



BENÉMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Análisis Preliminar De La Resina De *Bursera*
Fagaroides Engl. (Burseraceae)

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

DÍAZ NUÑEZ JOSÉ LUIS

TUTOR: BIOL. MOL. TOBÍAS RODRÍGUEZ RAMÍREZ



JULIO-2015

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a la fuerza que mueve a la Tierra y el Universo. Por permitirme llegar al término de mi licenciatura en Biología.

De manera especial agradezco al **Dr. Ramón Marcos Soto Hernández** y al **Mc. Rubén San Miguel Chávez**. Del Laboratorio De Fitoquímica Del Área De Botánica Del Colegio De Postgraduados Montecillo, México-Texcoco. Por apoyarme en mi investigación y permitirme trabajar en sus instalaciones.

Igualmente agradezco a la **Dra. Agustina Rosa Andrés Hernández** y al **Dr. David Martínez Moreno**. Del Laboratorio De Biología Vegetal de la Escuela De Biología de La Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. Por facilitarme la identificación de la planta y la zona de muestreo.

Un profundo agradecimiento para el **Biol. Mol. Tobías Rodríguez Ramírez**. Por acercarme a la Bioquímica Vegetal.

Finalmente agradezco a la Escuela De Biología De La Benemérita Universidad Autónoma De Puebla y a todos los profesores en especial a la **Biol. Rosete Enríquez María** que fueron mis maestros, me brindaron sus conocimientos y me formaron como profesionista.

DEDICATORIA



El primer muestreo que realice en la licenciatura de biología lo hice en “Huehuetlan el Grande” y encontré una piel de serpiente al bajar del cerro. En mi últimomuestreo de la licenciatura regreso al mismo lugar, y el sitio me despide con la imagen de un halcón.

Deseo dedicar este trabajo a mi familia:

A mi padre José Luis Díaz Menchaca por apoyarme a lo largo de mi educación tanto básica como profesional.

A mi madre María Ofelia Núñez Acosta por brindarme su cariño y comprensión a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Omar Abrahán Díaz Núñez, Erik Díaz Núñez e Iván Díaz Núñez por ser un ejemplo para mí.

De manera especial se lo dedico también:

A mis compañeros y amigos los “Cobra”, y a toda la gente que conocí a lo largo de la carrera biología por hacer de ella una de las etapas más interesantes de mi vida.

Abreviaturas

Ca ²⁺ calcio	NH ₄ OH hidróxido de amoniaco
CCF cromatografía de capa fina	nm nanómetros
C ₂ H ₄ etileno	NP 2-aminoetil difenil borinato
CL50 concentración letal	O ₂ oxígeno molecular
Co- A coenzima-A	PEG Polietil glicol
CO ₂ dióxido de carbono	Rf factor de retención
DPPH 2,2-difenol-1-picrilhidrazilo	
FeCl ₃ cloruro de hierro.	
FR factor de retardo	
gr gramos	
HCl ácido clorhídrico	
H ₂ SO ₄ ácido sulfúrico	
H ₂ O agua	
m metros	
mg miligramos	
ml mililitros	
µg microgramos	
µL microlitros	
Na ₂ CO ₃ carbonato de sodio	
NO ₃ nitrato	
NH ₄ amonio	

ÍNDICE

Resumen	7
Introducción	8
Antecedentes	10
Justificación	16
Hipótesis	16
Objetivo General	16
Objetivos Particulares	16
Material y Métodos	
• Zonas De Muestreo	17
• La Especie	18
• La Resina	19
• Método De Muestreo	20
• Técnicas De Análisis De Metabolitos	
○ Obtención De Extractos	21
○ Análisis Preliminar De Metabolitos	21
○ Identificación De Metabolitos Por CCF	24
○ Cuantificación De Metabolitos Secundarios	27
○ Determinación De Actividad Antioxidante	29
• Análisis Estadístico	29
Resultados	
• Extractos	30

• Análisis Preliminar	31
• Cromatografía en Capa Fina	38
• Cuantificación De Metabolitos Secundarios	40
• Actividad Antioxidante	41
Discusión	42
Conclusiones	44
Bibliografía	45
Anexos	49

Resumen

México cuenta con una gran diversidad de plantas que no han sido estudiadas y que ofrecen una gran fuente de metabolitos. Dentro de esta diversidad de plantas se encuentra la familia *Burceraceae*, un grupo de árboles o arbustos que presentan conductos resiníferos y laticíferos que producen aceites y resinas aromáticas apreciadas por la humanidad. Estas resinas son importantes para diferentes industrias, y muchas veces se utilizan sin conocer los componentes de los cuales están constituidas.

En este trabajo se realizaron diferentes estudios bioquímicos para analizar la resina de *Bursera fagaroides* con el fin de conocer cuáles son los metabolitos secundarios que la constituyen. Se determinó la polaridad de la resina y se obtuvieron extractos, mediante la aplicación de solventes de diferente polaridad. Con los extractos se realizaron análisis colorimétricos para determinar la presencia de los metabolitos y se rectificó su presencia mediante técnicas de cromatografía en capa fina. Se cuantificaron las cantidades de algunos metabolitos por gr de resina y se analizó la actividad antioxidante de la resina pura.

Los resultados de estos análisis evidenciaron que la resina es soluble en solventes como el diclorometano. Se evidenció la presencia de terpenos, saponinas y compuestos fenólicos como flavonoides. El porcentaje de compuestos fenólicos y saponinas representa el 16% de los metabolitos presentes por gr de resina. En la actividad antioxidante se necesitan 8.73 mg/ml de resina para inhibir el 50% de DPPH (CL50). Se llegó a la conclusión de que la resina es soluble en solventes como diclorometano. Los metabolitos secundarios que la constituyen son saponinas, terpenos y compuestos fenólicos como flavonoides y posibles lignanos. El porcentaje de ácidos fenólicos y saponinas representa menos de una cuarta parte de los constituyentes de la resina, y su actividad antioxidante es baja.

Introducción

Se denominan metabolitos a los elementos, moléculas o compuestos que interactúan dentro de las rutas metabólicas para mantener la estabilidad celular y por consiguiente la supervivencia de los organismos (Nelson y Cox, 2005).

En las plantas a los metabolitos que forman parte de la base estructural y funcional de sus sistemas de desarrollo se les denomina primarios. Mientras que a aquellos que surgen de la interacción de la planta con otras plantas, vertebrados, invertebrados, microorganismos y en general, el ambiente en el que habiten se les llama secundarios. Entre los metabolitos secundarios que se han podido aislar, identificar y aprovechar por el uso de las plantas a lo largo de la historia del hombre se encuentran los alcaloides, compuestos fenólicos, terpenos, glucósidos y sus respectivos derivados (Trewavas, 2000; Bell, 1981). En el caso de los alcaloides su producción está fuertemente asociada con el metabolismo del nitrógeno. Se piensa que proceden de L- aminoácidos como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina y arginina solos o combinados con esteroides y algunos terpenos (Waller y Dermer, 1981). Más de 12,000 alcaloides han sido aislados desde que se descubrió la morfina. El 20% de las plantas vasculares producen alcaloides. Aparecen en las hojas, flores, semillas y raíces de las plantas. Son solubles en agua (Rodney *et al.*, 2000) y se cree que en dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante y analgésico (Rodney *et al.*, 2000; Waller y Dermer, 1981). Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides son moléculas que forman parte estructural de las paredes celulares vegetales. Tienen un rol defensivo, diferencian maderas y cortezas, establecen el color de flores y producen ciertos olores. Su síntesis deriva de aminoácidos como fenilalanina, triptófano y tirosina a través de la ruta del ácido siquímico. Entre ellos se encuentran las ligninas, lignanos, flavonoides, taninos, comarinas, etc. (Rodney *et al.*, 2000; Grisebach, 1981; Hahlbrock; 1981 Brown, 1981). Los glicósidos son moléculas que surgen de la unión de un azúcares con esteroides, alcaloides o terpenos, presentan propiedades detergentes y actúan como protección contra herbívoros. Incluyen a moléculas como saponinas,

glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos (Rodney *et al.*, 2000). De todos estos metabolitos secundarios se sabe muy poco sobre sus rutas de síntesis y como tal no existe una reconstrucción histórica de su aparición. Pero, tienen una fuerte influencia ecológica. Pueden persuadir a potenciales depredadores, desalentar la competencia, atraer a polinizadores, favorecer la simbiosis, inhibir enfermedades y generar variabilidad en la forma de los tallos, raíces, hojas, flores y frutos. Por lo que se ha propuesto que son aberraciones de vías metabólicas genéticamente transmitidas por que eran favorables (Bell, 1981). Su producción y almacenamiento varía a lo largo del desarrollo de las plantas (Wiermann, 1981).

En México se cuenta con una enorme diversidad de plantas que no han sido estudiadas y que ofrecen una gran fuente de estos metabolitos (Díaz *et al.*, 2001). Dentro de esta diversidad se encuentra la familia *Burceraceae*. Un grupo de árboles o arbustos, deciduos o perennifolios, diocos o poligamodiocos y algunas veces hermafroditas, que presentan cortezas exfoliantes y de vistosos colores. Tienen conductos resiníferos y laticíferos, que producen aceites y resinas aromáticas apreciadas por la humanidad. Se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales. Engloba 18 géneros y cerca de 600 especies. En América se encuentran nueve géneros y 240 especies. De los cuales 3 géneros y cerca de 110 especies pertenecen a México siendo 70 u 80 especies endémicas (Lemos, 2008; Langenheim, 2003). Las resinas actúan como un mecanismo defensivo contra herbívoros e infecciones producidas por parásitos y microorganismos. Se cree que pueden atraer polinizadores y se sabe que todas estas propiedades están determinadas por los metabolitos secundarios de los cuales están constituidas (Becerra *et al.*, 2001). Se pueden fabricar adhesivos y papel. Son importantes para la industrias textil, alimenticia y farmacéutica, por lo que su composición es de mucho interés en la investigación (Langenheim, 2003). En México, de la resina del género *Bursera* se pueden extraer diferentes compuestos, por ejemplo de *Bursera linaloe* y *Bursera citronella* se obtienen inciensos, perfumes y remedios (Purata, 2008). Recientemente se han intentado usar como recubrimientos orgánicos para perdurar la vida de anaquel de algunos frutos

(Cortes, 2014). Sin embargo, muchas veces se desconoce la composición de estas resinas.

Antecedentes

Domínguez *et al.* (1973) mencionan que la bioquímica de la resina de *Bursera* es dominada por la presencia de mono y sesquiterpenos (Figura 1).

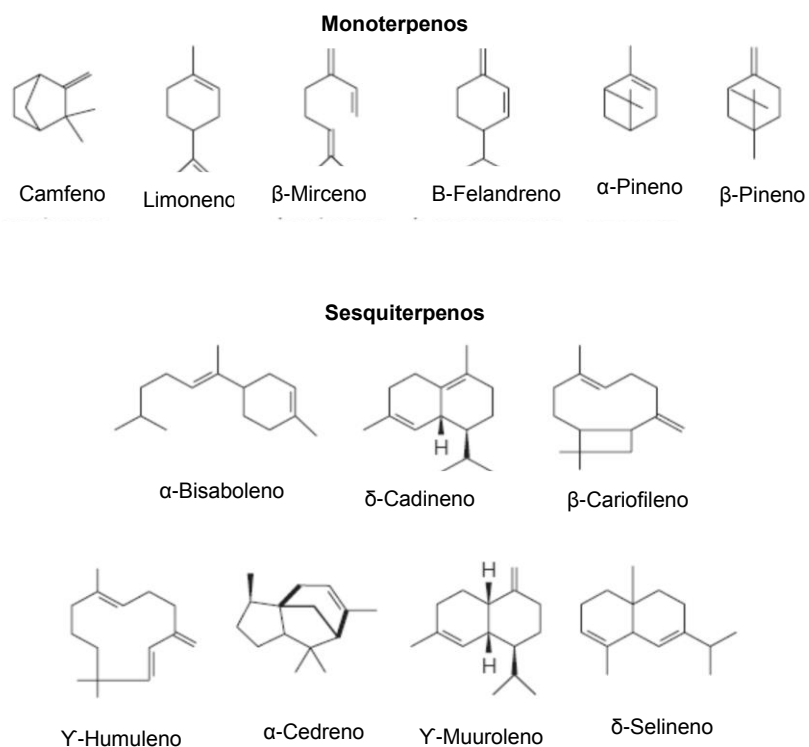


Figura 1. Mono y sesquiterpenos encontrados en la resina de *Bursera* (Langenheim, 2003).

Mientras que Khalid (1985), describe que la familia *Burseraceae* exuda oleogomoresinas al ser dañada su corteza está constituida principalmente de terpenos, flavonoides, cumarinas y lignanos (Figura 2). A su vez corroboro la presencia de triterpenos en las familias *Burseraceae*, *Dipterocarpaceae* y *Anacardinaceae* (Figura 3).

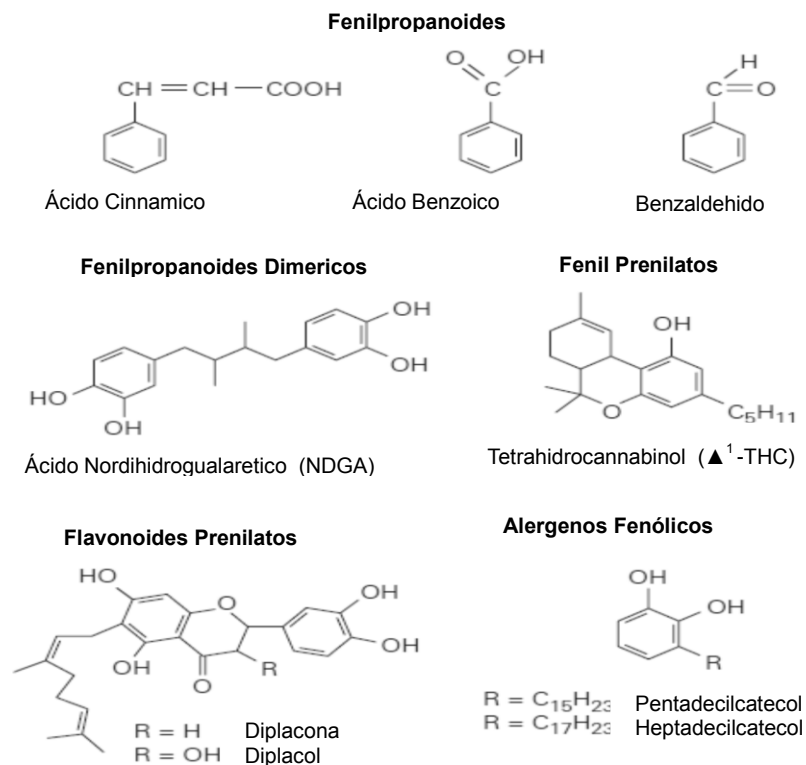


Figura 2. Compuestos fenólicos encontrados en resinas de *Bursera* (Langenheim, 2003).

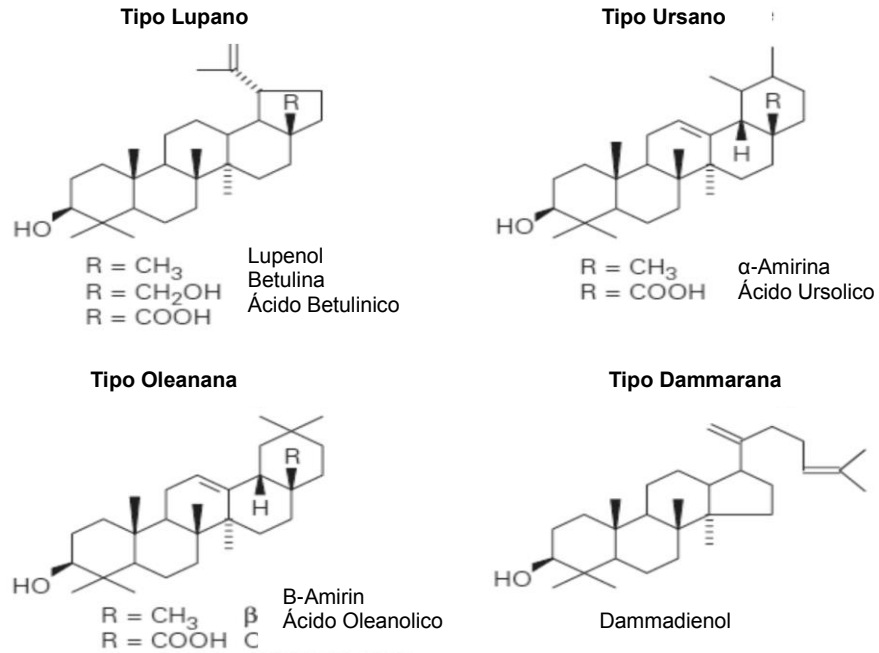


Figura 3. Tetraterpenos encontrados en las familias *Burseraceae*, *Dipterocarpaceae* y *Anacardinaceae* (Langenheim, 2003)

Wollenweber y Dietz (1981), y Wollenweber y Jay's (1988) plantean que la presencia de compuestos fenólicos en las resinas está estrechamente asociada con la presencia de sesqui y triterpenos. Mientras que Becerra *et al.* (2001) observaron que es posible encontrar algunos diterpenos en la resina *Bursera* (Figura 4).

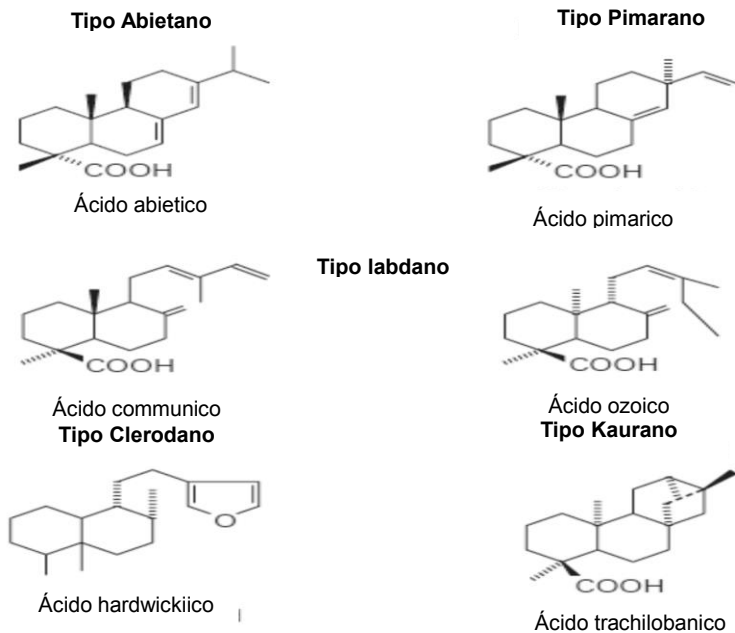


Figura 4. Diterpenos encontrados en la resina de *Bursera* (Langenheim, 2003).

Finalmente Langeheim (2003), definió a la resinas de plantas como una mezcla soluble de lípidos constituida por terpenos volátiles y no volátiles al igual que compuestos fenólicos. Los terpenoides encontrados pueden ser mono, sesqui, tri y rara vez diterpenos.

Por otro lado Hernández *et al.* (2002), descubrieron que es posible aislar del extracto de las hojas *Bursera fagaroides var. elegans* glicósidos derivados de flavonoides como 3'-O-a-L-ramnopiranosido de luteolina (Figura 5).

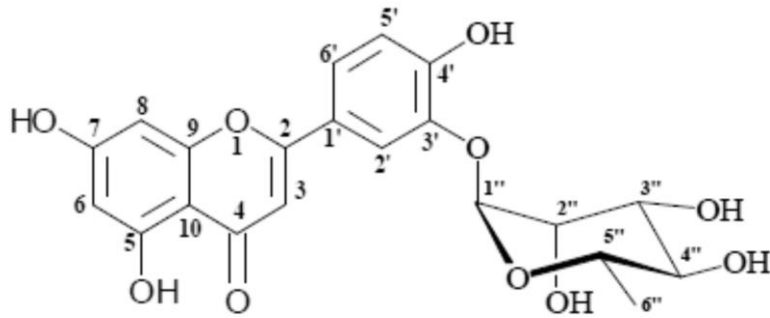


Figura 5. Estructura de 3'-O- α -L-ramnopiranosido de luteolina (Hernández *et al.*, 2002)

Noge y Becerra (2009) encontraron en las hojas de *B. fagaroides var. purpusii* altas concentraciones de α -pineno y germacreno, y bajas concentraciones de camfeno, sabineno, β -pineno, β -mirceno, limoneno, β -felandreno, β -cariofileno, biciclogermacreno (**ANEXO 1**).

Morales *et al.* (2012) descubrieron tres tipos lignanos no reportados de la resina de *Bursera fagaroides* (colectada en San Pedro Totolapan, Oaxaca) 9-acetil-9'-pentadecanoil-dihidroclusina (1), monoacetato de 2,3-dimetoxi-secoisolintralina (4) y monoacetato de dihidroclusina (5). Al igual que dos ya reportados diacetato de 2,3-dimetoxi-secoisolintralina (2) y diacetato de dihidroclusina (3) (Figura 6).

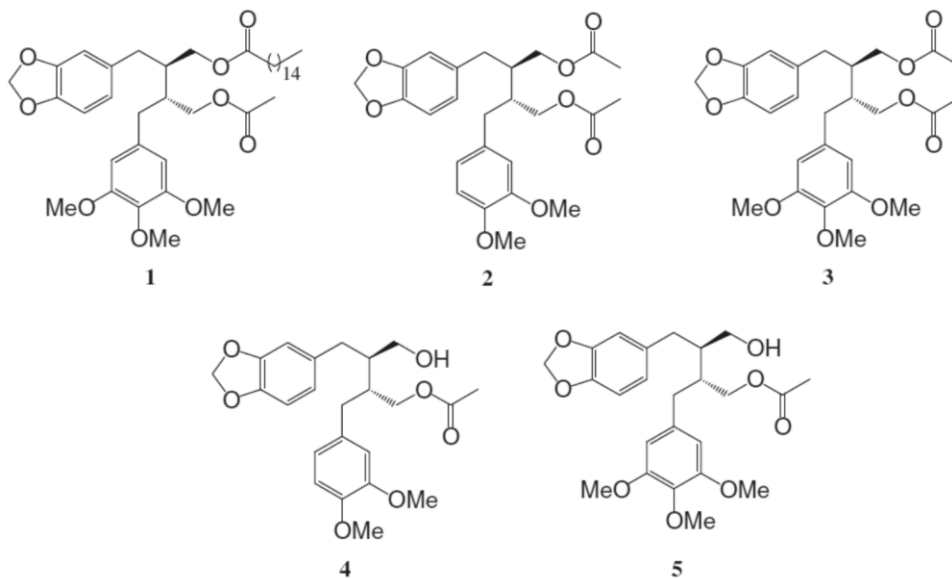


Figura 6. Lignanos aislados en la resina de *Bursera fagaroides* (Morales *et al.*, 2012).

Rosas *et al.* (2008) demostraron que el extracto de la corteza del tallo de *Bursera fagaroides* (colectada en Capula, Michoacán) inhibe el crecimiento *invitro* de *Entamoeba histolytica*. Pérez *et al.* (1998) y Reynoso *et al.* (2008) encontraron que el extracto de la corteza del tallo de *Bursera fagaroides* presenta actividad antitumoral en el linfoma de ratón, y Rojas *et al.* (2012) identificaron en el extracto de *Bursera fagaroides var fagaroides* siete tipos de lignanos podofilotoxicos: podofilotoxina (1), β -peltatina- α -metilether (2), 5'-desmethoxina- β -peltatina- α -metilether (3), dimetoxi-yateina (4), desoxipodofilotoxina (5), burseranina (6) y acetil podofilotoxina (7) (Figura 7).

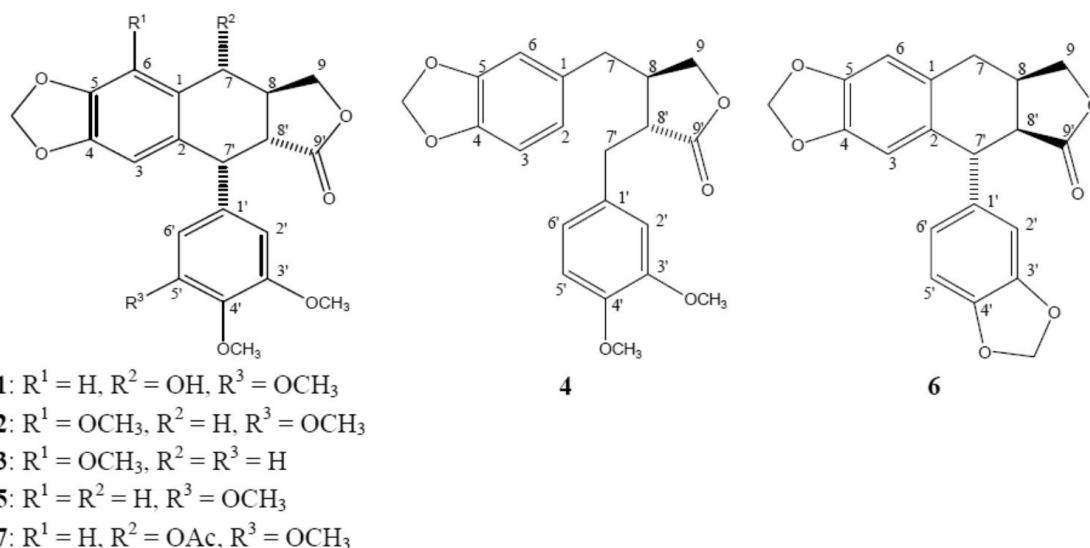


Figura 7. Estructura de los siete lignanos podofilotoxicos encontrados en el extracto de la corteza del tallo de *Bursera fagaroides var fagaroides* (Rojas *et al.* 2012).

Por último es importante mencionar que otro estudio donde se demuestra un ejemplo del potencial de esta resina, es el descrito por Cortes (2014), el cual menciona que esta resina disuelta en un disolvente polar puede ser un efectivo conservador de algunos frutos y hortalizas de carácter comercial, ya que permite aumentar su vida útil de anaquel.

Justificación

Un gran número de metabolitos secundarios se usan en medicina, la industria y la investigación, y estudiar nuevas fuentes de ellos como la resina de *Bursera fagaroides* permitirían incrementar el conocimiento que tenemos sobre los mismos y favorecer el descubrimiento de nuevos compuestos útiles para el hombre. Por lo que el presente estudio tiene como hipótesis y objetivos lo siguiente:

Hipótesis

Debido a que las resinas son un producto del metabolismo de las plantas que actúa como defensa y posiblemente atrae polinizadores, se espera que la resina de *Bursera fagaroides* presente una variedad de metabolitos secundarios.

Objetivo General

Analizar mediante distintos métodos bioquímicos la resina de *Bursera fagaroides* para determinar que metabolitos secundarios contiene.

Objetivos Particulares

- Examinar la solubilidad de la resina en disolventes con diferente polaridad (metanol, diclorometano y hexano) con el fin obtener extractos que se utilicen en el análisis preliminar y permitan evidenciar la presencia de los metabolitos.
- Cuantificar el contenido de los metabolitos secundarios que forman parte de la resina.
- Determinar la capacidad antioxidante de la resina.

Material y Métodos

El estudio se llevó a cabo en los meses de agosto a noviembre del 2014 en el laboratorio de Fitoquímica perteneciente al Postgrado de Botánica del Colegio De Postgraduados localizado en el municipio de Texcoco, Estado De México (Figura 8).



Figura 8. Laboratorio De Fitoquímica.

Zona De Estudio

La zona de muestreo fue el municipio “Huehuetlan El Grande” localizado en la parte central del estado de Puebla (Figura 9). Sus coordenadas geográficas son: paralelos $18^{\circ} 41' 06''$ - $18^{\circ} 53' 12''$ de latitud norte, y los meridianos $98^{\circ} 03' 18''$ - $98^{\circ} 15' 06''$ de longitud oeste. Tiene una superficie de 264.08 kilómetros. Su relieve varía de los 2000 a los 1400 metros sobre el nivel del mar. Pertenece a la cuenca del río Atoyac. En el municipio se pueden identificar tres tipos de climas, uno cálido, uno semicálido y uno templado. En cuanto a la vegetación se presentan: bosques de encino (asociados a vegetación arbustiva), selva baja caducifolia (asociada a vegetación arbustiva o arbórea) junto con una gran zona dedicada a la agricultura y pastizal inducido (INAFED, 2010).



Figura 9. Zona de estudios, municipio de “Huehuetlan el Grande”, Puebla.

Descripción Morfológica De La Especie Identificada

La especie de estudio fue identificada por la Dra. Agustina Rosa Andrés Hernández profesora de Botánica De La Escuela De Biología De La Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.

La especie fue *Bursera fagaroides*, en un grupo de arbustos o árboles que tienen entre 2 y 8 metros de alto (Figura 10). Son dioicos y algunas veces llegan a ser hermafroditas. Su tronco puede tener de 10 a 30 cm de diámetro. Su corteza externa es exfoliante y amarilla. La corteza interna es de color verde. Presenta látex blanquecino amarillento, resina ligeramente aromática y transparente que es abundante en ramas jóvenes. Las hojas son generalmente imparipinadas, foliadas con raquis alado, folíolos y un peciólulo. La base es cuneada, obtusa o redondeada, ápice agudo a obtuso, margen entero a crenado, hasta serrado, nervadura central amarillenta y evidente en ambas superficies. Presenta flores solitarias o densamente aglomeradas en el ápice. De color blanquecino, amarillento o verdoso. Los frutos presentan pedúnculos ligeramente incurvados y

engrosados, obovoidales a subesféricos, cortoapiculados, rojizos y glabros. Sus huesos están cubiertos totalmente por el pseudoarilo rojizo o amarillento. Se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de México. En México se encuentra en el Distrito Federal y los estados de Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Lemos, 2008).



Figura 10. Árbol de *Bursera fagaroides*.

Descripción Física De La Resina

La resina fue colectada en agosto del 2014 y se encontró solidificada en el tronco de los árboles y arbustos. Presentó una coloración ámbar y blanquecina (Figura 11).



Figura 11. Resina de *Bursera fagaroides*.

Método de Muestreo

Se utilizó un muestreo dirigido el cual consiste en la elección no aleatoria de las muestras. Se realizó una caminata donde se buscaron los especímenes con resina. Solo se encontraron cinco especímenes a los cuales se les tomo datos y se les extrajo una muestra (**ANEXO 2**). Para tomar la muestra se utilizó una navaja con la cual se raspo la superficie del árbol donde estaba contenida la resina. La muestra fue depositada en frascos de vidrio debidamente marcados para su posterior análisis (Figura 12).



Figura 12. Muestras de resina.

Técnicas de Análisis de Metabolitos.

Las técnicas de análisis de metabolitos se basaron en las metodologías de trabajo del laboratorio de Fitoquímica de Postgrado en Botánica Del Colegio De Posgraduados.

Obtención de Extractos.

Primero se fragmentaron las muestras en un mortero. Se pesaron en base a la que tuvo el menor peso. Se depositaron en frascos ámbar y se procedió a extraer las muestras con tres tipos de disolventes de diferente polaridad hexano, diclorometano y metanol.

Se usó primero hexano, hasta cubrir las muestras completamente. Los frascos se tapan con parafilm y se dejan reposar por 48 horas. Después se agitan y se filtran en frascos nuevos para obtener el extracto en hexano. Se evapora el disolvente y finalmente se pesa el extracto obtenido. Después el residuo que queda de la extracción con hexano, se procede a cubrirlo completamente con diclorometano y se realiza el mismo procedimiento hasta obtener el peso del extracto de diclorometano. Por último, las muestras se cubren completamente con metanol y se sigue el mismo procedimiento hasta obtener el peso del extracto en metanol. En los extractos de diclorometano y metanol se tuvieron que centrifugar las muestras a 4500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente **(ANEXO 3)**.

Análisis Preliminar de Metabolitos Secundarios

Una vez obtenidos los extractos se procedió a realizar técnicas químicas colorimétricas para la detección de los diferentes metabolitos (Martínez, 1997).

- **Ácidos Fenólicos:** se colocó en tubos de ensayo una pequeña cantidad de

los diferentes extractos. Se separó un tubo para control positivo y otro para el control negativo. Se añadió un pequeño volumen del disolvente en el cual se obtuvo el extracto (metanol, diclorometano o hexano) y se agregaron 3 gotas de reactivo Folin en agua en proporción (1:1). Si la prueba resulta positiva se desarrollara un color oscuro.

Control +: Ácido gálico.

Control -: Reactivos.

- **Flavonoides:** se colocó en tubos de ensayo una pequeña cantidad de los extractos. En un tubo se colocaron unos cuantos miligramos de quercetina como control positivo y otro solo con disolvente para el control negativo. Se añadió a los tubos un trozo de cinta de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. Si la prueba resulta positiva se desarrollara un tenue color amarillo a rosa en una solución efervescente.

Control +: Quercetina.

Control -: Reactivos.

- **Terpenos (Prueba De Liberman):** se colocó en tubos de ensayo una pequeña cantidad de los diferentes extractos. Se separó un tubo para el control positivo y otro para el control negativo. Se añadió a los tubos 1 ml de diclorometano, después 2 o 3 gotas de anhídrido acético y finalmente 2 o 3 gotas de H₂SO₄ concentrado resbalando por las paredes del tubo. Si la prueba resulta positiva se presenta coloración azul-verde.

Control +: Ácido masticadienólico.

Control -: Reactivos.

- **Alcaloides:** se colocó en tubos de ensayo una pequeña cantidad de los diferentes extractos. Se separó un tubo para control positivo y otro para el control negativo, se añade 2 ml de HCl a 1% en cada tubo. Se colocan en baño caliente 20 minutos. Se dejaron enfriar los tubos y se agregaron 3 gotitas de reactivo Dragendorff. Si la prueba resulta positiva se desarrollara

un color naranja.

Control +: *Lupinus sp.*

Control -: Reactivos.

- **Saponinas:** se colocó en tubos de ensayo una pequeña cantidad de los diferentes extractos. Se separó un tubo para el control positivo y una para el control negativo. Se preparó una solución A+B a partir de 1.5 ml de solución A y 1.5 ml de solución B (**ANEXO 4**). De esta se depositaron 0.5 ml en cada tubo. Se agregaron 0.5 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3). Se colocaron en baño caliente por 30 minutos. Si la prueba resulta positiva producirá un precipitado de color rosa.

Control +: Saponina de soya.

Control -: Reactivos.

- **Taninos:** se colocó en tubos ensayo una pequeña cantidad de los diferentes extractos. Se separó un tubo como control positivo y otro para el control negativo. Se depositan 0.5 ml de agua destilada. Se agitaron los tubos y se agregaron unas gotas de cloruro férrico (FeCl_3) a 5% en H_2O . Si la prueba resulta positiva se presenta una coloración oscura azul a violeta.

Control +: Ácido Tánico.

Control -: Reactivos.

Identificación De Metabolitos Por Análisis de Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Una vez realizado el análisis preliminar de los metabolitos, se procedió a realizar cromatografía de capa fina para obtener una segunda evidencia de la presencia de los compuestos. Vargas (2011) menciona que la CCF consta de cuatro partes importantes: muestra, cámara de desarrollo, fase estacionaria y una fase móvil o eluyente.

En una placa de CCF de 10x10 se traza una línea con lápiz a un cm de distancia de la parte inferior y otra línea a un cm de distancia de la parte superior. En la línea de la parte inferior se deja un cm en parte izquierda y derecha. La distancia que sobra en la línea se divide dependiendo del número de muestras que se desee utilizar. Finalmente en cada división se pone una marca de la muestra correspondiente. Para colocar las muestras se utiliza un capilar. Se sumerge la punta del capilar sobre la muestra. Sube un poco de la muestra y mediante una técnica de punteo se deja la muestra a lo largo de la línea, de tal forma que quede dentro de la división que le corresponda. Puede ser solo un punto o una línea de la muestra. Dependiendo con lo que se trabaje. Para verificar que las muestras están bien colocadas se visualizan en una cámara de luz ultravioleta.

La cámara de desarrollo para una placa de CCF de 10x10 es una de 20x20, a la cual se le agrega la fase móvil o eluyente que depende del tipo de metabolitos que se desea evidenciar.

- **Ácidos Fenólicos:** para una cámara de desarrollo para ácidos fenólicos se preparan 20 ml de acetato de etilo y metanol (9:1). Se vierte la solución en la cámara y se deja reposar por 10 minutos. Se coloca en la cámara la placa de CCF, se tapa la cámara y se espera hasta que el eluyente llegue a la línea superior. Se saca la placa y se deja secar. Se analiza la placa en la cámara de luz ultravioleta para tener una visión general del corrido de la muestras. Para el revelado de la placa se utiliza el reactivo folin en agua en proporción (1:1) y vapores de amonio (NH_4OH) a 50% en agua. Estos se colocan en forma de espray. Si se presentan coloraciones oscuras de azul a violetas indica la presencia de fenoles.
- **Flavonoides:** Se preparan 20 ml de acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético y agua (100:11:11:26). Se vierte la solución en la cámara y se deja reposar por 10 minutos. Se coloca en la cámara la placa de CCF, se tapa la cámara y se espera hasta que el eluyente llegue a la línea superior. Se

saca la placa y se deja secar. Se analiza la placa en la cámara de luz ultravioleta para tener una visión general del corrido de la muestras. Para el revelado de la placa se utiliza el reactivo NP (2-aminoetil difenil borinato) a 1% y el reactivo PEG (polietil glicol) a 5% en metanol. Estos se colocan en forma de espray. Después se vuelve a ver las muestras en la cámara de luz ultravioleta. Si se presentan coloraciones amarillas, azul turquesa, naranja o rojo indica la presencia de flavonoides.

- **Terpenos:** Se preparan 25 ml de hexano en acetato de etilo (8:1). Se vierte la solución en la cámara y se deja reposar por 10 minutos. Se coloca en la cámara la placa de CCF, se tapa la cámara y se espera hasta que el eluyente llegue a la línea superior. Se saca la placa y se deja secar. Se observa la placa en la cámara de luz ultravioleta para tener una visión general del corrido de la muestras. Para el revelado se utiliza vainillina a 1% en etanol y H_2SO_4 al 10% en etanol. Estos se colocan en forma de espray. Después se coloca en una estufa a 110 °C por 10 minutos. La aparición de color violeta en las muestras indica la presencia de terpenos.
- **Alcaloides:** Se preparan 20 ml de metanol en diclorometano (1:9). Se vierte la solución en la cámara y se deja reposar por 10 minutos. Se coloca en la cámara la placa de CCF, se tapa la cámara y se espera hasta que el eluyente llegue a la línea superior. Se saca la placa y se deja secar. Se analiza la placa en la cámara de luz ultravioleta para tener una visión general del corrido de la muestras. Para revelar la muestra se utiliza el reactivo de Dragendorff, este se coloca en forma de espray. Después se coloca en una estufa a 110 °C por 10 minutos. La aparición de las coloraciones naranja indica la presencia de alcaloides.
- **Saponinas:** Se prepara una mezcla de acetato de etilo, metanol y agua (64:32:2:6). Se vierte la solución en la cámara y se deja reposar por 10 minutos. Se coloca en la cámara la placa de CCF, se tapa la cámara y se

espera hasta que el eluyente llegue a la línea superior. Se saca la placa y se deja secar. Se analiza la placa en la cámara de luz ultravioleta para tener una visión general del corrido de la muestras. Para el revelado se utiliza anisaldehído ó vainillina a 1% en etanol y H_2SO_4 a 10% en etanol. Estos se colocan en forma de espray. Después se mete a una estufa a 110 °C por 10 minutos. La aparición de las muestras indica la presencia de saponinas.

- **Taninos:** Se preparan 25 ml de agua, acetato de etilo, ácido fórmico y ácido acético (100:11:11:26). Se vierte la solución en la cámara y se deja reposar por 10 minutos. Se coloca en la cámara la placa de CCF, se tapa la cámara y se espera hasta que el eluyente llegue a la línea superior. Se saca la placa y se deja secar. Se analiza la placa en la cámara de luz ultravioleta para tener una visión general del corrido de la muestras. Para el revelado se utiliza $FeCl_3$ a 5% en H_2O . Esta se coloca en forma de espray. Después se vuelve a ver las muestras en la cámara de luz ultravioleta. La aparición de color azul marino indica la presencia de taninos.

Finalmente se determina R_f (factor de retención) el cual es un valor indicativo para la diferenciación de metabolitos y está determinado por la distancia recorrida por la muestra (d_r) entre la distancia recorrida por el disolvente (d_m) (Vargas, 2011). Solo se realizó CCF para los compuestos que resultaron positivos en el análisis preliminar.

Cuantificación de Metabolitos.

Ácidos Fenólicos: Se realizó un estándar de ácido gálico. Se preparó 100 ml de Na_2CO_3 a 2.5% en agua y 20 ml del reactivo Folin en agua en proporción (1:1). Se pesaron 0.0024 gr de ácido gálico y se disolvieron en 100 ml de agua. Para obtener la curva estándar se depositaron de la solución de ácido gálico 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μl en tubos. Se completó con agua hasta los 500 μl . Para el blanco se depositaron 500 μl de agua. Se agregaron después 25 μl del reactivo de Folin (1:1) y finalmente 975 μl de Na_2CO_3 . El estándar se analizó por duplicado y se dejó reposar por 1 hora. Los tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 740 nm. Se graficaron los resultados obtenidos en los tubos (eje Y densidad óptica: eje X cantidad de ácidos fenólicos en $\text{mg}/\mu\text{l}$). Se obtuvo la línea de tendencia central, la ecuación de la gráfica y R^2 (no debe ser menor a 0.95). Para poder trabajar con los datos de las muestras se hicieron diluciones de 1 mg de la muestra (pura o extracto) en 2 ml de metanol-diclorometano en proporción (9:1). Se tomaron 100 μl de las muestras, se depositan en tubos y se procedió a realizar el mismo procedimiento que fue utilizado para el estándar. Las muestras se analizaron por triplicado. Con la absorbancia obtenida se obtuvo la ecuación de la gráfica para determinar la concentración de la muestra de ácidos fenólicos (0.5 mg/ml). A partir de este dato se determinó la concentración de ácidos fenólicos en la muestra total.

Flavonoides: Se preparó un estándar de quercetina. Se prepararon 200 ml de metanol a 80%, 200 ml de acetato de potasio 1M y 200 ml cloruro de aluminio (1:10). Se pesaron 0.0024 gr de quercetina y se disolvieron en 100 ml de metanol al 80%. Para obtener la curva estándar se depositaron de la solución de quercetina 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μl en tubos. Se completó con metanol hasta obtener 1 ml. Para el blanco solo se depositó 1 ml de metanol a 80% .Se agregaron después 2 ml de acetato de potasio 1 M y finalmente 2 ml de cloruro de aluminio. El estándar se preparó por duplicado y se dejó reposar por 40 minutos. Los tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 415 nm. Se graficaron los resultados obtenidos en los tubos (eje Y densidad óptica: eje X cantidad de

flavonoides en mg/ μ l). Se obtuvo la línea de tendencia central, la ecuación de la gráfica y R^2 (no debe ser menor a 0.95). Para poder trabajar con los datos de las muestras se hicieron diluciones de 1 mg de la muestra (pura o extracto) en 2 ml de metanol-diclorometano en proporción (9:1). Se tomaron 100 μ l de las muestras, se depositaron en tubos y se procedió a realizar el mismo procedimiento que fue utilizado para el estándar. Las muestras se realizaron por triplicado. Con la absorbancia obtenida se obtuvo la ecuación de la gráfica para determinar la concentración de flavonoides de la muestra (0.5 mg/ml). A partir de este dato se determinó la concentración de flavonoides en la muestra total.

Saponinas: Se preparó un estándar de saponina de soya. Se prepararon 20 ml ácido sulfúrico a 72% y 20 ml de vainillina a 8%. Se pesaron 0.136 gr de saponina de soya y se disolvieron en 20 ml de agua. Para obtener la curva estándar se depositaron de la solución saponina de soya 20, 40, 60, 80 y 100 μ l en tubos. Se completó con agua hasta obtener 100 μ l. Para el blanco solo se colocaron 100 μ l de agua. Se agregaron después 1 ml de ácido sulfúrico a 72% y 100 μ l vainillina a 8%. Se colocaron los tubos en baño caliente durante 20 minutos a 60°C. Después se enfriaron las muestras con hielo. El estándar se analizó por duplicado. Los tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 544 nm. Se graficaron los resultados obtenidos en los tubos (eje Y densidad óptica: eje X cantidad de flavonoides en mg/ μ l). Se sacó la línea de tendencia central, la ecuación de la gráfica y R^2 (no debe ser menor a 0.95). Para poder trabajar con los datos de las muestras se realizaron diluciones de 1 mg de muestra (pura-extracto) en 4 ml de metanol-diclorometano en proporción (9:1). Se tomaron 100 μ l de las muestras, se depositan en tubos y se procede a realizar el mismo procedimiento que fue utilizado para el estándar. Las muestras se analizaron por triplicado. Con la absorbancia se obtiene la ecuación de la gráfica para determinar la concentración de saponinas de la muestra (0.25 mg/ml). A partir de este dato se determinó la concentración de saponinas en la muestra total.

Determinación de Actividad Antioxidante

Para la determinación de actividad antioxidante se siguió del procedimiento de Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se prepararon 25 ml de DPPH 0.1 mM en metanol. Para el estándar se depositaron, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 ml de DPPH 0.1 mM y se complementaron con metanol hasta obtener 2 ml. Para el blanco solo se depositaron 2 ml de metanol. El estándar se realizó por duplicado. Los tubos se dejaron reposar 30 minutos en oscuridad y se leyeron en el espectrofotómetro a 517 nm. Se graficaron los resultados obtenidos en los tubos (eje Y densidad óptica: eje X cantidad de DPPH 0.1 mM depositado). Se obtuvo la línea de tendencia central, la ecuación de la gráfica y R^2 (no debe ser menor a 0.95). Para poder trabajar con los datos de las muestras se realizaron las siguientes diluciones por duplicado 1mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml y 0.1 mg/ml. Se tomaron 500 μ l de las muestras, se depositaron en tubos y se complementaron con 1.5 ml de DPPH 0.1 mM. Con la ecuación de la gráfica se determinó la concentración de DPPH inhibido. Después con la ecuación: % de DPPH inhibido = $(Ac - Am) \times (100 / Ac)$ se determinó el % de DPPH inhibido por las muestras, donde Ac es la densidad óptica máxima de la curva patrón. Am es la densidad óptica de las muestras. Se realizó una gráfica con los datos de las diluciones de las muestras en el eje X y el % de DPPH inhibido en el eje Y. Finalmente con la ecuación de la curva (depende de la tendencia) se obtuvo la CL50 un valor reportado que determina a que concentración se inhibe el 50% del DPPH.

Análisis Estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para determinar los patrones comportamiento de los componentes de la resina y pruebas estadísticas no paramétricas para posibles comparaciones. Los programas utilizados fueron GraphPad Prism 6, Sagma Plot 12.3 y Microsoft Excel 2010.

Resultados

Extractos

Se pesaron en total 3.410 gr por cada muestra de resina. En total se obtuvieron 15 extractos: cinco de hexano, cinco de diclorometano y cinco de metanol (Figura 13).

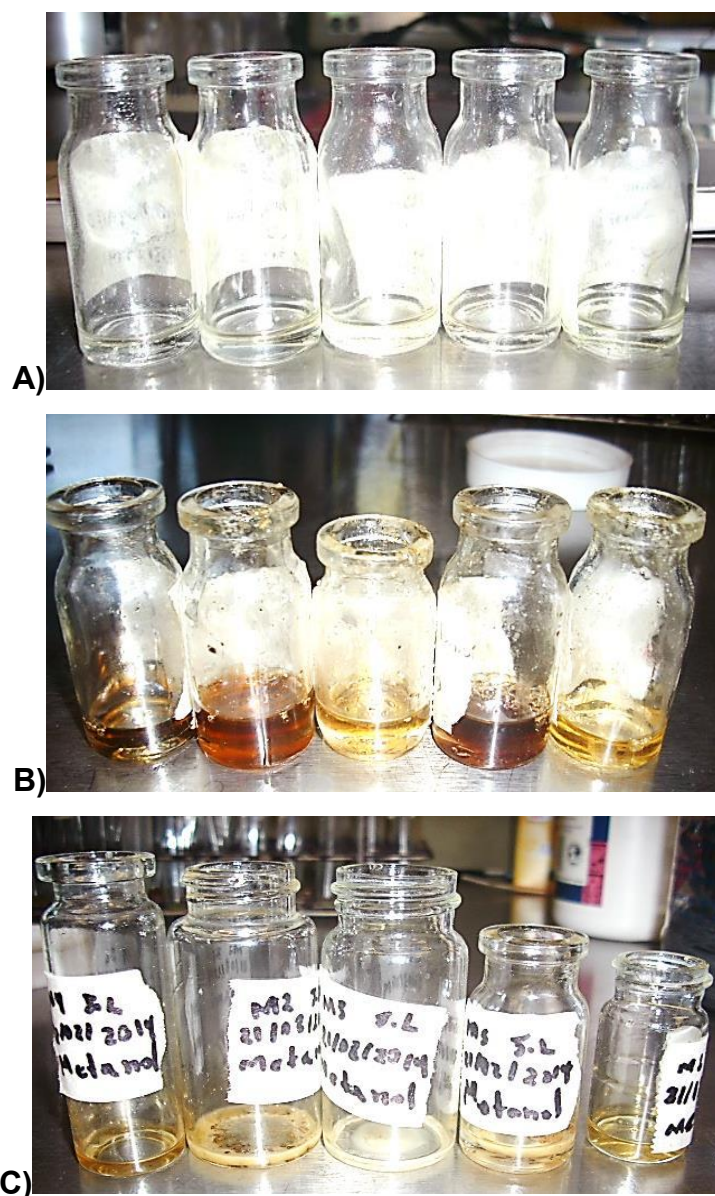


Figura 14. Extracto obtenidos de las muestras con 3.410 gr de resina.

A- hexano, B- diclorometano y C-metanol.

La mayor concentración de extracto se obtuvo con diclorometano (Figura 14). Las medias de las muestras presentaron diferencias con la prueba de Friedman (Cuadro 1).



Figura 14. Promedio De Los Extractos.

Cuadro 1. Estadística descriptiva y análisis comparativo de los extractos.

	Extracto	Media+/- E.S.(mg)	Varianza	Friedman
Resina	Hexano	0.0018+/- 1.7X10 ⁻⁴	1.4X10 ⁻⁷	(Fr _{5,3} =10; p<0.05)
	Diclorometano	0.991+/- 6.6X10 ⁻²	2.2X10 ⁻²	
	Metanol	0.042+/- 5X10 ⁻³	1.2X10 ⁻⁴	

Análisis Preliminares

La resina de *Bursera fagaroides* en el análisis preliminar para los tres extractos resulto positiva en compuestos fenólicos (Figura 15), flavonoides (Figura 16) y terpenos (Figura 17). Para saponinas solo se utilizaron los extractos de diclorometano y metanol. En los cuales resulto positiva (Figura 18).

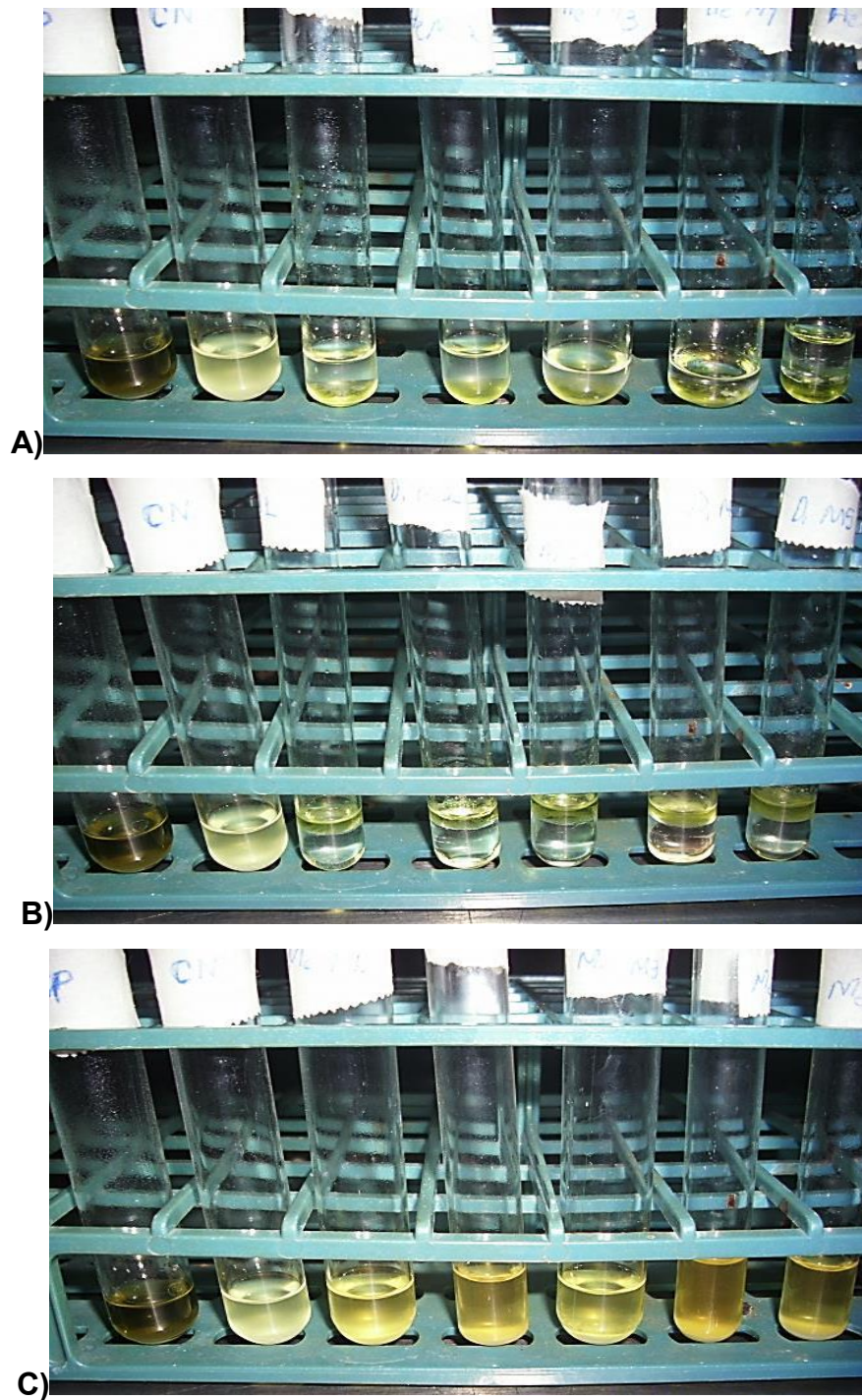


Figura 15. Prueba para ácidos fenólicos.
Control positivo lado izquierdo, control negativo y muestras.
A- hexano. B-diclorometano. C-metanol.

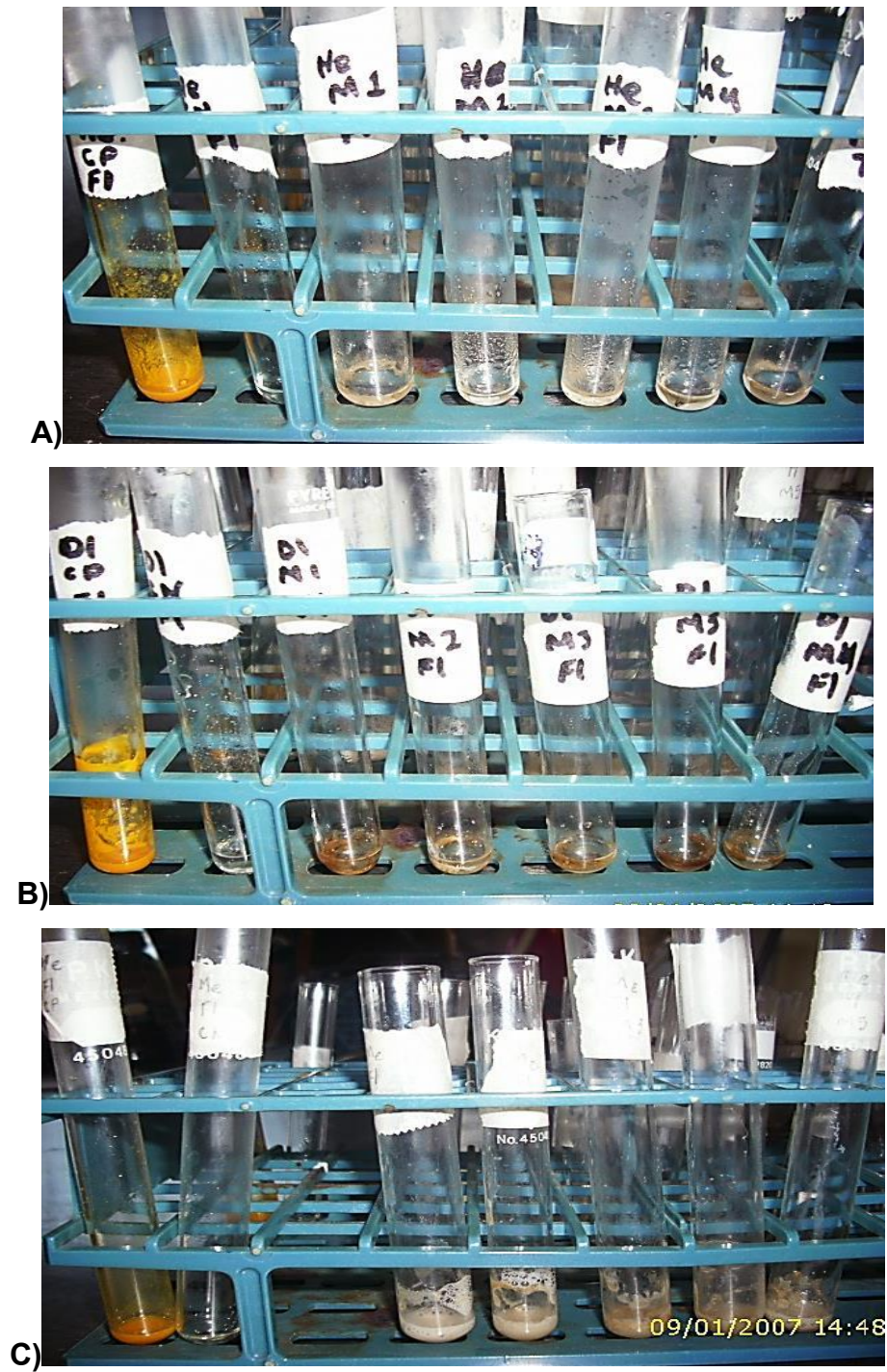
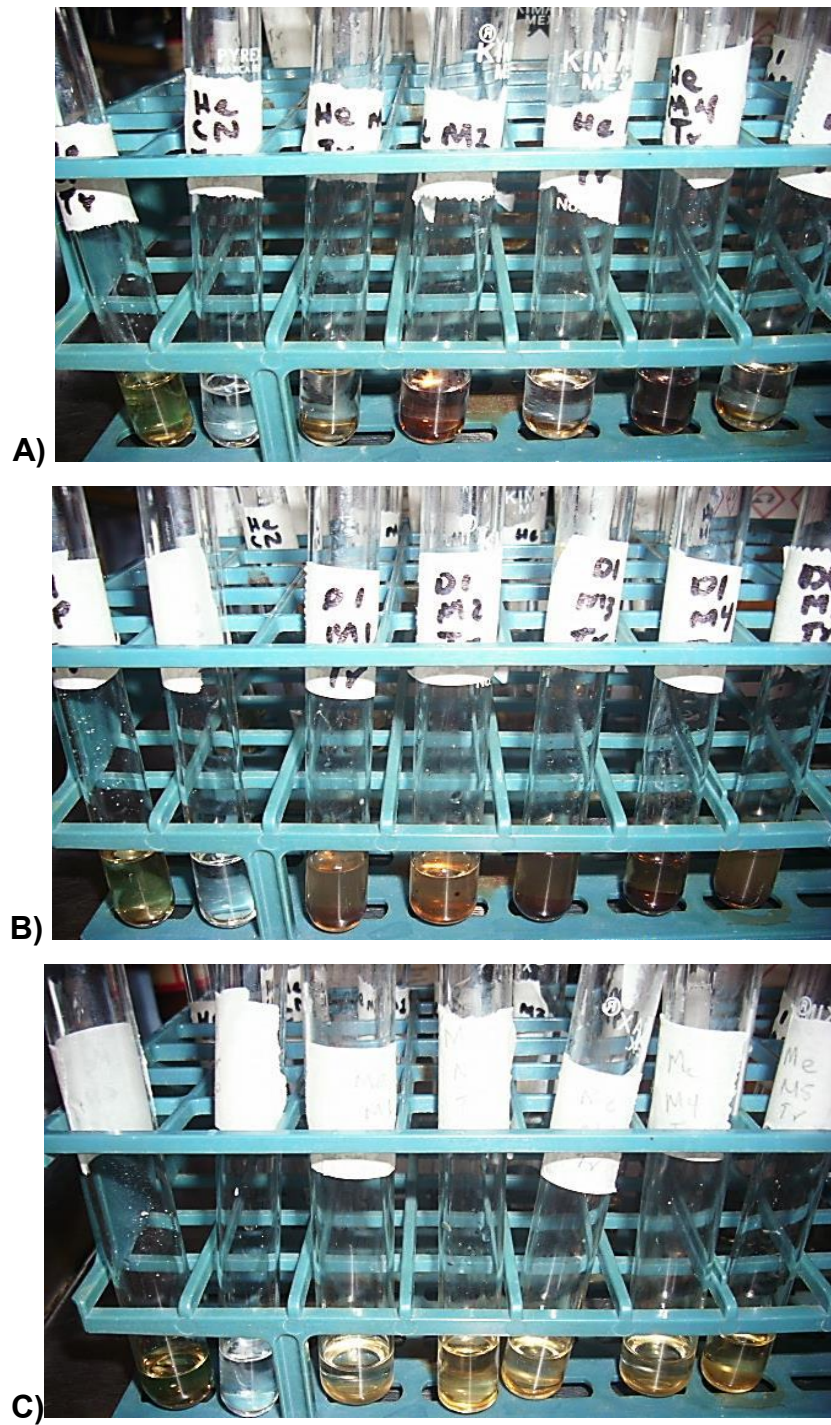


Figura 16. Prueba para flavonoides.
 Control positivo lado izquierdo, control negativo y muestras.
 A- hexano. B-diclorometano. C-metanol.



A)

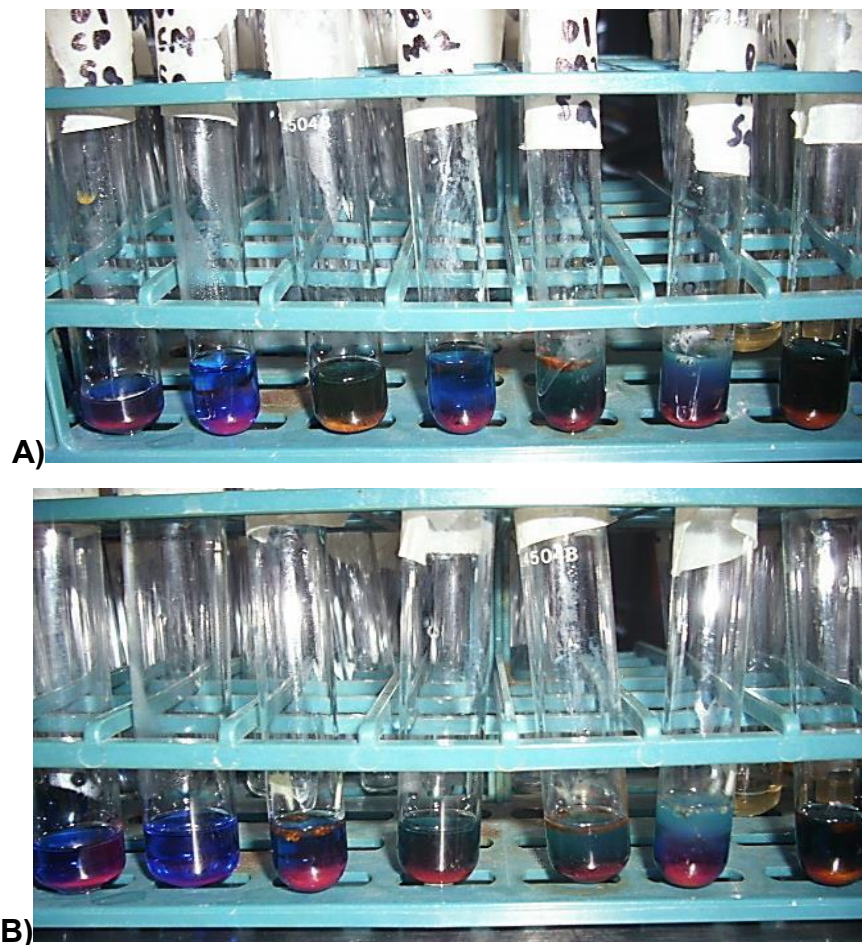
B)

C)

Figura 17. Prueba para terpenos.

Control positivo lado izquierdo, control negativo y muestras.

A- hexano. B-diclorometano. C-metanol.



A)

B)

Figura 18. Prueba para saponinas.

Control positivo lado izquierdo, control negativo y muestras.

A-diclorometano. B-metanol.

La resina de *Bursera fagaroides*, resultó negativa para alcaloides (Figura 19) y taninos (Figura 20) en el extracto de diclorometano y metanol.

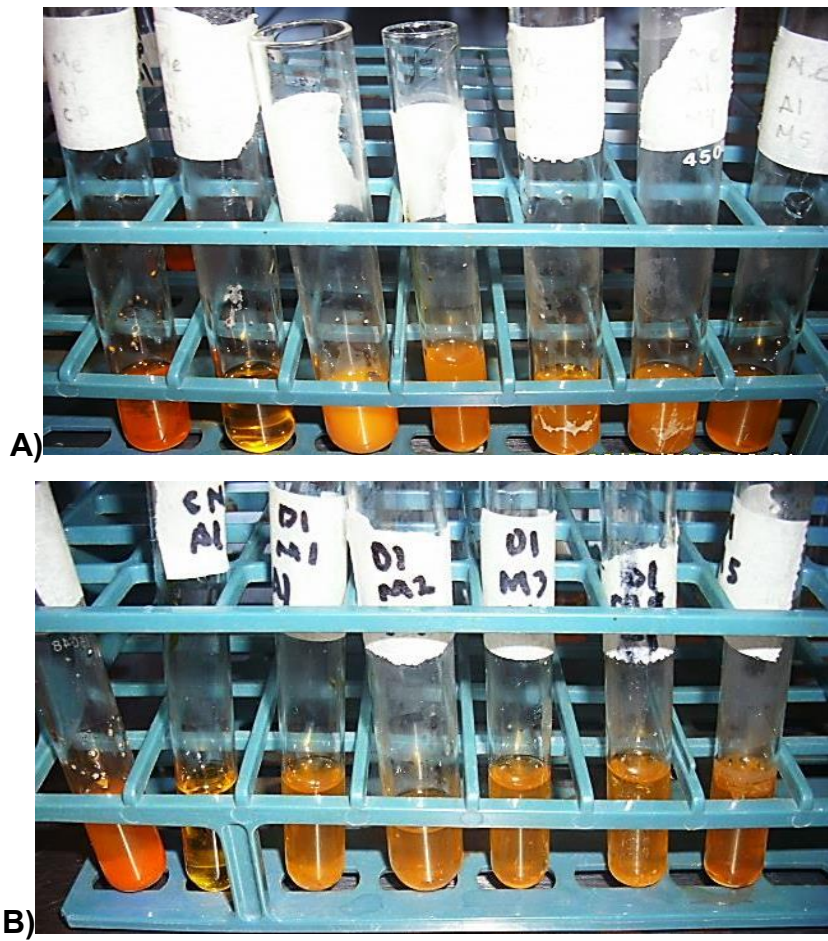


Figura 19. Prueba para alcaloides.
Control positivo lado izquierdo, control negativo y muestras.
A-diclorometano. B-metanol.



Figura 20. Prueba para taninos.

Control positivo lado izquierdo, control negativo y muestras.

A-diclorometano. B-metanol.

Los resultados del análisis colorimétrico preliminar fueron los siguientes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados preliminares.

Metabolito	Reactivo	Extracto	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Ácidos Fenólicos	Folin	Hexano	-	-	-	-	-
		Diclorometano	-	-	-	-	-
		Metanol	+	++	+	++	++
Flavonoides	HCL+ Mg ²⁺	Hexano					
		Diclorometano	-	-	-	-	-
		Metanol	+	+	+	++	++
Alcaloides	Dragendorff	Hexano					
		Diclorometano	-	-	-	-	-
		Metanol	-	-	-	-	-
Saponinas	Fehing S- A+B	Hexano					
		Diclorometano	+++	++	++	++	+++
		Metanol	++	++	++	++	+++
Taninos	FeCl ₃	Hexano					
		Diclorometano	-	-	-	-	-
		Metanol	-	-	-	-	-
Terpenos	Liebermann	Hexano	+	++	++	+++	++
		Diclorometano	++	+++	+++	+++	+++
		Metanol	++	++	++	++	++

Notación Positiva: +++ (alta), ++ (media), + (débil) y - (ausencia).

Cromatografía De Capa Fina

Se confirmó la presencia de los resultados positivos preliminares de ácidos fenólicos (Figura 21), flavonoides (Figura 22), terpenos y saponinas (Figura 23).

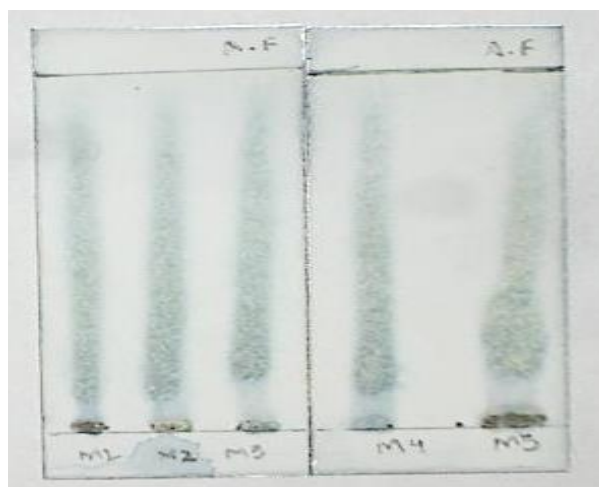


Figura 21. Cromatografía de capa fina (CCF) para ácidos fenólicos (extracto diclorometano).

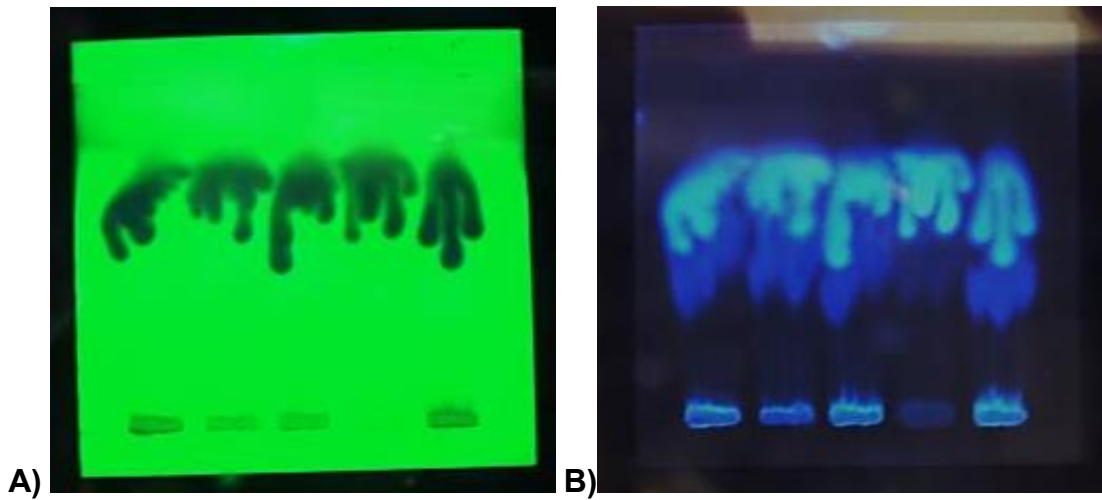


Figura 22. Cromatografía de capa fina (CCF) para flavonoides (extracto de metanol). Imagen A cámara de luz ultravioleta longitud de onda corta. Imagen B cámara de luz ultravioleta longitud de onda larga.

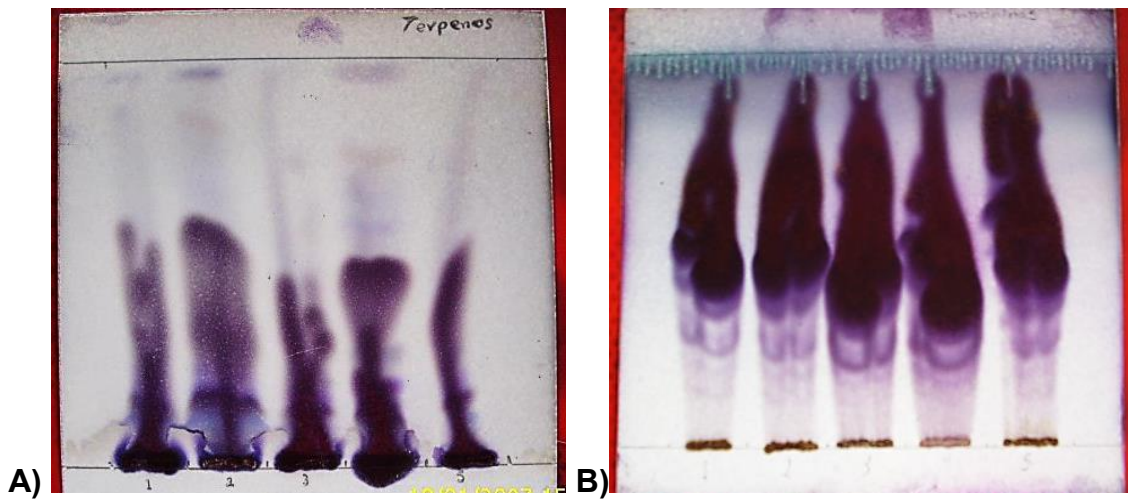


Figura 23. Cromatografía de capa fina (CCF) para terpenos imagen A y saponinas imagen B (extracto de diclorometano).

Cuantificación de Metabolitos Secundarios.

Se obtuvo una curva patrón favorable para la cuantificación de fenoles totales ($R^2=0.99$) (**ANEXO 5**). La media de la concentración de compuestos fenólicos fue de 19.86 mg/gr de resina (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estadística descriptiva de la concentración de ácidos fenólicos.

Muestra	Concentración De Ácidos Fenólicos (mg/gr)	Media+/-E.S.	Varianza
1	16.05	19.86+/-1.92	11.08
2	21.30		
3	22.23		

Se obtuvo una curva patrón favorable para la cuantificación de flavonoides ($R^2=0.99$) (**ANEXO 6**). La media de la concentración de flavonoides fue de 6.36 mg/gr de resina (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estadística descriptiva de la concentración de flavonoides.

Muestra	Concentración De Flavonoides (mg/gr)	Media+/-E.S.	Varianza
1	5.03	6.36+/-0.78	1.82
2	6.33		
3	7.73		

Se obtuvo una curva patrón favorable para la cuantificación de saponinas ($R^2=0.96$) (**ANEXO 7**). La media de la concentración de saponinas fue de 142.46 mg/gr de resina (Tabla 5)

Tabla 5: Estadística descriptiva de la concentración de saponinas.

Muestra	Concentración De Flavonoides (mg/gr)	Media+/-E.S.	Varianza
1	127.04	142.46+/-7.75	180.35
2	148.76		
3	151.58		

El porcentaje de compuestos fenólicos que engloban la presencia de flavonoides representan el 2% de los constituyentes de la resina mientras que las saponinas representan el 14%. Lo que significa que el otro 84% posiblemente sean carbohidratos y terpenos (Figura 25).

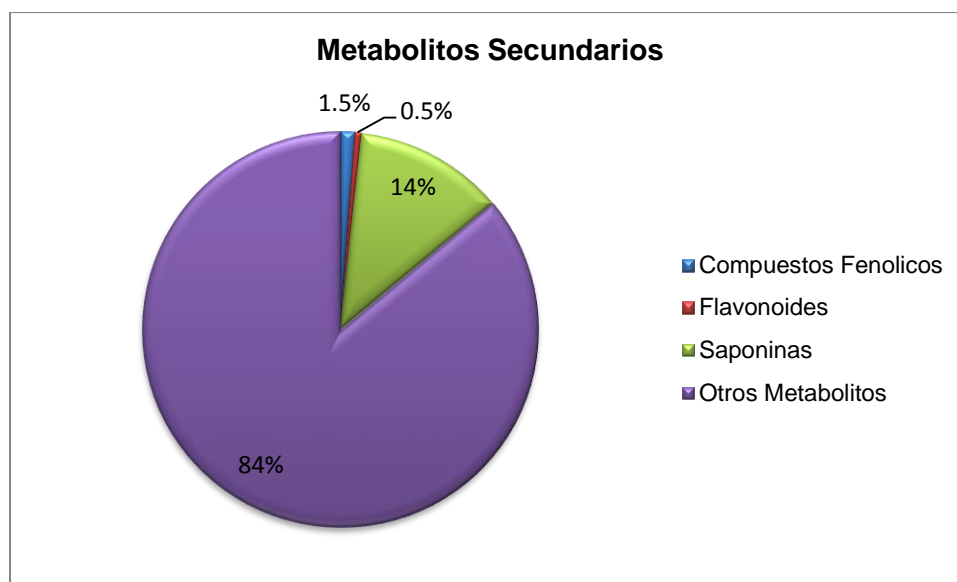


Figura 25. Porcentaje de la concentración de metabolitos por gr de resina.

Actividad Antioxidante

Se obtuvo una curva patrón favorable para trabajar las muestras de las resinas ($R^2=0.99$) (**ANEXO 8**). La concentración de DPPH inhibido menor fue de 1.34 y la más alta fue de 1.57 DPPH 0.1 mM. El menor porcentaje de DPPH inhibido fue del 20.87% y el mayor fue del 32%. El promedio para el CL50 (**ANEXO 9**) de la resina fue 8.73 mg/ml (Cuadro 6).

Tabla 7. Resultados obtenidos del análisis de actividad antioxidante.

Muestra	Concentración De DPPH inhibido 0.1 mM.	% De DPPH inhibido.	CL50	Promedio Del CL50
1	1.57	21.05	11.38	8.73
	1.54	23.08		
	1.53	22.77		
	1.47	26.10		
	1.46	26.74		
5	1.57	20.87	6.08	
	1.50	24.21		
	1.48	25.74		
	1.45	27.19		
	1.34	32.73		

Discusión

Los resultados denotaron que la resina de *Bursera fagaroides* es soluble en diclorometano. Esto es debido a que el mayor constituyente de la resina son terpenos (Langeheim, 2003) los cuales no son muy solubles en solventes polares próticos como agua y alcoholes, debido a que son derivados de lípidos (Nelson y Cox, 2005). Las saponinas y los compuestos fenólicos son solubles en solventes polares próticos, sin embargo probablemente las saponinas de las cuales está constituida también sean estructuras asociadas a triterpenos, y la concentración de flavonoides no sea un determinante de su polaridad (Nelson y Cox, 2005; Rodney *et al.*, 2000).

En el análisis preliminar junto con análisis de CCF se evidenció la presencia de terpenos, saponinas, ácidos fenólicos y flavonoides. Probablemente de los terpenos evidenciados en los análisis estén presentes monoterpenos como camfeno, limoneno, β -mirceno, β -felandreno, α -pinneno y β -pineno. Mientras que en sesquiterpenos estén α -bisalboleno, δ -candineno, β -cariofileno, γ -humuleno, α -cedreno, γ -muruleno y δ -sileno (Domínguez *et al.*, 1973). Algunos de los cuales han sido encontrados en las hojas de *Bursera fagaroides* (Noge y Becerra, 2009).

Los diterpenos podrían ser del tipo abietano, pimarano, labdano, clerodano y kaurano (Becerra *et al.*, 2001). Finalmente los triterpenos se relacionan con la presencia de saponinas (Rodney *et al.*, 2000; Wollenweber y Jay's, 1988; Wollenweber y Dietz, 1981) podrían ser del tipo lupano, ursano, oleanano y dammarano (Khalid, 1985). Los monoterpenos encontrados podrían ser útiles en la fabricación de compuestos aromáticos como perfumes. Los sesquiterpenos probablemente tengan propiedades antimicrobianas y antiherbívoros. Los diterpenos quizás puedan actuar como fitoalexinas al igual que los triterpenos sin embargo estos últimos también podrían ser útiles en la producción de compuestos esteroideos y toxinas (Rodney *et al.*, 2000).

Dentro de los compuestos fenólicos evidenciados se podrían encontrar fenilpropanoides como ácido cinámico, ácido benzoico y benzaldehído, fenol fenilatos como tetrahidrocannabinol, fenilpropanoides dimericos como ácido nordihidrogualeico al igual que alérgenos fenólicos como pentadecilcatecol y heptadecilcatecol (Khalid, 1985). Estos compuestos fenólicos probablemente sean útiles en investigaciones relacionadas con la respuesta inflamatoria (Rodney *et al.*, 2000). Existe la posibilidad de la presencia de lignanos como los encontrados en la resina *Bursera fagaroides* colectada en Oaxaca (Morales *et al.*, 2012). Con posibles propiedades antimicrobianas y anticancerígenas similares a las de los lignanos aislados en el extracto de la corteza de su tallo (Rojas *et al.*, 2012; Rosas *et al.*, 2008; Reynoso *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 1998). También es posible encontrar glicósidos derivados de flavonoides como los de *B. fagaroides var. elegans* (Hernández *et al.*, 2002) y curamidas (Khalid, 1985) aunque estas son representativas de flores y frutos (Rodney *et al.*, 2000). La presencia de saponinas es un dato que no se había reportado en la resina de *Bursera fagaroides* pero si en la resina de *Bursera simaruba* (Noriega *et al.*, 2010). La resina dio negativo para taninos y alcaloides pero esto es de esperarse porque los taninos aparecen más en frutos, mientras que los alcaloides aparecen en las hojas, semillas, flores y raíces (Rodney *et al.*, 2000). El factor de retención no se determinó debido a que la concentración de los metabolitos contenidas en las muestras y evidenciadas por la CCF se presentaron en altas concentraciones (Vargas, 2011). Se observó que el

16% de la resina son ácidos fenólicos, flavonoides y saponinas lo que nos llevaría a pesar que el otro 84% probablemente son terpenos siendo estos su mayor constituyente (Langeheim, 2003). La cantidad compuestos fenólicos y su actividad determinan la capacidad antioxidante, debido a que estos metabolitos pueden neutralizar especies reactivas al oxígeno (Zapata *et al.*, 2013). Utilizando 1mg/ml de la resina pura se obtuvo una CL50 promedio de 8.75 mg/ml. Un valor que se encuentra entre los reportados para frutos como banano (13.400 mg/ml) y naranja (5.40 mg/ml) que indican capacidades antioxidante bajas (Lim *et al.*, 2007), ya que capacidades antioxidantes altas se expresan en $\mu\text{g/ml}$ como la obtenida en las hojas de guanábana (*Annona muricata L.*) de 70 $\mu\text{g/ml}$ (Correa *et al.*, 2012). El potencial como recubrimiento orgánico de la resina de *Bursera fagaroides* probablemente se deba principalmente a la actividad de los compuestos fenólicos presentes en la misma, y su solubilidad en solventes polares (Zapata *et al.*, 2013), de tal forma que el solvente polar extrae estos compuestos de la resina creando una solución rica en los mismos, que se adapta a la polaridad de las capas cerosas de los diferentes frutos o verduras formando una biopelícula que permite el intercambio de gases (Cortes, 2014).

Conclusiones

La resina de *Bursera fagaroides* es soluble en solventes como diclorometano. Contiene metabolitos secundarios como saponinas, terpenos y compuestos fenólicos como flavonoides y posiblemente lignanos. El porcentaje de compuestos fenólicos y saponinas representa menos de una cuarta parte de los constituyentes de la resina y su capacidad antioxidante es baja.

Bibliografía

- **Becerra, Judith. Venable, D. Evans, P. y Bowers, S. (2001).** *Interactions between Chemical and Mechanical Defenses in the Plant Genus Bursera and Their Implications for Herbivores.* AMER. ZOOL., 41:865–876.
- **Bell, A. (1981).** The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products. Conn, E. *The Biochemistry of Plants: Secondary Plant Product*, pp. 1-19. Davis, California, Academic Press.
- **Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset. (1995).** *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.* Lebensmittel Wissenschaft and Technologies: 28 (1), 25-30.
- **Brown, S. (1981).** Coumarins. Conn, E. *The Biochemistry of Plants: Secondary Plant Product*, pp. 269-300. Davis, California, Academic Press.
- **Correa, J. Ortiz, D. Larrahondo, J. Sánchez, M y Pachón, H. (2012).** *Actividad antioxidante en guanábana (Annona muricata L.): una revisión bibliográfica.* Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 11 (2): 111 – 126.
- **Cortes, A. (2004).** *Mayor exposición de vida de anaquel de chile Capsicum pubescens mediante la aplicación un compuesto orgánico. (Tesis Para Obtener El Grado En Licenciada en Biología).* Benemérita Universidad Autónoma De Puebla, Laboratorio De Biología Vegetal.
- **Díaz, B. Baldomero, E. Hernández y M. Lotina, B. (2001)** Metabolitos Secundarios De Las Plantas Como Posibles Agentes Herbicidas. Bermen, I y Lora, H. *Avances En Bioquímica y Biología Molecular De Plantas*, pp. 111-135. México D. F. Facultad De Química UNAM.
- **Domínguez, A. Rendowski, J. Gutiérrez, M. y Gómez, M. (1973).** *A phytochemical survey of 21 species of the genus Bursera (Burseraceae) natives of Mexico.* Revista Latinoamericana de Química 4: 108–121.
- **Grisebach, H. (1981).** Lignins. Conn, E. *The Biochemistry of Plants: Secondary Plant Product*, pp. 457-478. Davis, California, Academic Press.
- **Hahlbrock, K. (1981).** Flavonoids. Conn, E. *The Biochemistry of Plants:*

- Secondary Plant Product*, pp. 425-456. Davis, California, Academic Press.
- Hernández, J. García, L. Hernández, A. Álvarez, R. y Román, L. (2002). *Glicósidos de luteolina y miricetina de Burseraceae*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46, 295–300.
 - Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. (2010). *Enciclopedia De Los Municipios y Delegaciones De México*. SEGOB Secretaría de Gobernación. <http://www.inafed.gob.mx/>.
 - Khalid, S. (1983). Chapter 10: Chemistry and Taxonomy of the Tales. *Chemistry of the Burseraceae*. Edited by Waterman and Grundon, Academic Press. London.
 - Lemos, R. (2008). *Flora Del Valle De Tehuacán-Cuicatlán*. México D. F. Departamento de Botánica Instituto de Biología, UNAM, p.p. 1-2, 35-37.
 - Lim, Y. Lim, T. y Tee J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *Food Chem*, 103: 1003 - 1008.
 - Langenheim, H. (2003). *Plant Resins: Chemistry, evolution, ecology and ethnobotany*. Timber Press Portland Oregón, p.p. 586.
 - Martínez, E. (1997). *Aislamiento y Caracterización De Metabolitos Secundarios De Bougainvillea glabra, CHOISY, (NYCTAGINACEAE); Leucophyllum frutescens, (RERL) I. M. JOHNST, (SCROPHULARIACEAE) y Eriobotrya japonica, LINSL (ROSACEAE)*. (Tesis Para Obtener El Grado en Maestría). Universidad De Nuevo León, Facultad De Ciencias Biológicas División De Estudios En Posgrado, México.
 - Morales, J. Cruz, E. García, E. Madrigal, D. Gaviño, R. Cárdenas, J. y Salmon, M. (2012). *Three new diarylbutane lignans from the resin of Bursera fagaroides*. *IFirst, Natural Product Research* 1-6.
 - Nelson, D. y Cox M. (2005). *Lehninge: Principios De Bioquímica*. Barcelona, Omega 4ta Edición p.p. 59-72, 73-96, 97-125, 255-283, 285-314, 315-339.
 - Noge, K. y Becerra, J. (2009). *Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus Bursera (Burseraceae)*. *Molecules*, 14, 5289–5297.
 - Noriega, O. Regalado, A. Ramírez, J y Báez, J. (2010). *Caracterización Físicoquímica del Exudado De Palo Mulato y su Potencial Como Adictivo en*

Alimentos. XII, CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Guanajuato, Gto.


- Pérez, P. Huacuja, L. Rodriguez, G. Lozoya, X. Zaitseva, G. y Villaseñor, M. (1998). Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytother. Res.* 12: 545-548.
- Purata, S. (2008). Uso y Manejo De Los Copales Aromáticos: resinas y aceites. CONABIO/RAISES, México pp.60.
- Reynoso, R. Delgado A., Casa J. Velázquez, S. y Puebla, A. (1998). *Polyamines as Biomarkers of the Antitumor activity of Bursera fagaroides*. *Interciencia*, (35)-5, pp 384-388.
- Rodney, C., Kutchan T. y Lewis N. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). Buchan, B., Gruiseem W. y Jones, R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp. 1251-1267. Rockville, EUA. American Society Plant Physiologist.
- Rojas, A. Mediante, M. Antúnez, M. Sales, E. Marquina, S. Villareal, M. Puebla, A. Delgado, J. y Álvarez, L. (2012). Cytotoxic Podophyllotoxin Type-Lignans from the Steam Bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*, (17) 9506-9519.
- Rosas, P. Arteaga, P. Reynoso, R. Villagómez, J. Sabanero, M. Puebla, A. y Calvo, C. (2008). *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*., *Experimental Parasitology* 119: 398–402.
- Trewavas, A. (2000). Signal Perception and Transduction. B., Gruiseem W. y Jones, R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp.930-987. Rockville, EUA. American Society Plant Physiologist.
- Vargas, J. (2011). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de Wigandia urens (HYDROPHYLLACEAE)*. (Tesis Para Obtener El Grado En Químico Industrial). Universidad Autónoma De México, Instituto De Química (México). Universidad Tecnológica De Pereira, Escuela De Química (Colombia).
- Waller, G. y Dermer, O. (1981). Enzymology of Alkaloid Metabolism in

Plants and Microorganisms. O. Conn, E. *The Biochemistry of Plants: Secondary Plant Product*, pp. 317-402. Davis, California, Academic Press.

- **Wiermann, R.** (1981). Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation. Conn, E. *The Biochemistry of Plants: Secondary Plant Product*, pp. 1-19.
- **Wollenweber, E., and V. H. Dietz.** (1981). *Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants*. *Phytochemistry* 20: 869–932.
- **Wollenweber, E., and M. Jay.** (1988). *Flavones and flavonols*. In: *The Flavonoids*, pp. 233–328, ed. J. B. Harborne. Chapman and Hall, London.
- **Zapata, K. Cortes, F. y Rojano, B.** (2013). Polifenoles y Actividad antioxidante del fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Información Tecnológica* 24(5): 103-112.

ANEXOS

Anexo 1: Datos de los árboles a los que se les colecto una muestra de resina

Muestra	Forma De Vida	Hora	Fecha	Coordenadas	Altitud (m)	Foto
1	Árbol	12:40 p.m.	13/08/2014	N18°46'31.8'' W098°08'36.2''	1715	
2	Árbol	1:00 p.m.	13/08/2014	N18°46'30.1'' W098°08'36.4''	1717	
3	Árbol	1:25 p.m.	13/08/2014	N18°46'29.9'' W098°08'36.6''	1718	
4	Árbol	1:45 p.m.	13/08/2014	N18°46'20.9'' W098°08'53.8''	1721	
5	Árbol	2:30 p.m.	13/08/2014	N18°46'18.8'' W098°08'55.4''	1775	

Anexo 2: Mono y sesquiterpenos aislados en las hojas de 5 especies de *Bursera*

Compound	t_R (min) ^a	ID ^b	Composition (%) ^c				
			<i>B. copallifera</i>	<i>B. excelsa</i>	<i>B. mirandae</i>	<i>B. rutilcola</i>	<i>B. fagaroides</i> var. <i>purpusii</i>
α -Thujene	7.65	2	0.2	–	–	5.3	–
α -Pinene	7.81	1	0.7	1.6	6.6	10.3	67.8
Camphene	8.15	2	–	–	–	1.2	1.2
Sabinene	8.53	2	–	–	–	2.8	1.2
β -Pinene	8.65	1	–	4.7	–	21.9	5.7
β -Myrcene	8.76	1	–	–	0.5	–	2.0
α -Phellandrene	9.13	1	0.3	1.2	15.0	–	–
<i>p</i> -Cymene	9.44	1	–	–	0.6	–	–
Limonene	9.52	1	–	–	–	0.4	0.9
β -Phellandrene	9.56	1	–	–	1.9	2.0	0.2
β -Ocimene	9.75	1	–	4.9	–	–	–
Sesquiterpene	14.21	3	–	2.6	–	–	–
α -Copaene	14.80	1	1.7	–	2.7	–	–
Sesquiterpene	14.94	3	1.7	6.4	0.7	0.5	–
β -Caryophyllene	15.43	1	9.6	15.0	14.4	18.3	4.3
α -Humulene	15.88	1	12.5	0.7	0.5	0.6	–
Sesquiterpene	15.93	3	0.4	–	0.5	–	–
Sesquiterpene	16.05	3	1.5	0.7	–	–	–
Germacrene D	16.18	1	56.2	50.5	36.6	31.9	15.1
Bicyclogermacrene	16.36	2	6.2	8.8	1.2	0.7	0.8
Sesquiterpene	16.55	3	2.4	–	–	1.2	–
Sesquiterpene	16.57	3	–	1.5	2.7	–	–
Sesquiterpene	17.33	3	1.0	1.3	–	0.6	–
Sesquiterpene	18.06	3	1.4	–	–	0.5	–
Sesquiterpene	18.27	3	–	–	–	1.0	–
Unknown	25.95	4	–	–	2.6	–	–
Unknown	26.58	4	–	–	–	0.9	–
Monoterpenes			1.2	12.4	24.6	43.9	79.0
Sesquiterpenes			94.6	87.5	59.3	55.3	20.2

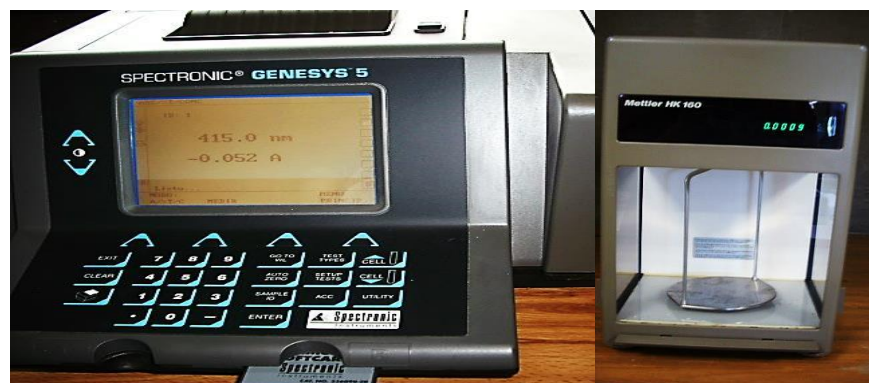
^a Retention times are based on GC-FID analysis with DB-5MS capillary column; ^b Method of identification: 1, matching GC retention time and mass spectrum with an authentic standard; 2, mass spectral matching with a library spectrum; 3, interpretation of the mass spectrum; 4, unidentified; ^c Percentages are based on GC peak area. Percentages higher than 10% are bolded. –, Not detected.

Anexo 3: Equipo utilizado en el laboratorio



Cámara De Luz Ultravioleta

Estufa De Secado



Espectrofotómetro

Balanza Analítica



Vortex

Centrifuga

Anexo 4: Preparación de algunas soluciones no descritas

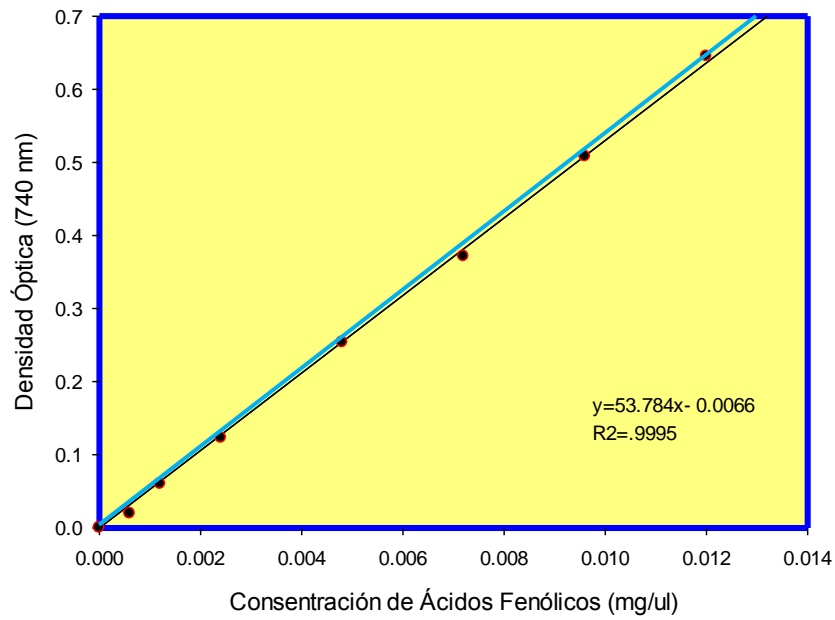
Para Saponinas:

Solución A: 6.4 gr de Sulfato De Cobre en 50 ml agua.

Solución B: Para 500 ml de agua se disuelven 176 gr de Tartrato Sódico Potásico y 77 gr de NaOH.

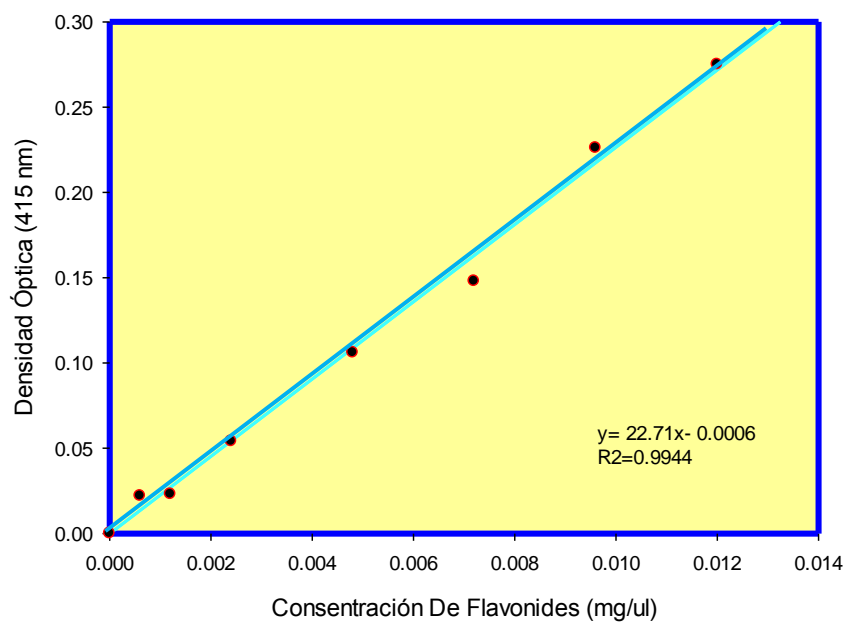
Anexo 5: Datos de la curva patrón de ácidos fenólicos

Muestra	Contenido (µl) De La Muestra	Densidad Óptica (740 nm)-UDO	Concentración De Ácidos Fenólicos (mg/µl)
1	0	0	0
2	25	0.019	0.0006
3	50	0.060	0.0012
4	100	0.123	0.0024
5	200	0.253	0.0048
6	300	0.371	0.0072
7	400	0.508	0.0096
8	500	0.645	0.012



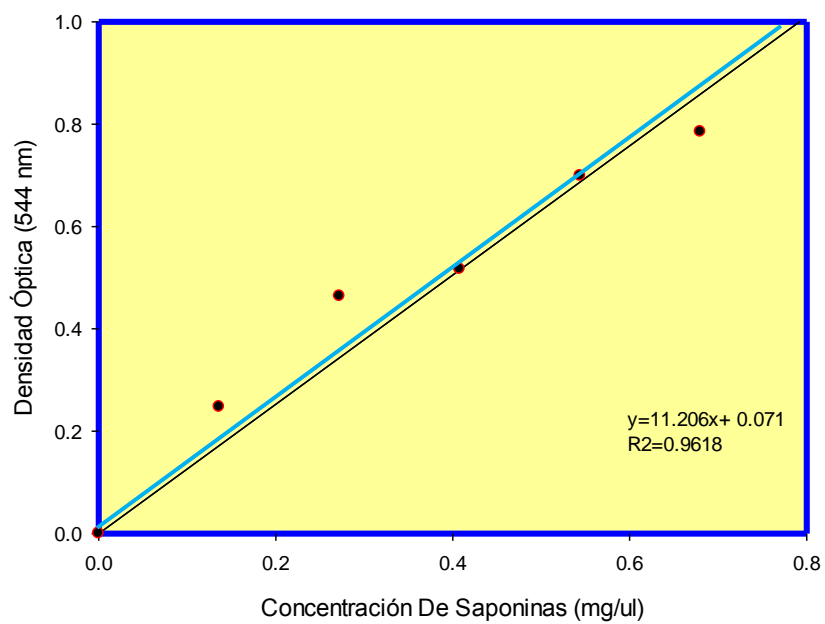
Anexo 6: Datos de la curva patrón de flavonoides

Muestra	Contenido (µl) De La Muestra	Densidad Óptica (415 nm)-UDO	Concentración De Flavonoides (mg/µl)
1	0	0	0
2	25	0.022	0.0006
3	50	0.023	0.0012
4	100	0.054	0.0024
5	200	0.106	0.0048
6	300	0.148	0.0072
7	400	0.226	0.0096
8	500	0.275	0.012



Anexo 7: Datos de la curva patrón de saponinas

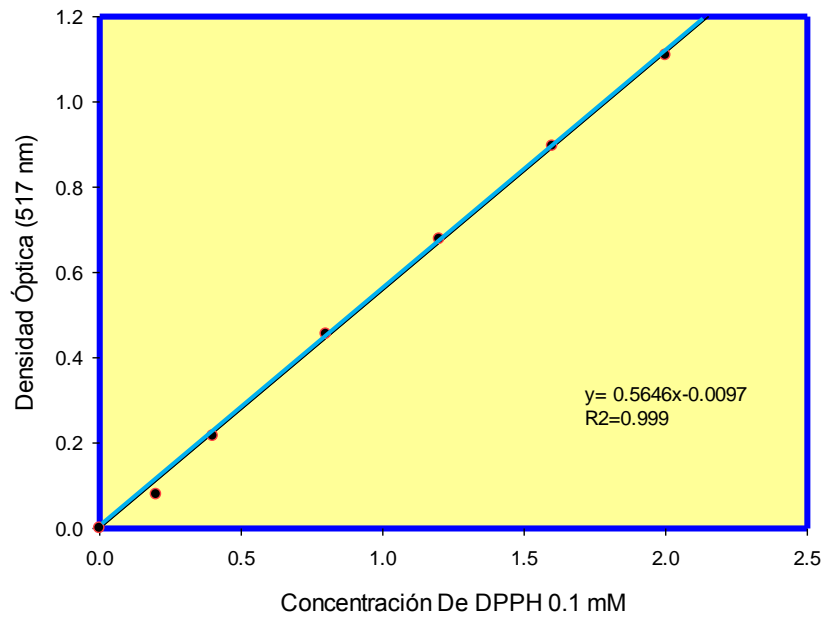
Muestra	Contenido (µl) De La Muestra	(544 nm)-UDO	Concentración De Saponinas (mg/ µl)
1	0	0	0
2	20	0.247	0.0136
3	40	0.464	0.0272
4	60	0.517	0.0408
5	80	0.699	0.0544
6	100	0.785	0.068



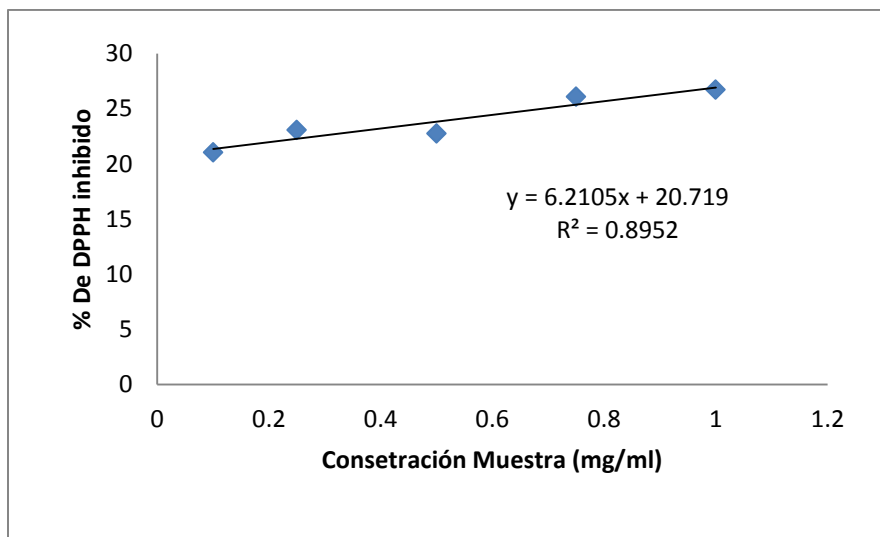
Anexo 8: Datos de la curva patrón para la determinación de la actividad antioxidante

DPPH 0.1 mM	Densidad Óptica(517 nm)
0	0
.2	0.079
.4	0.216
.8	0.455
1.2	0.678
1.6	0.896

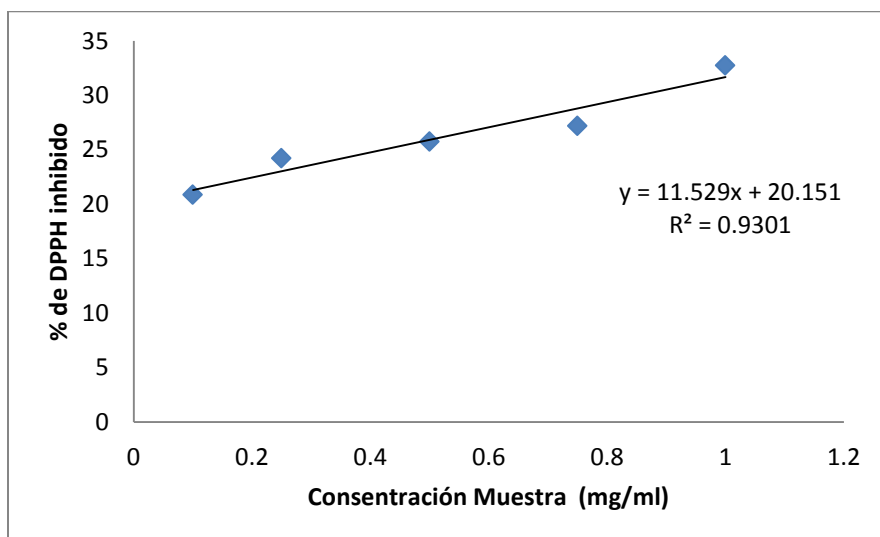
2	1.109
---	-------



Anexo 9: Curvas patrón para la determinación del CL50



Muestra 1



Muestra 4