbalanceada, exposición prolongada y sin protección a la radiación ultravioleta solar, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2007).

El exceso de formación de RL a nivel sistémico, está íntimamente relacionado con algunas enfermedades crónico degenerativas como las neurodegenerativas (Dorado *et al.*, 2003), cardiopatías (Céspedes y Sánchez, 2000), procesos periodontales inflamatorios (García *et al.*, 2002) y se ha encontrado relación con la carcinogénesis (Venereo, 2002), entre otras. Así mismo, el estrés oxidativo es causante del envejecimiento, ya que se oxidan moléculas como el colágeno, elastina, otras proteínas, ácidos nucleicos y grasos (Zorrilla, 2002).

Por lo anterior, los seres vivos cuentan con mecanismos de defensa para neutralizarlos, los cuales se les denominan antioxidantes (Zorrilla, 2002). A continuación se definirán los términos RL y AOX.

### **Radicales libres (RL)**

Los RL se pueden definir como cualquier molécula o átomo capaz de existir independientemente conteniendo uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 2007). Algunos de ellos son inestables y altamente reactivos. Se pueden formar por rompimientos homolíticos o por reacciones REDOX. Una vez que se generan pueden iniciar reacciones en cadena que producen a su vez más RL (Avello y Suwalsky, 2006; Sen *et al.*, 2010).

Los RL son producidos por funciones celulares normales como la explosión respiratoria de neutrófilos y la función del complejo de NADPH oxidasa, entre otros (Tabla 1) o bien pueden ser inducidos por diferentes factores ambientales como la contaminación, el consumo de cigarro, la exposición al ozono, las radiaciones ionizantes y no ionizantes, el consumo de algunos fármacos, drogas, la exposición a pesticidas, quimio y radioterapias, entre otros (Genestra, 2007; Domej *et al.*, 2014).

**Tabla 1.** Procesos de generación de radicales libres

<b>Generadores de radicales libres</b>	
Procesos normales	Fagocitosis Cadena respiratoria Síntesis de prostaglandinas Vías araquidónicas Xantina peroxidasa Lipooxigenasas Citocromo P450
Organelos	Peroxisomas Mitocondria
Procesos de respuesta	Inflamación Isquemia Respuesta inmune
Otros	Ejercicio extenuante

### **Antioxidantes (AOX)**

Un antioxidante (AOX) es aquella sustancia capaz de retardar o inhibir el daño oxidativo (Céspedes y Sánchez, 2000). Actúan reduciendo el daño celular y tisular actuando como bloqueadores o estabilizadores de los RL (Sen *et al.*, 2010).

Los AOX pueden clasificarse por:

- Tipo de moléculas (Rao y Ormond, 1995; Zamora, 2007)

- a) Enzimáticos: son aquellas moléculas de origen proteico con actividad catalítica que metabolizan los RL impidiendo así el daño a los componentes celulares. Algunos pueden usar metales como cofactores.
- b) No enzimáticos: generalmente son obtenidos de la dieta y algunos son producidos por el organismo.
- Modo de acción (Gordon *et al.*, 2004)
  - c) Primarios: este tipo de moléculas captan RL y los reducen durante el período de inducción.
  - d) Secundarios: actúan por diversos mecanismos, por ejemplo, unión a metales pesados, captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no reactivas, absorción de radiación UV o desactivación de oxígeno singulete.
- Tipo de protección que le ofrecen al organismo (Céspedes y Sánchez, 2000)
  - e) Primarios: son de origen enzimático y protegen a los tejidos de la formación de nuevos RL.
  - f) Secundarios: son moléculas no enzimáticas que se dividen en hidrofílicos y lipofílicos,
  - g) Terciarios: son compuestos encargados de reparar biomoléculas dañadas por RL (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de sistemas antioxidantes.

	<b>Clasificación</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Tipo de moléculas</b>	<b>Enzimáticos</b>	<b>Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y reductasa (GRX), tiorredoxina reductasa, etc.</b>
	<b>No enzimáticos</b>	<b>Vitamina A, C, E, curcumina, resveratrol, bioflavonoides, ubiquinolonas, ácido lipolco, bilirrubina, acetil-L-carnitina, coenzima Q, etc.</b>
<b>Modo de acción</b>	<b>Primarios</b>	<b>Fenoles, terpenos</b>
	<b>Secundarios</b>	<b>SOD, GPX, GRX.</b>
<b>Tipo de protección</b>	<b>Primarios</b>	<b>SOD, GPX, proteínas de unión a metales pesados.</b>
	<b>Secundarios</b>	<b>Vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albumina.</b>
	<b>Terciarios</b>	<b>Proteasas reparadoras de ADN y metionina reductasa, entre otros.</b>

Los AOX han sido utilizados por el hombre en la industria para evitar la oxidación de las sustancias orgánicas presentes en los diferentes productos (Mandal, 2012). Algunos de los más utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica son las vitaminas A, C, E, el selenio, el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), entre otros (CTG, 2002; EUFIC, 2004).

Algunos AOX comerciales han reportado tener efectos secundarios. El BHA y BHT, causan alergias, urticaria, desordenes metabólicos y son promotores de la mutagénesis y carcinogénesis (Hernández-Guijo, 2010). Por lo que la búsqueda de AOX de origen natural se está incrementando, y las fuentes más ampliamente estudiadas son las plantas.

Las plantas son productoras de abundantes sustancias las cuales han sido usadas por el hombre, dentro de estas se encuentran las que tienen efecto antioxidante (Ruiz-Terán *et al.*, 2008). Los metabolitos secundarios que presentan actividad antioxidante son principalmente de naturaleza terpénica (Grassman *et al.*, 2002) y fenólica (Rice-Evans *et al.*, 1996), los cuales actúan como AOX primarios (Tabla 2), debido a que tienen la capacidad de donar electrones (Gordon *et al.*, 2004).

La producción de terpenos y compuestos fenólicos en las plantas se ve incrementada cuando hay un exceso en la producción de RL, por factores como el estrés hídrico, el térmico, el mecánico, la exposición a metales pesados, la contaminación del aire (como el ozono) y el exceso de radiación ultravioleta (UV) (Mittler, 2002). Esta última en particular, causa daños en el fotosistema II (Takahashi y Badger, 2011) y para detener este daño las plantas acumulan compuestos principalmente fenólicos en la epidermis de las hojas, lo cual funciona como fotoprotección (Winkel-Shirley, 2002). Por lo que las plantas que habitan en zonas áridas son candidatas ideales para sintetizar compuestos de naturaleza antioxidante y fotoprotectora, como lo son los representantes del género *Bursera* (Rzedowski y Kruse, 1979).

Algunos de los estudios sobre el efecto antioxidante se han realizado en el género *Bursera*. Dicho género es de gran importancia para México ya que este país alberga 80 de las 100 spp. que se tienen reportadas a nivel mundial (Medina-Lemos, 2008), en nuestro país se distribuyen principalmente en los Estados de Michoacán, Oaxaca y Guerrero (Díaz *et al.*, 2013).

## ANTECEDENTES

En el género *Bursera* se han reportado distintos tipos de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes como triterpenos, lignanos, neolignanos, bilignanos, flavonoides (Arriaga, 2011), proantocianidinas (Maldini *et al.*, 2009) y taninos (Serrano, 2013).

Arriaga (2011) identificó algunos compuestos antioxidantes del extracto metanólico de *B. simaruba* como el 5, 6, 3', 4'-tetrahidroxi-flavanol, burselignano, burseneolignano, isolariciresinol y 5-metoxi-(+)-isolariciresinol; estos últimos 4 componentes también fueron reportados por Jutiviboonsuk y colaboradores (2005) en el extracto clorofórmico de *B. tonkinensis*.

Arriaga (2011) estudió la actividad antioxidante de *B. bipinnata*, *B. copallifera* y *B. simaruba* demostrando que las tres especies tienen alta actividad antioxidante mediante técnicas electroquímicas (voltamperometría cíclica y voltamperometría diferencial de pulso). Estas especies fueron colectadas en Querétaro. Posteriormente, se analizó nuevamente a *B. simaruba*, obteniendo como resultado poca actividad antioxidante con los métodos *in vitro* DPPH y ABTS. Las  $CA_{50}$  reportadas fueron con DPPH de 2.117 mg/mL y ABTS de 2.574 mg/mL, lo que comparado con un antioxidante de referencia (Trolox: DPPH,  $CA_{50}= 0.506\pm 0.008$  mg/mL, ABTS,  $CA_{50}= 0.525 \pm 0.01$  mg/mL) resulta tener baja actividad antioxidante (Bah *et al.*, 2014).

Serrano y colaboradores (2012) encontraron para *B. morelensis* una actividad antioxidante alta ( $CA_{50}= 3.04$  µg/mL), lo cual es significativamente igual a lo reportado para el AOX de referencia (quercetina  $CA_{50}= 4.45$  µg/mL), en este estudio se atribuye la capacidad antioxidante a los taninos encontrados en el extracto; la zona de colecta fue San Rafael Coxcatlán.

Rodríguez (2014) encontró una  $CA_{50}$  para *B. aptera* de 11.72 µg/mL, frente al radical DPPH, lo cual está correlacionado con el contenido de fenoles totales (61.2 mg EAG/mL) presentados por esta especie.

Los trabajos anteriormente mencionados hasta el momento de esta revisión son los únicos relacionados con la actividad antioxidante que se reportan para el género *Bursera*, el cual es de importancia nacional por su distribución y abundancia en el territorio.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los antioxidantes se han vuelto indispensables debido a la gran cantidad de factores que contribuyen a generar estrés oxidativo en los organismos, que se ha correlacionado

con diversas enfermedades crónico degenerativas. En las plantas la excesiva irradiación solar es uno de los factores que inducen la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antioxidante. Las plantas del género *Bursera* son unas de las que se encuentran sometidas a altas cantidades de irradiación solar, además se ha reportado que especies de este género presentan actividad antioxidante o compuestos que podrían presentar dicha bioactividad.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los extractos de *Bursera biflora* tendrán actividad antioxidante?

## **HIPÓTESIS**

Se conoce que algunas especies del género *Bursera* poseen metabolitos secundarios con actividad antioxidante, además de estar sometidas a altas cantidades de irradiación solar; por lo tanto esta especie presentará metabolitos secundarios con dicha bioactividad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *Bursera biflora*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

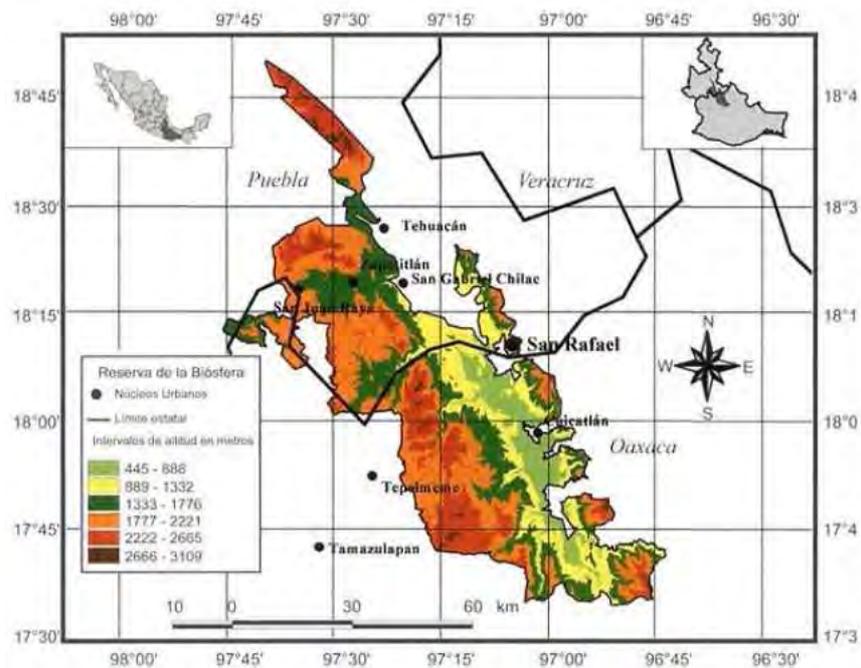
- Obtener los extractos metanólico, acetónico y hexánico de las hojas, ramas y frutos de *B. biflora*.
- Identificar cualitativamente los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *B. biflora*.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de *B. biflora*.
- Determinar la cantidad de fenoles totales de los extractos que presenten actividad antioxidante de *B. biflora*.

## Zona de colecta

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

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

San Rafael Coxcatlán se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, se ubica al sureste del Valle de Tehuacán entre las coordenadas 18° 08' y 18° 21' N, 97° 01' y 97° 13' O, con una altitud de 1217 msnm (Figura 1). La zona tiene un clima semiárido a árido, con una temperatura anual de 22°C y una precipitación de 394.6 mm anuales (Medina, 2000) y presenta un suelo de tipo regosol, principalmente calcáricos, eutrícos y xerosoles principalmente háplicos (Dávila y Lira 2002; INEGI, 2009).



**Figura 1.** Ubicación geográfica del poblado de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Fuente: Canales *et al.*, 2006.

La localidad de San Rafael Coxcatlán es objeto de una línea de investigación etnobotánica regional, que pretende conocer la condición actual de los recursos naturales, así como el proceso de cultivo, manipulación y domesticación de plantas, encaminada a proveer herramientas de manejo para el uso y preservación de los recursos naturales dentro de la Reserva de la Biosfera (Lira, 2001).

La vegetación de San Rafael Coxcatlán es de tipo matorral espinoso con especies como *B. morelensis* Ramírez, *B. aptera* Ramírez, *B. arida* Standley, *B. schlelendalli* Engl., *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeb, *Opuntia puberula* Pfeiffer, *Ceiba parviflora* Rose y *Acacia cochliancantha* Humb. y Bonpl. ex Wild (Dávila y Lira, 2002). Además, se han determinado un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con sus usos medicinales (Rosas, 2003).

### **Descripción de la planta**

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



**Figura 2.** *Bursera biflora* (Rose) Standl.

Fuente: <http://wikivisually.com/wiki/Bursera>

*Bursera biflora* es una especie endémica mexicana, que se distribuye en los estados de Puebla y Oaxaca, aunque se conocen colectas de las cuencas superiores de los ríos Balsas y Tehuantepec, así como en Baja California Sur, Tabasco, Veracruz y Jalisco (Figura 3) (Medina-Lemos, 2008).



**Figura 3.** Mapa de distribución de *B. biflora* (puntos amarillos).

Fuente: <http://www.gbif.org/species/3993010>

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

## MATERIALES Y MÉTODO

### Obtención del material vegetal

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

### Obtención de los extractos

La obtención de los extractos se llevó a cabo por el método de maceración. El material seco (ramas, hojas y frutos) fue pesado y molido. La maceración del material vegetal se realizó con hexano, acetona y metanol. Se dejó reposar por 3 días en los diferentes solventes anteriormente mencionados. Llevándose a cabo una destilación a presión reducida para concentrar los extractos.

El rendimiento de cada extracto se determinó con referencia del peso del extracto y el peso seco de la planta, en base a la siguiente fórmula (Rodríguez, 2014):

$$\text{Rendimiento \%} = (\text{Peso del extracto} / \text{Peso seco de la planta}) * 100$$

### Caracterización preliminar de los compuestos presentes en los extractos

La presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios se determinaron con las reacciones colorimétricas de identificación y se emplearon los siguientes reactivos: para terpenos vainillina en ácido sulfúrico (azul-morado-rosa); la determinación de alcaloides se efectuó por reactivo de Dragendorff (precipitado naranja-rojizo) y reactivo de Mayer (precipitado blanco); para fenoles se empleó cloruro férrico (rojo, púrpura, azul o verde); los glucósidos con reactivo de Molish (anillo violeta) y la de saponinas (prueba de la espuma al menos un minuto) (Muñoz, 2015).

## Actividad antioxidante

### Método de DPPH

El método de DPPH (2,2 difenil-1picrilhidracilo) mide la reducción de dicho radical cuando se le agrega un antioxidante y se deja reaccionar por 30 minutos en oscuridad, esta reacción se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 495 nm. El DPPH se utiliza a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  disuelto en metanol y se mantiene en oscuridad.

Las concentraciones a las que se utilizaron los extractos fueron: 3.12-50  $\mu\text{g/mL}$  (metanólico), 7.81-125  $\mu\text{g/mL}$  (acetónico) y de 7.81 a 500  $\mu\text{g/mL}$  (hexánico). El estándar de referencia fue ácido gálico (2-8  $\mu\text{g/mL}$ ). Como blanco se usaron 200  $\mu\text{L}$  del solvente, como control negativo 200  $\mu\text{L}$  de DPPH (Murillo, 2006).

Los resultados se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción que se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

C= absorbancia del DPPH

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

Para determinar la Capacidad Antioxidante Media ( $CA_{50}$ ) se obtuvo el porcentaje de decoloración del DPPH, haciéndose una regresión lineal con estos datos.

El ensayo de DPPH se realizó por triplicado con 8 repeticiones para cada experimento.

### Método ABTS

El método de ABTS mide la pérdida de color cuando al agregar el cromóforo verde azul  $ABTS^+$  (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)) el radical es reducido por un antioxidante. El radical  $ABTS^+$  se preparó adicionando 2 mL de una solución acuosa de ABTS (7 mM), a una solución de persulfato de potasio (2 mL a 2.45 mM), la cual se incubó por 16 hrs. Posteriormente, se diluyó 1 mL de la solución anterior con 60 mL de metanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 (734 nm) (solución de trabajo). Las concentraciones de los extractos metanólico y acetónico fueron de 10-80  $\mu\text{g/mL}$  y 25-200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. El

antioxidante de referencia fue ácido gálico (5-10 µg/mL) y el blanco fue metanol y agua (1:1). La reacción de los extractos y el antioxidante de referencia con el radical ABTS<sup>+</sup> se midieron a 734 nm, después de 7 minutos de incubación en oscuridad (Re *et al.*, 1999).

Los resultados se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción que se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

A=absorbancia del control (ABTS<sup>+</sup>)

C=absorbancia del experimental (Extracto+ABTS<sup>+</sup>)

La CA<sub>50</sub> se determinó obteniendo el porcentaje de reducción del radical ABTS con ayuda de una regresión lineal. Es importante mencionar que para realizar esta prueba se utilizaron pesajes diferentes, además de realizarlo por triplicado.

### **Método FRAP**

Este método cuantifica el efecto antioxidante de acuerdo a la capacidad para reducir el hierro férrico (Fe<sup>+3</sup>) presente en un complejo con la 2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe<sup>+2</sup>). Se llevaron a cabo con buffer de acetato 300 mM (acetato de sodio) (pH 3.6), que contiene TPTZ 40 mM y FeCl<sub>3</sub> 20 mM. Se utilizaron 2.714 mL de esta solución, y se adicionaron 286 µL de muestra. Se dejaron reposar por 10 minutos y se determinó la absorbancia a 593 nm. La curva patrón se realizó usando ácido gálico (5-35 µg/mL). Y las unidades se expresaron en µmol de equivalentes de ácido gálico/g de extracto (µmol de EAG/g de extracto) (Mesa-Venegas *et al.*, 2008).

### **Cuantificación del contenido de fenoles totales**

El método usado para determinar y cuantificar fenoles totales fue el ensayo de Folin-Ciocalteu, sólo se realizó en los extractos que presentaron actividad antioxidante. Se pesaron 5 mg de los extractos metanólico y acetónico, así como del ácido gálico, se diluyeron en 3 mL de metanol y 7 mL de agua destilada. Se realizó la curva patrón con ácido gálico a concentraciones de 5 a 100 µg/mL. Los extractos metanólico y acetónico se emplearon a una concentración de 0.5

mg/mL, una vez realizadas las diluciones se agregaron 250  $\mu$ L del reactivo de Folin dejando reposar por 5 min en oscuridad, posteriormente se añadieron 750  $\mu$ L de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20% para dejarlos reaccionar por 1 hr en completa oscuridad. Todos los tubos se aforaron a 5 mL. Estas soluciones se midieron en un espectrofotómetro a 760 nm. Posteriormente se interpolaron los resultados obtenidos en la curva patrón de ácido gálico, los resultados finales se expresaron en EAG/mg extracto (Singleton y Rossi, 1965).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los ensayos se analizaron estadísticamente con un ANOVA y posteriormente la prueba de Tukey en Excel.

## **RESULTADOS**

### **Identificación de la planta**

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

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

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

### **Rendimiento de los extractos**

La maceración se realizó a partir de 428.8 g de la parte aérea seca de *B. biflora* (ramas, hojas y frutos). En la tabla 4 se puede observar que el extracto donde se obtuvo el mayor rendimiento

fue el metanólico (4.5%), seguido del extracto hexánico con 2.9%. El extracto que presentó el menor rendimiento fue el extracto acetónico (1.5%).

**Tabla 4.** Rendimiento de los extractos de *B. biflora*.

<b>Extracto</b>	<b>Peso de la planta (g)</b>	<b>Peso del extracto (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>Hexánico</b>		12.5	2.9
<b>Acetónico</b>	428.8	6.2	1.5
<b>Metanólico</b>		19.4	4.5

### **Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos**

El extracto obtenido de la maceración de las hojas, ramas y flores de *B. biflora* con hexano dio positivo para glucósidos y terpenos, los cuales fueron los más abundantes, siendo esta última la reacción más colorida. Los extractos metanólico y acetónico presentan terpenos y fenoles, este último también presentó glucósidos.

La reacción de fenoles para ambos extractos (metanólico y acetónico) fue muy colorida, por lo que este grupo es probable que este en altas concentraciones, esto fue verificado mediante la cuantificación de fenoles totales (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas colorimétricas de los extractos de *B. biflora*.

<b>Grupo de Metabolitos</b>	<b>Hexánico</b>	<b>Acetónico</b>	<b>Metanólico</b>
<b>Alcaloides Dragendorff/Mayer</b>	-/+	-/+	-/+
<b>Glucósidos</b>	+	+	-
<b>Terpenos</b>	+	+	+
<b>Saponinas</b>	-	-	-
<b>Fenoles</b>	-	+	+

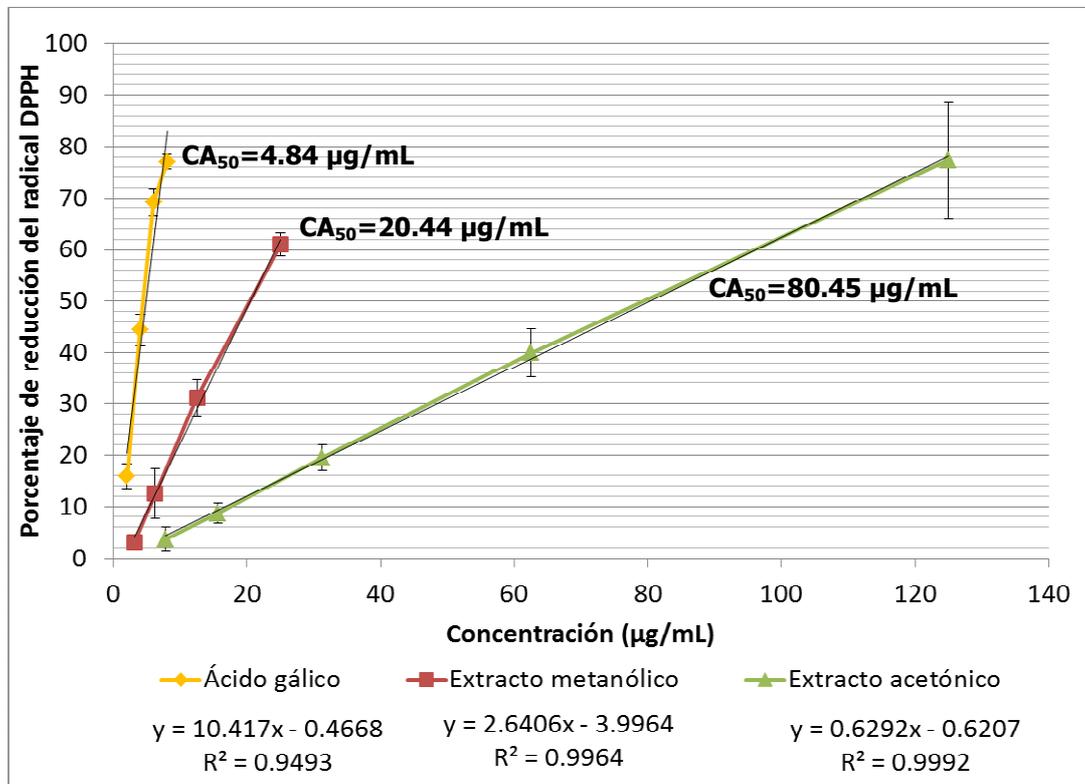
+ positivo, - negativo.

## Actividad antioxidante

### Método DPPH

Los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* presentaron actividad antioxidante frente al radical DPPH. El extracto metanólico presentó una  $CA_{50}$  de 20.44  $\mu\text{g/mL}$  y el extracto acetónico la  $CA_{50}$  fue de 80.45  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $F=1050.14$ ,  $p<0.05$ ). Mientras que la  $CA_{50}$  del ácido gálico fue de 4.84  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual también es significativamente diferente con respecto a los extractos ( $F=1050.144$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 4).

El extracto hexánico no presentó actividad antioxidante en los tres métodos utilizados.



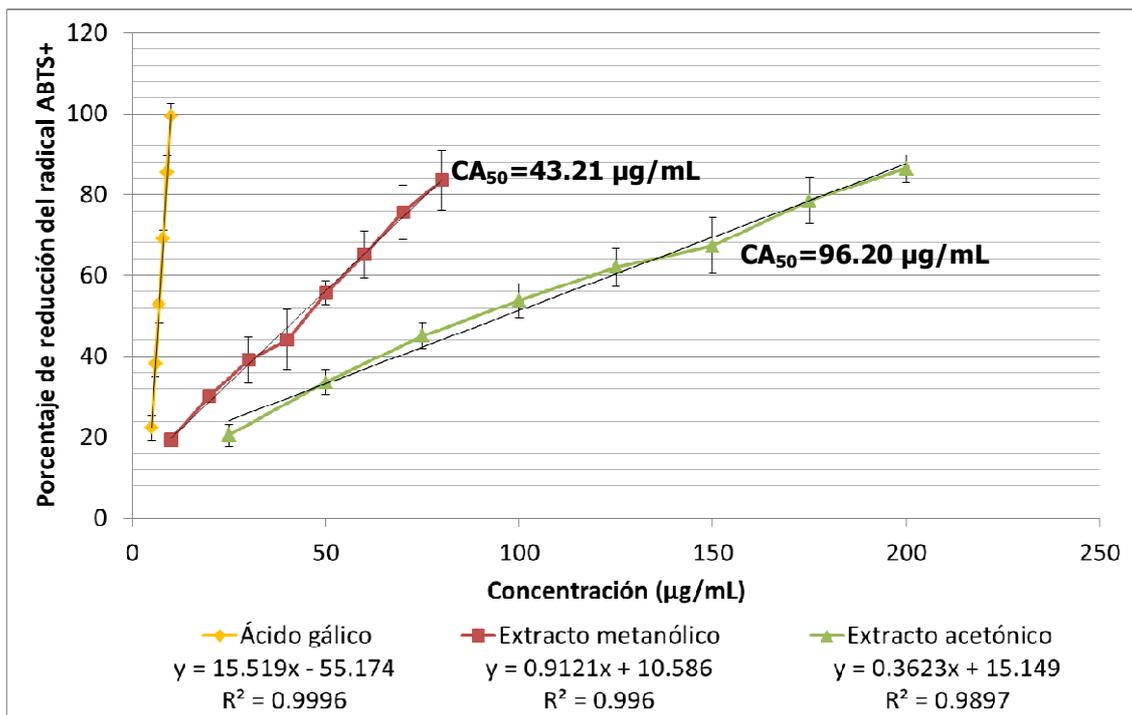
**Figura 4.** Comparación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* (DPPH), así como de la sustancia de referencia (ácido gálico).

### Método ABTS

Los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* presentaron actividad antioxidante contra el radical  $\text{ABTS}^+$ . La  $CA_{50}$  del extracto metanólico ante el radical  $\text{ABTS}^+$  fue de 43.21  $\mu\text{g/mL}$ ,

mientras que para el extracto acetónico fue 96.20  $\mu\text{g/mL}$ , estos valores son diferentes significativamente. El ácido gálico presentó una  $\text{CA}_{50}$  de 1  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual es significativamente menor con respecto a ambos extractos ( $F=136.6$ ,  $p<0.05$ ).

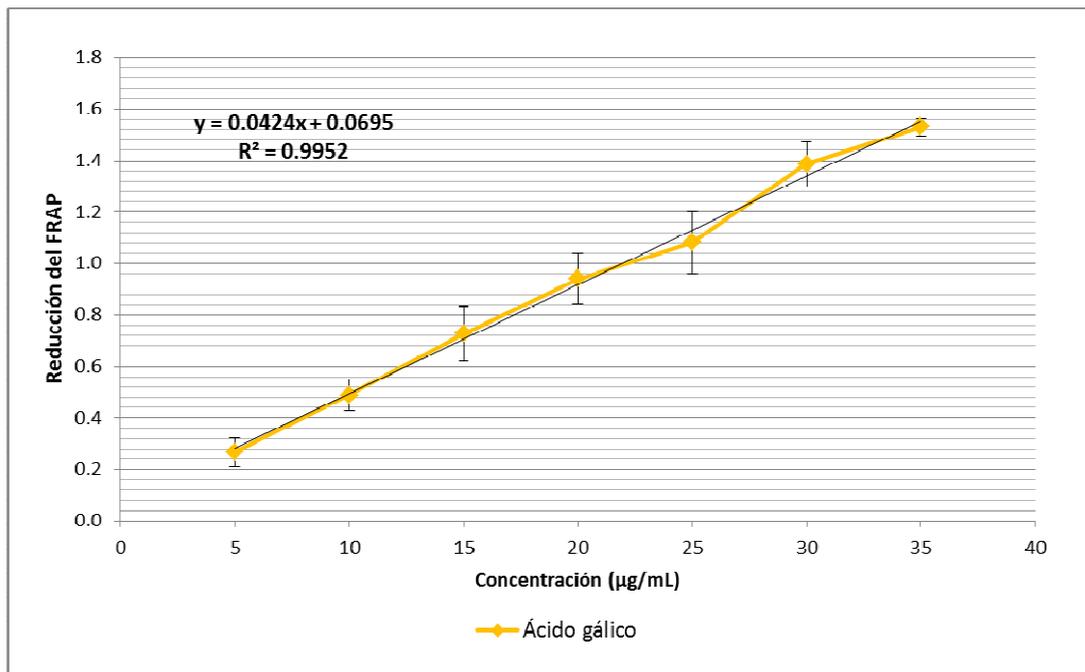
En la figura 5 se muestra la comparación de la actividad antioxidante frente al radical  $\text{ABTS}^+$ , donde se observa que ambos extractos (metanólico y acetónico) tienen menor actividad que el ácido gálico.



**Figura 5.** Comparación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* frente al radical  $\text{ABTS}^+$ , así como del ácido gálico.

### Método FRAP

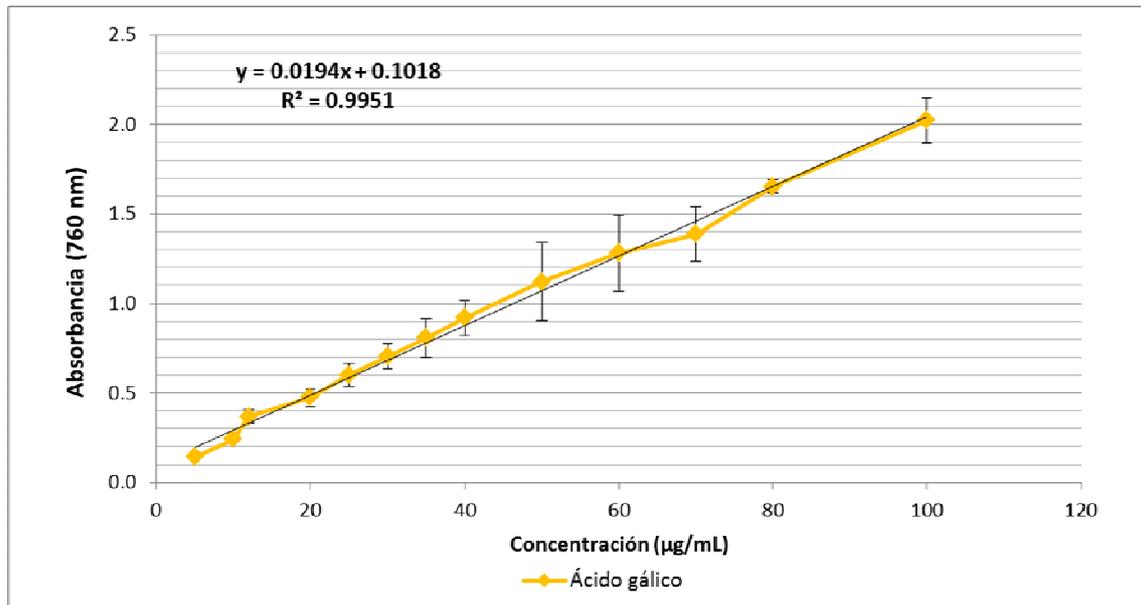
Los extractos metanólico y acetónico presentaron efecto antioxidante frente al radical FRAP, reduciendo el hierro de su estado férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Los extractos metanólico y acetónico presentan valores de 153.57  $\mu\text{mol}$  de EAG/g de extracto metanólico y 68.04  $\mu\text{mol}$  de EAG/g de extracto acetónico. Estos resultados se obtuvieron a partir de la interpolación de los datos arrojados por los extractos de *B. biflora* en la curva patrón de ácido gálico (Figura 6).



**Figura 6.** Curva patrón del ácido gálico frente al radical FRAP.

### Cuantificación del contenido de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo interpolando los valores arrojados por los extractos metanólico y acetónico en la curva patrón de ácido gálico (Figura 7). Los resultados fueron los siguientes: para el extracto metanólico el contenido de fenoles totales fue de 136.2 mg EAG/g de extracto y el extracto acetónico de 30.8 mg EAG/g de extracto.



**Figura 7.** Curva patrón del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

## DISCUSIÓN

Las plantas están expuestas a estímulos externos que las pueden estresar, por lo que presentan múltiples defensas. Se pueden clasificar en constitutivas, las cuales están presentes durante todo el ciclo celular, y en inducidas la que solo se sintetizan si hay un estímulo (Puentes, 2009). Estas condiciones van a determinar la cantidad y la presencia de los metabolitos encontrados en los extractos.

### Rendimiento de los extractos

El rendimiento obtenido por el extracto metanólico de *B. biflora* (4.5%) es menor a lo reportado para *B. arida* 18.54% (Gorgua, 2014), *B. morelensis* 19.66% (García, 2015) y 23.28% (Serrano, 2013). Sin embargo, este resultado es mayor al reportado para *B. aptera* 2.37% (Rodríguez, 2014; Ruiz, 2014) y *B. simaruba* con 0.86% (Vara, 2015). Esto se puede deber a la variabilidad de producción de metabolitos secundarios entre especies (Sepúlveda *et al.*, 2003), también puede influir la época de colecta, la edad de las plantas, así como el órgano o parte utilizada (Hernández, 2004).

El rendimiento de los extractos analizados en este trabajo nos indican que los compuestos de polaridad alta son los más abundantes (4.5%), seguidos por los de baja (2.9%) y los menos abundantes los de intermedia (1.5%), esto es relevante para nuestro trabajo ya que los compuestos fenólicos son a los que se les atribuye principalmente el efecto antioxidante y se encuentran mayormente en los extractos de alta polaridad (metanol).

### **Identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios de los extractos**

Los tres extractos de *B. biflora* presentaron terpenos, sin embargo la reacción fue más colorida en el de menor polaridad (hexánico), esto puede ser debido a que los terpenos son metabolitos generalmente insolubles en agua y por lo tanto son extraídos con solventes de menor polaridad como el hexano (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Estos metabolitos son los más abundantes en el género *Bursera* (Becerra *et al.*, 2009).

En los extractos acetónico y hexánico se presentaron glucósidos. Estos metabolitos secundarios son compuestos altamente polares; sin embargo existen algunos otros metabolitos que se pueden unir a azúcares para poder cumplir su función o almacenarse, lo que podría proporcionar a la molécula glucosídica una parte no polar, la cual al ser procesada con solventes de la misma naturaleza son extraídos de la planta, por lo que la ausencia de glucósidos en el extracto metanólico puede ser explicada por este fenómeno, ya que las extracciones que se llevaron a cabo fueron consecutivas, es decir, primero con hexano, luego con acetona y finalmente con metanol; un ejemplo de estos compuestos son los glucósidos cianogénicos, los cuales en algunos casos presentan estructuras que son de carácter poco polar unido a una glucosa (parte polar) (Selmar, 2010).

La prueba colorimétrica para alcaloides (Dragendorff) resultó ser negativa en los tres extractos de *B. biflora*, según Rzedowski y Ortiz (1988) reportan que estos metabolitos no son característicos para el género *Bursera*.

En ninguno de los tres extractos de *B. biflora* se detectó la presencia de saponinas. Estos son metabolitos de tipo constitutivo, y tienen funciones de toxicidad para microorganismos, insectos, animales incluso para el ser humano (Puentes, 2009). Estos al no estar presentes en los

extractos de *B. biflora*, nos indican que probablemente la presión por depredación y de infección por microorganismos era baja en el momento de colecta, ya que se tienen reportes de que en Puebla hay insectos que se alimentan de las flores de *Bursera* de los órdenes Coleóptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera (Rivas-Arancibia *et al.*, 2015) y se han observado algunos coleópteros que hacen sus nidos en la corteza de algunas especies del género *Bursera* (Morón *et al.*, 1988). Aunado a esto podemos decir que la prueba de espuma es muy poco certera ya que necesita de altas cantidades de saponinas presentes para poder identificarlas, se recomienda cotejarla con una prueba de hemólisis. Otra posible explicación es que esta especie no presenta las enzimas necesarias para la producción de dicho grupo de metabolitos.

Los compuestos fenólicos se han detectado para los extractos metanólicos de las ramas de *B. simaruba* en por lo menos cuatro trabajos, por lo que podría decirse que estos metabolitos son componentes característicos de este género, además de ser un grupo de abundantes metabolitos (Ciccio y Rosales, 1995; Chosson *et al.*, 1997; Żoelek *et al.*, 2003; Maldini *et al.*, 2009). Nolasco (2014) y Serrano (2013) reportan que *B. morelensis* tiene fenoles en el extracto metanólico, con lo que todo lo anteriormente mencionado por estos autores concuerda con el presente trabajo. Además este tipo de metabolitos se ha reportado como uno de los más abundantes en el género *Bursera* (Becerra *et al.*, 2009).

### **Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles totales**

El extracto hexánico de ramas, hojas y frutos de *B. biflora* no presentó actividad antioxidante. Lo anterior coincide con los estudios realizados con diversas especies del género *Bursera*. Esto se ha cotejado con distintos métodos *in vitro* antioxidantes ante radicales como DPPH, (Serrano, 2013) ABTS, FRAP (Bah, *et al.*, 2014) y voltamperometría cíclica (Arriaga, 2011) (Tabla 6). Esto se puede deber a que dicho extracto no presenta fenoles, que son los metabolitos secundarios a los que se les ha atribuido la mayor parte del efecto antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996), a pesar de que presenta abundantes terpenos, los cuales también se reportan con esta actividad (Evans *et al.*, 2000; Grassmann *et al.*, 2002). Probablemente los terpenos presentes en el extracto hexánico no tienen una estructura que les permita tener actividad antioxidante o su actividad es muy débil en comparación con la concentración de radical a la que está expuesta;

algunos ejemplos de este tipo de terpenos pueden ser los diterpenos verticilanos (Gigliarelli *et al.*, 2015). Los terpenos verticilanos no presentan ni dobles enlaces y tampoco hidrógenos para estabilizar RL.

Serrano (2013), encontró que la partición metanólica del extracto metanólico de corteza de *B. morelensis* tiene una  $CA_{50}$  frente al radical DPPH en 3.05  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual es mejor a la capacidad media antioxidante reportada en presente trabajo (20.44  $\mu\text{g/mL}$ ). Estas diferencias de capacidades antioxidantes son debidas principalmente a la cantidad de fenoles totales que se presentan en estas dos especies, ya que para *B. morelensis* se reportaron 504.14 mg EAG/g de extracto y para *B. biflora* 136.22 mg EAG/g de extracto, lo que demuestra que los compuestos fenólicos son los principales responsables del efecto antioxidante de los extractos estudiados. La producción diferencial de los compuestos fenólicos pueden deberse a la síntesis especie específica de metabolitos secundarios, lo que es parte de una estrategia adaptativa de las plantas y esta se incrementa de acuerdo a las condiciones ambientales (Sepúlveda *et al.*, 2003). Otra razón por la que se pudiera observar esta diferencia entre el trabajo de Serrano y el presente estudio, la expresaron Siddhuraju y colaboradores (2002), quienes mostraron que *Cassia fistula* tuvo una actividad menor en los extractos de frutos y flores que en los de corteza, debido a que los frutos presentaron compuestos prooxidantes. También podría ser un factor importante la cantidad de planta de la que se obtuvieron los extractos, ya que Serrano utilizó 646 g de corteza para realizar el extracto y en este trabajo se usaron 428.8 g de ramas, frutos y hojas.

Bah y colaboradores (2014) realizaron un estudio al extracto metanólico de *B. simaruba* obteniendo poca actividad antioxidante en tres métodos, encontraron una  $CA_{50} = 2117 \mu\text{g/mL}$  frente al radical DPPH, con el radical ABTS 2574  $\mu\text{g/mL}$  y redujo el radical FRAP con un valor de 4493  $\mu\text{mol}$  de eq. de  $\text{FeSO}_4$ , lo cual resalta que la actividad antioxidante de *B. simaruba* es menor a la de *B. biflora*. Estas diferencias se pueden deber a la zona de colecta, ya que las condiciones de temperatura, radiación y precipitación son menos extremas en Querétaro que en San Rafael, esta última es considerada la zona más seca del sur del país (Dávila *et al.*, 1993). Estas condiciones ambientales generan RL los cuales a su vez inducen la síntesis de compuestos fenólicos como medio de defensa para evitar daños a las células y compuestos celulares de las plantas (Sepúlveda *et al.*, 2003). Aunado a la diferencia de la producción de metabolitos

secundarios intraespecíficamente. Bah y colaboradores (2014) atribuyen la falta de actividad al poco contenido de fenoles encontrados.

El efecto antioxidante del extracto metanólico de *B. biflora* presenta diferencias significativas con el ácido gálico demostrando que su actividad antioxidante es menor que dicho compuesto, esto puede deberse a que el compuesto puro es en su totalidad antioxidante mientras que el extracto posee una mezcla de compuestos, los cuales pueden no ser necesariamente antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Los extractos metanólico y acetónico presentan fenoles en abundancia. La actividad antioxidante podría explicarse por su presencia, ya que estos MS deben esta bioactividad a la facilidad con que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático se puede donar o transferir a un radical libre; así como a la capacidad del resto fenólico para mantener un electrón desapareado debido a la deslocalización del sistema de electrones- $\pi$  (López-Vélez *et al.*, 2003). Otros compuestos fenólicos como los flavonoides han demostrado tener propiedades quelantes de hierro, además de captar RL (Ciappini *et al.*, 2013).

No se han reportado trabajos con extractos acetónicos de ninguna especie del género *Bursera*, para ninguno de los métodos utilizados en este trabajo (DPPH, ABTS y FRAP), por lo cual los resultados de este estudio son los primeros que se reportan.

Las  $CA_{50}$  de los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* reportadas frente al radical DPPH son menores a los otros métodos debido a que su potencial redox es de 0.25 V (Prior *et al.*, 2005), lo cual genera que la energía para conseguir su estabilización sea más baja, mientras que la energía necesaria para contrarrestar o neutralizar a los radicales ABTS y FRAP son mayores ya que sus potenciales son de 0.68 y 0.7 V (Prior *et al.*, 2005), respectivamente.

De acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration, USA) son considerados como buenos antioxidantes aquellos compuestos o mezclas que están por debajo de las 200  $\mu\text{g/mL}$  (Gardziella *et al.*, 2000), por lo que el extracto metanólico y acetónico de *B. biflora* se consideran como buenos antioxidantes ya que están muy por debajo de este límite.

Tabla 6. Cuadro comparativo de estudios realizados sobre pruebas antioxidantes y contenido de fenoles totales en diferentes especies del género *Bursera*.

AUTOR	AÑO	ESPECIE	ZONA DE COLECTA	EXTRACTO	Pruebas antioxidantes			Fenoles totales
					DPPH ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ABTS ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	FRAP	FOLIN-CIOCALTEU (EAG/ g de extracto)
En este estudio	2016	<i>Bursera biflora</i>	San Rafael, Coxcatlán, Puebla	Metanólico	20.44	43.31	147 $\mu\text{mol}$ de EAG/g extracto	136.22
				Acetónico	80.45	99.2	60.04 $\mu\text{mol}$ de EAG/g extracto	30.75
Serrano	2013	<i>Bursera morelensis</i>	San Rafael, Coxcatlán, Puebla	Metanólico (corteza)	n.d.	n.d.	n.d.	456.15
				Fracción metanólica	3.05	n.d.	n.d.	504.54
Bah y colaboradores	2014	<i>Bursera simaruba</i>	Jalpan de Serra, Querétaro	Metanólico	2117	2570	4493 $\mu\text{m eq FeSO}_4$	n.d.
				Hexánico	nulo	nulo	nulo	n.d.
Rodríguez	2014	<i>Bursera aptera</i>	Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán	Metanólico	11.72	n.d.	n.d.	61.2

N.d.= no determinado.

### **CONCLUSIONES**

- Los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* presentaron actividad antioxidante.
- Todos los extractos de *B. biflora* presentaron terpenos.
- Los extractos metanólico y acetónico de *B. biflora* presentaron actividad antioxidante frente a los radicales DPPH, ABTS y FRAP.
- El extracto metanólico de *B. biflora* presenta mejor actividad antioxidante que el extracto acetónico.
- El extracto hexánico de *B. biflora* no presentó actividad antioxidante frente a los radicales evaluados.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aguilar, S. R. y R. García. 2004. Catálogo de plantas reportadas como parte de la dieta de la guacamaya verde (*Ara militaris*) en la región de la cañada oaxaqueña. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, México. 44 p.
- Alam, N. M., N. J., Bristi y Rafiquzzaman. 2013. Review on *in vitro* and *in vivo* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21: 143-152.
- Arango, A. J. G. 2008. Manual de prácticas de alcaloides y compuestos nitrogenados, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf> Fecha de acceso: Marzo 2016.
- Arriaga, W. E. P. 2011. Evaluación del potencial antioxidante de extractos de especies de *Bursera*, *Matricaria* y *Cymbopogon* mediante técnicas electroquímicas. Tesis de Licenciatura, Ingeniería Química en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, 73 p.
- Ávalos, G. A. y E. C. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario en plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
- Avello, M. y M. Suwalsky. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494: 161-172.
- Bah, M., D. M. Gutierréz-Avella, S. Mendoza, V. Rodríguez-López y R. Castañeda-Moreno. 2014. Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6): 527-536.
- Becerra, X. J., K. Nogue y L. Venable. 2009. Macroevolutionary chemical escalation in an ancient plant-herbivore arms race. *Proceedings of the National Academic Sciences*, 106(13): 18062-18066.
- Blainski, A., G. C. Lopes y J. C. de M. Palazzo. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18: 6852-6865.
- Casas, A., A. Valiente-Banuet, J. L. Viveros, J. Caballero, L. Cortés, P. Dávila, R. Lira y I. Rodríguez-Arévalo. 2001. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlán Valley, México. *Economic Ethnobotany*, 55: 129-166.

- Céspedes, C. T. y Sánchez, S. D. 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*, 14(1): 55-60.
- Chosson, E., A. Chaboud, A. J. Chulia y J. Raynaud. 1997. A phloracetophenone glucoside from *Rhododendron ferrugineum*. *Phytochemistry*, 47: 87-88.
- Ciappini, M. C., F. S. Stoppani, R. Martinet y M. B. Alvarez. 2013. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucaliptos y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 19: 45-51.
- Ciccio, J. F. y J. M. Rosales. 1995. Isolation of the lignan yatein from bark of *Bursera simaruba* (Burseraceae). *Revista de Ingeniería de Ciencias Químicas*, 15: 20-21
- CTG, Centro Tecnológico Granotec. 2002. *Antioxidantes naturales: Vitamina C y E*. Industria de Alimentos. México: 4-7.
- Dávila, A. P. y R. S., Lira. 2002. La flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Coxcatlán y Zapotitlán Salinas, Puebla. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. T015. México. 73 p.
- Dávila, P., J. L., Villaseñor, R. Medina, A. Salinas, J. Sánchez-Kén y P. Tenorio. 1993. Listados florísticos de México. X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México 8 p.
- Díaz, N. A., J. V. Jorrín-Novo, J. A. Bárcena-Ruíz. 2006. Manual de prácticas de reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares. Universidad de Córdoba, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, España. 1-8 Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimicabiolmol/pdfs/20%20REACCIONES%20COLOREADAS%20DE%20AZ%20C%20ACARES.pdf> Fecha de acceso: Marzo 2016.
- Díaz, L. E., J. M. C. Loeza, I. B. Hernández, C. H. Sánchez, J. M. P. Campos, C. H. D. Bravo e I. J. G. Orlando. 2013. *Manual técnico para Propagación de Burseraceae en la Cañada Oaxaqueña*. Universidad de la Cañada. Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca. 16 p.
- Domej, W., K. Oettl y W. Renner. 2014. Oxidative stress and free radicals in COPD-implications and relevance for treatment. *International Journal of COPD*, 4(9): 1207-1224.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
- Dorado, C. M., C. V., Rugerio y S. A., Rivas. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México*. 46(6): 229-235.

- EUFIC European Food Information Council. 2004. Los alimentos también deben tener buen aspecto- ¿por qué son tan importantes los antioxidantes?. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/artid/buen-aspecto-alimentos-antioxidantes/> Fecha de acceso: Octubre 2015.
- Evans, P. H., J. X. Becerra D. L. Venable y W. S. Bowers. 2000. Chemical study of squirt-gun defense in *Bursera* and counterdefense by chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 745-754.
- Fernández, H. C., M. B. Báez y R. D. Sarduy. 1995. Tamizaje de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. III. Sierra del Rosario. *Revista Cubana de Enfermería*, 11(3): 23-24.
- Gardziella, A., L. A., Pilato y Knop. 2000. *Phenolic Resins*. 2da. Edición. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. Alemania. 560 p.
- García, L. A.J. 2015. Caracterización del efecto del extracto metanólico de la corteza de *Bursera morelensis* sobre *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 79 p.
- García, T.E. B., A. B., Saldaña y C. F., Soto. 2002. El estrés oxidativo en los efectos sistémicos de la enfermedad periodontal inflamatoria. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 21(3):194-196.
- Genestra, M. 2007. Oxy radical, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. *Cell signal*, 19(9): 1807-1819.
- Gigliarelli, G., J. X. Becerra, M. Curini y M. C. Marcotullio. 2015. Chemical composition and biological activities of fragrant Mexican copal (*Bursera* spp.). *Molecules*, 20: 22383-22394.
- Grassman, J., S. Hippeli y E. F. Elstner. 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoidins oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 471-478.
- Gordon, M., J., Pokorny y N. Yanishlieva. 2004. *Antioxidantes de los alimentos*. Aplicaciones prácticas. Zaragoza, Ed. ACRIBIA.\*
- Gorgua, J. G. 2014. *Actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de Bursera arida (Rose) Standl.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 73 p.
- Guedea, F. G. E. D. 2012. Rotavapor. En: Aguilar, A. I., F. A. Arriaga, O. E. Campoy, F. G. Elías, S. N. L. García, F. G. E. D. Guedea, G. L. A. Hernández, P. L. B. Hernández, R. D.

- Herrera, V. J. A. Lara, P. M. Mandujano, G. M. G. Molina, R. A. C. Monsalvo, H. M. T. Olvera, S. C. Ordoñez, M. G. Ortiz, Z. R. E. Quintanar, H. A. Trujillo, U. B. R. Urbieto y M. J. Medrano. 2012. Instrumentos y equipos de laboratorio. Fundamentos y usos. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 205 pp.
- Halliwell, B. y J. M. C., Gutteridge. 2007. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 4º edición, E.U.A., 851 p.
- Hernández, D. C. T. 2004. Etnobotánica y actividad microbiana de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Doctorado, Facultad de Estudios Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, 163 p.
- Hernández-Guijo, J. M. 2010. *Aditivos Alimentarios*. Toxicología alimentaria. Universidad Autónoma de Madrid. 13 pp.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Coxcatlán, Puebla. Clave geoestadística 21035.
- Jutiviboonsuk, A., H. Zhang, G. T. Tan, C. Ma, N. Van Hung, N. M. Cuong, N. Bunyapraphatsara, D. D. Soejarto y H. H. S. Fong. 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*, 66: 2745-2751.
- Kedare, S. B. y R. P. Singh. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4): 412-422.
- Kehrer, J.P., J.D. Robertson y C. V. Smith. 2010. Free radicals and Reactive Oxygen Species. *Elsevier*. Estados Unidos de Norteamérica pp 277-307.
- López-Vélez, M., F. Martínez-Martínez y C. Del Valle-Ribes. 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3): 233-244.
- Maldini, M., P. Montoro, S. Piacente y S. Pizza. 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. Bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70: 641-649.
- Mandal, A. 2012. Antioxidantes en tecnología. Disponible en: [http://www.news-medical.net/health/Antioxidants-in-Technology-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Antioxidants-in-Technology-(Spanish).aspx) Fecha de consulta: Septiembre, 2016.

- Martínez, A. M. 2001. Saponinas esteroides. Universidad de Antioquia. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf> Fecha de consulta: Septiembre, 2016.
- Medina, J., 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis de Licenciatura, Facultad de estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 48 p.
- Medina-Lemos, R. 2008. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 66. BURSERACEAE. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 82 p.
- Mesa-Venegas, A. M., C. A. Gaviria, F. Cardona, J. A. Sáez-Vega, S. B. Trujillo y B. A. Rojano. 2008. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 11 pp.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410.
- Moreno, S., E. Jiménez y C. Saura. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20: 25-27.
- Morón, M. A., J. Valenzuela y R. A. Terron. 1988. La macro-colepteroфаuna saproxilofila de Soconusco, Chiapas, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 74: 145-158.
- Muñoz, C. D. S. 2015. *Larrea tridentata* de dos zonas áridas de México: Análisis fitoquímico y evaluación antioxidante. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 89 p.
- Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante *in Vitro* de las bebidas de frutas. *Revista Tecnológica Alfa Editores Técnicos*, 27 pp.
- Nolasco, O. E. 2014. Análisis de la variación temporal de los principales metabolitos secundarios presentes *Bursera morelensis* (Ramírez). Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 78 p.
- Parry, J., L., Su, M., Luther, K. Q., Zhou, M. P., Yuraweez, P., Whittaker y L. L., Yu. 2005. Fatty acids composition and antioxidant properties of col-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry and blueberry seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 566-573.
- Prior, R., X. Wu y K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

- Puentes, D. L. N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2): 32-35.
- Rao, M. V. y D. P., Ormond. 1995. Impact of UVB and O<sub>3</sub> on the oxygen free radical scavenging system in *Arabidopsis thaliana* genotypes differing in flavonoid biosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, 62: 719-726.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9710): 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., J. M. Miller y G. Paganga. 1996. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956.
- Rivas-Arancibia, S. P., E. Bello-Cervantes, H. Carrillo-Ruíz, A. R. Andrés-Hernández, D. M. Figueroa-Castro y S. Guzmán-Jiménez. 2015. Variaciones de la comunidad de visitantes florales de *Bursera copallifera* (Burseraceae) a lo largo de un gradiente de perturbación antropogénica. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86: 178-187.
- Rodríguez, L. M. G. 2014. Estudio de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de *Bursera aptera* Ramírez. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 92 p.
- Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 94 p.
- Ruíz, H. P. A. 2014. Actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *Bursera áptera* Ramírez. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 58 p.
- Ruíz-Terán, F., A. Medrano-Martínez y A. Navarro-Ocaña. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plants extracts used in traditional medicine in Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 7(12):1886-1893.
- Rzedowski, J. y G. de R. Calderón. 2006. Dos especies nuevas de *Bursera* (Burseraceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, 74: 169-178.
- Rzedowski, J. y H. Kruse. 1979. Algunas tendencias evolutivas de *Bursera* (Burseraceae). *Taxon*, 28: 102-116.

- Rzedowski, J. y E. Ortíz. 1988. Estudios quimiotaxonómicos de *Bursera* (Burseraceae). (II). Una especie nueva de origen híbrido de la barranca de Tolantongo. Estado de Hidalgo. *Acta Botánica Mexicana*, 1: 11-19.
- Selmar, D. 2010. Biosynthesis of cyanogenic glycosides, glucosinolates and non-protein aminoacids. *Annual Plant Reviews*, 40: 92-181.
- Sen, S., R. Chakraborty, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy y B. De. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1): 91-100.
- Sepúlveda, J. G., D.H. Porta y S. M., Rocha. 2003. La partición de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):355-363.
- Serrano, R. P. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis Doctorado en Ciencias, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 138 p.
- Serrano, R. P., B. C. Vázquez, D. C. Segura, A. L. L. Anaya, M. Jiménez-Estrada y M. M. Canales. 2012. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications of cutaneous wound healing. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(44): 5609-5615.
- Siddhuraju, P., P. S. Mohan y K. Becker. 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79: 61-67.
- Singleton V. y J. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 144-153.
- Takahashi, S. y M. R. Badger. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*, 16(1): 53-60.
- Vara, M. P. M. 2015. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto metanólico de la corteza del árbol *Bursera simaruba* recolectada en el estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., 81 p.
- Venereo, J.R. G. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2):126- 133.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 218-223.

- Zamora, J. D. S. 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1): 17-26.
- Żoelek, T., K. Paradowska y I. Wawer. 2003. <sup>13</sup>C CP MAS NMR and GIAO-CHF calculations of coumarins. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 23: 77-87.
- Zorrilla, G. A. E. 2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 21(3): 178-18.

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1

#### Método de maceración

El método de maceración consiste en la obtención del extracto con solventes orgánicos a partir del material vegetal, generalmente se usa seco y pulverizado o en trozos pequeños. Este se coloca en un matraz y se agrega el solvente apropiado, de acuerdo al extracto que se desea obtener. En el presente trabajo se utilizaron hexano ( $C_6H_{14}$ ), acetona ( $C_3H_6O$ ) y metanol ( $CH_3OH$ ) (Figura 8). Se deja reposar 72 horas, se filtra el extracto y se evapora el exceso de solvente por destilación a presión reducida. Después de esto se evapora el solvente en su totalidad a temperatura ambiente, o con ayuda de un ventilador. Finalmente se pesa el extracto y se determina el rendimiento del extracto (Domínguez, 1973).



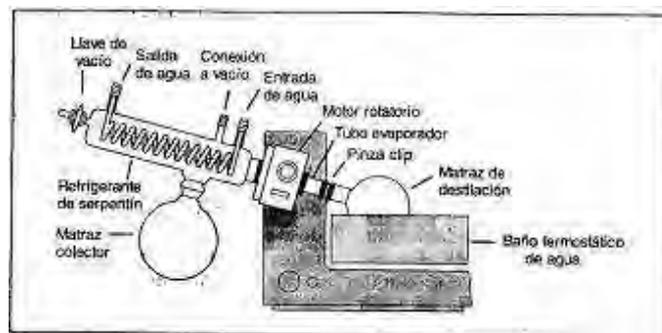
**Figura 8.** Método de maceración.

## APÉNDICE 2

### Destilación a presión reducida

La destilación es un proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor, para posteriormente enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. El objetivo es separar mezclas de líquidos aprovechando las diferentes polaridades.

Esta técnica se desarrolla con ayuda de un rotavapor, el cual fue inventado en Suiza hace más de 50 años. El rotavapor (Marca Heidolph, Laborota 4000 efficient) consta de un sistema de vidrio conformado por un refrigerante tipo serpentín o espiral, adaptado a un matraz de bola donde se coloca la muestra biológica disueltos en solventes orgánicos, los cuales se evaporarán con ayuda de vacío (Figura 9) (Guedea, 2012).



**Figura 9.** Esquema del rotavapor.

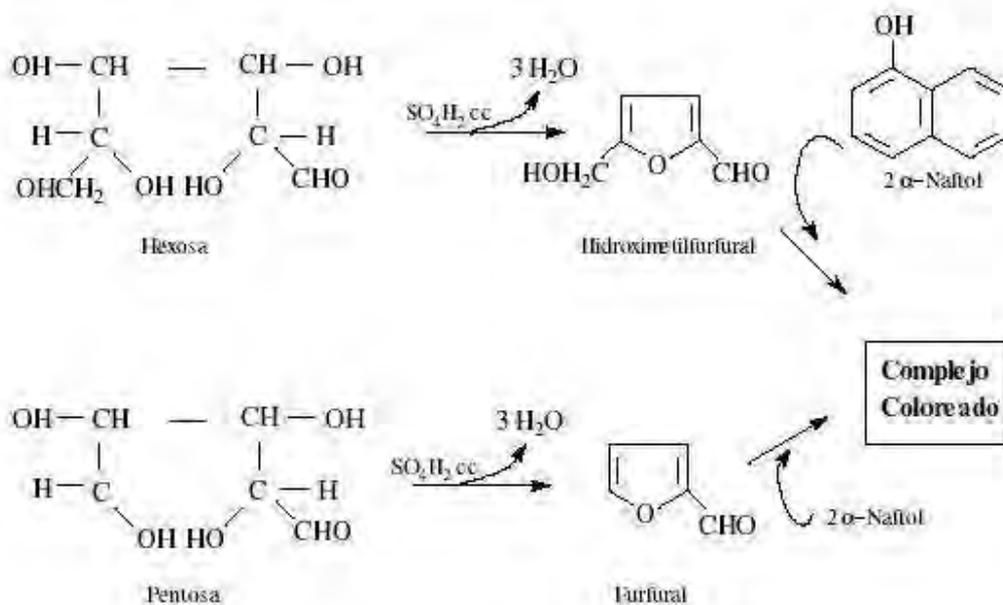
Fuente: [https://rodas5.us.es/file/116d23b8-c458-2012-481b-2357ffa2b34/2/modulo\\_general\\_SCORM.zip/pagina\\_19.htm](https://rodas5.us.es/file/116d23b8-c458-2012-481b-2357ffa2b34/2/modulo_general_SCORM.zip/pagina_19.htm)

## APÉNDICE 3

### Reacciones colorimétricas para la identificación de metabolitos secundarios

#### Reacción de Molish para glucósidos

El ensayo de Molish permite detectar la presencia de carbohidratos en una muestra, en base a la acción hidrolizante y deshidratante que ejerce el ácido sulfúrico sobre dichos compuestos. Los ácidos originan deshidratación de los azúcares para rendir furfurales (derivados aldehídicos del furano). Los furfurales se condensan con los fenoles dando como productos derivados coloreados característicos (dando como resultados derivados del color púrpura), empleados frecuentemente en el análisis colorimétrico (Figura 10). A pesar de que es una prueba dirigida a monosacáridos, algunos poli y oligosacáridos también dan positivo, por el medio ácido y la hidrólisis del enlace glucosídico (Díaz *et al.*, 2006).



**Figura 10.** Formación de furfurales en la reacción de Molish.

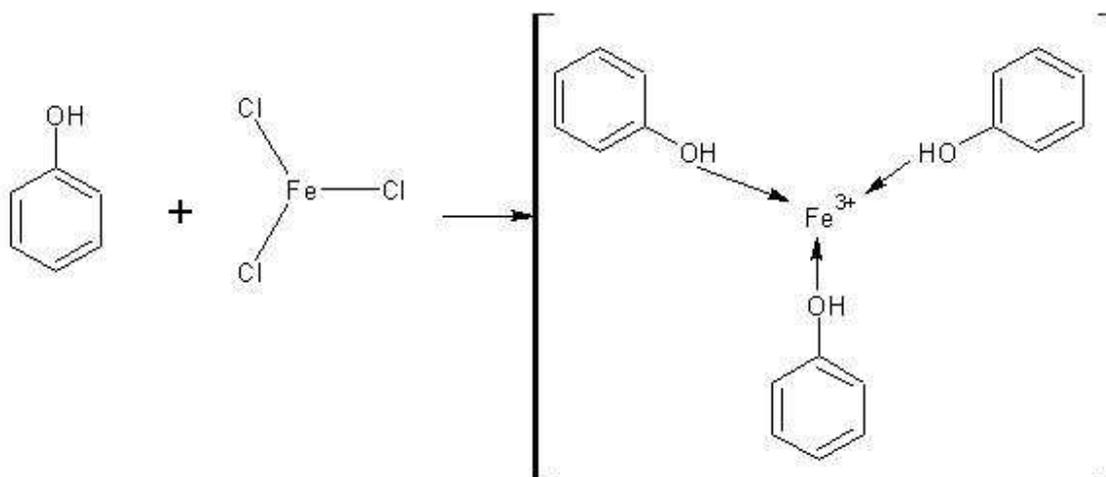
Fuente: <https://sites.google.com/site/bioquia9/reaccion-de-molish>

El procedimiento a seguir fue el siguiente:

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

### Reacción con cloruro férrico para fenoles

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



**Figura 11.** Reacción de  $FeCl_3$  con un fenol.

Fuente: [https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica\\_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/test-analisis-funcional-2011/e4\\_2011/e4\\_2011](https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/test-analisis-funcional-2011/e4_2011/e4_2011)

Procedimiento:

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

### Reacciones para alcaloides (Dragendorff y Mayer)

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal de combinarse con el yodo y metales pesados como el bismuto, mercurio, tungsteno, formando precipitados (Arango, 2008).

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

Procedimiento:

Diluir 1.3 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua, agregar 5 g de KI y aforar a 100 mL

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

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

Procedimiento:

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

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

### **Reacción para saponinas- Ensayo de espuma**

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

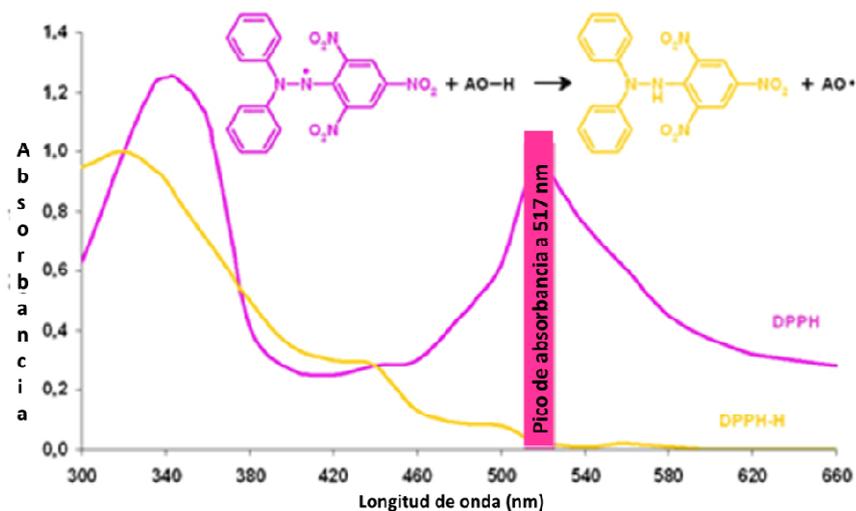
Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen

otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir ente ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides (Martínez, 2001).

## APÉNDICE 4

### Método DPPH

La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidracilo es un radical libre estable, tiene un electrón deslocalizado, que no forma dímeros, por lo cual no se puede estabilizar de esta manera. El electrón desapareado le confiere el color violeta, caracterizado por una banda de absorción a 517 nm en solución metanólica (Figura 12) (Alam *et al.*, 2013).



**Figura 12.** Curva de absorción del radical DPPH en su estado de radical libre (morado) y el no radical (amarillo). Fuente: [https://www.researchgate.net/post/DPPH\\_Antioxidant\\_assay\\_Method\\_Development2](https://www.researchgate.net/post/DPPH_Antioxidant_assay_Method_Development2)

Este método antioxidante se basa en la capacidad de reducción del átomo de nitrógeno mediante la recepción de un hidrógeno para la hidracina correspondiente, lo cual hace que se pierda el color violeta (Kedare y Singh, 2011).

La determinación de actividad antioxidante es fácil y de una gama bastante amplia ya que pueden usarse diversos sistemas de solventes incluyendo el etanol, metanol, acetona:agua, alcohol:agua y benceno (Parry *et al.*, 2005).

La determinación de la capacidad antioxidante media ( $CA_{50}$ ) con este método se llevó acabo de la siguiente manera: en una placa de 96 pozos se adicionaron 50  $\mu$ L de los extractos metanólico, acetónico y hexánico a diferentes concentraciones (M= 3.12-50  $\mu$ g/mL; A= 7.8125-125  $\mu$ g/mL; H= 7.8125-500  $\mu$ g/mL), posteriormente se adicionaron 150  $\mu$ L de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 250  $\mu$ M (Figura 13). Dicha placa fue incubada en la oscuridad por 30 minutos, para después determinar su absorbancia a 495 nm en un lector de ELISA. Como referencia se utilizó ácido gálico, como control negativo se usaron 200  $\mu$ L de metanol. La actividad antioxidante sobre el DPPH se expresó como porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

C= absorbancia del DPPH

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



**Figura 13.** Placa de 96 pozos con la reacción de DPPH y el antioxidante de referencia.

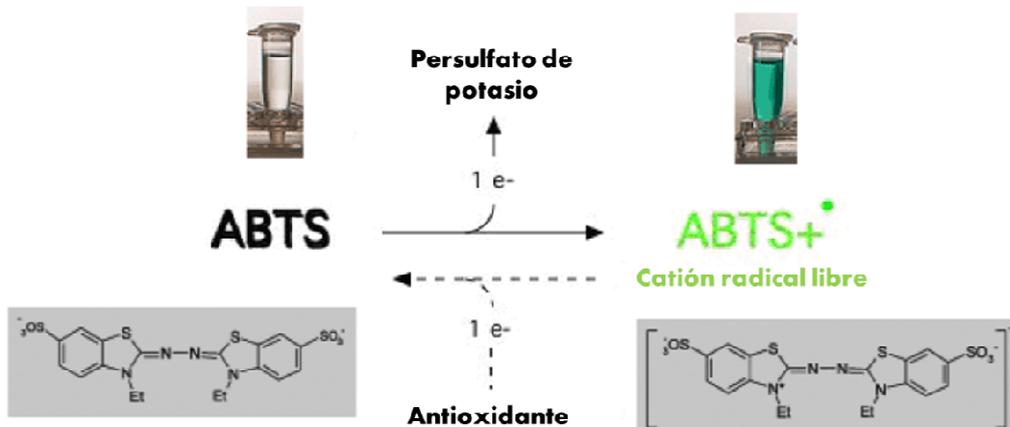
## APÉNDICE 5

### Método ABTS

El ensayo de ABTS (ácido 2, 2,azinobis-(3-etilbenzotioazolin-6-sulfónico)), o también conocido como TEAC, se basa en la capacidad del radical catión  $ABTS^+$  para reaccionar con los AOX. Este radical es de coloración verde azulada que disminuye al interactuar con los AOX, esta disminución se produce en la longitud de onda de 734 nm (Moreno *et al.*, 2000)

El  $ABTS^+$  es soluble en disolventes orgánicos y acuosos, por lo que es un método apto para determinar la capacidad antioxidante tanto lipofílica como hidrofílica de extractos y fluidos biológicos (Prior, 2005).

El radical catiónico ABTS se obtuvo siguiendo los pasos que a continuación se presentan: para la solución de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) se utilizaron 3 mL a 2.45 mM, y del ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)) se prepararon 3 mL a 7 mM, de cada una de estas soluciones se mezclaron 2 mL y se dejaron reaccionar por 12-14 hrs en completa oscuridad a temperatura ambiente. Después de esta incubación se preparó la solución de trabajo para la cual se diluyó 1 mL con un promedio de 60 a 90 mL de metanol o hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 a 734 nm (Figura 14).



**Figura 14.** Reacción de ABTS a ABTS<sup>•+</sup>.

Fuente: <https://www.omicsonline.org/articles-images/2161-0444-4-517-g002.html>

Este método se llevó a cabo de la siguiente manera: en una tubos de ensayo se adicionaron los extractos metanólico (M) y acetónico (A) a diferentes concentraciones (M= 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 µg/mL; A= 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 250 µg/mL), posteriormente se tomaron 300 µL de estas soluciones, para adicionarle 2700 µL de ABTS<sup>•+</sup> (solución de trabajo) más 1 mL de agua destilada. Los tubos fueron incubados por 7 minutos en la oscuridad, para después determinar su absorbancia a 734 nm en un espectrómetro T80+ UV/VIS PG Instruments Ltd. Como referencia se utilizó ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg/mL), como control negativo se usaron 3 mL de metanol:agua (1:1). La actividad antioxidante sobre el radical ABTS se expresó como porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

C= absorbancia promedio del ABTS<sup>•+</sup>

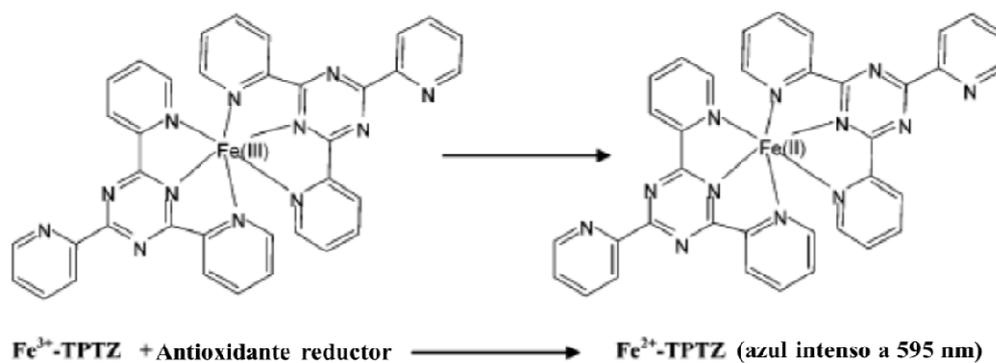
E= absorbancia del experimental (Mezcla de ABTS<sup>•+</sup> + extracto)

Los resultados se expresaron como µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto.

## APÉNDICE 6

### Método FRAP

El método FRAP cuantifica el efecto antioxidante de acuerdo a la capacidad de los extracto para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) presente en un complejo con la 2, 4, 6-tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (Figura 15) (Mesa-Venegas *et al.*, 2008). Este método da un panorama de la habilidad para mantener el estado redox de las células o tejidos.



**Figura 15.** Reacción de FRAP de su estado oxidado al reducido.

Fuente: <http://www.biotecharticles.com/Applications-Article/Description-of-Various-Assay-Procedures-for-Determination-of-Antioxidant-Activity-3712.html>

El poder antioxidante que se tiene con FRAP tiene que ver con el grado de hidroxilación y conjugación de los polifenoles presentes en los extractos, sin embargo, no detecta los radicales que transfieren H particularmente tioles y proteínas (Prior *et al.*, 2005).

El FRAP se obtuvo con buffer de acetato 300 mM (acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial) (pH 3.6), TPTZ 40 mM y FeCl<sub>3</sub> 20 mM, en una proporción 10:1:1 (v/v/v), esta solución se mantuvo a 37°C y en agitación constante durante todo el proceso.

La actividad antioxidante de los extractos metanólico y acetónico se obtuvieron mezclando 284 µL (100 µg/mL) con 2714 µL del reactivo FRAP para obtener un volumen final de 3 mL, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se leyeron a una absorbancia de 593 nm. Los valores obtenidos se compararon con una curva patrón de ácido gálico a diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg/mL). Los resultados se expresaron como µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto.

## APÉNDICE 7

### MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU O CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

El método Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los fenoles totales en una muestra orgánica. El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que, en presencia de fenoles se torna azul, los cuales son cromóforos compuestos por complejos fosfotúngsticos-fosfomolibdicos. La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 760 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico que es el estándar de referencia (Blainski *et al.*, 2013).

La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una curva de calibración o patrón con ácido gálico, a partir de una solución stock de 0.5 mg/ 10 mL de metanol y agua (1:1), se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener diferentes concentraciones de ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 100 µg/mL), para un volumen total de 3 mL.

Para el análisis de los extractos metanólico y acetónico, se prepararon soluciones stock de cada muestra a una concentración de 0.5 mg/mL de metanol y agua (1:3). Se tomaron alícuotas de 250 µL de cada muestra en tubos de ensayo y se agregaron 2.75 mL de agua destilada. Se añadió a cada tubo 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, posteriormente se agitó y se dejó reposar por 10 min., después de este tiempo se añadieron 750 µL de carbonato de sodio (20%),

también se agitó y se dejó reposar por 1 hora en la oscuridad para leerlo a 760 nm. En un espectrofotómetro UV/VIS modelo T+80 PG Instruments Ltd.