



UNIVERSIDAD DEL MAR  
CAMPUS PUERTO ÁNGEL

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXUDADO DE

*Bursera simaruba* L. Sarg. (1890)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

CON LA ESPECIALIDAD EN QUÍMICA AMBIENTAL

PRESENTA

**I.Q. OCTAVIO ANTONIO NORIEGA RAMOS**

DIRECTOR

**M.C. ALEJANDRO REGALADO MÉNDEZ**

PUERTO ÁNGEL, OAXACA

AGOSTO 2010



# UNIVERSIDAD DEL MAR

Puerto Escondido - Puerto Angel - Huatulco

O A X A C A

Puerto Ángel, Oaxaca a 03 de Agosto del 2010

DR. EDGAR ROBLES ZAVALA  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
UNIVERSIDAD DEL MAR  
P R E S E N T E

Después de haber analizado y evaluado la tesis "CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL EXUDADO DE *Bursera simaruba* L. Sarg. (1890)" que presenta el I.Q. OCTAVIO ANTONIO NORIEGA RAMOS.

Por este conducto, le comunicamos que la tesis SI cumple con los requisitos académicos para que el citado tesista presente el correspondiente examen profesional.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

Atentamente

Dr. Juan Báez González  
Revisor

Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares  
Revisor

Dr. Héctor Santiago Romero  
Revisor

Dr. Rolando Cardeña López  
Revisor

M. C. Alejandro Regalado Méndez  
Director de tesis

## RESUMEN

Se presenta el estudio fisicoquímico del exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) para proponerlo como alternativa a las gomas actualmente disponibles. La muestra se colectó en El Hule, Santa María Huatulco, Oaxaca durante la temporada seca. El tratamiento en laboratorio consistió de disolución en agua, filtración y secado por liofilización. Se sometió una fracción a purificación en cromatografía por exclusión de tamaño. Se determinó el perfil de solubilidad del exudado en agua y de pH hasta 50% p/v. La reología se evaluó por viscosímetro Brookfield® a 40% p/v y por reómetro con cilindros concéntricos en disoluciones al 3-15% p/v. La tensión superficial en disoluciones al 3-15 % p/v se registró por el método del anillo de Du Nouy. El diámetro hidrodinámico al 5% p/v se determinó en un analizador Zeta Sizer Nano Malvern®. La capacidad calorífica se monitoreó con un calorímetro diferencial de barrido hasta 100 °C. El contenido de humedad en el cristal, extracto crudo y puro se obtuvo por un analizador termogravimétrico. El exudado se sometió a una hidrólisis ácida para posteriormente identificar por Cromatografía Líquida de Alta Resolución la composición de azúcares. Se realizaron análisis fitoquímicos y de fitotoxicidad. Se evaluó como agente tensoactivo con una emulsión O/W observada al microscopio durante 20 días. Los resultados obtenidos fue un rendimiento del 40%; valores de pH que oscilaron entre 4.3 y 5.3; la viscosidad por Brookfield resultó de 65 mPa·s mientras que con el reómetro de 3.22 a 42.29 mPa·s, se comportó como fluido newtoniano a baja concentración y como pseudoplástico en alta concentración; la tensión superficial resultó de  $49.06 \pm 1.24$  mN/m; el diámetro hidrodinámico fue de  $1865.00 \pm 49.66$  nm; la capacidad calorífica en el extracto crudo es  $6.1086 \pm 0.0736$  J/g °C y en el extracto puro de  $2.6484 \pm 0.0027$  J/g °C; la humedad en el cristal, extracto crudo y purificado fue de 11.83, 14.30 y 16.06% respectivamente; se identificó al monosacárido xilosa como un constituyente del exudado; la presencia de taninos en el extracto crudo resultó de 0.229 mg-eq catequina/g muestra; la fitotoxicidad se manifestó en concentraciones mayores al 15% p/v; la cinética de coalescencia en la emulsión O/W fue de  $1.63 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>, indicativo de estabilidad. El exudado de *Bursera simaruba* manifestó buen rendimiento, gran solubilidad en agua, pH y humedad similares a otras gomas, viscosidad alta a baja concentración, disminución efectiva de la tensión superficial, un constituyente sacárido, taninos mínimos que promuevan su fitotoxicidad y estabilidad en emulsiones O/W; por lo que se considera como un potencial agente tensoactivo en sistemas de emulsiones.

*Por aquellos que nunca mueren,  
solo se van y acompañan de otra forma.*

*A la familia,  
por su apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Alejandro Regalado Méndez quién brindó origen, dirección y sentido a ésta investigación; estableciendo en todo momento una comunicación directa y honesta que permitió con éxito su culminación.

Al Dr. José Marco Vinicio Ramírez Mares, Dr. Héctor Santiago Romero, Dr. Rolando Cardeña López y al Dr. Juan Gabriel Báez González por el apoyo en los experimentos, colecta y comentarios durante la revisión de este trabajo.

Al Dr. Jaime Vernon Carter, Dr. Rubén Jiménez Alvarado y demás integrantes del laboratorio de Biopolímeros T-166 por las facilidades otorgadas para la realización de pruebas en la UAM-Iztapalapa.

A la Dra. Beatriz Hernández Carlos, Dra. Rosario Enríquez Rosado, M.C. María Nieves Trujillo Tapia, Dr. Aitor Aizpuru, M.C. José Alberto Montoya Márquez, Dr. Francisco Benítez y al Ing. Aurelio Cerdaneres que ofrecieron disposición y experiencia en asesorías.

A Coral, Mayra y Jorge, excelentes soldados aliados en el laboratorio.

A Ernesto, por su convicción ambiental y compañero en mi incursión a este campo.

A Karina, Citlally, Linda, Julia, Xóchitl, Edith, Claudia, Sergio, Cervando, Ricardo, Emanuel e Ignacio, engranes hilarantes de esta aventura.

A CONACyT por la beca otorgada con registro 212252.

Al resto de personas con las que se coincidió fortuita o cotidianamente y son parte de esta historia.

*En la investigación es incluso más importante el proceso que el logro mismo.*

Emilio Muñoz (científico español)

...y encontrarlos al lado del camino, fue parte significativa de ello: ¡gracias!

# ÍNDICE

RESUMEN .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
1. MARCO TEÓRICO .....	1
1.1. Exudados de plantas.....	2
1.1.1. Gomas y mucílagos.....	2
1.1.2. Resinas .....	3
1.1.3. Legislación .....	5
1.2. Caracterización fisicoquímica.....	5
1.2.1. Emulsiones.....	6
1.2.2. Reología.....	9
1.2.3. Tensión superficial .....	12
1.2.4. Tamaño de partícula .....	13
1.2.5. Análisis térmico .....	14
1.2.6. Identificación de gomas.....	15
1.2.7. Alelopatía .....	16
2. ESTADO DEL ARTE .....	19
2.1. <i>Bursera simaruba</i> L. Sarg (1890).....	19
3. OBJETIVOS .....	24
4. HIPÓTESIS .....	24
5. JUSTIFICACIÓN .....	25
6. METODOLOGÍA .....	26
6.1. Colecta .....	26
6.2. Tratamiento al exudado.....	28
6.2.1. Purificación.....	31
6.3. Solubilidad y pH .....	31
6.4. Reología.....	32
6.5. Tensión superficial .....	33
6.6. Tamaño de partícula .....	34
6.7. Calorimetría diferencial de barrido .....	34
6.8. Termogravimetría .....	35

6.9. Composición de azúcares .....	35
6.10. Fitoquímica.....	36
6.11. Fitotoxicidad .....	38
6.12. Estabilidad de emulsiones.....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
8. CONCLUSIONES .....	79
9. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	80
10. LITERATURA CITADA.....	80
11. APÉNDICE .....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos físicos en estabilidad de emulsiones.....	7
	Tomado y modificado de McClements (1999).	
Figura 2.	Clasificación de fluidos.....	11
	Tomado y modificado de McClements (1999).	
Figura 3.	Distribución geográfica del género <i>Bursera</i> en México.....	22
	Tomado de Rzedowski (2005).	
Figura 4.	Distribución geográfica de <i>Bursera simaruba</i> .....	22
	Tomado del Global Biodiversity Information Facility.	
Figura 5.	Sitio de muestreo. El Hule, Santa María Huatulco, Oaxaca.....	26
Figura 6.	Incisiones a <i>Bursera simaruba</i> .....	27
Figura 7.	Colecta de exudados.....	27
	Alejandro Regalado (izquierda), Héctor Santiago (centro) y Octavio Noriega (derecha).	
Figura 8.	Disolución de <i>Bursera simaruba</i> .....	28
Figura 9.	Filtración (izquierda) y filtros utilizados (derecha).....	29
Figura 10.	Disoluciones filtradas.....	29
Figura 11.	Liofilización.....	30
Figura 12.	Liofilizado de <i>Bursera simaruba</i> .....	30
Figura 13.	Exudado de <i>Bursera simaruba</i> .....	41
Figura 14.	Secado de <i>Bursera simaruba</i> por liofilización.....	42
Figura 15.	Valores de pH.....	43
Figura 16.	Reograma para <i>Bursera simaruba</i> por viscosímetro Brookfield.....	45
Figura 17.	Reograma para <i>Bursera simaruba</i> por reómetro.....	45



Figura 18. Viscosidad de <i>Bursera simaruba</i> a distintas velocidades de corte $\dot{\gamma}$ .....	46
Figura 19. Viscosidad de <i>Bursera simaruba</i> crudo.....	47
Figura 20. Viscosidad de exudados a distintas concentraciones.....	48
Figura 21. Tensión superficial en <i>Bursera simaruba</i> puro y crudo.....	49
Anillo de Du Nouy y placa Wilhelmy.	
Figura 22. Tensión superficial en exudados. Anillo de Du Nouy.....	50
Figura 23. Diámetro como tamaño de partícula en disoluciones al 5% p/v.....	51
Figura 24. Polidispersidad en la determinación del tamaño de partícula.....	52
Figura 25. Capacidad calorífica de <i>Bursera simaruba</i> crudo y puro.....	53
Figura 26. Perfil termogravimétrico de <i>Bursera simaruba</i> cristal, crudo y puro.....	54
Figura 27. Cromatograma por CLAR de <i>Bursera simaruba</i> .....	56
Figura 28. Cromatograma por CLAR para xilosa.....	57
Figura 29. Cromatograma por CLAR para la coelución <i>Bursera</i> –xilosa.....	58
Figura 30. Determinación cualitativa de taninos.....	59
Ciruelo (izquierda) <i>Bursera simaruba</i> (derecha).	
Figura 31. Curva de calibración para catequina.....	60
Figura 32. Absorbancias de los exudados a $\lambda = 229$ nm.....	61
Figura 33. Crecimiento en raíz e hipocotilo para semillas irrigadas con exudados al 10% y 15% p/v.....	64
<i>Bursera</i> cristal (BsC), <i>Bursera</i> crudo (Bs), <i>Bursera</i> puro (BsP), arábiga (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (Crl) y copal (Cpl).	

Figura 34. Crecimiento en raíz para semillas irrigadas con exudados al 10% y 15% p/v.....	66
<i>Bursera</i> cristal (BsC), <i>Bursera</i> crudo (Bs), <i>Bursera</i> puro (BsP), arábiga (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (Crl) y copal (Cpl).	
Figura 35. Crecimiento en hipocotilo para semillas irrigadas con exudados al 10% y 15% p/v.....	67
<i>Bursera</i> cristal (BsC), <i>Bursera</i> crudo (Bs), <i>Bursera</i> puro (BsP), arábiga (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (Crl) y copal (Cpl).	
Figura 36. Germinación en raíz para semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> .....	69
Figura 37. Fitotoxicidad en raíz para semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> .....	70
Figura 38. Germinación en hipocotilo para semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> ...	71
Figura 39. Fitotoxicidad en hipocotilo para semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> ...	72
Figura 40. Determinación de $K_c$ en emulsiones O/W.....	77
<i>Bursera simaruba</i> (superior) y ciruelo (inferior).	

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Métodos de medición para tensión superficial.....	13
Tabla II.	Taxonomía de <i>Bursera simaruba</i> acorde al Global Biodiversity Information Facility.....	21
Tabla III.	Determinación de viscosidad de <i>Bursera simaruba</i> por viscosímetro Brookfield.....	44
Tabla IV.	Parámetros del modelo de Ostwald de Waelde para <i>Bursera simaruba</i> ....	47
Tabla V.	Tamaño de partícula para diversos exudados.....	51
Tabla VI.	Análisis fitoquímico cualitativo.....	59
	Presencia: ausencia (-); poca (+) y media (++)..	
Tabla VII.	Crecimiento en milímetros para raíz e hipocotilo de semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> a distintas concentraciones ( [ ] ).....	63
Tabla VIII.	Diferencias significativas encontradas por la prueba de Dunnet.....	67
Tabla IX.	Índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) de raíz en semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> a varias concentraciones ( [ ] ).....	68
Tabla X.	Índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) de hipocotilo en semillas irrigadas con <i>Bursera simaruba</i> a varias concentraciones ( [ ] ).....	71
Tabla XI.	Emulsión O/W con copal observada al microscopio.....	74
Tabla XII.	Emulsiones O/W observadas al microscopio.....	75
Tabla XIII.	Diámetro promedio de gotas $\pm 0.5$ nm.....	76
Tabla XIV.	Cinética de coalescencia para <i>Bursera simaruba</i> .....	76
Tabla XV.	Resultados generales en la caracterización fisicoquímica del exudado de <i>Bursera simaruba</i> L. Sarg (1890).....	78

## 1. MARCO TEÓRICO

A continuación se describen los exudados de plantas, así como las características de gomas y resinas. Además, se menciona la legislación mexicana para la colecta y uso de dichos exudados. La caracterización fisicoquímica de agentes tensoactivos para modificar emulsiones y sus limitaciones de aplicación requieren de campos interdisciplinarios, por lo que conceptos, técnicas e información sobre reología, tensión superficial, tamaño de partícula, análisis térmico, identificación química y relaciones alelopáticas es abordada.

Las plantas en su medio natural están expuestas a infinidad de enemigos potenciales, tales como bacterias, insectos o animales que amenazan su preservación. Los exudados de plantas, como gomas y resinas, son un mecanismo de defensa que como metabolitos secundarios las plantas poseen y los cuales han sido de interés en la investigación de sus estructuras y propiedades fisicoquímicas para una posterior aplicación (Langenheim, 2003; Nussinovitch, 2010).

Las gomas y resinas son útiles en la industria de alimentos, farmacéutica, textil, de adhesivos, papel y diversos sistemas emulsificados, donde se utilizan como agentes estabilizadores o espesantes, debido a que presentan estructuras químicas de biopolímeros inocuas que les permite incorporarse como agentes con actividad superficial, denominándoseles hidrocoloides. Las gomas actualmente utilizadas son la goma arábiga, mezquite, tragacanto, agar y xantano principalmente (Imeson, 2010).

Para promover el uso alternativo de gomas y resinas de nuevas especies de plantas es necesario desarrollar una caracterización fisicoquímica que determine si se presentan propiedades similares a los exudados disponibles. Las propiedades físicas y químicas de los exudados tienen gran importancia en determinar su uso final e incursión comercial; éstas van desde el color, forma, aroma, rendimiento, humedad; los efectos de su concentración en la solubilidad, viscosidad, tensión superficial y tamaño de partícula; hasta la determinación química de compuestos que pueda limitar su uso por considerarse tóxicos (Nussinovitch, 2010).

## **1.1. Exudados de plantas**

Las plantas durante su desarrollo poseen metabolitos primarios como parte de los procesos químicos para su crecimiento y reproducción; mientras que, metabolitos secundarios intervienen como reguladores en interacciones ecológicas cumpliendo funciones de defensa y adaptativas (pesticidas naturales, atracción de polinizadores e incrementando la habilidad de una especie para competir con otra en un hábitat dado), promoviendo así su supervivencia (González-Rodríguez, 2003; Hanson, 2003). Las plantas al ser dañadas con incisiones en su corteza producen, a partir de sus metabolitos secundarios, exudados con el fin de cubrir tal lesión.

Los exudados se han generalizado como cualquier sustancia con viscosidad característica, insoluble en agua y que se endurece con la exposición al aire; sin embargo, la diversidad en exudados va desde gomas, resinas, mucílagos, ceras, aceites y látex logrando su reconocimiento al distinguirse características que presentan en torno a su química, tipo de tejido secretor y las funciones ecológicas desempeñadas. La gomosis resulta de la transformación de celulosa y hemicelulosa dentro de la pared celular de la planta en sustancias amorfas desorganizadas; usualmente se considera un mecanismo de defensa natural causado por trauma inducido por infección microbiana, ataque por insectos o por lesión mecánica (Langeheim, 2003).

Los biopolímeros son macromoléculas biológicas, se conforman por proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Weber, 2000); son sustancias de origen natural compuestas por repetidas unidades estructurales o monómeros a través de largas cadenas, denotando así el alto peso molecular que los caracteriza (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1993). Los biopolímeros conformados por polisacáridos están compuestos por azúcares simples que se encuentran distribuidos ampliamente a través del reino vegetal, sus funciones van desde almacenar y proveer de energía para actividades celulares o como elementos estructurales al proteger membranas. Los polisacáridos son de naturaleza hidrofílica, insolubles en alcohol y su grado de solubilidad estará en función de la estructura del polisacárido.

### **1.1.1. Gomas y mucílagos**

Las gomas provenientes de plantas son compuestos usualmente heterogéneos conformados por monosacáridos y ácidos urónicos que hidratándose forman soluciones viscosas o dispersantes (Kaplan, 1998).

Los exudados como gomas son químicamente cadenas complejas de polisacáridos y se han evaluado como biopolímeros emulsificantes, ejemplo de ello son la goma arábica de *Acacia spp.*, tragacanto de *Astragalus spp.* mezquite de *Prosopis spp.*, entre otras (Verbeken *et. al.*, 2003).

Las gomas suelen estar asociadas con mucílagos, sustancias viscosas encontradas en células especializadas de plantas; aunque dicho término, también se aplica a suspensiones acuosas o soluciones de gomas y almidones gelatinizados.

Las propiedades que presentan gomas y mucílagos son similares, siendo las físicas de mayor relevancia que las químicas, ya que la degradación de sus componentes se considera inerte e inocua (Pengelly, 2004).

Los mucílagos por su estructura lineal presentan menor solubilidad en agua y tienden a precipitar a altas temperaturas formando soluciones viscosas denotadas como “babosas”; mientras que las gomas conformadas por polímeros ramificados son más hidrosolubles, promoviendo la formación de geles y refiriéndoseles como “pegajosos” (Mills, 1994).

En el caso de *Acacia spp.* las gomas al contacto con la corteza pueden absorber taninos, tornándose amarillas y prestándose a ser confundidas con resinas como el ámbar. Algunas *Commiphora spp.* y *Mangifera spp.* producen tanto gomas como resinas al incorporar carbohidratos en los conductos secretores de resina (Bhatt, 1987). Las resinas suelen encontrarse clasificadas en mezcla con demás constituyentes de plantas; así, surgen goma-resinas, oleo-goma-resinas y glucoresinas; además las resinas están conformadas por unidades estructurales análogas a los monómeros en polisacáridos que presentan posibilidad de polimerizarse.

### **1.1.2. Resinas**

La resina es definida como una mezcla principalmente de metabolitos secundarios terpenoides y/o fenólicos de variable volatilidad, con gran importancia en las interacciones ecológicas y usualmente formada, almacenada y secretada por estructuras especializadas sobre la superficie de la planta. Los componentes de la resina son derivados de carbohidratos producidos fotosintéticamente que sufren rupturas hacia compuestos más simples, sintetizados posteriormente por distintas rutas metabólicas y contribuyendo así a la variedad en resinas (Lagenheim, 2003).

Las resinas son insolubles en agua pero solubles en alcohol; más pesadas que aceites volátiles y agua; tienen puntos de ebullición altos; son traslúcidas; se queman con una flama humeante y presentan acciones fijadoras. Las resinas son clasificadas por grupos: ligninas, resinas ácidas, resinas fenólicas, resinas ésteres, resinotanoles y resenos (Pengelly, 2004). Las resinas ácidas son las que en mayor porcentaje se presentan naturalmente y por su naturaleza de terpenos constituyen las de mayor comercialización; no obstante, las fenólicas han sido importantes dentro de la industria farmacéutica y como biocombustibles.

Los terpenos son conocidos por sus gratas fragancias, irritantes sabores o actividades medicinales (Breitmaier, 2006); constituyen el grupo más abundante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios en plantas con más de 23,000 estructuras elucidadas (Ai-Xia *et. al.*, 2007). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN) han sido de gran utilidad en tales identificaciones (Langenheim, 2003; Breitmaier, 2006).

Los monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ) al ser componentes olorosos en plantas son utilizados en la industria de perfumería y saborizantes; algunas especies que los contienen son *Eucalyptus spp.*, *Pinus spp.* y *Cinnamomun spp.* La diversidad estructural de sesquiterpenos excede la de los monoterpenos, aunque ambos brindan fluidez a la resina comportándose como plastificantes. Las resinas en la mayoría de las plantas no contienen monoterpenos y diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ) en su fracción no volátil, no obstante pocos géneros de la familia *Burseraceae* los presentan (Hanson, 2003).

Suele referirse a la fracción volátil de la resina (mono y sesquiterpenos) como aceite esencial, mientras que a la no volátil simplemente resina; esencial y aceite suelen denotarse por su fragancia y tacto respectivamente; tal fracción volátil de terpenos es predominante en arbustos y plantas, mientras que sólo arboles de *Laurus spp.* suelen presentarla (Langenheim, 2003).

Los aceites esenciales son formados por la síntesis de ácidos grasos de carbohidratos, seguido por la combinación con glicerol a través de acción enzimática y consiguiendo así ésteres como los triglicéridos; representan menos del 1% de la planta y son responsables de los aromas peculiares de ciertas especies; se identifican como solubles en alcohol y grasas, ligeramente en agua; incoloros y en exposición a luz se oxidan y resinifican fácilmente (Pengelly, 2004).

### **1.1.3. Legislación**

En México, la colecta de exudados está regulada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Las normas que generalmente aplican son:

- NOM-005-SEMARNAT-1997 que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de vegetación forestal.
- NOM-009-SEMARNAT-1996 que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de látex y otros exudados de vegetación forestal.
- NOM-059-SEMARNAT-2001 Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo.
- NOM-126-SEMARNAT-2000 por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional.

### **1.2. Caracterización fisicoquímica**

La caracterización es la determinación de propiedades como forma, estructura química, parámetros termodinámicos y físicos. La morfología es la ciencia de la forma y es la que permite establecer relaciones estructura-propiedad de los materiales (Chalmers y Meier, 2008).

Los polímeros son parte cotidiana de nuestra vida y su presencia queda manifestada en infinidad de productos que utilizamos a diario. Su producción industrial es un sector económico importante a nivel mundial; por lo tanto, su investigación y desarrollo es un área vital para el progreso científico y tecnológico.

Los biopolímeros brindan una alternativa a la producción de sus similares sintéticos y conllevan efectos económicos y ambientalmente positivos debido a sus fuentes renovables; han sido útiles en el sector industrial, médico y de alimentos como adhesivos, absorbentes, lubricantes, empaques, cosméticos y en la creación de materiales (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1993).



Las metas en biopolímeros consisten en valerse de su estructura para mejorar sus características físicas como espuma, gel y de atracción dual entre hidro-lipo compuestos (Kolybaba *et. al.*, 2003).

Debido a la diversa naturaleza de los polímeros, no existe disponible un método simple capaz de proveer la completa información que cubra el rango desde oligómeros hasta grandes polímeros; en control de producción basta con la viscosidad intrínseca, pero en investigación, sólo los resultados combinados de diversas técnicas proveerán la suficiente información.

La caracterización y análisis a polímeros son herramientas que permiten verificar si las propiedades fisicoquímicas perseguidas son alcanzadas de manera natural, por ser inherentes al material, o se requiere de modificaciones para conseguirlas; brindando con ello el conocimiento y la pauta de las aplicaciones posteriores. La caracterización fisicoquímica y la diversidad de técnicas utilizadas es detallada por Cheremissinof (1996), Groenwoud (2001), Chalmers y Meier, (2008) y Stamm (2008).

### **1.2.1. Emulsiones**

Una emulsión consiste de por lo menos dos líquidos inmiscibles, donde uno de ellos está disperso como pequeñas gotas esféricas en el otro (McClements *et. al.*, 2007). El diámetro promedio de las gotas oscila entre los 100 nm y 100  $\mu$ m (Aranberri *et. al.*, 2006). Las partículas del líquido dividido constituyen la fase dispersa o interna de la emulsión; mientras que el líquido en el cual las gotas están dispersas representa la fase continua o externa.

Las emulsiones pueden ser clasificadas acorde a la organización espacial de las fases acuosa u oleosa. Se denomina emulsión *oil in water* (O/W) o *water in oil* (W/O) en virtud de que al segundo término le corresponda la fase continua. El tipo de emulsión dependerá de la naturaleza y proporciones de los constituyentes, así como de su modo de preparación. Los ejemplos cotidianos de emulsiones O/W los tenemos en la mayonesa, leche, crema; mientras que las emulsiones W/O están presentes en la margarina y manteca (McClements, 1999).

### 1.2.1.1. Estabilidad

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que el contacto entre las distintas fases se considera energéticamente desfavorable (McClements *et. al.*, 2007).

La estabilidad de una emulsión está definida como la resistencia a los cambios en sus propiedades con el tiempo, se mide por la velocidad con la cual las gotas de la fase dispersa se agrupan para formar una masa de líquido cada vez mayor y separándose finalmente por gravedad. Aranberri *et. al.* (2006) afirman que la estabilidad y reversibilidad en emulsiones está regida por mecanismos físicos y químicos responsables de la alteración en sus propiedades (figura 1). Existen procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos que afectarían la durabilidad y calidad de las emulsiones.

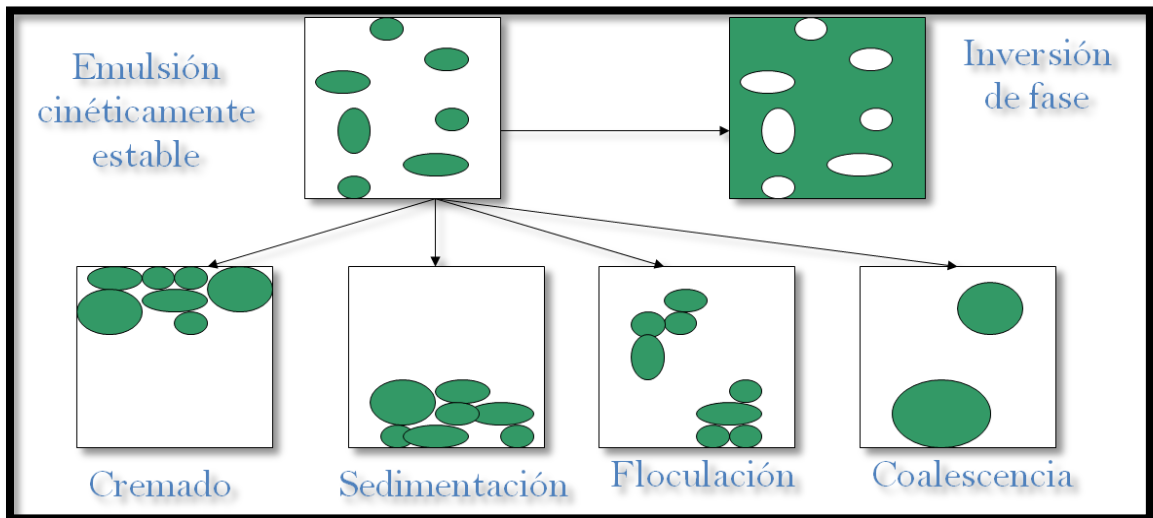


Figura 1. Mecanismos físicos en estabilidad de emulsiones. Tomado y modificado de McClements (1999).

Se presentan mecanismos reversibles como *cremado* cuando la fase dispersa se concentra en la parte superior y *sedimentación* cuando la misma fase se ubica en la parte inferior; lo anterior, es promovido por las diferencias de densidad, la acción de gravedad y la presencia de un gradiente de velocidad de las gotas sin variar la distribución del tamaño de las mismas. En la *floculación* se forman agregados que no se fusionan entre sí y están controlados por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de Van der Waals y repulsivas de tipo estéricas y de hidratación.

Entre los mecanismos irreversibles, la *coalescencia* consigue que las gotas pequeñas se fusionen entre sí creando una de mayor tamaño y eliminando la interfase líquido-líquido. El engrosamiento de gotas u *Ostwald ripening* se manifiesta en el crecimiento de las gotas más grandes a costa de las pequeñas hasta que éstas últimas desaparecen; lo anterior ocurre en función de la solubilidad entre fases y a la presión interna de las gotas de menor tamaño. En la *inversión de fases* se modifica el rol de las fases por alguna alteración en la composición o en las condiciones ambientales.

En algunos sectores industriales se persigue desestabilizar emulsiones como parte esencial en sus procesos. Entre los promovedores de fenómenos de floculación se han utilizado polímeros de alto peso molecular en procesos de separación de sólido-líquido dentro de la industria del papel, tratamiento de aguas y procesamiento de minerales formándose agregados de gran tamaño y de apariencia como nata.

Los mecanismos de los floculantes son la neutralización de cargas y por puenteo; la floculación por puenteo adsorbe múltiples partículas en una cadena polimérica. La estabilidad de emulsiones puede verse mejorada al incluirse estabilizadores (como emulsificantes o modificadores de textura), consiguiendo así emulsiones cinéticamente estables por razonables periodos de tiempo (McClements *et. al.*, 2007).

#### **1.2.1.2. Emulsificantes**

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles a una emulsión, o de reducir el tamaño de las gotas formadas, es conocido como homogeneización y se consigue a través de intensa agitación mecánica, alta presión, ultrasonido o por membranas. Los emulsificantes, denotados también como tensoactivos (*SURFace ACTive AgeNT*) o hidrocoloides, son especies químicas que se adsorben en la superficie de las gotas durante la homogeneización formando una capa que evita la inmediata formación de agregados y el asociarse en soluciones acuosas; presentan en su estructura una naturaleza hidrofílica y lipofílica lo que tiende a localizarlos en la interfase de emulsiones (McClements, 1999).

Los factores que permiten decidir el tipo de emulsificante, están determinados por sus propiedades moleculares (estructura, peso y polaridad), propiedades fisicoquímicas y fisiológicas (solubilidad, estado físico, reología, actividad superficial, estabilidad y bioactividad); las cuales modificarán finalmente a las emulsiones y limitarán su campo de aplicación (Imeson, 2010; Nussinovitch, 2010).

Entre los emulsificantes naturales están los biopolímeros conformados por proteínas o polisacáridos y sus aplicaciones han sido en modificar la apariencia, textura y sabor de emulsiones en alimentos o en la liberación controlada de sustancias bioactivas en medicamentos (McClements, 1999; McClements *et. al.*, 2007).

Los agentes emulsificantes se seleccionan acorde al tipo de emulsión y de acuerdo a la regla de Bancroft: la fase continua es aquella que solubiliza al agente emulsificante (Aranberri *et. al.*, 2006). En las emulsiones O/W el emulsificante se coloca con su cadena hidrófoba orientada hacia el aceite y la hidrófila respecto al agua; en emulsiones W/O el agente tensoactivo se posiciona inversamente. Este comportamiento se denota como micelas y en función de la concentración de emulsificante que da cabida a su formación surge la concentración micelar crítica (CMC) a la cual ocurren los cambios fisicoquímicos (Khan, 2007).

Los agentes con actividad superficial por su naturaleza anfótera pueden clasificarse en términos del índice HLB (Hydrophile-Lipophile Balance), el cual describe la afinidad relativa de una molécula tensoactiva a las fases oleosa y acuosa; dicho valor se asigna al emulsificante puro y suele diferir del comportamiento en disolución en función del electrolito, temperatura y tipo de aceite (McClements, 1999; Aranberri *et. al.*, 2006).

### **1.2.2. Reología**

Las pinturas, aderezos o cosméticos que cotidianamente están a nuestro alcance los evaluamos con adjetivos a su consistencia como espesos, suaves o cremosos; que revelan, a nuestra percepción, su calidad. La reología es la ciencia correspondiente al estudio del flujo y la deformación de la materia (Bird *et. al.*, 2002); su objetivo está restringido a la observación del comportamiento de materiales sometidos a deformaciones muy sencillas para someterlo a análisis dentro de algún modelo matemático que permita determinar las propiedades reológicas de dicho material (Barnes, 2000).

La adecuada descripción reológica de los fluidos es importante para su caracterización fisicoquímica, ya que tales propiedades son las que determinan los cambios manifestados y el comportamiento dentro de algún proceso; lo anterior, de gran relevancia en control de calidad, diseño de operaciones como bombeo, mezclado, envasado, almacenamiento e incluso consumo (Mackley *et. al.*, 1994).

La reología de polímeros surge por las propiedades viscoelásticas que estos sistemas presentan, donde gomas y resinas han probado ser útiles en muchas aplicaciones. Los polímeros aunque sean macromoléculas entrelazadas aún son sujetas al movimiento Browniano que promueve configuraciones aleatorias, creando cadenas lineales de forma esférica con interacciones de largo alcance que persisten a altas velocidades de corte (Barnes, 2000).

Una manera de caracterizar biopolímeros en solución a bajas concentraciones es midiendo la viscosidad y ésta depende de la distribución del peso molecular, la concentración y las propiedades del solvente (Holmberg *et. al.*, 2002). La distribución del peso molecular está en función de la forma en que la macromolécula sea encontrada, sea lineal, ramificada o en red.

Una variedad de métodos instrumentales han sido desarrollados para caracterizar las propiedades reológicas de materiales; varían acorde al tipo de deformación que aplican en la muestra (corte, compresión o elongación), a la propiedad que miden y a su costo o sofisticación (McClements, 1999).

Con la finalidad de comparar resultados, es necesario seguir procedimientos estandarizados que definan parámetros experimentales como tamaño de la muestra, modo de preparación, magnitud de la fuerza o deformación aplicada, equipo utilizado, diseño del recipiente y geometría de accesorios; así como la velocidad, duración y temperatura a la cual se realizaron las pruebas (Barnes, 2000; Viswanath *et. al.*, 2007).

Un fluido es capaz de fluir debido a las fuerzas de cohesión en sus moléculas y suele deformarse continuamente cuando se somete a un esfuerzo cortante. La viscosidad es una propiedad de transporte, ya que cuantifica la conductividad de cantidad de movimiento a través de un medio conductivo o fluido, se interpreta como la resistencia que ofrecen los fluidos a ser deformados cuando son sometidos a un esfuerzo (Barnes, 2000).

La clasificación de fluidos (Figura 2) está dada por las diferentes características reológicas que pueden ser descritas a través del uso de algún viscosímetro (McClements, 1999).

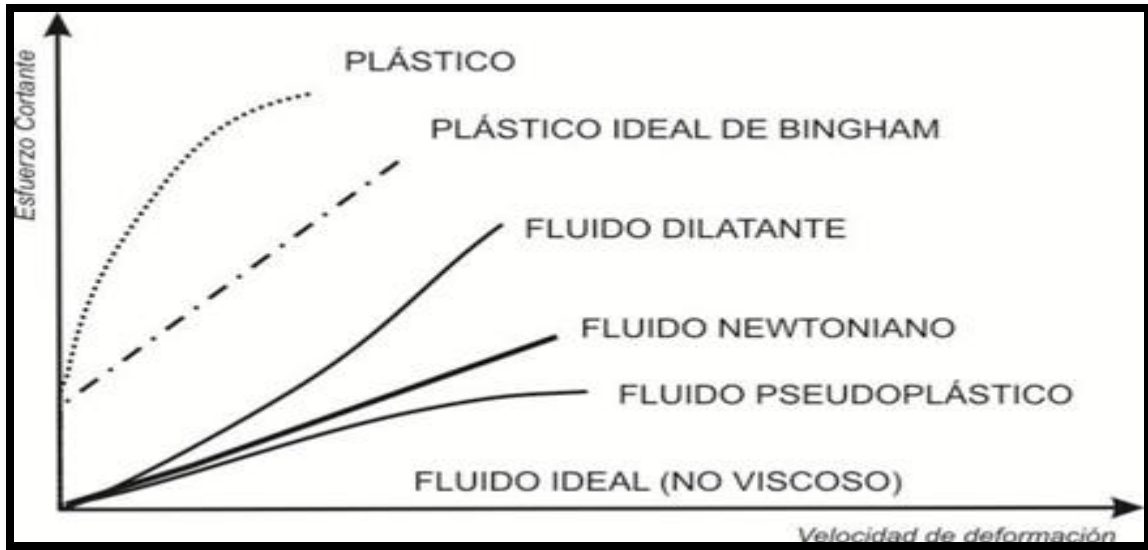


Figura 2. Clasificación de fluidos. Tomado y modificado de McClements (1999).

Los fluidos newtonianos poseen una relación lineal entre la magnitud del esfuerzo cortante aplicado ( $\tau$ ) y la velocidad de corte o deformación ( $\dot{\gamma}$ ) resultante (Bloomer, 2000); lo anterior indica una viscosidad ( $\mu$ ) constante a diferentes velocidades de corte y cuando no presentan tal proporcionalidad se denominan fluidos no newtonianos.

La viscosidad de fluidos no newtonianos acorde a su dependencia con la velocidad de deformación los clasifica en pseudoplásticos y dilatantes, mientras que a su dependencia con el tiempo se identifican como reopéctico y tixotrópico (McClements, 1999).

Existen modelos matemáticos que definen las propiedades reológicas de los fluidos (Shames, 1995; Chhabra, 2007) mostrados en la figura 2.

Plástico ideal de Bingham	$\tau = \tau_0 + \mu \dot{\gamma}$	Ecuación (1)
Ley de Newton	$\tau = \mu \dot{\gamma}$	Ecuación (2)
Ley de potencias o modelo de Ostwald de Waelde	$\tau = \mu (\dot{\gamma})^n$	Ecuación (3)

### 1.2.3. Tensión superficial

La región en el espacio donde dos fases coexisten es conocida como interfase; si una de ellas es gaseosa, se denomina entonces superficie. Las fases generalmente difieren en su estado físico, composición y propiedades físicas como densidad, índices de refracción, volatilidad y viscosidad (Rossiter y Baetzold, 1993).

Una molécula en el interior de un líquido está sometida a la acción de fuerzas atractivas de cohesión cuya resultante es una fuerza nula; pero si la molécula se encuentra en la superficie, sus fuerzas de cohesión no están balanceadas y la resultante es una fuerza perpendicular a la superficie y dirigida hacia el interior del líquido, por lo que la superficie tiende a contraerse formando una tensión en ella y a ocupar un área más pequeña (McClements, 1999).

En este fenómeno se involucran dos términos: la energía libre de superficie y la tensión superficial, definidas como el trabajo necesario para aumentar a temperatura y de modo reversible, el área de superficie en una unidad. La tensión superficial y la energía libre son numéricamente iguales siempre que la viscosidad del líquido no sea muy grande (Adamson y Gast, 1997).

Los métodos para medición de la tensión superficial están basados sobre la aplicación de una fuerza, presión o deformación (Drelich *et. al.*, 2002) y son descritos en la tabla I.

Tabla I. Métodos de medición para tensión superficial.

<b>Medición de fuerza</b>	<b>Medición de presión</b>	<b>Medición de deformación</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Método de la placa (Wilhelmy)</li><li>• Método del anillo (Du Nouy)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ascenso capilar</li><li>• Presión de burbuja</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Gota pendiente o colgante</li><li>• Gota colocada</li><li>• Gota giratoria</li></ul>

#### **1.2.4. Tamaño de partícula**

Black *et. al.* (1996) comentan que las técnicas para la medición del tamaño de partícula son importantes dentro de industrias como combustión, aerosoles, agricultura, alimentos, control de contaminación y medicina; así como en diversos campos de investigación como la caracterización de sistemas o el estudio en la dinámica de partículas sólidas. Los métodos de determinación pueden ser físicos, por imágenes o dispersión de luz. El láser, debido a su naturaleza monocromática, coherencia y poder espectral es útil para la determinación de tamaño de partícula por medio de las propiedades de dispersión de luz.

Los métodos basados en láser para el análisis de tamaño de partícula comparten elementos como terminología (formas, diámetro de partícula individual y media) o funciones de distribución (normal y Rosin-Rammler), los cuales deben ser abordados en la comprensión de las mediciones. Diversas teorías (Lorenz-Mie, difracción Fraunhofer y óptica geométrica) son ampliamente utilizadas en la instrumentación para análisis de tamaño de partícula.

Los analizadores de partícula basados en láser generalmente determinan la distribución espacial o temporal de los tamaños esféricos equivalentes. Las distribuciones de tamaño de partícula son expresiones matemáticas que relacionan algunos aspectos de las partículas en el fluido (volumen, velocidad o concentración) con el diámetro de partícula, evitando el gráfico detallado de la distribución experimental y brindando una manera de extrapolar información fuera del rango de medición, para determinar parámetros como diámetro promedio o forma de distribución.

La consistencia y la exactitud de las mediciones suele estar sujeta a factores como tamaño, velocidad, índice de refracción, temperatura y concentración de la muestra. Actualmente equipos poseen características que asisten al operador en la eliminación de errores en el resultado final. Instrumentos como los analizadores de partícula Microtrac, Coulter y Malvern basados en la difracción Fraunhofer son utilizados ampliamente en control de calidad y análisis de laboratorio, consiguiendo mediciones fáciles y consistentes.



### **1.2.5. Análisis térmico**

El análisis térmico se refiere a una variedad de técnicas en las que una propiedad de una muestra es continuamente medida en un perfil de temperatura predeterminado. Las técnicas más comunes son el análisis termogravimétrico y la calorimetría diferencial de barrido (Brown, 2001; Groenewoud, 2001; Pielichowski y Njuguna, 2005)

Una curva de análisis térmico es interpretada al relacionar la propiedad medida contra los datos de temperatura que manifiestan cambios físicos y químicos en la muestra, considerándola una técnica comparativa o cualitativa. El análisis térmico es útil en la caracterización fisicoquímica de propiedades de un sistema bajo condiciones que simulan aplicaciones reales (Cheremisinoff, 1996).

#### **1.2.5.1. Calorimetría diferencial de barrido**

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica de análisis térmico en la que el flujo de calor a la muestra es monitoreado en función del tiempo y temperatura. En la práctica se analiza el flujo de calor hacia un contenedor con la muestra y uno vacío como referencia con el fin de determinar las temperaturas donde existen transformaciones físicas de la muestra. El instrumento utilizado es un calorímetro diferencial de barrido o DSC (Cheremisinoff, 1996; Groenewoud, 2001).

El DSC en la investigación en polímeros es utilizado principalmente en tres tipos diferentes de experimentos:

- Determinación de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).
- Determinación de la temperatura de cristalización y fusión.
- Mediciones en sistemas con reacciones químicas.

El estado físico de las muestras a analizar va desde sólidos, películas, fibras, geles o líquidos viscosos. La información obtenida de los DSC son los parámetros termodinámicos como capacidad calorífica ( $C_p$ ), cambios de entalpía ( $\Delta H$ ), entropía ( $\Delta S$ ) y energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ).

#### **1.2.5.2. Termogravimetría**

La termogravimetría es la técnica donde la masa de una muestra es monitoreada con respecto al tiempo y temperatura, se desarrolla con un analizador termogravimétrico (TGA) o termobalanza (Groenewoud, 2001).

Existen importantes diferencias entre las balanzas a utilizar

- El tipo de balanza, sea horizontal o vertical.
- La sensibilidad en combinación con el peso máximo de la muestra.
- El intervalo y precisión de la temperatura.

La termogravimetría y la calorimetría diferencial de barrido son técnicas muy populares en la investigación en polímeros, estudiando la estabilidad térmica de muestras bajo condiciones de aplicación. La interpretación de resultados de ambas técnicas no se limita a la composición, por lo que más de un método adicional o acoplado (espectroscopia de IR, cromatografía de exclusión de tamaño o resonancia magnética nuclear) es requerido para la total comprensión de las reacciones físicas y químicas que ocurren en la muestra (Chalmers y Meier, 2008).

### **1.2.6. Identificación de gomas**

Las gomas pese a que son obtenidas con pureza relativa, requieren de análisis que permita el conocimiento de sus componentes (Miller, 1973). Las gomas en su estado natural son reconocidas por su forma, tamaño, color, brillo, entre otras propiedades físicas y que combinadas con simples pruebas químicas bastan para identificarlas; pero si son adquiridas en polvo, procedimientos químicos para su identificación son necesarios (Nussinovitch, 2010).

Nussinovitch (2010) describe para las gomas de uso industrial (arábica, mezquite, tragacanto, guar y xantano) una identificación a partir de la solubilidad en agua, la precipitación en alcohol, la observación microscópica e incluso el uso de anticuerpos como identificación de polisacáridos. Esta última, una novedosa aplicación para anticuerpos que resulta altamente específica para las gomas.

Debido a que no hay un método sencillo y general de identificación para todas las gomas, una opción es seguir esquemas que permitan clasificar las gomas para una subsecuente identificación por otras pruebas. Las reacciones de precipitación con cetavlon y reactivos (Million, Schweitzer, Stoke, acetato de plomo, hidróxido de potasio, cloruro férrico, ácido tánico y sulfúrico) son útiles para identificar y caracterizar exudados.

Los métodos analíticos utilizados en la identificación de gomas son espectroscopía de infrarrojo y Raman, diversas técnicas cromatográficas, resonancia magnética nuclear, electroforesis capilar, cristalografía en rayos X, análisis térmico diferencial, reacciones enzimáticas (Cheremisinoff, 1996; Chalmers y Meier, 2008; Eliasson, 2006; Nussinovitch, 2010) e incluso acoplamientos entre ellos que involucren el uso de lectinas para una determinación estructural (Nillson, 2007).

La detección de azúcares en cromatogramas ha sido útil para identificar goma agar, arábica y tragacanto. Los monosacáridos constituyentes de cualquier polisacárido pueden ser detectados y aislados al someter la muestra a una hidrólisis completa seguida por una separación cromatográfica del azúcar resultante. Convencionalmente, una hidrólisis completa involucra el uso de ácidos fuertes o realizarla por un tiempo prolongado. Diversas técnicas cromatográficas han sido desarrolladas para la clasificación y cuantificación de carbohidratos (Nussinovitch, 2010).

El amplio uso de las gomas en la industria de alimentos como estabilizadores, modificadores de textura y agentes con actividad superficial, requiere de análisis adicionales que estimen la presencia de diversos fitoquímicos que impliquen una limitación en su uso debido a efectos en organismos y en la salud humana (Vaclavick y Christian, 2008).

### **1.2.7. Alelopatía**

Los metabolitos secundarios en las plantas son una vasta fuente de sustancias bioactivas (Harbone y Baxter, 1998); por lo tanto, es de suma importancia realizar estudios que permitan reconocer los constituyentes químicos y sus implicaciones en el ambiente u organismos vivos. La sola presencia de algún compuesto con bioactividad no es un atributo para clasificarlo como tóxico, se requiere de la investigación sobre la concentración en la cual sus efectos llegan a manifestarse en algún organismo.

De acuerdo a Reigosa y Pedrol (2003), Lichtenhaler (2003), Álvarez-Tinaut y Espinosa-Borreguero (2003) y Alcázar *et. al.* (2003) las plantas sintetizan una mayor batería de compuestos secundarios que los animales, puesto que no pueden confiar en la movilidad física para escapar de sus predadores o de fenómenos físicos cambiantes, apoyándose en la defensa química o morfológica contra los fenómenos bióticos o abióticos que perturban su correcto desarrollo.

Los cambios en las condiciones ambientales, las restricciones debidas a estrés y los agentes estresantes deben ser captados y registrados por las plantas para producir respuestas de tensión y estrés, además de disparar los procesos de aclimatación y adaptación.

Los agentes estresantes (bióticos y abióticos, naturales o antropogénicos) representan señales externas que su percepción y transducción en la planta y sus órganos (hojas, raíz, tallo y flores) producirán respuestas metabólicas directas (reajuste de tasas metabólicas y la activación de mecanismos de protección y reparación) y activación de la expresión génica (síntesis de fitoalexinas, activación de genes de defensa, síntesis de proteínas, hormonas y reguladores de estrés: ácido abscísico *ABA*, jasmonatos *JAs*, salicilatos *SAs*, etileno y poliaminas); estos últimos modifican a su vez las respuestas metabólicas de las plantas bajo estrés y controlan la estabilidad del nuevo estándar fisiológico.

La alelopatía es cualquier efecto, perjudicial o benéfico, directo o indirecto que una planta produce sobre otra a través de la producción de compuestos químicos liberados al medio ambiente. Las relaciones alelopáticas desempeñan un papel importante por sus consecuencias evolutivas, así como los efectos fisiológicos y ecológicos que intervienen en la lucha por la supervivencia y distribución de especies; se consideran un proceso más de los distintos tipos de estrés que sufren las plantas en el medio que modifican la síntesis y tasa de liberación de metabolitos secundarios (González-Rodríguez, 2003).

La clasificación de alelopáticos más reconocidos incluye compuestos alifáticos, lactonas insaturadas, lípidos o ácidos grasos, terpenos, glucósidos cianogénicos, alcaloides y compuestos fenólicos. La categoría de compuestos fenólicos comprende los grupos químicos más estudiados debido a su actividad biológica, éstos incluyen ligninas, melaninas, flavonoides, taninos, entre otros.

La inmediata respuesta de la planta a la presencia de un aleloquímico es una interferencia en alguno de sus procesos fisiológicos. Los mecanismos de resistencia son similares a los manifestados ante cualquier otro tipo de estrés, éstos incluyen reacciones enzimáticas (fase I): hidroxilación, oxidación, reducción y/o hidrólisis; la conjugación con un sustrato endógeno para formar un compuesto nuevo (fase II) y la

aprehensión (fase III): conjugados terciarios que pueden ser transportados y depositados en la vacuola o pared celular.

La resistencia alelopática entre especies no sólo se debe a sus propiedades morfológicas. La detoxificación representa un factor que contribuye a la diferente susceptibilidad a un agente químico en particular.

Los mecanismos moleculares y fisiológicos que dirigen procesos alelopáticos en el organismo vegetal están sujetos a:

- La gran diversidad de familias químicas que pueden actuar como aleloquímicos.
- Los diferentes lugares y modos de acción para cada aleloquímico.
- Los distintos procesos de eliminación y detoxificación presentes en las plantas.
- La actividad conjunta (antagónica, sinérgica o aditiva) de diferentes aleloquímicos.
- La concentración umbral o efectiva en el interior de la célula.
- La posibilidad de que el aleloquímico actúe sobre dos rutas metabólicas diferentes.
- La interacción con otros fenómenos de estrés.
- La provocación de una serie de modificaciones metabólicas en cascada.

La mayor parte de los estudios en el análisis de relaciones alelopáticas se han realizado sobre procesos fisiológicos secundarios como el crecimiento, la morfología o la germinación.

La interacción del aleloquímico es normalmente afectando una ruta metabólica primaria que provoca la variación en otras relacionadas y manifestando los síntomas de interacción en otros niveles. La acción sobre las membranas por parte de los compuestos fenólicos es central y primaria para el trastorno de otros procesos, actúan como antagonistas o sinérgicos de la actividad auxínica afectando el desarrollo vegetal; incluso, podrían no tener un único lugar de acción y la probabilidad de actuar sobre uno u otro dependerá de la concentración o de los factores ambientales que interactúen.

## 2. ESTADO DEL ARTE

Se describe a *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) presentando su sinonimia, rasgos generales del árbol, servicios al ambiente, usos de la madera y medicinales, taxonomía, distribución geográfica e investigaciones científicas de la especie.

Los estudios químicos en plantas se desarrollan al azar o de manera bioracional; es decir, a partir de un metabolito en particular, del que ya conozcamos su bioactividad y la técnica para aislarlo; basándonos en la taxonomía, donde si el género se encuentra reportado en la literatura, sus especies y variantes podrían tener dicho fitoquímico afín; durante la observación en estado natural, llegándose a percibir si las plantas trabajan en competencia por nutrientes o en coordinación ante depredadores; por último, a través de la cultura popular, teniendo como referencia su frecuente y efectivo uso para algunos padecimientos (Ramírez-Mares, 1999).

### 2.1. *Bursera simaruba* L. Sarg (1890)

De acuerdo a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) la planta *Bursera simaruba* presenta sinónimos: *Bursera bonairensis* Boldingh; *Bursera gummífera* (L.); *Bursera integerrima* (Tul.) Triana & Planch; *Bursera ovalifolia* (Schltdl.) Engl.; *Bursera subpubescens* (Rose) Engl. ; *Elaphrium simaruba* (L.) Rose.; *Elaphrium subpubescens* Rose; *Pistacia simaruba* L.; *Tapiria macrophylla* Lundell. De manera común, además de palo mulato, es también conocido como palo jioté, jiñocuabo, chaká, indio desnudo, almácigo o gumbo-limbo, entre otros.

En *Bursera simaruba* su tamaño va desde pequeños arbustos hasta grandes árboles; sus troncos suculentos presentan coloraciones amarilla, verde, roja o púrpura y la corteza de algunas especies se exfolia en forma de escamas, incluso de color distinto al tronco (Becerra y Venable, 1999; Espinosa *et. al.*, 2006).

La CONABIO y Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) brindan una descripción más detallada sobre su forma, copa y hojas, tronco y ramas, corteza, flores, frutos, semillas, raíz, biología reproductiva, hábitat, fenología, vegetación asociada, aspectos fisiológicos, cultivo, propagación, tolerancia y desventajas. Se le considera con efecto restaurador en el drenaje de tierras inundables, conservador del suelo por control de la erosión y estabilizador de bancos de arena. En los servicios al ambiente está el de barrera rompevientos, cerca viva, ornamental y de sombra o refugio.

Entre los usos, su madera es su principal producto, se utiliza para la construcción de canoas y viviendas rurales, mangos para herramientas e implementos agrícolas, cajas y embalajes, cabos para cerillos, abatelenguas, palillos para dientes, chapa, huacales para hortalizas y frutas, cajas para pastas, tablas, carpintería en general y pulpa para papel. Se recomienda para fabricar cocinas integrales, juguetes, viruta excélsior, muebles rústicos, artículos torneados y patrones, debido a que su estabilidad dimensional es excelente. La madera contiene mucha agua, almidones y azúcares por lo que se mancha y se pudre enseguida si no se sierra y seca rápidamente.

El uso maderero más que nada es debido a su abundancia y no a sus cualidades superiores, mientras que la savia azucarada se usa en áreas rurales para alimentar a los niños y los retoños tiernos se cocinan como verduras (Francis, 1990).

Entre los usos medicinales está la infusión del fruto, flor, hoja y corteza para bajar de peso. El fruto y flor como antidiarreico, en la mordedura de serpiente y para repeler insectos; la planta para el resfriado, disentería, fiebre, hongos en la piel, mal de viento, antimicótica, purgante y sudorífica; la hoja en la tosferina y sarampión, como antiasmático, acelerador de parto, encías infectadas, evacuaciones con sangre, amigdalitis, comezón, úlceras (enfermedades venéreas), antiinflamatorio (rodillas), para fiebre intestinal y analgésico (dolor de cabeza, estómago y muelas); la corteza como antipirético, hemorragia nasal, dolor muscular, remedio para el hipo, limpieza de heridas, inflamación de ovarios, picadura de araña (CONABIO, 2006).

La resina que mana del tronco y de las ramas se utiliza en algunas regiones como sustituto de pegamento en piezas rotas de vidrio, loza y porcelana; hervida en agua y endurecida se emplea como sustituto del copal en forma de incienso; también se usa para la fabricación de lacas y barnices (CONABIO, 2006).

Las resinas que producen *Bursera spp.* y *Protium spp.* se consideran terpenoides de tipo bálsamo originadas en canales de su corteza. La resina comprende mono/sesqui/tri-terpenos y en menor grado diterpenos. El uso de las resinas de *Bursera spp.* y *Protium spp.* se remonta incluso a tiempos ancestrales, siendo partícipes en ceremonias y rituales mayas y estudiados taxonómicamente hasta finales del siglo XIX. Los bálsamos de *Protium copal* son conocidos de manera común como inciensos y son utilizados como desodorizadores o purificadores (Langenheim, 2003).

La identificación taxonómica de plantas productoras de exudados resulta útil, abordando así diferencias o similitudes entre especies y géneros; Langenheim (2003) reconoce generalmente a productoras de resinas en el grupo de las coníferas y angiospermas, ubicando entre éstas últimas a la familia *Burseraceae*. En la tabla II se desarrolla la taxonomía para *Bursera simaruba*.

Tabla II. Taxonomía de *Bursera simaruba*. Global Biodiversity Information Facility.

Palo Mulato	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Fanerógama Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Familia</b>	Burseraceae
<b>Género</b>	<i>Bursera</i>
<b>Especie</b>	<i>Simaruba</i>

Langenheim (2003) resalta la copiosa producción de resinas por parte de *Burseraceae*, siendo la mayor distribución de ésta familia en Asia y África, a excepción de *Bursera* y *Protium* localizadas en regiones tropicales de América. La máxima diversidad de *Bursera spp.* se encuentra en las costas del Pacífico mexicano, considerándolas endémicas en su mayoría (figura 3 y 4).

En Oaxaca se distribuye en climas como la selva alta y mediana subperennifolia (CONABIO, 2006) y su presencia es confirmada por Salas *et. al.* (2003), García-Mendoza *et. al.* (2004), Rzedowski (2006) y Rzedowski *et. al.* (2005, 2007).

*Bursera simaruba* presenta variaciones morfológicas en su área de distribución; exhibe una notable variación fenotípica asociada a cierto nivel de diferenciación ecotípica; por lo menos para ciertos caracteres ecofisiológicos y anatómicos de la madera (CONABIO, CONAFOR). Un estudio de Espinosa *et. al.* (2006) brinda los patrones biogeográficos históricos de las especies de *Bursera* (*Burseraceae*) y sus implicaciones taxonómicas.



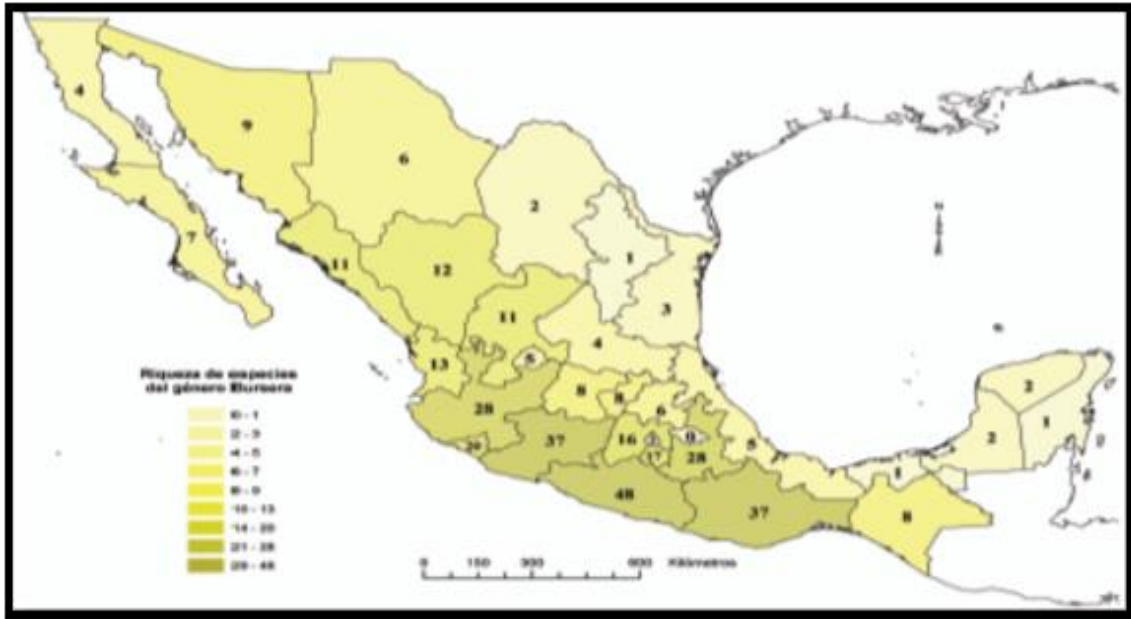


Figura 3. Distribución geográfica del género *Bursera* en México. Los números indican la cantidad aproximada de especies. Tomado de Rzedowski *et. al.* (2005).

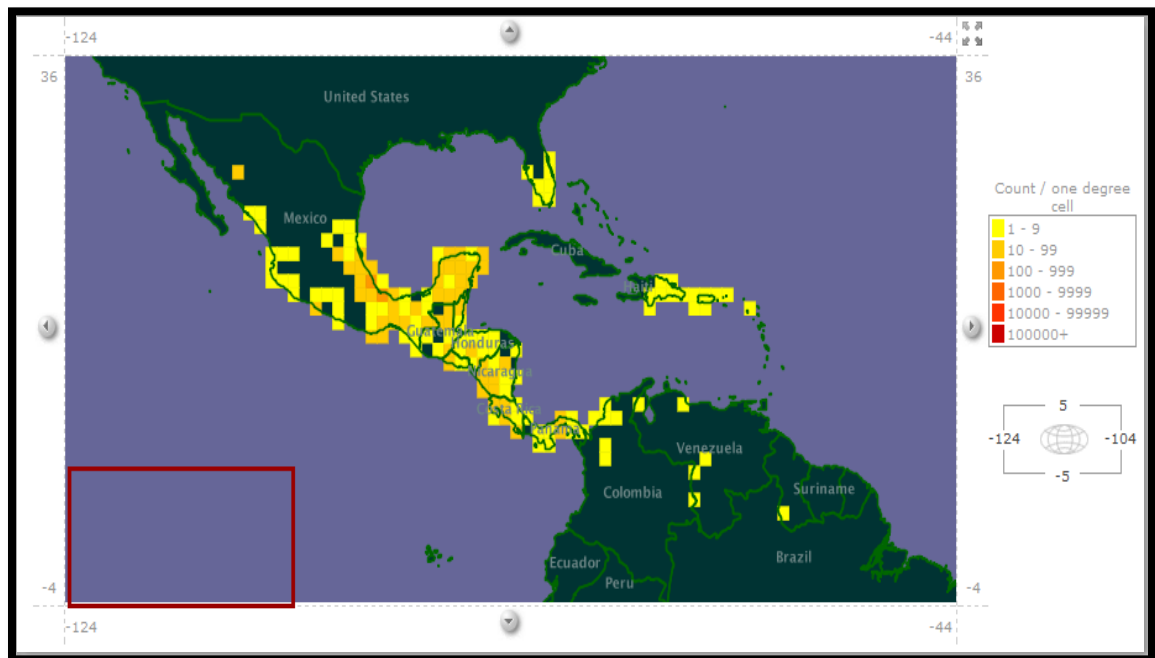


Figura 4. Distribución geográfica de *Bursera simaruba*. Tomado de Global Biodiversity Information Facility.

Las investigaciones científicas relevantes en torno a *Bursera simaruba* se describen a continuación:

Andrés-Hernández y Espinosa-Organista (2002) ubica a palo mulato dentro del complejo *Bursera simaruba* en su estudio sobre morfología de plántulas de *Bursera* Jacq. Ex. L. (*Burseraceae*) y sus implicaciones filogenéticas.

Una especie nueva de *Bursera* (*Burseraceae*) del estado de Oaxaca denominada *Bursera laurihuertae* es presentada por Rzedowski y Calderón de Rzedowski (2000). La segunda restauración de *Bursera ovalifolia* y nombre nuevo para otro componente del complejo de *Bursera simaruba* (*Burseraceae*) es descrita por Rzedowski *et. al.* (2007).

Lambert *et. al.* (2005) presentan relaciones taxonómicas y químicas reveladas por espectros de RMN de exudados de plantas para distinguir entre resinas, gomas y goma-resina, ubicando en el último grupo a *Bursera simaruba* L. Sarg.

La descripción de triterpenos en el extracto con cloroformo de la resina de *Bursera simaruba* es reportada por Peraza-Sánchez *et. al.* (1995).

El estudio de Bruck (2002) revisa los usos tradicionales de *Bursera simaruba* en la ebullición de corteza y hojas para determinar si los registros etnobotánicos en la región maya pueden ser corroborados con la información química. La bioactividad de los extractos con cloroformo, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano es confirmada.

La determinación del volumen de la corteza para *Bursera simaruba* en Belice es presentada por Atha *et. al.* (2005).

La actividad antimicrobiana y antiinflamatoria en extractos de hoja con solventes orgánicos es reportada por Yasunaka *et. al.* (2004), Noguera *et. al.* (2004) y Carretero *et. al.* (2008). Los compuestos fenólicos son reportados por Maldini *et. al.* (2009).

### 3. OBJETIVOS

#### General

Evaluar por caracterización fisicoquímica el exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) como potencial agente emulsificante.

#### Específicos

- Obtener en pureza adecuada el exudado desde su colecta y posterior tratamiento en laboratorio, registrando el rendimiento conseguido.
- Determinar parámetros físicos como solubilidad, pH, viscosidad, tamaño de partícula y actividad superficial a distintas concentraciones del exudado en agua.
- Analizar por calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría al exudado, determinando la capacidad calorífica y el contenido de humedad.
- Establecer la bioactividad de los exudados por medio de pruebas fitoquímicas y de fitotoxicidad.
- Identificar la naturaleza química de los constituyentes del exudado por cromatografía y espectroscopia UV-Visible.
- Valorar la estabilidad de emulsiones O/W formuladas con el exudado como emulsificante.

### 4. HIPÓTESIS

El exudado de *Bursera simaruba* presenta propiedades fisicoquímicas como agente tensoactivo similares a los exudados disponibles de uso industrial.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las gomas y resinas se utilizan como agentes estabilizadores o espesantes; actualmente se utilizan la goma arábica, mezquite, tragacanto, agar y xantano principalmente. Para promover el uso alternativo de gomas y resinas de nuevas especies de plantas es necesario desarrollar una caracterización fisicoquímica que determine si se presentan propiedades similares a los exudados disponibles que determinan su uso final e incursión comercial.

En virtud de evaluar una especie de la diversidad vegetal oaxaqueña se considera al exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg. (1890) para una caracterización fisicoquímica. *Bursera simaruba* presenta variaciones morfológicas en su área de distribución geográfica. La bioactividad es generalmente indicada para la corteza, hojas y fruto o demostrada por la asociación con *Metopium brownie* en la región maya, dicho árbol presenta distribución restringida desde el sur de Veracruz hasta la Península de Yucatán. Estudios químicos en *Bursera spp.* han sido realizados bajo la extracción de solventes como cloroformo, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano.

La caracterización del extracto acuoso a temperatura ambiente del exudado de *Bursera simaruba* distribuida en la región de la costa oaxaqueña es la propuesta de esta investigación; así, el conocimiento de sus propiedades fisicoquímicas como pH, viscosidad, tensión superficial, humedad, composición de azúcares, fitoquímica, fitotoxicidad y estabilidad en emulsiones indicarían si presenta potencial para su incorporación a la gama de biopolímeros disponibles. Además, al documentarse la información para el acervo científico, en el sector académico surgirían líneas de investigación en diversas e interesantes aplicaciones procurando el uso sustentable de dicha especie.

## 6. METODOLOGÍA

A continuación se presenta la metodología de las pruebas fisicoquímicas realizadas. La caracterización involucra desde la colecta del exudado y tratamiento en el laboratorio hasta conseguir por liofilización el secado del extracto crudo y purificado. Se procede con la determinación de propiedades físicas como solubilidad, pH, viscosidad, tensión superficial, tamaño de partícula y el análisis térmico (capacidad calorífica y humedad) de la muestra. Se realizan una prueba de fitotoxicidad como inhibidora del crecimiento en raíz e hipocotilo de semillas, así como la identificación de azúcares y fitoquímicos presentes. Por último, se realiza una emulsión O/W con la finalidad de evaluarlo como agente estabilizante.

### 6.1. Colecta

La colecta del exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) se realizó en la comunidad de El Hule, Santa María Huatulco, Oaxaca (figura 5) con el permiso de las autoridades locales correspondientes y acompañados por el Dr. Héctor Santiago, colector oficial por SEMARNAT que labora en la Universidad del Mar, quién realizó la identificación de la especie e indicó la técnica de incisiones para la extracción del exudado y la preservación del árbol (figura 6).



Figura 5. Sitio de muestreo. El Hule, Santa María Huatulco, Oaxaca.



Figura 6. Incisiones a *Bursera simaruba*.

La incisión a los árboles fue realizada el 01 de diciembre de 2008 y colectada el 03 de febrero de 2009 (figura 7), considerada esta época como la temporada seca en la región. El número de árboles para el muestreo fue de 10, los cuáles fueron elegidos a su inmediato reconocimiento y a la accesibilidad que el terreno permitiera llegar hasta ellos. La edad promedio de los árboles oscila entre 15 y 20 años. Los exudados fueron colectados en recipientes plásticos durante el muestreo para su posterior determinación de peso y almacenamiento en laboratorio.



Figura 7. Colecta de exudados. Alejandro Regalado (izquierda), Héctor Santiago (centro) y Octavio Noriega (derecha).

## 6.2. Tratamiento al exudado

El exudado fue dispuesto en el laboratorio 4 de química orgánica, correspondiente a la carrera de Ingeniería Ambiental, dentro de las instalaciones de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel.

Se determinó el peso bruto del exudado colectado por medio de una balanza granataria OHAUS Triple Beam Serie 700/800, siendo almacenados en bolsas plásticas herméticas transparentes dentro de una gaveta aislada del contacto con otras muestras. Algunas fracciones de exudados fueron separadas acorde a la limpieza que mostraban y otras fueron reducidas en tamaño por medio del mortero.

Se realizaron disoluciones (Figura 8) a volúmenes desde 0.1 L hasta 1 L con una concentración entre el 10% y 20% p/v en agua ultrapura proveniente del equipo EASY-pure UV Barnstead.

Las disoluciones fueron agitadas mecánica, magnética y oscilatoriamente alrededor de una hora. Posteriormente se realizó un tamizado a través de una malla de tela y ese residual obtenido se dejó en solución para filtrarlo hasta el día siguiente. El procedimiento anterior se realizó a temperatura ambiente.



Figura 8. Disolución del exudado de *Bursera simaruba*.

La filtración se llevó a cabo al vacío por medio de embudos Buchner de  $\phi = 4.5, 9$  y  $12$  cm y matraz Kitasato de 500 mL y 1000 mL. Se utilizaron una serie de filtros de diámetro decreciente hasta alcanzar el Whatman #4 ( $\phi = 90$  mm) y observar que impurezas dejaran de ser retenidas (Figura 9).

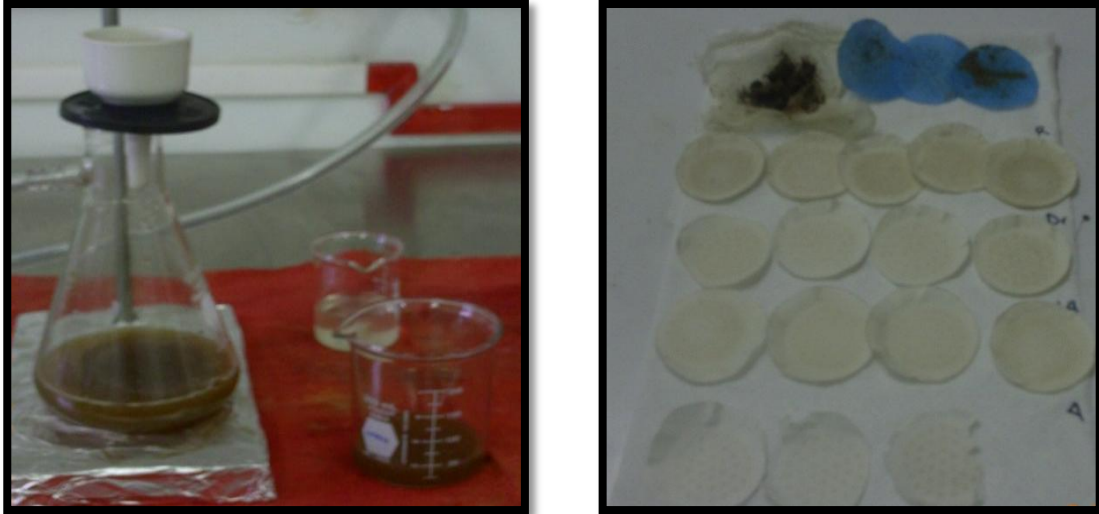


Figura 9. Filtración (izquierda) y filtros utilizados (derecha).

La liofilización se realizó con las muestras filtradas en volúmenes de 50 y 70 mL dentro de matraces Erlenmeyer de 250 mL (Figura 10); se mantuvieron a una temperatura de  $-12^{\circ}\text{C}$  en un congelador General Electric Profile Arctica por 15 horas como mínimo.



Figura 10. Disoluciones filtradas.

Una liofilizadora LABCONCO Free Zone 4.5 fue utilizada adaptándosele cápsulas donde se situaban las muestras (Figura 11). La temperatura y presión de vacío mínimas alcanzadas por el equipo para la liofilización es de  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $133 \times 10^{-3}$  Mbar. La pérdida de agua era monitoreada por medio de la balanza granataria determinando en los matraces el peso inicial y final a las sesiones de liofilización.





Figura 11. Liofilización.

Se destinaron frascos de vidrio para la conservación del exudado liofilizado. Fueron lavados con agua y jabón, así como secados en una estufa Lab-line Instruments 3516M a 60°C durante 3 horas y dispuestos hasta su utilización en un desecador al vacío. El producto liofilizado, previamente a su almacenamiento, era pesado en balanza analítica (marca AND con capacidad mínima de 10 mg, máxima de 120 g, exactitud de 1 mg y desviación de 0.1 mg) en fracciones de 5 y 10 g (Figura 12).



Figura 12. Liofilizado de *Bursera simaruba*.

El rendimiento de los exudados fue determinado por un balance de materia entre lo colectado, el liofilizado conseguido, la muestra aún almacenada y su uso en otros objetivos fijados por esta investigación.

El tratamiento se realizó también para otros exudados como arábigo, mezquite, ciruelo y copal, útiles en pruebas posteriores para comparación de sus resultados. Procedimientos similares han sido reportados por León de Pinto *et. al.* (2000a, 2000b), Martínez *et. al.* (2003, 2008), Vinod *et.al.* (2008) y Koubala *et. al.* (2008) en la evaluación de exudados.

### **6.2.1. Purificación**

El liofilizado conseguido de *Bursera simaruba* fue fraccionado a través de cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando como soporte de exclusión Sephadex G-15 en la fase estacionaria y agua desgasificada como fase móvil.

La columna fue verticalmente sujeta con pinzas en un soporte universal; un fragmento de algodón se colocó al fondo y el Sephadex en suspensión se agregó; al sedimentar y retirar el contenido de agua excedente, la muestra disuelta se vierte.

Las disoluciones sometidas fueron concentraciones de 10% p/v, requiriéndose un volumen de 200 ml por fase al conseguirse la adsorción de la muestra; las fracciones colectadas por intervalos de 15 minutos se destinaron a liofilización nuevamente.

La columna era doblemente lavada con agua antes de volver a colocarse otra disolución; después de utilizarla en un par de ocasiones se lavaba con agua tibia y/o metanol, permaneciendo éste último como fase móvil si el tiempo de utilizarla no era constante.

El liofilizado conseguido del extracto acuoso de *Bursera simaruba* se denotará como *crudo*, diferenciándose así del *crystal* proveniente directo de la colecta y del *purificado* al resultante a través de la cromatografía de exclusión por tamaño (CET).

### **6.3. Solubilidad y pH**

Se determinó el grado de disolución de *Bursera simaruba* crudo en agua ultrapura a varias concentraciones y midiéndose valores de pH en un potenciómetro Orion 4 Star Thermo ubicado en el Laboratorio de Investigación de esta institución. Se realizó la calibración del equipo con soluciones buffer de 4, 7 y 10 previo a la determinación de pH. La agitación se consiguió en un rango de velocidad de 0 a 7500 RPM con un agitador Talboys 102, aplicándose correspondiendo a las exigencias que la disolución manifestaba para conseguir homogeneizarla.

El volumen de agua fue de 100 mL, se vertieron fracciones de 1 g hasta alcanzar la concentración de 10% p/v; posteriormente se llevó la disolución hasta la saturación, siendo ésta determinada por observación de la consistencia. La muestra analizada se sometió a liofilización nuevamente para la recuperación del exudado. Se registró la temperatura y un volumen de agua sirvió como control del potenciómetro utilizado durante el experimento previendo alguna obstrucción del electrodo que influyera en las mediciones.

#### **6.4. Reología**

La viscosidad aparente fue determinada por medio de un viscosímetro Brookfield DV-II Programmable empleando *spindles* RV del No. 2 al No. 7 y con el accesorio *guardleg* en el equipo.

La muestra analizada fue una disolución homogénea que consistió en un vaso de precipitado KIMAX de 600 ml con 350 ml de agua ultrapura al que se añadió exudado en concentraciones de 10% hasta 40% p/v. Las lecturas se registran al alcanzar el estado estacionario y la temperatura de la muestra sea de 25°C. La prueba se efectuó durante 10 minutos con el rango de velocidades de corte disponibles del equipo.

Los datos registrados fueron la viscosidad, el esfuerzo cortante, la velocidad de corte y el porcentaje de torque en unidades del Sistema Internacional. Los resultados generaron gráficas para determinar el tipo del fluido, se obtuvieron los parámetros de índice de consistencia y el índice de comportamiento del fluido acorde a lo reportado por Mitschka (1982), Briggs y Steffe (1997), Ibanoglu e Ibanoglu (1998), Sahin y Ozdemir (2004).

Con la finalidad de conseguir más información sobre la reología de la muestra, se realizaron pruebas reológicas con *Bursera simaruba* crudo, arábigo, mezquite y ciruelo disueltos en agua en concentraciones de 3, 6, 9, 12 y 15 % p/v; *Bursera simaruba* purificado sólo consiguió medirse al 3% p/v por limitaciones en la cantidad de muestra disponible. El equipo utilizado fue el Modular Compact Rheometer Physica MCR 300; se estableció el sistema de medición de cilindros concéntricos CC-27 aunado al accesorio TEZ-150P-C. El perfil reológico se obtuvo a través de 30 puntos de medición, registrándose los resultados en el software V3 200/32 V2.50 para su posterior análisis a través del modelo de Ostwald de Waelde. Las pruebas se realizaron por duplicado y a una temperatura controlada de 25°C.

## 6.5. Tensión superficial

La tensión superficial por efecto de la concentración de *Bursera simaruba* crudo, ciruelo, arábiga y mezquite en agua fue determinada por un tensiómetro Sigma 703 KSV Instruments, las disoluciones fueron preparadas al 3, 6, 9, 12 y 15 % p/v. La determinación en *Bursera simaruba* purificado se efectuó al 3% por limitaciones en la cantidad de muestra disponible.

El método de la placa Wilhelmy y el anillo de Du Nouy fueron desarrollados acorde al manual de operación del equipo. Los resultados son el promedio de tres mediciones efectuadas a temperatura ambiente.

Las mediciones de tensión superficial se determinan al llevar la geometría que se encuentra suspendida de una balanza hacia la interfase líquida a evaluar y registrando las fuerzas involucradas; éstas dependerán del tamaño y geometría (placa o anillo), el ángulo de contacto (es cero si el sensor es de platino o iridio, debido a que brindan mejor contacto y son de fácil limpieza) y a la tensión superficial del líquido. Es en modo *Normal* si registra todos los valores a lo largo de la prueba y es en modo *Peak* si sólo nos interesa el valor registrado más alto.

El método de la placa Wilhelmy se desarrolló configurando al equipo en modo de medición *W* y *Normal*. Se coloca la placa completamente limpia sobre el gancho y se sumerge en la muestra. Se manipula lentamente hasta que la placa esté sobre la superficie del líquido y se observan los valores de tensión superficial desplegados en el panel del equipo hasta desprenderse la placa y registrar esa lectura.

El método de Du Nouy consiste en utilizar un anillo sumergiéndolo y despegando de un líquido, presentándose diversas fuerzas durante ese procedimiento. Cuando el anillo esta sobre la superficie es cero; al tocar la superficie, la humectación del anillo provoca una fuerza positiva y es negativa al atravesarla y sumergirse en su totalidad; mientras el anillo es extraído, la fuerza va incrementándose hasta alcanzar un máximo y ése es el resultado. Las mediciones se realizaron en modo *Normal* y con el factor de corrección *Rc* para obtener directamente los valores en la pantalla del equipo y al ser agua el disolvente.

## **6.6. Tamaño de partícula**

El radio hidrodinámico como tamaño de partícula fue determinado para disoluciones al 5% p/v de los exudados liofilizados de *Bursera simaruba* crudo y purificado, ciruelo, mezquite y arábigo. El equipo utilizado fue un Z-Sizer Nano Malvern con la celda ZEN0112; se configuró la prueba a través del Zetasizer software v6.01 indicando al agua como medio dispersante y proporcionando su índice de refracción (también de las disoluciones) previamente determinado. La prueba se realizó por duplicado a temperatura ambiente.

Las consideraciones implicadas en ésta prueba no destructiva con respecto a la muestra son volúmenes pequeños y en concentraciones bajas que permitan la dispersión de luz, una disolución total de la muestra evitando la formación de agregados o espuma y la homogeneidad del exudado liofilizado al provenir preferentemente de un solo lote. La operación del equipo es relativamente sencilla, basta configurar la prueba con los datos descritos y tener las consideraciones en el manejo de celdas de cuarzo.

## **6.7. Calorimetría diferencial de barrido**

Las muestras liofilizadas tanto del exudado y la fracción purificada de *Bursera simaruba* se llevaron dentro de cápsulas de aluminio al DSC Q1000 de TA Instruments para la determinación de capacidad calorífica. El software utilizado para el registro de resultados fue Universal V4.2E.

Durante la ejecución de la prueba es pertinente un uso eficiente y limpio de la balanza analítica para que esas mediciones sean reportadas al software de manera precisa. Los exudados liofilizados deben incorporarse plenamente dentro de la cápsula, evitando caer en excesos que durante el sellado desborden la muestra.

Las cápsulas se colocaran correspondientemente a sus posiciones de tapa y base, no exponerlas a la deformación al aplicarse demasiada fuerza durante el sellado. Es recomendable utilizar instrumentación como espátulas y pinzas en todo momento de manipulación para no presentar variaciones en el peso.

Se colocaron 0.7200 mg de *Bursera simaruba* crudo y 0.800 mg de la fracción purificada, se registraron los valores de capacidad calorífica hasta 100°C.

## 6.8. Termogravimetría

El contenido de humedad para *Bursera simaruba* en su presentación cristal, crudo y purificado se determinó en un TGA 2950 V5.4A de TA Instruments. La prueba se realizó sometiendo las muestras a un gradiente de temperatura durante 20 minutos hasta una isoterma de 98°C por 100 minutos. La pérdida de porcentaje en peso era registrada en el software Universal V4.2E.

En el analizador termogravimétrico, a diferencia del calorímetro diferencial de barrido, basta con realizar el procedimiento de tarar la charola previamente a la colocación de la muestra y a la realización de las mediciones. Las consideraciones en ésta prueba radicaron en determinar un rango de temperatura que no expusiera a quedar inservible la charola debido a la degradación de la muestra y siendo nuestro objetivo la humedad se fijó la isoterma mencionada.

Se requirieron 7.439 mg, 1.260 mg y 0.957 mg de *Bursera simaruba* cristal, crudo y puro respectivamente.

## 6.9. Composición de azúcares

La identificación del monosacárido presente en el exudado de *Bursera simaruba* se realizó a través de una hidrólisis ácida y posteriormente por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Una cantidad de 0.5 g del exudado se mezcló con 40 mL de HCl 1.8 N en H<sub>2</sub>O y 40 mL de CH<sub>3</sub>OH, sometién dose a reflujo durante 40 horas. Al término de la reacción se neutralizó con KOH 2N en CH<sub>3</sub>OH hasta pH 7 y se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotavapor Heidolph 400.

Los azúcares durante la hidrólisis ácida se detectaban por cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de gel de sílice con fase móvil de n-butanol-H<sub>2</sub>O (9:1) y revelándose con sulfato cérico amoniacal. Se utilizaron cromatofolios (5 x 3 cm) de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck) y glucosa como referencia.

La neutralización posterior a la hidrólisis favoreció la formación de sales; para eliminarlas, la muestra se sometió a filtración, a evaporación del disolvente por presión reducida y finalmente a una cromatografía de exclusión por tamaño en columna abierta (CET-CA). Se utilizaron filtros Whatman #4 de tipo cualitativo. La cromatografía en columna abierta se acondicionó con Sephadex G-15 en la fase estacionaria y metanol como fase móvil, se colectaron las fracciones y se eliminó el disolvente en el rotavapor.

El análisis en CLAR se realizó con la fracción I proveniente de la CET-CA. Se filtró la muestra a través de acrodiscos LC 13 mm de 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF y se inyectó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  en un equipo Perkin-Elmer con detector de índice de refracción Serie 200, una interfase NCI 900 y una columna analítica Econosphere  $\text{NH}_2$  (250mm x 4.6mm, 5  $\mu\text{m}$  Alltech). La fase móvil fue  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (4:4:2) con un caudal de operación de 1 mL/min. Los monosacáridos inyectados como estándar fueron arabinosa, galactosa, glucosa y xilosa a 5 mg/mL. Se realizó una coelución de la muestra con el monosacárido que presentara similares tiempos de retención en CLAR.

### 6.10. Fitoquímica

Se realizó un análisis fitoquímico cualitativo en los exudados de *Bursera simaruba*, ciruelo, copal, mezquite y arábigo para determinar la presencia de taninos, alcaloides, saponinas, glucósidos cardiacos, esteroides y flavonoides acorde a lo realizado por Parekh y Chanda (2006). Las pruebas se realizaron por duplicado, siendo el procedimiento de la siguiente manera:

- En la determinación de taninos se requirió de 200 mg de exudado disuelto en 10 mL de agua destilada y posteriormente filtrado. En un tubo de ensayo a 2 mL del filtrado se agregó 2 mL de  $\text{FeCl}_3$ .

Se confirma la presencia de taninos con la aparición de un precipitado.

- Los alcaloides fueron determinados al disolver 200 mg de exudado en 10 mL de metanol y filtrándose. En tres tubos de ensayo se vertieron 2mL de filtrado, 1mL de HCl al 1%, se colocaron sobre vapor de agua durante unos minutos y se añadió 1mL del filtrado nuevamente. Los reactivos de Mayer, Wagner y Draggendorf fueron utilizados como etapa final de la prueba, utilizando un tubo de ensayo para cada reactivo y agregándole 6 gotas respectivamente.

La confirmación de alcaloides se interpreta por la presencia de precipitados; cremoso en el caso del reactivo de Mayer, café-rojo para el reactivo de Wagner y naranja con el reactivo de Draggendorf.

- En la prueba para saponinas a 0.5 mL del filtrado proveniente de la disolución en metanol se agregaron 5 mL de agua destilada.

La persistencia de espuma es indicadora positiva de éstos compuestos.

- Los glucósidos cardiacos fueron determinados por la prueba de Keller-Killiani. Consiste en tomar 2 mL del filtrado en metanol; agregar 1 mL de ácido acético glacial,  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

La aparición de un color verde-azul representa la presencia de éstos compuestos.

- La prueba para esteroides consistió en la reacción de Liebermann-Burchard. 200 mg de cada exudado fueron disueltos en 10 mL de cloroformo y posteriormente filtrado. Se toman 2 mL, se agrega 2 mL de anhídrido acético y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lentamente.

Un anillo azul-verde indica la presencia de éste tipo de terpenoides.

- Los flavonoides fueron determinados disolviendo 200 mg de cada exudado en 10 mL de etanol, filtrándose para tomar 2 mL, agregar HCl concentrado y sumergir una tira de magnesio y/o zinc.

Se confirma la presencia al presentarse un color rosa-rojo.

Considerando que los taninos presentes en gomas de *Prosopis spp.* resultan una limitación para su uso como aditivo en alimentos (López-Franco *et. al.*, 2006) se procedió con el análisis fitoquímico cuantitativo de los exudados liofilizados de arábigo, mezquite, ciruelo, copal y *Bursera simaruba* en cristal, crudo y fracciones puras (I, II y III) acorde a lo reportado por Edeoga *et. al.* (2005). La descripción de la prueba es:

- 500 mg de muestra son pesados dentro de un recipiente al que se agregan 50 mL de agua destilada. Se mantiene por una hora en un agitador mecánico, posteriormente se filtra en un matraz volumétrico de 50 mL y se afora. Se extraen 5mL del filtrado a un tubo de ensayo donde se mezcla con 2 mL de  $\text{FeCl}_3$  a 0.1 M en HCl 0.1 N y ferrocianuro de potasio 0.008 M. La absorbancia es medida a 120 nm después de 10 minutos.



## 6.11. Fitotoxicidad

La fitotoxicidad se determinó por la inhibición del crecimiento en raíz e hipocotilo durante la germinación de semillas irrigadas con diluciones de exudados (Burton *et. al.*, 2001; Sahu y Arora, 2007).

El exudado de *Bursera simaruba* fue presentado en su forma cristal (proveniente directamente de la colecta), crudo (a partir del extracto liofilizado) y puro (sometido a cromatografía por exclusión de tamaño). En los exudados de arábigo, mezquite, ciruelo y copal se utilizaron extractos crudos liofilizados; se incluyó mezquite adquirido comercialmente. Se utilizaron semillas de lenteja *Lens esculenta* adquiridas comercial y localmente, para asegurar sus condiciones sanitarias se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% en H<sub>2</sub>O destilada durante 15 minutos para enseguida lavarlas. Se prepararon diluciones con los exudados en concentraciones desde 5 hasta 25 % p/v en H<sub>2</sub>O ultrapura. Se utilizó H<sub>2</sub>O ultrapura como control negativo y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a 10.8 mg/L.

En cajas Petri estériles fue colocado un papel filtro de filtración media en la base y se añadió 1 mL de la solución del exudado, se colocaron 5 semillas de manera equidistante para cubrirlas con un papel filtro y agregando nuevamente 1 mL de la misma solución. Las cajas se sellaron con parafilm y se depositaron al resguardo de luz y a temperatura ambiente durante 192 horas. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Al término de los 8 días requeridos se procedió a medir la elongación de la radícula e hipocotilo por medio de un vernier digital Yamato CDX60; observándose cualquier signo de fitotoxicidad como necrosis o inhibición en las semillas.

Se determinó el crecimiento en raíz e hipocotilo para las semillas irrigadas con las diluciones de exudados, sometiendo los datos a un Análisis de Varianza Múltiple factorial de dos vías mediante el software Statistica® 8.

Con los promedios del crecimiento se determinó el índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) en H<sub>2</sub>O de acuerdo a las ecuaciones 5 y 6, reportadas en la literatura ya citada para ésta prueba. La propagación del error es incluida mediante las ecuaciones 7 y 8 y su desarrollo matemático (Baird, 1998; CWRU, 2004) es presentado en el apéndice A.

$$\%G = \left( \frac{G_s L_s}{G_c L_c} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

$$\%F = \left( \frac{L_c - L_s}{L_c} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (6)}$$

$$\frac{\delta_G}{G} = \sqrt{\left( \frac{\delta_{L_s}}{L_s} \right)^2 + \left( \frac{\delta_{L_c}}{L_c} \right)^2} \quad \text{Ecuación (7)}$$

$$\frac{\delta_F}{F} = \sqrt{\frac{\delta L_c^2 + \delta L_s^2}{(L_c - L_s)^2} + \left( \frac{\delta_{L_c}}{L_c} \right)^2} \quad \text{Ecuación (8)}$$

$G_s, G_c$  : Número de semillas germinadas en el tratamiento y control respectivamente.

$L_s, L_c$  : Longitud promedio de raíz o hipocotilo en el tratamiento y control.

$\frac{\delta_G}{G}, \frac{\delta_F}{F}$  : Error en la determinación del índice de germinación y fitotoxicidad.

$\delta_{L_s}, \delta_{L_c}$  : Errores en las mediciones de raíz o hipocotilo en el tratamiento y control.

## 6.12. Estabilidad de emulsiones

Se elaboraron emulsiones O/W con aceite de canola, H<sub>2</sub>O ultrapura y los extractos crudos liofilizados de los exudados de *Bursera simaruba*, ciruelo y copal como emulsificantes. Las emulsiones fueron formadas a 4500 RPM con un agitador Talboys 102. La proporción de los sistemas de emulsiones fue la siguiente:

- *Bursera simaruba* crudo: 100 mL H<sub>2</sub>O/10 g de exudado liofilizado/10 mL aceite
- Ciruelo: 100 mL H<sub>2</sub>O/5 g de exudado liofilizado/10 mL aceite
- Copal: 100 mL de H<sub>2</sub>O/5 g de exudado liofilizado/5 mL aceite

Se observaron durante 20 días y registrando por fotografías diarias el diámetro Feret promedio como tamaño de gota manifestado a los diversos objetivos del microscopio mediante el software para procesamiento de imágenes *ImageJ*. Los microscopios utilizados fueron Zeuss Axiolab (Laboratorio de Ecología del Bentos) y Nikon Eclipse E200 (Planta Piloto de Ingeniería Ambiental). Las fotografías digitales fueron conseguidas con una cámara Sony DSC-W45. Se determinó la cinética de coalescencia de los diversos sistemas de emulsiones acorde a lo realizado por Román-Guerrero *et. al.* (2009).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación para *Bursera simaruba* son la descripción del exudado colectado y el rendimiento del extracto crudo obtenido tras la liofilización; las propiedades físicas como solubilidad en agua y pH a distintas concentraciones; tensión superficial, distribución del tamaño de partícula y la caracterización reológica. El análisis térmico incluye la capacidad calorífica entre el extracto crudo y purificado; así como el contenido de humedad en el cristal, extracto crudo y purificado. Se realizó una identificación de azúcares, análisis fitoquímico y de fitotoxicidad. Finalmente, se evaluó al exudado de *Bursera simaruba* como agente estabilizante en emulsiones O/W calculando la tasa de coalescencia.

El desarrollo de ésta tesis permitió la realización de las siguientes publicaciones científicas:

- Alejandro Regalado Méndez & Octavio Antonio Noriega Ramos. 2009. Comportamiento reológico de un fluido. *Ciencia y Mar*. XII (36): 35-42. ISSN: 1665-0808.
  
- Regalado-Méndez A., Noriega-Ramos O. A., Hernández-Carlos B., Santiago-Romero H., Nava-Díaz I. L., Báez-García J. G. y Vernon-Carter J. E.. Physicochemical Characterization of Biopolymers. 2009. IFT 09 Annual Meeting + Food Expo. June 6-9 2009. Anaheim/OC CA, USA. Book of abstracts 254-27:312. ISSN: 1082-1236.
  
- Noriega-Ramos O.A., Regalado-Méndez A., Ramírez-Mares J.M.V. y Báez-González J.G. Caracterización fisicoquímica del palo mulato y su potencial como aditivo en alimentos. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 27-28 Mayo, 2010. Guanajuato, México. OT160. *Revista Salud Pública y Nutrición Edición Especial No. 03-2010*. ISSN: 1870-0660.

## DESCRIPCIÓN DEL EXUDADO

La especie *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) requerida para la colecta de su exudado no se encuentra dentro de la Lista de Especies en Riesgo acorde a la NOM-059-SEMARNAT-2001. La copiosa producción de exudado para *Bursera simaruba* descrita por Lagenheim (2003) se confirma (Figura 13), se colectaron 1.75 kg.



Figura 13. Exudado de *Bursera simaruba*.

El exudado se distribuyó a lo largo de la incisión realizada; al retirarlo, enseguida comenzó a producirlo nuevamente que caía de manera líquida sobre los brazos de los colectores y secándose en un corto tiempo. La corteza papirácea, pese a su remoción previa en el área del tronco para la colecta, se encontró relativamente incorporada al exudado. Durante el tratamiento en laboratorio, el exudado estaba disponible en diversos tamaños como placas y granuloso; se percibía un aroma característico pero no intenso y el color se encontraba desde amarillo claro hasta opaco.

## RENDIMIENTO

Se elaboraron diversos lotes ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  y  $A_4$ ) con disolución de *Bursera simaruba* a 10% p/v, los cuales fueron liofilizados en el equipo LABCONCO Free Zone 4.5 a  $133 \times 10^{-3}$  Mbar y  $-40^\circ\text{C}$  determinándose la diferencia de peso en cada sesión. Los perfiles de pérdida de  $\text{H}_2\text{O}$  son similares en los lotes (figura 14). El secado total se consigue aproximadamente en 24 hrs.

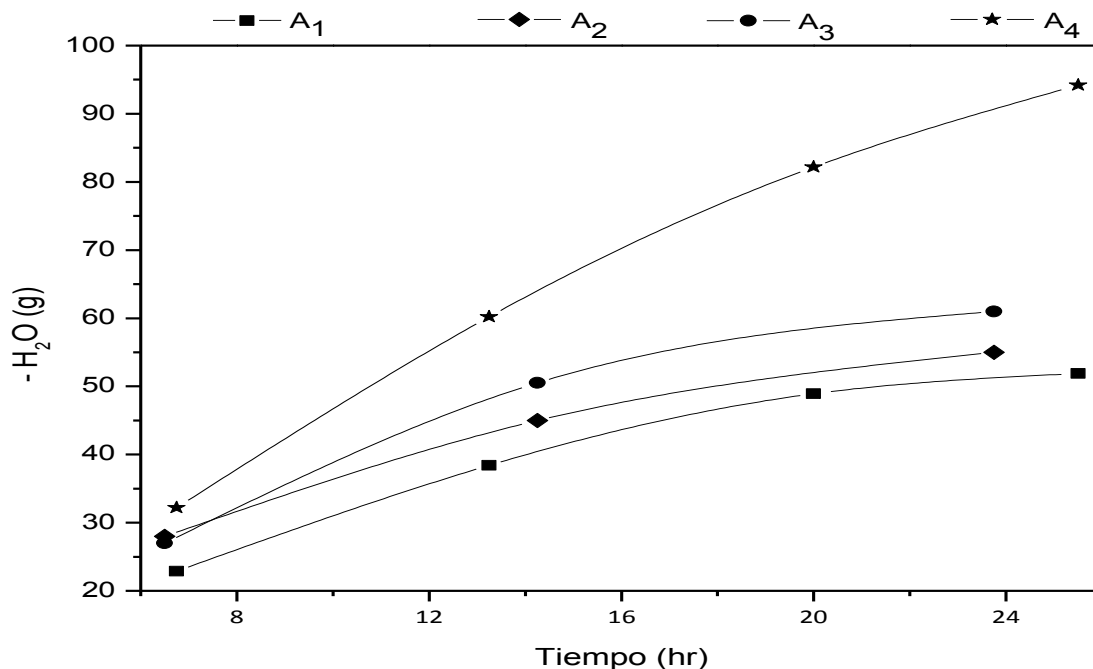


Figura 14. Secado de *Bursera simaruba* por liofilización.

La curva  $A_4$  que presenta una mayor pérdida de agua pertenece a la disolución de corteza y materia extraña retenida en la primera filtración; no consiguiéndose cantidades significativas liofilizadas de esta fracción, por lo que es descartada de investigación. La pérdida de agua en  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  es menor debido a una presencia importante de extracto. Las diferencias en la velocidad de secado son debido a la geometría del recipiente contenedor (es preferible utilizar recipientes de volumen mayor al conseguido posterior a la filtración). Al reducir el grosor de la muestra congelada, se brinda mayor área superficial de contacto durante la liofilización y se optimiza el tiempo de secado. Como resultado principal, el rendimiento de las fracciones del exudado liofilizado de *Bursera simaruba* son 55.5%, 52.8% y 46.5% para  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  respectivamente. El rendimiento global es del 40%.

## pH Y SOLUBILIDAD

Para la medición de pH, se realizaron disoluciones de *Bursera simaruba* en concentraciones hasta 10% p/v con un incremento unitario y posteriormente de un factor de 10 en el rango de 10-50% p/v tanto en *Bursera simaruba* y mezquite comercial. El valor pH del H<sub>2</sub>O como control fue 6.879±0.048 a 22.6±0.7 °C durante toda la prueba. El comportamiento es similar entre exudados.

El perfil de pH en función de la concentración de los extractos crudos liofilizados de *Bursera simaruba* y mezquite comercial son representados en la figura 15. La saturación se consiguió al 40% p/v.

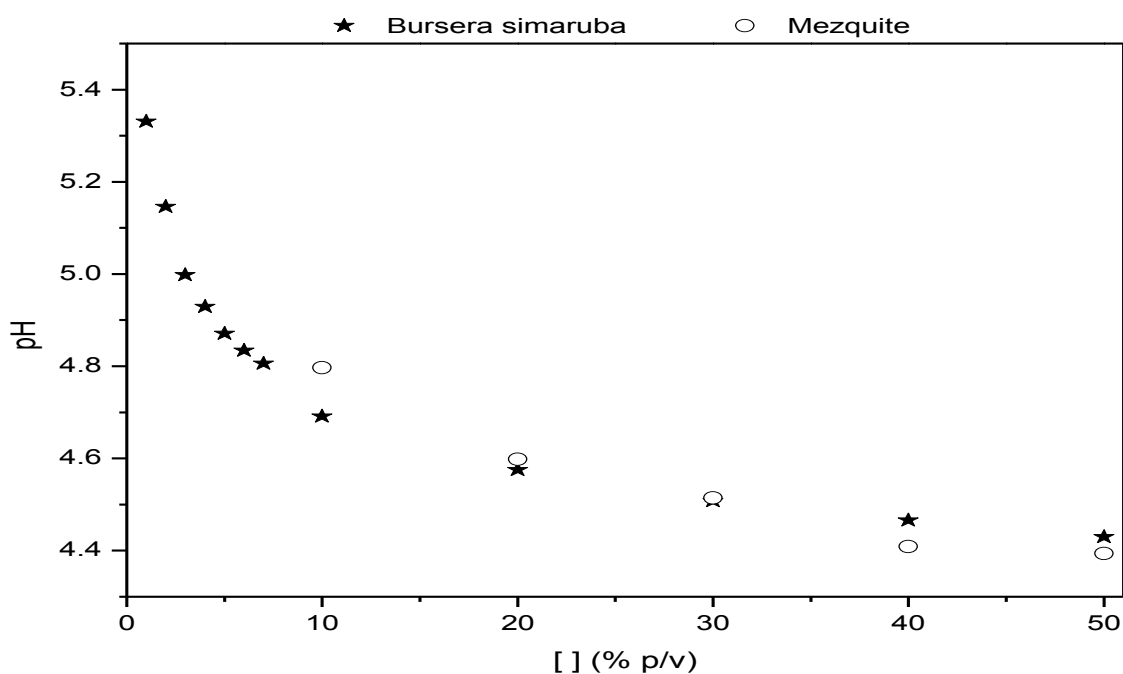


Figura 15. Valores de pH.

Los valores experimentales de pH para *Bursera simaruba* confirman similitud con la goma de mezquite. Nussinovitch (2010) reporta que las disoluciones de goma arábica tienen un pH entre 4.5 y 5.5. El exudado de *Bursera simaruba* presenta semejanza de ésta propiedad con las gomas mencionadas.

## REOLOGÍA

Los datos de viscosidad para *Bursera simaruba* en disolución al 40% p/v son reportados en la Tabla III y fueron obtenidos con el viscosímetro Brookfield® DV-II Pro con el *spindle* 3 y a  $25 \pm 1$  °C. Se consideró ésta medición representativa para la determinación de viscosidad y tipo de fluido de la muestra debido a que el porcentaje de torque es cubierto apropiadamente en todas las revoluciones por minuto (RPM) disponibles en el equipo.

Tabla III. Determinación de viscosidad de *Bursera simaruba* por viscosímetro Brookfield.

Velocidad angular $\Omega$ (RPM)	Viscosidad $\eta$ (mPa·s)	Esfuerzo cortante $\tau$ (N/m <sup>2</sup> )	Velocidad de corte $\dot{\gamma}$ (s <sup>-1</sup> )	Torque %
3	62.95	0.24	3.67	2.95
6	62.90	0.46	7.34	5.90
10	64.00	0.78	12.20	10.00
12	62.40	0.92	14.70	11.70
20	63.35	1.55	24.50	19.80
30	61.95	2.27	36.70	29.05
50	61.63	3.77	61.20	48.23
60	61.40	4.51	73.40	57.60
100	60.95	7.46	122.00	95.20

En la figura 16 se aplicó el modelo de Ostwald de Waelde a los resultados de la tabla IV, consiguiéndose la expresión  $\tau = 0.06551(\dot{\gamma})^{0.98539}$  con un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.99998$ . El valor del exponente (0.985) indica un comportamiento pseudoplástico (Bird *et. al*, 2002) y la viscosidad resultante es de 65 mPa·s.

Los bajos valores de viscosidad y el comportamiento newtoniano inclusive en altas concentraciones son también presentados por goma arábica (Nussinovitch, 2010).

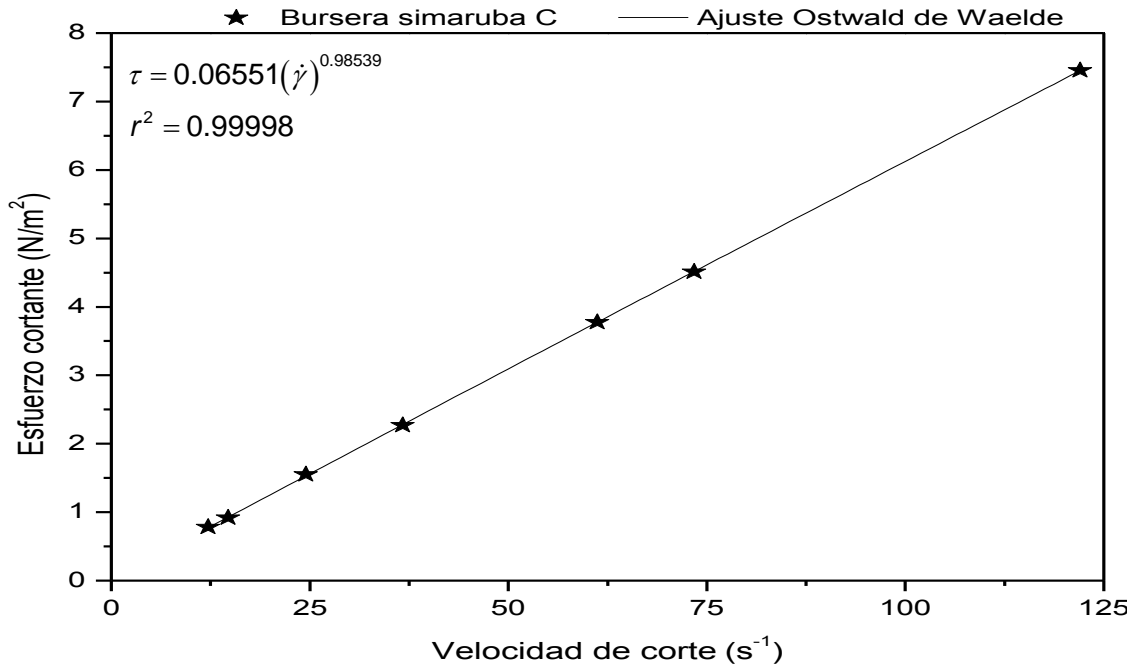


Figura 16. Reograma para *Bursera simaruba* por viscosímetro Brookfield.

El comportamiento reológico obtenido por el reómetro Modular Compact Rheometer Physica MCR 300 a través de cilindros concéntricos para las diversas concentraciones de *Bursera simaruba* es mostrado en la figura 17.

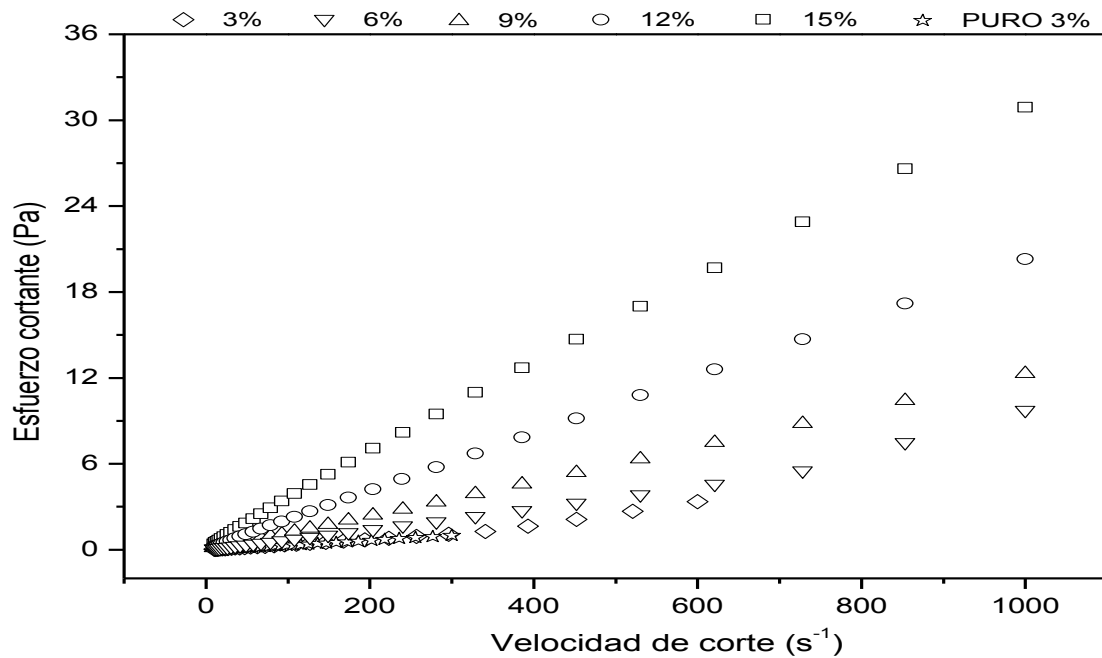


Figura 17. Reograma para *Bursera simaruba* por reómetro.



En la figura 17 se manifiesta un aumento en el esfuerzo cortante  $\tau$  requerido directamente proporcional al incremento de la concentración. Los valores de  $\tau$  y  $\dot{\gamma}$  en la fracción purificada al 3% p/v son equiparables a su similar concentración del extracto crudo, por lo que la purificación con cromatografía de exclusión por tamaño no tiene implicaciones en esta propiedad. Se confirma similar comportamiento al determinado por el viscosímetro Brookfield®. Adicionalmente a los valores de  $\tau$  y  $\dot{\gamma}$ , la viscosidad es determinada y se muestra en la figura 18.

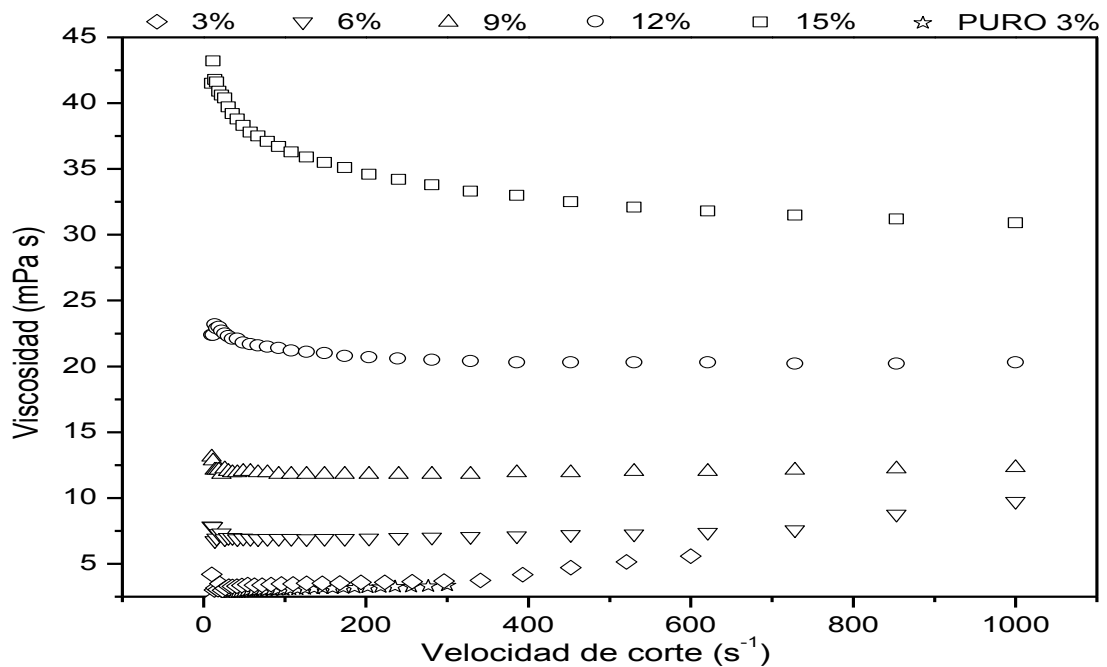


Figura 18. Viscosidad de *Bursera simaruba* a distintas velocidades de corte  $\dot{\gamma}$ .

En la figura 18 los valores de viscosidad manifiestan variaciones al incrementarse la velocidad de corte  $\dot{\gamma}$ ; a concentraciones de 3 y 6 % p/v la viscosidad aumenta, mientras que a 15% p/v la viscosidad decrece y finalmente a 6 y 9% p/v se mantiene estable en un mayor intervalo. La viscosidad de *Bursera simaruba* evidentemente aumenta con respecto a la concentración.

Los parámetros reológicos para *Bursera simaruba* obtenidos por el modelo de Ostwald de Waelde se registran en la tabla IV.

Tabla IV. Parámetros del modelo Ostwald de Waelde para *Bursera simaruba*.

Modelo Ostwald de Waelde:  $\tau = \mu (\dot{\gamma})^n$

[ ]	$\mu \times 10^{-3}$	$n$	$r^2$
3_Puro	2.2	1.0745	0.9998
3	2.3	1.0971	0.9930
6	6.6	1.0193	0.9974
9	12.4	0.9933	0.9997
12	24.7	0.9684	0.9999
15	50.7	0.9278	1.0000

Un análisis sobre los valores de viscosidad en función de la concentración para *Bursera simaruba* se muestra en la figura 19 y su comparación con otras gomas es descrita en la figura 20.

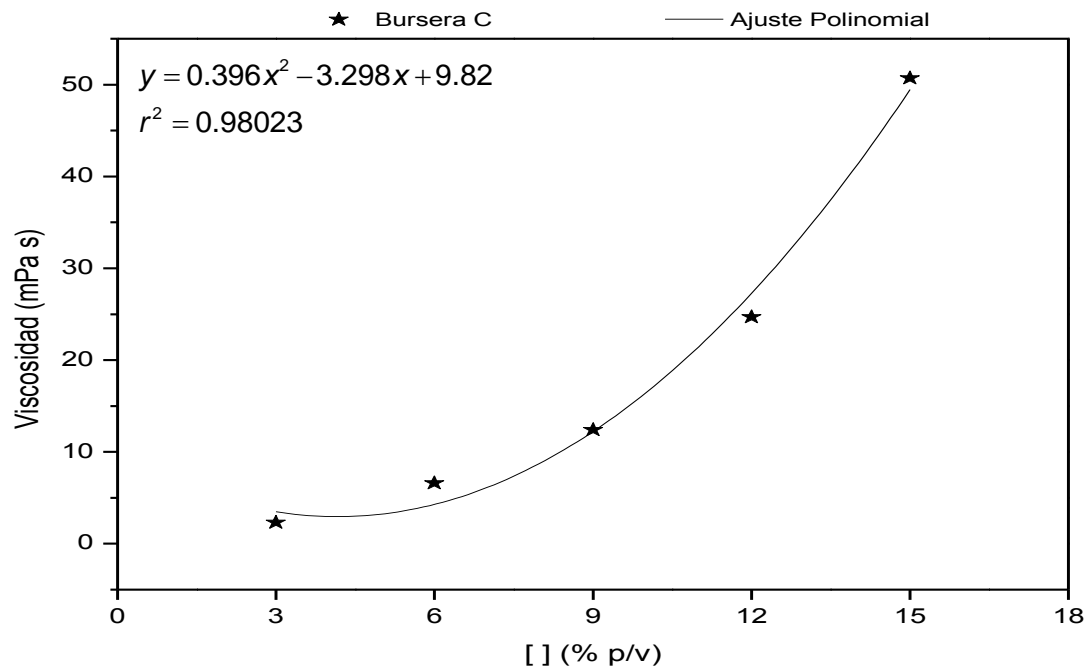


Figura 19. Viscosidad de *Bursera simaruba* crudo.

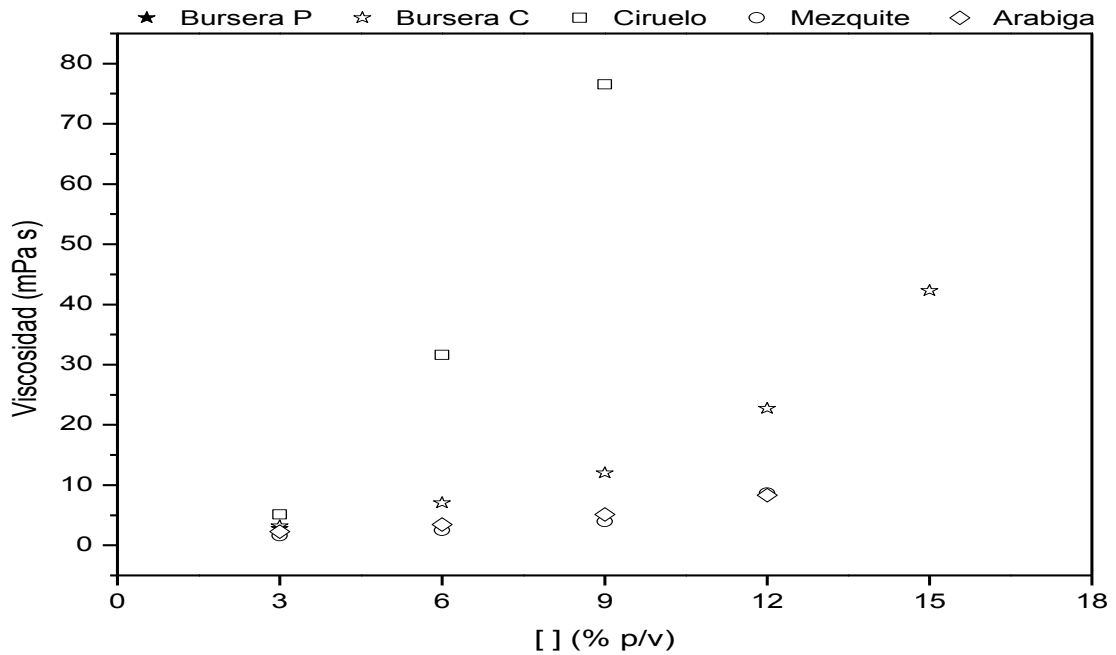


Figura 20. Viscosidad de exudados a distintas concentraciones.

En la figura 20 se presenta la viscosidad en función de la concentración para *Bursera simaruba*, ciruelo, goma arábica y mezquite siendo  $\eta_{\text{ciruelo}} > \eta_{\text{Bursera simaruba}} > \eta_{\text{arábica}} \approx \eta_{\text{mezquite}}$ . Se interpreta de estos resultados que las características espesantes de *Bursera simaruba* son mejores que las brindadas por goma arábica y mezquite.

A 3% p/v la viscosidad es del mismo orden en todos los exudados, incluso la de la fracción purificada, implicando que la purificación en cromatografía por exclusión de tamaño no es relevante en los estudios reológicos.

## TENSIÓN SUPERFICIAL

Los resultados de tensión superficial para *Bursera simaruba* se obtuvieron por el método del anillo de Du Nouy y placa Wilhelmy en un tensiómetro Sigma 703 KSV Instruments, presentándolos en la figura 21.

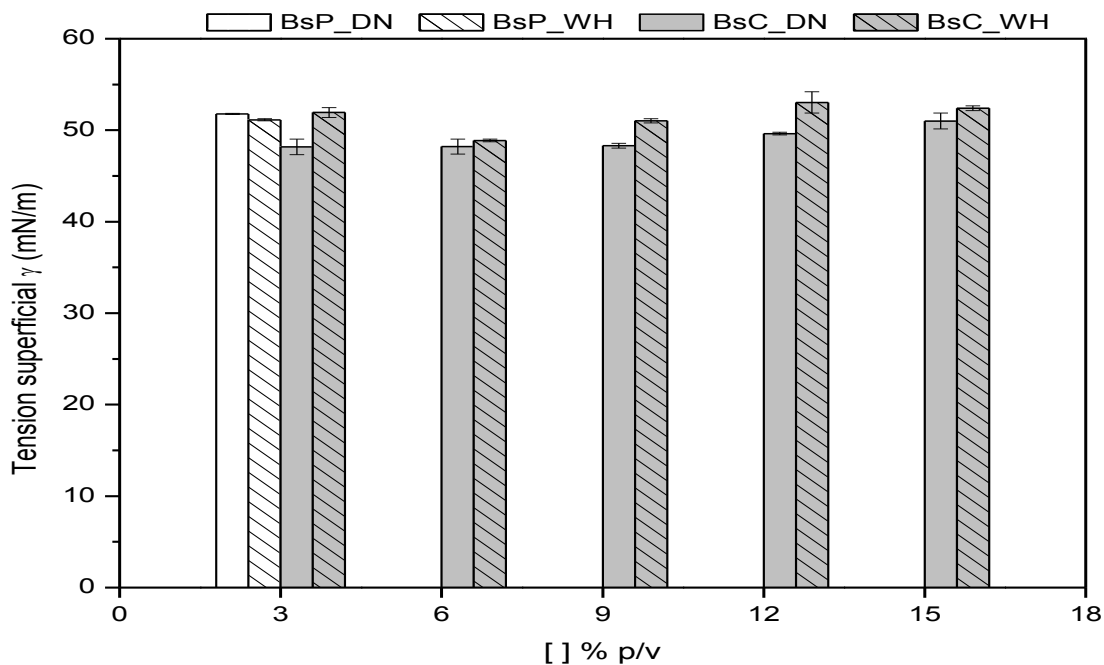


Figura 21. Tensión superficial en *Bursera simaruba* puro y crudo.  
Anillo de Du Nouy y placa Wilhelmy.

Por el método del anillo de Du Nouy, *Bursera simaruba* crudo (BsC) registró valores más bajos que su fracción purificada. Se observa un incremento en la tensión superficial directamente proporcional al aumentar la concentración. El valor de *Bursera simaruba* puro (BsP) a 3% p/v supera incluso al de BsC a 15% p/v.

Por el método de placa Wilhelmy, los resultados en la disminución de tensión superficial se encuentran en un rango similar a los obtenidos por el método del anillo de Du Nouy; pero no presentan una tendencia con respecto al incremento de concentración.

Ambos métodos no presentaron desviaciones estándar de sus resultados mayores a  $\pm 1$  mN/m. La tensión superficial del agua utilizada en las disoluciones fue determinada por ambos métodos; por el anillo de Du Nouy se obtuvo un valor de 72 mN/m, mientras que por placa Wilhelmy fue de 71.5 mN/m.

Se considera de mayor precisión el método del anillo de Du Nouy porque el valor de la tensión superficial es más cercano al reportado por Muñoz *et. al.* (2007) (72.5 mN/m a 25 °C).

En la figura 22 se presenta la comparación de *Bursera simaruba* con los exudados de ciruelo, mezquite y arábigo. Se demuestra que todos los exudados presentan una disminución de tensión superficial con respecto a la del agua. *Bursera simaruba* crudo prevalece como el exudado que generalmente disminuye en mayor grado la tensión superficial.

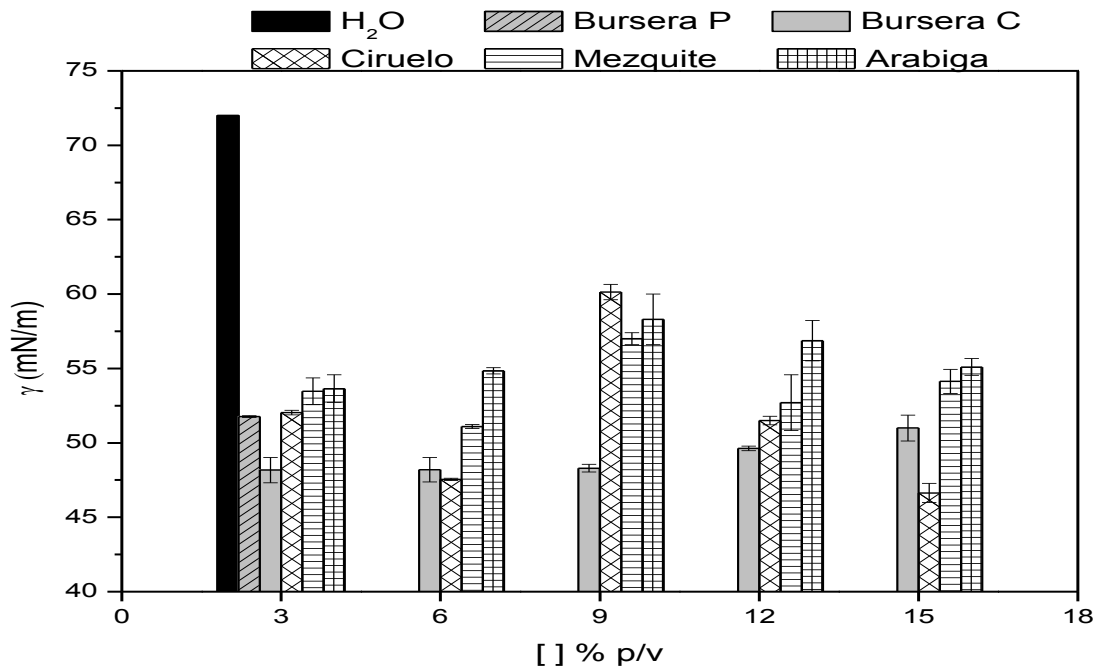


Figura 22. Tensión superficial en exudados. Anillo de Du Nouy.

La efectiva disminución de la tensión superficial a bajas concentraciones del exudado de *Bursera simaruba* respecto a ciruelo, mezquite y arábigo permite considerarlo un buen agente tensoactivo. La fracción purificada no presentó características adicionales o ventajas sobre el extracto crudo liofilizado.

## TAMAÑO DE PARTÍCULA

La determinación del diámetro hidrodinámico como tamaño de partícula fue analizada en un Z-Sizer Nano Malvern con celda ZEN0112 en disoluciones de exudados al 5% p/v. La distribución promedio del diámetro hidrodinámico y su polidispersidad es presentada en la tabla V. Los resultados de *Bursera simaruba* fueron determinados para el extracto crudo (Bursera) y para tres fracciones purificadas en cromatografía de exclusión por tamaño (I, II, III con  $T_r$  distintos). Se comparan además con ciruelo, mezquite y arábigo (figura 23).

Tabla V. Tamaño de partícula para diversos exudados.

Exudado	Diámetro hidrodinámico (nm)		Polidispersidad	
	Valor	±	Valor	±
Bursera	1,898.00	97.58	0.74	0.33
Bursera I	1,832.00	56.57	0.80	0.17
Bursera II	1,982.50	75.66	1.00	0.00
Bursera III	1,540.00	251.73	0.88	0.16
Ciruelo	1,461.50	156.27	1.00	0.00
Mezquite	231.95	3.18	0.72	0.00
Arábigo	175.95	61.45	0.82	0.19

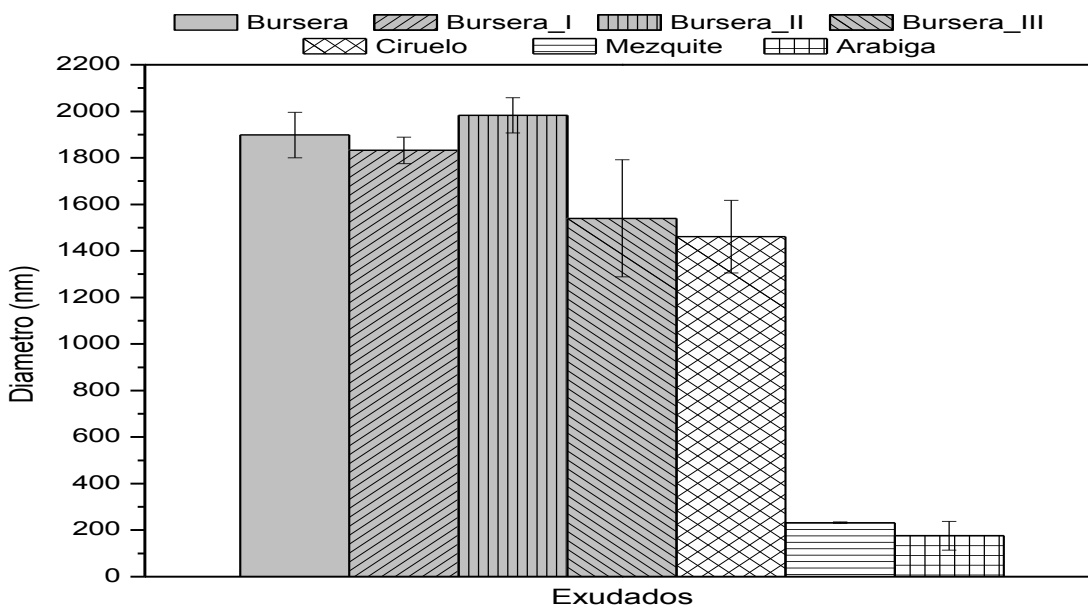


Figura 23. Diámetro hidrodinámico como tamaño de partícula en disoluciones al 5% p/v.

La figura 23 muestra la comparación del diámetro hidrodinámico entre exudados e indica que *Bursera simaruba* presenta los valores más altos mientras que los menores son para mezquite y arábigo. La proporción decreciente en tamaño queda expresada como  $Bs^{II} > Bs > Bs^I > Bs^{III} > \text{ciruelo} > \text{arábigo}$ .

Los polímeros poseen una distribución de pesos moleculares, por lo que el estudio de la física de polímeros tiene que ser estadística. La figura 24 es indicadora del parámetro de polidispersidad, que describe el grado de variación o amplitud de una campana gaussiana que representa los pesos moleculares de un polímero. La polidispersidad o índice de heterogeneidad se representa como el cociente entre el peso molecular en masa  $M_w$  y el peso molecular promedio en número  $M_n$  de la muestra (Hernández y Aguirre, 2005).

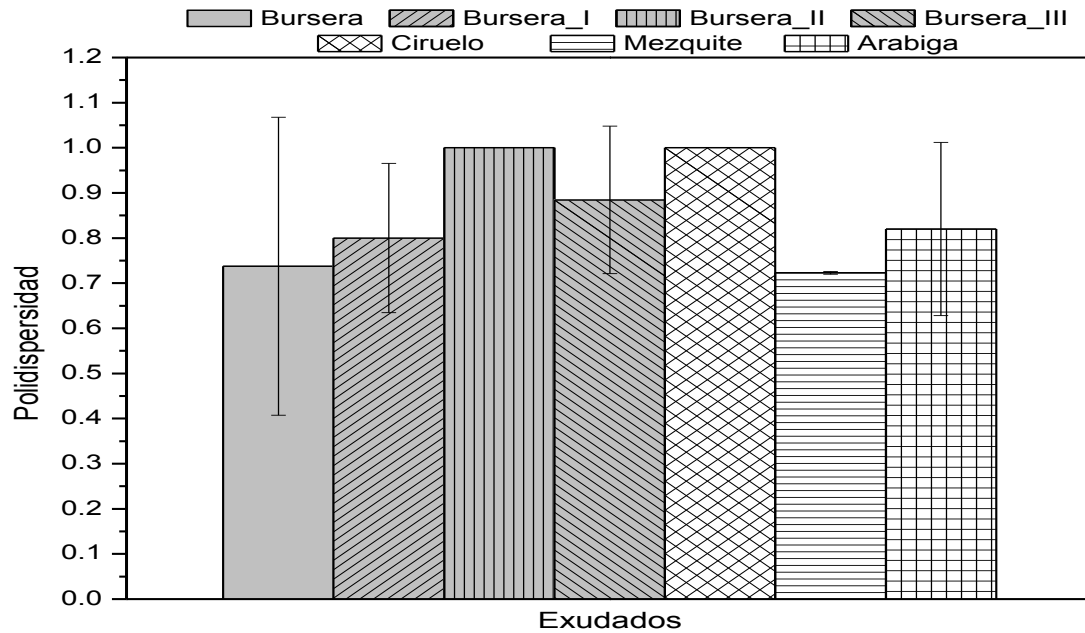


Figura 24. Polidispersidad durante la determinación del tamaño de partícula.

Los resultados de la figura 24 manifiestan significativas desviaciones en los valores de polidispersidad, por lo que la distribución de tamaño de partícula no es representativa. Este fenómeno se debe principalmente a que durante el tratamiento en laboratorio se presentaron diversas variables en el proceso de secado (impidiendo conseguir una muestra homogénea) y a que la disolución para ésta prueba se realizó sin ningún instrumento que incorporara los exudados liofilizados en el medio dispersante de manera adecuada.

## CAPACIDAD CALORÍFICA

El perfil de la capacidad calorífica con respecto a la temperatura fue determinado en un DSC Q1000 de TA Instruments y es mostrado en la figura 25.

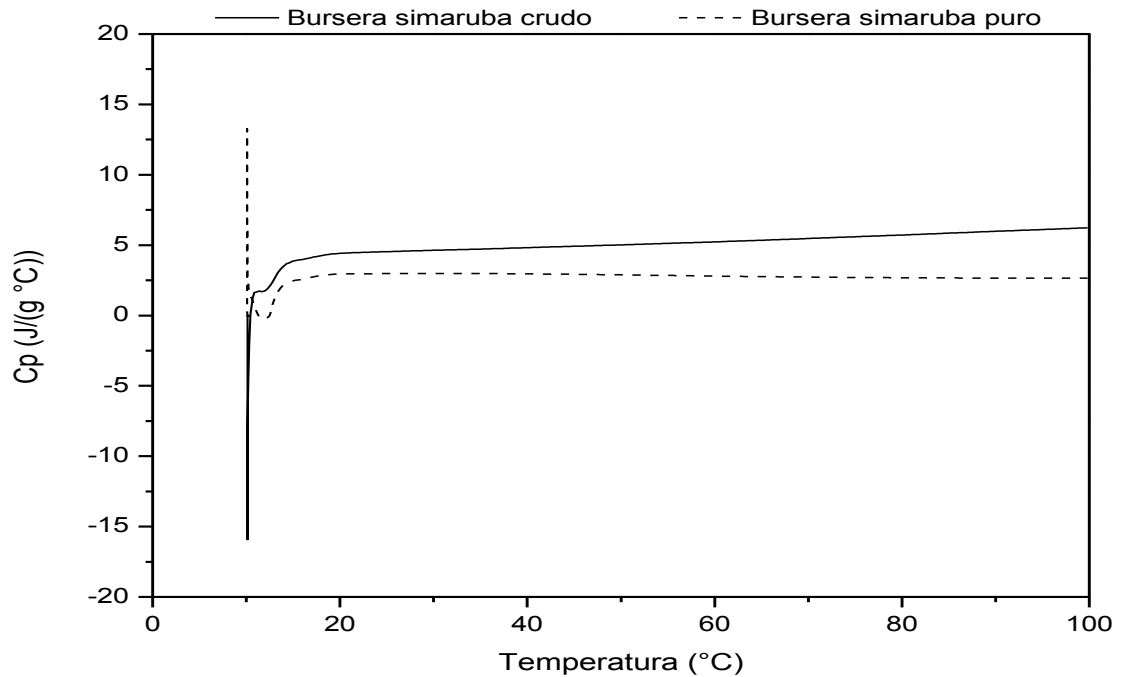


Figura 25. Capacidad calorífica de *Bursera simaruba* crudo y puro.

Los valores de capacidad calorífica para *Bursera simaruba* crudo hasta 100 °C son de  $6.1086 \pm 0.0736$  J/g °C presentando una tendencia creciente; mientras que *Bursera simaruba* puro registró valores de  $2.6484 \pm 0.0027$  J/g °C con una estabilidad más evidente.

El exudado de *Bursera simaruba* requiere de un análisis térmico más detallado para la determinación de temperaturas de transición vítrea, cristalización, fusión o degradación.



## TERMOGRAVIMETRÍA

El análisis termogravimétrico se realizó en un TGA 2950 V5.4A de TA Instruments. El perfil de pérdida de peso con respecto al tiempo dentro de la isoterma a 98 °C es presentado en la figura 26. Se observan similar comportamiento entre las muestras, los tiempos de asentamiento son  $\tau_A^{Cristal} = 100\text{min}$ ;  $\tau_A^{Crudo} = 53\text{min}$ ;  $\tau_A^{Puro} = 41\text{min}$ . El contenido de humedad para *Bursera simaruba* queda descrito por la pérdida de peso durante la prueba.

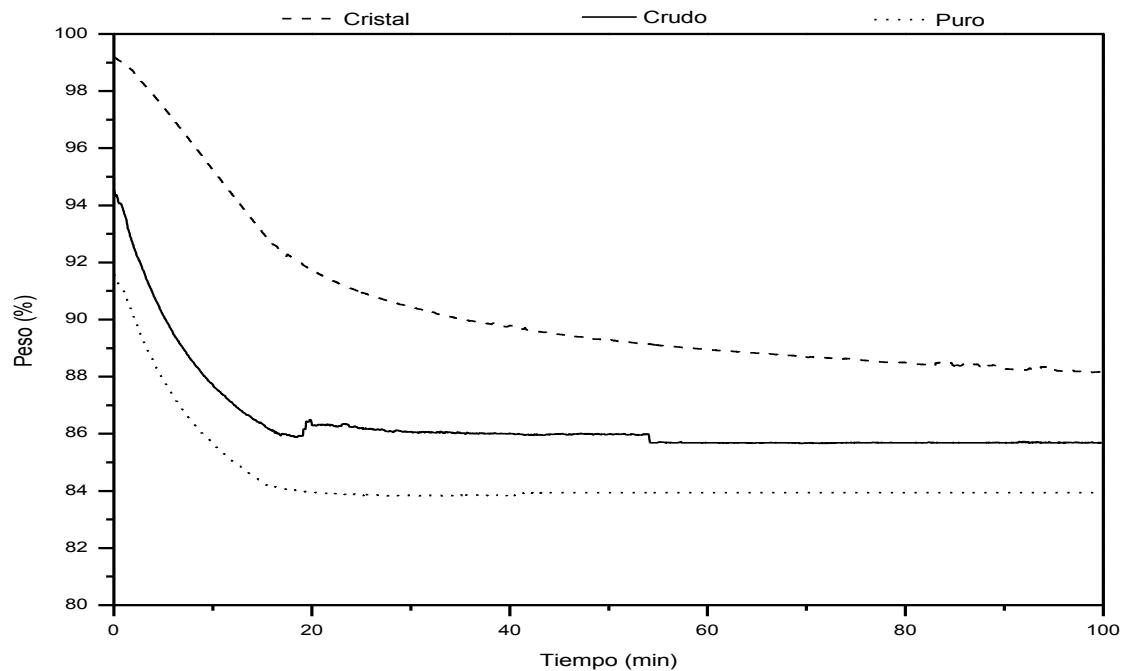


Figura 26. Perfil termogravimétrico de *Bursera simaruba* cristal, crudo y puro.

Los contenidos de humedad son  $H_{cristal} = 11.83\%$ ,  $H_{crudo} = 14.30\%$ ,  $H_{puro} = 16.06\%$ . Los resultados muestran que el menor contenido de humedad se presentó en el cristal, mientras la fracción purificada registró el mayor valor. Las muestras liofilizadas de *Bursera simaruba* crudo y puro por su estado físico de polvo están sujetas a absorber humedad fácilmente del medio.

El contenido de humedad en gomas oscila entre 12-16 % y tiene relación con la dureza (Nussinovitch, 2010).

## COMPOSICIÓN DE AZÚCARES

Se inyectó la muestra (fracción I de CET-CA) al equipo de CLAR Perkin-Elmer obteniéndose el cromatograma de la figura 27. Los picos observados aparecieron agrupados en forma de dos dobletes. El primer doblete posee picos con tiempos de retención de 5.29 y 5.59 min, mientras que el segundo los presenta a 7.14 y 7.39 min.

Para la identificación de los posibles monosacáridos contenidos en la muestra se inyectaron como estándares arabinosa, glucosa, galactosa y xilosa obteniendo tiempos de retención de 8.50, 11.50, 12.50 y 7.40 min respectivamente. La única similitud en tiempos de retención se dio entre la xilosa y el cuarto pico de la muestra, sugiriendo identidad entre estos. Para evaluar esta posibilidad se efectuó una coelución, la cual mostró que el pico correspondiente a la xilosa se superpuso al cuarto pico de la muestra, prevaleciendo el tercer pico de ésta en forma de un hombro que lo antecede (figura 29). En conjunto, estos resultados sugieren que el exudado de *Bursera simaruba* contiene al menos cuatro monosacáridos, uno de los cuales es xilosa.

Los estudios sobre composición de azúcares en gomas muestran que galactosa es el más común mientras que glucosa por lo general está ausente (Vaclavik y Christian, 2008). Esto concuerda con los resultados de esta tesis para el caso de la glucosa, pero no para la galactosa. Existen reportes de que la goma arábica presenta componentes sacáridos como galactosa, arabinosa y ramnosa; y que la goma tragacanto posee galactosa, xilosa y arabinosa (Ramsden, 2004; Nussinovitch, 2010). La composición sacárida de especies en la familia *Burseraceae* como *Boswellia carteri* y *Commiphora molmol* está reportada en Ashis *et. al.* (1992), Wiendl *et. al.* (1995) y Burdock (2010).

La composición de azúcares en el exudado de *Bursera simaruba* queda parcialmente descrita. Aparentemente xilosa, y otros tres monosacáridos, podrían formar parte de algún heteropolisacárido o de glucoproteínas. La identificación de los restantes podría lograrse al mejorar la resolución de la separación cromatográfica, aunada al uso de un mayor número de estándares que incluyan ramnosa, manosa, entre otros. Se recomienda incluir el resto de fracciones obtenidas por CET-CA. Además de la hidrólisis química seguida de CLAR en la detección de azúcares, existen métodos alternativos como la hidrólisis enzimática y el uso de lectinas; los cuales, acoplados a los métodos analíticos tradicionales, brindan una mayor especificidad en la identificación y determinación estructural de gomas (Brummer y Cui, 2005).

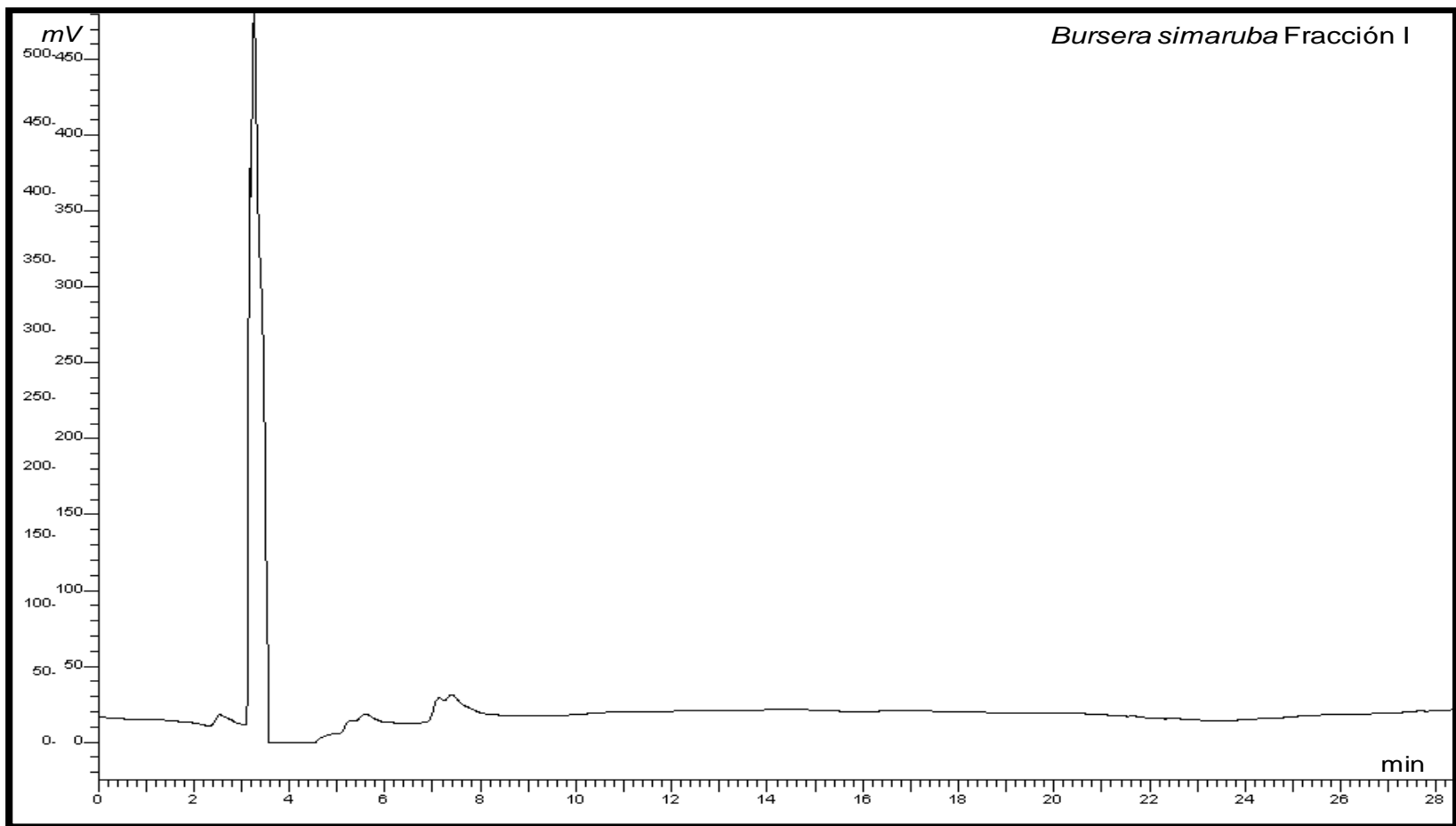


Figura 27. Cromatograma por CLAR de *Bursera simaruba*.

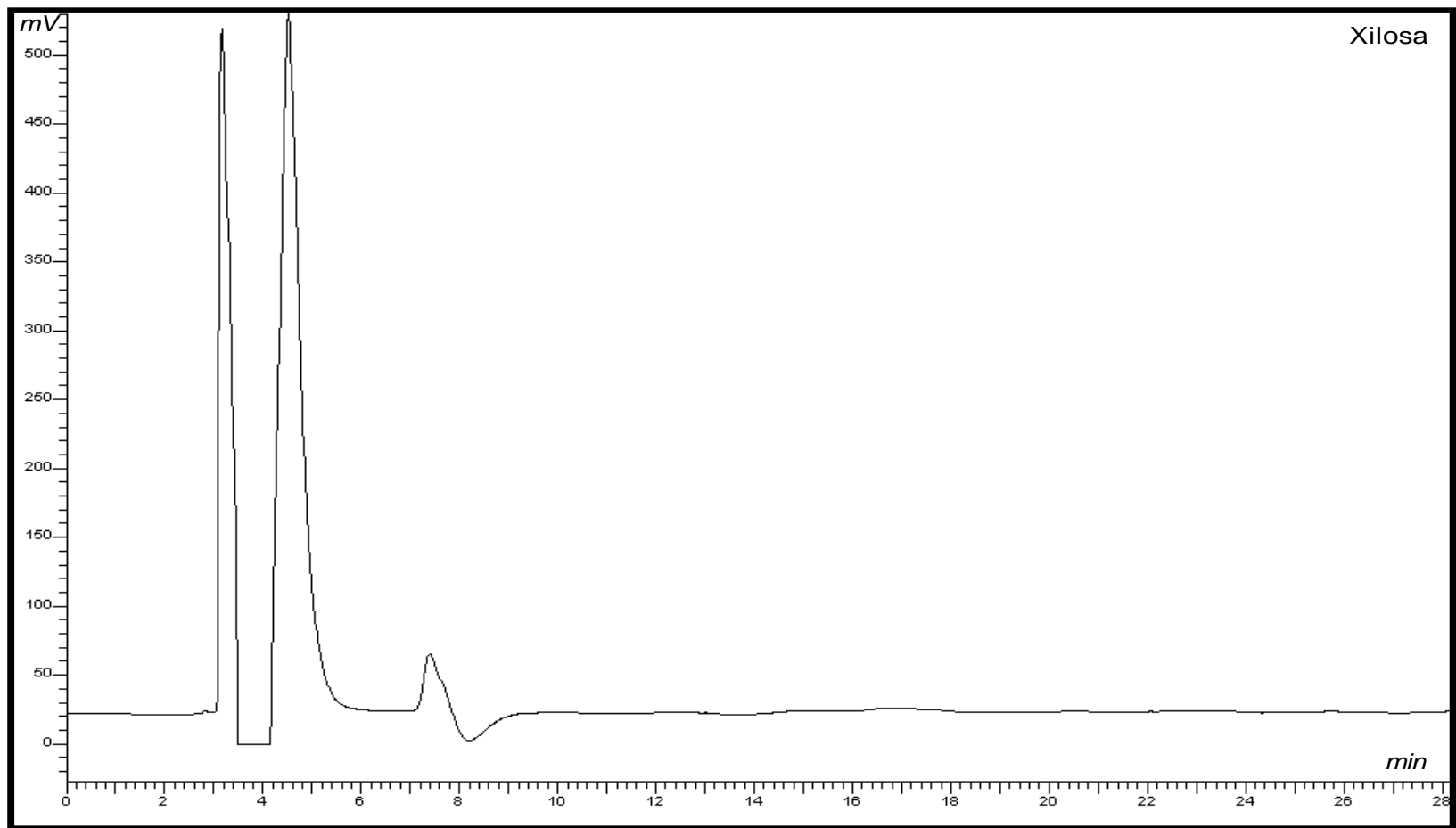


Figura 28. Cromatograma por CLAR para xilosa.

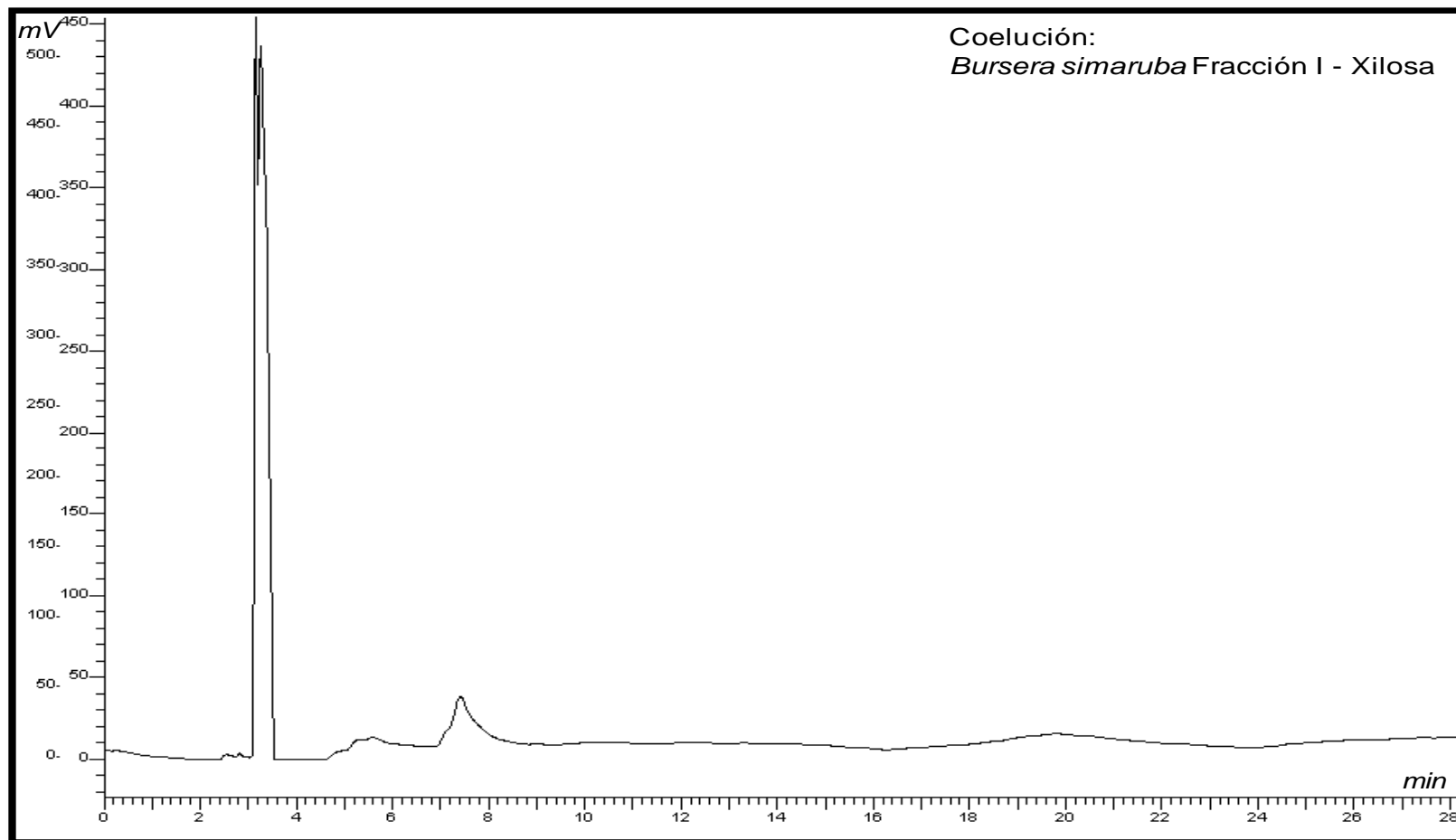


Figura 29. Cromatograma por CLAR para la coelución *Bursera*-xilosa.

## FITOQUÍMICA

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo desarrollado acorde a Parekh y Chanda (2006) son mostrados en la tabla VI. Se evidencia que saponinas, flavonoides, esteroides y glucósidos cardiacos no se encontraron en ningún exudado, mientras que alcaloides sólo se encontraron en copal; la presencia de taninos en *Bursera simaruba* y ciruelo se manifestó experimentalmente a través de un precipitado pardo (ver figura 30) y en mezquite con un precipitado azul-negro acorde a la metodología citada.

Tabla VI. Análisis fitoquímico cualitativo. Presencia: ausencia (-); poca (+) y media (++)

Exudado	Taninos	Saponinas	Flavonoides		Esteroides	Glucósidos cardiacos
			Mg <sup>0</sup>	Zn <sup>0</sup>		
<i>Bursera</i>	+	-	-	-	-	-
Ciruelo	++	-	-	-	-	-
Copal	-	-	-	-	-	-
Mezquite	++	-	-	-	-	-
Arábiga	-	-	-	-	-	-
Exudado	Alcaloides					
	Reactivo Mayer	Reactivo Wagner	Reactivo Draggendrof			
<i>Bursera</i>	-	-	-			
Ciruelo	-	-	-			
Copal	-	+	+			
Mezquite	-	-	-			
Arábiga	-	-	-			

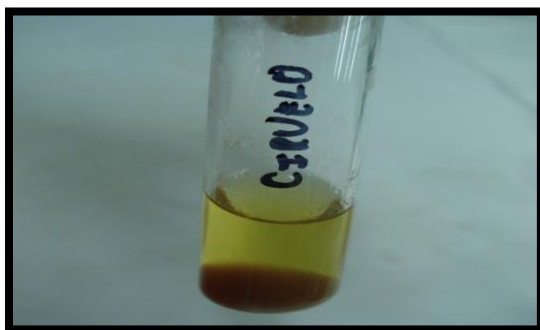


Figura 30. Determinación de taninos. Ciruelo (izquierda) *Bursera simaruba* (derecha).

Considerando que la cantidad de taninos presentes en gomas resulta una limitación para su uso como aditivo en alimentos se procedió con el análisis fitoquímico cuantitativo acorde a Edeoga *et. al.* (2005); se realizaron modificaciones en su procedimiento ya que comparando con Pisani y Distel (1997); Krishnaiah *et. al.* (2008) y Okwu e Iroabuchi (2008) establecían los mismos reactivos pero presentaban diferencias con respecto al tiempo de reacción, la expresión de resultados, la concentración y longitud de onda para realizar la medición utilizando ácido tánico como estándar.

Se decidió utilizar catequina como estándar debido a que es un compuesto reconocido en taninos (Hagerman, 2002) y reportar finalmente los resultados como equivalentes de catequina. Se realizó un barrido con el espectrofotómetro UV/Vis Beckam DU530 con celda de cuarzo desde 190 a 1100 nm e identificando un solo pico de absorción máxima en  $\lambda = 229$  nm. Se realizaron mediciones cada 5 minutos hasta transcurrir media hora confirmándose que los valores de absorbancia no presentan cambios con el tiempo.

Se estableció una curva de calibración con catequina en concentración desde 0.5 ppm hasta 3.0 ppm (figura 31) encontrándose la expresión  $y=0.0533x + 2.9174$  con un coeficiente de correlación  $r^2=0.94705$  que nos permitió encontrar la cantidad de taninos equivalentes a catequina presentes en arábica, mezquite, ciruelo, copal y *Bursera simaruba*; ésta última, como cristal y extractos liofilizados crudo y puro.

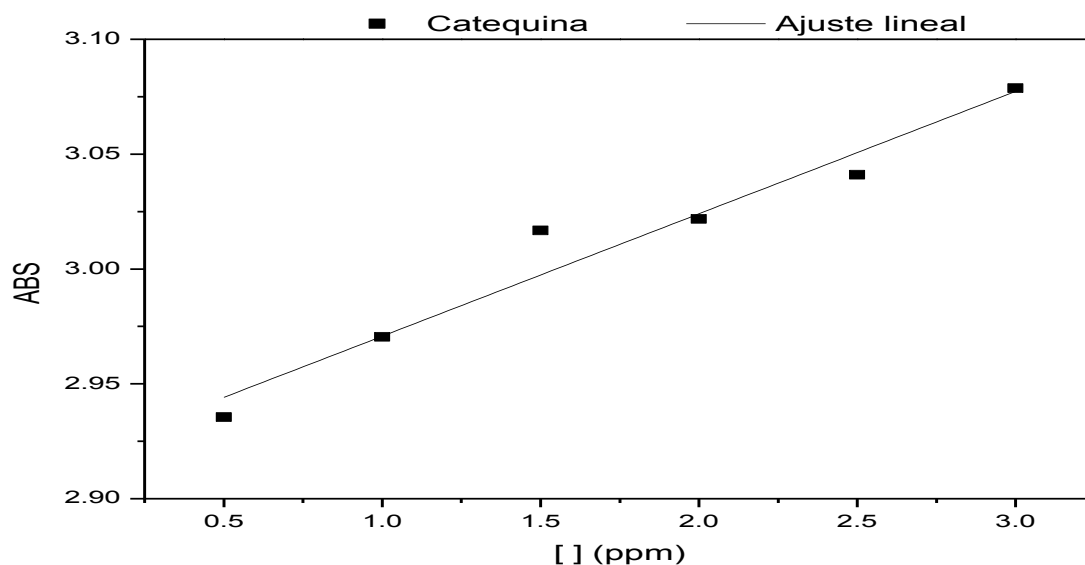


Figura 31. Curva de calibración para catequina.

La absorbancia de los exudados es presentada en la figura 32. Al sustituir los resultados en la expresión conseguida durante la calibración, sólo los exudados de mezquite, ciruelo y *Bursera simaruba* crudo presentaron resultados cuantificables de concentración. La absorbancia de *Bursera simaruba* crudo es de  $3.005 \pm 0.150$ , ciruelo  $3.357 \pm 0.022$  y mezquite  $3.364 \pm 0.028$ .

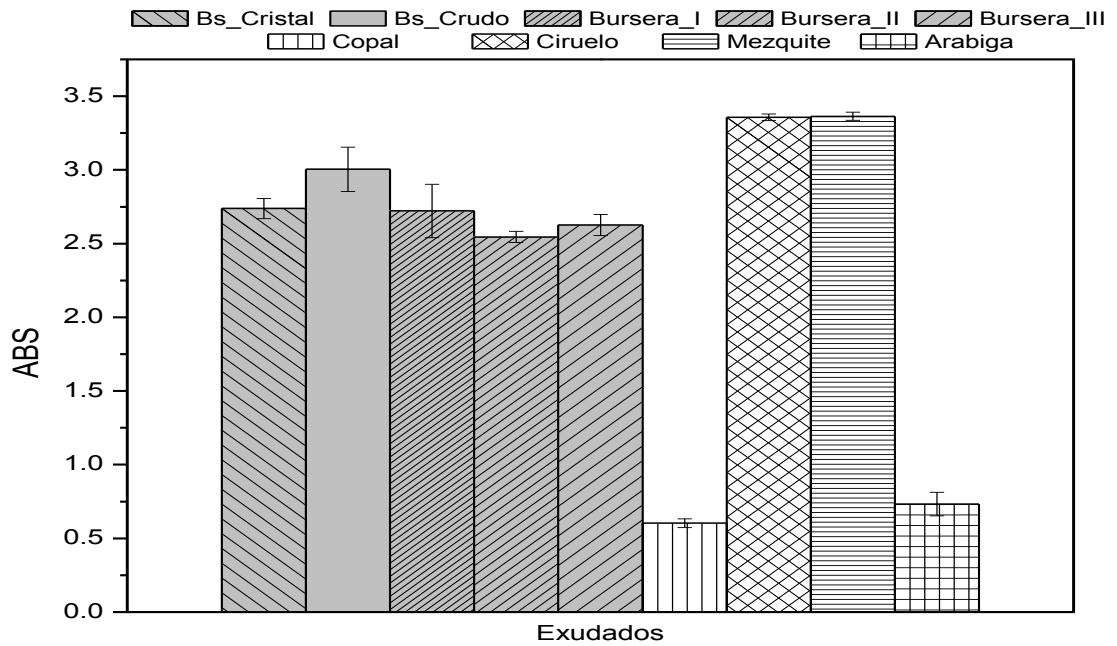


Figura 32. Absorbancias de los exudados a  $\lambda = 229$  nm.

La cantidad de taninos en *Bursera simaruba* crudo, ciruelo y mezquite son de 1.637, 8.379 y 8.248 ppm-equivalentes de catequina respectivamente. Lo anterior, se convertiría a 0.229 mg-eq catequina/g muestra en *Bursera simaruba* crudo, 1.173 mg-eq catequina/g muestra para ciruelo y 1.155 mg-eq catequina/g muestra para mezquite. Se encuentra que la cantidad de taninos en *Bursera simaruba* crudo es aproximadamente 5 veces menor que en goma de mezquite y en el exudado de ciruelo bajo el mismo tratamiento en laboratorio. En base a las investigaciones realizadas en *Bursera spp.*, asumimos que los taninos presentes en *Bursera simaruba* crudo fueron aportados por la corteza principalmente, recomendando evitar incorporarla durante la colecta.



## FITOTOXICIDAD

La fitotoxicidad fue analizada por el crecimiento en raíz e hipocotilo de semillas irrigadas con diluciones de exudados, determinándose el índice de germinación y fitotoxicidad manifestado con las ecuaciones 5, 6, 7 y 8 (Burton *et. al.*, 2001; Sahu y Arora, 2007).

El exudado de *Bursera simaruba* fue presentado en su forma cristal (proveniente directamente de la colecta), crudo (a partir del extracto liofilizado) y puro (sometido a cromatografía por exclusión de tamaño). Los demás exudados son arábigo, mezquite, ciruelo y copal en extractos crudos liofilizados y el mezquite comercial. Los controles son H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a 10.8 mg/L. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Las concentraciones de los exudados fueron de 10, 15, 20 y 25 % p/v, seleccionadas acorde a que con su magnitud consiguieran manifestar algún efecto fitotóxico sobre las semillas, hayan sido utilizadas para la obtención del liofilizado y se encontraran dentro del rango en la prueba de solubilidad.

Los resultados del crecimiento en raíz e hipocotilo para las semillas irrigadas con diluciones de *Bursera simaruba* están en la tabla VII y para el resto de exudados véase el apéndice B.

El crecimiento de raíz en H<sub>2</sub>O fue de 36.43±9.48 mm, mientras que en K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> fue de 31.46±7.27 mm. El crecimiento del hipocotilo en H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> fue de 24.28±12.55 mm y 27.61±23.16 mm respectivamente.

Los valores no determinados (ND) se debieron en el caso de *Bursera\_Cristal* a que en las concentraciones de 20 y 25 % p/v no se conseguía una disolución homogénea, lo que se manifestaba en una inadecuada distribución durante la irrigación. Se procedió a diluir alcanzando las concentraciones de 5 y 7.5 % p/v. En el caso de *Bursera\_Puro* se equipararon las concentraciones representativas con *Bursera\_Cristal* pero por limitaciones en la cantidad de muestra disponible no se consiguió la de 25% p/v.

Tabla VII. Crecimiento en milímetros para raíz e hipocotilo de semillas irrigadas con *Bursera simaruba* a distintas concentraciones ( [ ] )

[ ]	<i>Bursera_Cristal</i>				<i>Bursera</i>				<i>Bursera_Puro</i>			
	Raíz		Hipocotilo		Raíz		Hipocotilo		Raíz		Hipocotilo	
	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$
5	45.81	20.40	22.49	9.89	ND				26.91	4.30	17.51	11.01
7.5	35.07	11.29	24.58	6.33	ND				21.15	12.97	23.63	6.04
10	36.71	21.03	21.88	20.46	44.08	19.38	16.76	7.18	22.78	13.11	25.29	5.73
15	18.31	18.20	4.87	1.33	33.25	15.30	0.00	0.00	15.68	5.53	24.25	17.49
20	ND				0.00	0.00	0.00	0.00	15.68	5.08	24.43	22.47
25	ND				0.00	0.00	0.00	0.00	ND			

El análisis estadístico se realizó para las concentraciones de 10 y 15 % p/v ya que se tenían valores con todos los exudados y se realizó por medio de un Análisis de Varianza Múltiple de dos vías factorial mediante el software Statistica 8. Los supuestos de normalidad se evaluaron por K-S y a través de los residuales, mientras que la homocedasticidad por Cochran. El análisis fue significativo ( $\alpha = 0.05$ ), por lo que se realizaron Análisis de Varianzas de dos vías factoriales como pruebas *a posteriori*, encontrando diferencias significativas en todos los efectos. Finalmente, se realizó la prueba de Dunnet para comparar los tratamientos con el control (H<sub>2</sub>O). El apéndice C despliega los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas mencionadas.

El crecimiento en raíz e hipocotilo para las semillas irrigadas con todos los exudados al 10 y 15 % p/v está representado en la figura 33.

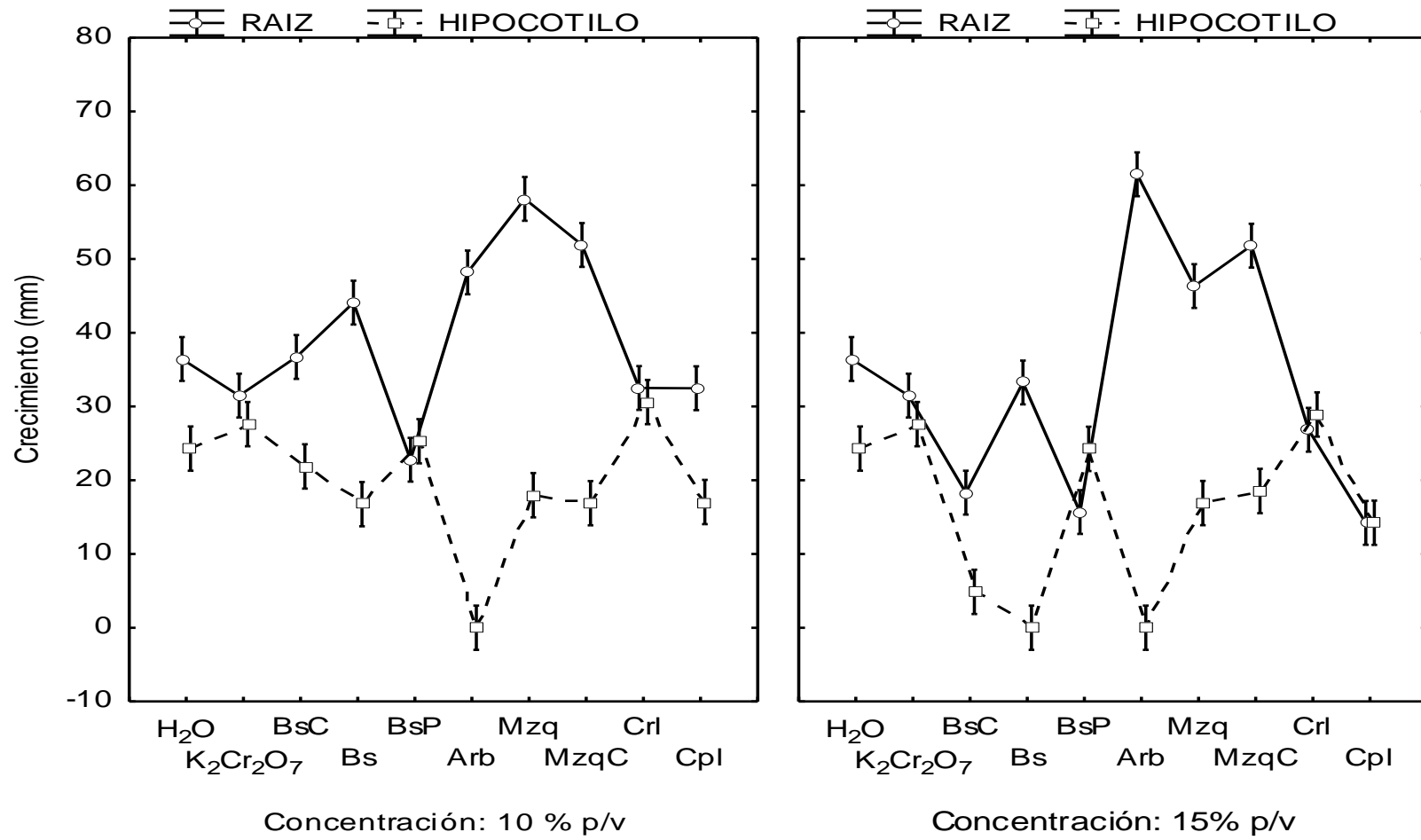


Figura 33. Crecimiento en raíz e hipocotilo para semillas irrigadas con exudados al 10% y 15% p/v. *Bursera cristal* (BsC), *Bursera* crudo (Bs), *Bursera* puro (BsP), arábigo (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (CrI) y copal (Cpl).

Describiendo la figura 33, a continuación se compara el crecimiento de la raíz e hipocotilo dentro del mismo tratamiento, es decir, su respectiva concentración.

El crecimiento al 10% p/v en raíz es superior al del hipocotilo en todos los factores. El crecimiento en raíz respecto al H<sub>2</sub>O en *BsC* y *Bs* es mayor, mientras que en *BsP* se refleja inhibición; las semillas irrigadas con *Arb*, *Mzq* y *MzqC* presentan un desarrollo alrededor de 50 mm y en *Crl* y *Cpl* con resultado similar de 30 mm aproximadamente. El crecimiento de hipocotilo con respecto al H<sub>2</sub>O en todos los exudados resultó disminuido. El desarrollo del hipocotilo en *BsP* fue ligeramente mayor al de la raíz y su inhibición total se consiguió con *Arb*.

El crecimiento al 15% p/v por parte de raíz e hipocotilo presentó la misma tendencia que favorece a la raíz. La comparación de resultados de *BsC*, *Bs* y *BsP* con H<sub>2</sub>O indica que el crecimiento fue inhibido; por otro lado, *Arb*, *Mzq* y *MzqC* prevalecieron con el mayor desarrollo, mientras que *Crl* y *Cpl* ya no comparten valores similares de crecimiento. El desarrollo del hipocotilo en *BsP* nuevamente es ligeramente mayor; la inhibición total de éste se comienza a manifestar en *BsC* y se consigue totalmente en *Bs* y *Arb*.

De acuerdo a Reigosa y Pedrol (2003) el crecimiento de la raíz se detiene más tarde y se ve menos inhibido que el de las partes aéreas pudiendo seguir creciendo durante el estrés. Esta respuesta diferencial está regulada por la concentración del ácido abscísico (ABA) y tiene significación adaptativa: si la raíz continúa creciendo se consigue una exploración más eficiente y al funcionar como almacén de recursos, éstos podrán ser utilizados en la construcción de biomasa aérea una vez que cese el estrés.

El crecimiento en raíz a concentraciones de 10 y 15 % p/v es presentado en la figura 34 donde la inhibición del crecimiento en raíz es directamente proporcional al aumento de la concentración en las presentaciones de *Bursera simaruba*; entre ellas, *Bs* manifiesta mayor crecimiento en ambas concentraciones analizadas. Es necesario remarcar que a 10% presenta valores mayores de crecimiento al del H<sub>2</sub>O mientras que a 15% ya es inferior a ésta referencia, ubicando así a este rango de concentración el umbral del efecto dosis-respuesta para *Bs*. El desarrollo por *BsC* disminuye un 50% al aumentar la concentración de 10 a 15 % p/v. Los resultados de *BsP* no reflejan grandes variaciones, lo cual se analizará a detalle con el resto de sus concentraciones en el índice de germinación y fitotoxicidad. En *Arb* se indica mayor desarrollo a concentración alta, mientras que *MzqC* no presenta variación alguna.

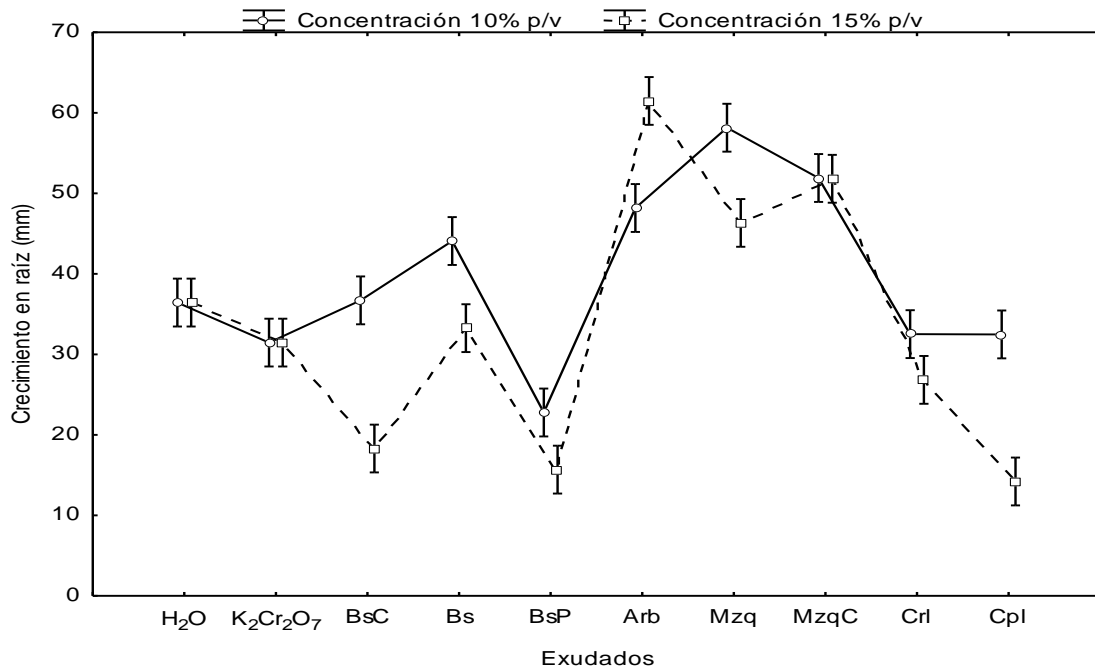


Figura 34. Crecimiento en raíz para semillas irrigadas con exudados al 10% y 15% p/v. *Bursera* cristal (BsC), *Bursera* crudo (Bs), *Bursera* puro (BsP), arábigo (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (Crl) y copal (Cpl).

El estrés vegetal es un asunto dependiente de la dosis, a concentraciones bajas un agente estresante puede estimular el metabolismo vegetal y el crecimiento (eu-estrés); mientras que a concentraciones mayores inducirán senescencia temprana y daños que conducen finalmente a la muerte (dis-estrés) si no se elimina el agente estresante (Lichtenhaler, 2003).

El crecimiento en hipocotilo a distintas concentraciones es presentado en la figura 35 donde éste se ve disminuido al aumentar la concentración, aproximándose a la inhibición total en *BsC* y consiguiéndola en *Bs*. Se observa que los efectos en *BsP*, *Mzq*, *MzqC*, *Crl* y *Cpl* se presentan sin variación indistintamente de la concentración. Se manifiesta inhibición total de crecimiento en *Arb* para ambas concentraciones; en contraparte los de mayor desarrollo son *BsP* y *Crl*.

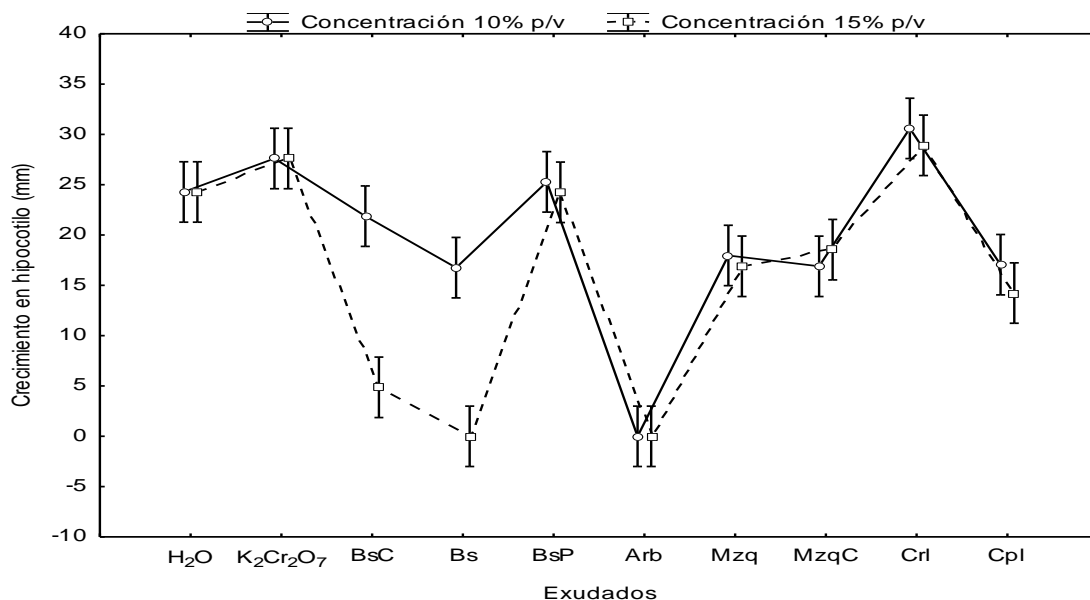


Figura 35. Crecimiento en hipocotilo para semillas irrigadas con exudados al 10% y 15% p/v. *Bursera cristal* (BsC), *Bursera crudo* (Bs), *Bursera puro* (BsP), arábigo (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (CrI) y copal (Cpl).

La descripción de las figuras 33, 34 y 35 permiten definir aspectos interesantes como resultado de ésta prueba. La continuación con el análisis estadístico dirige la atención hacia las diferencias significativas encontradas por la prueba de Dunnet descritas en la tabla VIII y para dichos valores encontrados remitirse al apéndice C.5.

Tabla VIII. Diferencias significativas encontradas por la prueba de Dunnet.

[ ] % p/v	Raíz								
	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	BsC	Bs	BsP	Arb	Mzq	MzqC	CrI	Cpl
10	NS	NS	*	*	*	*	*	NS	NS
15	NS	*	NS	*	*	*	*	*	*
	Hipocotilo								
10	NS	NS	*	NS	*	NS	*	NS	*
15	NS	*	*	NS	*	*	NS	NS	*

\*=significativo; NS= No significativo.

*Bursera cristal* (BsC), *Bursera crudo* (Bs), *Bursera puro* (BsP), arábigo (Arb), mezquite (Mzq), mezquite comercial (MzqC), ciruelo (CrI), copal (Cpl).

El tratamiento con  $K_2Cr_2O_7$  estadísticamente no resultó significativo, indicando que la concentración de 10.8 mg/L seleccionada no representa un estrés para el desarrollo de las semillas de *Lens esculenta* comparándolo con el brindado por  $H_2O$ . El tratamiento con *BsC* al 15% p/v fue significativo en raíz e hipocotilo, *Bs* lo fue para hipocotilo en ambas concentraciones y con *BsP* sólo en raíz para ambas concentraciones. En el resto de exudados, las diferencias significativas respecto al control se dan al 15% p/v en raíz con todos los exudados.

Las diferencias significativas estadísticamente indican que tanto la concentración y el exudado tienen implicaciones en el crecimiento de las semillas de *Lens esculenta*, por lo que a continuación se procede a la evaluación del índice de germinación y fitotoxicidad con todos los exudados y concentraciones disponibles.

La germinación de semillas es un conjunto de procesos metabólicos y morfogenéticos que tienen como finalidad transformar un embrión en una plántula capaz de valerse por sí misma y fotosintéticamente competente, donde su vulnerabilidad está sujeta a factores como temperatura, luz, humedad y nivel nutricional del nicho depositado (Matilla, 2003; Reigosa y Pedrol, 2003).

El índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) en  $H_2O$  para raíz en las semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diluciones de *Bursera simaruba* son descritos en la tabla IX. El %G para  $K_2Cr_2O_7$  es  $69.25 \pm 0.35$  %. y el %F de  $13.44 \pm 4.18$  %.

Tabla IX. Índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) de raíz en semillas irrigadas con *Bursera simaruba* a varias concentraciones ( [ ] ).

[ ]	<i>Bursera_Cristal</i>				<i>Bursera</i>				<i>Bursera_Puro</i>			
	%G	±	%F	±	%G	±	%F	±	%G	±	%F	±
5	125.75	0.52	-25.75	2.41	ND				59.10	0.31	26.12	1.15
7.5	96.32	0.42	3.68	24.72	ND				46.56	0.65	41.80	1.19
10	60.44	0.64	-0.73	11.99	121.01	0.51	-21.01	2.83	49.98	0.65	37.52	1.21
15	40.31	1.02	49.61	1.22	54.96	0.50	8.40	18.11	25.88	0.44	56.86	0.61
20	ND				0.00	0.00	100.00	0.00	25.76	0.44	57.06	0.58
25	ND				0.00	0.00	100.00	0.00	ND			

En la figura 36 se manifiesta una germinación en raíz decreciente generalizada con el aumento de la concentración como efecto dosis-respuesta. Al 10 y 15 % p/v la germinación de *Bursera* (crudo) > *Bursera* cristal > *Bursera* puro. Los máximos valores de germinación se consiguen a concentraciones bajas de *Bursera* cristal, por lo que un efecto de eu-estrés se estaría manifestando ya que presenta mayor crecimiento que el control. Los resultados de *Bursera* puro indican una menor germinación que las otras presentaciones de *Bursera*, pero sin conseguir la inhibición total incluso a 20% p/v donde las semillas irrigadas con *Bursera* (crudo) ya no germinaron y donde la solubilidad con *Bursera* cristal no fue conseguida. Se vislumbra un efecto antagónico por parte del resto de componentes en *Bursera* (crudo) hasta el 15% p/v, rebasando esta concentración la germinación es inhibida totalmente.

En el estudio fitoquímico de esta investigación la presencia de taninos cuantificables sólo se manifiesta en *Bursera* (crudo), lo que explicaría la fitotoxicidad de ésta presentación (figura 37), siendo la incorporación de la corteza en la colecta y disolución la fuente de dicho fitoquímico.

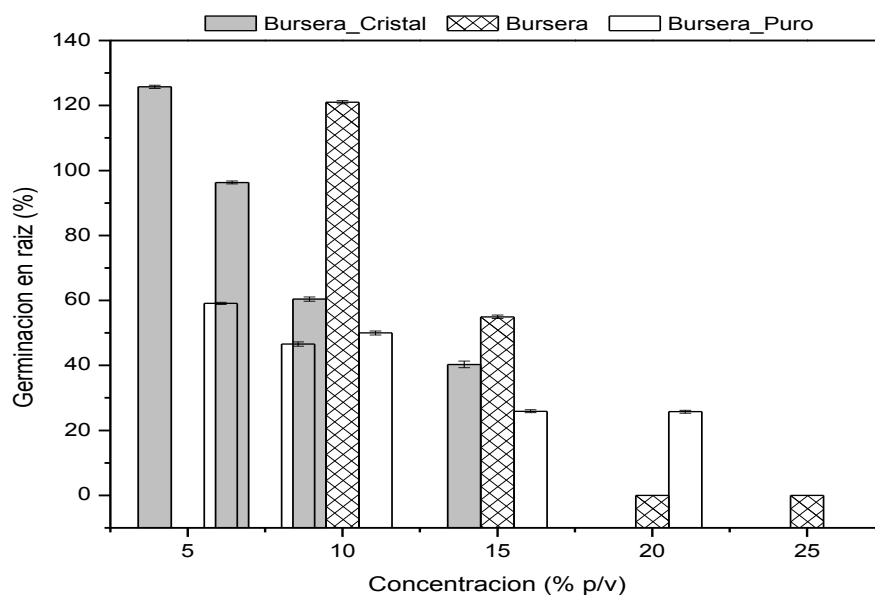


Figura 36. Germinación en raíz para semillas irrigadas con *Bursera simaruba*.



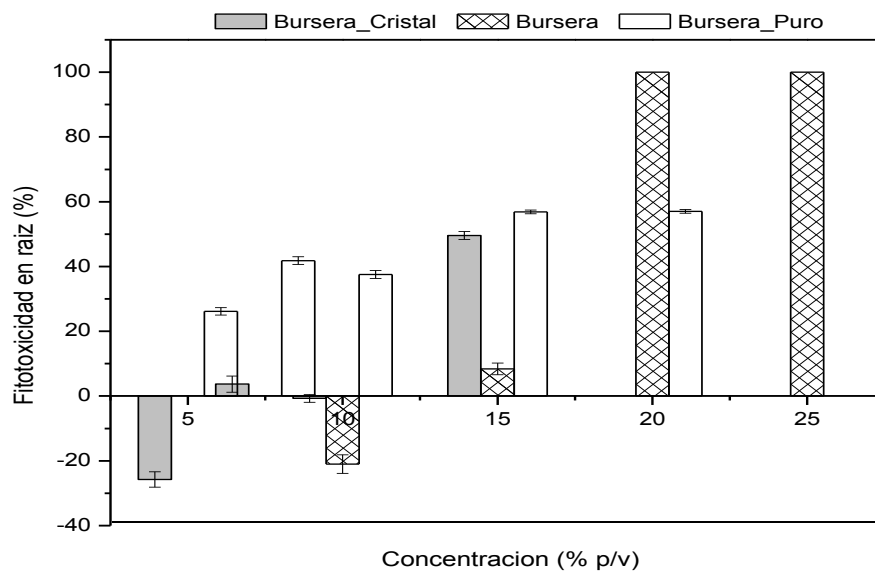


Figura 37. Fitotoxicidad en raíz para semillas irrigadas con *Bursera simaruba*.

La germinación de los otros exudados (Figura B.1.1 del apéndice) sólo fue inhibida por arábigo y mezquite (crudo y comercial) hasta alcanzar 25% p/v. El exudado de ciruelo no consiguió disolverse a 25% p/v, pero en el resto de sus concentraciones presenta altos valores de germinación.

Los resultados de copal no corresponden al efecto del exudado, ya que éste no se disolvió en agua y por lo tanto no deben considerarse dentro de la comparativa entre exudados. La baja fitotoxicidad de mezquite y arábigo se presenta en la figura B.1.2. del apéndice.

El índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) en H<sub>2</sub>O para hipocotilo en las semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diluciones de *Bursera simaruba* están descritos en la tabla X. El %G para K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> es 91.38±0.98 %. y %F es -14.22±8.93 %.

Tabla X. El índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) de hipocotilo en semillas irrigadas con *Bursera simaruba* a varias concentraciones ([ ]).

[ ]	Bursera_Cristal				Bursera				Bursera_Puro			
	%G	±	%F	±	%G	±	%F	±	%G	±	%F	±
5	93.52	0.69	6.48	29.78	ND				58.89	0.84	26.39	4.24
7.5	102.72	0.59	-2.72	4.56	ND				78.28	0.59	2.14	17.94
10	54.94	1.08	8.43	16.74	70.24	0.69	29.76	2.71	83.92	0.58	-4.90	19.78
15	8.02	0.60	79.94	0.85	0.00	0.00	100.00	0.00	40.93	0.94	-2.33	4.14
20	ND				0.00	0.00	100.00	0.00	61.62	1.08	-2.71	5.92
25	ND				0.00	0.00	100.00	0.00	ND			

En la figura 38 la germinación en hipocotilo se ve severamente afectada por *Bursera* (crudo) y *Bursera* cristal desde el 15% p/v. El hipocotilo no manifiesta inhibición en mismo grado que la raíz con *Bursera* puro, manteniéndose incluso a concentraciones altas. *Bursera* cristal sigue presentando alta germinación en concentraciones bajas colocando el umbral de la dosis-respuesta en 10% p/v; a ésta concentración se observa que la germinación en *Bursera* puro > *Bursera* (crudo) > *Bursera* cristal.

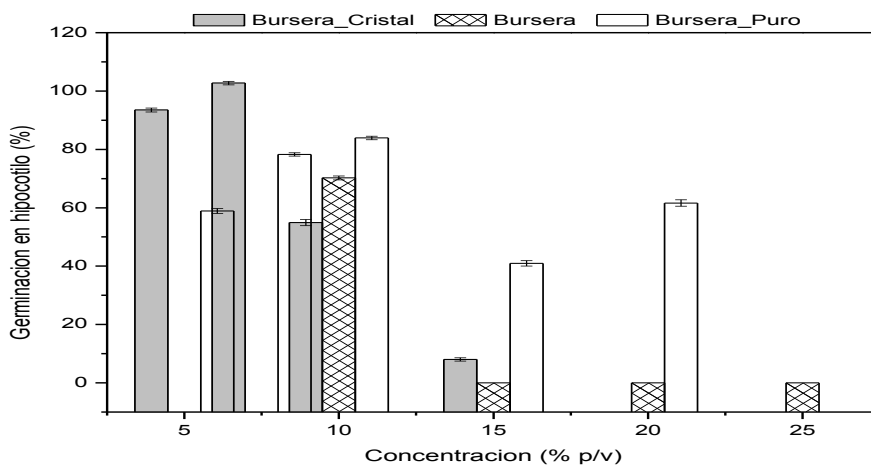


Figura 38. Germinación en hipocotilo para semillas irrigadas con *Bursera simaruba*.

La fitotoxicidad en hipocotilo (figura 39) de *Bursera* puro es relativamente pequeña con las demás presentaciones de este exudado. En el resto de exudados se manifestaron inhibiciones significativas en el hipocotilo sólo con arábigo y a partir de 20% p/v; ciruelo favoreció el desarrollo de las semillas (figura B.2.1. y B.2.2. del apéndice).

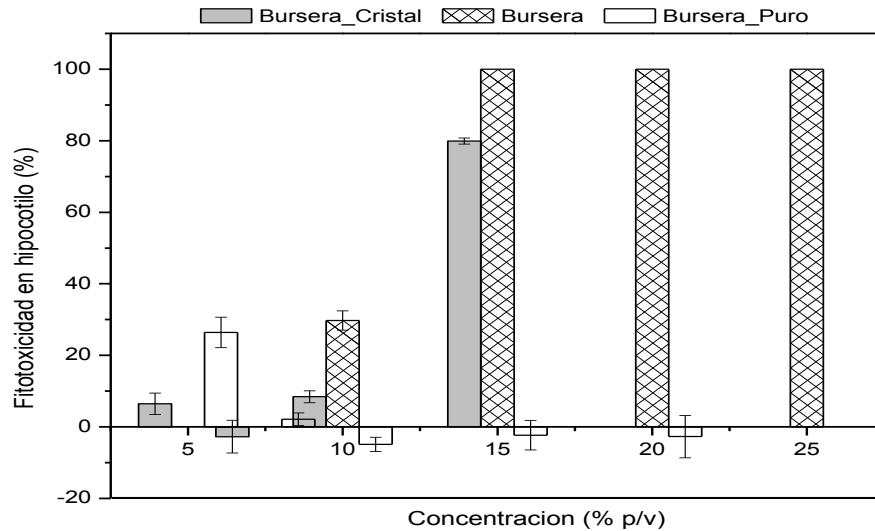


Figura 39. Fitotoxicidad en hipocotilo para semillas irrigadas con *Bursera simaruba*.

La capacidad de los aleloquímicos de interactuar con una especie vegetal determinada dependiendo de su concentración es variable ya que las respuestas fisiológicas de la planta ante la adición de dichos compuestos no siguen una curva de saturación dosis-respuesta y ante una batería de concentraciones crecientes se obtienen respuestas positivas, indiferentes y negativas. La concentración a la que una molécula es activa no necesariamente es efectiva ya que en la interacción alelopática se han encontrado efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos (González-Rodríguez, 2003).

En este caso, la naturaleza química heterogénea en los extractos crudos liofilizados de los exudados explicaría dichas variaciones encontradas. La pureza relativa con la que los exudados gomosos se obtienen (Miller, 1973) permite incluir los anteriores resultados fitoquímicos en la discusión de la prueba de fitotoxicidad para una explicación y procedencia de los efectos encontrados.

La germinación en raíz es favorecida por *Bursera* cristal y *Bursera* (crudo) principalmente, mientras que en hipocotilo por *Bursera* puro y *Bursera* cristal. La fitotoxicidad es manifestada a concentraciones altas tanto en raíz e hipocotilo por *Bursera* (crudo), soportando éste resultado por la confirmación de la presencia de taninos para esta presentación en el estudio fitoquímico y observando similares resultados de fitotoxicidad con mezquite en ésta prueba. Los taninos forman parte de compuestos fenólicos que han registrado interacción vegetal actuando como disuasorios de herbívoros, protectores de las partes leñosas de la planta e inhibidores del crecimiento y germinación (Álvarez-Tinaut y Espinosa-Borreguero, 2003)

De lo anterior y lo concluido en la prueba fitoquímica, afirmaríamos que un mejor cuidado en la colecta determinaría el grado de calidad del exudado, como actualmente sucede con la goma arábica, contribuyendo al uso directo de *Bursera* cristal y evitando la incorporación de corteza o materia extraña durante el tratamiento para conseguir el extracto crudo seco (sea por liofilización o aspersion) y descartando así la cromatografía por exclusión de tamaño por lo que en tiempo, costo y rendimiento implica esa purificación.

Los exudados de arábica y mezquite son gomas ampliamente utilizadas donde su inocuidad ha sido demostrada (Verbeken *et. al.*, 2003) y en ésta prueba valores de germinación en raíz mayores al 50% son manifestados en un rango amplio de concentraciones (5-20 % p/v); el objetivo de incorporarse era analizarlos con respecto a *Bursera simaruba* quedando ésta última con efecto equiparable en concentración más baja (hasta 15% p/v).

En las pruebas para propiedades físicas de ésta investigación se observó que el efecto característico y deseado en gomas en viscosidad y tensión superficial se conseguía a bajas concentraciones, por lo que su uso en concentraciones menores a 15 % p/v implicaría también una reducción en su grado de fitotoxicidad.

La autorización del uso de la goma de mezquite por la Secretaría de Salud en México fue conseguido a través del estudio realizado por Vernon-Carter *et. al.* (1996) que consistía en pruebas toxicológicas y mutagénica a ratas Wistar alimentadas con una dieta a base de goma de mezquite, arábica y celulosa. Ésta sería una perspectiva de investigación que definiría finalmente la toxicidad del exudado de *Bursera simaruba*.

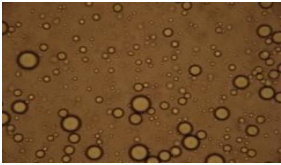
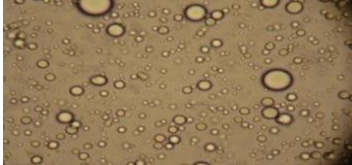
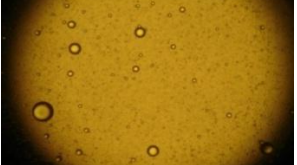
## ESTABILIDAD DE EMULSIONES

La capacidad de emulsificación es una propiedad esencial para la microencapsulación, usada para la fijación de aromas y sabores. Los agentes microencapsulantes más usados han sido la goma arábica y los almidones modificados o hidrolizados (López-Franco *et. al.*, 2006).

Para evaluar el potencial como agente tensoactivo se formularon emulsiones O/W con los extractos liofilizados de *Bursera simaruba*, ciruelo y copal. La proporción agua/aceite emulsificante fue de 100mL/10mL/10g en *Bursera simaruba*, 100mL/10mL/5g en ciruelo y 100mL/5mL/5g en copal. Estas emulsiones fueron monitoreadas en los microscopios Zeuss Axiolab y Nikon Eclipse E200 capturando fotografías durante 20 días. Las imágenes fueron analizadas con el software *ImageJ* por el diámetro Feret permitiendo establecer el tamaño de gota, empleándosele para encontrar la cinética de coalescencia.

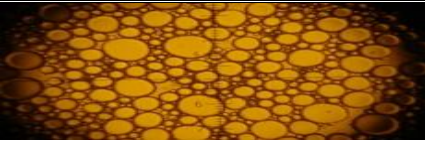
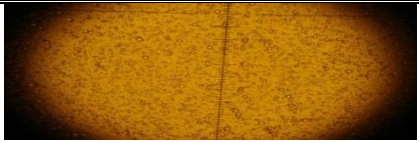
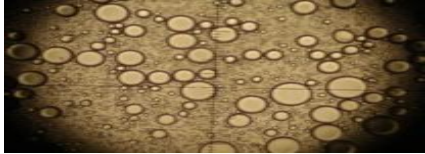

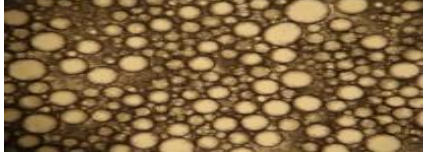

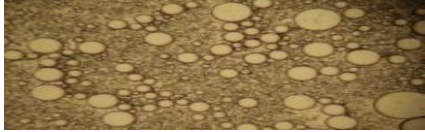
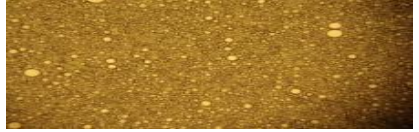
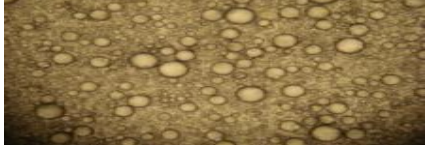

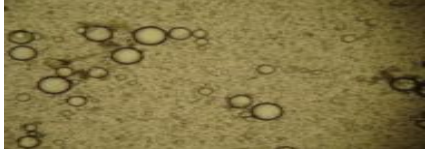
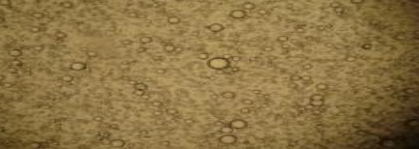



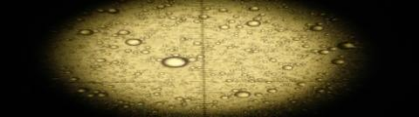
La emulsión O/W formulada con copal rompió al día 7 (Tabla XI). Esto es debido a que en pruebas preliminares este exudado no manifestó ser soluble en agua y que la emulsión se consiguió principalmente por efecto de la fuerza centrífuga y su carácter lipofílico. Por lo anterior, esta emulsión no fue sujeta a análisis para encontrar su tasa de coalescencia, considerándola una emulsión inestable.

Tabla XI .Emulsión O/W con Copal observada al microscopio.

	Día 2	Día 5	Día 7
Copal			

En la Tabla XII se muestran las fotografías más representativas para ciruelo y *Bursera simaruba* respectivamente.

Tabla XII. Emulsiones O/W observadas al microscopio.

Día	Ciruelo	<i>Bursera simaruba</i>
02		
05		
08		
09		
10		
13		
14		
20		

La determinación de la tasa de coalescencia requería de los diámetros promedio de gotas, siendo observados a 10x en microscopio y procesados a partir de las fotografías con el software *ImageJ*, éstos resultados son presentados en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Diámetro promedio de gotas  $\pm 0.05$  nm.

Día	<i>Bursera simaruba</i>	Ciruelo
2	47.33	168.53
5	59.60	171.30
8	65.40	191.73
9	67.20	201.60
10	75.73	206.13
13	82.93	213.33
14	89.33	227.87
20	118.13	275.73

La cinética de coalescencia se calculó de acuerdo a Román-Guerrero *et. al.* (2009), siguiendo una cinética de primer orden y se representa como  $\frac{N_t}{N_0} = e^{-K_c t}$  donde  $N_t$  es la concentración en número de gotas al tiempo  $t$ ,  $N_0$  es la concentración del número de gotas recién formadas  $t=0$  y  $K_c$  es la constante de velocidad, que se interrelaciona con la probabilidad de que la capa interfacial rompa en el tiempo  $t$ . Obteniendo así el número relativo de gotas de emulsión por medio de  $\frac{N_t}{N_0} = \left[ \frac{(d)_{t=0}}{(d)_{t=t}} \right]^3$ . Los resultados obtenidos para la emulsión O/W con *Bursera simaruba* son presentados en la tabla XIV.

Tabla XIV. Cinética de coalescencia para *Bursera simaruba*.

Segundos	Diámetro	$N_t / N_0$	LN ( $N_t / N_0$ )
0	47.33		
259200	59.60	0.50091322	0.69132242
518400	65.40	0.37911243	0.96992247
604800	67.20	0.34945676	1.05137544
691200	75.73	0.24414063	1.41001089
950400	82.93	0.18591477	1.68246691
1036800	89.33	0.14875126	1.90547977
1555200	118.13	0.06432561	2.74379748

Realizando la gráfica de  $LN(N_t/N_0)$  versus  $t$  resulta una línea recta donde la pendiente es  $K_c$ . La velocidad de coalescencia  $K_c$  para las emulsiones O/W con los exudados de *Bursera simaruba* y ciruelo como agentes emulsificantes fueron de  $1.63 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  y  $1.04 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  respectivamente, considerándolas de acuerdo con Regalado *et. al.*, (2001) emulsiones estables por el orden presentado (figura 40).

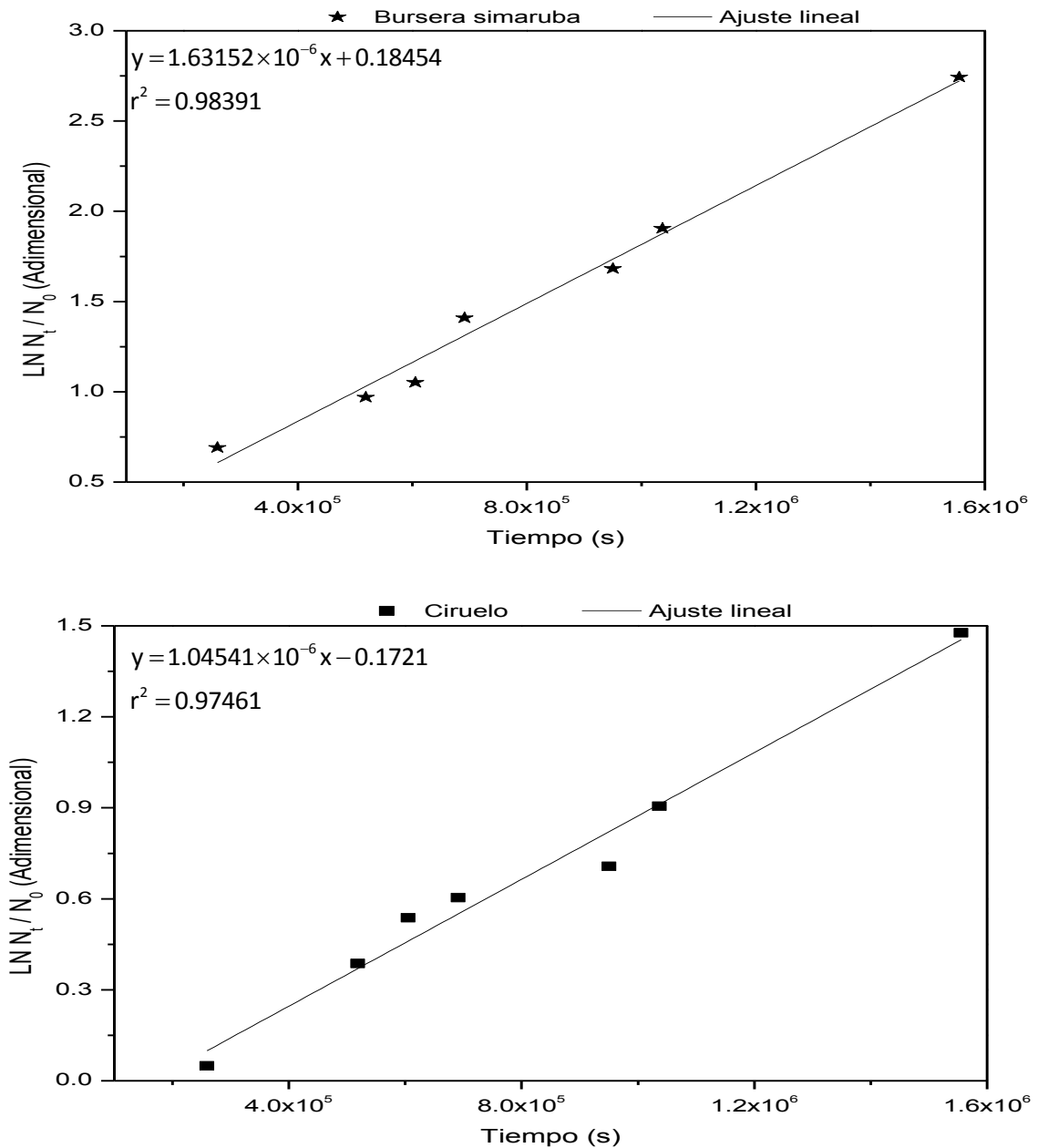


Figura 40. Determinación de  $K_c$  en emulsiones O/W.  
*Bursera simaruba* (superior) y ciruelo (inferior).



Los resultados de la caracterización fisicoquímica del exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) se presentan de manera concisa en la tabla XV.

Tabla XV. Resultados generales en la caracterización fisicoquímica del exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890).

PROPIEDAD	RESULTADO
Rendimiento	40 %
Solubilidad y pH	Solubilidad: 1 - 50 % p/v 4.43 -5.33 pH
Reología	Fluido newtoniano en baja concentración Fluido pseudoplástico en alta concentración Brookfield: $\mu = 65$ mPa·s al 40% p/v Reómetro: $\mu = 3.22 - 42.29$ mPa·s del 3 - 15 % p/v
Tensión superficial [ ]: 3-15 % p/v	<i>Bursera simaruba</i> crudo 49.06±1.24 mN/m
Radio hidrodinámico [ ]: 5 % p/v	<i>Bursera simaruba</i> crudo: 1898.00±97.58 nm <i>Bursera simaruba</i> puro: 1832.00±56.56 nm
Capacidad calorífica	<i>Bursera simaruba</i> crudo: 6.1086±0.0736 J/g °C <i>Bursera simaruba</i> puro: 2.6484±0.0027 J/g °C
Humedad	<i>Bursera simaruba</i> cristal: 11.83 % <i>Bursera simaruba</i> crudo: 14.30% <i>Bursera simaruba</i> puro: 16.06%
Monosacárido	Presencia de xilosa. Tr = 7.40 min
Fitoquímica	<i>Bursera simaruba</i> crudo Presencia de taninos 0.229 mg equivalentes de catequina / g muestra
Fitotoxicidad	<i>Bursera simaruba</i> crudo en [ ] > 15 % p/v por taninos.
Coalescencia	$K_c = 1.63 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

## 8. CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta investigación para la caracterización fisicoquímica del exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890) se describen a continuación:

- El rendimiento obtenido se mejoraría al evitar la incorporación de la corteza papirácea desde la colecta.
- Los valores de pH son similares a los reportados por goma arábica y de mezquite.
- Los valores de viscosidad conseguidos en bajas concentraciones promueven su uso como agente espesante.
- La disminución de la tensión superficial comparada con los demás exudados favorece a *Bursera simaruba* como agente tensoactivo.
- El radio hidrodinámico no presenta diferencias entre el extracto crudo y purificado.
- La capacidad calorífica se mantuvo estable en el intervalo de temperatura analizado; el valor de la fracción purificada es menor al del extracto crudo.
- El contenido de humedad es acorde a lo reportado para gomas.
- La aparente presencia de xilosa indicaría constituyentes sacáridos en su composición; análisis posteriores son requeridos para reportar su conformación química y estructural.
- El análisis fitoquímico indica la presencia de taninos, los cuales fueron aportados por la corteza y se consideran como influencia en los resultados de fitotoxicidad.
- La fitotoxicidad se relaciona con la concentración y se manifiesta por la presencia de taninos en el extracto crudo de *Bursera simaruba*.
- La emulsión O/W formulada con *Bursera simaruba* como emulsificante permaneció estable.
- La fracción purificada en cromatografía por exclusión de tamaño no tiene implicaciones relevantes en las propiedades reológicas, de tensión superficial, radio hidrodinámico y humedad. En la fitotoxicidad presenta efectos inmediatos pero constantes en el rango de concentraciones analizadas.

El exudado de *Bursera simaruba* manifiesta buen rendimiento, gran solubilidad en agua, valores de pH y contenidos de humedad similares a otras gomas, viscosidades altas a bajas concentraciones, disminución efectiva de la tensión superficial, se identificó un constituyente sacárido, poca o evitable presencia de taninos y estabilidad en emulsiones O/W. Por todo lo anterior, se considera como un potencial agente tensoactivo útil en sistemas de emulsiones.

## 9. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Diversas líneas de investigación quedan disponibles a partir del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del exudado de *Bursera simaruba* L. Sarg (1890).

- Transporte de sustancias bioactivas (medicamentos y nutraceuticos).
- Aditivo en alimentos.
- Biopelículas.
- Remoción de contaminantes.
- Análisis térmico.
- Ecofisiología de la especie.
- Elucidación estructural.
- Toxicidad del extracto acuoso.

## 10. LITERATURA CITADA

Adamson, A.W. y Gast, A. P. 1997. Physical Chemistry of Surfaces. Wiley 6° Ed., pp 808.

Ai-Xia, C.; Yong-Gen L.; Ying B.; Shan L., Ling-Jian W. y Xiao-Ya C. 2007. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. Journal of Integrative Plant Biology 49: 179-186.

Alcázar, R.; Altabella, T. y Tiburcio, T. F.. 2003. Las poliaminas. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Coordinadores: Reigosa, M.J.; Pedrol, N. y Sánchez-Moreiras, A.. Thomson Editores. 1era edición. Segunda reimpresión, pp 725-748.

Álvarez-Tinaut, M. C. y Espinosa-Borreguero, F. 2003. Jasmonatos y salicilatos: fitohormonas clave en las reacciones de defensa de las plantas y de comunicación en el ecosistema. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Coordinadores: Reigosa, M.J.; Pedrol, N. y Sánchez-Moreiras, A.. Thomson Editores. 1era edición. Segunda reimpresión, pp 633-724.

Andrés-Hernández, A.R. y Espinosa-Organista, D. 2002. Morfología de plántulas de *Bursera Jacq ex. L.* (Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas. Boletín de la Sociedad Botánica de México 70: 5-12.

- Aranberri, I.; Binks, B. P.; Clint, J. H. y Fletcher, P. D. I.. 2006. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 7 (3): 211-231.
- Ashis, K. S. R.; Asit, K. D.; Nilima, B. y Vignon, M. R.. 1992. Isolation and structure of 4-O-methyl glucuronoarabinogalactan from *Boswellia serrata*. *Carbohydrate Research* 223: 321-327.
- Atha D. E.; Romero L. y Forrest T.. 2005. Bark volume determination of *Bursera simaruba* in Belize. *Caribbean Journal of Science* 41 (4): 843-848.
- Baird, D. C. 1998. Experimentación, una introducción a la teoría de mediciones y al diseño de experimentos. Prentice Hall, pp 210.
- Barnes, H. A.. 2000. A handbook of elementary rheology. Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics. University of Wales, Aberystwyth, pp 210.
- Becerra, J. X. y Venable, D. L.. 1999. Nuclear ribosomal DNA phylogeny and its implications for evolutionary trends in Mexican *Bursera* (Burseraceae). *American Journal of Botany* 86: 1047–1057.
- Bhatt, J. R.. 1987. Development and structure of primary secretory ducts in the stem of *Commiphora wightii* (Burseraceae). *Annals of Botany* 10: 405–416.
- Bird, R. B.; Stewart, W. E. y Lightfoot, E. N.. 2002. Transport phenomena 2ª ed. John Wiley & Sons, pp 895.
- Black, D. L.; McQuay, M. Q. y Bonin, M. P.. 1996. Based Techniques For Particle-Size Measurement: A review of sizing methods and their industrial applications. *Prog. Energy Combust. Sci.* 22: 267-306.
- Bloomer, J. J.. 2000. Practical Fluid Mechanics for Engineering Applications. Marcel Dekker Inc. Pennsylvania, USA.
- Breitmaier, E.. 2006. Terpenes: Flavors, Fragances, Pharmaca, Pheromones. Wiley-VCH Verlag, pp 214.
- Briggs, J. L. y Steffe, J. F.. 1997. Using Brookfield data and the Mitschka method to evaluate power law foods. *Journal of Texture Studies* 28:517-522.

- Brown, M. E.. 2001. Introduction to thermal analysis: Techniques and applications. Kluwer Academic Publishers. Second Edition, pp 155.
- Bruck, I. S.. 2002. Ethnobotanically identified wound-healing response tied to *Bursera simaruba* Sarg (Burseraceae) bark pigments (pheophytin and polyphenolics). PhD Tesis: Ethnobotany of the k'ekchi' maya of southern Belize and a search for novel pesticide models. Department of Botany North Carolina State University. pp 176-210.
- Brummer, Y. y Cui, W. S.. 2005. Understanding carbohydrate analysis. Food carbohydrates: chemistry, physical properties and applications, editado por Steve W. Cui. Taylor & Francis Group, pp. 38.
- Burdock, A. G.. 2010. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. Sixth edition. Taylor & Francis Group, pp. 1450 y 1559.
- Burton Jr., G.A.; Baudo, R.; Beltrami, M. y Rowland, C.. 2001. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. J. Limnol. 60 (2): 263-267.
- Carretero, M.E.; López-Pérez, J.L.; Abad, M.J.; Bermejo, P.; Tillet, S.; Israel, A. y Noguera, P. B.. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. Journal of Ethnopharmacology 116: 11-15.
- Chhabra, R. P.. 2007. Bubbles, drops and particles in non-Newtonian fluids. Second edition. CRC Taylor & Francis Group, pp 587.
- Chalmers, J. M. y Meier, R. J.. 2008. Comprehensive Analytical Chemistry Volume 53: Molecular characterization and analysis of polymers edited by Barceló D. First Edition. Elsevier. pp 784.
- Cheremisinoff, N. P.. 1996. Polymer Characterization: Laboratory Techniques and Analysis. Novel Publications. pp 251.
- CONABIO. 2006. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en:  
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/17-burse2m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/17-burse2m.pdf). Acceso al 22 junio de 2010.

- CONAFOR. Comisión Nacional Forestal. Disponible en:  
<http://www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/Fichas%20Tecnicas/Bursera%20simaruba.pdf>. Acceso al 22 de junio de 2010.
- CWRU. 2004. Case Western Reserve University. Physics Department.  
[http://physicslabs.cwr.edu/MECH/Manual/Appendix\\_V\\_Error%20Prop.pdf](http://physicslabs.cwr.edu/MECH/Manual/Appendix_V_Error%20Prop.pdf).  
Acceso al 12 de junio de 2010.
- Drelich, J.; Fang, C. y White, C. L.. 2002. Measurement of interfacial tension in fluid-fluid systems. Encyclopedia of Surface and Colloid Science. A. Hubbarb Ed., Marcel Dekker pp 3152-3166.
- Edeoga, H.O.; Okwu, D.E. y Mbaebie, B.O.. 2005. Phytochemicals constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biothecnology 4 (7): 685-688.
- Eliasson, A. C.. 2006. Carbohydrates in food. CRC Press Taylor&Francis Group, pp 527.
- Espinosa, D.; Llorente, J. y Morrene, J. J.. 2006. Historical biogeographical patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. Journal of Biogeography 33:1945-1958.
- Francis, J. K.. 1990. *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Almácigo, gumbo limbo. SO-ITF-SM-35. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, pp 5.
- García-Mendoza, A. J.; Ordoñez, M. y Briones-Salas M.. 2004. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología UNAM. México, pp 605.
- Global Biodiversity Information Facility. Disponible en [www.gbif.net](http://www.gbif.net). Acceso al 22 de junio de 2010.
- Groenewoud, W.M. 2001. Characterization of Polymers by Thermal Analysis. Elsevier Science, pp 390.
- González-Rodríguez, L.. 2003. Relaciones alelopáticas. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Coordinadores: Reigosa, M.J.; Pedrol, N. y Sánchez-Moreiras, A.. Thomson Editores. 1era edición. Segunda reimpresión, pp 527-576.

- Hanson, J. R. 2003. Natural Products: The Secondary Metabolites. Tutorial Chemistry Texts. Royal Society of Chemistry, pp 147.
- Harbone, J. y Baxter, H.. 1998. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. CRC Press, pp 976.
- Hagerman, E. A. 2002. Tannin Handbook. Disponible en <http://www.muohio.edu/~chmcwis/faculty/hagerman.htm>. Acceso al 22 de junio de 2010.
- Hernández, G. H. y Aguirre, C. J.. 2005. Estimación de calidad en polímeros empleando sensores virtuales. *Dyna* 72 (147): 65-73.
- Holmberg, K.; Jönson, B.; Kronberg, B. y Björn, L. 2002. Surfactants and polymers in aqueous solution. Second edition. John Wiley & Sons. Sweden, pp 547.
- Ibanoglu, S. e Ibanoglu, E.. 1998 Rheological characterization of some traditional Turkish soups. *Journal of Food Engineering* 35: 251-256.
- Imeson, A.. 2010. Food stabilisers, thickeners and gelling agents. Wiley-Blackwell. First edition, pp 372.
- Kaplan, D. L.. 1998. Biopolymers from renewable resources Springer, pp 417.
- Khan, M. N.. 2007 Micellar Catalysis. Surfactant Science Series Volume 133. Taylor & Francis Group Malaysia, pp 482.
- Kolybaba, M.; Tabil, L.G.; Panigrahi, S; Crerar, W.J.; Powell, T y Wang, B.. 2003. Biodegradable Polymers: Past, Present and Future. ASAE Paper No. 03-0007 St Joseph, MI USA.
- Koubala, B.B.; Mbone, L. I.; Kansci, G.; Tchouanguép, M. F.; Crepeau M. J.; Thibault, J. F. y Ralet, M. C. 2008. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry* 106: 1202-1207.
- Krishnaiah, D.; Devi, T.; Bono, A. y Sarbatly R.. 2008. Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 3 (2): 067-072.

- Lambert, J. B.; Wu, Y. y Santiago-Blay, J. A.. 2005. Taxonomic and chemical relationships revealed by nuclear magnetic resonance spectra of plant exudates. 68 (5): 635-648.
- Langenheim, J. H.. 2003. Plant Resins: Chemistry, evolution, ecology, ethnobotany. Timber Press Portland Oregon, pp 586.
- León de Pinto, G.; Martínez, M.; Beltrán, O.; Rincón, F.; Igartuburu, J. M. y Rodríguez F. L.. 2000a. Structural investigation of the polysaccharide from *Spondias mombin* gum. Carbohydrate Polymers 43: 105-112.
- León de Pinto, G.; Martínez, M.; Sanabria, F.; Rincón, F.; Vera, A.; Beltrán, O. y Clamens C.. 2000b. The composition of two *Spondias* gum exudates. Food Hydrocolloids 14: 259-263.
- Lichtenhaler, H. K.. 2003. El estrés y la medida del estrés en plantas. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Coordinadores: Reigosa, M.J.; Pedrol, N. y Sánchez-Moreiras, A.. Thomson Editores. 1era edición. Segunda reimpresión pp. 59-112.
- López-Franco, Y. L.; Goycoolea, F.M.; Valdéz, M. A. y Calderón de la Barca, A. M.. 2006. Goma de mezquite: Una alternativa de uso industrial. Interciencia (31) 003: 183-189.
- Mackley, M. R.; Marshall, R. T. J.; Smeulders, J. B. A. F. y Zhao F. D.. 1994. The rheological characterization of polymeric and colloidal fluids. Chemical Engineering Science 49 (16): 2551-2565.
- Maldini, M.; Montoro, P.; Piacente, S. y Pizza, C.. 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. Phytochemistry 70:641-649.
- Martínez, M.; León de Pinto, G.; Sanabria, F.; Beltrán, O.; Igartuburu, J. M. y Bahsas, A.. 2003. Structural features of an arabinogalactan gum exudates from *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). Carbohydrate Research 338: 619-624.



- Martínez, M.; León de Pinto, G.; Bozo de González, M.; Herrera, J.; Oulyadi, H. y Guilhaudis, L.. 2008. New structural features of *Spondias purpurea* gum exudate. *Food Hydrocolloids* 22: 1310-1314.
- Matilla, A.. 2003. Ecofisiología de la germinación de semillas. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Coordinadores: Reigosa, M.J.; Pedrol, N. y Sánchez-Moreiras, A.. Thomson Editores. 1era edición. Segunda reimpresión, pp 901-922.
- McClements, D. J.. 1999. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Series in Contemporary Food Science. University of Massachusetts, pp 377.
- McClements, D. J.; Decker, E. A. y Weiss, J.. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science* 72 (8): 109-124
- Mills, S.. 1994. *The Essential Book of Herbal Medicine*. Viking Arkana London, pp 704.
- Miller, L. P.. 1973. Hemicelluloses and gums. *Phytochemistry: The process and products of photosynthesis*. Volume I. Van Nostrand Reinhold Company, pp 198-248.
- Mitschka, P.. 1982. Simple conversion of Brookfield RVT readings into viscosity functions. *Rheologica Acta* 21: 207-209.
- Muñoz, J.; Rincón, F.; Alfaro, C.M.; Zapata, I.; De la Fuente, J.; Beltrán, O. y León de Pinto, G.. 2007. Rheological properties and surface tension of *Acacia tortuosa* gum exudate aqueous dispersions. *Carbohydrate Polymers* 70: 198-205.
- Nillson, C. L.. 2007. *Lectins: Analytical Technologies*. Elsevier. First edition, pp 457.
- Noguera, B.; Díaz, E.; García, M.V.; San Feliciano, A.; López-Pérez, J.L. e Israel, A.. 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* L. Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92: 129-133.
- Nussinovitch, A.. 2010. *Plant gum exudates of the world: sources, distribution, properties, and applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, pp 430.
- Okwu, D.E. e Iroabuchi, F.. 2008. Phytochemical Composition and Biological Activities of *Uvaria chamae* and *Clerodendron splendens*. *E-Journal of Chemistry* 6 (2): 553-560.

- Parekh, J. y Chanda, S.V.. 2006. In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *Turk J. Biol.* 31: 53-58.
- Pengelly, A.. 2004. The Constituents of Medicinal Plants: An Introduction to the Chemistry & Therapeutics of Herbal Medicines. *Sunflowers Herbals*, pp 109.
- Peraza-Sánchez, S. R.; Salazar-Aguilar, N. E. y Peña-Rodríguez, L. M.. 1995. A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products.* 58 (2): 271-274.
- Pisani, J.M. y Distel, R.A.. 1997. Inter and intraspecific variations in production of spines and phenols in *Prosopis caldenia* and *Prosopis flexuosa*. *Journal of Chemical Ecology* 24 (1): 23-36.
- Pielichowski, K. y Njuguna, J.. 2005. Thermal Degradation of Polymeric Materials. *Rapra Technology Limited*. First edition, pp 320.
- Ramírez-Mares, M. V.. 1999: Químiprotección del extracto de *Ardisia compressa* en modelos in vitro e in vivo. Programa de postgrado en alimentos del centro de la república. Tesis de doctorado. UAQ.
- Ramsden, L.. 2004. Plant and algal gums and mucilages. Chemical and functional properties of food saccharides, editado por Piotr Tomasik. *CRC Press*, pp. 24.
- Regalado, M. A.; Espinosa, A. H. y Mendoza, T. G.. 2001. Diseño de una planta encapsuladora de nutraceuticos. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. UAM-Iztapalapa.
- Reigosa, M. J. y Pedrol, N.. 2003. La ecofisiología vegetal. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Coordinadores: Reigosa, M.J.; Pedrol, N. y Sánchez-Moreiras, A.. Thomson Editores. 1era edición. Segunda reimpresión, pp 1-58.
- Román-Guerrero, A.; Orozco-Villafuerte, J.; Pérez-Orozco, J. P.; Cruz-Sosa, F.; Jiménez-Alvarado, R. y Vernon-Carter, E.J.. 2009. Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocolloids* 23 (3): 708-713
- Rossiter, B. W. y Baetzold, R. C.. 1993. Physical Methods of Chemistry Volume 9 Part A: Investigations of Surfaces and Interfaces. Second edition. *John Wiley & Sons*.

- Rzedowski, J. y Calderón de Rzedowski, G.. 2000. Una especie nueva de *Bursera* (Burseraceae) del estado de Oaxaca. *Acta Botánica Mexicana* 52: 75-81.
- Rzedowski, J.; Medina, R. L. y Calderón de Rzedowski, G.. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 70: 85-111
- Rzedowski, J.. 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp 504.
- Rzedowski, J.; Medina, R. L. y Calderón de Rzedowski, G.. 2007. Segunda restauración de *Bursera ovalifolia* y nombre nuevo para otro componente del complejo de *B. simaruba* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 81: 45-70.
- Sahin, H. y Ozdemir, F.. 2004. Effect of some hydrocolloids on the rheological properties of different formulated ketchups. *Food Hydrocolloids* 18: 1015-1022.
- Salas, S.; Saynes, A. y Schibli, L.. 2003 Flora de la Costa de Oaxaca, México: Lista Florística de la Región de Zimatán. *Sociedad Botánica de México* 72: 21-58.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Disponible en [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx). Acceso al 22 de junio de 2010.
- Sahu, R. K. y Arora, N. K.. 2007. Bioassay as a tool for assessing susceptible and resistant plant species for field contaminated with industrial effluent. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 113-148.
- Shames, I. H.. 1995. Mecánica de fluidos. 3ed. McGraw Hill Interamericana, pp 847.
- Stamm, M.. 2008. Polymer Surfaces and Interfaces: Characterization, Modifications and Applications. 1<sup>st</sup> edition, pp 4-6.
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment. 1993. Biopolymers: Making Materials Nature's Way. Background Paper, OTA-BP-E-102 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, September 1993), pp 80.
- Vaclavick, V.A. y Christian, E.W.. 2008. Essentials of Food Science. Springer. 3er edition, pp 75.

- Verbeken, D.; Dierckx, S. y Dewettinck, K.. 2003. Exudate gums: occurrence, production and its applications. *Applied Microbiology Biotechnology* 63: 10–21.
- Vernon-Carter, E.J.; Nieto-Villalobos, Z; Velásquez-Madrado, O.; Valle-Vega, P.; de Aluja, A. S.; Constantino, F.; Zamora, C.; Pedroza-Islas, R.; Janczur, M.; Bourgues-Rodriguez, H.; Espinosa, J. y de la Fuente Dorado, L.. 1996. Evaluation of mesquite gum toxicity. Multidisciplinary committee report submitted to the Mexican Welfare Secretariat.
- Vinod, V.T.P.; Sashidhar, R.B.; Suresh, K.I.; Rama-Rao, B.; Vijaya-Saradhi, U. V. R. y Prabhakar-Rao, T.. 2008. Morphological, physic-chemical and structural characterization of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A tree gum from India. *Food Hydrocolloids* 22: 899-915.
- Viswanath, D. S.; Ghosh, T. K.; Prasad, D. H. L.; Dutt, N. V. K. y Rany, K. Y.. 2007. *Viscosity of liquids: Theory, estimation, experiment and data*. Springer
- Weber. 2000. *Biobased Packaging Materials for the Food Industry: Status and Perspectives*. A European Concerted Action, pp 136.
- Wiendl, R. M.; Muller, B. M. y Franz G..1995. Proteoglycans from the gum exudate of myrrh. *Carbohydrate Polymers* 28: 217-226.
- Yasunaka, K.; Fumiko, A.; Nagayama, A.; Hikaru, O.; Lozada-Pérez, L.; López-Villafranco, E.; Estrada, M. E.; Aguilar A. y Reyes-Chilpa, R.. 2004. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 293-299.

## 11. APÉNDICE

### A. PROPAGACIÓN DE ERROR

Al conseguir resultados como los promedios en mediciones y aplicarlos en una fórmula es necesario determinar la propagación del error implícita. En este caso, nos referimos a la prueba de fitotoxicidad donde se estimó el índice de germinación (%G) y de fitotoxicidad (%F) a partir de las fórmulas citadas en la metodología. Baird (1998) y CWRU (2004) consideran al método derivativo para la estimación de propagación del error en funciones de dos o más variables. A continuación se detalla el procedimiento realizado para las fórmulas de nuestro interés.

#### A.1. Índice de germinación (%G)

La fórmula se expresa como función de las variables y errores correspondientes

$$\%G = \left( \frac{G_s * L_s}{G_c * L_c} \right) * 100 = a * L_s * L_c^{-1} \quad (A.1.1)$$

$$a = \left( \frac{G_s}{G_c} \right) * 100 \therefore G = f(a, L_s, L_c); \delta_a, \delta_{L_s}, \delta_{L_c}$$

El error en la función estará dado por la contribución de cada una de las variables

$$\delta_G = \sqrt{\left( \left| \frac{\partial f}{\partial a} \right| \delta_a \right)^2 + \left( \left| \frac{\partial f}{\partial L_s} \right| \delta_{L_s} \right)^2 + \left( \left| \frac{\partial f}{\partial L_c} \right| \delta_{L_c} \right)^2} \quad (A.1.2)$$

Se deriva parcialmente la función para obtener

$$\frac{\partial f}{\partial a} = |L_s * L_c^{-1}|; \frac{\partial f}{\partial L_s} = |a * L_c^{-1}|; \frac{\partial f}{\partial L_c} = |-a * L_s * L_c^{-2}| \quad (A.1.3)$$

Se sustituyen las derivadas parciales y se expresan en términos de los errores

$$\begin{aligned} \delta_G &= \sqrt{\left( L_s * L_c^{-1} * \delta_a \right)^2 + \left( a * L_c^{-1} * \delta_{L_s} \right)^2 + \left( -a * L_s * L_c^{-2} * \delta_{L_c} \right)^2} \\ &= \sqrt{\left( L_s * L_c^{-1} \right)^2 \delta_a^2 + \left( a * L_c^{-1} \right)^2 \delta_{L_s}^2 + \left( -a * L_s * L_c^{-2} \right)^2 \delta_{L_c}^2} \end{aligned} \quad (A.1.4)$$

Se divide entre la función

$$\begin{aligned} \frac{\delta_G}{G} &= \frac{\sqrt{(L_s * L_c^{-1})^2 \delta_a^2 + (a * L_c^{-1})^2 \delta_{L_s}^2 + (-a * L_s * L_c^{-2})^2 \delta_{L_c}^2}}{(a * L_s * L_c^{-1})^2} \\ &= \sqrt{\frac{(L_s * L_c^{-1})^2 \delta_a^2}{(a * L_s * L_c^{-1})^2} + \frac{(a * L_c^{-1})^2 \delta_{L_s}^2}{(a * L_s * L_c^{-1})^2} + \frac{(-a * L_s * L_c^{-2})^2 \delta_{L_c}^2}{(a * L_s * L_c^{-1})^2}} \end{aligned} \quad (\text{A.1.5.})$$

Finalmente, el error en la función estará dado por

$$\begin{aligned} \frac{\delta_G}{G} &= \sqrt{\frac{\delta_{L_s}^2}{L_s^2} + \frac{\delta_{L_c}^2}{L_c^2}} \\ \therefore \frac{\delta_G}{G} &= \sqrt{\left(\frac{\delta_{L_s}}{L_s}\right)^2 + \left(\frac{\delta_{L_c}}{L_c}\right)^2} \end{aligned} \quad (\text{A.1.6.})$$

## A.2. Índice de fitotoxicidad (%F)

La fórmula se expresa como función de las variables y errores involucrados

$$\%F = \left(\frac{L_c - L_s}{L_c}\right) * 100 = 100 * (L_c - L_s) * L_c^{-1} = a * u * L_c^{-1} \quad (\text{A.2.1.})$$

$$a = 100; u = L_c - L_s; v = L_c^{-1} \therefore G = f(a, u, v); \delta_a, \delta_u, \delta_v$$

El error en la función estará dado por la contribución de cada una de las variables

$$\delta_F = \sqrt{\left(\left|\frac{\partial f}{\partial a}\right| \delta_a\right)^2 + \left(\left|\frac{\partial f}{\partial u}\right| \delta_u\right)^2 + \left(\left|\frac{\partial f}{\partial v}\right| \delta_v\right)^2} \quad (\text{A.2.2.})$$

Se deriva parcialmente la función para obtener

$$\frac{\partial f}{\partial a} = |u * L_c^{-1}|; \frac{\partial f}{\partial u} = |a * L_c^{-1}|; \frac{\partial f}{\partial v} = |a * u * -L_c^{-2}| \quad (\text{A.2.3.})$$

Se sustituyen las derivadas parciales y se expresan en términos de los errores

$$\begin{aligned}\delta_F &= \sqrt{(u * L_c^{-1} * \delta_a)^2 + (a * L_c^{-1} * \delta_u)^2 + (-a * u * L_c^{-2} * \delta_v)^2} \\ &= \sqrt{(u * L_c^{-1})^2 \delta_a^2 + (a * L_c^{-1})^2 \delta_u^2 + (-a * u * L_c^{-2})^2 \delta_v^2}\end{aligned}\quad (A.2.4.)$$

Se divide entre la función

$$\begin{aligned}\frac{\delta_F}{F} &= \frac{\sqrt{(u * L_c^{-1})^2 \delta_a^2 + (a * L_c^{-1})^2 \delta_u^2 + (-a * u * L_c^{-2})^2 \delta_v^2}}{(a * u * L_c^{-1})^2} \\ &= \sqrt{\frac{(u * L_c^{-1})^2 \delta_a^2}{(a * u * L_c^{-1})^2} + \frac{(a * L_c^{-1})^2 \delta_u^2}{(a * u * L_c^{-1})^2} + \frac{(-a * u * L_c^{-2})^2 \delta_v^2}{(a * u * L_c^{-1})^2}}\end{aligned}\quad (A.2.5.)$$

Y se obtiene

$$\frac{\delta_F}{F} = \sqrt{\frac{\delta_u^2}{u^2} + \frac{\delta_{Lc}^2}{L_c^2}} = \sqrt{\left(\frac{\delta u}{u}\right)^2 + \left(\frac{\delta_{Lc}}{L_c}\right)^2}\quad (A.2.6.)$$

Hasta aquí  $u$  es una variable que involucra la diferencia de longitudes entre el control y la muestra, cuya incertidumbre está dada por la contribución de incertidumbres en sus respectivas mediciones.

Por lo tanto

$$u = L_c - L_s; \delta u = \sqrt{\delta L_c^2 + \delta L_s^2}\quad (A.2.7.)$$

Finalmente, se sustituye el valor de  $u$  y se simplifica la expresión matemática obtenida

$$\begin{aligned}\frac{\delta_F}{F} &= \sqrt{\left(\frac{\sqrt{\delta L_c^2 + \delta L_s^2}}{L_c - L_s}\right)^2 + \left(\frac{\delta_{Lc}}{L_c}\right)^2} \\ \therefore \frac{\delta_F}{F} &= \sqrt{\frac{\delta L_c^2 + \delta L_s^2}{(L_c - L_s)^2} + \left(\frac{\delta_{Lc}}{L_c}\right)^2}\end{aligned}\quad (A.2.8.)$$

## B. FITOTOXICIDAD DE OTROS EXUDADOS

El análisis de fitotoxicidad en semillas de *Lens esculenta* se realizó simultáneamente con otros exudados para comparar sus efectos ante *Bursera simaruba*. Se utilizaron como exudados los extractos crudos liofilizados de arábiga, mezquite, ciruelo, copal e incluso una muestra de mezquite adquirido comercialmente. Los resultados de crecimiento, germinación y fitotoxicidad en raíz e hipocotilo con respecto a su concentración de exudado son presentados a continuación.

### B.1. RAÍZ

El crecimiento de raíz en H<sub>2</sub>O fue de 36.43±9.48 mm, mientras que en K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> fue de 31.46±7.27 mm.

Tabla B.1.I. Crecimiento de raíz en milímetros para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diversos exudados a varias concentraciones ([ ]).

[ ]	Arábiga		Mezquite		Mezquite_Comercial		Ciruelo		Copal	
	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$
7.14	ND		ND		ND		28.79	4.63	ND	
10	48.18	31.86	58.15	16.80	51.91	20.64	32.51	9.63	32.47	7.52
15	61.48	27.29	46.33	14.87	51.81	20.10	26.83	7.74	14.21	7.41
20	32.08	20.12	22.12	9.70	12.69	0.00	33.38	15.47	30.35	3.60
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND		30.93	7.23

La disolución al 25% p/v con el exudado de ciruelo requirió ser diluida, consiguiéndola finalmente a 7.14 % p/v de concentración, por lo que sus correspondientes espacios en la tabla quedan descritos como No Determinados (ND).



El índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) en H<sub>2</sub>O para raíz en las semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diluciones de diversos exudados son descritos enseguida. El %G para K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> es 71.24±0.39 %. y %F es 13.44±4.18 %.

Tabla B.1.II. Índice de germinación (%G) en raíz para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diversos exudados a varias concentraciones ( [ ] ).

[ ]	Arábiga		Mezquite		Mezquite_Comercial		Ciruelo		Copal	
	%G	±	%G	±	%G	±	%G	±	%G	±
7.14	ND		ND		ND		79.11	0.31	ND	
10	79.37	0.72	159.89	0.39	113.94	0.49	89.20	0.40	89.17	0.35
15	134.99	0.52	127.18	0.42	113.95	0.47	73.80	0.39	38.95	0.59
20	52.73	0.72	24.37	0.52	7.18	0.22	91.80	0.53	83.36	0.29
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND		84.93	0.35

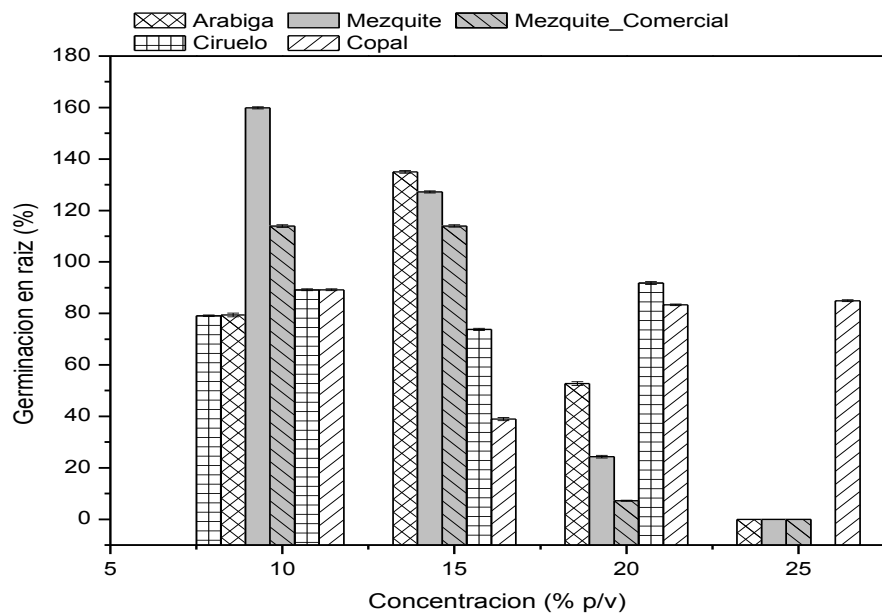


Figura B.1.1. Germinación en raíz para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con exudados a varias concentraciones.

Tabla B.1.III. Índice de fitotoxicidad (%F) de raíz en semillas de *Lens esculenta* irrigadas por exudados a varias concentraciones ([ ]).

[ ]	Arábiga		Mezquite		Mezquite_Comercial		Ciruelo		Copal	
	%F	±	%F	±	%F	±	%F	±	%F	±
7.14	ND		ND		ND		20.89	1.54	ND	
10	-32.28	2.80	-59.89	0.91	-42.43	1.55	10.80	3.36	10.83	3.32
15	-68.74	1.20	-27.18	1.80	-42.44	1.47	26.20	1.52	61.05	0.60
20	12.11	5.04	39.09	1.04	64.09	0.82	8.20	17.65	16.64	1.83
25	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	ND		15.07	2.25

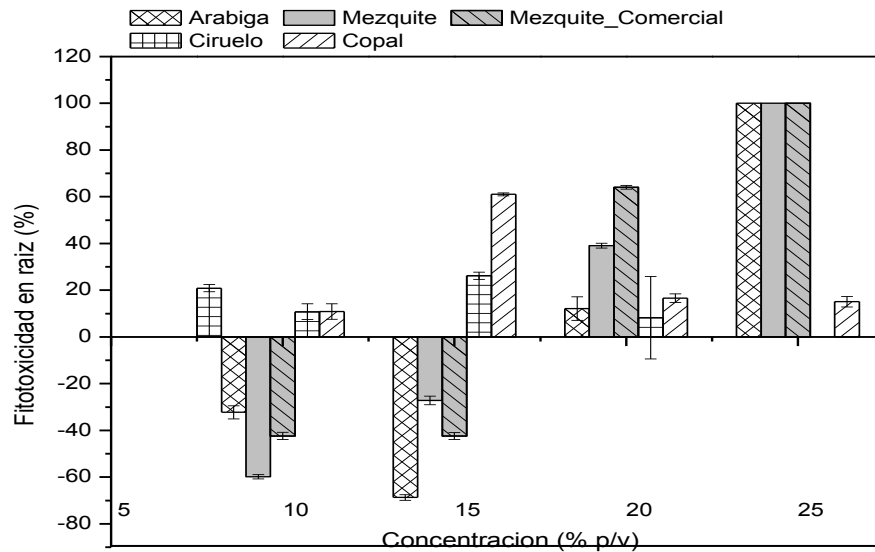


Figura B.1.2. Fitotoxicidad en raíz para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con exudados a varias concentraciones.

## B.2. HIPOCOTILO

El crecimiento del hipocotilo en H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> fue de 24.28±12.55 mm y 27.61± 23.16 mm respectivamente.

Tabla B.2.I. Crecimiento de hipocotilo en milímetros para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diversos exudados a varias concentraciones ([ ]).

[ ]	Arábiga		Mezquite		Mezquite_Comercial		Ciruelo		Copal	
	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$	$\bar{x}$	$\pm$
7.14	ND		ND		ND		31.62	15.36	ND	
10.00	0.00	0.00	17.97	9.57	16.89	4.86	30.60	6.59	17.05	5.23
15.00	0.00	0.00	16.90	5.75	18.55	8.08	28.92	13.40	14.24	5.41
20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.32	7.05	17.49	5.14
25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND		21.68	9.62

El índice de germinación (%G) y fitotoxicidad (%F) en H<sub>2</sub>O para hipocotilo en las semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diluciones de diversos exudados son descritos enseguida. El %G para K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> es 91.38±0.98 %. y el %F de -14.22±8.93 %.

Tabla B.2.II. Índice de germinación (%G) en hipocotilo para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con diversos exudados a varias concentraciones ( [ ] ).

[ ]	Arábiga		Mezquite		Mezquite_Comercial		Ciruelo		Copal	
% p/v	%G	±	%G	±	%G	±	%G	±	%G	±
7.14	ND		ND		ND		131.44	0.72	ND	
10.00	0.00	0.00	75.43	0.76	55.90	0.60	127.18	0.57	70.67	0.61
15.00	0.00	0.00	70.96	0.64	45.95	0.67	120.16	0.70	59.16	0.65
20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	71.58	0.66	72.33	0.60
25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND		90.92	0.70

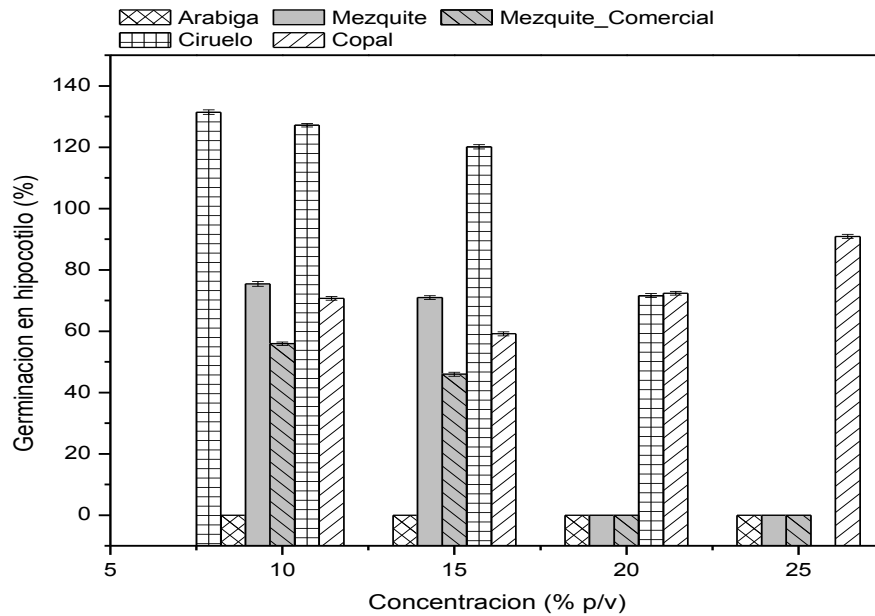


Figura B.2.1. Germinación en hipocotilo para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con exudados a varias concentraciones.

Tabla B.2.III. Índice de fitotoxicidad (%F) en hipocotilo para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con exudados a varias concentraciones ( [ ] ).

[ ]	Arábiga		Mezquite		Mezquite_Comercial		Ciruelo		Copal	
	%F	±	%F	±	%F	±	%F	±	%F	±
7.14	ND		ND		ND		-31.44	3.11	ND	
10.00	100.00	0.00	24.57	4.37	30.12	2.00	-27.18	2.63	29.33	2.09
15.00	100.00	0.00	29.04	2.82	23.42	2.70	-20.16	5.08	40.84	1.56
20.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	28.42	2.19	27.67	2.18
25.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	ND		9.08	9.80

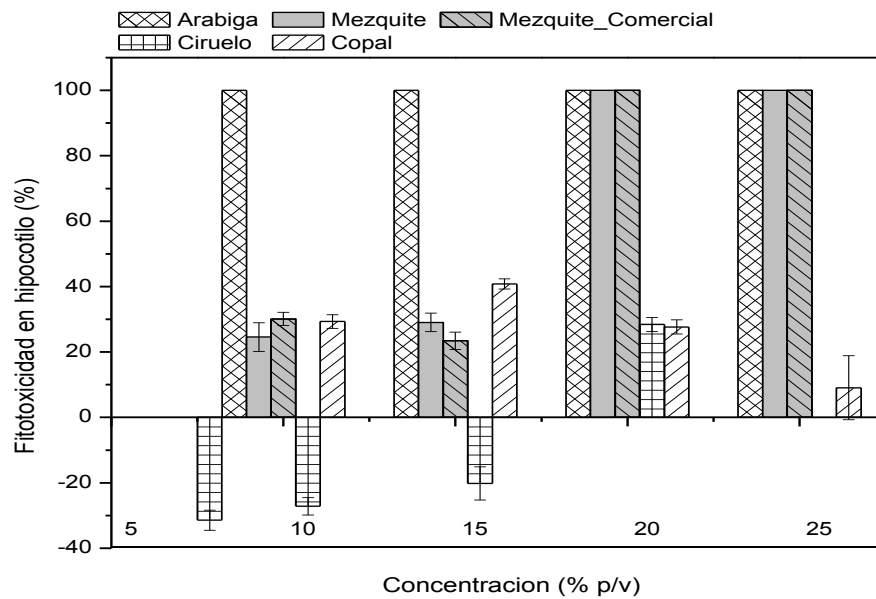


Figura B.2.2. Fitotoxicidad en hipocotilo para semillas de *Lens esculenta* irrigadas con exudados a varias concentraciones.

## C. RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA MÚLTIPLE FACTORIAL DE DOS VÍAS EN EL CRECIMIENTO DE RAÍZ E HIPOCOTILO CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DEL EXUDADO.

Los resultados se obtuvieron por medio del software Statistica® 8.0.

C.1. Tabla de resultados generales del Análisis de Varianza Múltiple.

	$\Lambda$	GL Efecto	GL Error	p
Concentración	0.132149	2	19	0.000000
Exudado	0.000488	18	38	0.000000
Concentración*Exudado	0.018415	18	38	0.000000

C.2. Resultados de las pruebas *a posteriori* (univariadas).

	GL	Raíz		Hipocotilo	
		F	p<0.05	F	p<0.05
Exudado	1	85.51	0.000000	36.134	0.000000
Concentración	9	158.73	0.000000	81.413	0.000000
Interacción	9	23.07	0.000000	11.684	0.000000
Error	20				

C.3. Homocedasticidad

$$C_{\text{raíz}} = 0.221935; \text{GL } 19; p = 0.999770$$

$$C_{\text{hipocotilo}} = 0.180650; \text{GL } 16; p = 0.997538$$

C.4. Normalidad

$$K\text{-}S_{\text{raíz}} = p > 0.20; \quad K\text{-}S_{\text{hipocotilo}} = p > 0.20$$

Por residuales: Véase gráfica C.4.1.

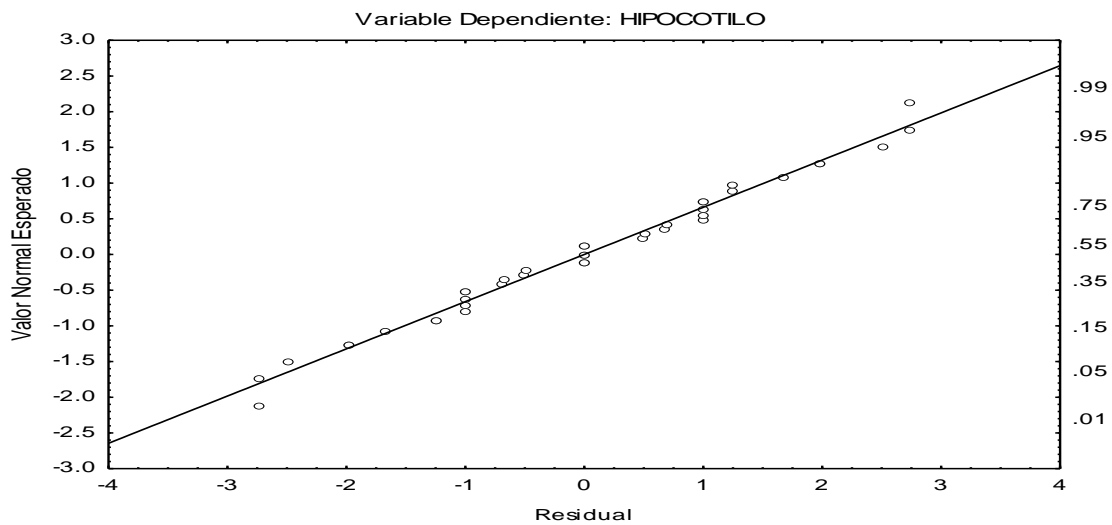
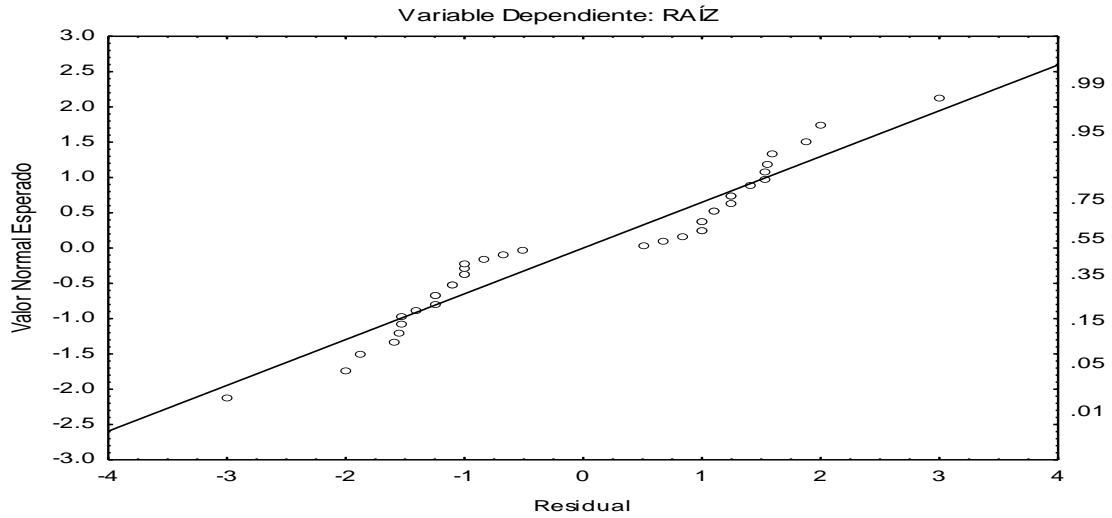


Figura C.4.1. Prueba de normalidad a través de residuales en raíz e hipocotilo.

C.5. Prueba de Dunnet

<b>Raíz</b>	<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	<b>BsC</b>	<b>Bs</b>	<b>BsP</b>	<b>Arb</b>	<b>Mzq</b>	<b>MzqC</b>	<b>CrI</b>	<b>Cpl</b>
<b>10%</b>	0.2017	1.0000	0.1411	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.4559	0.4448
<b>15%</b>	0.2017	0.0000	0.7052	0.0000	0.0000	0.0011	0.0000	0.0016	0.0000
<b>Hipocotilo</b>	<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	<b>BsC</b>	<b>Bs</b>	<b>BsP</b>	<b>Arb</b>	<b>Mzq</b>	<b>MzqC</b>	<b>CrI</b>	<b>Cpl</b>
<b>10%</b>	0.6687	0.9296	0.0176	0.9999	0.0000	0.0611	0.0202	0.0606	0.0240
<b>15%</b>	0.6687	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0203	0.1067	0.2782	0.0011