



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Actividad antioxidante de *Bursera cuneata*
(Schlecht.) (Burseraceae): estudio diferencial
entre individuos masculinos y femeninos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

Jessica Mariana Becerra Cigarroa



Directora de tesis : Dra. Rocio Serrano Parrales

Los Reyes Iztacala, Estado de México Enero, 2019



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.

Dedicatoria

Agradecimientos

Índice general

Resumen	1
Introducción	2
Justificación	7
Hipotesis	8
Objetivo general	9
Objetivos particulares	9
Materiales y Métodos	10
1. Colecta	10
2. Obtención de los extractos	10
3. Determinación de fenoles totales	10
4. Evaluación de Actividad antioxidante	10
5. Caracterización química de los extractos con mayor actividad antioxidante	13
6. Análisis estadísticos	13
Resultados	14
1. Rendimiento de los extractos	14
2. Fenoles totales	14
3. Actividad Antioxidante	17
3.1 DPPH	17
3.2 ABTS ^{•+}	17
5. Perfil de polifenoles	22
Discusión	23
Conclusiones	28
Literatura citada	29
Anexo 1. Cromatogramas de los extractos analizados por HPLC-MS	32

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Rendimiento de los extractos de la corteza de <i>B. cuneata</i>	12
Cuadro 2. Fenoles totales de los extractos de la corteza de <i>B. cuneata</i>	14
Cuadro 3. Concentración antioxidante media (CA ₅₀) sobre el radical DPPH de los extractos de <i>B. cuneata</i>	17
Cuadro 4. Concentración antioxidante media (CA ₅₀) sobre el radical ABTS ^{•+} de los extractos de <i>B. cuneata</i>	18
Cuadro 5. Porcentaje de reducción ferrica de los extractos de la corteza de <i>B. cuneata</i>	21
Cuadro 6. Perfil de polifenos de extractos metanólicos.....	22

Índice de figuras

	Página
Figura 1. <i>Bursera cuneata</i>	7
Figura 2. Comparación de los rendimientos de los extractos obtenidos de individuos machos y hembras de <i>B. cuneata</i>	14
Figura 3. Comparación de la concentración de fenoles por extracto y por sexo de <i>B. cuneata</i>	16
Figura 4. Efecto antioxidante de los extractos acetónicos y metanólicos sobre el radical DPPH.	16
Figura 5. Comparación del efecto antioxidante sobre el radical DPPH entre extractos y entre individuos machos y hembras.	17
Figura 6. Efecto antioxidante de los extractos acetónicos y metanólicos sobre el radical ABTS ^{•+}	19
Figura 7. Comparación del efecto antioxidante sobre el radical ABTS ^{•+} por extracto y entre individuos machos y hembras.	20
Figura 8. Comparación del efecto antioxidante en la reducción férrica entre extractos y entre individuos machos y hembras.	21

Resumen

El estrés oxidativo se ve implicado en diversas enfermedades, como aterosclerosis, cáncer y catarata senil, entre otras. En este sentido algunas especies de la familia Burseraceae han presentado un potencial antioxidante, es decir, la capacidad de neutralizar radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ERO). El potencial antioxidante de las plantas se debe al contenido de metabolitos secundarios (MS), principalmente compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante diferencial entre organismos masculinos y femeninos de *B. cuneata*. La especie se colectó en Jerécuaro, Guanajuato, se obtuvieron los extractos hexánico, acetónico y metanólico mediante el método de maceración. La concentración de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se evaluó en modelos *in vitro* sobre los radicales DPPH y ABTS^{•+}. Adicionalmente, se determinó el potencial de reducción férrica de los extractos mediante el uso del reactivo FRAP. En los resultados se obtuvo que los extractos metanólicos presentaron el mayor rendimiento con respecto al peso seco de la planta. En cuanto al contenido de fenoles totales en los extractos del ejemplar tres masculino (3♂) fue el que presentó el mayor contenido de fenoles en los extractos acetónicos y metanólicos, con 132.46 y 211.99 mgEAG/g de extracto respectivamente. En la evaluación de la actividad antioxidante, los extractos acetónicos y metanólicos presentaron una buena actividad antioxidante sobre los radicales DPPH, ABTS^{•+}, con valores de CA₅₀ de 13.85 a 18.44 µg/mL para los extractos acetónicos y una CA₅₀ = 3.31 a 27.06 µg/mL para los extractos metanólicos. Además, los extractos mencionados presentaron un alto potencial en la reducción del hierro férrico, siendo los valores más altos los de los extractos obtenidos de los ejemplares masculinos, con 85.36 y 98.95% de reducción férrica. Los compuestos identificados por HPLC en los extractos metanólicos fueron catequina, naringenina y pinocembrina. En la comparación integral de la actividad no se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales y en el efecto antioxidante entre individuos masculinos y femeninos. Los resultados contribuyen al conocimiento fitoquímico y farmacológico de *B. cuneata* y validan su uso como recurso potencial para el tratamiento en enfermedades relacionadas con procesos de estrés oxidativo.

Palabras clave: *Bursera cuneata*, antioxidante, fenoles, metanol, catequina, naringenina, pinocembrina.

Introducción

A través de los años el ser humano ha utilizado a las plantas con fines terapéuticos, al ingerirlas encontró la respuesta a su necesidad primaria de alimento y mediante ensayo y error aprendió que muchas de ellas podían tener otros usos, entre ellos el medicinal para aliviar algún padecimiento. Además, asimiló que la dosis o la manera de preparación eran fundamentales para obtener el efecto terapéutico esperado (Waizel, 2011).

En la actualidad las plantas medicinales constituyen un importante recurso natural, ya que existe una cantidad notable de medicamentos patentados cuya base lo constituyen, ya sea un metabolito secundario de origen vegetal o alguna sustancia derivada de un principio activo aislado de especies vegetales (Eleno, 2010).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (MS) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Normalmente los MS se concentran en alguna de sus estructuras: hojas, flores, cortezas, semillas, raíces o frutos (Barrera, 2008; citado en Eleno, 2010).

Los MS de las plantas funcionan como estrategia de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico; los cuales presentan actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros y actividad antioxidante. Los MS son compuestos de bajo peso molecular; una síntesis activa de ellos se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, tales como el ataque por virus, bacterias y hongos, la competencia por el espacio de suelo, la luz, los nutrientes entre las diferentes especies de plantas, la exposición a la radiación solar, entre otros (Sepúlveda-Jimenez *et al.*, 2003).

Además, la síntesis de MS en las plantas dioicas puede desencadenarse de manera diferencial, evidenciando una variación cuantitativa de éstos (Rugna *et al.*, 2002). Debido a que el proceso reproductivo suele ser muy costoso, las plantas dioicas utilizan estrategias de compensación como la reducción de recursos asignados a crecimiento y mantenimiento vegetativo. Los cuales son diferentes en cada sexo, por ejemplo, los

machos presentan el máximo gasto de recursos en el periodo de floración al liberar el polen, en cambio, las hembras lo presentan justo después de la polinización, para el crecimiento y maduración del fruto (Montesinos, 2007); en este sentido se han reportado mayores concentraciones de fenoles y terpenos en individuos femeninos, mientras que los individuos masculinos contienen mayores concentraciones de nitrógeno (Maldonado, 2007).

Se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de MS que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados que incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos, y los no nitrogenados que se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Croteau *et al.*, 2000; citado en Sepúlveda-Jimenez *et al.*, 2003). Otra clasificación es la que considera el valor medicinal y económico de los MS, en cuyo caso pueden agruparse en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Ávalos y Pérez-Urria, 2009); dentro de esta gran familia de productos naturales pueden encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más común (Ochoa y Ayala, 2004; citado en Echavarría *et al.*, 2009).

La síntesis de los compuestos fenólicos se da a partir de fenilalanina por la vía del shikimato, la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Estos compuestos regulan el metabolismo y la síntesis de lignina, además poseen potencial antioxidante; es decir, son capaces de neutralizar radicales libres (Jaureguí *et al.*, 2007).

Un radical libre es una especie química (átomo, molécula o ión) que se caracteriza por tener uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de existir de manera independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón

se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (Hansberg, 2002; citado en Quintanar y Calderón, 2009).

Entre los radicales libres se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ERO), término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales, las cuales son principalmente producidas por las células que utilizan el oxígeno para su metabolismo, siendo este su origen endógeno, el cual también se lleva a cabo por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos, que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}). Por otro lado, su origen exógeno está dado por los factores como la radiación solar, toxinas fúngicas, las radiaciones ionizantes, una concentración de oxígeno demasiado elevada, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos o el humo de tabaco, que incrementan su nivel (Avello y Suwalsky, 2006).

Dichos radicales actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados, el colesterol, el ADN y los lípidos, siendo estos últimos los más susceptibles a la sustracción de un electrón por parte del radical que lo requiere para alcanzar su estabilidad electroquímica. Los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar de cualquiera de los componentes anteriormente mencionados, protegiendo de esta manera las células contra el daño que causan los radicales libres (García *et al.*, 2000; citado en Echavarría *et al.*, 2009).

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Estos mecanismos son adecuados a la vida media corta de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides (Avello y Suwalsky, 2006).

Debido a los daños a nivel celular que causan las ERO en los organismos ha surgido el interés de la búsqueda de compuestos con capacidad antioxidante, en este sentido se ha dirigido la atención hacia las especies de la familia Burseraceae, que cuenta con 20

géneros y más de 600 especies distribuidas en las regiones calientes del mundo, con mayor diversidad en América tropical (Rzedowski, 1992).

En México habitan aproximadamente el 80% de especies del género *Bursera*, también conocidas como “copales”, los cuales se distribuyen a lo largo de la costa del pacífico; especialmente, en la cuenca del Río Balsas, Las cuencas del Papagayo, Armería-Coahuayana, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la cuenca del Tehuantepec (CONABIO, 2009).

El género *Bursera* se conoce por sus propiedades curativas en casos como la disentería, la hidropesía, enfermedades venéreas, fiebre amarilla, resfriados, contra la ponzoña se utiliza la goma desleída en agua, y la resina se ha utilizado contra enfermedades uterinas (Martínez, 1959). Incluso se ha reportado que entre sus propiedades se encuentra la actividad y capacidad antioxidante, debido a un gran contenido de flavonoides en el extracto metanólico, algunos trabajos en este sentido son los siguientes:

Serrano *et al.*, en 2012 evaluaron la actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de *Bursera morelensis*. En este estudio se utilizó la técnica DPPH, en la cual encontraron una fuerte capacidad reductora, la concentración antioxidante media (CA₅₀) del extracto fue de 3.05 µg/mL, sin embargo, no mostró diferencia significativa comparándose con quercetina. Por otro lado, la cuantificación de fenoles mostró 50.5% de componentes fenólicos en el extracto, de los cuales por HPLC determinó que corresponden a flavonoides. La capacidad antioxidante la relacionan con la buena cantidad de componentes fenólicos.

De la misma manera, Islam *et al.*, en 2014 estudiaron las propiedades antioxidantes del extracto metanólico de hojas de *Bursera serrata*, por medio de la cuantificación total de fenoles, de flavonoides y por la capacidad de poder reductor con el reactivo FRAP. Ellos obtuvieron un contenido total de fenoles de 55.53 ± 14.63 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mgEAG/g). En el caso del contenido total de flavonoides obtuvieron un valor de 106.33 ± 7.35 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mgEQ/g), finalmente, la capacidad de poder reductor del extracto mostró una reducción significativa a altas concentraciones, en comparación con el ácido ascórbico. Concluyeron que el extracto metanólico de *B. serrata* tiene una buena actividad

antioxidante debido al buen contenido de flavonoides, el cual es comparable con estudios previos.

Bah *et al.* en 2014, investigaron acerca de los constituyentes químicos y los efectos antioxidantes *in vitro*, de los extractos metanólico y hexánico de corteza de las ramas de *B. simaruba*, en este trabajo los autores reportaron 17 compuestos, incluyendo terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos grasos de la cadena larga (AG) y ésteres de metilo de AG. En cuanto a la actividad antioxidante se determinó que fue baja, debido al poco contenido de compuestos fenólicos, sin embargo, se presentó un potencial de oxidación cercano al de la quercetina y la catequina. Ellos concluyeron que la corteza de ramas de *B. simaruba* contiene metabolitos secundarios antioxidantes.

Existen especies del género *Bursera* de las cuales no hay estudios en los que se haya evaluado la actividad antioxidante como es el caso de *B. cuneata*, que es una especie endémica de la parte centro-sur de México. Esta especie recibe diversos nombres comunes como copal o cuerecatzundi, es un árbol o arbusto, dioico, de hasta 10 m de alto, resinoso y con aroma agradable al estrujarse, posee una corteza gris o gris-rojiza (Figura 1).

B. cuneata es usada en la elaboración de artesanías diversas, su resina aromática se emplea como incienso. Los troncos y las ramas se cortan para consumirse en forma de leña (Rzedowski, 1992).



Figura 1. *Bursera cuneata* (Imagen obtenida de Hernández-Gómez, 2018).

Justificación

Dada la diversidad de las especies de la Familia Burseraceae en México, es necesario realizar investigaciones dirigidas al conocimiento de sus propiedades biológicas. Las especies de esta familia tienen un potencial medicinal amplio, ya que se han verificado sus efectos antiinflamatorio, antimicrobiano y antioxidante. Sin embargo, hay especies de las que aun no se han realizado estudios como en *B. cuneata*, por lo que en la presente investigación se evaluó su actividad antioxidante en individuos masculinos y femeninos, con ello se contribuye con el conocimiento de sus propiedades medicinales y al conocimiento de fuentes potenciales de antioxidantes exógenos, dada la problemática de salud que representan las enfermedades causadas por estrés oxidativo en los organismos. Por otra parte, los resultados permiten determinar las diferencias en el efecto antioxidante en individuos de diferente sexo, debido a que se ha reportado que la síntesis de MS ocurre de manera diferencial en especies dioicas (Montesinos, 2007; Maldonado, 2007).

Hipotesis

Si en las especies del género *Bursera* se ha reportado una alta concentración de compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides, y que estos MS presentan actividad antioxidante, los extractos de la corteza *B. cuneata* presentarán actividad antioxidante. Además, dado que en las plantas dioicas se presenta una distribución de recursos diferente en cada sexo al alcanzar la madurez sexual, *B. cuneata*, al ser una planta dioica, presentará diferencias cuantitativas y/o presenciales de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante.

Objetivo general

- Evaluar la actividad antioxidante diferencial entre organismos masculinos y femeninos de *B. cuneata*.

Objetivos particulares

- Determinar el rendimiento de los extractos de polaridad ascendente (hexano, acetona y metanol) de la corteza de organismos de diferente sexo de *B. cuneata*.
- Determinar la concentración de fenoles totales en los extractos.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos.
- Determinar el perfil de polifenoles en los extractos con mayor actividad antioxidante.

Materiales y Métodos

1. Colecta

La corteza de *B. cuneata* se colectó en agosto de 2017 en El Clarín, municipio de Jerécuaro, Guanajuato. Se colectaron muestras independientes de seis ejemplares adultos (tres masculinos y tres femeninos). Se depositó un ejemplar en el herbario IZTA de la FES Iztacala.

2. Obtención de los extractos

Las muestras de corteza se trituraron y se colocaron en maceración para obtener los extractos de diferente polaridad con los solventes hexano, acetona y metanol (Dominguez, 1973). Los extractos se filtraron y se concentraron mediante destilación del exceso de los solventes a presión reducida. El rendimiento se determinó por diferencia de peso entre los extractos sólidos obtenidos y el material vegetal de partida.

3. Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu para muestras orgánicas (Singleton & Rossi, 1965). El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que, en presencia de un fenol, se torna azul. Posteriormente se midió la intensidad del color azul con un espectrofotómetro a 760 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (mgEAG/g), que es utilizado como estándar de referencia.

4. Evaluación de Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se determinó por métodos de óxido-reducción, mediante el uso de los radicales DPPH (Método modificado de Murillo, 2006) y ABTS^{•+} (Método modificado de Re *et al.*, 1999), así como mediante la determinación del potencial de reducción férrica con el reactivo FRAP (Método modificado de Benzie y Strain (1996).

Los fundamentos y las características experimentales de cada uno se resumen a continuación:

a) DPPH

El método de reducción del radical DPPH (2,2-difenil-picril-hidracilo) (Método modificado de Murillo, 2006), DPPH se utiliza para evaluar la actividad antioxidante de las sustancias de interés (extractos) y consiste en una reacción de óxido-reducción en la que el radical DPPH se reduce al aceptar un electrón de la sustancia antioxidante. La reacción puede observarse por el cambio de color, de violeta intenso a amarillo claro, que puede medirse espectrofotométricamente a 515 nm.

Se llevó a cabo en placas de 96 pozos, a las cuales se adicionaron por triplicado 50 μ L diferentes concentraciones de los extractos (10 a 100 μ g/mL) y 150 μ L de solución metanólica de DPPH (250 μ M); posteriormente, se incubaron en la oscuridad y se mantuvieron en agitación constante durante 30 min a 37 °C. A continuación, se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de ELISA (SLT Spectra ELISA reader).

Los resultados se expresaron como concentración antioxidante media (CA_{50}) y se compararon con la CA_{50} de quercetina, que es usada como estándar de referencia.

b) ABTS^{•+}

El método ABTS^{•+} se fundamenta en la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+} al interaccionar con un sustrato oxidante (Método modificado de Re *et al.*, 1999). El radical ABTS^{•+} se generó por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Dicho radical, se produjo con la mezcla de reacción con solución de ABTS (7 mM/L) y solución de persulfato de potasio (2.45 mM/L) en agua destilada. Después, se preparó una solución de trabajo mezclando dos soluciones stock en cantidades iguales y se dejó 16 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. El radical ABTS^{•+} se obtuvo mediante la mezcla de 1 mL de la solución de trabajo con 60 mL de metanol para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 unidades a 734 nm.

En tubos de ensayo se adicionaron por triplicado 300 μL de extracto a diferentes concentraciones. A cada tubo se le agregaron 2700 μL de la solución ABTS^{•+}. Posteriormente la mezcla resultante se agitó y se dejó en la oscuridad por 7 minutos a temperatura ambiente, para permitir su reacción. Finalmente se leyó la absorbancia de la mezcla de reacción a 734 nm.

Se reportó la CA_{50} del compuesto antioxidante frente al radical ABTS^{•+}. La disminución de la coloración se expresó como el porcentaje de reducción del ABTS^{•+}, la cual se comparó con la CA_{50} de la quercetina que fue empleada como estándar de referencia.

c) FRAP

Por medio de el método FRAP (poder antioxidante de reducción férrica) (Método modificado de Benzie y Strain, 1996), se determinó la capacidad antioxidante de forma indirecta. El método se fundamenta en la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar un electrón al Fe^{3+} (oxidado) para pasar a Fe^{2+} (reducido). Es un método espectrofotométrico que mide la absorbancia del Fe^{2+} . De tal manera que cuanto más antioxidante es la sustancia mayor es la reducción y mayor es la concentración de Fe^{2+} y es más alta la señal de absorbancia.

El reactivo FRAP se preparó con amortiguador de acetato pH 3.6, TPTZ y FeCl_3 . El reactivo se mantuvo durante todo el proceso en un baño a 37 °C.

En tubos de ensayo se adicionaron por triplicado 300 μL del extracto (100 mg/mL) y 2700 μL del reactivo FRAP. los tubos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se leyó a la absorbancia de las muestras a 593 nm.

Adicionalmente se preparó una curva estándar de trolox a diferentes concentraciones. Los resultados se graficaron (concentración de trolox vs absorbancia), se obtuvo la regresión lineal y la ecuación de la recta, con la cual se determinaron los mg equivalentes de trolox por gramo de extracto (mgET/g) y el porcentaje de reducción férrica.

5. Caracterización química de los extractos con mayor actividad antioxidante

La composición química de los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante se determinó mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), para lo cual se empleó un equipo HPLC-ESI-TOF-MS. El análisis consistió en un perfil de compuestos fenólicos para cada muestra que fue comparado con los iones moleculares de 24 estándares de referencia.

6. Análisis estadísticos

Los resultados de la actividad antioxidante con los radicales DPPH y ABTS^{•+} se analizaron mediante ANOVA bifactorial, tomando como factores los extractos y el género (machos y hembras). Para los fenoles totales y la prueba de reducción férrica (FRAP) se hicieron curvas de regresión lineal, para obtener los mg equivalentes de ácido gálico (mgEAG/g) y de trolox (mgET/g), respectivamente, en los extractos.

Resultados y análisis

1. Rendimiento de los extractos

Los extractos metanólicos de los ejemplares evaluados mostraron un mayor rendimiento, los cuales se encontraron entre entre 0.34 y 3.16%, correspondientes con 0.99 y 10.09 g respectivamente (Cuadro 1 y Figura 2). De los extractos acetónicos también se obtuvieron buenos porcentajes de rendimiento, los más altos fueron obtenidos de los ejemplares 2, 3 y 5, con 6.49, 6.31 y 5.37 g, correspondientes con 2.27, 1.84 y 1.68% respectivamente. Estadísticamente, no se observaron diferencias significativas en los rendimientos de los extractos (Figura 2).

En la comparación de los rendimientos entre individuos machos y hembras, se obtuvo que no hay diferencias estadísticamente significativas, excepto para el extracto acetónico, ya que se obtuvo mayor rendimiento del extracto mencionado de los machos.

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos de la corteza de *B. cuneata*.

Ejemplar	Hexánico		Acetónico		Metanólico	
	(g)	%	(g)	%	(g)	%
1♂	4.83	1.76	4.71	1.71	6.81	2.47
2♂	0.47	0.16	6.49	2.27	0.99	0.34
3♂	4.60	1.34	6.31	1.84	9.54	2.78
4♀	3.61	1.30	3.46	1.33	4.28	1.65

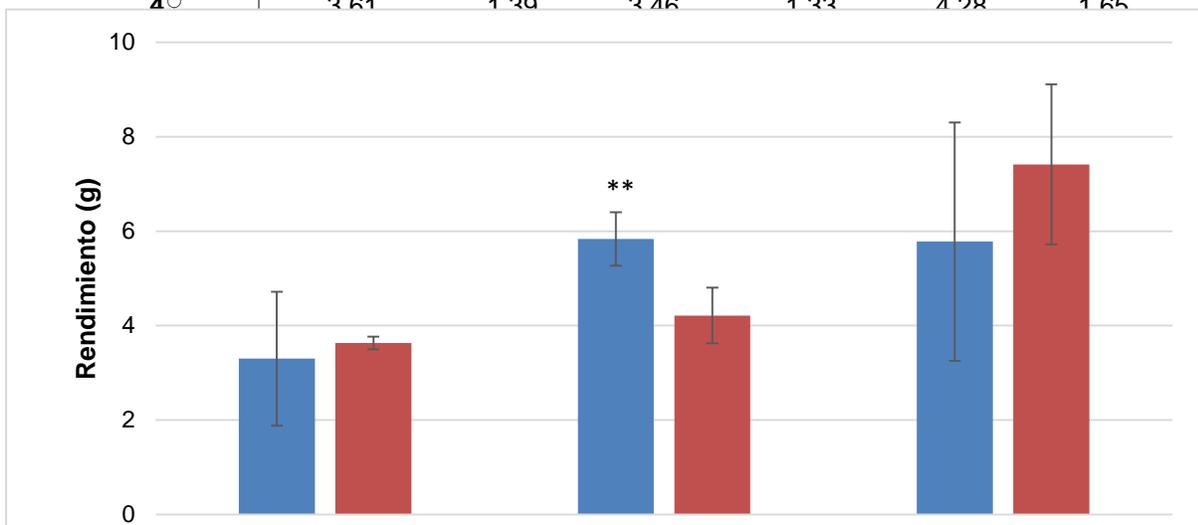


Figura 2. Comparación de los rendimientos de los extractos obtenidos de individuos machos y hembras de *B. cuneata*. Valores promedio (rendimiento (g) \pm EEM). n=3. *Estadísticamente significativo *por extracto ($p < 0.05$), **por sexo ($p < 0.05$)

2. Fenoles totales

En la determinación de fenoles totales, los extractos metanólicos presentaron el mayor porcentaje, seguido de los acetónicos (Cuadro 2 y Figura 3). En los extractos hexánicos se obtuvieron resultados negativos en la presencia de fenoles.

En el análisis estadístico se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de fenoles entre extractos (hexano, acetona y metanol) ($p < 0.01$). Por otra parte, entre machos y hembras no se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$) (Figura 3).

Individualmente, los ejemplares 3-masculino (3♂), así como 5-femenino (5♀) presentaron los mayores porcentajes de fenoles en los extractos acetónico y metanólico. Por otro lado, en el extracto hexánico solo el ejemplar 2-masculino (2♂) presentó fenoles, los cuales se detectaron en porcentaje bajo (1.37%) en comparación con los extractos acetónicos y metanólicos.

Cuadro 2. Fenoles totales de los extractos de la corteza de *B. cuneata*.

Ejemplar	mgEAG/g extracto			% Fenoles		
	Extracto			Extracto		
	Hexánico	Acetónico	Metanólico	Hexánico	Acetónico	Metanólico
1♂	0.00	109.17	267.39	0.00	10.92	26.74
2♂	13.72	25.97	227.97	1.37	2.60	22.80
3♂	0.00	132.46	317.98	0.00	13.25	31.80
4♀	0.00	47.61	240.87	0.00	4.76	24.09
5♀	0.00	127.43	281.45	0.00	12.74	28.15
6♀	0.00	130.72	203.76	0.00	13.07	20.38

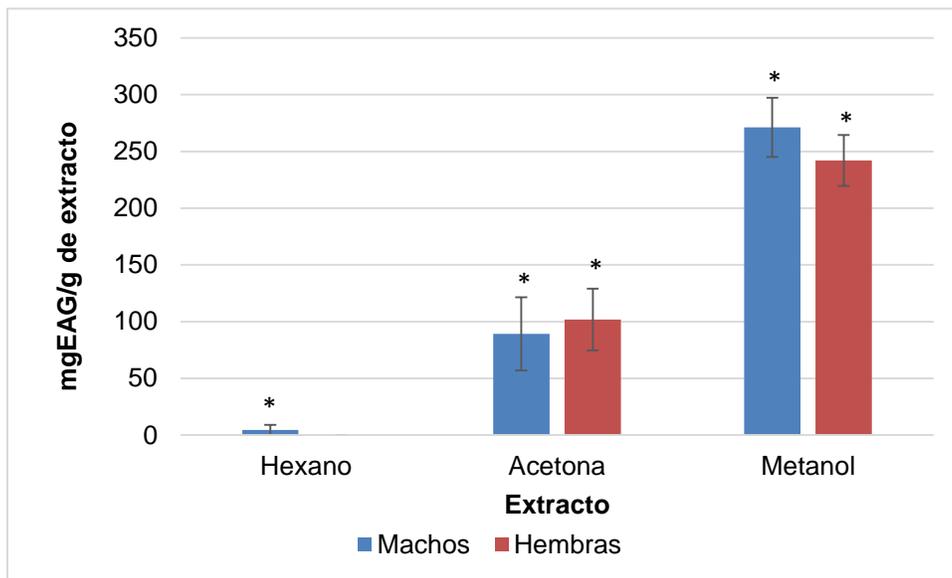


Figura 3. Comparación de la concentración de fenoles por extracto y por sexo de *B. cuneata*. Valores promedio (mgEAG \pm EEM). n=3. Estadísticamente significativo *por extracto ($p < 0.01$), **por sexo ($p < 0.01$).

3. Actividad Antioxidante

3.1 DPPH

En la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos acetónicos y metanólicos sobre el radical DPPH, el porcentaje de reducción del radical aumenta al aumentar la concentración del extracto (Figura 4), lo que indica que la actividad antioxidante es dependiente de la concentración, lo cual es evidente ya que los porcentajes de reducción de los extractos presentaron un comportamiento lineal con las diferentes concentraciones (R^2 entre 0.83 y 0.99).

Además, se obtuvo que los extractos metanólicos tuvieron mayor efecto antioxidante, al presentar porcentajes de reducción hasta de 80% en concentraciones menores o iguales a 20 $\mu\text{g/mL}$, en comparación con los extractos acetónicos en los que se observó un porcentaje de reducción similar en concentraciones entre 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$.

Lo anterior se corroboró con la determinación de la concentración antioxidante media (CA_{50}), ya que los extractos metanólicos presentaron los menores valores de CA_{50} , tanto en individuos machos como en hembras, con valores entre 2.32 y 5.43 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 3). El análisis estadístico reveló que hay diferencias en el efecto antioxidante entre extractos, y no las hay por sexo ($p < 0.05$) (Figura 4).

En el análisis individual, los extractos acétonicos de los ejemplares 1♂, 3♂ y 5♀ mostraron mayor actividad antioxidante al reducir el radical en un 50% en las concentraciones de 14.39, 18.43 y 13.85 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores son mayores que los observados para la quercetina, usada como estándar de referencia, que presentó una CA_{50} de 5.2 $\mu\text{g/mL}$. En contraste, la mayoría de los extractos metanólicos presentaron valores de CA_{50} menores a los reportados para la quercetina. Además, en estos extractos se obtuvo una mayor actividad antioxidante en los ejemplares 3, 4, 5 y 6 en las concentraciones 2.43, 3.52, 2.32 y 3.31 $\mu\text{g/mL}$.

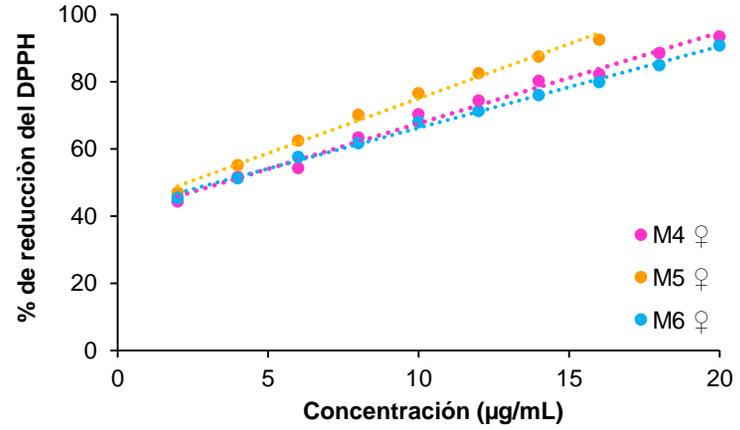
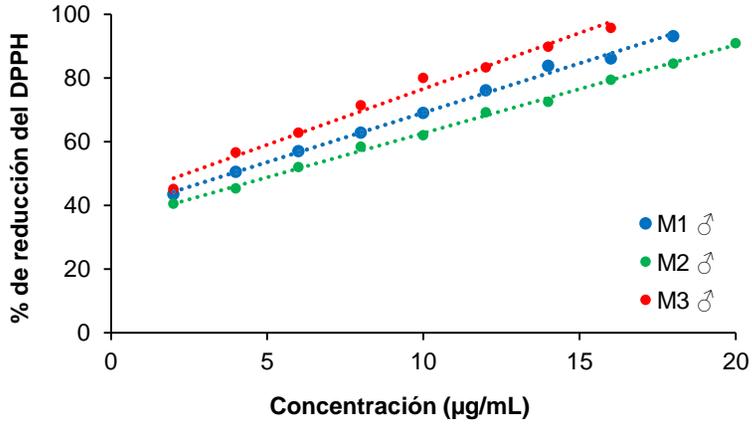
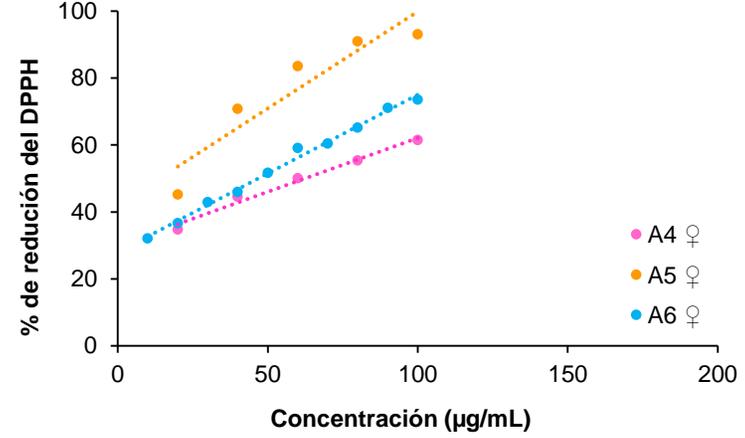
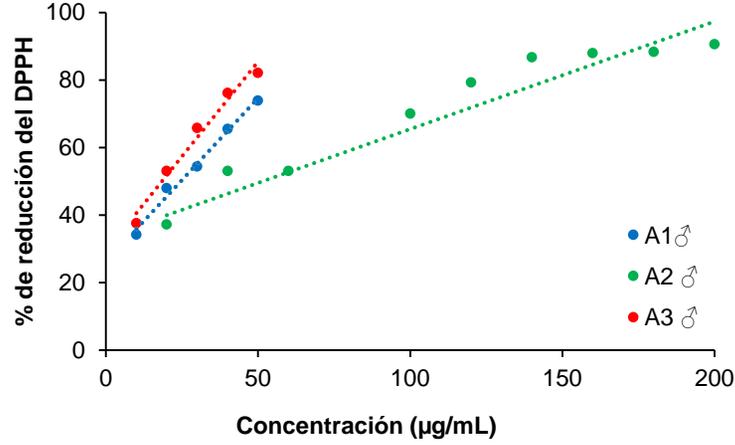


Figura 4. Efecto antioxidante de los extractos acetónicos y metanólicos sobre el radical DPPH. A1, A2, A3: extracto acetónico machos; A4, A5, A6: extracto acetónico hembras; M1, M2, M3: extracto metanólico machos; M4, M5, M6: extracto metanólico hembras.

Cuadro 3. Concentración antioxidante media (CA₅₀) sobre el radical DPPH de los extractos de *B. cuneata*.

Ejemplar	CA ₅₀ (µg/mL)	
	E. acetónico	E. metanólico
1♂	14.39	3.85
2♂	51.56	5.43
3♂	18.44	2.43
4♀	62.41	3.52
5♀	13.85	2.32
6♀	46.82	3.31

Al comparar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de machos y hembras se obtuvo que no hay diferencias significativas en el efecto reductor por sexo ($p < 0.05$) (Figura 5).

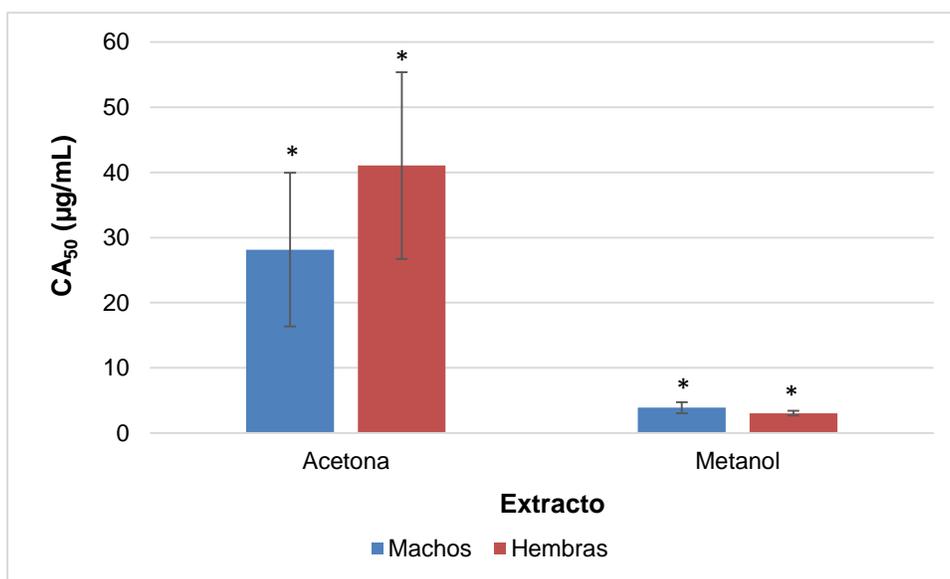


Figura 5. Comparación del efecto antioxidante sobre el radical DPPH entre extractos y entre individuos machos y hembras. Valores promedio (µg/mL ± EEM). n=3. Estadísticamente significativo *por extracto ($p < 0.01$), **por sexo ($p < 0.01$).

3.2 ABTS^{•+}

En cuanto a la evaluación de la actividad antioxidante sobre el radical ABTS^{•+}, los extractos metanólicos tuvieron mayor efecto antioxidante, con respecto a los acetónicos, en los que se obtuvo entre 40 y 60% de reducción del radical en la concentración de 40

µg/mL (Figura 6). Lo anterior fue corroborado al obtener la CA₅₀ de los extractos, con lo cual se obtuvo que de los extractos metanólicos obtuvieron valores de entre 3.31 y 41.4 µg/mL, que es un rango menor que para los extractos acetónicos (entre 13.09 y 123.96) (Cuadro 4).

Estadísticamente no hubo diferencias significativas en el efecto antioxidante entre extractos ni por sexo ($p < 0.05$) (Figura 7).

Al analizar individualmente los datos, los ejemplares de los extractos acetónicos que presentaron una mayor CA₅₀ fueron 1♂ (26.28 µg/mL), 2♂ (20.76 µg/mL) y 6♀ (13.09 µg/mL); los ejemplares con mayor CA₅₀ de los extractos metanólicos fueron 1♂ (27.06 µg/mL), 3♂ (25.15 µg/mL) y 6♀ (3.31 µg/mL). El único ejemplar que muestra una CA₅₀ menor que la quercetina (5.2 µg/mL) fue el ejemplar 6♀ en extracto metanólico.

Cuadro 4. Concentración antioxidante media (CA₅₀) sobre el radical ABTS*⁺ de los extractos de *B. cuneata*.

Ejemplar	CA ₅₀ (µg/mL)	
	E. acetónico	E. metanólico
1♂	26.28	27.06
2♂	20.76	36.23
3♂	123.96	25.15
4♀	123.83	41.40
5♀	69.67	28.67
6♀	13.09	3.31

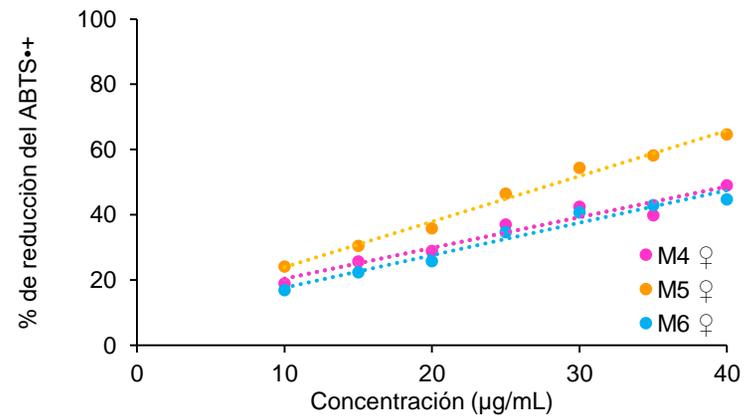
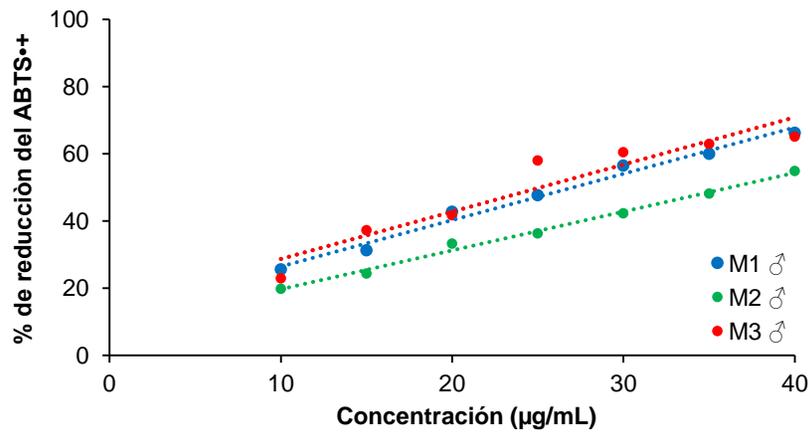
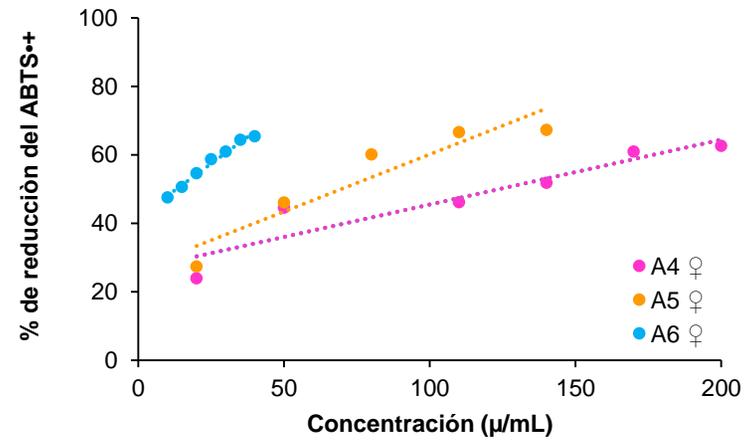
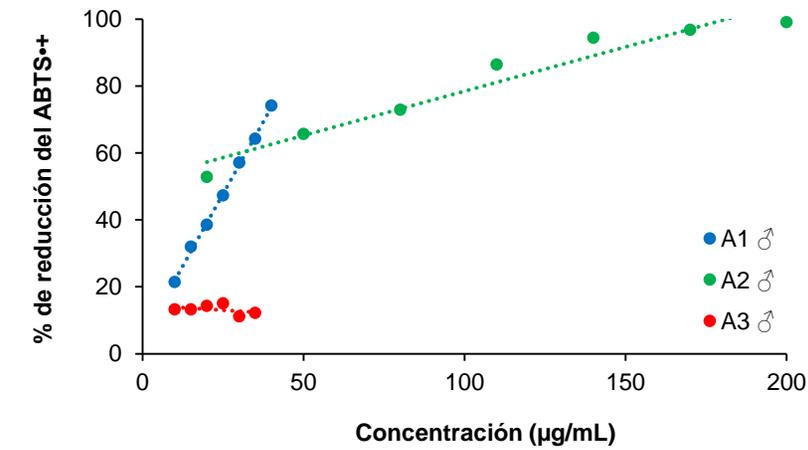


Figura 6. Efecto antioxidante de los extractos acetónicos y metanólicos sobre el radical ABTS•+. A1, A2, A3: extracto acetónico machos; A4, A5, A6: extracto acetónico hembras; M1, M2, M3: extracto metanólico machos; M4, M5, M6: extracto metanólico hembras.

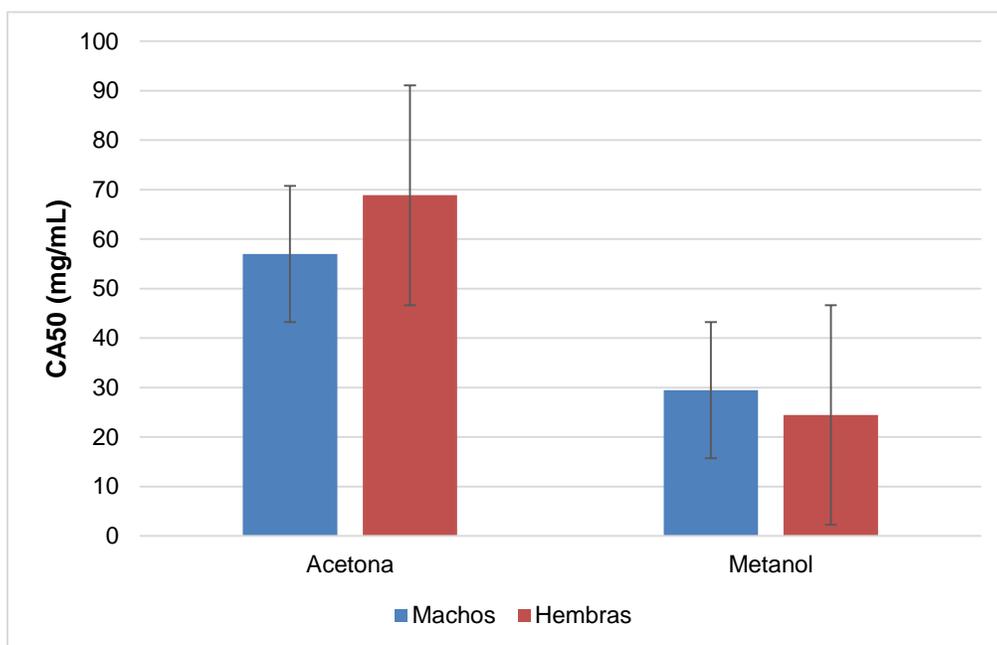


Figura 7. Comparación del efecto antioxidante sobre el radical ABTS^{•+} por extracto y entre individuos machos y hembras. Valores promedio ($\mu\text{g/mL} \pm \text{EEM}$). $n=3$. Estadísticamente significativo *por extracto ($p < 0.05$), **por sexo ($p < 0.05$).

3.3 FRAP

En la evaluación de la actividad antioxidante sobre la reducción férrica (FRAP), se obtuvo que los extractos metanólicos presentaron el mejor efecto (Cuadro 5). Los ejemplares 1♂ y 3♂ fueron los más activos al obtener una mayor cantidad de mgEAG/g (853.62 y 989.48) y, por tanto, un mayor porcentaje de reducción férrica (85.36 y 98.95%). Además, se observaron diferencias significativas en la reducción férrica entre extractos y no las hubo en la comparación por sexo (Figura 8).

Cuadro 5. Porcentaje de reducción férrica de los extractos de la corteza de *B. cuneata*.

Ejemplar	mgEQ/g extracto		% de reducción sobre FRAP	
	Extracto		Extracto	
	Acetónico	Metanólico	Acetónico	Metanólico
1♂	65.52	853.62	6.55	85.36
2♂	45.86	443.21	4.59	44.32
3♂	66.09	989.48	6.61	98.95
4♀	43.02	589.69	4.30	58.97
5♀	58.14	661.84	5.81	66.18
6♀	52.25	482.25	5.22	48.22

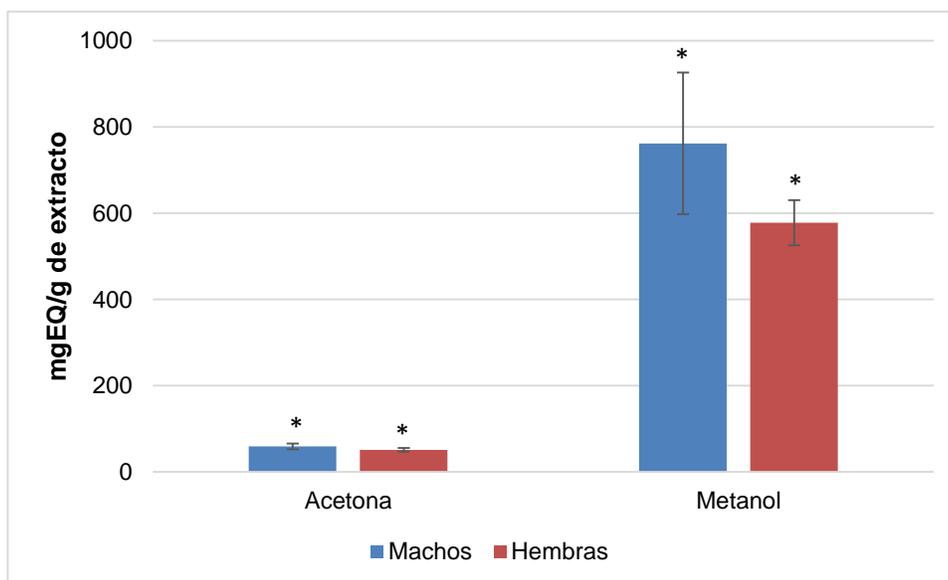


Figura 8. Comparación del efecto antioxidante en la reducción férrica entre extractos y entre individuos machos y hembras. Valores promedio (mgEAG/g \pm EEM). n=3. Estadísticamente significativo *por extracto ($p < 0.01$), **por sexo ($p < 0.01$).

5. Perfil de polifenoles

Con el análisis por HPLC-MS realizado a los extractos acetónicos y metanólicos de *B. cuneata* se identificaron compuestos polifenólicos únicamente en los extractos metanólicos. Los compuestos identificados fueron catequina, naringenina y pinocembrina. El compuesto que se presentó en casi todos los ejemplares fue la catequina, la cual varía en abundancia entre ellos. Los compuestos naringenina y pinocembrina se identificaron en el ejemplar tres (3♂) y pinocembrina en el ejemplar cinco (5♀) (Cuadro 6).

Los ejemplares con un valor mayor de abundancia de catequina fueron 2♂, 5♀ y 4♀ (área = 7591.42, 4425.29 y 2209.77 respectivamente). La abundancia de la naringenina en el ejemplar 3♂ se considera baja (área = 812.51), en comparación con la abundancia de la catequina en los otros ejemplares y de la pinocembrina (área = 1520.97).

Cuadro 6. Perfil de polifenoles de extractos metanólicos.

	Ejemplar	Catequina		Naringenina		Pinocembrina	
		TR	Ab	TR	Ab	TR	Ab
Metanólico	1♂	17.09	1363.72	-	-	-	-
	2♂	17.09	7591.42*	-	-	-	-
	3♂	-	-	34.87	812.51	40.05	1520.97*
	4♀	17.09	2209.77*	-	-	-	-
	5♀	17.09	4425.29*	-	-	39.72	242.92
	6♀	17.20	1546.01	-	-	-	-

TR: Tiempo de retención (min), Ab: abundancia, *compuestos más abundantes, - no está presente.

Discusión

Las especies del género *Bursera* representan recursos de importancia prioritaria para México, dada su diversidad y distribución en el país, siendo en su mayoría endémicas. Estas especies poseen diversas propiedades medicinales, entre ellas las antioxidantes. El presente estudio tuvo como propósito determinar la actividad antioxidante de los extractos de la corteza de *B. cuneata* de ejemplares masculinos y femeninos; en diversas comunidades de México se usan contra enfermedades en las que están involucrados procesos inflamatorios, en donde los compuestos con potencial antioxidante pueden estar cumpliendo con su función. Los resultados obtenidos sugieren que los extractos acetónicos y metanólicos tienen buen potencial antioxidante; debido a la capacidad para reducir los radicales DPPH, ABTS^{•+} y su capacidad de reducción férrica.

Para todos los casos, los extractos con mayor rendimiento fueron los metanólicos, lo que indica que las cortezas de *B. cuneata* contienen mayor cantidad de compuestos polares como los compuestos fenólicos, excepto en el ejemplar dos masculino (2♂) del extracto acetónico en el que se obtuvo un rendimiento mayor que para el extracto metanólico (2.27% y 0.34% respectivamente). Los resultados referentes a los rendimientos por grupo indicó que no hay diferencia entre individuos masculinos y femeninos, lo que sugiere que en cantidad ambos sexos sintetizan compuestos de características fisicoquímicas similares, aunque su naturaleza química puede ser diferente.

En cuanto a la cantidad de fenoles totales, los extractos acetónicos y metanólicos presentaron los mayores porcentajes, lo cual se debe a que los fenoles son de naturaleza polar y se presentan en mayor concentración en los extractos obtenidos con solventes de polaridad media y alta, como la acetona y el metanol. Además, en los análisis estadísticos, se obtuvieron diferencias significativas entre los tres extractos ($P < 0.01$); no obstante, entre machos y hembras no se observaron diferencias. Por otro lado, en los extractos metanólicos se obtuvieron valores de entre 13 a 21% de fenoles, lo cual concuerda con un estudio realizado por Reyna en 2015, en donde se obtuvieron valores muy similares en el extracto metanólico de la corteza de *B. morelensis* (224.91 mgEAG/g de extracto); estos valores pudieran parecer altos, sin embargo son menores a lo reportado por Serrano *et al.*, en 2012, para *B. morelensis* en donde se obtuvo un 50% de

fenoles en el extracto metanólico, sin embargo este valor lo obtuvieron del extracto concentrado, después de haber extraído de este los componentes no polares.

En cuanto a la actividad antioxidante sobre el radical DPPH, los extractos metanólicos presentaron un mayor efecto antioxidante (80% de reducción) con las menores concentraciones y valores de CA₅₀ menores a los reportados para la quercetina (5.2 µg/mL). Este resultado sugiere que los extractos metanólicos de *B. cuneata* pueden ser considerados buenos antioxidantes en concentraciones relativamente bajas, lo cual difiere con lo obtenido por otros investigadores, quienes han reportado actividad antioxidante en otras especies del género *Bursera*, con concentraciones mayores a lo reportado para la quercetina (5.2 µg/mL), como en el caso de *B. morelensis*, en el cual el extracto metanólico de su corteza presentó una Concentración Efectiva Media (CE₅₀) de 24.83 ± 0.73 (Reyna, 2015). Así mismo, Guevara-Fefer *et al.* en 2017, compararon la actividad antioxidante de extractos de metanol-agua (80:20) de diferentes especies del género *Bursera*, a las cuales se evaluó la reducción del DPPH, se observó que las especies *B. aleoxylon*, *B. vejarvazquezii*, *B. grandifolia* y *B. morelensis* lograron reducir más del 50% del radical a una concentración de 10 ppm, y que las especies *B. bipinnata*, *B. glabrifolia*, *B. submoniliformis*, *B. aptera*, *B. lancifolia* y *B. longipes* se requieren más de 10 ppm pero menos de 100 ppm para lograr el mismo efecto.

Para el radical ABTS^{•+}, los extractos metanólicos tuvieron en promedio un mayor efecto antioxidante sobre este radical (CA₅₀ = 26.97), en comparación con los extractos acetónicos (CA₅₀ = 62.93) (cuadros 3 y 4). Aunque en esta prueba los valores fueron mayores que para la quercetina (CA₅₀ = 5.2 µg/mL) aun pueden ser considerados buenos antioxidantes, al presentar valores aceptables de acuerdo con el estándar propuesto por la FDA que considera que los productos naturales que tengan la propiedad de reducir en un 50% a los radicales libres en concentraciones menores a 200 µg/mL son considerados buenos antioxidantes. Estos resultados indican que los extractos obtenidos de la corteza de *B. cuneata* son buenos antioxidantes y que pueden usarse como remedio alternativo contra enfermedades en donde se encuentran involucrados procesos oxidativos.

Para la evaluación de la actividad antioxidante sobre la reducción férrica (FRAP), los extractos metanólicos presentaron un mayor efecto mediante mayores porcentajes de

reducción (entre 44.32 y 98.95 %), en comparación con los extractos acetónicos (entre 4.30 y 6.61%). Estos resultados indican el efecto antioxidante de manera indirecta de los extractos mencionados, ya que no actúan directamente sobre radicales libres (como es el caso de las pruebas DPPH y ABTS^{•+}), sin embargo, los resultados son buenos indicadores del potencial que tienen los extractos para reducir radicales, formar iones y, de esta manera, detener la oxidación en cadena que causan los radicales libres en las células o tejidos de los organismos (Cao *et al.*, 1997).

En el análisis de HPLC para conocer el perfil polifenólico de los extractos acetónicos y metanólicos se observó que el compuesto que se presentó en la mayoría de los ejemplares fue la catequina, con una abundancia mayor en los ejemplares 2♂, 5♀ y 4♀. Otros compuestos encontrados fueron naringenina y pinocembrina en los ejemplares 3♂ y 5♀. Los compuestos mencionados han sido reportados previamente en otras especies del género *Bursera*, se ha encontrado el diástomero de la catequina, la epicatequina, en extractos de acetato de etilo acuoso de la corteza de *B. simaruba*; en el estudio de Castro *et al.*, en 1999, le atribuyen un potencial anti-hemorrágico contra el veneno de *Bothrops asper*, debido a su actividad antitrombótica y plaquetaria.

De igual manera, el compuesto naringenina, se ha reportado en *B. velutina*, *B. aptera*, *B. grandifolia*, *B. lancifolia*, *B. longipes*, *B. aptera*, *B. grandifolia* y *B. lancifolia*, en estas tres últimas especies Guevara-Fefer *et al.*, 2017 identificaron, además de la naringenina, apigenina, sin embargo, en este estudio atribuyeron la mayor actividad antioxidante a otros compuestos, que son los estándares de rutina y quercetina/apigenina.

Como lo evidencian los resultados de cada prueba de actividad antioxidante en este trabajo, los extractos metanólicos son los que mostraron un mejor efecto, esto podría deberse a que los compuestos presentes en el extracto mencionado, como los polifenoles detectados por el HPLC: catequina, naringenina y pinocembrina, son considerados buenos antioxidantes como ha sido reportado por otros autores (Martínez-Flores, *et al.*, 2002 y Pérez y Martínez, 2001).

Los compuestos mencionados presentan diferentes mecanismos de acción; por ejemplo, Granado en 2010, reportó que la catequina (epicatequina) mejora la tolerancia intracelular

intrínseca frente al estrés oxidativo al disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno y activar las proteínas clave de las vías de señalización relacionadas con los procesos de proliferación/supervivencia (PK13/AKT y ERKs).

Por otro lado se ha demostrado que el grupo OH en la posición 7 de la naringenina incrementa significativamente su capacidad antioxidante al estabilizar el radical ABTS^{•+} y provee una gran efectividad al inhibir la lipoperoxidación (Cavia-Saiz, *et al.*, 2010).

Finalmente, la pinocembrina reduce la actividad de la enzima superóxido dismutasa, lo cual sugiere que actúa regulando el estrés oxidativo; también se le atribuye su capacidad antioxidante a los grupos hidroxilo y carbonilo en los anillos A y C (Li *et al.*, 2011; Neacsu *et al.*, 2007).

En las tres pruebas de actividad antioxidante, en la comparación por sexo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras, lo que sugiere que sintetizan compuestos con efectos biológicos similares, lo cual fue evidente en este trabajo, ya que en la mayoría de los ejemplares estudiados se observó una concentración alta de catequina, excepto en el ejemplar 3♂ en el que la concentración de pinocembrina fue alta y no se identificó la presencia de catequina. Lo mencionado coincide con la información teórica que señala una síntesis diferencial de metabolitos secundarios entre diferentes sexos en plantas, como el caso de *Smilax campestris*, la cual presentó una mayor concentración de flavonoides en ejemplares femeninos que en masculinos, esto en un estudio realizado por Rugna *et al.* en 2002.

Cabe señalar que puede existir una síntesis diferencial de otro tipo de metabolitos secundarios, en las estructuras de *B. cuneata*, como lo son hojas, flores, tallos o frutos. Ya que la variedad estructural de los metabolitos secundarios ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los órganos de la planta, la cual es parte de las estrategias de adaptación. La distribución espacial y temporal de los MS puede estar relacionada con las necesidades de la planta, de sus recursos y del ambiente (Sépulveda *et al.* 2003; González-Esquinca y Castro-Moreno, 2008); además, pueden estar involucrados en otros procesos, como la polinización, dispersión y remoción de semillas; de este último proceso se ha reportado para especies del género *Bursera* que las aves son los principales responsables. Por

ejemplo, en *B. cuneata* se reporto que *Oreothlypis celata*, *Oreothlypis ruficapilla* y *Empidonax sp.* consumen los frutos y con ello llevan a cabo la remoción de las semillas (Cultid-Medina y Rico,2020).

Conclusiones

- Los extractos acetónicos y metanólicos presentaron actividad antioxidante sobre los radicales DPPH, ABTS^{•+} y FRAP, así como un mayor rendimiento.
- Los extractos metanólicos mostraron mayores porcentajes de fenoles, en comparación con los acetónicos.
- En los extractos hexánicos no se identificó la presencia de compuestos fenólicos, excepto en el ejemplar 2♂.
- Los extractos metanólicos tuvieron una mayor actividad antioxidante sobre los radicales DPPH y ABTS^{•+}, así como mayor potencial de reducción férrica, en comparación con los extractos acetónicos.
- En el extracto metanólico se identificaron los compuestos catequina, naringenina y pinocembrina. El efecto antioxidante de los extractos puede deberse a la mezcla de estos y otros compuestos fenólicos, los cuales potencian este efecto.
- En los extractos acetónicos no se identificó la naturaleza química de los fenoles que contiene, por lo que en futuras investigaciones será necesario hacer análisis mediante otros métodos de identificación de compuestos fenólicos.
- En las pruebas de actividad antioxidante no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los extractos de los ejemplares masculinos y femeninos, sin embargo, esto solo aplica para los extractos de las cortezas, se sugiere, realizar estudios en otros órganos de la planta, como lo son hojas, flores y/o frutos; ya que en estos pueden estar involucrados en procesos como la polinización, la dispersión y remoción de semillas.
- Los resultados contribuyen al conocimiento fitoquímico y farmacológico de *B. cuneata* y se comprueba su actividad antioxidante, por lo que en futuras investigaciones puede considerarse un recurso potencial para el tratamiento en enfermedades relacionadas con procesos de estrés oxidativo.

Literatura citada

- Ávalos, G. A. y C. E. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 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. Gutiérrez-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.
- Benzie, I. F. F. y J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 239: 70-76.
- Cao, G., Sofic, E. y Prior, R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. En: *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 22, no. 5. p. 749-760.
- Castro, O. J. M. Gutiérrez., M. Barrios., I. Castro., M. Romero. y E. Umaña. 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical*, 47(3), 605-616.
- Cavia-Saiz, M., M. D. Busto., M. C. Pilar-Izquierdo., N. Ortega., M. Pérez-Máteos. Y P. Muñiz. 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1238-1244.
- Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. Copales. Distribución geográfica. Disponible en <http://goo.gl/NFxCBj> (Consulta: 19 de Agosto de 2017).
- Cultid-Medina, C. A. y Y. Rico. 2020. Los aliados emplumados de los copales y cuajotes de México: aves y la dispersión de semillas de *Bursera*. *Revista Digital Universitaria*, 21 (2), 1-9.
- Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. México.
- Echavarría, Z. B., S. A. Franco y M. A. Martínez. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos

- de macroalgas del Caribe colombiano. *Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica*, 16(1): 126-131.
- Eleno, M. M. G. 2010. Actividad antibacteriana, antioxidante y toxicidad del fruto (en diferentes estados de maduración) y la hoja de *Cyrtocarpa procera* Kunt (Chupandilla). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Esquinca, A. R. y M. Castro-Moreno. 2008. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Lacandonia*, 1 (2): 123-130.
- Guevara-Fefer, P.,V. Muñoz-Ocotero., R.E. Llanos Romero., B. Zuñiga-Ruiz., R. J. Cárdenas-Vázquez., J. L. Contreras-Jiménez., y F. Ocampo-Bautista. 2017. Flavonoides de trece especies del género *Bursera* con potencial antioxidante, *Polibotánica*, (44), 185-193.
- Granado, S. A. B. 2010. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Memoria para optar al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid.
- Hernández-Gómez, A. 2018. Destino de las semillas de *Bursera cuneata* en la REPSA, Ciudad de México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Islam, R., M. K. Fazlul, R. Alam, R. Dhar, M. R. Nasiruddin, E. Islam, S. Parvin y A. Hossain. 2014. Sedative, membrane stability, cytotoxic and antioxidant properties of methanol extract of leaves of *Protium serratum* Wall. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2): S928-S933.
- Jaureguí, M. A. M., F. D. Ramos-Escudero, U. C. Alvarado-Ortiz y C. B. Castañeda. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 3(73): 142-149.
- Li-li, S., C. Bai-nian., G. Mei., Z. Heng-ai., L. Yan-jing., W. Li. y D. Guan-hua. 2011. The characteristics of therapeutic effect of pinoembrine in transient global brain ischemia/reperfusion rats. *Life Sciences*, 88: 521-528.
- Maldonado, L. Y. 2007. Ecología evolutiva del árbol *Spondias purpurea*: expresión sexual, herbivoría y defensa química. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

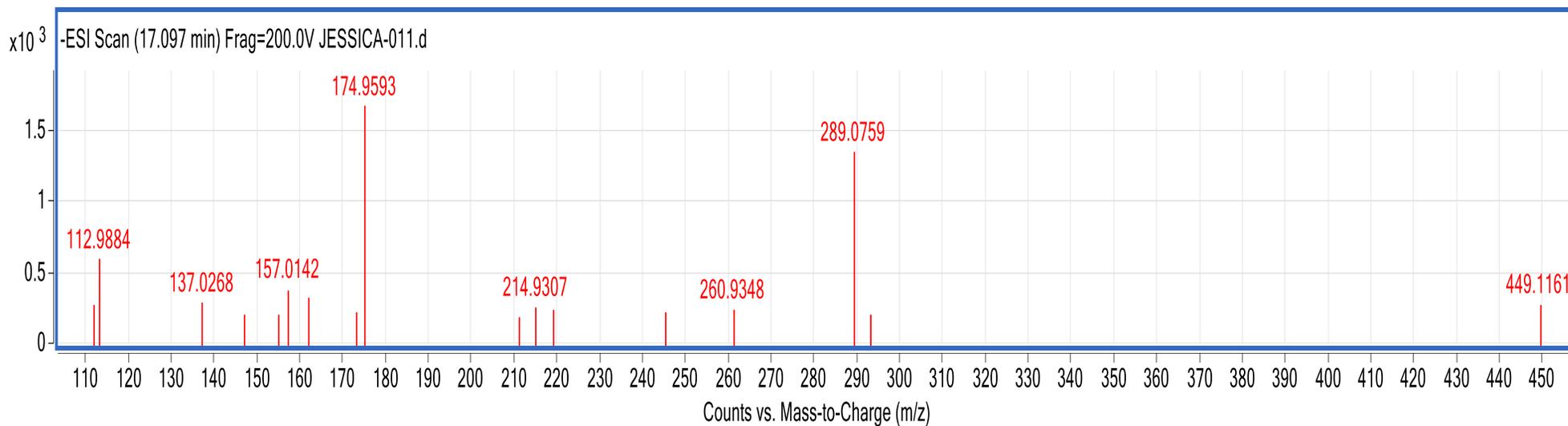
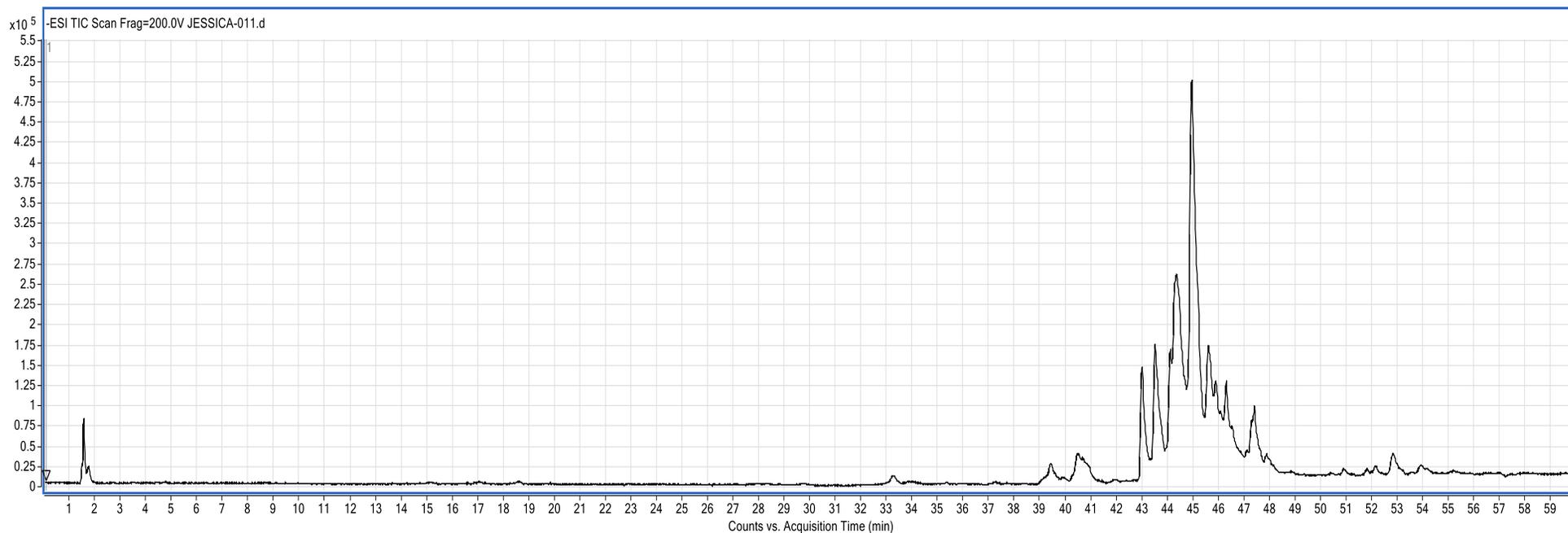
- Martínez, M. 1959. Las plantas medicinales de México. México: Ediciones Botas.
- Martínez-Flórez, S. J., González-Gallego, J. M. C. Y Tuñón. M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6), 271-278.
- Murillo, F. E. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. Alfa editores técnicos. 20-27 pp.
- Montesinos, T. D. 2007. *Juniperus thurifera*: una especie dioica, vecera y relíctica. *Ecosistemas*, 16 (3), 172-185.
- Neacsu, M., P.C. Eklund., R.E. Sjöholm., S.P. Pietarinen., M.O. Ahotupa., B.R. Holmbom. y S.M. Willför. 2007. Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 65:1-6.
- Pérez, T. G. Y Martínez, S. G. 2001. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 20 (4), 297-306.
- Quintanar, E. M. A. y S. J. V. Calderón. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Re, R., N. Pellegrini; A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. A. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bioogy and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Reyna, C. A. O. 2015. Estudio de las propiedades antioxidantes de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del valle de Tehucán-Cuicatlán. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rugna, A., A. Gurni. y M. Wagner. 2002. Estudio variacional de flavonoles en ejemplares masculinos y femeninos de *Smilax campestris* Griseb. –Smilacaceae- . *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21(2): 119-121.
- Rzedowski, J. y F. Guevara–Féter. 1992. Burseraceae. *Flora del bajío y de regiones adyacentes*, (3).
- Sepúlveda-Jiménez, G., H. Porta-Ducoing. y M. Rocha-Sosa. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 355-363.
- Serrano, P. R., B.C. Vázquez, D.C. Segura, A.L.L. Anaya, M. Jimenez-Estrada y M. M. Canales. 2012. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant properties of *Bursera morelensis* bark from San Rafael, Coxcatlán, Puebla (México): Implications for

cutaneous wound healing. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(44): 5609-5615.

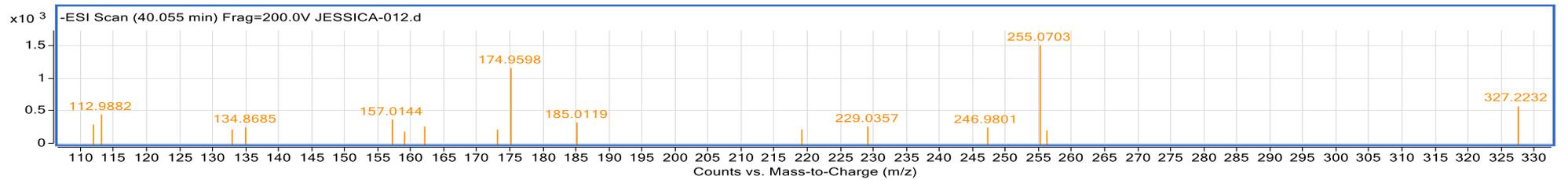
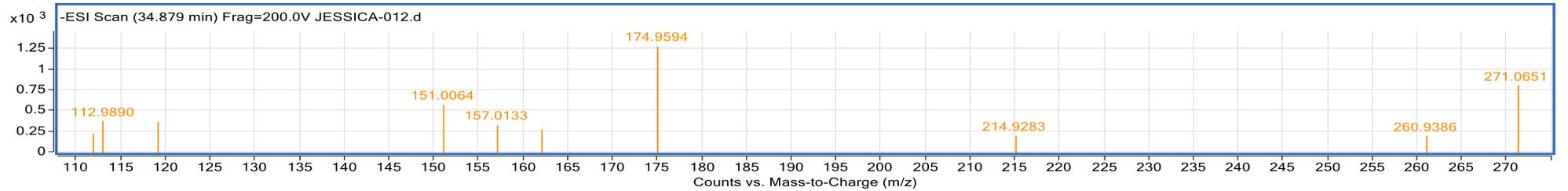
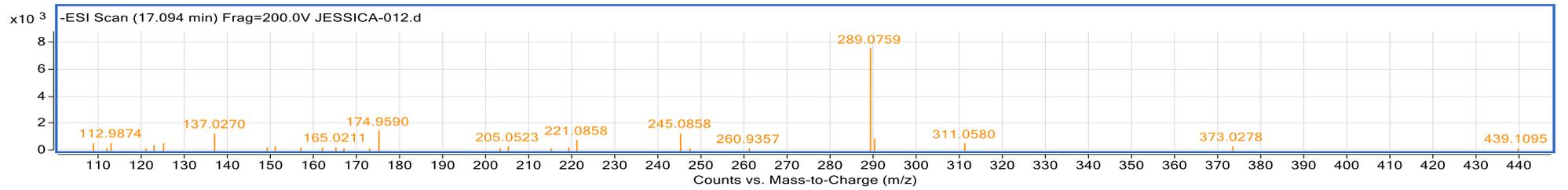
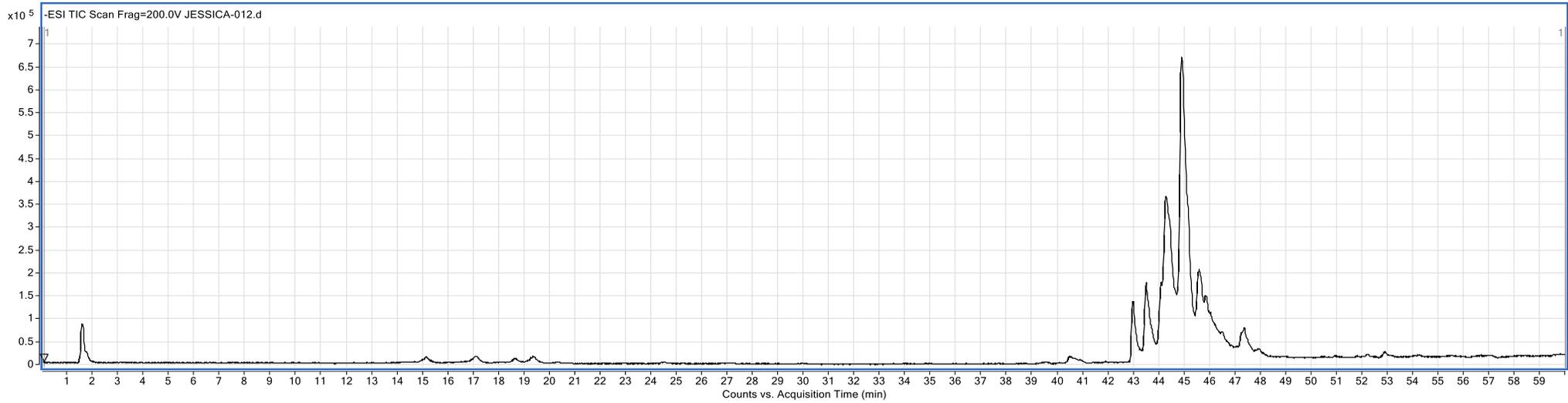
Singleton V. y J. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-153.

Waizel, B. J. 2011. *La medicina por medio de las plantas: su recorrido a través de las culturas y la historia*. México: Instituto Politécnico Nacional.

Anexo 1. Cromatogramas de los extractos analizados por HPLC-MS

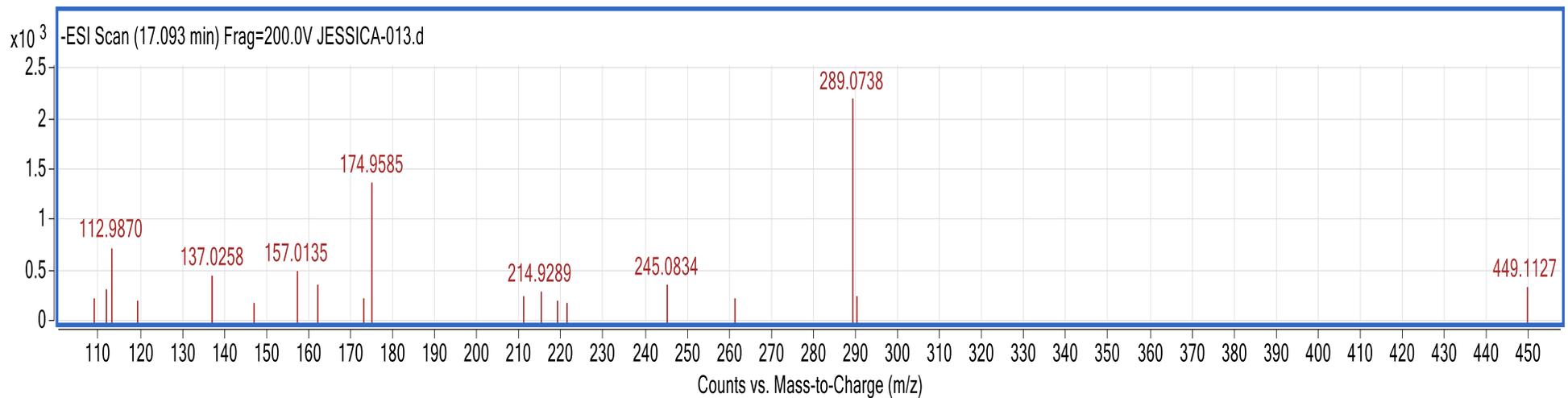
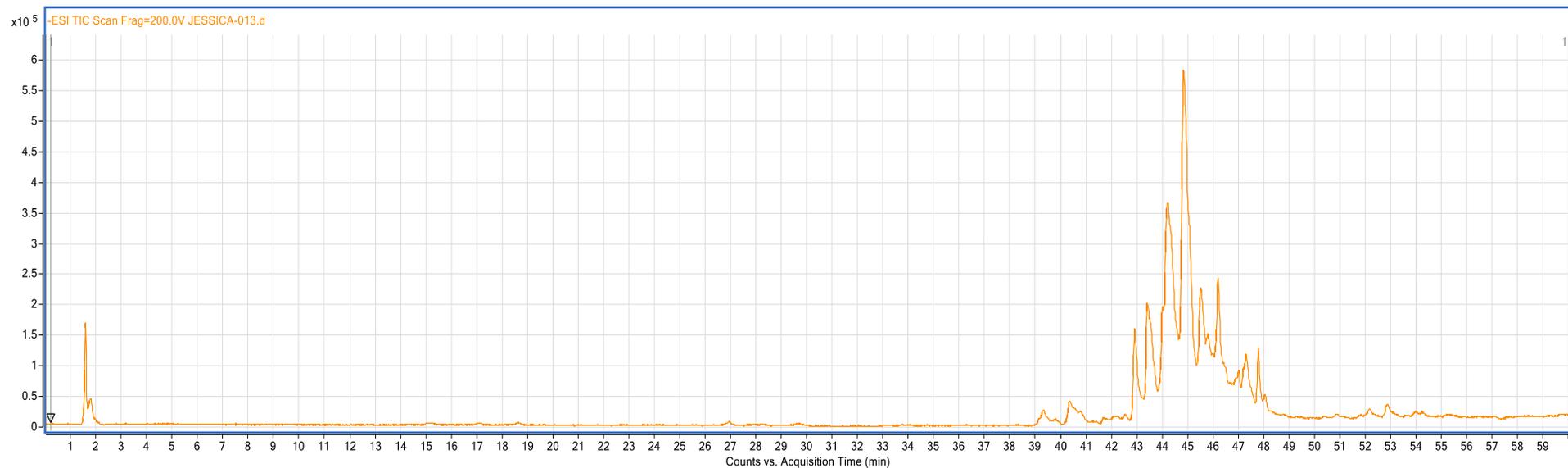


Cromatograma 1. Extracto metanólico 2 ♂, se observa el ión catequina (289.0759) con 1363.72 de abundancia.



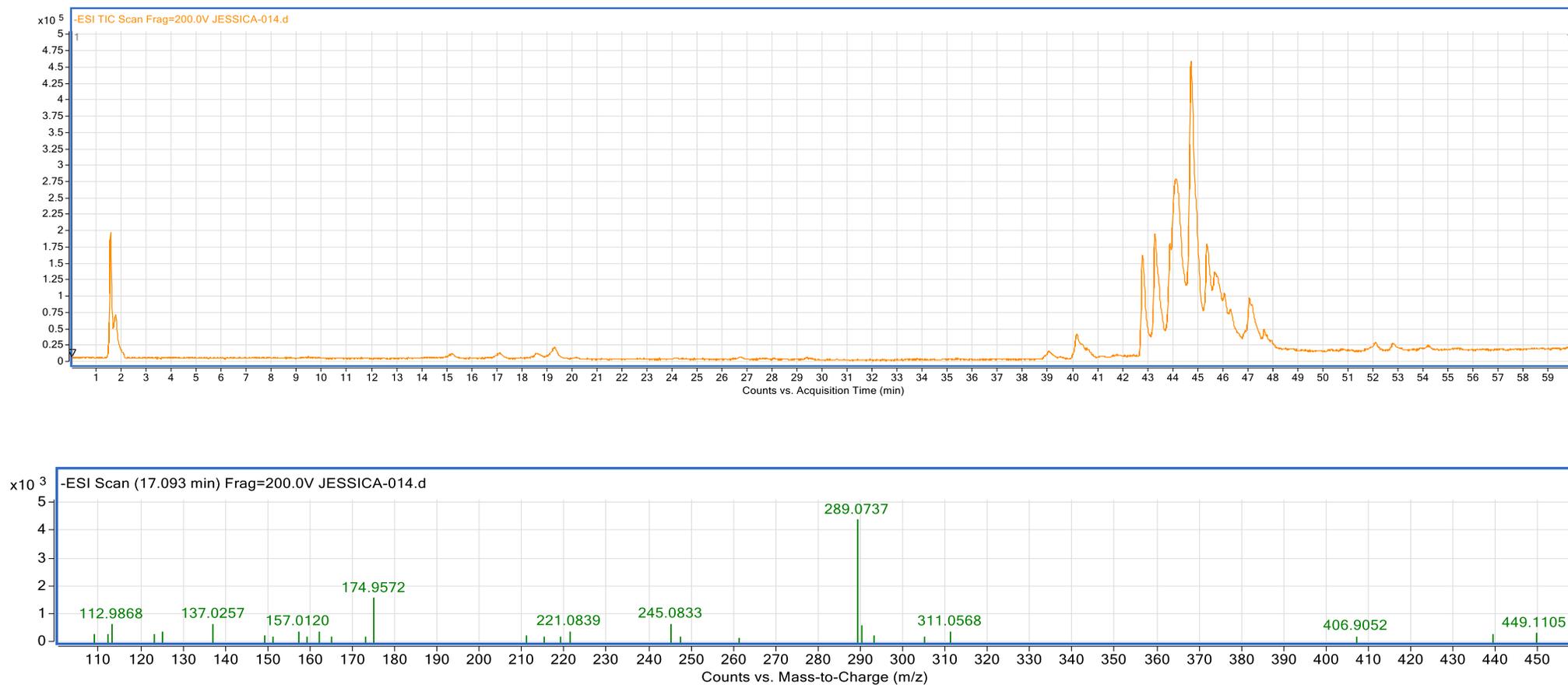
Cromatograma 2. Extracto metanólico 3 ♂, se observan los iones catequina (289.0759) con 7591.42 de abundancia, naringenina (271.0651) con 812.51 de abundancia y pinocembrina (255.0703) con 1520.97 de abundancia.

Anexo 1. Cromatogramas de los extractos analizados por HPLC-MS



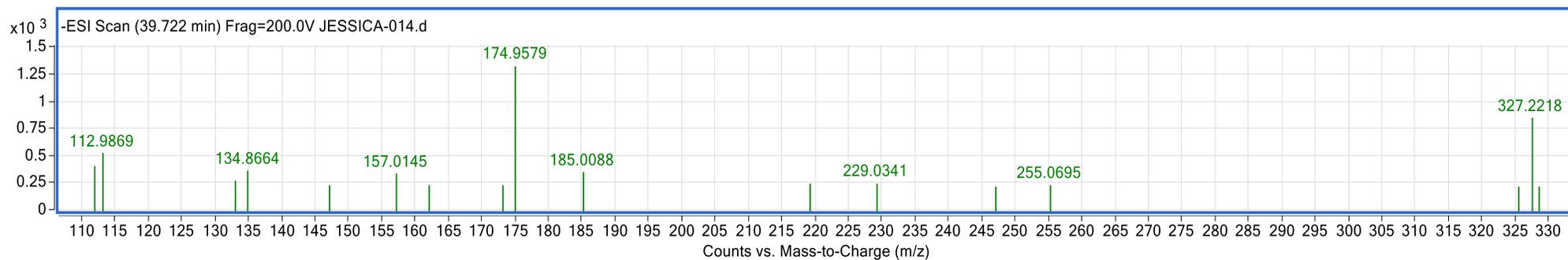
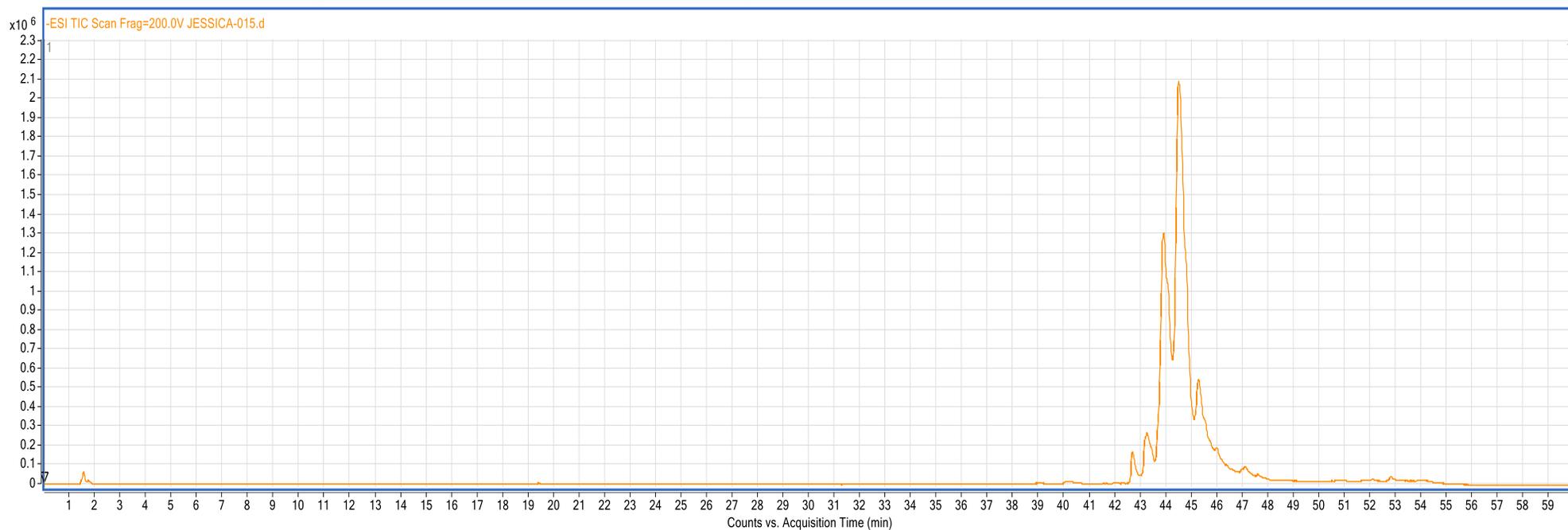
Cromatograma 3. Extracto metanólico 1 ♀, se observa el ión catequina (289.0759) con 2209.77 de abundancia.

Anexo 1. Cromatogramas de los extractos analizados por HPLC-MS



Cromatograma 4. Extracto metanólico 2 ♀, se observan los iones pinocembrina (255.0695) con 242.92 de abundancia y catequina (289.0737) con 4425.29 de abundancia.

Anexo 1. Cromatogramas de los extractos analizados por HPLC-MS



Cromatograma 5. Extracto metanólico 3 ♀, se observan le ión catequina (289.0723) con 1546.01 de abundancia.