



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

"ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN TEMPORAL
DE LOS PRINCIPALES METABOLITOS
SECUNDARIOS PRESENTES EN
Bursera morelensis (Ramirez)"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA

ERICK NOLASCO ONTIVEROS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES



Tlalnepantla, Estado de México, Agosto, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente y permitirme ser parte de la gran comunidad que la integra.
- A la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** por convertirse en mi nuevo hogar.
- A mi tutora **Dra. Ana María García Bores** por todo el apoyo y confianza que deposito en mí para realizar este proyecto.
- Al **Dr. Guillermo Avila Acevedo** por todos los consejos y ayuda recibidos.
- A la **Dra. Patricia Guevara Fefer** por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.
- Al **M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero** por el apoyo técnico proporcionado para la realización de este proyecto.
- Al **M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla** por su invaluable ayuda la cual me permitió realizar gran parte de este trabajo.
- Al apoyo financiero proporcionado por el proyecto **PAPCA-FES IZTACALA 2013/55**.

Dedicatorias

Este trabajo va dedicado de manera muy especial a las siguientes personas.

A mi abuelito **Marcelino Ontiveros Cruz** (21 de Marzo de 1946- 21 de Junio de 2009) por enseñarme que nunca hay que rendirse no importa que es lo que la vida te ponga enfrente.

A mis padres **Virginia y Germán** por enseñarme de la tenacidad, de la responsabilidad y de la honestidad y porque gracias a ellos puedo contemplar cada día las maravillas de este mundo; gracias por ayudarme a conseguir esta meta y a todo el esfuerzo que realizaron para que lo lográramos.

A mis hermanos **Irene y Jesús** por las alegrías que me regalan cada día sin ustedes la vida no tendría tantos colores.

A la **Dra. Ana María García Bores** porque además de ser mi tutora nunca olvidaré el invaluable regalo de su amistad y toda la sabiduría y conocimiento que compartió conmigo durante mi estancia en el laboratorio.

Al **Dr. Guillermo Avila Acevedo** por compartir su inagotable entusiasmo y conocimiento y por inspirarme (aunque aún me falta) a usar la imaginación para impulsar la búsqueda del conocimiento.

A la **Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado y al Dr. Elías Piedra Ibarra** por acompañarme y guiarme en uno de los momentos más cruciales de mi vida.

A **Montserrat** y sus espartanos (Miguel y Bruno).

A mis brothers **Wisburg, Rodrigo y René** ¡¡¡¡finalmente lo logre !!!!!.

A **Ariel, Rosa y Carlos** por ser tan generosos y por brindarme su amistad estos años.

Finalmente a todos los compañeros con los que tuve el gusto de trabajar en ese laboratorio tan genial que es Fitoquímica: **Diana, Ceci, Rocío, Marisol, Sebastián, Griselda y Aurora** gracias por compartir su amistad, consejos, alegría y conocimiento.

**"Sólo podemos progresar y desarrollarnos si
admitimos que no somos perfectos y vivimos de
acuerdo con esta verdad"**

Ray Bradbury

Índice general

Índice general.....	V
Índice de tablas.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Abreviaturas utilizadas.....	VIII
	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	4
• El metabolismo secundario en las plantas.....	4
• Género <i>Bursera</i>	8
• Descripción botánica.....	9
• Usos tradicionales.....	10
• <i>Bursera morelensis</i>	12
• Antecedentes sobre trabajos fitoquímicos sobre el género <i>Bursera</i> y la especie <i>Bursera morelensis</i>	15
Justificación.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Estrategia metodológica.....	21
Etapas 1. Obtención y caracterización química preliminar de los extractos	22
Recolecta del material vegetal.....	22
Obtención de extractos.....	22
Pruebas de detección de metabolitos secundarios.....	23
Etapas 2. Análisis de la variación temporal de los extractos de corteza , rama y hoja	24
Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).....	24
Etapas 3. Identificación y aislamiento de los compuestos presentes en los extractos de corteza	26
Fraccionamiento de los extractos de corteza.....	26
Análisis por CG-EM.....	26
Análisis por HPLC.....	27
Resonancia magnética nuclear (RMN ¹ H) (RMN ¹³ C).....	29
Espectrometría con infrarrojo (IR).....	29
Resultados y discusión etapa 1	31
Datos de herbario de <i>B. morelensis</i>	31
Rendimiento de los extractos.....	31
Pruebas de detección de metabolitos.....	32
Etapas 2 Análisis de la variación de compuestos en extractos crudos	33
Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).....	33
CG-EM (extractos hexánicos).....	44
Etapas 3. Identificación y aislamiento de compuestos (Extractos de corteza)	49
Fraccionamiento cromatográfico de los extractos de corteza de <i>B. morelensis</i>	49
CG-EM (Extracto hexánico de corteza).....	50
HPLC (Extractos acetónicos de corteza).....	53
Análisis espectroscópico de los precipitados de los extractos ACS1, ACS2 y MCS1.....	57
Resonancia magnética nuclear (RMN ¹ H y RMN ¹³ C).....	57
Espectroscopia con infrarrojo (IR).....	64

Conclusiones.....	65
Referencias.....	66
Anexos.....	72

Índice de tablas

Tabla 1	Ubicación taxonómica de <i>Bursera morelensis</i>	14
Tabla 2	Antecedentes de trabajos relacionados a la fitoquímica del género <i>Bursera</i>	15
Tabla 3	Lista de los extractos obtenidos de <i>B. morelensis</i>	23
Tabla 4	Pruebas de detección de los principales grupos de metabolitos secundarios.....	24
Tabla 5	Datos de herbario de <i>Bursera morelensis</i> Ramírez.....	31
Tabla 6	Peso del material seco de las diferentes partes recolectas de <i>B. morelensis</i>	31
Tabla 7	Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración.....	32
Tabla 8	Familias de compuestos presentes en <i>B. morelensis</i>	32
Tabla 9	Principales terpenos identificados en los extractos hexánicos de <i>B. morelensis</i>	44
Tabla 10	Principales ácidos grasos identificados en el extracto hexánico de <i>B. morelensis</i>	46
Tabla 11	Principales terpenos identificados en el extracto hexánico de corteza de <i>B. morelensis</i>	50
Tabla 12	Principales triterpenos y fitosteroles identificados en los extractos de corteza de <i>B. morelensis</i>	51
Tabla 13	Principales ácidos grasos identificados en los extractos hexánicos de rama y hoja de <i>B. morelensis</i>	51
Tabla 14	Fraciones analizadas por medio de cromatografía de líquidos de alta eficacia.....	53
Tabla 15	Tiempos de retención (min) de los principales constituyentes de las fracciones de la cromatografía en columna de los extractos ACS1 y ACS2.....	54
Tabla 16	Precipitados aislados de los extractos de ACS1, ACS2 y MCS1 de <i>B. morelensis</i>	56
Tabla 17	Espectro de RMN ¹ H del precipitado obtenido del extracto ACS1.....	57
Tabla 18	Espectro de RMN ¹³ C del precipitado obtenido del extracto ACS1.....	58
Tabla 19	Bandas de absorción en infrarrojo del precipitado ACS2.....	62
Tabla 20	Bandas de absorción en infrarrojo del precipitado MCS1.....	63

Índice de figuras

Fig.1	Rutas de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios.....	7
Fig.2	Distribución geográfica del género <i>Bursera</i>	8
Fig.3	Principales zonas de distribución del género <i>Bursera</i> en México.....	9
Fig.4	Usos artesanales del género <i>Bursera</i>	10
Fig.5	<i>Bursera morelensis</i> Ramírez.....	13
Fig.6	<i>Bursera morelensis</i> Ramírez ejemplar de herbario.....	14
Fig.7	Algunos compuestos identificados en el género <i>Bursera</i>	17
Fig.8	Estrategia metodológica.....	21
Fig.9	Ubicación de la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla.....	22
Fig.10	Cromatogramas de los extractos hexánicos.....	34
Fig.11	Cromatogramas de los extractos acetónicos perfil de terpenos.....	35
Fig.12	Cromatogramas de los extractos acetónicos perfil para flavonoides.....	36
Fig.13	Cromatogramas de los extractos metanólicos 365 nm.....	37
Fig.14	Cromatogramas de los extractos metanólicos 264 nm.....	38
Fig.15	Variación de compuestos en extractos metanólicos de corteza.....	39
Fig.16	Variación de compuestos en extractos metanólicos de rama.....	40
Fig.17	Variación de compuestos en extractos metanólicos de hoja.....	41
Fig.18	Principales terpenos identificados en los extractos hexánicos de hoja y rama.....	45
Fig.19	Principales ácidos grasos identificados en los extractos hexánicos de hoja y rama.....	47
Fig.20	Espectro de RMN de ¹ H del precipitado obtenido del extracto acetónico de corteza de la primera recolecta.....	59
Fig.21	Espectro de RMN de ¹³ C del precipitado obtenido del extracto ACS1.....	60
Fig.22	Espectro infrarrojo del precipitado obtenido del extracto MCS1.....	62
Fig.23	Espectro infrarrojo del precipitado obtenido del extracto ACS2.....	63

Abreviaturas utilizadas

AcOEt	Acetato de etilo
cc	Cromatografía en columna abierta
ccf	Cromatografía de capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DM	Diclorometano
EP	Éter de petróleo
HPLC	High performance liquid chromatography, cromatografía de líquidos de alta resolución
HPTLC	High performance thin layer chromatography, cromatografía de capa fina de alta resolución
IR	Infrarrojo
LB	Reactivo de Lieberman-Buchard
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPN	Revelador de productos naturales
sh	Shoulder u hombro. Termino que se refiere una inflexión en el espectro de luz UV o visible.
UV	Ultravioleta

Resumen

Los organismos del género *Bursera* son reconocidos por presentar amplia distribución y diversidad en México. Representan un componente dominante de la vegetación de diversos ecosistemas aunque se distribuyen principalmente en los bosques tropicales sub y caducifolios de la cuenca del Pacífico Mexicano. Son recursos muy importantes para numerosas comunidades debido a la gran cantidad de propiedades que presentan entre las que destacan las antiinflamatorias, antipiréticas además de que su madera es utilizada como material de construcción y para la fabricación de artesanías. *Bursera morelensis* es un ejemplo de lo anterior, aunque las investigaciones enfocadas en la fitoquímica de esta especie son escasas. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de ésta especie por medio de la identificación y el análisis de la variación temporal de los principales metabolitos secundarios que produce. Para cumplir con este objetivo se realizaron cuatro recolectas en la localidad de San Rafael Coxcatlán Puebla en los meses de febrero, marzo, agosto y septiembre de 2011 de las cuales se obtuvieron corteza, ramas y hojas. El material recolectado se sometió a un proceso de secado seguido de maceraciones usando solventes de polaridad ascendente, con lo cual se obtuvieron un total de 21 extractos. Posteriormente, los extractos fueron sometidos a pruebas de detección para las principales familias de metabolitos secundarios por este medio se logró corroborar la presencia de terpenos, triterpenos, fitoesteroles y flavonoides. Los resultados del análisis de la variación temporal de la producción de compuestos de las diferentes partes recolectadas de *B. morelensis* por medio de las técnicas de HPTLC, CG-EM y HPLC indican que existen variaciones significativas en la producción de metabolitos presentándose dos picos máximos uno de ellos en el mes de marzo (época de sequía) y el segundo en el mes de septiembre (época de lluvias). El análisis de la composición química de los extractos de *B. morelensis* se realizó utilizando técnicas como la CG-EM con la cual se identificaron los principales compuestos de los cuales destaca la presencia del óxido de cariofileno como el principal metabolito secundario presente en los extractos hexánicos de rama y hoja. El análisis del extracto de corteza fraccionado por medio de cromatografía en columna también aportó información sobre la existencia de fitoesteroles como el β -sitosterol y el campesterol. En el caso de los extractos acetónicos estos fueron sometidos a un análisis por medio de la técnica de HPLC, los resultados indican que los extractos acetónicos son ricos en compuestos de tipo flavonoide lo cual corrobora reportes realizados en otras especies del género. Por último, el fraccionamiento de los extractos de corteza de las polaridades con las que se trabajo permito el aislamiento de 3 precipitados con puntos de fusión superiores a 300°C. En el caso del primer precipitado analizado por RMN se dedujo que es un triterpeno derivado del oleanano. Los otros dos precipitados fueron sometidos a análisis por espectroscopia infrarroja, con estos resultados se pudo deducir que el precipitado obtenido del extracto ACS1 es una mezcla constituida principalmente por ácidos grasos mientras que el precipitado obtenido del extracto MCS1 es una mezcla constituida en su mayoría por flavonas y flavanonas. Por último los resultados obtenidos de las técnicas de HPTLC, CG-EM y HPLC muestran que existen variaciones significativas en cuanto a los compuestos producidos así como en la concentración de éstos siendo los extractos de la segunda recolecta de la época de sequía y de la época de lluvias los que mayor diversidad y concentración de metabolitos secundarios presentaron de todos los extractos analizados en este estudio.

Introducción

El metabolismo secundario implica la producción de una gran variedad de compuestos que las plantas sintetizan en respuesta a diferentes condiciones a las cuales están expuestas en su hábitat. Dentro de éstas podemos encontrar las de tipo biótico: el ataque de herbívoros, fitoparásitos, la competencia con otras especies vegetales, o bien pueden servir para atraer polinizadores y/o dispersores de semillas; y abióticos: el exceso de radiación solar, la desecación derivada de altas temperaturas, el exceso de lluvias o el estrés mecánico entre otros factores (Schupp, 1995).

México se encuentra entre los 10 países con mayor biodiversidad del planeta; en un territorio de casi 2 millones de Km² alberga una gran cantidad de especies. Un ejemplo de esto lo encontramos en la diversidad de flora que posee. Hasta el momento se han encontrado cerca de 22,000 especies de plantas vasculares, esto representa cerca del 10% del total reportado hasta la fecha. Aunado a lo anterior, el país presenta un elevado número de endemismos, se han reportado cerca de 219 géneros de plantas vasculares con esta característica. A pesar de la gran biodiversidad de nuestro país, existe un profundo desconocimiento sobre muchas de las características moleculares, fisiológicas y químicas que permiten a estos organismos tal diversificación y distribución (Llorente-Bousquet y Ocegueda, 2008).

Las condiciones ambientales y las regiones florísticas mexicanas son producto de la posición geográfica de nuestro territorio y el relieve (Fernández, 1999). Un ejemplo de esto lo tenemos en la reserva del Valle de Tehuacán-Cuicatlán en el estado de Puebla y en concreto en la localidad de San Rafael municipio de Coxcatlán (Rzedowski, 1978).

Los organismos del género *Bursera* son parte representativa del paisaje florístico mexicano se han reportado al menos 80 especies en el país aunque se cree que pueden existir 100 especies. Estas plantas se han conocido desde la época prehispánica por sus propiedades aromáticas, medicinales y por su madera que es utilizada con fines artesanales (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2004) aunque cabe resaltar que a pesar de su importancia ecológica y social son pocos los estudios dirigidos a estudiar la fitoquímica de este género y la mayoría de estos trabajos se concentran en unas pocas especies.

B. morelensis es conocida como mulato, cuajote o palo rojo. Aunque existen reportes de los grupos de metabolitos secundarios que produce el género, los trabajos sobre esta especie son escasos. Estas plantas son conocidas por ser productoras de metabolitos tales como terpenos y diversos tipos de fenilpropanoides los cuales son constituyentes de sus resinas y existen en grandes acumulaciones en partes como la corteza (Ledesma 2009); poco se sabe sobre el comportamiento en la producción de éstos y su variabilidad en respuesta a las condiciones a las cuales están expuestas en su medio. Por lo cual este trabajo se centra en el análisis de la variación en la producción de estos metabolitos con el fin de aportar información sobre la biología de la especie así como incentivar el interés sobre esta y otras especies del género para así ahondar en el conocimiento de este importante grupo de organismos.

Antecedentes

El metabolismo secundario en las plantas.

A lo largo de la historia evolutiva de las plantas han estado sometidas a una gran cantidad de factores de estrés, tanto bióticos como abióticos. Sin embargo aún con todas estas presiones ambientales son escasos los lugares en el mundo donde no se encuentren este tipo de organismos (Dey y Harborne, 1997).

Para hacer frente a las condiciones de estrés las plantas presentan adaptaciones morfo-anatómicas (presencia de espinas en plantas desérticas, engrosamiento de corteza), fisiológicas (reducción de la evapotranspiración en las horas de mayor temperatura del día) y bioquímicas que incluyen tanto el metabolismo primario y como secundario (Dey y Harborne, 1997).

El metabolismo secundario se define como la síntesis de compuestos de bajo peso molecular los cuales cumplen con roles ecológicos muy específicos en las plantas. Debido a esto, la producción de estos compuestos puede estar restringida solamente a algunas estructuras (hojas, cortezas, raíces, flores, semillas) y en algunos casos se sintetizan en todo el organismo presentando variaciones dependiendo de la etapa de desarrollo del mismo (Heldt, 1997).

Principales familias de metabolitos secundarios

Si bien la diversidad de metabolitos secundarios producidos por las plantas es enorme estos se clasifican en tres grupos principales basados en sus rutas de biogénesis y sus características estructurales (Figura 1):

Terpenos: Los terpenos que incluyen compuestos producidos por el metabolismo primario y secundario se sintetizan a partir del isopentenil difosfato y se conocen más de 25000 metabolitos de este tipo. Los terpenos se pueden clasificar de acuerdo al número unidades de isopreno de los que están formados (Croteau *et al*, 2000):

1.- Monoterpenos: (C-10). Formados por dos unidades de isopreno. Compuestos volátiles y aromáticos presentan funciones alelopáticas y antibióticas actuando principalmente sobre bacterias, funcionan también como atractores de polinizadores (Romo de Vivar, 1985).

2.- Sesquiterpenos (C-15). Formados por tres unidades de isopreno. Compuestos volátiles los cuales forman parte de los aceites esenciales junto a los monoterpenos, presentan funciones antimicrobianas, y antilalimentarias. Algunos de ellos afectan el desarrollo de ciertas especies de insectos, impidiendo su crecimiento o metamorfosis (Harborne, 1991).

3.- Diterpenos (C-20). Formados por cuatro unidades de isopreno. Grupo de compuestos formados por ciclización del geranil geraniol. Presentan diversos tipos de actividades biológicas entre las más importantes se encuentran: la actividad reguladora del crecimiento vegetal y la actividad citotóxica de los diterpenos con esqueleto base de taxano (Romo de Vivar, 1985).

4.-Triterpenos (C-30). Formados por 6 unidades de isopreno. Existen al menos cuatro tipos de triterpenos: los de cadena abierta, tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos. Entre las actividades biológicas que presentan estos compuestos podemos citar las anti alimentarias y de antiherbivoría (Harborne, 1991).

5.-Politerpenos (C-n) Formados por más de 8 unidades de isopreno. Estos compuestos funcionan como pigmentos accesorios esenciales para la fotosíntesis (carotenoides) también forman parte de algunas resinas como es el caso del hule y la gutapercha (Romo de Vivar, 1985; Croteau *et al*, 2000).

Alcaloides: Estos compuestos se caracterizan por la presencia de átomos de nitrógeno en su estructura. Son sintetizados principalmente a partir de aminoácidos y bases nitrogenadas, el número de compuestos identificados supera los 12000. Cerca del 20 % de las plantas con flores producen alcaloides y cada una de estas especies acumulan estos compuestos en formas muy específicas (Croteau *et al*, 2000).

Los alcaloides presentan un amplio rango de actividades biológicas tales como efectos fisiológicos sobre animales herbívoros o sus propiedades antibióticas. Algunos de ellos son tóxicos para los insectos como ejemplo de esto tenemos a la nicotina uno de los primeros insecticidas conocidos por el hombre (Croteau *et al*, 2000).

Fenilpropanoides y derivados de la ruta del fenilpropano-acetato: Las plantas tuvieron su origen en el ambiente acuático. Su exitosa adaptación al medio terrestre se debe a la producción de una gran cantidad de compuestos fenólicos. Sin embargo, la mayoría de estas sustancias además de asumir roles estructurales en las paredes celulares de las plantas también presentan una gran variedad de funciones no

estructurales entre los que se encuentran los de defensa química contra fitoparásitos como los nemátodos y protozoos, proporcionan color a las flores y contribuyen substancialmente a proporcionar sabor y olor a los frutos. Los compuestos fenólicos a menudo presentan en su estructura uno o más grupos hidroxilo unido a un anillo aromático (Croteau *et al*, 2000). Entre los principales tipos de compuestos fenólicos se encuentran los siguientes:

Lignans. Relacionados muy estrechamente a las ligninas, los lignanos pueden polimerizar formando desde dímeros hasta grandes oligómeros. Además, proporcionan protección a las plantas ya que presentan actividad contra diversos patógenos, actúan como antioxidantes en diferentes estructuras como flores, cortezas, raíces, y semillas. (Croteau *et al*, 2000).

Algunos lignanos han sido estudiados por presentar actividades de interés terapéutico tal es el caso de la podofilotoxina así como sus derivados los cuales son ampliamente utilizados en las quimioterapias contra el cáncer (Gottlieb y Yoshida, 1989).

Cumarinas. Estos compuestos son sintetizados por las plantas como medio de defensa ante el ataque de bacterias y hongos, además de ser inhibidores de la germinación de otras plantas (Croteau *et al*, 2000).

Flavonoides. Comprenden un amplio grupo de compuestos sobrepasando más de 4500 de estas sustancias identificadas, entre las cuales encontramos a sus diferentes subclases: las antocianinas, (pigmentos) protoantocianidinas, y taninos condensados (disuasorios de la alimentación, y protección en cortezas) y las isoflavonas (metabolitos de defensa y señalización) (Croteau *et al*, 2000), flavonas, flavonoles y flavanonas los cuales funcionan como atractores de insectos polinizadores y protegen del ataque de virus y hongos (Arias 2001). Los flavonoides también juegan un rol determinante ante factores como la radiación UV o el estrés oxidativo (Gould y Lister, 2006).

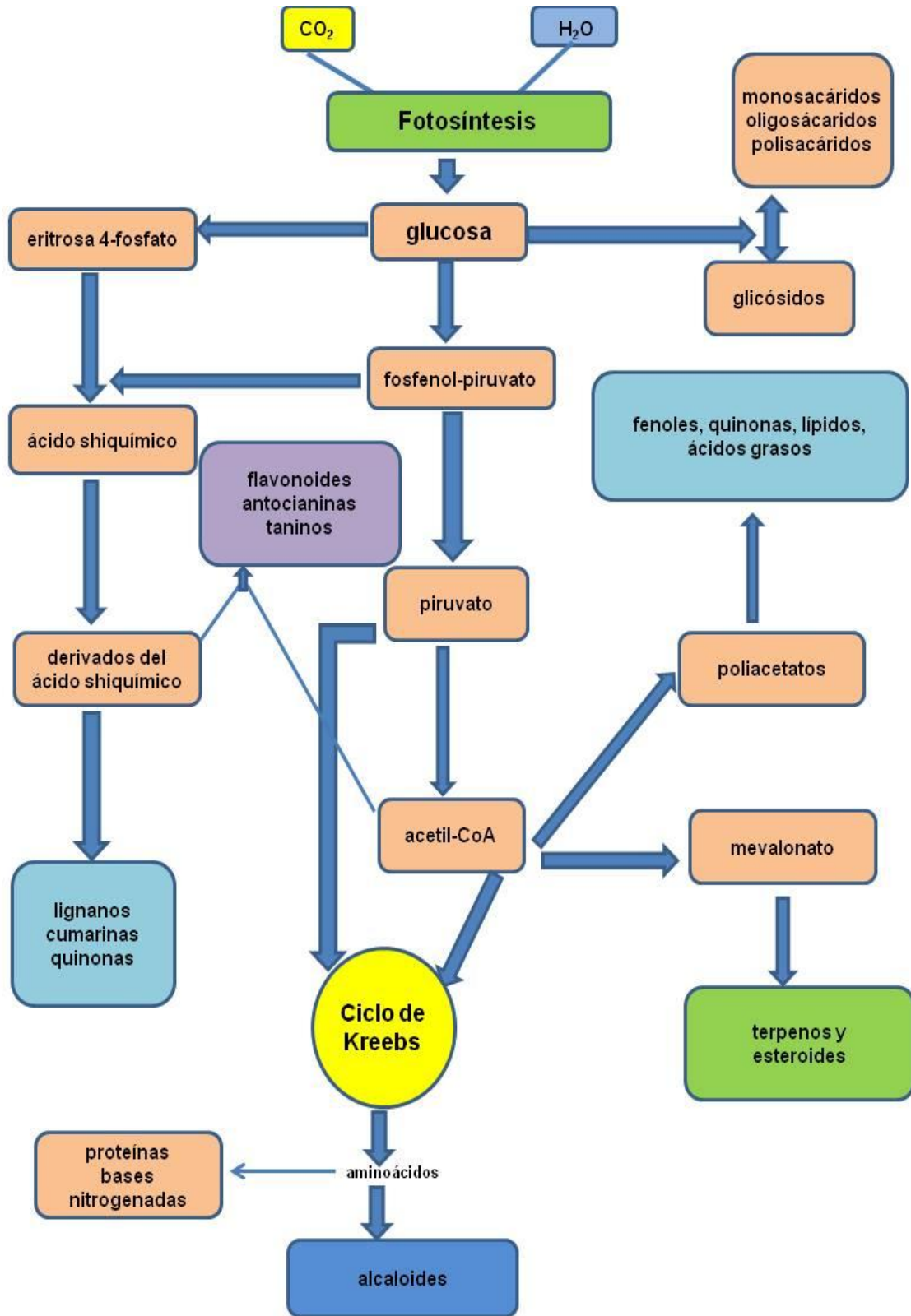


Fig. 1 Rutas de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios (modificado de Ikan, 2008).

Género *Bursera* Jacq.ex L*

El género *Bursera* pertenece a la familia *Burseraceae* la cual está conformada por alrededor de 18 géneros y 600 especies en el mundo, su distribución es pantropical, principalmente en América y África con algunos representantes en Malasia. Los géneros más diversos de esta familia son: *Bursera* con 100 especies, *Cannarium* con 77, *Commiphora* con 190 y *Protium* con 80 especies. En América se pueden encontrar 9 géneros y 240 especies. En México existen 3 géneros y 110 especies (Medina-Lemos, 2008).

El género *Bursera* es un grupo monofilético estrechamente relacionado con *Commiphora*. Las filogenias recientes corroboran la monofilia del género y su división en dos secciones *Bursera* (cuajotes) y *Bullockia* (copales) (Becerra y Venable 1999; Becerra 2003).

Distribución

La distribución geográfica del género *Bursera* se limita a las zonas cálidas del continente Americano. Esta comprende una amplia zona que va desde el suroeste y sudeste de los Estados Unidos hasta el norte de Brasil y Perú. Tiene dos centros de diversidad, el principal en México y uno secundario en las Antillas (Figura 2). Nuestro país alberga 80 especies de las cuales 70 son endémicas, aunque se estima que pudiera alcanzar el centenar de especies (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2004).



Fig. 2 Distribución geográfica del género *Bursera* en el continente americano (Becerril 2009).

La mayor parte de las especies de *Bursera* habitan en el bosque tropical caducifolio de México. En estos bosques las burseras son dominantes del estrato arbóreo, junto con algunas especies de leguminosas. Sólo unas pocas especies son arbustos y generalmente habitan en el matorral xerófilo (Rzedowski 1986).

En México podemos encontrar representantes del género en prácticamente todos los estados excepto en Tlaxcala (Reguera, 2011); sin embargo, la mayor diversidad de especies se localiza en la vertiente del Pacífico principalmente en la cuenca del Balsas (Figura, 3).



Fig. 3 Principales zonas de distribución del género *Bursera* en México (Peter *et al*, 2003).

Descripción botánica del género *Bursera*

Las plantas que integran el género *Bursera* son en su mayoría arboles de con estaturas generalmente entre los 4 y 13 m aunque pueden encontrarse ejemplares de hasta 30 m, la copa es más ancha que alta. Todos contienen oleorresinas volátiles intensamente aromáticas. Pierden sus hojas en la época seca del año y por lo general son dióicas aunque se han registrado poblaciones polígamo-dióicas y aun hermafroditas en algunas especies (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2004).

Hojas

Las hojas de las especies del género *Bursera* suelen ser imparipinnadas, en rosetas sobre el ápice de los braquiblastos, no pocas veces el número de folíolos se reduce a tres o solo uno (Medina-Lemos, 2008).

Usos tradicionales del género *Bursera*.

El uso de estas especies está profundamente arraigado en una buena cantidad de pueblos indígenas del centro de país. Este conocimiento data de la época prehispánica donde ya se usaba la resina de estas plantas con diferentes propósitos los cuales se enumeran a continuación:

Adhesivos.

Un análisis reciente de los mosaicos Mexicas/Mixtecos, que posee el museo Británico fue incluido en un estudio analítico de las resinas, las cuales fueron usadas para su construcción. Estas resinas fueron utilizadas como adhesivo primario en objetos tales como las teselas que conformaban los mosaicos. Posteriores análisis espectrométricos reevaluaron la presencia de compuestos como diterpenos y triterpenos como el lupeol y la α -amirina (Stacey y Cartwright, 2005) (Figura 4).

Actualmente los artesanos mexicanos utilizan diversas resinas, como adhesivos para la pintura de sus artesanías. Incluso los muralistas mexicanos como Gerardo Carrillo y Diego Rivera utilizaron este material como adhesivo para la pintura de sus murales. Rivera fue el último muralista que utilizó copal, una muestra de esto lo tenemos en su obra llamada "la Creación" que está ubicada en el palacio de San Idelfonso de la capital mexicana (De la Cruz *et al*, 2005) (Figura 4).



Fig. 4 Serpiente de dos cabezas hecha con turquesa y conchas azteca/mixteca (Stacey y Cartwright, 2005). Mural la creación eucarística Diego Rivera Colegio de San Idelfonso (Foto: Pedro Cuevas. AFMT, IIE-UNAM.)

Inciensos

El copal es conocido como el incienso tradicional en México. La palabra copal deriva del vocablo náhuatl "*copalli*" y en la región maya se le conoce con el nombre de *poom*. Grandes cantidades de este fueron utilizadas en las ceremonias rituales. Este uso está bien documentado en los códices mixtecos. En el código Mendocino se menciona que una gran cantidad de copal era pagada a los mexicas como tributo cada 80 días por los señoríos mixtecos de Tlachco y Tepecuicuilco Además de esto, el copal también era utilizado en ofrendas como las encontradas en el templo mayor de Tenochtitlán en forma de cilindros así como los recipientes de cerámica hallados en el cenote sagrado de Chichen Itzá (Stacey y Cartwrigh, 2005).

Artesanías.

Algunas especies del género *Bursera* además de los usos descritos anteriormente son utilizadas en la fabricación de artesanías, tales como alebrijes y cajas de madera principalmente en la localidad de Olinálá Guerrero. Por su aroma y textura la madera de la especie *B. linaloe* y otras especies es apreciada para elaborar estas artesanías aunque en tiempos recientes, la madera "calada" es difícil de conseguir por lo que los artesanos utilizan la madera de otros copales, aunque esto deriva en cajas de menor calidad (Juárez, 2008).

Usos terapéuticos

Actualmente se considera que al inhalar el humo de la resina o tomarla en forma de té, ayuda a aliviar enfermedades respiratorias. El humo también es utilizado para purificar casas y personas, para pedir salud y bienestar o simplemente porque a la gente le agrada el aroma (Purata, 2008).

El aceite de copal es utilizado en la aromaterapia para tratar ciertas enfermedades, debido a que tienen efectos sobre el sistema límbico. Los copales no sólo son quemados en sahumeros, también en algunos casos la resina se usa en té para la bronquitis o se aplica localmente como cataplasma para la tos y las reumas (Purata, 2008).

***Bursera morelensis* Ramírez**

Descripción botánica

Nombres comunes: Colorado, palo mulato, xixote, cuajote, aceitillo, palo colorado.

Las plantas de la especie *B. morelensis* son árboles dióicos con una altura máxima de 13 m, con abundante resina aceitosa con olor a trementina en la corteza y hojas. El tronco alcanza los 40 cm de diámetro su corteza externa es de color rojo intenso y exfoliante desprendiéndose en láminas papiráceas delgadas (Figura 5). Las hojas son imparipinnadas con una longitud que va de 5 a 11 cm de largo y de 1.5 a 4.5 cm de ancho. El peciolo es acanalado de 1 a 2 cm de largo con raquis con alas inconspícuas, los folíolos pueden ser sésiles o sub-sésiles, linear oblongos o linear lanceolados, de 7 a 22 mm de largo y de 1.4 a 2.5 mm de ancho, disminuyendo de tamaño hacia los extremos de la hoja. El ápice es agudo margen entero la nervadura es central conspicua, la lateral poco marcada. Los catafilos inconspicuos, caedizos. Las flores masculinas se encuentran en inflorescencia, racimosas o paniculadas hasta de 5 cm de largo, provistas de bractéolas filiformes o sublobuladas caedizas (Rzedowski y Guevara, 1992). Las flores en su gran mayoría son pentámeras algunas veces trímeras o tetrámeras, con lóbulos de cáliz angostamente triangulares, de 0.7 a 1.3 mm de largo agudos, en el ápice, pétalos amarillentos verdosos o blanquecinos oblongos o lanceolados de 3 a 6 mm de largo, 10 estambres, anteras oblongas de 1.5 a 2 mm de largo. Las flores femeninas son comúnmente solitarias, a veces en pares o en una panícula corta por lo general trímeras a veces algunas de trímeras o pentámeras similares en forma y tamaño a las masculinas, anteras de los estaminoídos de 1 mm de largo ovario trilocular, pedúnculo en fruto notablemente engrosados y encorvados, "drupa" trivalvada oblicuamente ovoide de 5 a 10 mm de largo y de 4 a 6 de ancho, más o menos pronunciadamente apiculada o el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo amarillo (Rzedowski y Guevara, 1992).

B. morelensis es un componente dominante del bosque tropical caducifolio. Aunque también es frecuente encontrarlo en zonas de matorral xerófilo, donde forma bosquetes o se presenta en forma aislada, sobre todo en laderas de pendiente pronunciada, de cañadas profundas, preferentemente con exposición al sur (Rzedowski y Guevara, 1992).

Estas plantas pueden encontrarse en un rango de altitud que va de los 600 a los 1500 msnm. Florece de abril a junio, permanece con follaje del mes de mayo hasta noviembre. La especie es muy común en la parte oriental de la depresión del Balsas, sobre todo en

los estados de México, Morelos, Puebla y Guerrero. En Oaxaca se extiende hacia los valles de los ríos Tehuantepec y Papaloapan. También aparece en forma dispersa en cañones de muchos de los afluentes del Pánuco de los estados de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Rzedowski y Guevara, 2004).

Usos

B. morelensis se utiliza como cercas vivas, su textura y dureza la hacen adecuada para la fabricación de juguetes pequeños y cajas. La infusión de la corteza se utiliza como remedio para enfermedades venéreas (Abundiz *et al*, 2004). En la localidad de San Rafael Coxcatlán, *B. morelensis* junto con otras especies del género *Bursera*, son utilizadas como cicatrizantes, además de servir como remedio contra erupciones cutáneas e infecciones en la lengua (Canales *et al*, 2005).



Fig. 5 *Bursera morelensis* Ramírez. El tronco presenta la característica coloración rojo intenso, corteza exfoliante en láminas pequeñas.

Ubicación taxonómica.

En la tabla 1 se encuentra la información taxonómica de la especie *B. morelensis* así como el ejemplar de herbario (Figura 6).

Tabla 1. Información taxonómica de *B. morelensis*.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Burseraceae
Género	<i>Bursera</i>
Epíteto específico	<i>morelensis</i>
Nombre común	Cuajote rojo, aceitillo

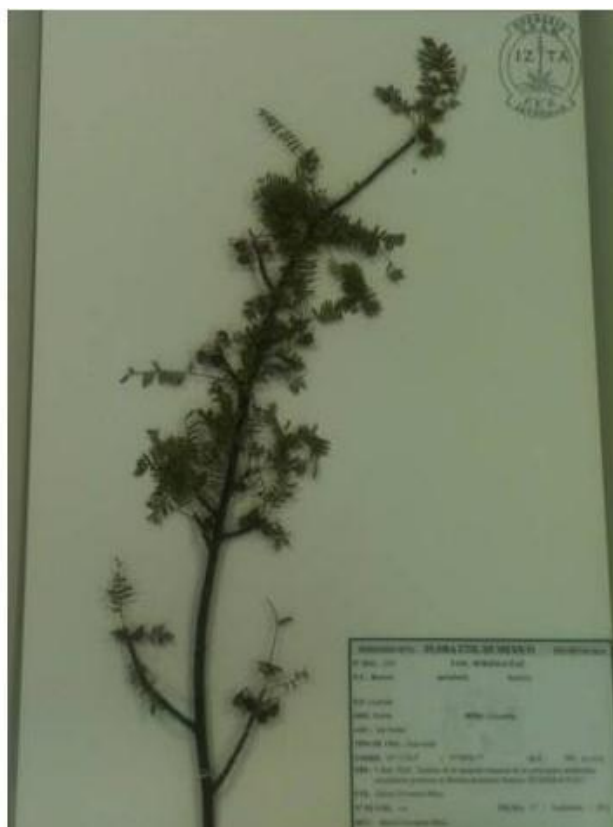


Fig. 6 Ejemplar de herbario de *Bursera morelensis* Ramírez.

Antecedentes de trabajos fitoquímicos en el género *Bursera* y la especie *B. morelensis*

Aunque los trabajos sobre *B. morelensis* son escasos, existe una diversidad de investigaciones enfocadas en la búsqueda de metabolitos con actividades biológicas de interés, basados en los conocimientos etnobotánicos de las especies del género. Estos reportes se han centrado principalmente en los compuestos aislados de la corteza y las resinas, que es lo que más se utilizan para la elaboración de remedios (Tabla 2)(Figura 7).

Tabla 2. Investigaciones realizadas con algunas especies del género *Bursera*.

Especie	Compuestos identificados o aislados	Actividad biológica	Referencia
<i>B. aloexylon</i>	Linalol	Antibacteriana	Queiroga <i>et al</i> , 2007
<i>B. fagaroides</i>	Liganos relacionados con la podofilotoxina	Citotóxicos, Antitumorales	Velazquez <i>et al</i> , 2011
<i>B. fagaroides</i>	Extracto etanólico	Aniparasitaria / Citotóxico	Rosas <i>et al</i> , 2008
<i>B. fagaroides</i>	Extracto etanólico	Citotóxico	Puebla <i>et al</i> , 1998
<i>B. grandifolia</i> Eng	Ácido hexadecanóico, Ácido dodecanóico	Antialimentaria <i>Spodoptera frugiperda</i>	Salgado, 2009
<i>B. schechlentaii</i> Engler	Camfeno, α -felandreno, α -pineno	Anitmicrobiana	Espinosa, 2012
<i>B. simaruba</i>	α - metil pentatina.	Antiinflamatorios	Nogera <i>et al</i> , 2004

Especie	Compuestos identificados o aislados	Actividad biológica	Referencia
<i>B. simaruba</i>	Yateina, β -peltatina-O-b-D-glucopiranosido,	Antitumorales	Maldini <i>et al</i> , 2009
<i>B. suntui</i>	Derivados oxigenados del verticileno	Antitumorales	García <i>et al</i> , 2008
<i>B. tonkinensis</i>	40-demetildesoxipodofilotoxina	Citotóxicos	Jutiviboonsuk <i>et al</i> , 2005
<i>B. schlechtendaii</i> Engler	Limoneno, camfeno, α -felandreno, α -pineno, β -pineno	Antimicrobiana	Espinosa, 2012
<i>B. delepechiana</i>	3 β -acetoxi-11a, 12a-epoxirus-28, 13-ólida y 3 β -acetoxi-12 β -hidroxiris-28,13 ólida	Sin evaluar	Symasundar y Mallavarapu, 1995
<i>B. simaruba</i>	β -amirina, epi-lupeol, α -amirina	Antimicrobiana	Vences, 2012
<i>B. copallifera</i>, <i>B. lancifolia</i> y <i>B. vejar vazquezii</i>	Flavonoides y terpenos	Antialimentaria	Reguera, 2011
<i>B. arida</i>	β -felandreno, α -careno, β -tujeno, α -felandreno, limoneno	Antimicrobiana	Rojas, 2012
<i>B. graveolens</i>	Monoterpenos	Sin evaluar	Yukawa <i>et al</i> , 2006

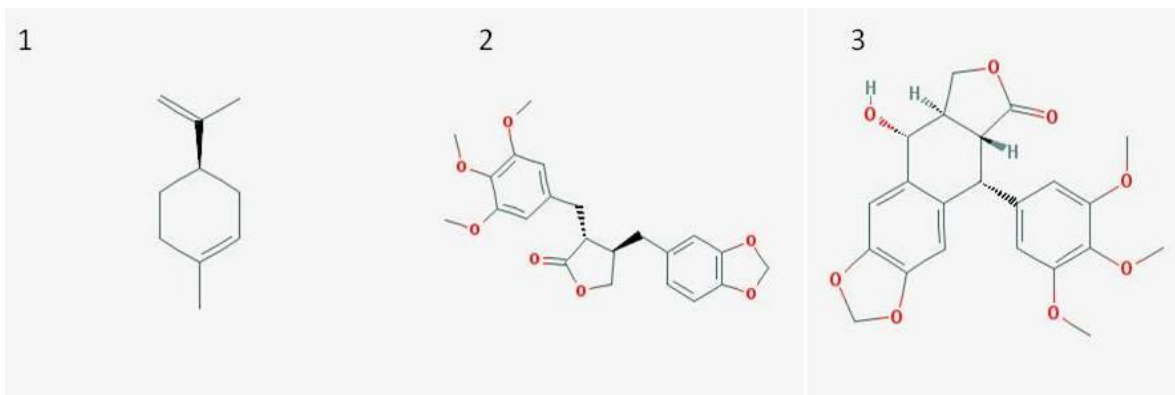


Fig. 7. Algunos compuestos identificados en especies del género *Bursera*. 1. Limoneno, 2. Yateina, 3. Podofilotoxina.

A pesar de la elevada diversidad de especies del género *Bursera* y de que se cuenta con diversos estudios donde se han descrito sus principales grupos de metabolitos, hasta el momento son pocos los trabajos realizados con *B. morelensis*. De estos, la mayoría se han centrado en la obtención de compuestos con actividad terapéutica.

- Jolad *et al* (1977) aislaron y caracterizaron dos líganos con actividad citotóxica, la deoxipodofilotoxina y la 5' demetoxideoxipodofilotoxina (morelensina), del extracto etanólico de corteza de *B. morelensis* las cuales mostraron actividad biológica en dos líneas celulares la P-388 de leucemia linfocítica (PS) y del carcinoma humano epidermoide nasofaríngeo (KB).
- Rzedowski y Ortiz en 1988 realizaron un estudio quimiotaxónomico de tres especies de *Bursera* en la barranca de Tolantongo Hidalgo. En este estudio se describe a *B. medranoana* como híbrido de *B. schlenchtendaii* Eng y *B. morelensis*, dadas sus características morfológicas así como por su producción de terpenoides
- López en 2011 realizó una caracterización del aceite esencial de las ramas de *B. morelensis*, el cual está constituido principalmente por los monoterpenos α y β felandreno además de realizarse la evaluación de la actividad bactericida y fungicida. Los resultados de este estudio señalan que el aceite esencial de rama de *B. morelensis*, presenta actividad bactericida frente a *Vibrio cholerae* y fungicida frente a las especies *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia lilacina*.

- Serrano en 2013 realizó un estudio para evaluar el efecto cicatrizante del extracto metanólico de corteza de *B. morelensis*. Dicho extracto además presenta actividad antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antibiótica, contiene lignanos, flavonoides y taninos.
- Rodríguez en 2014, realizó un estudio para evaluar la actividad amebicida del extracto metanólico de tres especies del género *Bursera*, reportando que el extracto de *B. morelensis* presenta actividad, frente a la especie *Naegleria fowleri*.

Justificación

Aun cuando existen diversos trabajos relacionados con el metabolismo secundario y los compuestos derivados de este proceso bioquímico en las plantas muchos de estos se encuentran enfocados en la obtención de compuestos químicos de interés terapéutico e industrial. Sin embargo aún son pocos los estudios centrados en la ecología química de muchas de las especies que se encuentran en el territorio nacional.

Ejemplo de esto es *B. morelensis* especie endémica de México con amplia distribución en el centro del país. Un caso representativo de esto es la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla. Esta región, por sus características climáticas, orográficas y bióticas representa un ambiente en el cual solo especies con características morfológicas y bioquímicas particulares pueden prosperar.

Además, *B. morelensis* es un recurso valioso para los habitantes de la localidad, por su potencial terapéutico. Hasta el momento los pocos estudios realizados a esta especie solo se han enfocado en grupos específicos de metabolitos secundarios tales como monoterpenos, lignanos y taninos los cuales se han identificado en la corteza y ramas la mayoría de estos estudios se han realizado con el objetivo de identificar y/o aislar compuestos con actividad biológica de interés terapéutico.

Es importante resaltar la importancia de este trabajo el cual se centra en el análisis de la variación y la identificación de los principales grupos de compuestos producidos por *B. morelensis* el cual se centra en las hipótesis derivadas de la pregunta. ¿Existirá variaciones en la producción de metabolitos secundarios en *Bursera morelensis* en dos épocas del año?

Con los resultados obtenidos en este estudio se pretende realizar una aportación al conocimiento fitoquímico de *B. morelensis* que permitan tener una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos que permiten a esta especie hacer frente a condiciones de su medio así como aportar información general sobre la especie.

Hipótesis

Sí los principales grupos de metabolitos de las especies del género *Bursera* son terpenos, fenólicos y fenilpropanoides *B. morelensis* también es una especie productora de estas mismas familias de compuestos. Además la producción de estos metabolitos variará de acuerdo a las condiciones ambientales que se presentan durante el año en la región de San Rafael Coxcatlán.

Objetivo general

Analizar la variación temporal de los principales metabolitos secundarios presentes en corteza, rama y hoja de *Bursera morelensis*.

Objetivos particulares

- Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de la corteza rama y hoja de *B. morelensis*.
- Comparar la variación de los grupos de metabolitos presentes en los extractos crudos de corteza, ramas y hojas, en diferentes épocas del año con dos intervalos de tiempo diferentes.
- Elucidar la estructura de compuestos aislados de los extractos de corteza de baja mediana y alta polaridad de *B. morelensis*

Estrategia metodológica

Con el fin de cumplir los objetivos planteados para este trabajo se siguió la estrategia metodológica que se describe a continuación.

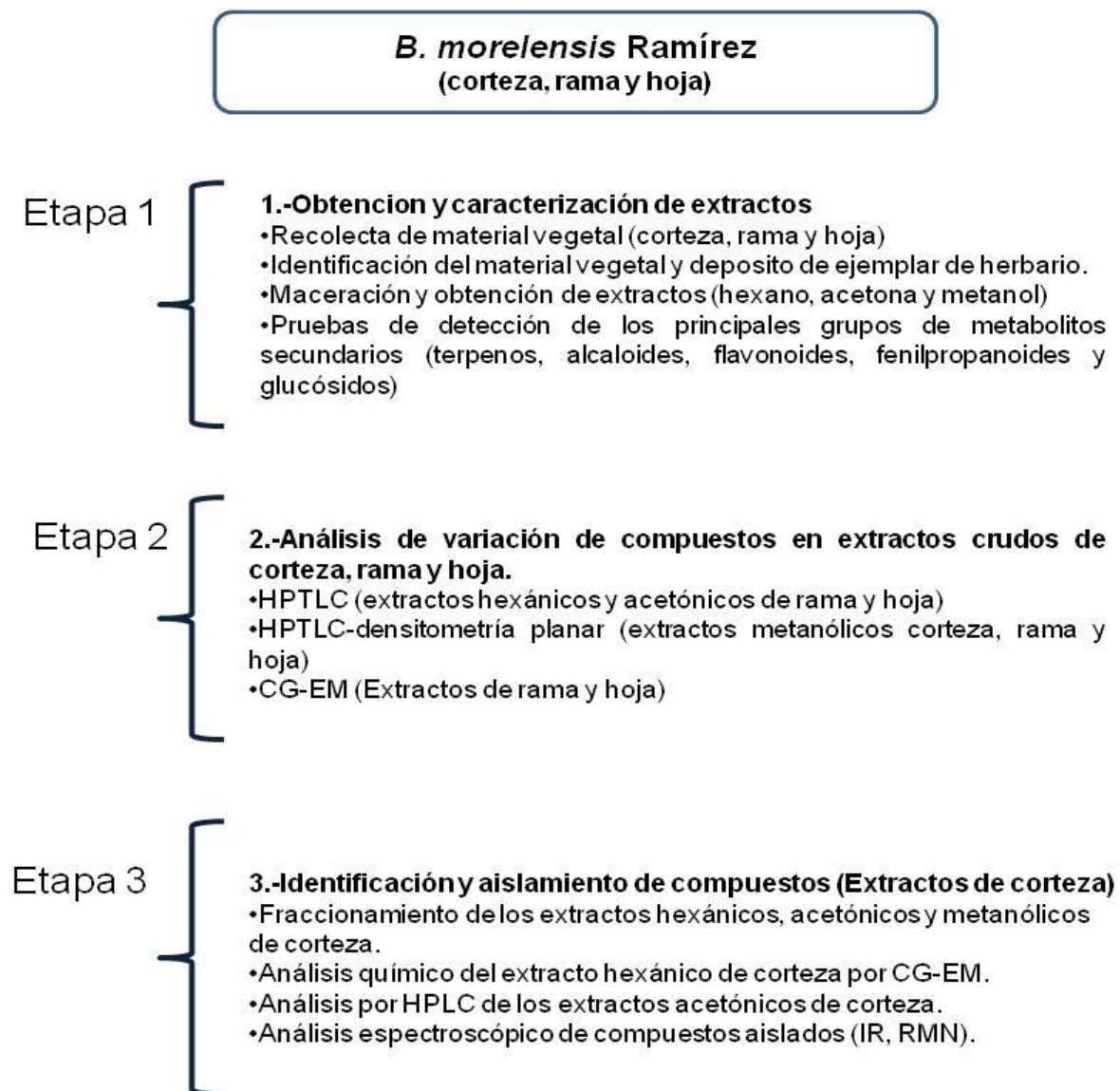


Fig.8 Estrategia metodológica empleada para el análisis de la variación de compuestos de *B. morelensis* Ramírez.

Etapa 1: Obtención y caracterización preliminar de los extractos

Recolecta del material vegetal.

La primera fase de este trabajo consistió en obtener material vegetal, para lo cual se realizaron un total de cuatro recolectas en las cercanías de la localidad de San Rafael en el municipio de Coxcatlán, Puebla, entre los coordenadas N 18°12' y 18°14' y W 97°07' y 97°09' (Figura 9). Las dos primeras recolectas se llevaron a cabo durante la estación seca, en el periodo comprendido entre los meses de febrero y marzo del año 2011, mientras que las otras dos se realizaron con la misma diferencia temporal en los meses de agosto y septiembre del mismo año, durante la estación de lluvias. En cada recolecta se obtuvo aproximadamente 1 Kg de material fresco de corteza, ramas y hojas. El cual fue llevado al laboratorio para su secado. También se recolectaron dos ejemplares herborizados para su identificación y registro en el herbario IZTA de la FES-Iztacala de la UNAM.

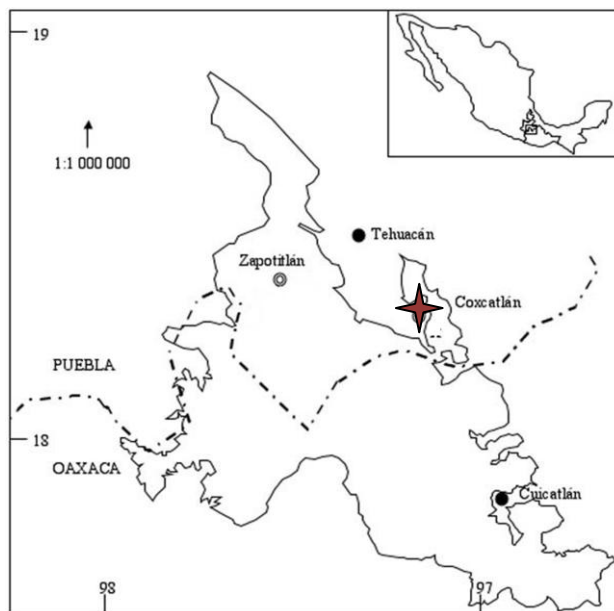


Fig.9 Ubicación de la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla.

Obtención de extractos.

Una vez finalizado el proceso de secado del material vegetal de las diferentes recolectas, fue sometido a un proceso de maceración en frío con solventes de polaridad ascendente,

utilizando por separado hexano, acetona y metanol. Posteriormente, se procedió a la recuperación de lo sólidos por medio del método de concentración a presión reducida con un equipo Heidolph Mod. Laborota 4000. En la tabla 3 se enlistan los extractos obtenidos, así como la nomenclatura utilizada para designar a cada uno.

Tabla 3. Lista de extractos obtenidos del material recolectado de *B. morelensis*.

Extracto	Parte procesada	Número/ mes de recolecta	Clave
Hexánico	Corteza	1 febrero	HCS1
Hexánico	Rama	1 febrero	HRS1
Hexánico	Rama	2 marzo	HRS2
Hexánico	Rama	4 septiembre	HRL2
Hexánico	Hoja	3 agosto	HHL1
Hexánico	Hoja	4 septiembre	HHL2
Acetónico	Corteza	1 febrero	ACS1
Acetónico	Corteza	2 marzo	ACS2
Acetónico	Rama	1 febrero	ARS1
Acetónico	Rama	2 marzo	ARS2
Acetónico	Rama	4 septiembre	ARL2
Acetónico	Hoja	3 agosto	AHL1
Acetónico	Hoja	4 septiembre	AHL2
Metanólico	Corteza	1 febrero	MCS1
Metanólico	Corteza	2 marzo	MCS2
Metanólico	Rama	1 febrero	MRS1
Metanólico	Rama	2 marzo	MRS2
Metanólico	Rama	4 septiembre	MRL2
Metanólico	Hoja	3 agosto	MHL1
Metanólico	Hoja	4 septiembre	MHL2

Simbología: H, A, y M: Hexano, acetona y metanol. C, R y H: corteza, rama y hoja. S: estación seca. L: estación de lluvias. 1, 2 y 3: Número de recolecta.

Pruebas de detección de grupos de metabolitos por reacciones coloridas y cromatografía de capa fina.

Una vez obtenidos los extractos de las diferentes recolectas y partes de *B. morelensis*, éstos se sometieron a la detección de los principales grupos de metabolitos secundarios. Los métodos utilizados consistieron en detecciones colorimétricas y el revelado de cromatografía de capa fina (ccf) específicas para cada grupo de compuestos, las cuales se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Pruebas de detección de los principales grupos de metabolitos secundarios.

Grupo de metabolitos	Revelador/agente cromógeno	Método
Terpenos	Vainillina	Revelado de cromatografía en capa fina
Esteroides	Lieberman-Buchard	Revelado de cromatografía en capa fina
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	Reacción colorida
Glucósidos	Molish	Reacción colorida
Flavonoides	Cloruro férrico	Reacción colorida
Fenólicos	RPN (2-aminoetildifenil borato)	Revelado de cromatografía en capa fina

Eta 2. Análisis de la variación temporal de los extractos de corteza, rama y hoja.

Análisis por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).

La ccf es una de las técnicas de separación más utilizadas en el mundo y esto se debe a que es fácil y rápida de llevar a cabo y no requiere complejos procesos de preparación. Aunque esta técnica puede ser efectiva para aislar compuestos, para hacer determinaciones analíticas es necesario estandarizar factores como: el tamaño de la fase estacionaria, la cantidad de solvente y de muestra son determinantes en la obtención de los resultados. Al estandarizar todos estos parámetros se pueden realizar estudios analíticos (García, 1998).

En este trabajo esta técnica fue utilizada con el fin de analizar la variación de los principales grupos de metabolitos en las diferentes partes recolectadas de *B. morelensis* las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

- Los extractos hexánicos acetónicos y metanólicos de corteza, rama y hoja fueron disueltos a una concentración de 5 mg/mL y se aplicó un volumen de 10 µL, utilizando un aplicador automático (TLC sampler, CAMAG).
- Todos los extractos se aplicaron en placas con base gel de sílice G-25, con indicador fluorescente para luz UV de 365 nm.
- Las placas se desarrollaron en una cámara cromatográfica, para posteriormente ser observadas en una cámara de luz UV visualizándolas tanto en longitud de onda larga (365 nm) como en longitud de onda corta (254 nm).

Fases móviles y agentes cromogénicos utilizados para el revelado de las placas.

- a) Extractos hexánicos.** Estos extractos fueron desarrollados con un sistema de elución hexano-acetato de etilo (8:2) aplicando muestras en dos placas que fueron reveladas reactivo de Lieberman-Buchard.
- b) Extractos acetónicos.** Para el caso de los extractos acetónicos se utilizó un sistema de elución compuesto por hexano, acetato de etilo, acetona (7:2:1). Se desarrollaron dos placas: una de ellas fue revelada con reactivo de Lieberman-Buchard para detectar la presencia de terpenos y esteroides la otra placa fue revelada con revelador de productos naturales (RPN) y visualizadas a 365 nm para compuestos de tipo flavonoide o fenólico.
- c) Extractos metanólicos.** Por último los extractos de alta polaridad fueron desarrollados con una fase móvil que permitiera la mejor separación de los compuestos de los extractos para este fin se empleó una fase móvil compuesta por la mezcla de cloruro de metileno, ácido acético glacial y metanol (90:5:5) y revelados con RPN para posteriormente ser visualizados en luz UV de onda larga (365 nm) y onda corta (264 nm). Estos cromatogramas fueron analizados mediante un software de densitometría planar, VideoScan (Wincats) para determinar el porcentaje de similitud y variación de los grupos de metabolitos entre las diferentes recolectas se realizó un análisis estadístico ANOVA de un factor.

Etapa 3. Identificación y aislamiento de los compuestos presentes en los extractos de corteza.

Fraccionamiento de los extractos de corteza.

Los extractos de corteza de las tres polaridades fueron incluidos en celita para fraccionarlos en cc utilizando gel de sílice F₂₅₄ (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merk malla 70-230 ASTM). La columna se eluyó con mezclas de polaridad ascendente. La fase móvil fue seleccionada previamente por cromatografía de capa fina (ccf). Del fraccionamiento se obtuvieron alícuotas de 100 mL que posteriormente fueron concentradas a presión reducida para analizarlas con ccf y de esta manera formar las fracciones en base a similitud del patrón cromatográfico.

Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

La cromatografía de gases es una técnica de análisis cuantitativo la cual tiene su fundamento en la ccf, sólo que en este caso la fase móvil, que en la cromatografía clásica es un solvente líquido, es substituida por un gas, el cual puede ser helio, nitrógeno o hidrógeno. Además la CG puede acoplarse a un espectrómetro de masas, el cual es un potente detector para análisis cualitativo y cuantitativo de la muestras. La espectrometría de masas tiene su fundamento en la ionización de moléculas en estado gaseoso, éstas convertidas en cationes son aceleradas en un campo eléctrico y luego separadas de acuerdo a su masa. El proceso de ionización suministra suficiente energía para que las moléculas se rompan en diversos fragmentos los cuales son mostrados en el espectro de masas, que consiste en un gráfico que muestra la abundancia de cada uno de los fragmentos que choca con el detector de masas (Harris, 2001).

Con el fin de realizar el análisis espectrométrico de los extractos HSC1 y los extractos crudos de rama y hoja estos se sometieron a un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Éste se realizó en un cromatógrafo (Agilent technologies) modelo 6850, el cual dispone de una columna HP-5MS (Agilent Technologies) de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro y película de 0.25 µm acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent technologies modelo HP-5MS). El tipo de inyección fue Split o manual. La cantidad de muestra utilizada fue de 1 µg. El gradiente de temperatura abarcó un rango de temperatura inicial de 70°C hasta un máximo de 230°C. El gas empleado como fase móvil fue el helio (He). El flujo inicial de la columna fue de 1

mL/min, con una presión de 64.85 Kpa (8.77psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total de análisis fue de 40 minutos. El rango de masas detectado fue de 35 m/z, las muestras se ionizaron por impacto electrónico a 70 eV, la temperatura alcanzada en la fuente de ionización fue de 230°C y el cuadrupolo de 150°C. La identificación de los compuestos se llevo a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST, versión 8.0.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

El campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución permite los análisis de compuestos termo sensibles, con masas moleculares muy grandes o incluso de altas polaridades. Su eficiencia se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos, a través de la selección de la columna y de la composición de eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones solución/fase móvil/fase estacionaria (Rouessac, 2003). La cromatografía de líquidos de alta resolución utiliza presiones elevadas para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo separaciones de gran resolución. Los sistemas de HPLC generalmente se componen de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y una computadora que controla el sistema y donde se pueden visualizar los resultados (Harris, 2001).

Con el fin de analizar los extractos acetónicos, sólo se utilizaron las fracciones de mayor rendimiento obtenidas por cromatografía en columna abierta; para lo cual, se utilizó un equipo Hewlett-Packard, modelo 1100 con bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos. La columna utilizada fue Allosphere ODS -1 DE 250 mm de largo por 46 mm de diámetro, tamaño de partícula de 5 µm. La temperatura de horno fue de 23 °C, con un flujo constante de 5mL por minuto durante 15 minutos y fase móvil isocrática, conformada por los siguientes eluyentes y proporciones: H₂O: MeOH: AcOH (60:20:20) El análisis de los picos en los cromatogramas se determinó en el espectro UV, a 260nm, con el software Chemstation A.09.03.

Análisis de los compuestos aislados de los extractos acetónicos

Filtrado de precipitados y cristales

La obtención de precipitados y/o cristales es un punto clave durante el fraccionamiento de los extractos, ya que esto nos indica la separación de compuestos relativamente puros por lo cual se debe continuar con el proceso de purificación para su análisis espectroscópico y así elucidar la estructura de estos compuestos, se enlistan los pasos que se siguieron para lograr este propósito.

- 1.- Los precipitados o cristales se filtraron con ayuda de un embudo de porcelana con papel filtro acoplado a una toma de vacío.
- 2.- Una vez filtrados el solvente recuperado (aguas madres) se conservaron para permitir la cristalización de más compuesto.
- 3.- A los productos obtenidos se les realizaron pruebas de solubilidad con solventes de polaridad ascendente con el fin de obtener información acerca de su polaridad.
- 4.- Posteriormente una muestra de estos cristales/precipitados se desarrolló en cc y en base al patrón cromatográfico identificar la presencia de compuestos puros.
- 5.- Una muestra de los compuestos obtenidos fue incinerada con el fin de observar el residuo obtenido después de exponerla a las flamas y saber si es un compuesto orgánico o inorgánico.
- 6.- Una vez obtenido el compuesto este se sometió a la prueba con el equipo Fisher-Johns para obtener su punto de fusión. Esta técnica nos brinda información en base a los cambios de estados que presentaron los compuestos ya que esto nos indica de primera mano las fuerzas intermoleculares que existen en ellos y por lo tanto el tipo de enlaces que presentan.

Los compuestos que se obtengan después del proceso fueron analizados por diferentes técnicas con la finalidad de obtener sus parámetros fisicoquímicos así como elucidar sus estructuras las técnicas que se utilizaran con este propósito se enlistan a continuación.

Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) representa básicamente otra forma de espectrometría de absorción semejante a la infrarroja y la ultravioleta. Bajo condiciones adecuadas una muestra puede absorber radiación electromagnética a frecuencias que derivan de la estructura química de la muestra (Silverstein *et al*, 1981)

La resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos sobre todo los de ^1H y ^{13}C . Además de las propiedades magnéticas del núcleo los electrones también producen modificaciones, aunque son débiles son observables. Los efectos electrónicos son los que dan lugar a los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento permitiendo de esta manera el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas (Elguero *et al*, 2000).

En este estudio se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C con el fin de aportar información sobre de un compuesto aislado por medio de la cromatografía en columna abierta y para de esta forma complementar la información obtenida en los análisis por CG-EM y HPLC sobre la naturaleza de los compuestos presentes en la *B. morelensis*.

La muestra obtenida del extracto ACS1 fue analizada bajo las siguientes condiciones. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C) fueron obtenidos en un equipo Bruker-Avance los cuales operaron a una frecuencia de 300 MHz y 75 MHz respectivamente. Los espectros de obtuvieron utilizando como solvente acetona-deuterada. Los desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm (δ) con respecto a un patrón de tetrametilsilano (TMS) utilizado como referencia interna.

Espectrometría infrarroja.

La radiación infrarroja es la porción del espectro electromagnético comprendida entre el espectro visible y el de microondas. La región entre los 2.5-15 μm es de gran utilidad en el análisis espectroscópico de moléculas orgánicas. Aun cuando el espectro infrarrojo es característico para toda la molécula, algunos grupos funcionales originan bandas a la misma frecuencia o a frecuencias diferentes al resto de la molécula. En la región de las frecuencias fundamentales de grupo las principales bandas con las que se pueden identificar. Son estas bandas las que nos permiten obtener información estructural útil

mediante su inspección y la consulta de tablas generalizadas de frecuencias características (Silverstein *et al*, 1981; Ferrera y Vergara, 2012).

Los precipitados obtenidos de los extractos ACS2 Y MCS1 fueron analizados por medio de espectrometría infrarroja de acuerdo a la siguiente metodología:

5 mg de muestra de cada precipitado fueron incluidos en 100 mg de KBr para preparar pastillas que fueron analizadas en un espectrofotómetro de infrarrojo modelo FT-IR Spectrum-2000 (Perkin-Elmer) el cual operó en un rango de barrido de 4000-600 cm^{-1} realizándose un total de 8 barridos por muestra. El espectro fue analizado con el software Spectrum versión 3.02.00.

Resultados y discusión.

Etapa 1 Análisis de la variación de compuestos en extractos crudos de corteza, hoja y rama.

Datos de herbario de *Bursera morelensis*.

La determinación del material vegetal recolectado en San Rafael Coxcatlán fue realizada por la M. en C. Ma. Edith López Villafranco responsable del herbario IZTA de la FES-Iztacala. La información de herbario de muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Datos de herbario de *Bursera morelensis* Ramírez.

Nombre científico	<i>Bursera morelensis</i>
Familia	BURSERACAE
Nombre común	Aceitillo
No de registro	2262 IZTA

Extracción

Rendimiento de los extractos

El peso del material seco se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 6. Peso del material seco de las diferentes partes recolectadas de *B. morelensis*.

Parte	Recolecta	Peso material vegetal (gr)
Corteza	1	119.5
Corteza	2	73.6
Rama	1	317
Rama	2	597
Rama	4	223.5
Hoja	3	298
Hoja	4	185

Un total 21 extractos se obtuvieron de las diferentes partes recolectadas de *B. morelensis* tomando como base los pesos del material vegetal seco los rendimientos obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento de los extractos obtenidos por el método de maceración

Rendimiento %				
Parte	Recolecta	Extractos hexánicos	Extractos acetónicos	Extractos metanólicos
Corteza	1	9.87	10.39	17.69
Corteza	2	14.40	18.80	15.71
Rama	1	3.70	4.09	7.32
Rama	2	1.89	2.20	9.08
Rama	4	1.64	1.41	6.80
Hoja	3	0.50	0.45	1.68
Hoja	4	2.50	1.72	8.40

En la tabla 7 se puede observar que los extractos metanólicos presentan los mayores rendimientos seguidos de los acetónicos y finalmente los hexánicos aunque con algunas excepciones; como en el caso del extracto ACS2 el cual es el extracto de mayor rendimiento.

Pruebas de detección de metabolitos.

Las pruebas realizadas a los extractos con el fin de conocer los grupos de metabolitos presentes en *B. morelensis* nos permitieron corroborar los reportes sobre los tipos de compuestos que se pueden encontrar en esta especie, con respecto a otros integrantes del género. En la tabla 8 se muestran los resultados de las pruebas aplicadas a todos los extractos de las muestras recolectadas.

Tabla 8. Familias de compuestos presentes en *B. morelensis* Ramírez.

Grupos de metabolitos	Revelador / agente cromógeno	Resultado	Extractos
Terpenos	Vainillina	+	Hexánicos/ Acetónicos
Esteroides	Lieberman-Buchard	+	Hexánicos/Acetónicos
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	-	Todos
Glucósidos	Molish	+	Metanólicos
Fenólicos	Cloruro férrico	+	Acetónicos/Metanólicos
Flavonoides	RPN (2-aminoetildifenil borato)	+	Acetónicos/Metanólicos

Simbología: + (presencia) – (ausencia).

Discusión

El mayor porcentaje de rendimiento lo presentaron los extractos metanólicos con un promedio de 9.5% seguidos de los acetónicos con un 5.58% y por último los hexánicos con 4.9%. Los rendimientos obtenidos en los extractos metanólicos de corteza son similares a los reportados por Parrales en 2013 y Rodríguez en 2014. Sin embargo, los extractos acetónicos de corteza también presentan rendimientos similares y en el caso de la segunda recolecta el extracto ACS2 presenta un rendimiento superior al MCS2. El mismo fenómeno puede observarse en el caso de los extractos hexánicos los cuales presentaron un porcentaje de rendimiento superior de los extractos acetónicos de sus respectivas colectas lo cual indica que estos compuestos concentran mayor cantidad de compuestos.

De acuerdo a lo mostrado en la tabla anterior en todos los extractos hexánicos las partes procesadas de *B. morelensis* podemos encontrar compuestos de la familia de los terpenos de diferente tipo tales como mono y sesquiterpenos así como fitosteroles. La prueba con el reactivo de Dragendorff indica la ausencia de alcaloides los cuales no son característicos del género (Rzedowski y Ortiz 1998). Por último las pruebas para glucósidos, flavonoides y fenólicos dieron positivo en los extractos acetónicos y metanólicos de todas las partes recolectadas

Etapa 2. Análisis de la variación temporal de los extractos de corteza, rama y hoja.

Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).

Extractos hexánicos.

Los extractos hexánicos sometidos a una cromatografía en capa fina de alta resolución y revelados con reactivo de Lieberman-Buchard muestran un comportamiento similar en la distribución de las bandas en los diferentes carriles (Figura 10). Con excepción del carril 2 que corresponde al extracto HRS1 donde se puede ver que existe una banda adicional en la zona de baja polaridad la cual no aparece en el resto de los extractos. En general, se observa una mayor concentración de compuestos en la zona de alta polaridad de las placas sin embargo en el carril número 3, del extracto HRL2, se puede notar una disminución en la concentración de los compuestos en comparación con los extractos

HRS1 y HRS2. El mismo fenómeno se observa Los carriles 4 y 5 que son de los extractos HHL1 y HHL2.

Tanto en la placa donde se aplicaron 10 μ L como en la de 20 μ L de extracto a una concentración de 5mg/mL, se siguen observando los mismos patrones, aunque se nota una mejor definición de las bandas en la segunda, por lo cual se recomienda utilizar esta cantidad en estudios posteriores (Figura 10A y 10B).

El reactivo de Lieberman-Buchard es utilizado en el revelado de placas cromatografías para saber si en el extracto o muestras, existen compuestos como triterpenos o fitoesteroles. Para el caso de los extractos de *B. morelensis* podemos observar que las bandas distribuidas los 5 carriles presentan coloraciones grisáceas, violáceas y marrones, las cuales son típicas de este tipo de compuestos (Wagner y Bladt, 1996).

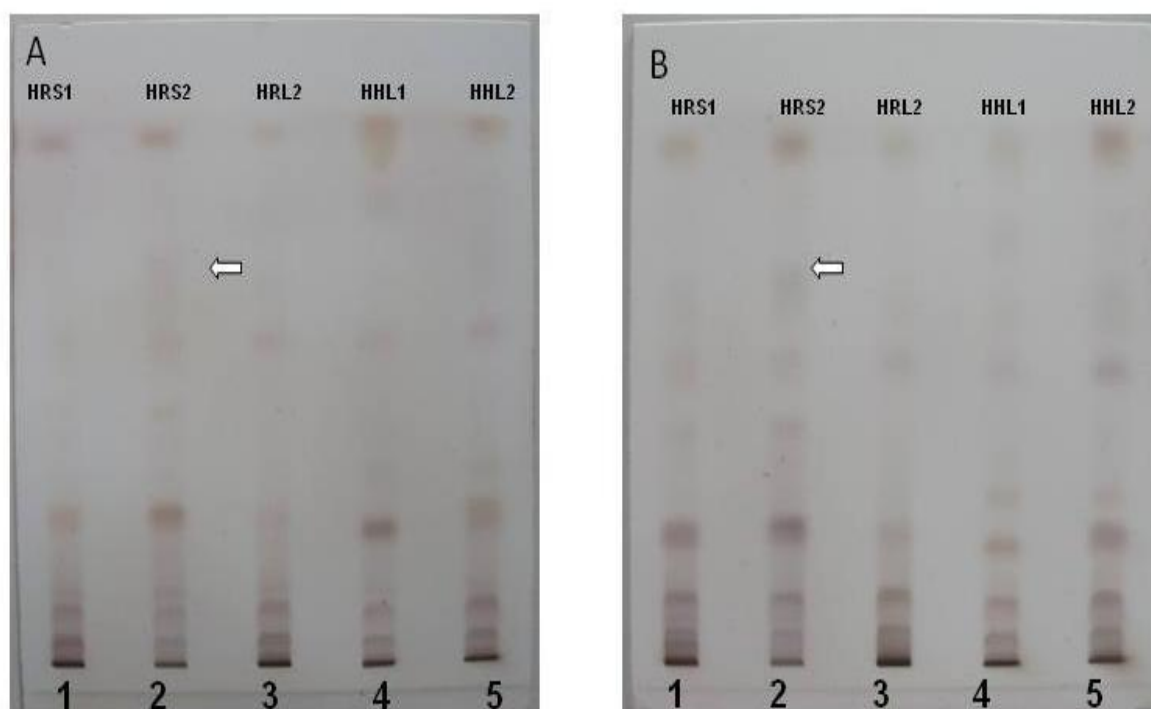


Fig. 10. Cromatogramas de los extractos hexánicos revelados con reactivo de Lieberman-Buchard (5mg/mL). Al cromatograma A se aplicaron de 10 μ L de extracto por carril. Al Cromatograma B se le aplicaron 20 μ L de extracto por carril. Carriles 1-3 corresponden a los extractos de rama HRS1, HRS2 y HRL2. Carriles 4 y 5 corresponden a los extractos de hoja HHL1 y HHL2.

Extractos acetónicos

Perfil de terpenos

En el cromatograma de los extractos acetónicos revelados con reactivo de Liebermann-Buchard se puede observar de nuevo una tendencia de comportamiento similar entre todos los extractos, en cuanto al número y coloración de las bandas que aparecen en los 6 carriles. Estas presentan coloraciones violetas y marrones con excepción del carril 5 donde aparece una banda de color verde grisáceo (←) (Figura 11).

En el carril 1 (ACS1) y 2 (ARS1) es notoria la similitud en la concentración de los metabolitos producidos entre corteza y rama; por otro lado en el carril 3 (ARS2) presentan un aumento en la concentración de compuestos en la zona de baja polaridad de la placa mientras que para el carril 4 (ARL2) se presenta una tendencia inversa y se observa una mayor concentración de los compuestos en la zona de alta polaridad de la placa. Por otra parte en los carriles 5 y 6 que corresponden a los extractos de hoja también existen diferencias en la concentración de los compuestos siendo superior en el carril 5 (AHL1 con respecto al carril 6 (AHL2) lo que demuestra que existen variaciones en la cantidad de compuestos entre las diferentes partes de la planta y las épocas de recolecta.

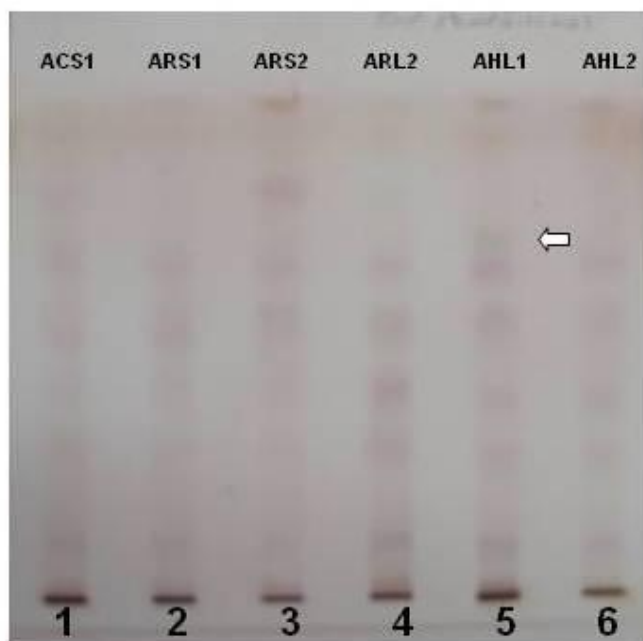


Fig. 11. Cromatograma de los extractos acetónicos revelados con reactivo de Liebermann-Buchard (5mg/mL). Para detección de triterpenos. Carriles 1 extracto de corteza ACS1 carriles 2,3 Y 4 corresponden a los extractos de rama ARS1, ARS2 Y ARL2. Carriles 5 y 6 extractos de hoja AHL1 Y AHL2

Perfil para compuestos fenólicos

En los extractos acetónicos las bandas visualizadas después de la aplicación del revelador de productos naturales (RPN) (Figura 12) muestran coloraciones verdes (carriles 5 y 6) rojas (carriles 1-4 zona de alta polaridad) las cuales son características de flavonoides (Wagner, 1996). También aparecen bandas con fluorescencia intensa en color azul que indica una fuerte presencia de ácidos hidroxicinámicos en todos los extractos (Wagner y Bladt, 1996).

La concentración de compuestos en los extractos de corteza (carril 1) y rama (carriles 2-4) presenta una gran similitud aunque con una leve disminución en la banda principal (Σ) que presenta su máxima fluorescencia en el carril 1 (primer recolecta y mínima en el carril 4. Otro de los compuestos que presenta disminución gradual en su concentración es la banda con coloración rosa (\Rightarrow) en la zona de alta polaridad la cual disminuye, aunque esta lo hace de manera más drástica. Por otra parte, la banda del compuesto que presenta fluorescencia blanca en la zona de alta polaridad presenta una concentración muy similar en tres los cuatro carriles. En cuanto a los extractos de hoja (carriles 5 y 6) estos presentan una banda en color verde la cual tiende a aumentar su fluorescencia en el carril 6 lo que indica (\Leftarrow) un incremento en la producción de este compuesto; la banda azul principal de los 4 primeros carriles de nueva cuenta aparece aunque su concentración es menor en los extractos de hoja (Figura 12).

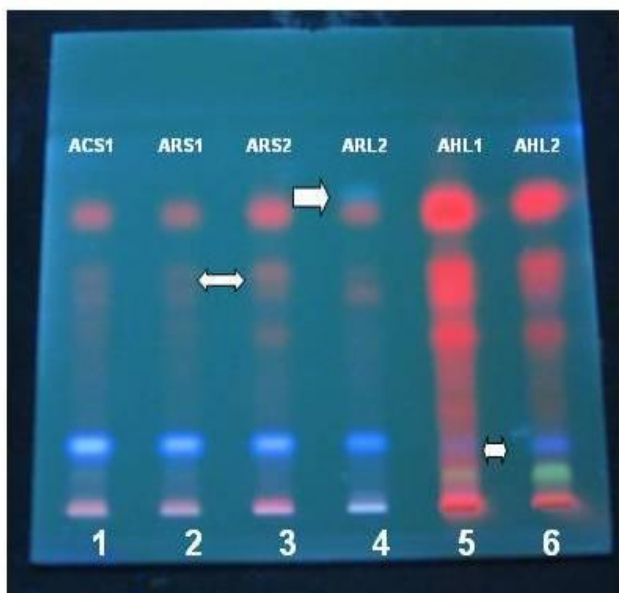


Fig. 12. Cromatograma de los extractos acetónicos revelados con RPN y visualizados con luz UV 365 nm (5mg/mL). Para detección de flavonoides Carriles 1 extracto de corteza ACS1 carriles 2,3 Y 4 corresponden a los extractos de rama ARS1, ARS2 Y ARL2. Carriles 5 y 6 extractos de hoja AHL1 Y AHL2

Extractos metanólicos de corteza, rama y hoja.

Los extractos metanólicos de *B. morelensis* fueron los que mostraron mayores diferencias entre sí y con respecto a los demás extractos en cuanto al comportamiento en la producción y variación de compuestos tal como se puede observar en la placa revelada con luz UV de 365 nm (Figura 13 A). Posteriormente ésta placa fue revelada nuevamente con RPN con el fin de que las bandas para visualizar manchas no visibles en el UV (Figura 13 B).

En cuanto a las bandas de los compuestos presentes en los extractos metanólicos de *B. morelensis* se pueden observar diferencias notables en los carriles 1 y 2 que corresponden a los extractos de corteza pues existe una predominancia de bandas de color verde que se distribuyen en las diferentes zonas de polaridad de la placa además de bandas en color azul en la zona de alta polaridad. Los carriles 3, 4 y 5 que corresponden a los extractos de rama se distinguen por la presencia de una banda de color azul den la zona de alta polaridad las cual disminuye en los carriles 4 y 5. Por otra parte en los carriles 1, 2, 6, y 7 se puede observar una banda de color amarillo en la zona de alta polaridad de la placa la cual sólo pudo apreciarse hasta después de la aplicación de RPN fluoresciendo con mayor intensidad en los carriles 6 y 7 esto debido a una mayor producción de este compuesto en los extractos de hoja.

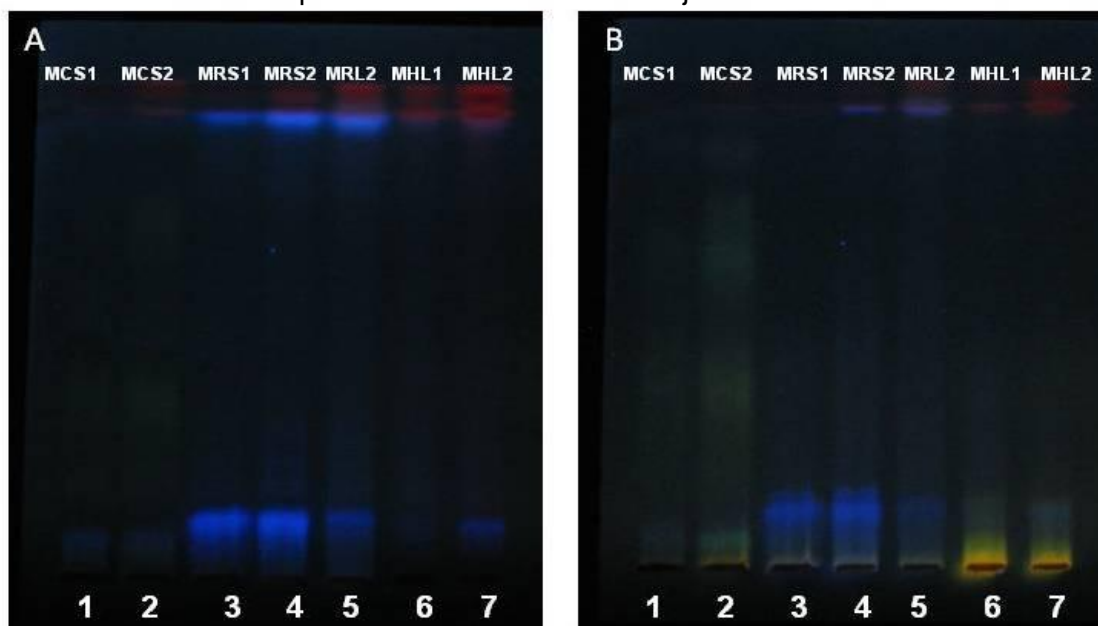


Fig. 13. Cromatograma de los extractos metanólicos visualizados con luz UV de 365 nm (A) y revelados con reactivo de RPN (5mg/mL) para detección de flavonoides (B). Carriles 1 y 2 extractos de corteza MCS1 Y MCS2 carriles 2,3 Y 4 corresponden a los extractos de rama MRS1, MRS2 Y MRL2. Carriles 5 y 6 extractos de hoja MHL1 Y MHL2.

Las placas también fueron observadas en luz UV a una longitud de onda de 254 nm donde de nuevo se detectaron diferencias notables en el patrón de compuestos que aparecen en cada extracto (Figura 14). La mayor parte de los compuestos se acumulan en la parte de alta polaridad de la placa aunque en los carriles 1 y 2 correspondientes a los extractos de corteza se puede apreciar una mayor distribución en las diferentes zonas de polaridad presentando estos extractos el mayor número de bandas. En los carriles 3 y 4 de los extractos MRS1 y MRS2 se puede apreciar una banda de color azul en la zona de alta polaridad la cual no aparece en el carril 5 MRL. Por último los carriles 6 y 7 (hoja) presentan una banda en la zona de alta polaridad la cual es más notoria en el carril 6 la cual corresponde al extracto MHL2.

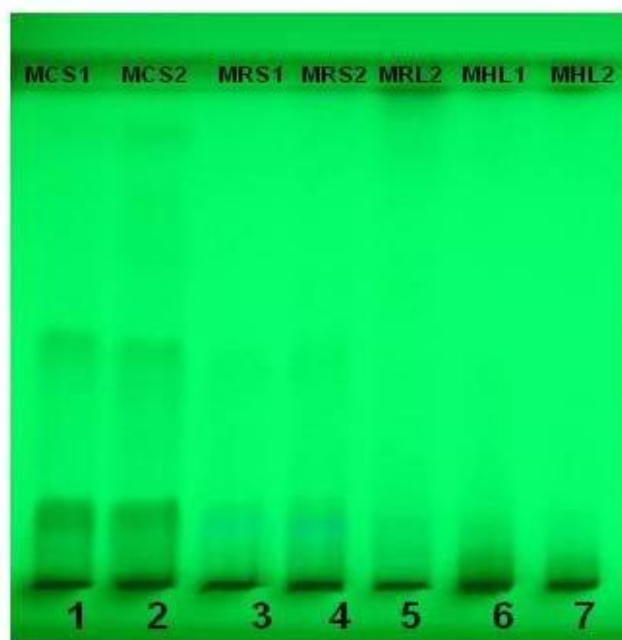


Fig. 14. Cromatograma de los extractos metanólicos visualizados con luz UV de 254 nm y revelados con reactivo de RPN (5mg/mL) para detección de flavonoides. Carriles 1 y 2 extractos de corteza MCS1 Y MCS2 carriles 2,3 Y 4 corresponden a los extractos de rama MRS1, MRS2 Y MRL2. Carriles 5 y 6 extractos de hoja MHL1 Y MHL2.

Variación de los principales metabolitos en los extractos metanólicos.

Las placas de los extractos metanólicos de corteza, rama y hoja fueron sometidos a un análisis por densitometría planar en el cual se detectaron un total de 32 compuestos (Anexo 1). La distribución de estos compuestos se presento es de la siguiente manera: 10 para cada extracto de corteza, 6 para el MRS1, 9 para el MRS2 y 8 para el MRL2. En los extractos de hoja se detectaron 4 compuestos en cada uno. Sin embargo para el análisis de variación de compuestos se eligieron sólo los que fueron detectados más de una vez

en los extractos así como aquellos que presentaron los porcentajes de concentración más elevados como se describe a continuación.

Extractos de corteza.

Los compuestos 3 y 5 son los compuestos mayoritarios en los extractos metanólicos de corteza, aun cuando el material recolectado presenta un mes de diferencia en la misma época del año, existe una variación significativa en el porcentaje de abundancia de los 5 compuestos mayoritarios de estos extractos ($F_{1,10}=4.96$, $P=72.2$) como se puede apreciar en la figura 15. También se puede observar una tendencia de disminución de los compuestos entre el mes de febrero y el mes de marzo salvo en los compuestos 2 y 9 donde existe un fenómeno inverso al aumentar la producción de ambos.

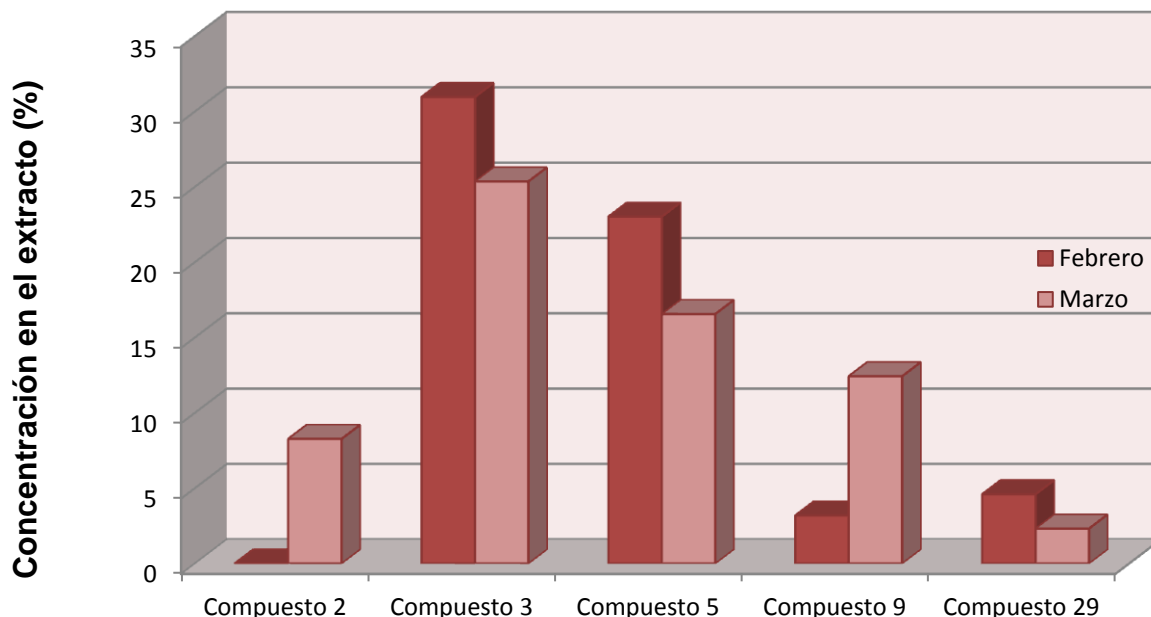


Fig. 15 Variación de los compuestos presentes en la corteza de *B. morelensis* en los meses de febrero y marzo (estación seca).

Extractos de rama.

La diversidad de compuestos en los extractos metanólicos de rama es menor en cuanto número de compuestos producidos y también a los metabolitos identificados en comparación a los de corteza. En este caso los compuestos más abundantes fueron el 1 y el 2 para los extractos obtenidos en la época de sequía; y el 1 y el 10 para la época de lluvias. Aunque el 2 presenta un porcentaje de abundancia importante en este extracto.

De nueva cuenta se pudo observar una variación significativa en la producción de los compuestos mayoritarios ($F_{2,10}=4.10$, $P=6.67$) (Figura 16), así como una mayor acumulación de compuestos en el extracto de la primer recolecta (febrero) mientras que estos tienden a variar y disminuir de manera considerable en los meses de marzo el cual está cercano a la época de producción de flores, y septiembre época de producción de semillas.

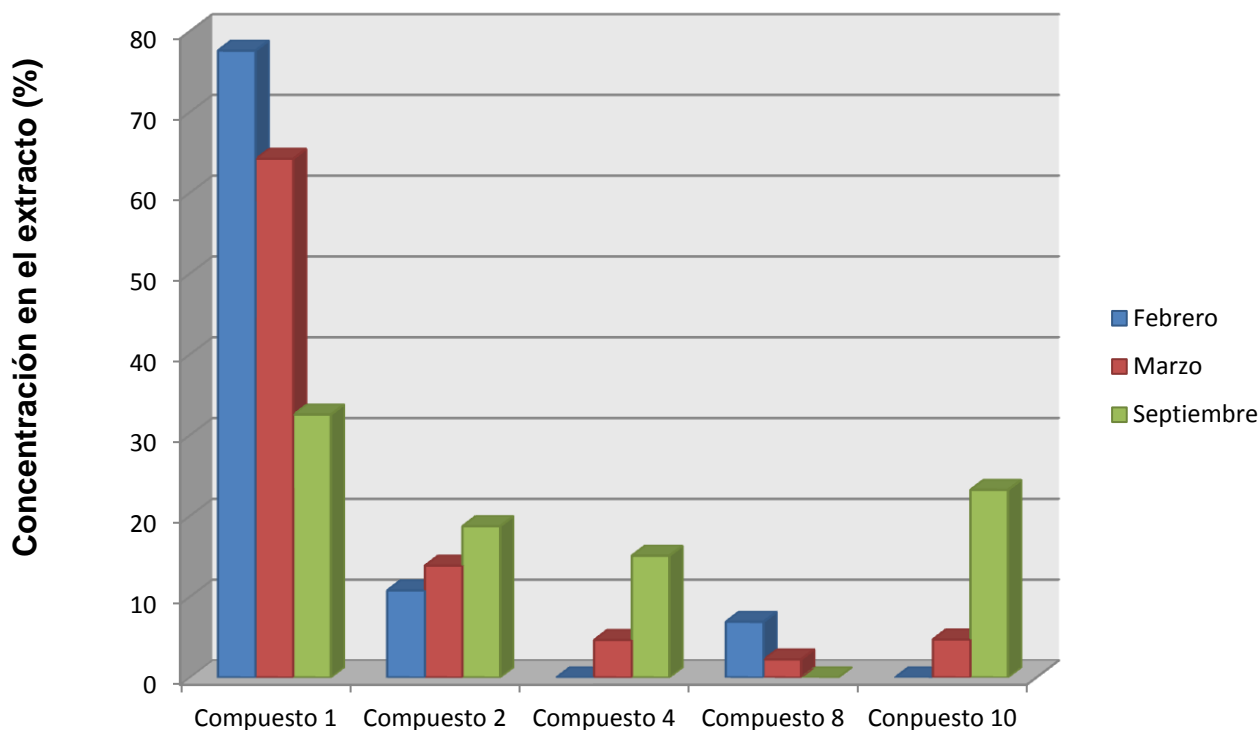


Fig. 16 Variación de los compuestos presentes en ramas de *B. morelensis* en los meses de febrero y marzo (estación seca) y septiembre (estación de lluvias).

Extractos de hoja.

Los extractos metanólicos de *B. morelensis* de hoja fueron los que presentaron una menor diversidad de compuestos, con 4 cada uno. Los compuestos 1 y 2 son los que presentan un mayor porcentaje de concentración en los extractos. De nueva cuenta existe una variación significativa en la producción de compuestos entre los dos extractos ($F_{1,6}=4.99$, $P=6.67$) aunque esta vez se observa un aumento en la producción de metabolitos entre los meses de agosto y septiembre. En contraste el compuesto 2 que presenta una disminución en su producción en el mes de septiembre (Figura 17).

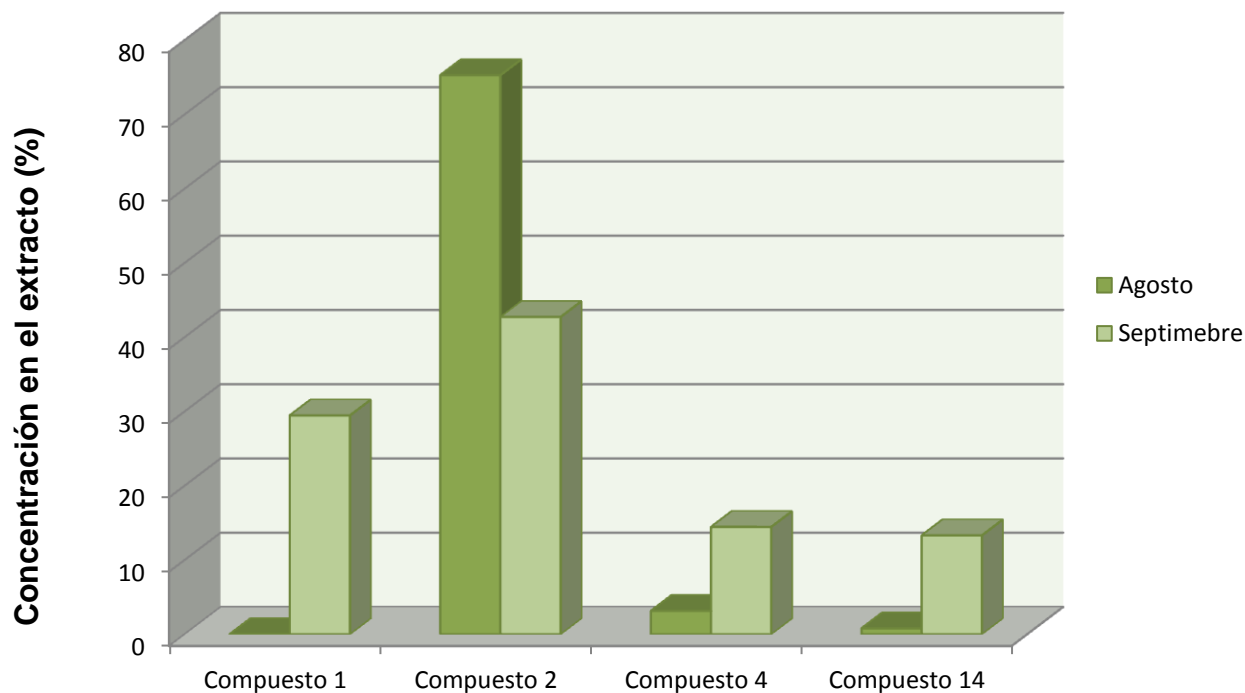


Fig. 17 Variación de los compuestos mayoritarios en las hojas de *B. morelensis* en los meses de agosto y septiembre (época de lluvias).

Discusión análisis de variación de los extractos hexánicos y acetónicos

Análisis por HPTLC

El patrón cromatográfico de compuestos para las diferentes partes recolectadas, (corteza, rama y hoja) de *B. morelensis* muestra que esta especie es productora de triterpenos y fitosteroles. Abundantes sobre todo en los extractos hexánicos y acetónicos. El papel de estos compuestos en las plantas es el de ser componentes de la membrana celular (fitoesteroles) disuasorios alimentarios, o tener acción antimicrobiana (fitoalexinas) (Harborne, 1993). La producción de estos metabolitos no presenta variaciones importantes en cuanto a la diversidad de compuestos con las excepciones del extracto HRS1 y AHL2 que presentaron una banda adicional con coloración diferente al resto de los carriles. En cuanto a la variación en la producción de compuestos se puede observar un incremento en las concentraciones de estos metabolitos de acuerdo a la época del año. Presentando las mayor acumulación en los extractos HRS2 y ARS2 obtenidos en el mes de marzo, previo a la época de producción de hojas, pero disminuyendo en el extracto de rama de la recolecta del mes de septiembre a la vez que aumenta la producción en los extractos de hoja. Lo que nos indicaría posiblemente una distribución

de metabolitos hacia las hojas flores y semillas, con el fin de protegerlas de ataques de insectos que se alimentan de ellas, parásitos tales como hongos o agentes infecciosos como bacterias (Hamond y Jons, 2000).

Por otra parte el perfil de flavonoides permitió corroborar la existencia de estos compuestos en los extractos acetónicos y metanólicos de todas las partes recolectadas de la planta. Aunque el número de bandas es menor en comparación con otras especies de *Bursera* (Reguera, 2011). La mayor diversidad de estos compuestos se encuentra en partes como las hojas (extractos acetónicos y metanólicos) y corteza (extractos metanólicos). Este tipo de compuestos cumplen funciones de defensa ante agentes de estrés abióticos tales como la radiación UV y complementarios a los sistemas de defensa antioxidante e incluso contra algunos agentes infecciosos principalmente eucariontes (Gould y Lister, 2006).

Discusión del análisis por densitometría planar de los extractos metanólicos

El análisis con el programa VideoScan (Wincats) proporcionó datos de los constituyentes separados en las cromatografías tales como: el número de estos su r_f , su porcentaje de abundancia y el número total de estos.

Las coloraciones exhibidas por las bandas visualizadas con luz UV (365nm) y luego del revelado con RPN permiten teorizar la existencia de flavonoides como kaempferol y sus glucósidos (bandas verdes) quercetina y sus glucósidos (bandas amarillas) (Wagner, Bladt, 1996). Estos son compuestos comunes en otras especies del género *Bursera*, (Souza *et al*, 1986) así como compuestos hidroxicinámicos como ácido cloragénico (banda azul zona de alta polaridad. Sin embargo, aún no se puede aseverar por completo la identidad de estos metabolitos, ya que aún es necesario aislarlos e identificarlos además de desarrollar y modificar sistemas de elución que sean exclusivos para las especies del género *Bursera* dado que las resinas producidas por esta planta presentan una gran complejidad en su composición así como una elevada cantidad de compuestos polares.

El análisis por densitometría reveló la presencia de 32 constituyentes. En donde solo 10 tienen presencia en más de una época de colecta resaltando de manera particular el caso de los compuestos 1 el cual se pudo identificar en prácticamente todos los extractos con excepción del MCS1 y el 2 y el 4 presentes en ramas y hojas. El valor de r_f de estos

constituyentes coincide con las bandas azules observadas en la parte inferior de las placas por lo que muy probablemente se traten de ácidos hidroxicinámicos los cuales presentan importante actividad antioxidante (Mulh, 2013). Por otra parte, el resto de los constituyentes sólo se pudo identificar una vez por lo que posiblemente se trate de compuestos sintetizados para responder a un estímulo particular.

Por último, la variación en la producción de compuestos en los extractos metanólicos presenta diferencias significativas de acuerdo a la parte analizada y la época de colecta. Tanto en el análisis por HPTLC y los resultados del análisis por densitometría (Anexo 1) los extractos de corteza muestran la mayor diversidad de compuestos seguidos de los de rama y por último los de hoja. Esto podría atribuirse al hecho de que la corteza del fuste es la que presenta el mayor porcentaje de superficie y a diferencia de las hojas las cuales solo están presentes durante un corto periodo en el año, esta debe soportar un mayor número de factores de estrés biótico y abiótico. Sin embargo, al igual que en los cromatogramas de los extractos hexánicos y acetónicos en los extractos metanólicos se puede observar una disminución en la producción de 3 de los 5 compuestos analizados a la vez que en los extractos de rama se observa una disminución sólo de dos compuestos aunque en los restantes se observa un claro aumento en la presencia de estos la cual tiene su punto máximo en la época de lluvias. Esta tendencia también se observó en los extractos de hoja donde también existe un aumento de producción de 3 de los 4 compuestos identificados lo que es un indicativo de que la producción de metabolitos secundarios es mayor en los meses en los cuales la planta se encuentra en procesos reproductivos (Rzedowski y Guevara, 2004).

Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos hexánicos de rama y hoja de *Bursera morelensis* de las cuatro recolectas realizadas reveló la existencia de 18 compuestos mayoritarios; 14 de ellos del grupo de los terpenos (Tabla 9) además de 4 ácidos grasos (Tabla 10).

Tabla 9. Principales terpenos identificados en los extractos hexánicos de *B.morelensis*.

Tiempo de retención	Nombre	Tipo de compuesto	Extracto donde fue identificado	Promedio de abundancia %
15.6	Óxido de cariofileno	Sesquiterpeno	Todos	15.9
5.7	2 Ciclohexano-1 ona, 4 -(metiletil)	Monoterpeno	Todos excepto el HRS1	6.2
18.4	α-felandreno	Monoterpeno	HRS1 y HRS2	0.2
6.1	β-felandreno	Monoterpeno	HRS2 y HRL2	4.1
4.5	α- pineno	Monoterpeno	HRS2 y HHL2	0.24
6.9	Eucaliptol	Monoterpeno	HRS2 y HHL2	0.29
5.1	Biciclo (3.1.0) hexano, 4 meitleno-1-(1 metiletil)	Monoterpeno	HRS2 y HHL2	0.11
6.0	Benceno, 1 metil-2 -(1-metiletil)	Monoterpeno	HRS2 y HHL2	1.1
6.1	Limoneno	Monoterpeno	HHL2	2.3
6.1	β-Tujeno	Monoterpeno	HHL1	0.53
5.68	Ciclohexano, 1- metileno-4-(1- metiletil)	Monoterpeno	HHL2	0.16
10.1	Carveno	Monoterpeno	HHL2	0.007
26.9	α-santalol	Sesquiterpeno	HRS2	0.2
30.6	Lupeol	Triterpeno	HHL1	1.2
			Total	35.53

En el caso de los terpenos identificados en este análisis se observa un importante número de monoterpenos con un total de 10, seguidos por los sesquiterpenos con 2 y sólo un triterpeno.

El análisis estadístico muestra diferencias significativas ($F_{3,66}=2.76$, $P= 38.53$) en las concentraciones de los terpenos identificados, así como en la presencia de estos en los

diferentes extractos, siendo el óxido de cariofileno el único que aparece en los 5 extractos además de ser el que se encuentra en mayor concentración entre ellos (Figura 18).

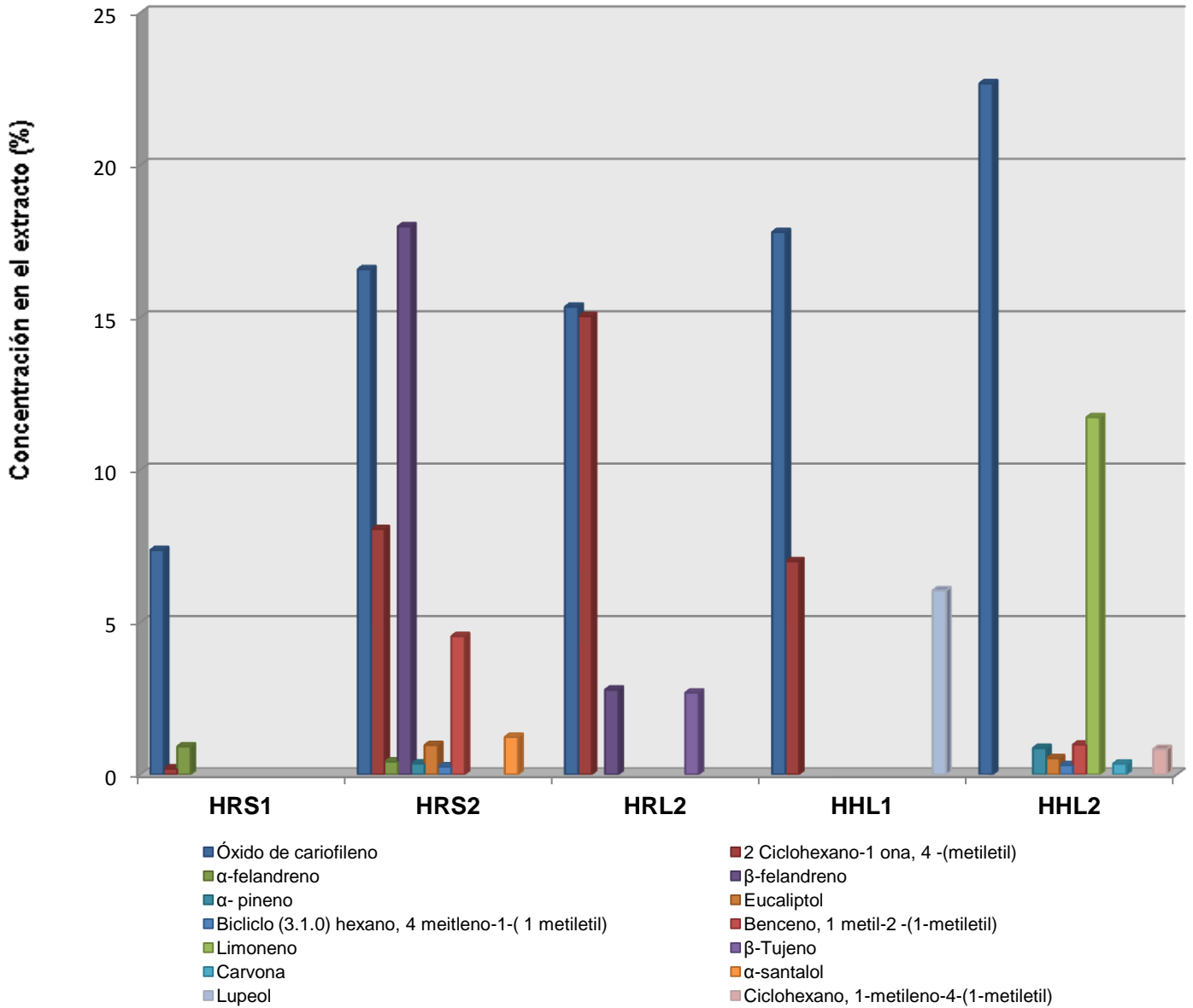


Figura 18. Variación de los principales terpenos identificados en los extractos de rama y hoja

Los extractos crudos de hojas y ramas de *B. morelensis* también muestran importantes concentraciones de cuatro ácidos grasos, como se puede observar en la tabla 10.

Tabla 10. Principales ácidos grasos identificados en los extractos de *B. morelensis*.

Tiempo de retención	Nombre	Extracto donde fue identificado	Promedio de abundancia
20.34	Ácido palmítico	Todos excepto el HRL2	2.87
22.87	Ácido hexadecanóico-metil ester	Todos excepto el HRS2	1.38
19.88	Ácido hexadecanóico-butil ester	HRS2,HRS3 y HHL2	0.582
29.86	Ácido hexacosanóico metil ester	HHL2	0.238

Por último los ácidos grasos identificados en los extractos crudos de *B. morelensis* en todas las recolectas, también muestran variaciones significativas ($F_{3,16} = 3.24$, $P = 3.68$) en su concentración a lo largo del año tal como se puede observar en la figura 19.

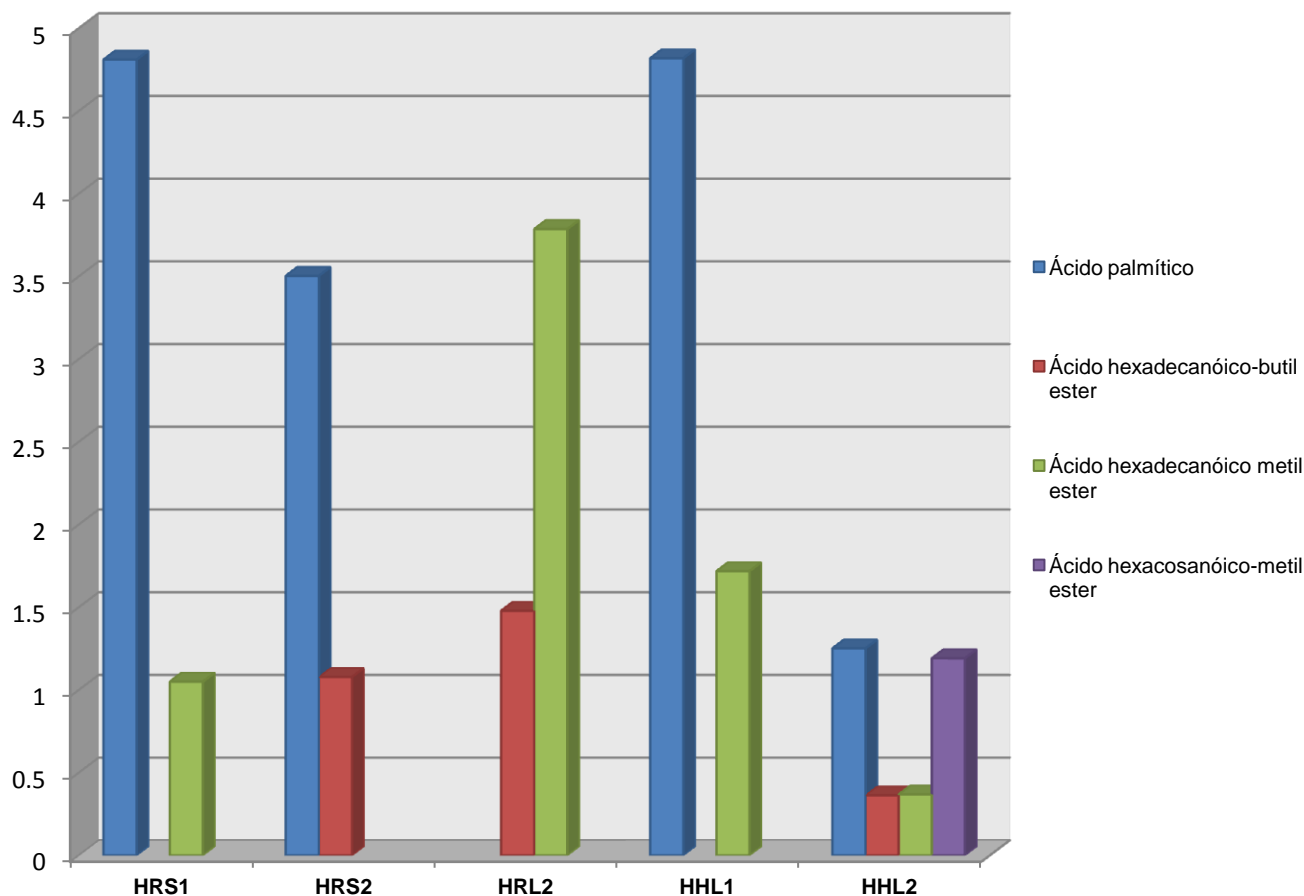


Fig.19 Variación de los principales ácidos grasos identificados en los extractos hexánicos de rama y hoja de *B. morelensis*.

Discusión del análisis por CG-EM de los extractos hexánicos de hoja y rama

Los resultados obtenidos a partir del análisis de CG-EM realizado a los extractos hexánicos de rama y hoja de *B. morelensis* permiten observar la presencia de diversos terpenos entre los que predominaron los monoterpenos esto permite complementar lo reportado por Rzedowski y Ortiz en 1988. Además de los monoterpenos también se identificaron 2 sesquiterpenos, un triterpeno y cuatro ácidos grasos principales compuestos que también forman parte de los aceites esenciales y la resina producida por esta especie. Estas resinas brindan protección ante el ataque de herbívoros como insectos o mamíferos e incluso se plantea que podrían funcionar como atractores de polinizadores (Ambruster, 2003).

De los 14 terpenos identificados resalta de manera importante el óxido de cariofileno, un sesquiterpeno. Este compuesto ya había sido reportado en los aceites esenciales de *B. morelensis* por López en 2011. Sin embargo, a diferencia de estos resultados el óxido de

cariofileno es el compuesto mayoritario en todos los extractos obtenidos de las ramas y hojas con un porcentaje promedio del 15.9%; sin embargo presenta notables variaciones en su producción teniendo dos picos máximos tanto para ramas y hojas ambos en el extracto 3 (rama) y 5 (hoja) que corresponden al material recolectado en el mes de septiembre. Lo anterior es un indicativo del papel de este compuesto en el rol de defensa de esta especie ante factores bióticos ya que los sesquiterpenos son un grupo importante de compuestos que presentan actividad como antimicrobianos y disuasorios de la alimentación principalmente de insectos (Harbone, 1994).

Otros compuestos con concentraciones importantes en los extractos son el limoneno, β -felandreno y el 2-Ciclohexen-1-ona, 4-(1-metiletil). Sin embargo solo este último presenta porcentajes de concentración elevados fue identificado en 4 de los 5 extractos, por lo cual es muy probable que se trate de un terpeno constitutivo de las resinas producidas en las diferentes partes de *B. morelensis*. Mientras que el limoneno y el β -felandreno junto con el resto de los terpenos identificados sean compuestos producidos en épocas específicas del año.

En cuanto a los monoterpenos y el sesquiterpenos varios de estos ya han sido reportados para otras especies del género *Bursera*. Ejemplo de esto lo tenemos en compuestos como el α -felandreno, β -felandreno y el α - pineno los cuales también fueron identificados en el aceite esencial de rama de *B. morelensis* por López en 2011. Además de estos monoterpenos también fue posible la identificación de compuestos como el limoneno, α -felandreno, β -felandreno y el α - pineno los cuales han sido reportados en los aceites esenciales de la especie *B. schlechtendalii* Engler (Espinosa, 2012) y en los de *B. fagaroides* (Camargo, 2013). Por otra parte, este es el primer reporte de los siguientes terpenos en la especie y el género: 2 Ciclohexano-1 ona, 4 -(metiletil), Biciclo (3.1.0) hexano, 4 meitleno-1-(1 metiletil), Benceno, 1 metil-2 -(1-metiletil). Por último el α -santalol también se ha reportado en aceites esenciales de la especie *B. schlechtendalii* (Espinosa, 2012) y el lupeol (triterpeno) en el extracto hexánico de corteza de *B. simaruba* (Vences, 2012).

El patrón de producción de metabolitos tanto secundarios (terpenos) como primarios (ácidos grasos) muestra diferencias significativas en ambos casos. En los terpenos la mayor diversidad de estos compuestos se presenta en el extracto HRS1 (rama época de sequía) y el HHL2 (hoja época de lluvias). Este aumento en la diversidad de compuestos obedece a que la planta se encuentra en situaciones de vulnerabilidad generada por un aumento en las temperaturas y falta de humedad de lluvias, (mes de marzo). Para el caso

del mes de septiembre el exceso de lluvias podría representar un riesgo ya que favorece el ataque de fitoparasitos como hongos y bacterias (Bakkali *et al*, 2008). así mismo en esta época del años los monoterpenos y sesquiterpenos producidos en las hojas de *B. morelensis* actúan como atractores de polinizadores y dispersores de semillas.

Etaapa 3 Aislamiento e identificación de compuestos en los extractos de corteza

Fraccionamiento cromatográfico de los extractos de *B. morelensis*.

Con la finalidad de conocer la composición química de los extractos de diferente polaridad de la corteza de *B. morelensis*, se procedió a hacer un fraccionamiento por cc de cada uno. La descripción de cada uno de los fraccionamientos se encuentra en los anexos 2 al 6.

A partir del fraccionamiento del extracto hexánico de corteza de *B. morelensis* HCS1, se obtuvieron un total de 108 alícuotas las cuales se agruparon en 22 fracciones, de acuerdo a su patrón cromatográfico y polaridad. En este fraccionamiento no se aislaron compuestos pero las fracciones fueron analizadas por CG-EM para conocer los principales componentes.

El fraccionamiento del extracto ACS1 de corteza de *B. morelensis* permitió obtener 214 alícuotas, que se agruparon en 27 fracciones (Anexo 3), mientras que para el extracto ACS2 se obtuvieron un total de 191 alícuotas, agrupadas en 32 fracciones (Anexo 4). En ambos casos solo se analizaron por HPLC las fracciones que presentaron mayores diferencias en los patrones exhibidos en un análisis previo por cf. Del análisis del extracto ACS1 se aisló un precipitado (A) que se analizó por RMN ¹H Y RMN ¹³C Del extracto ACS2 también se obtuvo un precipitado (B) que sólo se analizó por IR debido a su pureza. A partir del extracto MCS1 se obtuvo un precipitado (C) de la fracción M, el cual se analizó por IR.

Análisis químico del extracto hexánico de corteza de *B. morelensis* (HCS1) por CG-EM.

Para el análisis por CG-EM se utilizaron las fracciones de mayor rendimiento del extracto HCS1 (Anexo 2). Con la finalidad de conocer perfil de compuestos de baja polaridad, encontrando principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y ácidos grasos como se describe a continuación.

El análisis por CG-EM de las fracciones C a la M del extracto HCS1 de *B. morelensis* revela la presencia de 16 compuestos principales. De los cuales, 12 pertenecen al grupo de los terpenos; predominando los triterpenos con 7 compuestos, seguidos de los monoterpenos con 4 y sólo un sesquiterpeno. El óxido de cariofileno es el terpeno más abundante de estos extractos ya que presenta una abundancia del 4.06 % de la fracción C la cual es la de mayor rendimiento y un 0.85 % de la fracción D con lo cual se corrobora que este es el principal terpeno presente en *B. morelensis* (Tabla 11).

Tabla 11. Principales terpenos del extracto HCS1 de *B. morelensis*.

Compuesto	Tipo de compuesto	Fracción analizada	Eluyente	Proporción
α -felandrano	Monoterpeno	C	EP/Acetona	8:2
2-Ciclohexan-1-ona, 4-(1-metiletil)-	Monoterpeno	C	EP/Acetona	8:2
Benceno, 1-metil-3-(1-metiletil)-	Monoterpeno	G, J	EP/Acetona	8:2
β -felandreno	Monoterpeno	E	EP/Acetona	8:2
Óxido de cariofileno	Sesquiterpeno	C,D	EP/Acetona	8:2

En cuanto a los triterpenos fue posible identificar 6 compuestos en las fracciones H, I, J y M (Tabla 12), los cuales difieren de los encontrados en los extractos crudos de rama y hoja que se mencionaron anteriormente.

Tabla 12. Principales triterpenos identificados en los extractos hexánicos de corteza de *B. morelensis*.

Compuesto	Tipo de compuesto	Fracción analizada	Eluyente	Proporción
28-Norolean-17-en-3-ona	Triterpeno	H	EP/Acetona	8:2
γ -sitosterol	Triterpeno	J, M	EP/Acetona	8:2
Lanosterol	Triterpeno	J	EP/Acetona	8:2
Estigmasterol	Triterpeno	I	EP/Acetona	8:2
β -sitosterol	Triterpeno	J	EP/Acetona	8:2
Lupan-3-ona	Triterpeno	J	EP/Acetona	8:2
Campesterol	Triterpeno	H	EP/Acetona	8:2

En cuanto a los ácidos grasos encontrados en el extracto HCS1 cabe destacar que 3 fueron detectados en todas las fracciones del extracto siendo el principal el metil ester, del ácido tetranosóico el cual presenta el mayor porcentaje de concentración de todos los metabolitos identificados mediante el análisis por CG- EM (Tabla 13). Este perfil de ácidos grasos concuerda con el encontrado en todos los extractos crudos de rama y hojas, lo que indica que estos compuestos son componentes importantes de las resinas de *B. morelensis* (Rzedowski, 1988).

Tabla 13. Principales ácidos grasos identificados en los extractos hexánicos de *B. morelensis*.

Compuesto	Tipo de compuesto	Fracción analizada	Eluyente	Proporción
Ácido tetradecanoico metil ester	Ácidos grasos	C	EP/Acetona	8:2
Ácido hexacosanoico metil ester	Ácidos grasos	C	EP/Acetona	8:2
Ácido n-hexadecanoico	Ácidos grasos	D, F, G, I,J,K	EP/Acetona	8:2
Ácido tetradecanoico	Ácidos grasos	G, I, J ,K	EP/Acetona	8:2

Discusión del análisis por CG-EM del extracto de corteza

El fraccionamiento por cc del extracto hexánico de corteza de la colecta realizada en época de sequía de *B. morelensis* permitió la identificación de un número importante de compuestos pertenecientes al grupo de los terpenos. La proporción de monoterpenos en el extracto hexánico de corteza es menor, ya que solo se identificaron 4 compuestos de este tipo, más un sesquiterpeno (el óxido de cariofileno) el cual presentó el mayor porcentaje de concentración al igual que en los extractos de rama y hoja. En cuanto a los demás terpenos identificados, es importante señalar la importante cantidad de triterpenos identificados los cuales son reportados por primera vez para la especie *B. morelensis*.

La diferencia en la cantidad de triterpenos identificados en el extracto hexánico de corteza con respecto a los extractos crudos se debe principalmente al proceso de fraccionamiento por cc el cual permite separar a los compuestos de la mezcla original con lo cual disminuyen las interacciones entre moléculas tales como los puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals etc. Lo que a su vez permite tener fracciones con una menor complejidad en el número y tipo de compuestos respecto al extracto lo que facilita el análisis de los mismos en pruebas espectroscópicas y espectrométricas (Ayala, 2014).

La abundancia y diversidad de triterpenos permite complementar y corroborar los resultados obtenidos en el análisis de HPTLC realizado a los extractos de rama y hoja lo que confirma que *B. morelensis* presenta una importante producción de estos compuestos. La mayoría de estos triterpenos pertenecen al grupo de de los fitosteroles los cuales presentan variaciones significativas (Wagner y Bladt, 1996).

En cuanto a los monoterpenos y el sesquiterpeno identificados éstos coinciden con los que se han identificado en los extractos crudos de rama lo cual se atribuye a que estos compuestos son producidos en partes de la planta con características estructurales y factores de estrés similares. A diferencia de las hojas que sólo se encuentran presentes durante una parte del año y por su localización en la planta presentan necesidades de defensa que difieren de las ramas y corteza.

Debido al bajo rendimiento del resto de las fracciones del extracto hexánico de corteza de *B. morelensis* con excepción de la T y a las mezclas empleadas para su fraccionamiento (acetona-metanol), es necesaria el empleo de técnicas que se adecuen más a las características fisicoquímicas de los compuestos presentes en ellas.

Análisis químico de los extractos ACS1 y ACS2 de *B. morelensis*.

Las fracciones de los extractos ACS1 y ACS2 que se sometieron a un análisis por HPLC se describen a continuación (Tabla 14):

Tabla 14. Fracciones analizadas por medio de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

ACS1			ACS2		
Fracción	Rendimiento (g)	Eluyente	Fracción	Rendimiento (g)	Eluyente
A1	0.276	AcOEt 100%	E2	0.136	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt 9:1
C	0.050	AcOEt 100%	G	0.480	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt 9:1
E	0.027	AcOEt 100 %	I	0.327	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt 7:3
H	0.880	AcOEt/Metanol 6:4	L	0.356	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt 8:2
K	0.044	MeOH 100%	L1	0.141	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt 8:2
N	0.009	MeOH 100%			

La composición de los fraccionamientos que provienen de los extractos ACS1 y ACS2 presenta diferencias en la cantidad de constituyentes; en el primero se detectaron 68 componentes en 6 fracciones mientras que en el segundo fueron 51 en 5 fracciones (Anexo 6 y 7).

En la tabla 15 se observan los tiempos de retención y los valores de absorción UV de los principales constituyentes detectados en las fracciones de los extractos ACS1 y ACS2. Al analizar los picos máximos de absorción en la región UV (λ max) de los constituyentes que se encontraron en más de una fracción.

En ACS1 los constituyentes de las fracciones muestran 5 patrones de absorción en UV característicos (Tabla 15), a diferencia del extracto ACS2 en el cual prácticamente todos los constituyentes de las fracciones son diferentes en los picos máximos de absorción, indicando la presencia de 19 constituyentes. Esto corrobora que *B. morelensis* presenta

diferencias metabólicas, que se reflejan en la composición química de acuerdo a las condiciones ambientales, puesto que la mayor diversidad de compuestos se encontró en el mes de marzo, concordando con los resultados obtenidos en HPTLC y CG-EM del resto de los extractos.

Tabla 15. Tiempos de retención (min) de los principales constituyentes de las fracciones de la cromatografía en columna del extracto ACS1.

ACS1			ACS2		
Fracción	Tiempo de retención	λ Max (nm)	Fracción	Tiempo de retención	λ Max(nm)
A1	1,928	202.278	E2	1,462	240
	2,078	202.278		1,778	*sh230
	2,306	202.278		2,55	*sh224,276
	10,936	202,284,Sh322			
	11,48	202,284,Sh322			
C	1,447	202.278	G		
	1,749	202.278			
	2,759	202,sh214,278		2512	224.278
	3,455	202,sh214,278		2812	226.274
	3,564	202,sh214,278		3725	222.278
E	2,55	202,sh220,280,340	I	2,785	226.282
	3,474	204,sh220,280,340		3,384	224.286
	4,432	204.288.334		3,651	226,288,*sh326
	4,728	204.288.334		4,13	226,292,*sh330
				7,294	224,292,*sh330

				11,292	224,292,*sh330
H	1,672	202.276	L	1,852	210.260
	1,869	202.276		2,005	276
	2,485	278		2,53	202.276
	2,66	278		4,625	202.282
	2,806	278		5,302	202.282
				5,661	202.282
K	1,734	208,276	L1	1,46	202.276
	2,489	278		1,994	218.258
	2,672	278		9,556	282
	2,788	278		11,268	282
N	1,703	202.278			
	1,837	202.276			
	2,541	278			
	2,818	278			
	3,454	240			

*sh. Shoulder u hombro. Termino que se refiere una inflexión en el espectro de luz UV o visible.

El análisis por HPLC de los extractos acetónicos de *B. morelensis* presenta diferencias notables en cuanto a la cantidad y diversidad de compuestos entre los extractos ACS1 y ACS2 siendo este último correspondiente al material colectado en el mes de marzo el que presento mayor complejidad en cuanto a los constituyentes identificados. Es de resaltar el hecho de que mientras que en el extracto ACS1 presenta un compuesto predominante (λ max 202, 208 nm) en el extracto ACS2 se puede observar que las fracciones analizadas por HPLC presentan un patrón de producción mucho más diverso

este resultado es similar a lo analizado con anterioridad con respecto a los extractos HRS2 y HHL2.

Este aumento en la producción de compuestos durante el mes de marzo puede deberse a que las plantas se encuentran en una época en la cual las condiciones de su medio tales como las altas temperaturas y las irradiación solar pueden afectar de manera importante a la corteza ya que durante los meses de estiaje *B. morelensis* carece de follaje con lo cual el tronco se encuentra totalmente expuesto a los efectos de las altas temperaturas y la irradiación UV la cual puede producir daños a biomoléculas de importancia como ácidos nucleídos o sistemas enzimáticos (Gould y Lister, 2006).

Otro factor que podría explicar el aumento en la producción de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos es que estos compuestos presentan actividad contra diversos agentes patógenos entre los que se incluyen virus, bacterias, protozoos y fitopárasitos importantes como hongos y nemátodos estos últimos representan un riesgo potencial para la integridad de la planta ya que pueden invadir conductos de transporte de nutrientes con lo cual no solo afectan la distribución de estos sino que también pueden propiciar la entrada de otros agentes patógenos que propicien la muerte de la planta (Gould y Lister, 2006).

Análisis espectroscópico de los precipitados de los extractos ACS1, ACS2 y MCS1

El fraccionamiento por columna abierta de los 5 extractos de corteza permitió aislar un precipitado de los siguientes extractos: ACS1, ACS2 y MCS1. En la tabla 16 se muestran los parámetros fisicoquímicos obtenidos de cada uno.

Tabla 16. Precipitados aislados de los extractos ACS1, ACS2 y MCS1 de *B. morelensis*.

Extracto / fracción	Rendimiento	Disolvente	Punto de fusión
ACS1/ A	6 mg	Diclorometano	≥300°C
ACS2/ B	5 mg	Acetato de Etilo /Diclorometano	≥300°C
MCS1/C	15 mg	Metanol	≥300°C

Los precipitados obtenidos de los extractos acetónicos se disuelven en solventes de polaridad intermedia mientras que el precipitado obtenido del extracto metanólico se disuelve en metanol. Todos presentaron punto de fusión superior a 300°C lo que es indicativo de fuerzas de interacción molecular fuertes. Los tres precipitados fueron sometidos a análisis espectroscópicos con la finalidad de conocer su estructura.

Resonancia magnética nuclear protónica ^1H y de ^{13}C del precipitado A obtenido del extracto ACS1

Los espectros de RMN mostraron que el precipitado A obtenido del extracto ACS1 es una mezcla, sin embargo sí es posible identificar las señales del componente principal las cuales se describen a continuación:

El espectro de resonancia magnética de protones del precipitado α aislado de la fracción A del extracto ACS1 mostró los siguientes desplazamientos químicos: En campos altos entre 0.8 ppm y 1.3 ppm se detectan 5 grupos metilos. Entre 2 y 2.3 ppm, las señales son características de los grupos metileno y metinos. Con desplazamiento a 3.9 ppm se detecta un hidrogeno base de un grupo OH. Finalmente entre los 5 y 5.5 ppm se encuentra el desplazamiento de una doble ligadura (Figura 20, Tabla 17).

Tabla 17. Desplazamientos químicos del espectro de resonancia magnética de ^1H del precipitado A.

Señal en ppm	Interpretación
0.8-1.3	Metilos
2-2.3	Metilenos y metinos.
3.9	Hidrogeno base de grupo OH
5.1-5.3	Dobles ligaduras en estructura de anillos base

En el espectro de resonancia magnética de ^{13}C del precipitado A, aislado de la fracción A del extracto ACS1 mostró los siguientes desplazamientos químicos. En campos altos (10-30 ppm), señales características de metilos. Se detectaron metilenos y metinos entre 35-50 ppm. En 84 ppm la señal del carbono base de alcohol. En 128 y 135 ppm, las dos

señales pertenecen a los carbonos de una doble ligadura cíclica. Finalmente en ppm la señal corresponde a un carbonilo (Tabla 18) (Figura 21).

Tabla 18. Desplazamientos químicos del espectro de resonancia magnética de ^{13}C del precipitado A.

Señal en ppm	Interpretación
10-30	Metilos
35-50	Metilenos y metinos
94	Carbono base de OH
128 y 135	Doble ligadura cíclica
200-210	Carbonilo

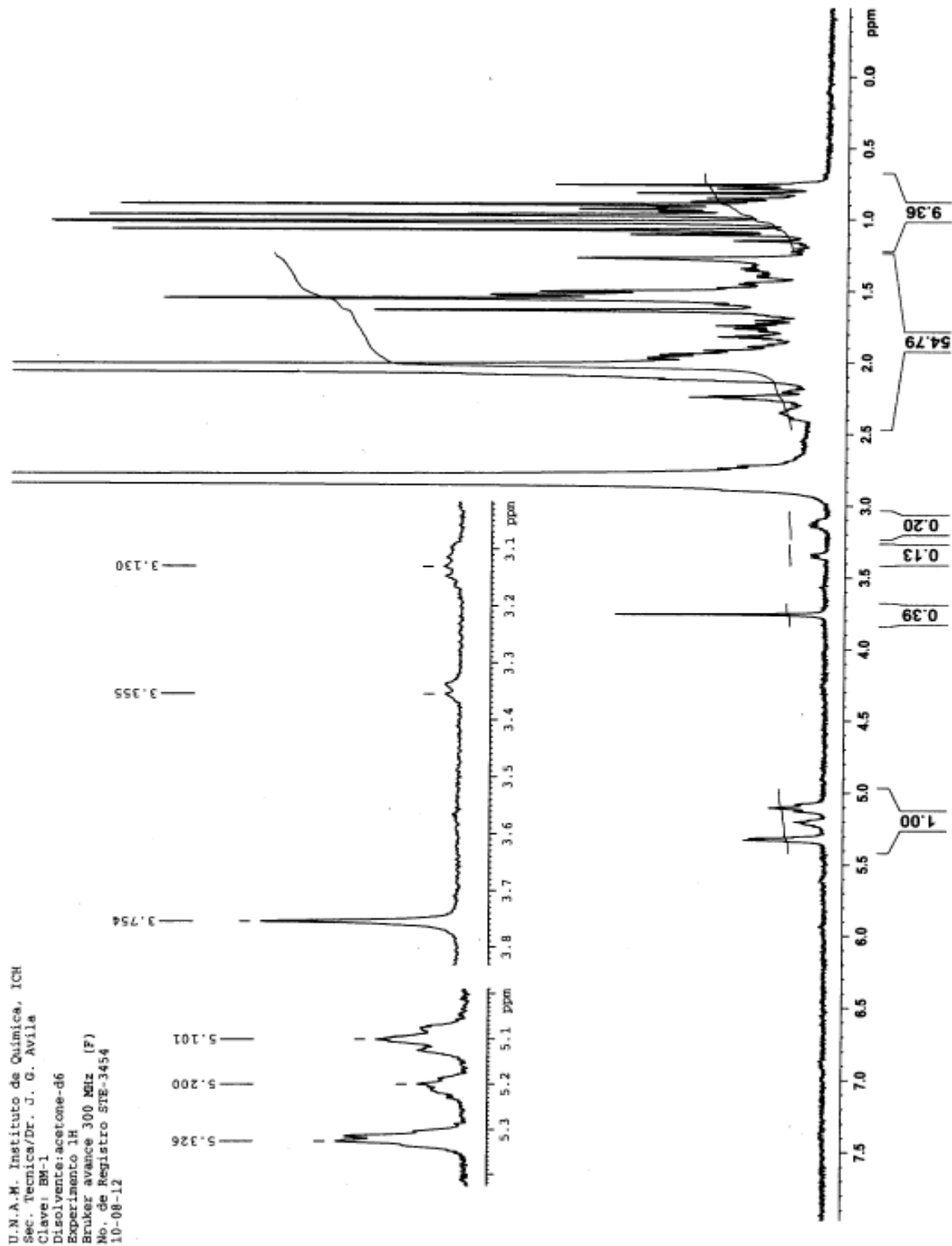


Fig. 20. Espectro de RMN de ^1H del precipitado obtenido del extracto ACS1.

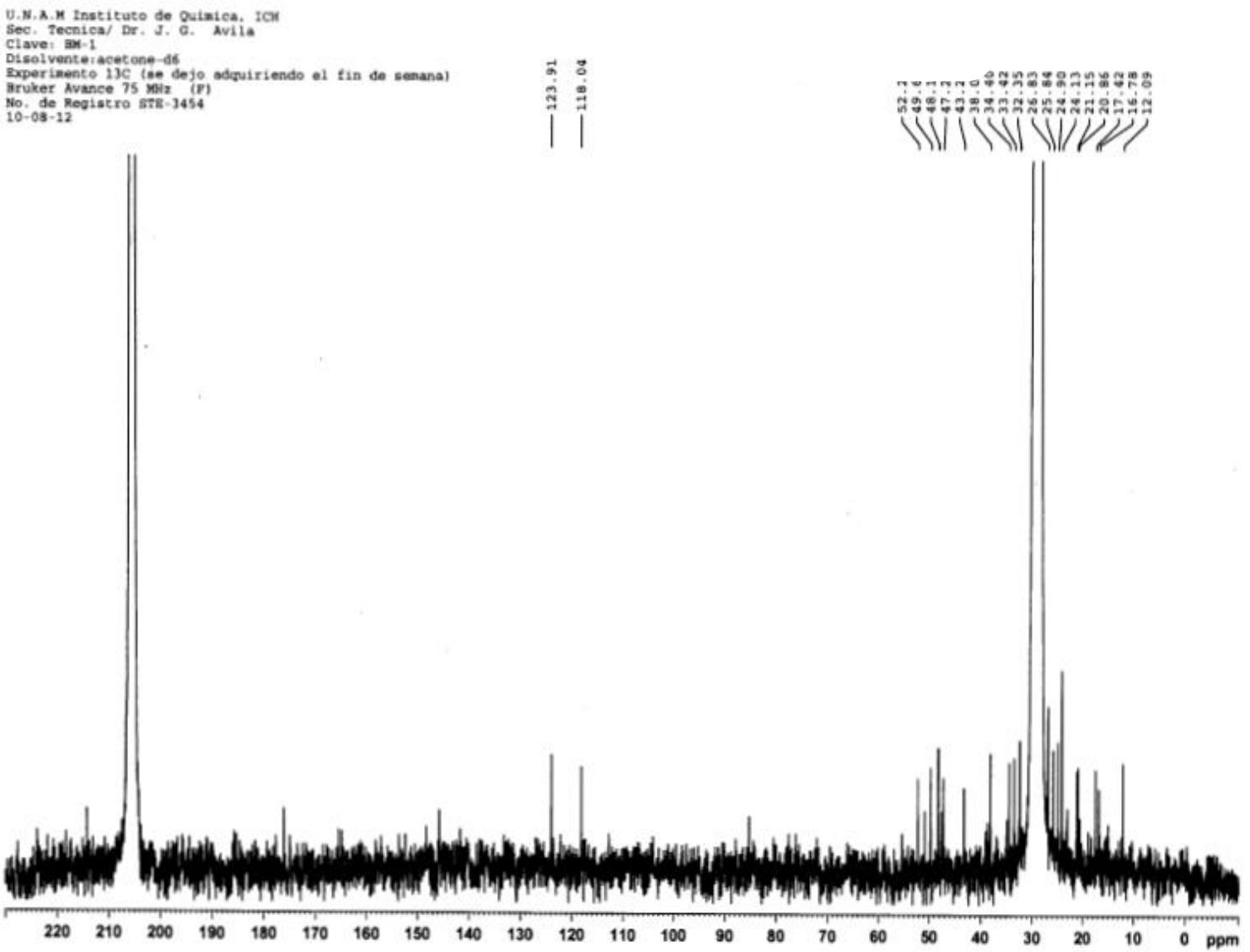


Fig. 21 Espectro de RMN de ^{13}C del precipitado obtenido del extracto ACS1.

Discusión del análisis espectroscópico de los precipitados aislado de los extractos de corteza

De acuerdo a las señales mostradas en los espectros RMN de ^1H y ^{13}C y a lo reportado en la literatura (Martínez *et al* 2013) se dedujo que el componente principal del precipitado a es un triterpeno derivado del oleanano.

Los resultados del análisis por RMN ^1H y RMN ^{13}C del precipitado aislado del extracto ACS1 muestran que este es una mezcla aunque se puede identificar un compuesto principal el cual muestra señales similares a los derivados del ácido oleanóico (Martínez *et al*, 2013). Estos compuestos pertenecen al grupo de los triterpenos, encontrándose principalmente en los aceites de oliva así como en la especie *Salvia breviflora* (Cuevas *et al*, 1986) siendo este el primer reporte para la especie *B. morelensis*. La presencia de este compuesto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis por HPTLC corroborando que los triterpenos se encuentran en abundancia en las resinas de *B. morelensis*, donde proporcionan protección frente a la desecación y contra diversos agentes microbianos y herbívoros. Algunos trabajos reportan que los compuestos derivados del oleanano presentan actividades biológicas de importancia como: antitumorales, antibacterianos, antioxidantes, hepatoprotectores e incluso antivirales (Martínez *et al*, 2013).

Espectroscopía IR de los precipitados aislados de los extractos ACS2 y MSC1.

El análisis por espectroscopía IR del precipitado B aislado del extracto ACS2 y del precipitado C aislado del extracto MCS1 mostró que ambos son mezclas sin embargo es posible identificar bandas de absorción características de los componentes principales las cuales se muestran a continuación:

Precipitado B extracto ACS2

El espectro de IR del precipitado B obtenido del extracto ACS2 mostró las siguientes bandas de absorción: En 1638 cm^{-1} bandas características de dobles ligaduras. En 1703 cm^{-1} se detectó un grupo carbonilo. En 2938 cm^{-1} la señal pertenece a uniones carbono hidrogeno. Y por último en 3437.15 cm^{-1} la señal al grupo hidroxilo (Tabla 19) (Figura 22).

Tabla 19. Bandas de absorción del precipitado B.

Intervalo cm^{-1}	Grupo funcional
1638	Doble ligadura
1703	Carbonilo
2938	Carbono-hidrogeno
3437.15	OH

Las bandas de absorción presentes en el espectro de IR del precipitado B aislado del extracto ACS2 permiten deducir que el componente principal de la mezcla es de ácidos grasos

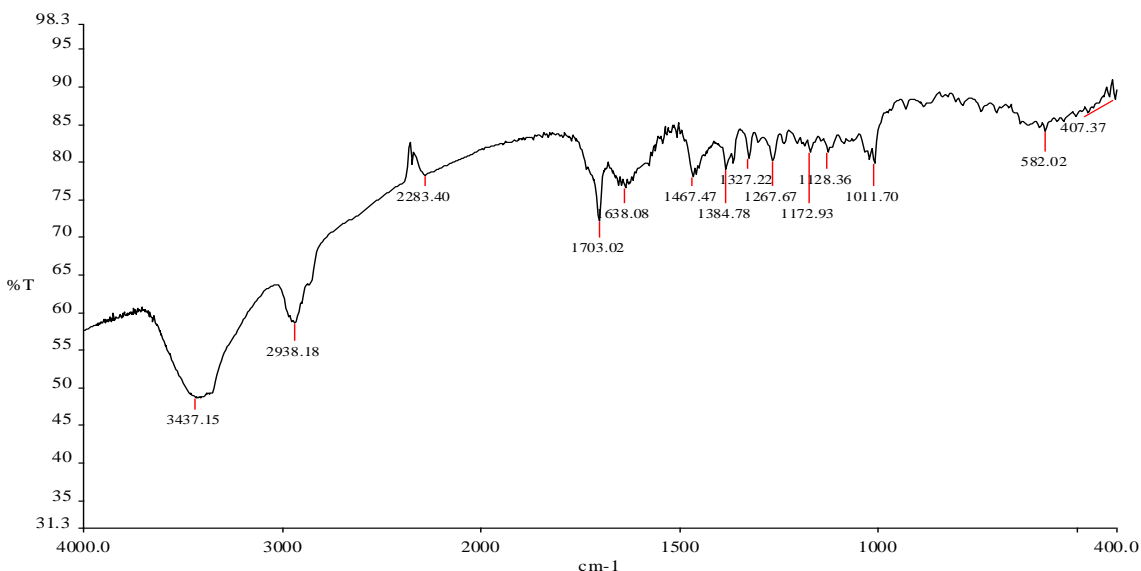


Fig. 22 Espectro infrarrojo del precipitado C aislado del extracto ACS2.

Precipitado C extracto MCS1

En cuanto al precipitado C aislado de la fracción M del extracto MCS1 este mostró las siguientes bandas de absorción en el espectro IR: En 1095.71 cm^{-1} banda característica de uniones carbono-hidrogeno. En 1520.19 cm^{-1} correspondiente para anillos aromáticos.

La banda de absorción en 1614.94 pertenece a dobles ligaduras. Se detectaron carbonilos a 1704 cm^{-1} . En 2900 cm^{-1} banda perteneciente a uniones carbono-hidrogeno. Por último en 3354 se detectó un grupo hidroxilo (tabla 20) (Figura 23).

Tabla 20. Bandas de absorción del precipitado C.

Intervalo cm^{-1}	Grupo funcional
1095.71	Carbono-hidrogeno
1520.19	Aromático
1614.94	Doble ligadura
1704	Carbonilo
2900	Carbono-hidrogeno
3354	OH

Las bandas de absorción en el espectro de IR del precipitado λ aislado del extracto MCS1 nos permiten confirmar que el componente principal de la mezcla es un flavonoide.

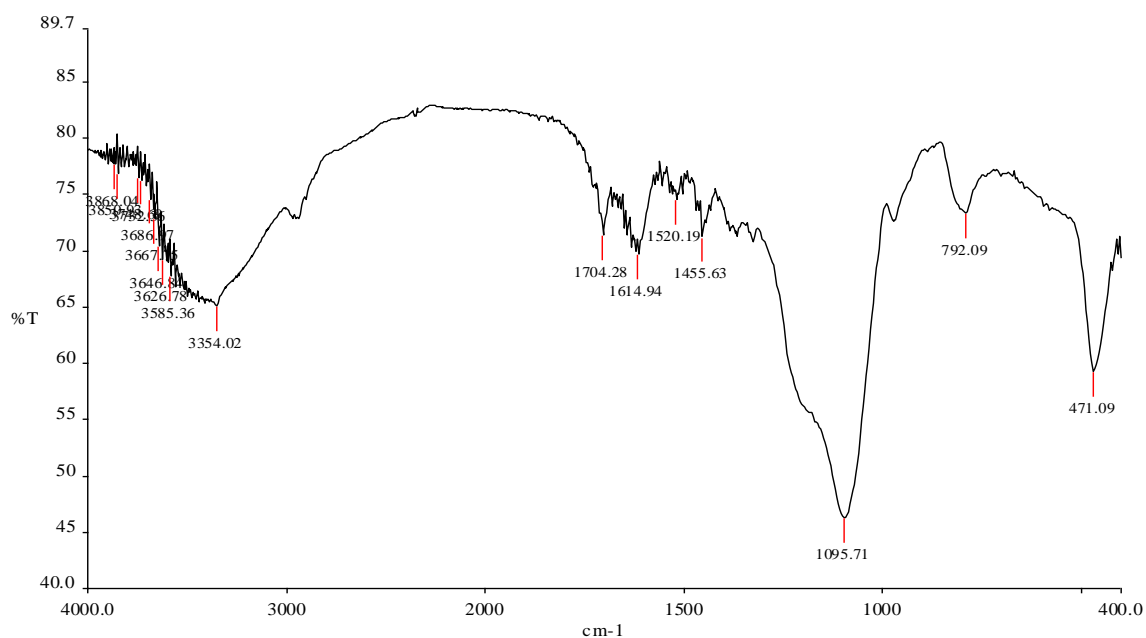


Fig. 23. Espectro infrarrojo del precipitado C obtenido del extracto MCS1.

Discusión del análisis por infrarrojo de los precipitados obtenidos de los extractos ACS2 Y ACS2

En cuanto al análisis por espectrometría IR este muestra, los desplazamientos químicos característicos de ésteres de ácidos grasos en el precipitado B aislado del extracto ACS2 lo cuales conforman la presencia de ceras. Con lo cual se puede decir que estos compuestos también se encuentran en concentraciones abundantes en los extractos acetónicos de *B. morelensis* en conjunto con los triterpenos proporcionando protección como barrera física contra factores abióticos como las altas temperaturas y bióticos ya que estos compuestos presentan efectos sobre diversos patógenos que pudieran ingresar a la planta por alguna herida provocada insectos u otro tipo de organismos (Ambruster, 2003).

Por último el precipitado y aislado del precipitado MCS1 muestra bandas de absorción características para flavonas/ flavonoles estos resultados permiten confirmar que estos compuestos son característicos de los extractos metanólicos de corteza de *B. morelensis*. Estos metabolitos se encuentran de manera abundante en las maderas de diversos grupos de plantas vasculares donde además de proporcionar coloración también son compuestos con actividad insecticida y alelopática pues evitan que la planta sufra ataques por parte de plantas parásitas (Harborne, 1994; Gould y Lister, 2006).

Conclusiones

- *Bursera morelensis* presenta una importante variación en la diversidad y concentración de los compuestos que produce.
- Las épocas mayor producción y diversidad de compuestos se presentan previo al inicio de la época de floración y durante la época de producción y dispersión de semillas.
- Los extractos hexánicos y acetónicos de *Bursera morelensis* presentan una importante concentración de triterpenos.
- Los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides son compuestos característicos de los extractos acetónicos y metanólicos de *Bursera morelensis*.
- El óxido de cariofileno es el principal terpeno presente en los extractos hexánicos de *Bursera morelensis*.
- Los fitoesteroles son compuestos característicos de los extractos hexánicos de *Bursera morelensis*.
- La mezcla aislada del extracto ACS1 presenta como constituyente principal un compuesto derivado del oleanano.

Referencias.

- Abundis, B. L. A. M. Barajas M. J. Tenorio. L. P. 2004 Anatomía de maderas de México: Árboles y arbustos del matorral xerófilo de Tehuacán, Puebla. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF. pp. 28.
- Ambruster, W. S. 2003. The many facets of amber and resin. *Trends in Ecology and Evolution*. 18(12):614.
- Arias, M. A. 2001. Separación de flavonoles de *Calendula officinalis* por cromatografía de partición centrifuga. Tesis en Química. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 9.
Bakkali, F; Averbeck, S; Averbeck, D; Waomar, M., 2008. Biological effects of essential oils a review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446–475.
- Becerra, J. X. & D. L. Venable. 1999. Nuclear ribosomal DNA phylogeny and its implications for evolutionary trends in Mexican *Bursera* (Burseraceae). *Amer. Journ. Bot.* 86(7): 1047-1057.
- Becerril, C.F. 2009. Morfología y anatomía del fruto del género *Bursera*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM. México pp. 16-17.
- Camargo. N. Rosa. M. 2013. Variación en la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera fagaroides*. Tesis de licenciatura Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. pp. 28-55.
- Canales, M; Hernández, T. Caballero, J. Romo de Vivar, A. Avila. G. Duran, A; Lira. R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 429–439.
- Croteau, R Kutchan, T Lewis. N. 2000. Buchanan, B. B; Grissem, W; Jones L. R; (Eds). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland Estados Unidos. pp. 1261-1263, 1286-1289
- Cuevas, G; Collera, O; Garcia, F; Cardenas. J; Maldonado, E; Ortega, A. 1986. Diterpenes from *Salvia breviflora*. *Phytochemistry*. 26 (7): 2019-2021.
- De la Cruz-Cañizares J, Doménech-Carbó MT, Gimeno-Adelantado JV, Mateo-Castro R, Bosch-Reig F. 2005. Study of *Burseraceae* resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography–mass spectrometry and

- pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1093:178.
- Dey, P. M; Harbone, J. B. 1997. *Biochemical plant ecology*. Plant biochemistry. Academic. San Diego California. Estados Unidos de America. pp. 506-515.
 - Espinosa, E. L. 2012. Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* Engler. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 19-20.
 - Ferrara, V. T. I; Vergara, G. O. J. 2012. Estudio espectroscópico al infrarrojo de pigmentos, lacas y aglutinantes utilizados en la pintura novohispana del siglo XVI. Tesis de licenciatura en Química. Facultad de química. UNAM. México D.F. pp.42.
 - García, G. H. A; Cerda, G. R. C. M; Hernández, H. J. D; Román, M. L. U; Joshep, N. P. 2008. Oxygenated verticillene derivatives from *Bursera suntui*. *Phytochemistry*. 69: 2844–2848.
 - García. J. D. 1998. Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de proteínas hidrosolubles de un medicamento utilizando HPTLC y densitometría. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. pp.9.
 - García. J. D. 1998. Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de proteínas hidrosolubles de un medicamento utilizando HPTLC y densitometría. Tesis de licenciatura en químico farmacéutico biólogo. Facultad de Estudios superiores Zaragoza. México D.F. pp.9.
 - Gottlieb, O. R; Yoshida, M; 1989. Natural products of woody plants: Chemicals extraneous to the lignocellulosic cell wall / John w. rowe, ed. Springer Verlag. Berlin Alemania. pp. 442.
 - Gould, K; Lister, C. 2006. Flavonoids functions in plants. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, (eds) Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham. CRC Press/Taylor & Francis. Boca Ratón Florida. Estados Unidos de América. pp. 489-490.
 - Hamond. K. B. 2000. Buchanan, B. B; Grisse, W; Jones L. R (Eds). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland Estados Unidos. pp. 1102-1249.
 - Harborne, J. B. 1994. *The flavonoids: advances in research since 1986* Chapman and Hall. Londres Inglaterra. pp. 533-539.

- Harris, C. D; 2001. Análisis químico cuantitativo; Versión Española por Vicente Berenguer Navarro, Ángel Berenguer Murcia. 2a edición. Barcelona; México. Reverte pp. 674: 693-694.
- Heldt, W. H; 1997. Biochemistry and molecular biology, Oxford university press.
- Ikan, R. 2008. Selected topics in the chemistry of natural products Singapur: World Scientific. pp. 7.
- Juárez Caballero L.F. 2008. Análisis de la distribución de *Bursera linanoe* (Lave) Rzed, Calderón & Medina (Burseraceae) en el sureste del estado de Puebla como base para su manejo. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. pp. 9
- Jutiviboonsuk, A; Zhang, H; Teng, T. G; Ma, C; Nguyen, V. H; Nguyen, M. C; Nuntavan, B; Soejarto, D. D; Fong, H. S. H. 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. Phytochemistry. 66: 2745–2751.
- Jolad S.D; Wiedhopf .R.M y Cole, J.R, (1977b) Citotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae); deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin J.P harmaceutical Science. pp. 66(6), 892-3.
- Ledesma Mora M.E. 2009. Género *Bursera*. Usos y metabolitos secundarios. Tesina de Licenciatura de Biología Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. pp. 5-6.
- Llorente-Bousquets, J. S. Ocegueda, S. 2008. Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 283-322.
- López, H. L. R. 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. pp.10-16.
- Maldini, M; Montoro, P; Piacente, S. Pizza, C. 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. Bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. Phytochemistry. 70: 641–649.
- Martínez, A; Rivas, F; Perojil, A; Parra, A; García, G. A; Fernández, V. A. 2013. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*. Phytochemistry. 94: 229–237.

- Medina-Lemos R 2008. Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlan, Fascículo 66 Burseraceae. Departamento de Botánica, Instituto de Biología UNAM, México pp. 2-3.
- Mendoza, M. U. 2011. Efecto sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* del extracto metanólico de la corteza de *Bursera simaruba*. Actividad anticariogénica del lignano picropoligamaina. Tesis de licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM. México. pp. 44-45.
- Mulh, B. E. A. 2013. Obtención de ácido caféico mediante la hidrólisis de ácidos clorogénicos con feruloilsterasas comerciales inmovilizadas. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos. Facultad de Química. UNAM. México. pp.15.
- Nicolás, C. R. M. 2013. Variación en la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera fagaroides*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad. UNAM. México, pp. 17-43.
- Noguera, B. Díaz, E; García, M. V; San Feliciano, A; Lopez-Perez. J. L; Israel, A. 2004 Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). Journal of Ethnopharmacology. 92:29–133.
- Peters, M. C; Purata E. S; Chibinil, B. J; Lopez, M. A; Ambrosio, M. 2003. The life and times of *Bursera glabrifolia* (H. B. K) Engl. in Mexico: a parable for ethnobotany. Economic Botany. 57:437.
- Puebla, P. A. M; Huacuja, R. L; Rodríguez, O. G; Villaseñor, G. M. M; Beltrab, M. M de L; Celis, A; Sandoval, R. L. 1998. Cytotoxic and Antitumour Activity from *Bursera fagaroides* Ethanol Extract in Mice with L5178Y Lymphoma. Phytoteraphy Research.12:545–548.
- Purata V.S.E. (Ed.) 2008. Uso y manejo de los copales aromáticos: resinas y aceites. CONABIO/RAISES. México. pp. 15-17.
- Queiroga, L. C; Texeira, D. M. C; Baesa, R. B; Melillo de Magalhães, M. 2007. Linalol production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. Fitoterapia. 78: 327–328.
- Reguera, S. J de J; 2011. Caracterización de la actividad de extractos vegetales en la alimentación de *Spodoptera frugiperda* (Smith) como modelo de estudio. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp. 76-78.

- Rodríguez, C. M. 2014. efecto amebicida de los extractos metanólicos de tres especies del género *Bursera* contra *Naegleria fowleri*. Tesis de Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. pp. 20.
- Rojas, S. B. 2012. Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (Rose) Standl, y validación de su actividad antimicrobiana. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México, pp. 17-24.
- Romo de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa. México. pp.59-70.
- Rosas, A. P; Arteaga, N. P; Reynoso, O. R; Vilagómez, C. J. C; Sabanero, L. M; Puebla, P. A. M; Méndez, C. 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.
- Rouessac, F. Rouessac, A. 2003. Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas. McGraw-Hill Interamericana. pp. 59.
- Rzedowski J. 1986. Vegetación de México. Limusa México pp.432.
- Rzedowski J. Guevara F.F; 1992 Flora del Bajío y de regiones adyacentes Fascículo 3 familia Burseraceae Instituto de ecología A.C Centro regional del bajío Pátzcuaro, Michoacán México. pp. 20-25.
- Rzedowski.J y G.Calderon de Rzedowski 2004. Copales y cuajitoes. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza-World Wildlife Fund. México. pp. 193-198.
- Rzedowski. J y Ortiz. E. 1988. Estudios quimiotaxonómicos de *Bursera* (Burseraceae). II. Una especie nueva de origen híbrido de la barranca de Tolantongo Estado de Hidalgo. Acta Botánica Mexicana. 1:11-19.
- Salgado, L. A. 2009. Aislamiento de los productos antialimentarios contra *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) de las semillas de *Bursera grandifolia* (Engl). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México, pp. 54-55.
- Schupp, E. W., and M. Fuentes. 1995. Spatial patterns of seed dispersal and the unification of plant population ecology. Ecoscience. 2:267-275.

- Serrano, P. R. 2013 Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael Coxcatlán Puebla. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 2013. pp.83-84.
- Silvestrain, M. R; Clayton, B. G; Morrill; C. T. 1981. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. Diana. México D.F. México. pp.85.
- Souza, P. M; Machado L. I. M; Braz-Fihlo. R. 1989. Six flavonoids from *Bursera leptopholeos*. *Phytochemistry*, 28 (9): 2467-2470.
- Stacey R. J. Cartwright, C.R. McEwan, C. 2006. Chemical characterization of ancient mesoamerican "copal" resins: preliminary results. *Archaeometry* .48(2): 323-340.
- Symasundar, K. V; Mallavarapu, G. R; 1995. Two Triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*. 40 (1): 337 339.
- Velázquez, J. R. J; Torres, V. M; Cerda. G. R. C. M; Hernandez, H. J. D; Román, M. L. U; Manríquez, T. J. J; Gómez, H. M. A; Valdez, C. A; Motilva, V; Garcia, M. S; Talero, E. Ávila, J; Nathan, J. P. 2011. Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*. 72:2237–2243.
- Vences, C. V. C. 2012. Estudio químico de la resina y el extracto hexánico de la corteza de *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Determinación de la actividad de los compuestos aislados sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Tesis de Licenciatura en Química. Facultad de Química. UNAM. México pp. 52-53.
- Wagner, H. Bladt, S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2a edición.
- Wink, M. 1999. Biochemistry of plant secondary metabolism. CRC Press.pp 5-6.
- Yukawa, C. Imayoshi, Y. Iwabuchi, H. Komenmushi, S. Sawabe, A. 2006. Chemical composition of three extracts of *Bursera graveolens*. *Flavour and Fragrance Journal*. 21: 236.

Anexos

Anexo 1. Constituyentes identificados en el análisis por densitometría de los extractos metanólicos de *B. morelensis*.

Constituyente	rf	Extractos donde tuvo presencia
Constituyente 1	0.11	MRS1, MRS2, MRL2, MHL2
Constituyente 2	0.01	MCS2, MRS1, MRS2, MRL2, MHL1, MHL2
Constituyente 3	0.06	MCS1, MCS2
Constituyente 4	0.93	MRS2, MRL2, MHL1, MHL2
Constituyente 5	0.17	MCS1, MCS2
Constituyente 6	0.31	MCS2
Constituyente 7	0.30	MCS1
Constituyente 8	0.27	MRS1, MRS2
Constituyente 9	0.31	MCS1, MCS2
Constituyente 10	0.26	MRS2, MRL2
Constituyente 11	0.33	MCS2
Constituyente 12	0.60	MCS2
Constituyente 13	0.62	MCS2
Constituyente 14	0.99	MHL1, MHL2
Constituyente 15	0.59	MCS1
Constituyente 16	0.64	MCS1, MRS2
Constituyente 17	0.25	MRS2
Constituyente 18	0.47	MRL2
Constituyente 19	0.45	MRS2

Constituyente	rf	Extractos donde tuvo presencia
Constituyente 20	0.72	MCS2
Constituyente 21	0.09	MHL1
Constituyente 22	0.78	MCS1
Constituyente 23	0.75	MCS1
Constituyente 24	0.55	MRL2
Constituyente 25	0.43	MRS2
Constituyente 26	0.95	MRS2
Constituyente 27	0.67	MRS1
Constituyente 28	0.58	MRL2
Constituyente 29	0.90	MCS1, MCS2
Constituyente 30	0.72	MRS1
Constituyente 31	0.88	MRS1
Constituyente 32	0.95	MCS1

Anexo 2. Resultados del fraccionamiento por columna abierta de los extracto HCS1.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Alícuota recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)	Analisis
Eter de petróleo: <u>Acetona</u>	9.5-0.5	1-5	1-5	A	0	
	9:1	6-11	6-11	B	0	
	8:2	12	12-30	C	3.299	CG-EM
		13		D	0.503	CG-EM
		14-15		E	0.357	CG-EM
		16-17		F	0.740	CG-EM
		18		G	0.12	CG-EM
		19		H	0.685	CG-EM
		20-21		I	1	CG-EM
		22-25		J	1.22	CG-EM
		26-30		K	1.218	CG-EM
		30-32	30-50	L	0.033	CG-EM
	33-40		M	0.072	CG-EM	
	41-50		N	0.228		
	7:3	51-53	51-70	O	0.024	
		54-60	51-70	P	0	
61-64		51-70	Q	0.007		
6:4	65-79	51-70/71-79	R	0.021		
5/5	81/90	81/90	S	0.143	CG-EM	
<u>Acetona-metanol</u>	5/5	91	91-98	T	0.602	CG-EM
<u>Acetona-metanol</u>	5/5	92-98	91-98	U	0	
<u>Metanol</u>	100%	99-106	99-108	V	4.18	

Anexo. 3 Resultados del fraccionamiento por columna abierta de los extracto ACS1.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Alícuotas recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)	Análisis
AcOEt	100%	3-5	3-28	A1	0.276	HPLC
		6-8		A2	0.068	
		9-11		A3	0.138	
		12-16		α *	0.130	RMN
		17-19		A4	0.105	
		20-23		A5	0.062	
		24		A6	0.075	
		25-28		A7	0.012	
AcOEt	9.5-0.5	29-33	29-44	B1	1.995	
		34-37		B2	0.124	
		38-41		B3	0.002	
		42-41		B4	0.036	
AcOEt	9:1	50-60	50-73	C	0.050	HPLC
		51-63		D	0.046	
		64-76		E	0.027	HPLC
AcOEt/Meta nol	8:2	77-96	77-96	F	0.450	
AcOEt/Meta nol	7:3	97-112	97-112	G	0.330	
AcOEt/Meta nol	6:4	113-119	113-125	H	0.880	HPLC
		120-125		I	0.11	
AcOEt/ Metanol	5:5	126-136	126-136	J	0.042	
Metanol	100%	137-142	137-204	K	0.044	
		143-149		L	0.001	
		150		L1	0.043	
		153-157		M	0.015	
		159-180		N	0.009	HPLC
H ₂ O /Metanol	8.5/1.5	205/210	205/210	O	0.415	
H ₂ O	100%	211/214	211/214	Q	0.048	

Anexo 4. Resultados del fraccionamiento por columna abierta de los extracto ACS2.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Alícuotas recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)	Análisis	
Diclorometano	100%	1	1-23	1	0.323		
		2		2	0.068		
		3		3	0.018		
		4		4	0.034		
		5		5	0.024		
		6-8		D *	0.078	IR	
		9-12		D1	0.110		
		13-20		E	0.245		
Diclorometano/AcOEt	9:1	21-23	24-54	E1	0.016		
		24-29		E2	0.136	HPLC	
		30-33		F	0.366		
	85:15	34	56-66	F1	1.062		
		35-54		G	0.480	HPLC	
		56-66		H	0.437		
	70:30	67-72	67-72	I	0.327	HPLC	
	1:1	73:78	73-87	I2	0.356		
	1:1	79		I3	0.132		
	1:1	80-82		I4	1.023		
	1:1	83-87		I5	0.181		
	AcOEt -Metanol	9:1	88-98	88-98	J	0.994	
	AcOEt -Metanol	8:2	99-107	99-107	L1	0.141	HPLC
			108-114	108-114	L2	0.340	
			115-134	115-134	L3	0.425	
7:3		135-143	135-143	M	3.560		
6:4		144-154	144-154	N	2.741		
5:5		155-160	155-160	N2**	0.283		
Metanol-Agua	9:1	161-165	161-165	N3**	0.346		
	8:2	166-.172	166-.172	O**	0.245		

Anexo 5. Resultados del fraccionamiento por columna abierta de los extracto MCS1.

Eluyente	Proporción	Fraciones combinadas	Alícuotas Recolectadas	Clave de la fracción	Peso (g)	Análisis
Diclorometano	100	3	1-3	1	0.340	
DM-MeOH	9:1	9	4-13	2	0.473	
		3	14-19	C	3.213	
	85:15	4	20-24	D	2.589	
DM-MeOH	8:2	8	25-33	E	0.283	
		6	34-40	F	0.421	
	75:25	14	41-55	G	0.234	
	7:3	6	56-62	H	0.321	
DM-MeOH	65:35	6	63-79	H1	0.424	
	60:40	9	80-89	J	0.521	IR

Anexo 6. Fracciones analizadas por HPLC de los extractos ACS1.

No de constituyente	Tiempo de retención (min)					
	Fracción					
	A1	C	E	H	K	N
1	1.466	0.779	1.466	1.672	1.478	1.703
2	1.928	1.447	1.689	1.869	1.734	1.837
3	2.078	1.749	1.832	2.485	2.091	2.541
4	2.306	1.841	2.016	2.66	2.489	2.818
5	2.758	2.327	2.55	2.806	2.672	3.454
6	2.994	2.562	3.474	3.466	2.788	
8	3.403	2.759	4.432	4.734	3.376	
9	4.134	3.455	4.728		4.728	
10	4.54	3.564	5.851		5.701	
11	5.074	4.075	7.936			
12	6.811	4.457	9.492			
13	8.134	4.792	10.925			
14	9.173	5.788	12.103			
15	10.936	6.406				
16	11.48	7.147				
17	14.428	8.669				

Anexo 7. Fracciones analizadas por HPLC de los extractos ACS2

Fracciones							
No de constituyente	E2	G	I	L	L1	R	
1	1.462	1.474	1.449	1.456	1.46	1.481	
2	1.778	1.813	1.902	1.852	1.994	2.448	
3	2.55	2.513	2.509	2.005	2.527	2.582	
4	2.805	2.806	2.785	2.53	3.378	2.74	
5	4.409	3.456	3.384	3.392	4.248	3.353	
6	4.663	3.725	3.651	4.16	4.708	3.919	
7	5.478	4.409	4.13	4.625	5.67	4.177	
8		4.809	5.34	5.302	6.89	4.738	
9		5.409	7.294	5.661	7.862	4.968	
10		9.099	11.292	7.185	9.556	5.662	
11		11.196	13.413	11.152	11.268	6.099	
12					12.966	6.894	
13						8.303	
14						9.556	
15						12.161	
16						13.359	

