



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO DE PLANTAS
MEDICINALES**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DE
Amphipterygium adstringens SCHIEDE EX SCHLECHTER
(CUACHALALATE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
DE PLANTAS MEDICINALES**

PRESENTA:

IBT. LEONEL ANDRES ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA

CODIRECTOR

DR. ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales, del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por permitirme formar parte de su grupo de investigación. A mis directores de tesis, la Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB-UAEM) como tutor principal y al Dr. Alexandre Cardoso Taketa (CEIB-UAEM, cotutor), por su apoyo incondicional en todo momento durante el periodo en el que me encontré en el Laboratorio de Plantas Medicinales, por brindarme su confianza y por su gran disposición para la elaboración del presente trabajo de tesis. Gracias por creer en mí. A los demás Doctores integrantes de mi comité tutorial: Dra. María Luisa Villarreal Ortega (CEIB-UAEM), Dra. Nayeli Monterrosas Brisson (FCB-UAEM) y el Dr. Porfirio Juárez López (FCA-UAEM) por su orientación y apoyo.

A La Cadena Productiva de Aprovechamiento de Plantas Medicinales de la Sierra de Huautla Mor. S.P.R. de R.L. que, junto con la Asesora Ambiental y Agronómica (PROSELBA), han establecido un proyecto para el aprovechamiento sustentable y controlado de la explotación racional de cuachalalate, de los cuales los representantes con los que traté directamente son el Ing. Jesús M. Velázquez R. (PROSELBA) y al Sr. Cándido Isidro Vidal Pineda (Presidente de Honor y Justicia de la Cadena Productiva de Cuachalalate de la Sierra de Huautla). Gracias por su valiosa disposición, colaboración y asesoría en los programas de recolección de material vegetal en campo en la Sierra de Huautla, en los ejidos de El limón y el ejido de Juchitán.

A las M. en C. Areli Madai Guzmán Pozos (Campo Experimental de Zacatepec -Inifap), al proporcionarme la información más relevante con la que cuentan al trabajar con algunos árboles de cuachalalate que poseen en el Campo Experimental y por su disposición a atenderme en todo momento.

A mi muy querido amigo el Maestro en Biotecnología Christian Carreño Campos por toda la asesoría y colaboración en los ensayos *in vitro* realizados en el Laboratorio de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, quien, a pesar de estar siempre muy ocupado con su propio proyecto, siempre mostró una excelente disposición a brindarme asesoría.

A la M. I. Ariadna Zenil Rodríguez por su asesoría en el manejo del equipo de HPLC, a la Téc. Lucero Valladares por sus asesorías y apoyos en los equipos de liofilización y a la Téc. Damaris Merino por todo su apoyo técnico en el cultivo de tejidos vegetales.

A mis compañeros de laboratorio, Eleazar, Roció, Itzel y demás compañeros nuevos que han ido llegando. A mis queridos compañeros de generación durante esta maestría: Ángel Franco, Cris Domínguez, Patricia Espinosa, Mario Oscar, Silvia Pinal; y a una personita muy en especial que se nos fue antes de tiempo debido a una enfermedad malvada que nos la quitó, la Dra. Gloria Patricia Domínguez Patiño. Al Dr. Said que además de ser un buen instructor se comportó en todo momento como un gran amigo.

A todos los mencionados y aquellos que no menciono por nombre, muchas gracias por su compañerismo, así como por brindarme su amistad incondicional en todo momento.

DEDICATORIA

A mis amados instructores de vida, quienes están siempre conmigo a pesar de haber fallecido hace algunos años, Mis amados Padres: Joel Andres y Josefina Ortega.

A mi padre por enseñarme mediante su ejemplo, y que, a pesar de estar grande de edad, seguía estudiando cursos por correspondencia por las noches, permitiéndome tener muy presente en mi mente la imagen de él sentado en la silla y recargado en la mesa, estudiando cursos de plomería, electricidad, maestro tornero y logrando obtener su certificado de primaria del cual estaba sumamente orgulloso. Y es gracias a su ejemplo que me nació el amor por el estudio y por la ingeniería.

A mi madre que siempre me mostró el ejemplo de ser una persona empática, comprensiva y tolerante. Gracias por su amor y confianza, son mi gran motivación, y su recuerdo mi mayor tesoro.

A mis hermanos Mary, Joel, Ricardo y Lupe, que los amo tanto.

A mi esposa Martha y mi hijo Iván que han sido el motor de mi vida, por los cuales siempre retomaba fuerzas para continuar esforzándome en todo momento.

A mis dos nenas que me han robado el corazón, y que, con solo pedirlo, su abuelo haría por ellas hasta lo imposible, mis nietas Yuria y Sara, las adoro con toda mi alma...

¡Gracias!

Índice

1	INTRODUCCIÓN.....	11
2	ANTECEDENTES.....	12
2.1	Plantas medicinales.....	12
2.2	Datos etnobotánicos del Cuachalalate.....	13
2.3	Clasificación taxonómica de <i>Amphipterygium adstringens</i> Schiede ex Schlecht. 14	
2.4	Descripción geográfica.....	14
2.5	Producción de Cuachalalate en México.....	15
2.5.1	Antecedentes agronómicos de <i>Amphipterygium adstringens</i>	15
2.5.2	Producción de la corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i>	17
2.6	Fitoquímica del Cuachalalate.....	17
2.7	Usos de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Cuachalalate) en la salud humana.....	21
2.8	Cultivo <i>in vitro</i>	23
3	JUSTIFICACION.....	25
4	HIPÓTESIS.....	26
5	OBJETIVOS.....	26
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	26
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
6	DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	27
6.1	ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	27
6.1.1	Colecta de <i>A. adstringens</i>	27
6.2	Métodos cromatográficos.....	28
6.2.1	Análisis de triterpenos por Cromatografía en Placa Fina (CCF).....	28
6.3	Purificación de terpenos por cromatografía en columna abierta.....	29
6.4	Análisis de triterpenos por Cromatografía Líquida de Alta Presión.....	29
7	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	30
7.1	Material biológico.....	30
7.2	Método de desinfección de explantes de <i>A. adstringens</i>	30
7.3	Medio para la inducción de callogénesis.....	31
7.4	Viabilidad celular de <i>A. adstringens</i>	31
7.5	Cromatografía en capa fina de los compuestos presentes en los callos de <i>A. adstringens</i>	32
8	RESULTADOS.....	33

8.1	Colecta de <i>A. adstringens</i>	33
8.2	Análisis de los extractos crudos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	33
8.2.1	Purificación de los compuestos de interés de las muestras colectadas del árbol de Cuachalalate de hoja, meristemas, fruto seco y Pecíolo de Xoxocotla. Análisis por cromatografía de capa fina preparativa.....	35
8.3	Análisis Comparativo por HPLC de las partes aéreas de Cuachalalate de la zona de Xoxocotla Morelos.....	38
8.4	Identificación del compuesto químico con el punto de referencia de Rf = 0.25 mediante cromatografía en gases masas.....	40
8.5	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. adstringens</i>	44
8.5.1	Porcentaje de desinfección de explantes de <i>A. adstringens</i>	44
8.5.2	Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> para la generación de callos de <i>A. adstringens</i>	44
8.5.3	Análisis de los compuestos producidos a partir de cultivo <i>in vitro</i> (callos) de Cuachalalate.....	46
9	DISCUSIÓN.....	47
9.1	Colecta de <i>A. adstringens</i>	47
9.2	Resultados de los perfiles metabólicos observados en la cromatografía en capa fina (CCF).....	48
9.3	Compuestos de interés encontrados en Cuachalalate.....	48
9.4	Determinación de la presencia de compuestos de interés mediante HPLC.....	49
10	CONCLUSIONES.....	49
11	PERSPECIVAS.....	50
12	ANEXO I.....	51
12.1	Jabón con extracto etílico de <i>A. adstringens</i>	51
12.2	Preparación de gel a base de extractos de <i>A. adstringens</i> , como regenerador celular y posible activador del gen MUTYH involucrado en la reparación del ADN.....	52
12.3	Daño del dedo izquierdo por hongo.....	54
12.4	Regeneración de daño celular en un pie de paciente con diabetes mellitus.....	55
12.5	Regeneración de daños celulares por la enfermedad de Ictiosis.....	56
12.6	CONVENIO CON EL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO.....	57
12.7	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE METABOLITOS PRESENTES EN EL CUACHALALATE CON BLANCOS PROTEICOS DEL SARS-CoV2	57
13	BIBLIOGRAFÍA.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	páginas
Figura 1. a) Cuachalalate (hembra) de la zona de Huautla, en el Ejido el Limón, b) Cuachalalate (hembra) de la zona de Xoxocotla Mor, c) Recolección en la Sierra de Huautla Morelos, ejido Juchitán	13
Figura 2. Distribución de <i>Amphipterygium adstringens</i> (cuachalalate) en México	15
Figura 3. Sierra de Huautla	16
Figura 4. Perfil triterpénico de la corteza de <i>A. adstringens</i>	18
Figura 5. Metabolitos secundarios aislados de <i>A. adstringens</i>	19
Figura 6. Compuestos alquilfenólicos aislados del extracto hexánico de <i>A. adstringens</i>	19
Figura 7. Comparación cromatográfica en capa fina de las muestras colectadas del árbol de Cuachalalate: de la zona de Xoxocotla Morelos (macho), de Puebla (Hembra), Extracción Acuosa (EA), extracción Etílica (EE). De izquierda a derecha por numeración: 1) EA-Xoxo-Corteza, 2) EE-Xoxo-Hoja, 3) EE-Xoxo-Meristemo, 4) EE-Xoxo-Meristemo Gde., 5) EE-Xoxo-Fruto Seco, 6) EE-Xoxo-Pecíolo, 7) EE-Xoxo-Corteza, 8) EE-Puebla-Corteza, 9) EE-Xoxo-Fruto Verde. En un sistema de (hexano:acetato de etilo (75:25)).....	19
Figura 8. Comparación cromatográfica en capa fina observada en el equipo CAMAG, de nueve muestras de las diferentes partes de un árbol de Cuachalalate de la zona de Xoxocotla Morelos (macho), de Puebla (Hembra), Extracción Acuosa (EA), extracción Etílica (EE) De izquierda a derecha por numeración: 1) EE-Xoxo-Hoja, 2) EE-Xoxo-Meristemo, 3) EE-Xoxo-Meristemo Gde., 4) ácido acetil salicílico 5) EE-Xoxo-Fruto Seco, 6) EE-Xoxo-Pecíolo, 7) EE-Xoxo-Corteza, 8) EE-Puebla-Corteza, 9) EE-Xoxo-Fruto Verde. En un sistema de (hexano:acetato de etilo, 75:25).....	34
Figura 9. a) Cromatografía en capa fina de los compuestos puros de los aislados de las diferentes partes del árbol de cuachalalate de Xoxocotla, panel a) 1. hoja, 2. Meristemos, 3). Fruto seco de Xoxocotla y utilizando una fase móvil de acetato de etilo y hexano (25:75) para realizar su separación b) compuestos obtenidos de la separación en cromatoplaaca a partir del extracto de Pecíolo.....	34
Figura 10. Cromatografía en capa fina: comparación del perfil químico entre extractos de tallos de hoja provenientes de tres árboles diferentes: 1) Pecíolo de Xoxocotla (hembra), 2) Pecíolo de Sierra de Huautla (macho) 3). Pecíolo de Sierra de Huautla (hembra). En un sistema de (hexano:acetato de etilo (75:25)).....	36
Figura 11. Perfil cromatográfico en capa fina, donde se muestran los compuestos del perfil químico obtenidos del fraccionamiento de la biomasa de los tallos de hoja de la Sierra de	

Huautla. Sistema de elución en sílica: hexano: éter etílico y ácido fórmico (70:30:1). Detección en luz ultravioleta a 315 nm y 280 nm.

Figura 12. Perfil cromatográfico en capa fina de los compuestos puros de tallos de hoja de la Sierra de Huautla. Sistema de elución en sílica: hexano: éter etílico y ác. fórmico (70:30:1). Detección en luz ultravioleta a 315 nm.	37
Figura 13. Punto de fusión de los cristales procedentes de los compuestos aislados de Pecíolo del Cuachalalate 25°C a 102°C.....	38
Figura 14. Perfil cromatográfico por HPLC de Cuachalalate (hembra) de la zona de corteza de Puebla y Xoxocotla Morelos y 1) Corteza-acuosa puebla, 2) Hoja, 3) Meristemo, 4) Meristemo Grande., 5) Fruto Seco, 6) Pecíolo, 7) Corteza, 8) Corteza, de puebla 9) -Fruto Verde y 10) Mezcla de hoja corteza (50:50). Se registra un pico en común a los 17.2 min. Sistema cromatográfico: acetonitrilo: agua (70:30), columna C-18, absorbancia de 230 nm.....	
Figura 15. Comparación cromatográfica en HPLC de las diez muestras de las partes aéreas de Cuachalalate (hembra) de la zona de Xoxocotla Morelos: 1) Corteza-acuosa, 2) Hoja, 3) Meristemo, 4) Meristemo Grande., 5) Fruto Seco, 6) Pecíolo, 7) Corteza, 8) Corteza, de puebla 9) -Fruto Verde y 10) Mezcla de hoja corteza (50:50), con tiempo de retención de 17.2 min. Sistema: Acetonitrilo: agua (70:30), columna C-18, absorbancia de 230 nm.....	
Figura 16. Perfil cromatográfico en capa fina de los compuestos puros de tallos de hoja de la Sierra de Huautla, mostrando el compuesto de color fosforescente con un punto de referencia de 0.25, que se analizó por gases-masas. Carril 1: Pecíolo Xoxotla (hembra) ; carril 2:Pecíolo Sierra de Huautla (macho); carril 3: Pecíolo Sierra de Huautla (hembra). Fase móvil compuesta por hexano: éter etílico y ác. fórmico (70:30:1) y visualización bajo luz ultravioleta.....	
Figura 17: Cromatograma del análisis de gases-masas del compuesto con Rf 0.25, que corresponde al pico más abundante con Tr 43.63 min.....	42
Figura 18: Espectro de masas del compuesto con Tr 43.63 min (compuesto con Rf 0.25) obtenido en el análisis de cromatografía de gases.....	42
Figura 19. Estructura química propuesta para el compuesto con Tr 0.25 en CCF, un derivado del ác. anacárdico de 13 carbonos.....	42
Figura 20: Perfil cromatográfico en capa fina de los compuestos presentes en los extractos de tallos de hoja de la Sierra de Huautla: 1) polen, 2) Callos, 3) compuesto de referencia con Rf 0.25, 4) Hoja y 5) ácido salicílico. En un sistema de (hexano: éter etílico y ac fórmico (70:30:1)..	43
Figura 21. Perfil cromatográfico en capa fina, donde se observa los compuestos producidos en cultivos de callos y su comparación con los producidos en partes aéreas de Cuachalalate. Carril 1: Corteza de Xoxocotla. Carril 2: Callos generados <i>in vitro</i> . Carril 3: Polen. Carril 4: Pecíolo (macho). Carril 5: Pecíolo (hembra).....	47

INDICE DE TABLAS	Páginas
Tabla 1. Producción máxima de corteza de <i>A. adstringens</i>	17
Tabla 2. Acción farmacológica de <i>A. adstringens</i>	23
Tabla 3. Colecta de <i>A. adstringens</i>	28
Tabla 4. Extracción etílica en una dilución de alcohol/agua 70:30.	28
Tabla 5. Protocolo de desinfección de explantes de <i>A. adstringens</i>	30
Tabla 6. Tratamientos para la inducción de callogénesis de <i>A. adstringens</i>	31
Tabla 7. Colecta de <i>A. adstringens</i>	33
Tabla 8. Producción de callo de <i>A. adstringens</i> en tratamientos con diferente concentración y combinación de reguladores de crecimiento.	45
Tabla 9. Generación de callo a partir de hojas de jóvenes de <i>A. adstringens</i> colectadas en Xoxocotla y del Campo Experimental de Zacatepec.	46

ABREVIATURAS

CIN	Cinetina
C50	Concentración letal 50
B5	Medio de cultivo Gamborg
g	Gramos
h	Horas
L	Litros
μL	Microlitros
mM	Milimolar
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanometros
PS	Peso seco
PF	Peso fresco
rpm	Revoluciones por minuto
t_R	Tiempo de retención
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
%	Porcentaje
CCF	Cromatografía en Capa Fina

1 INTRODUCCIÓN.

Las plantas superiores han jugado un papel muy importante como agentes medicinales de uso humano, aplicadas popularmente como infusiones, extractos crudos o en forma tópica. Hoy en día en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, las plantas medicinales continúan utilizándose para la atención de problemas de salud. Por otro lado, en los países del primer mundo, los fármacos obtenidos a partir de procesos biotecnológicos ofrecen un potencial, en el área de la salud humana para la obtención de nuevas moléculas, así como en procesos controlados de producción de metabolitos activos.

En las últimas décadas, el interés por los productos medicinales herbolarios o fitomedicamentos ha experimentado una creciente demanda en Estados Unidos, países de la Unión Europea, Canadá y Australia (Bennerman, 1998). Se estima que el mercado global de la medicina herbolaria y sus productos derivados fue de aproximadamente 30 mil millones de dólares para el año 2000 y que las ventas mundiales durante la última década se han incrementado en una tasa de crecimiento promedio anual de 5 a 15 %, esperando alcanzar 5 billones de dólares para el año 2050 (Vasisht y Kumar, 2002).

En el año de 1998 el Banco Mundial seleccionó a las plantas medicinales como un área prioritaria para resolver problemas de salud pública en los países en vías de desarrollo, debido a su gran potencial económico y por basarse en los recursos autóctonos existentes de aplicación para la explotación de la fitoterapia (Vasisht y Kumar, 2002).

En México, la medicina tradicional de las culturas populares se ha caracterizado por la gran diversidad de recursos vegetales que se han incorporado y continúan utilizándose en las prácticas curativas. El uso de estas plantas medicinales genera gran interés para realizar investigación científica tecnológica que permita mayor conocimiento para una explotación más racional y una mejor conservación de los valiosos recursos naturales.

Muchas investigaciones están enfocadas al empleo de cultivo *in vitro* para la producción de fármacos de origen vegetal, resultando en una tecnología de vanguardia que ha ganado prestigio internacional, debido a la posibilidad de ser aplicada a la mayoría de las especies vegetales y al

potencial de algunos sistemas de cultivo, para producir compuestos de utilidad farmacéutica a una escala industrial.

Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlechter (cuachalalate) es una planta medicinal de gran interés, por ser ampliamente utilizada en la medicina tradicional en México por sus importantes propiedades farmacológicas, principalmente por ser una fuente de producción de compuestos de naturaleza triterpénica. Los compuestos más abundantes que produce esta especie vegetal son: ácido masticadienónico, 3-alfa-hidroxi-masticadienónico y mezclas de ácidos masticadienónico/isomasticadienónico), así como una variedad de ácidos anacárdicos (Gellerman *et al.*, 1969; Kubo *et al.*., 1993a; Kubo *et al.*, 1999; Grazzini *et al.*, 1991; Spencer *et al.*, 1980; Mata *et al.*, 1991).

Debido a las propiedades terapéuticas de la especie de *A. adstringens* Schiede ex Schlecht. (cuachalalate) y con el interés de identificar y purificar los principales compuestos químicos presentes en la especie, se plantea determinar la producción de compuestos presentes en las partes aéreas del árbol, así como lograr el establecimiento del cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas (callos celulares con el fin de contar con un cultivo homogéneo de producción de sus compuestos químicos de interés farmacológico.

2 ANTECEDENTES.

2.1 Plantas medicinales.

Tradicionalmente las plantas medicinales han sido agrupadas en función de su esfera de acción para tratar diferentes padecimientos populares. En este sentido, es de importancia destacar que México es un país megadiverso, ya que es uno de los 7 países más ricos del mundo en especies de planta, posee el tercer lugar mundial en biodiversidad y el quinto lugar mundial en plantas vasculares, con más de 23,000 especies diferentes, de las cuales el 50% son endémicas de la región (Fuente, Conabio 2015). Gracias a esta riqueza vegetal, en México alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (15% de la flora total) tienen propiedades medicinales, es decir, que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. En la literatura, se han descrito un número interesante de plantas como *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate), cuya función principal está enfocada al control de agentes terapéuticos para diversas infecciones, cánceres digestivos, enfermedades crónicas entre otras. Diversos autores han demostrado que el

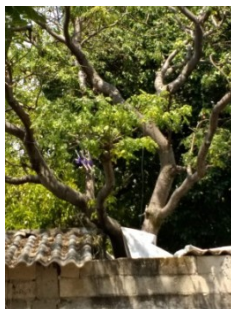
extracto crudo de *Amphipterygium adstringens* contiene compuestos químicos con actividad efectiva contra diversos malestares que aquejan al ser humano, que de acuerdo con los análisis fitoquímicos la presencia de compuestos del tipo triterpénicos y fenólicos son los compuestos principales.

2.2 Datos etnobotánicos del Cuachalalate.

Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlech. (Anacardiaceae) es conocido popularmente como chalalate, coachalalate, volador, cuachalalá o cuachinala y sinonimia botánica *Juliania adstringens* Schlechter (figura 1). Es un árbol "dioico" endémico de México, utilizado ampliamente en la medicina tradicional, comúnmente llamado cuachalalate. Se caracteriza por ser un árbol con alturas de seis y diez metros; su tronco es torcido y su corteza grisácea, escamosa y astringente (Argueta *et al.*, 1994). Se caracteriza por presentar inflorescencia, donde la planta masculina posee 8.6 cm de largo, con flor masculina actinomorfa (simetría radial o regular, polisimétrico o multilateral) y pedúnculo floral de 0.95 cm de longitud de 6-8 sépalos. La inflorescencia femenina es un racimo de aproximadamente 1.3 cm de longitud y contiene generalmente 2-4 flores, los pistilos se bifurcan, el estilo es cilíndrico y largo de 2-3 cm.



6.a)



b)



c)

Figura 1. a) Cuachalalate (hembra) de la zona de Huautla, en el Ejido el Limón, b) Cuachalalate (hembra) de la zona de Xoxocotla Mor, c) Recolección en la Sierra de Huautla Morelos, ejido Juchitán.

Su hábitat natural comprende la zona de Michoacán a Morelos, ciudad de México, Puebla, Oaxaca, y debido a las condiciones topográficas este árbol prefiere zonas que van de cálidas a templadas, ubicándose en los ecosistemas de bosque tropical caducifolio y semicaducifolio, matorral xerófilo, mesófilo de montaña y bosque espinoso (Argueta *et al.*, 1994).

Dentro de la Medicina Tradicional Mexicana, los pueblos prehispánicos le atribuían un efecto purificador, años después el cuachalalate ha sido utilizado en varios estados de la república. El cocimiento de la corteza también se ha utilizado para curar los granos y las llagas mediante la ingestión de la resina de la corteza. También se ha utilizado en golpes o postemas, mordeduras o piquetes de animales venenosos y como cicatrizante. Se emplea en malestares digestivos, dolor de estómago, infección o inflamación intestinal, para limpiar el estómago, para el hígado, vesícula, contra la tifoidea y en problemas del tipo bucal como estomatitis, dolor de muelas, endurecimiento de las encías y herpes (fuegos) bucales. En problemas relacionados con afecciones respiratorias, se utiliza para aliviar la tos, inflamación de anginas, enfermedades pulmonares, incluso para tratar a la tuberculosis. Se ha utilizado en problemas de circulación sanguínea, ayuda a purificar, desintoxicar y curar várices y úlceras varicosas. Otras aplicaciones medicinales son para fiebre, paludismo, caída del cabello y manchas en la piel (García, 1973). Esta especie también se ha reportado como anticancerosa, antipalúdica, astringente y para la fiebre tifoidea. Posteriormente, la Sociedad Farmacéutica de México la registró como astringente. Rzedowski, en 1987, reporta a esta especie de cuachalalate de manera desafortunada como una especie en peligro de extinción.

2.3 Clasificación taxonómica de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.

Reino: Plantae

División: *Magnoliophyta*

Orden: *Sapindales*

Familia: *Julianaceae*

Género: *Amphipterygium*

Especie: *A. adstringens*

2.4 Descripción geográfica.

Amphipterygium adstringens es endémico del centro y sur de México en los bosques de hoja caduca, generalmente se asocia con diversas especies de *Bursera* y *Pseudosmodium*; crece cerca de la montaña y en la costa del Pacífico, en la parte centro sur del Estado de Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Colima, Michoacán, Morelos, Estado de México, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (figura 1). Esta planta generalmente florece en verano, de junio a agosto, y tiende a fructificar

(frutos), de agosto a enero (figura 2). (Pennington *et al.*, 2005, http://ibugana.cucba.udg.mx/pdf/ibugana_13%281%29.pdf, Solares et al. 2002.).

Figura 2. Distribución de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) en México

2.5 Producción de Cuachalalate en México.

2.5.1 Antecedentes agronómicos de *Amphipterygium adstringens*.

Uno de los productos medicinales naturales de mayor frecuencia de consumo en la herbolaria mexicana y una de las especies arbóreas de mayor importancia de la selva baja caducifolia de México. *Amphipterygium adstringens* (*A. adstringen*) es un árbol de la cual principalmente la corteza de la planta se usa en la medicina tradicional. La población indígena y la medicina tradicional de México colecta esta especie en diferentes partes del país, siendo que el 90% del total del producto que se consume anualmente en México se obtiene o se abastece de la región integrada por Sierra de Huautla, Morelos, Mixteca Poblana y parte de la Cuenca del Balsas (Solares, 2009).

A la fecha en 2019, después de 18 años de investigación básica y aplicada por parte de INIFAP-Morelos (encaminada hacia la conservación y manejo de esta especie), se considera que la demanda de esta especie vegetal hasta ahora es insuficiente debido a que los compuestos

mayoritarios de interés farmacológico se han reportado que se encuentran en la corteza del árbol, por lo que los productores tienden a esperar varios años para que se obtenga esta materia prima. En Morelos, la zona, abastecedora de *Amphipterygium adstringens* se encuentra en la reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, que pertenece al municipio de Tlaquiltlenango (figura 3). Esta reserva, declarada en 1999, tiene una superficie de 59,331 ha., incluye la mayor superficie de selva baja caducifolia mejor conservada del estado y es la que mayor número de trabajo tiene en investigación básica (Solares y Gálvez, 2020).



Figura 3. Sierra de Huautla.

Cerca de cien productores están organizados en torno a la comercialización de este producto bajo una unidad de Manejo Ambiental Forestal (UMAFORSUR), que se registran como Cadena Productiva de Cuachalalate, que incluye 19 de las 21 comunidades rurales localizadas en esta reserva y que son: Huautla, Valle de Vázquez, Ajuchitlán, Chimalacatlán, Coaxintlán, Los Dormidos, Los Elotes, La Era, Huaxtla, Huixastla, Lorenzo Vázquez, La Mezquitera, Nexpa, Xicatlacotla, Quilamula, Rancho Viejo, San José de Pala, El Limón, Santiopan y Xochipala. Se estima una colecta anual de corteza de Cuachalalate de 22.5 toneladas. Cabe mencionar que los acopiadores compran ocho toneladas a \$5.00 pesos el kilogramo proveniente de la región de Morelos y Cuenca del Balsas. De esta cantidad, dos toneladas se venden a los exportadores, dos a los laboratorios naturistas y cuatro a empresas envasadoras. Los laboratorios naturistas procesan el cuachalalate y lo convierten en pastillas. Los laboratorios compran a \$100.00 pesos el kilogramo y lo venden a las tiendas naturistas a un equivalente de \$1,333.00 pesos el kilogramo. Las tiendas naturistas a su vez venden a los consumidores finales a un equivalente de \$1,600.00 pesos el kilogramo. En este canal tanto el margen mayor, tanto absoluto y relativo total, corresponden al laboratorio, ya que compran a \$100.00 pesos y venden a \$1,280.00 pesos por kilogramo.

2.5.2 Producción de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

La producción promedio de *Amphipterygium adstringens* en la zona de abastecimiento es de 40 a 50 árboles por hectárea, pero en algunas localidades como la Tigra, Rancho Viejo, en la Sierra de Huautla puede encontrarse hasta 110 árboles por hectárea (Soberanes y Boyás, 1991; Solares, 1995, 1999). Esto es muy importante porque permite calcular el volumen de corteza que se puede extraer por unidad de superficie. Pero también, es posible calcular la producción de un árbol, conociendo la composición de edades. Se debe tomar en cuenta que el grosor de la corteza está relacionado con la edad de los árboles y, por lo tanto, aquellos árboles menores de 15 cm de diámetro no deben ser descortezados, ya que no tienen una corteza madura y no tienen una densidad suficiente de canales resiníferos, por otra parte, su rendimiento en volumen de corteza es menor (Solares y Gálvez, 2002a). Con estas consideraciones, la producción máxima que se puede obtener en una hectárea depende de la densidad de arbolado y diámetro encontrados (Tabla 1).

Tabla 1. Producción máxima de corteza de *A. adstringens*.

Clase Diamétrica (CM)	Producción por árbol (kg)	Producción por hectárea (kg)
15-20	2.0	De 100 hasta 220
>20	4.0	De 200 hasta 440

La demanda que ha llegado a tener la corteza del cuachalalate en el extranjero va en aumento cada día, de 6-100 toneladas anuales. En el año 2002, se realizaron estudios científicos entre la Universidad Nacional Autónoma de México junto con el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS-Morelos) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agropecuarias y Pecuarias (INIFAP), para ratificar la potencialidad medicinal del cuachalalate, sin que para esta fecha (2020) se tenga una noticia favorable sobre una patente mexicana sobre estas investigaciones.

2.6 Fitoquímica del Cuachalalate.

Toda la investigación química sobre esta planta se ha hecho desde hace varias décadas a partir de la corteza del tallo, donde se han identificado los triterpenos ácidos 3-alfa y 3-epi-masticadienólico, isomasticadienólico y epi-oleanólico; los compuestos benzílicos ácidos 6-

heptadecil-, 6-nonadecil-, y 6-pentadecil- salicílico⁶; y el estero, beta-sitosterol. En la hoja se ha identificado el ácido cuachalálico, que es un triterpeno. De la corteza de esta planta se han aislado los triterpenos ácidos instipolinásico, oleanólico, masticadienónico y 3-alfa-hidroxi-masticadienónico, una mezcla de ácidos anacárdicos, y aldehídos fenólicos.

En los años de 1983 y 1987 se realizaron diversos estudios fitoquímicos de la corteza, encontrando un perfil químico triterpénico del tipo tirucalano, conformado por el ácido masticadienónico, el ácido instipolinásico y el ácido cuachalálico (Amezcu, 1983) (García, 1987) (Mata, 1989) (Figura 4).

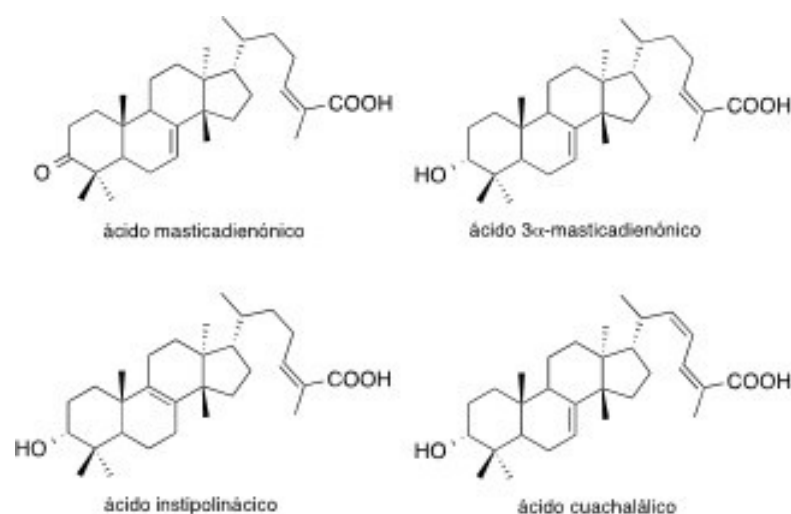


Figura 4. Perfil triterpénico de la corteza de *A. adstringens*.

Posteriormente, en 1989 Mata reportó el aislamiento del ácido 3-epihidroximasticadienoico, el ácido 3- α -hidroxi-masticadienónico, ácido epi-oleanólico, el ácido isomasticadienónico, β -sitosterol, así como, tres diferentes ácidos alquil-anacárdicos, tales como, el ácido 6-pentadecil-salicílico, el ácido 6heptadecil-salicílico y el ácido 6-nonadecil-salicílico (Mata, 1989) (Figura 5).

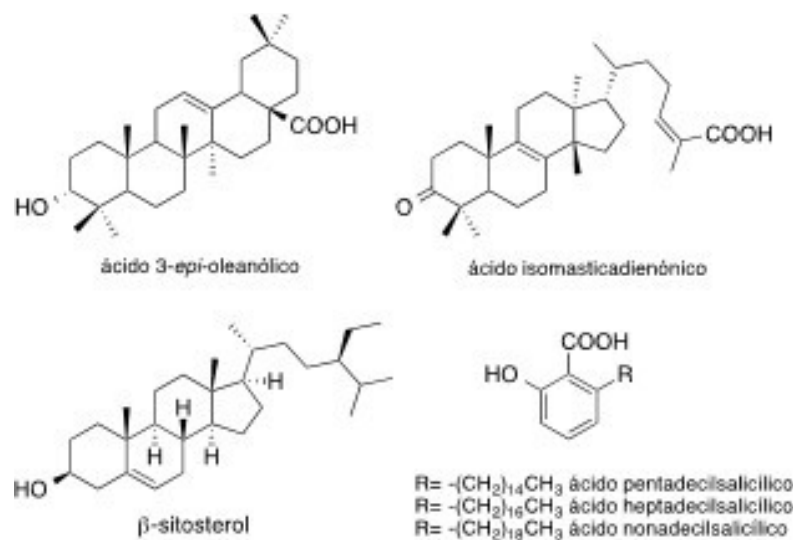


Figura 5. Metabolitos secundarios aislados de *A. adstringens*.

En 1991, el grupo de investigación de Mata y Navarrete reportaron los compuestos presentes del extracto hexánico, encontrando una mezcla de compuestos fenólicos de cadena alquílica larga (Figura 6).

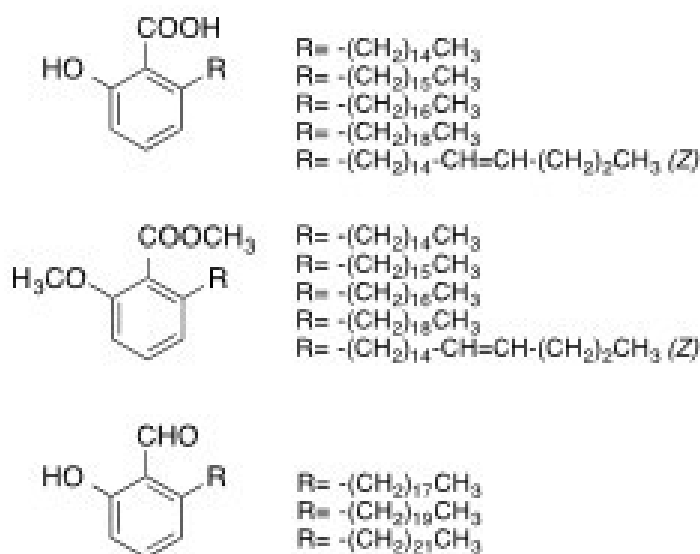


Figura 6. Compuestos alquilfenólicos aislados del extracto hexánico de *A. adstringens*.

Navarrete, en 1998, evaluó el extracto metanólico de la corteza de *A. adstringens* realizando la partición de dicho extracto, obteniendo tres extractos de diferentes polaridades, cloruro de metileno (CH_2Cl_2), acetato de etilo (EtOAC) y Acetona ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$). Posteriormente realizaron el fraccionamiento del extracto de CH_2Cl_2 mediante cromatografía en columna, obteniendo cuatro fracciones diferentes con un perfil químico del tipo triterpénico (Navarrete, 1998).

Posteriormente, en 1999, Soto-Hernández reportó el estudio fitoquímico del cuachalalate, tomando en cuenta factores como la estación y el sexo de la especie. En dicho proyecto, se colectó la corteza de cuatro árboles en diferentes estaciones del año, así como de diferente sexo. Cada una de las muestras se dejó secar y se les realizó una extracción con hexano. Posteriormente, cada extracto se sometió a una separación cromatográfica en mezclas de Hexano:Acetato de Etilo como eluyente, de manera general, de cada uno de los extractos se aislaron los siguientes compuestos: el ácido masticadienónico, el ácido α -hidroximasticadienónico, la mezcla de los ácidos masticadienónico e isomasticadienónico y otra mezcla del ácido hidroximasticadienónico con un compuesto hasta ahora desconocido. De los resultados obtenidos se realizó una comparación sobre la concentración de los compuestos aislados y el sexo de la especie, así como de la concentración de los compuestos con la época de año, encontrando que el ácido masticadienónico, el ácido α -hidroximasticadienónico y la mezcla de los ácidos masticadienónico e isomasticadienónico se encuentran en mayor proporción en plantas femeninas y solo la mezcla de ácido hidroximasticadienónico con el compuesto desconocido, predominaron en plantas masculinas (Soto-Hernández, 1999).

Con respecto a la relación de la abundancia de los metabolitos secundarios con la estación del año, se encontró que en el mes de febrero la concentración mayoritaria es del ácido masticadienónico y de la mezcla del ácido α -hidroximasticadienónico con el compuesto desconocido. Por otro lado, en el mes de noviembre la acumulación de la mezcla de los ácidos masticadienónico e isomasticadienónico es mayoritaria.

Con base en los usos de esta especie dentro de la medicina tradicional, así como de la actividad biológica que presentan los derivados del ácido masticadienónico, es de gran interés contar con información precisa para saber cuál es la mejor época del año para poder colectar la especie, y contar con la mejor concentración de los compuestos con respecto al sexo de la especie vegetal.

En el año 2003, Navarrete y su grupo de colaboradores siguieron la línea de investigación descrita previamente por Soto Hernández en 1999. Continuando con el estudio de la fracción activa del extracto diclorometánico de la corteza, realizaron la separación cromatográfica de los metabolitos secundarios presentes, logrando aislar el ácido masticadienónico, el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, β -sitosterol y el ácido 3epi-oleanólico.

2.7 Usos de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) en la salud humana.

El cuachalalate es de gran importancia como medicamento para los pueblos que habitan tradicionalmente los lugares donde se desarrolla y la parte que se ha encontrado más provechosa es la corteza: su empleo principalmente en forma de cocimiento permite la curación de un sinnúmero de trastornos y malestares. Según Francisco Hernández en el siglo XVI (citado por Argueta *et al.*, 1994) "la corteza es fría y secante, disuelve los tumores machacada y aplicada", los pueblos indígenas la utilizan principalmente para el trato de afecciones cutáneas, gastrointestinales, genitales, respiratorias y cancerígenas (Argueta *et al.*, 1994). Es usado comúnmente para atender heridas, rozaduras, golpes y piquetes de moscos. Se emplea por aplicación directa de la maceración o la infusión de corteza, incluso las afecciones cutáneas se pueden curar, aunque sean relativamente antiguas. También contribuye a eliminar dolores estomacales e infecciones intestinales; buen funcionamiento del hígado, vesícula, salud bucal y erradicación de la tifoidea.

En el caso de Morelos, se usa la corteza cocida antes de cada comida, junto con árnica (*Heterotbea inuloides* Cass) y restricciones dietéticas para prevenir y tratar las enfermedades (Mata *et al.*, 1994). Es usado en afecciones de inflamación del órgano sexual femenino y es útil cuando se trata el flujo o granos vaginales, así como la enfermedad de las mujeres púerperas: el cachán (frio vaginal). También se han reportado en el tratamiento de enfermedades respiratorias como tos, amigdalitis, gripe y tuberculosis. Los pueblos indígenas consideraban al cuachalalate como purificador, principalmente por las propiedades que tiene la corteza que se utiliza para tratar úlceras, cáncer de estómago, gastritis y ciertas lesiones cutáneas. Por otra parte, se emplea en malestares digestivos, dolor de estómago, infección o inflamación intestinal, para limpiar el estómago, el hígado, vesícula, contra la tifoidea y en problemas del tipo bucal como estomatitis, dolor de muelas, endurecimiento de las encías y herpes (fuegos) bucales. También se reporta para tratar problemas de circulación (várices, intoxicaciones, úlceras varicosas), enfermedades renales

(dolor e inflamación), de cintura, cabeza, pulmones, hernia, reuma y punzadas (es un analgésico); fiebre, paludismo, manchas epiteliales, gangrena y diabetes. Actualmente se ha reportado en el tratamiento cáncer de estómago, ya que esta reportada su relación del triterpeno ácido 3 α -hidroxi-masticadienónico en el control del cáncer de estómago o adenocarcinoma, lo cual puede representar una nueva alternativa en la elaboración de fármacos (Olivera-Ortega et al., 1999; Solares, 2009).

En problemas relacionados con afecciones respiratorias, se utiliza para aliviar la tos, inflamación de anginas, enfermedades pulmonares, incluso para tratar a la tuberculosis. En algunos casos, se utiliza en problemas de circulación sanguínea, ayuda a purificar, desintoxicar y curar várices y úlceras varicosas. Otras aplicaciones medicinales son para fiebre, paludismo, caída del cabello y manchas en la piel. (García, 1973). En los años 1986 y 1987, Navarrete y Soriano describen la actividad de la corteza de cuachalalate, la cual presenta actividad hipocolesterolémica, relacionado a la presencia de los compuestos fenólicos en el extracto hexánico. Mientras que Solares (1995) reportó las propiedades del ácido masticadienónico el cual está relacionado con la actividad anticancerígena y el ácido 3 α -hidroxi-masticadienónico con una eficiencia del 80% en el control de cáncer estomacal. En la tabla 2 se reportan algunas de las acciones farmacológicas de *A. adstringens* extraídas de la corteza del árbol.

Tabla 2. Acción farmacológica de *A. adstringens*.

AUTOR/AÑO	PRINCIPIO ACTIVO	ACCIÓN FARMACOLÓGICA	TIPO DE EXTRACCIÓN	ÓRGANO
Sociedad farmacéutica de México/1952		Antitumoral y adstringente	Acuosa	Corteza
Méndez/1954	Taninos/fenólicos	Cáncer estomacal	Acuosa	Corteza
Martínez/1969		Antitumoral y adstringente	Acuosa	Corteza
Díaz/1976		Anticanceroso y antitumoral	Acuosa	Corteza
Cortés/1979		Cáncer estomacal	Acuosa	Corteza
Argueta/1984		Antitumoral y anticancerígeno	Metanólico vía intramuscular en ratón	Corteza
Navarrete/1986 Soriano/1987	Triterpenos	Anticancerígeno		Corteza
Watson/1987	Triterpenos	Antiulcerosa En ratas		
García/1992		Anticancerígeno	Acuosa	Corteza
APMTM (UNAM) 1994		Antiulceroso, inhibe la producción de jugo gástrico, cicatrización del epitelio y mucosa gástrica.	Acuosa Y Acetato De Etilo	Corteza
Carretero/2000	Taninos	Astringente vasoconstrictor	Acuosa	Corteza

2.8 Cultivo *in vitro*.

El cultivo de tejidos vegetales es el conjunto de técnicas en las que un explante (semilla, órgano, tejido o célula) se inocula asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones controladas (Rosas, 2007). El cultivo de células y tejidos vegetales ha otorgado líneas celulares libres de virus, nuevos germoplasmas, sistemas de propagación clonal y la introducción de especies de plantas difíciles de propagar. El cultivo *in vitro* requiere principalmente de los fitorreguladores de crecimiento para ejercer efectos importantes como regular la iniciación y desarrollo de brotes y raíces sobre explantes y embriones en medios de cultivo semisólido o líquido.

Existen cinco principales grupos de fitorreguladores endógenos: auxinas, citocinas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Muchos de estos grupos tienen múltiples roles en el crecimiento y desarrollo de plantas, y son muy usadas para la manipulación de plantas en el cultivo de tejidos. Todos ellos pueden ser divididos en tres grupos: auxinas, citocinas y giberelinas.

Las plantas generalmente producen o acumulan cantidades muy bajas de los metabolitos químicos de interés, por lo que, grandes cantidades de material vegetal son necesarias para obtener sus moléculas bioactiva (Espinosa-Leal, *et al.* 2018). En este sentido, las técnicas de cultivos *in vitro* de tejidos vegetales pueden ser utilizadas como una alternativa biotecnológica en la mayoría de las especies vegetales y ser útiles para superar estos problemas, logrando la preservación de la especie utilizada y en muchos casos favoreciendo la producción de metabolitos de interés de una manera controlada y aséptica, evitando variaciones presentes en la planta silvestre (Domínguez, 2015). Esta técnica tiene la ventaja de poder ser aplicada a la mayoría de las especies superiores, además de resultar útil en el estudio de plantas que se encuentran en peligro de extinción o que tiene un crecimiento muy lento, por lo que se requiere un método de propagación más eficiente (Domínguez, 2015). Este tipo de cultivo tiene diversas ventajas como permitir la inducción de cualquier cultivo independientemente de donde se localice geográfica y estacionalmente, mantiene el cultivo libre de plagas y enfermedades. Además de ayudar al cultivo de especies en peligro de extinción (Sampayo-Maldonado, *et al.* 2018), genera una producción ininterrumpida en calidad y rendimiento con ciclos de crecimiento muy cortos (Espinosa-Leal, *et al.* 2018). También se puede producir una gran cantidad de biomasa, partiendo de una pequeña cantidad de tejido en comparación con otras estrategias potenciales, especialmente para la producción de compuestos con estructuras complejas, siendo utilizada en la actualidad para la producción de metabolitos secundarios a gran escala (Bourgau, *et al.* 2001; Ramachandra y Ravishankar, 2002; Ochoa-Villareal *et al.* 2016; Recto, 2018), permitiendo su aplicación directa en el comercio y la investigación en diversas áreas de la biología (Smetanska, 2008). Actualmente no se han reportado cultivos *in vitro* de *A. adstringens* productores de compuestos químicos de triterpenos de interés, a pesar de ser una planta tan importante en el uso de la medicina tradicional.

Por lo anterior en la presente propuesta de investigación plantea realizar el perfil químico de diferentes partes del árbol de *A. adstringens* y el establecimiento de cultivos de células

desdiferenciadas de *A. adstringens* a partir de la generación de callo friable como posible fuente de producción de metabolitos secundarios con interés farmacológico.

3 JUSTIFICACION.

Derivado del gran potencial que presenta *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) y la producción de sus compuestos químicos activos contra una serie de enfermedades en beneficio de la salud humana, hace que se sitúe como un recurso con alto potencial en el campo industrial y farmacéutico. Sin embargo, es necesario lograr una producción satisfactoria, constante y homogénea de estos compuestos químicos de interés farmacológico. A pesar de que existe una gran cantidad de estudios químicos de esta especie vegetal, es interesante analizar si actualmente bajo las condiciones del cambio climático a los que nos enfrentamos la planta mantiene el mismo patrón de producción de estos compuestos químicos. En el estado de Morelos se cuenta con varios municipios productores del cuachalalate, los cuales reportan una gran producción de esta materia prima (22.5 toneladas por año, según lo informo SEMARNAT e Inifap en 2011), sin embargo el precio que paga el consumidor por las farmacéuticas es muy bajo. Es por esto que se hace relevante definir la presencia de los principales metabolitos activos en estas plantas, con el objetivo de incrementar su valor agregado. Además, es importante investigar otras alternativas para la obtención de los metabolitos activos, no solo la corteza del árbol, sino también de otras partes aéreas de la planta (como hoja y tallo de hoja (Pecíolo), lo que evitaría esperar largos periodos de tiempo para el descortezamiento del árbol o su tala indiscriminada.

En este proyecto se plantea trabajar con plantas de cuachalalate generadas por los productores en Morelos y analizar la producción de los compuestos químicos con alto valor agregado, con el interés de generar herramientas biotecnológicas y desarrollar un producto con interés farmacéutico. Derivado de los tiempos tan largos para esperar a generación de la corteza de *A. adstringens* es necesario buscar nuevas estrategias biotecnológicas de producción de esta especie vegetal que permitan la producción de compuestos químicos de interés farmacológico.

4 HIPÓTESIS.

El análisis fitoquímico de *A. adstringens* y el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* permitirán identificar y obtener metabolitos secundarios del tipo fenólico de cadena alquílica con alto potencial farmacéutico.

5 OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Aislar e identificar derivados fenólicos de cadena alquílica (ácidos anacárdicos) presentes en partes aéreas *Amphipterygium adstringens*, así como establecer cultivos de células desdiferenciadas (callos) con alta proliferación celular, para la producción de metabolitos secundarios con potencial en la salud humana.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtener un extracto etanólico de *A. adstringens* (hojas, Pecíolo, meristemo (chico y grande), fruto (verde y seco), corteza, polen).
- Aislar e identificar los ácidos anacárdicos presentes en el extracto etanólico de las partes aéreas de *Amphipterygium adstringens*.
- Establecer cultivos de callo a partir de hoja de *A. adstringens* con la adición de reguladores de crecimiento vegetal.
- Identificar los ácidos anacárdicos que se generan a partir de cultivos *in vitro* de *A. adstringens* (callos) presentes en el extracto etanólico.

6 DIAGRAMA EXPERIMENTAL.

6.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO.

6.1.1 Colecta de *A. adstringens*.

Para realizar los estudios fitoquímicos de *A. adstringens*, las muestras se colectaron en poblaciones de Xoxocotla Morelos (hojas, tallo, flor polen, corteza) y en Puebla, donde solo se recolectó la corteza (tabla 3). Para la colecta del material se consideró el tamaño del árbol y el sexo. Las muestras de la colecta se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se trituró y molió hasta obtener un polvo, para proceder a su maceración en diferentes disolventes químicos, como se muestra en la tabla 4. El solvente de extracción fue etanol/agua (7:3), a una relación de 1 ml de disolvente por 3g de planta molida.

Tabla 3. Colecta de *A. adstringens*.

Lugares de colecta de la planta	Parte de la planta	Cantidad de la planta	Cantidad del extracto
Xoxocotla Morelos (árbol macho)	Partes aéreas y terrestres	500 gramos de Cada una	50 gramos de Cada una
Puebla (árbol hembra)	Sólo corteza	500 gramos	150 gramos

Tabla 4. Extracción etílica en una dilución de alcohol/agua 70:30.

No. de muestras	Extracción	Zona	Tipo de Explante
1	Acuoso	Xoxocotla	Corteza
2	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Hoja
3	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Meristemo
4	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Meristemo Grande
5	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Fruto Seco
6	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Pecíolo
7	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Corteza
8	etanol/agua 70:30	Puebla	Corteza
9	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Fruto Verde
10	etanol/agua 70:30	Xoxocotla	Hoja/Corteza

Una vez realizado el macerado se procedió a realizar un análisis por cromatografía en capa fina de las diez muestras del árbol macho de Xoxocotla Morelos y el árbol hembra del estado de Puebla.

Se procedió a comparar los diferentes perfiles que presentaba cada una de las muestras colectadas de elución de los metabolitos presentes en los diferentes extractos, tanto acuoso (EA), como etanólico (EE), de un árbol macho del municipio de Xoxocotla Morelos y de un árbol hembra del Estado de Puebla; utilizando para este fin la fase de elución de acetato de etilo/ hexano (25:75), en placas de sílica tipo G/UV254, 0.2 mm, en soporte de hoja de aluminio.

6.2 Métodos cromatográficos.

6.2.1 Análisis de triterpenos por Cromatografía en Placa Fina (CCF).

En el análisis se fue tomando como referencia el artículo realizado por Saenab *et al.* (2017), donde ellos usaron un sistema cromatográfico compuesto de una placa de TLC de

10x10 cm de gel de sílice 60 F254 y como eluyente una solución de éter dietílico (30)+ éter de petróleo (70) + ácido fórmico (1), siendo que nosotros empleamos una corrida cromatográfica con la fase móvil compuesta por hexano (70) + éter dietílico (30) + ácido fórmico (1). Saenab y colaboradores (2017) reportaron la presencia de diferentes tipos de ácidos anacárdicos con los Rf's de 0.2, 0.37 y 0.53, y utilizaron como revelador una solución de ácido fosfomolibdicdato (0.25 g disuelto en 10 ml de etanol) y posteriormente la placa fue expuesta a una temperatura de 105°C durante 15 min.

6.3 Purificación de terpenos por cromatografía en columna abierta.

Para realizar la purificación de los compuestos se realizó inicialmente una serie de cromatografías a columna abierta, empleando una columna de vidrio de 60 cm de largo por 1.5 cm de ancho, empacada con sílice 60 (Merck) con un tamaño de partícula de 40-60 µm y un sistema de elución recomendado por Saenab y colaboradores (2017), que consiste en hexano, éter dietílico, ácido fórmico en una proporción de 70:30:1, y de esta forma lograr aislar estos compuestos de interés. Cabe señalar que trabajar con hexano es sumamente complicado debido a su alto grado de volatilidad, teniendo que mantener compacta la sílica dentro de la columna mediante compresión con una bomba de aire para evitar agrietamiento.

6.4 Análisis de triterpenos por Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Para identificar y cuantificar los compuestos se utilizó un equipo de cromatografía líquida de Alta Presión (CLAP o HPLC). El equipo es de la marca Waters, (Millipore Corp, Waters Chromagrophy División, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de distribución de disolventes (bomba 600), un detector de UV con arreglo de diodos (410), un inyector automático (717) y un procesador de datos (Millenium 2000). Se utilizó un sistema de fase reversa en una columna C₁₈ analítica (Waters:

18

3.9 x 150 mm, 5 µm), con una fase móvil compuesta por acetonitrilo: agua (70:30) y a una absorbancia de 230 nm.

7 CULTIVO *IN VITRO*.

7.1 Material biológico.

El material vegetal que se utilizó para el cultivo *in vitro* de *A. adstringens* fue a partir de partes aéreas (hoja y Pecíolo) de los árboles colectados en Xoxocotla Morelos, Ejido de Juchitán de la Sierra de Huautla y cultivados en los viveros del Campo Experimental de Zacatepec. Las muestras fueron colectadas en el mes de junio de 2019, cuyas características y condiciones de su medio ambiente son muy diferentes.

7.2 Método de desinfección de explantes de *A. adstringens*.

Para la desinfección de explantes de *A. adstringens* se llevó a cabo como se muestra en el siguiente protocolo (Tabla 5):

Tabla 5. Protocolo de desinfección de explantes de *A. adstringens*.

Lavado No.	Tratamiento	Tiempo (min)
2	Agua estéril	5
2	Etanol al 70%	10
2	Agua estéril	2
1	Hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 20%	11
1	Hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 10%	5
2	Agua estéril	1

Este protocolo se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar (marca VECO). Se colocaron de 5 a 10 tejidos (hojas, Pecíolo) en frascos tipo tarro con 25 ml de medio basal MS. Los frascos fueron depositados en un cuarto de cultivo a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad y oscuridad total por un periodo de 15 días y posteriormente se colocaron en agitación suave durante 2 min en un frasco con agua mQ adicionado con el antibiótico cefotaxime (2 mg/L).

7.3 Medio para la inducción de callogénesis.

El medio de cultivo que se utilizó para inducir los callos de *A. adstringens* fue MS (Murashige y Skoog, 1962), y B5 (Gamborg *et al.*,1968) adicionado con 30g de sacarosa, 3g/L PVP y los fitorreguladores de crecimiento (2,4-D y cinetina (2mg/L), pH 5.7 y phytigel® (3.5 g/L) posteriormente se esterizaron por 15 minutos a 121°C y 15 psi. El medio de cultivo esterilizado se vertió a tarros de 100 ml con un volumen de trabajo de 25 ml de medio de cultivo. Una vez solidificado el medio de cultivo se colocaron 5 explantes desinfectados en cada frasco. La incubación fue por 30 días a temperatura de 25°C en luz constante y oscuridad total, tabla 6. El experimento se realizó con 3 repeticiones para cada tratamiento (tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos para la inducción de callogénesis de *A. adstringens*.

Tratamiento	Regulador de crecimiento		medio de cultivo	
	Cinetina + 2,4-D (4 mg/L)	Cinetina + 2,4-D (2 mg/L)	MS	B5
Oscuridad	*	*	*	*
Luz Constante	*	*	*	*
Fotoperiodo	*	*	*	*

*Se realizó el tratamiento en esas condiciones.

7.4 Viabilidad celular de *A. adstringens*.

La viabilidad celular se determinó de manera indirecta a través de la integridad de la membrana, utilizando la técnica de diacetato de fluoresceína (DAF) (Wildholm, 1972). Para preparar la solución, se pesaron 5 mg de DAF y se disolvieron en 1 mL de acetona, almacenándose a 4°C. Una alícuota de 0.1 mL del stock se adiciono a 5 mL de agua desionizada. Posteriormente, se tomaron 50 µL de esta última dilución y se mezcló con una muestra de callo o en 500 µL para suspensión celular, se dejó reposar por 1 min, después se tomaron 50 µL y se colocó en un portaobjetos para ser observada al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF).

7.5 Cromatografía en capa fina de los compuestos presentes en los callos de *A. adstringens*.

Para determinar si los callos generados producían alguno de los compuestos de interés, se realizó un análisis cromatográfico en capa fina. Se preparó un extracto de los callos generados *in vitro* mediante maceración en etanol/agua (70/30) por una semana. El filtrado se concentró para la obtención del extracto crudo que posteriormente se analizaron por CCF como anteriormente se describió en el punto 6.2.1.

8 RESULTADOS.

8.1 Colecta de *A. adstringens*.

Las muestras de *A. adstringens* fueron colectadas en las poblaciones de Xoxocotla y Sierra de Huautla en el ejido de Juchitán del estado de Morelos. Se colectaron partes aéreas de los árboles: hojas, Pecíolo, corteza, meristemo pequeño, meristemo grande, fruto verde y fruto seco, las colectas se de la Sierra de Huautla fueron tomadas de árbol macho y hembra. Para realizar un comparativo de compuestos presentes en corteza, se comparó con árboles colectados del estado de Puebla donde solo se colectó corteza como se muestra en la tabla 7. Una vez secadas las muestras se trituraron hasta obtener un polvo muy fino y fueron maceradas para realizar la extracción de los compuestos presentes en todas las muestras.

Tabla 7. Colecta de *A. adstringens*.

Lugares de colecta de la planta	Parte de la planta	Cantidad de la planta
Xoxocotla Morelos (árbol macho)	Partes aéreas y terrestres	500 gramos de cada muestra vegetal
Puebla (árbol hembra)	Sólo corteza	500 gramos
Sierra de Huautla Ejido Juchitán (árbol hembra)	Partes aéreas y terrestres	500 gramos de cada muestra vegetal
Sierra de Huautla Ejido Juchitán (árbol macho)	Partes aéreas y terrestres	500 gramos de cada muestra vegetal

8.2 Análisis de los extractos crudos por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Con el objetivo de analizar el perfil químico en las muestras colectadas del árbol de *A. adstringens*, de las muestras de Xoxocotla Morelos, Sierra de Huautla y del estado de Puebla, se realizó la extracción de los compuestos químicos en alcohol etílico (70:30) y se analizaron por cromatografía en capa fina. Como se puede observar en la figura 7, el perfil cromatográfico de las muestras colectadas son semejantes. Sin embargo, fue necesario repetir este análisis para lograr una mejor separación de los compuestos químicos utilizando el equipo automatizado de CCF CAMAG, para observar más finamente la separación de los compuestos (figura 8), donde observamos un comportamiento de bandas totalmente diferente, con el empleo del sistema de elución hexano: acetato de etilo (75:25). Uno de los compuestos químicos más importantes reportados en

8.2.1 Purificación de los compuestos de interés de las muestras colectadas del árbol de Cuachalalate de hoja, meristemos, fruto seco y Pecíolo de Xoxocotla. Análisis por cromatografía de capa fina preparativa.

De acuerdo al primer análisis, se decidió trabajar inicialmente con las muestras de del árbol de cuachalalate con de hoja, meristemos, fruto seco y Pecíolo de Xoxocotla, para lograr el fraccionamiento cromatográfico de un compuesto presente en estos extractos con un R_f 0.54, a través de cromatoplasmas preparativas, con una fase móvil de hexano:acetato de etilo y hexano (75:25). Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 9, en el panel A, donde se logró obtener la banda con el mismo R_f 0.54 de los extractos de hoja, meristemos, fruto seco, que de acuerdo con lo reportado por Navarrete 1986, Soriano 1987, Mata 1991, Solares 1995, podría tratarse de un derivado del ácido anacárdico. Debido a los bajos rendimientos, menores a 1 mg, se procedió a obtener una cantidad mayor del compuesto a través de la cromatografía en columna abierta.

Con respecto a la purificación de los compuestos de Pecíolo se logró obtener una fracción enriquecida del compuesto con $R_f = 0.25$ (Fig 9, panel B). Debido también al bajo rendimiento obtenido se decidió purificarlo por columna abierta.

a)

1 2 3

Figura 9. a) Cromatografía en capa fina de los compuestos puros de los aislados de las diferentes partes del árbol de cuachalalate de Xoxocotla, panel a) 1. hoja, 2. Meristemos, 3). Fruto seco de Xoxocotla y utilizando una fase móvil de acetato de etilo y hexano (25:75) para realizar su separación b) compuestos obtenidos de la separación en cromatoplasma a partir del extracto de Pecíolo.

Purificación por cromatografía en columna abierta de compuestos presentes en el Pecíolos.

Con el fin de obtener una mayor cantidad de los compuestos de Pecíolo con $R_f = 0.25$ y 0.54 y realizar su purificación, se procedió a coleccionar muestras de Cuachalalate de Xoxocotla y Sierra de Huautla, ambos de Morelos. En Sierra de Huautla se coleccionaron muestras de 2 árboles: una hembra y el otro macho (presencia de polen). Considerando que el perfil químico de producción pudiera ser diferente, se realizó un perfil cromatográfico en capa fina, y como se puede observar en la figura 10, el árbol coleccionado de Xoxocotla y Sierra de Huautla hembra producen los mismos compuestos mayoritarios, mientras que en el árbol macho solo se pudo observar un solo compuesto ($R_f = 0.25$)

➡ 0.5

➡ 0.25

Figura 10. Cromatografía en capa fina: comparación del perfil químico entre extractos de tallos de hoja provenientes de tres árboles diferentes: 1) Pecíolo de Xoxocotla (hembra), 2) Pecíolo de Sierra de Huautla (macho) 3). Pecíolo de Sierra de Huautla (hembra). En un sistema de (hexano:acetato de etilo (75:25)).

La producción de compuestos generados a partir de Pecíolo muestra un perfil interesante de acuerdo con la cantidad extraída de los árboles coleccionados en Xoxocotla (hembra), por lo que se procedió a realizar su purificación en columna abierta. Después de realizar un fraccionamiento cromatográfico del extracto de (10g de extracto crudo de Pecíolo) en sílica con una fase móvil constituida por hexano, éter dietílico, ácido fórmico en una proporción de 70:30:1, se logró obtener 21 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina (figura 11). En este experimento se logró aislar dos compuestos con R_f s 0.25 y 0.5 (figura 12).

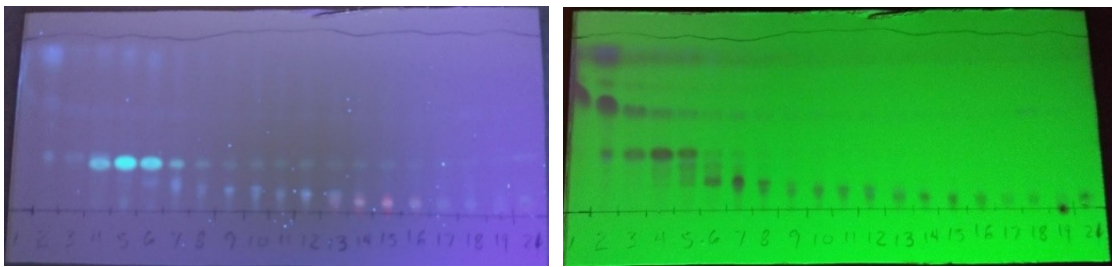


Figura 11. Perfil cromatográfico en capa fina, donde se muestran los compuestos del perfil químico obtenidos del fraccionamiento de la biomasa de los tallos de hoja de la Sierra de Huautla. Sistema de elución en sílica: hexano: éter etílico y ácido fórmico (70:30:1). Detección en luz ultravioleta a 315 nm y 280 nm

0.5 0.5

0.25

0.2

5

1 2 3

Figura 12. Perfil cromatográfico en capa fina de los compuestos puros de tallos de hoja de la Sierra de Huautla. Sistema de elución en sílica: hexano: éter etílico y ácido fórmico (70:30:1). Detección en luz ultravioleta a 315 nm.

Durante el secado de las muestras fraccionadas se observó que en las fracciones 6, 7 y 8 se formaron cristales, destacando que la fracción del vial 7 fue donde se obtuvo mayor rendimiento (0.046 g) de un compuesto en la forma de cristales (figura 13 a). A la fracción 7, se realizó un estudio de punto de fusión para determinar su identidad química. La prueba consistió en someter 2mg del cristal a un calentamiento de 25°C a 102°C, donde se observó que al 95°C inició el punto de fusión y a 110°C (figura 13 b). Estos resultados indican que el compuesto podría tratarse de un

derivado del ácido anacárdico, ya que según la base de datos PubChem (2020) el punto de fusión de los ácidos anacárdicos varían de 92°C a 93°C.

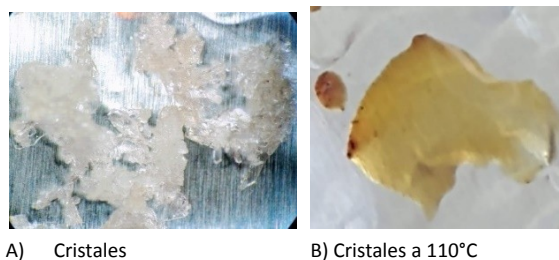


Figura 13. Punto de fusión de los cristales procedentes de los compuestos aislados de Pecíolo del Cuachalalate 25°C a 102°C.

8.3 Análisis Comparativo por HPLC de las partes aéreas de Cuachalalate de la zona de Xoxocotla Morelos.

Una vez analizado el perfil cromatográfico en capa fina y aislados 2 de los compuestos mayoritarios en las muestras colectadas, se decidió realizar un estudio comparativo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de los extractos completos, de las partes aéreas del Cuachalalate colectadas en Xoxocotla Morelos. Las muestras estudiadas fueron: 1) Corteza, 2) Hoja, 3) Meristemo, 4) Meristemo Grande., 5) Fruto Seco, 6) Pecíolo, 7) Corteza, 8) Corteza, de Puebla 9) Fruto Verde y 10) mezcla de hoja: corteza (50:50). El análisis comparativo de los cromatogramas obtenidos en HPLC, utilizando una columna C-18 y una fase móvil de acetonitrilo: agua (70:30), con detección a 230 nm, se observa la presencia de un compuesto mayoritario al minuto de 17.2 de la corrida en todas las partes aéreas analizadas del árbol del cuachalalate, como se muestra en la Figura 14.

Figura 14. Perfil cromatográfico por HPLC de Cuachalalate (hembra) de la zona de corteza de Puebla y Xoxocotla Morelos y 1) Corteza-acuosa puebla, 2) Hoja, 3) Meristemo, 4) Meristemo Grande., 5) Fruto Seco, 6) Pecíolo, 7) Corteza, 8) Corteza, de puebla 9) -Fruto Verde y 10) Mezcla de hoja corteza (50:50). Se registra un pico en común a los 17.2 min. Sistema cromatográfico: acetonitrilo: agua (70:30), columna C-18, absorbancia de 230 nm.

Los cromatogramas obtenidos anteriormente se sometieron al programa INKSCAPE Vector Graphics Editor (figura 15), el cual empalma las corridas cromatográficas para una mejor comparación de los picos presentes en las muestras analizadas, mostrando que la mayoría de las muestras posee un pico mayoritario que migra a los 17.2 min, que se encuentra en todas las partes aéreas del Cuachalalate. Lo interesante de esta comparación es que no existe ningún reporte científico bibliográfico que se mencione que todas las partes de la planta contiene este compuesto químico, por lo que es interesante saber su estructura química.

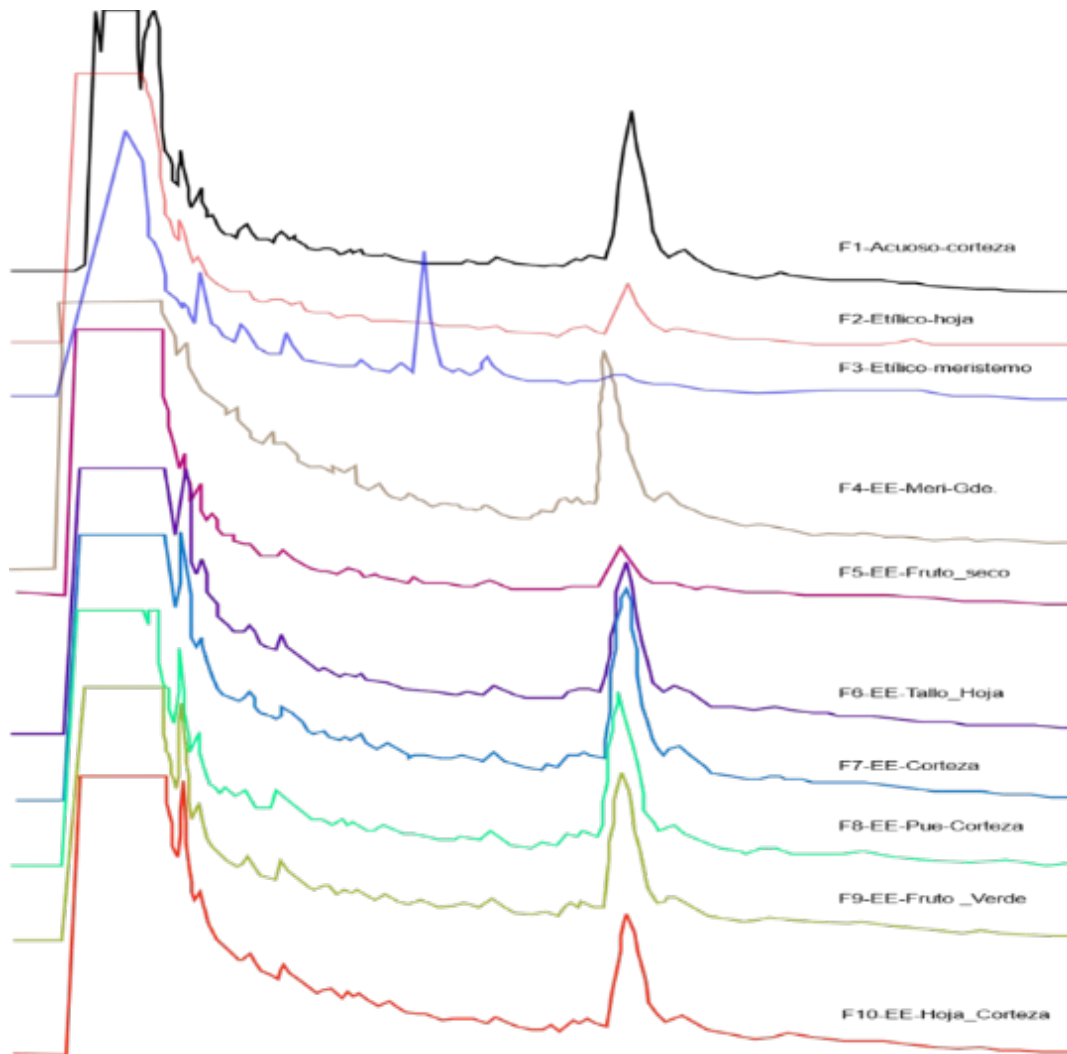


Figura 15. Comparación cromatográfica en HPLC de las diez muestras de las partes aéreas de Cuachalalate (hembra) de la zona de Xoxocotla Morelos: 1) Corteza-acuosa, 2) Hoja, 3) Meristemo, 4) Meristemo Grande., 5) Fruto Seco, 6) Pecíolo, 7) Corteza, 8) Corteza, de puebla 9) -Fruto Verde y 10) Mezcla de hoja corteza (50:50), con tiempo de retención de 17.2 min. Sistema: Acetonitrilo: agua (70:30), columna C-18, absorbancia de 230 nm.

8.4 Identificación del compuesto químico con el punto de referencia de $R_f = 0.25$ mediante cromatografía en gases masas.

Después de que haber realizado la extracción etílica y purificación del compuesto con $R_f = 0.25$ mayoritario de Pecíolo, de la Sierra de Huautla (figura16), se logró la obtención de un precipitado en la forma de cristales, que se sometió a un estudio de gases-masas en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ-LANEM), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

0.5

0.25

Figura 16. Perfil cromatográfico en capa fina de los compuestos puros de tallos de hoja de la Sierra de Huautla, mostrando el compuesto de color fosforescente con un punto de referencia de 0.25, que se analizó por gases-masas. Carril 1: Pecíolo Xoxotla (hembra) ; carril 2: Pecíolo Sierra de Huautla (macho); carril 3: Pecíolo Sierra de Huautla (hembra). Fase móvil compuesta por hexano: éter etílico y ac. fórmico (70:30:1) y visualización bajo luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos del análisis por cromatografía de gases-masas del compuesto con Rf 0.25 mostraron que existe la presencia de un pico en el minuto 43.63 que corresponde a un ácido anacárdico (Fig. 17). Este compuesto presentó un valor de masa de 316 M/z, correspondiente a un compuesto con fórmula [M-H] de un derivado del ácido anacárdico de 13 carbonos (Fig. 18 y 19). El análisis mostró que la concentración de compuestos del ácido anacárdico de 13 carbonos y 3 insaturaciones, frente a los demás compuestos volátiles presentes en la muestra analizada fue del 39.2%.



Figura 17: Cromatograma del análisis de gases-masas del compuesto con Rf 0.25, que corresponde al pico más abundante con Tr 43.63 min.

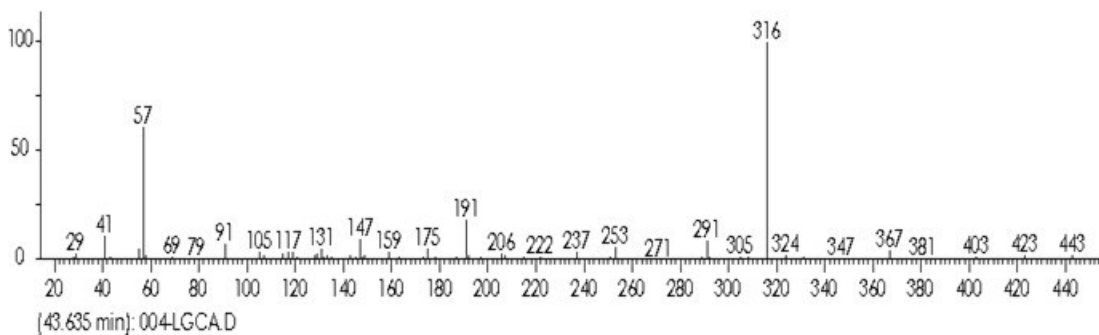


Figura 18: Espectro de masas del compuesto con Tr 43.63 min (compuesto con Rf 0.25) obtenido en el análisis de cromatografía de gases.

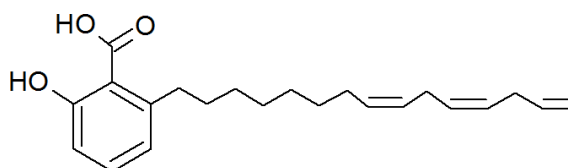


Figura 19. Estructura química propuesta para el compuesto con Tr 0.25 en CCF, un derivado del ácido anacárdico de 13 carbonos.

Esta propuesta estructural para el ácido anacárdico del tipo C13 se realizaron sobre la base de la señales del ion molecular m/z 315. Cabe mencionar que este resultado respalda los estudios de CCF, donde la muestra siempre mantiene un R_f de 0.25, indicando se tratar de un compuesto de menor polaridad que el ácido salicílico (R_f 0.1), figura 20.

Figura 20: Perfil cromatográfico en capa fina de los compuestos presentes en los extractos de tallos de hoja de la Sierra de Huautla: 1) polen, 2) Callos, 3) compuesto de referencia con R_f 0.25, 4) Hoja y 5) ácido salicílico. En un sistema de (hexano: éter etílico y ac fórmico (70:30:1).

8.5 Cultivo *in vitro* de *A. adstringens*.

8.5.1 Porcentaje de desinfección de explantes de *A. adstringens*.

En el proceso de desinfección de los explantes de hoja y Pecíolo de *A. adstringens* fue del 20 al 30 % de efectividad en el protocolo de desinfección. Entre los problemas más importantes que presentaron estos tejidos vegetales fue la alta cantidad de agentes bacterianos y hongos que ocasionan grandes pérdidas de material vegetal, lo que retraso el establecimiento de los cultivos celulares. Los protocolos de desinfección más utilizados para los explantes de hojas fue cuando se implementó hipoclorito de sodio en concentraciones altas y exposición a periodos largos de inmersión y etanol en una concentración del 50-80 % con tiempos de inmersión más corto, los cuales generan una disminución considerable en el porcentaje de contaminación de los diferentes explantes.

8.5.2 Condiciones de cultivo *in vitro* para la generación de callos de *A. adstringens*.

La formación del callo se observó en el medio de cultivo B5 con los fitorreguladores de 2,4-D: Cinetina a 2 mg/L respectivamente, en esta condición crecieron los explantes de Xoxocotla y del Campo Experimental de Zacatepec, para el Ejido de Juchitán de la Sierra de Huautla no se han podido generar callos. Los callos generados fueron a partir de día 38 de que se colocaron los explantes en los medios de cultivo y al día 45 los cultivos mostraron una coloración cristalino-amarilla, nodular y mayor friabilidad lo que permitirá poder generar y disgregar las células si se plantea trabajar con células en suspensión en un futuro (tabla 8).


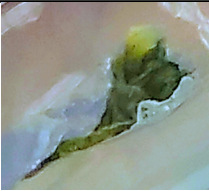

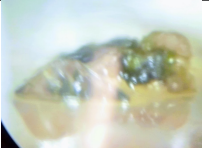

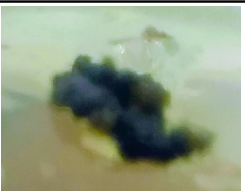
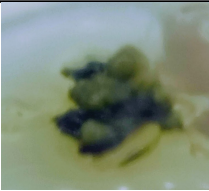
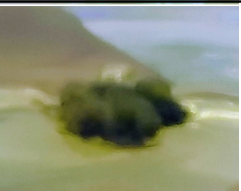
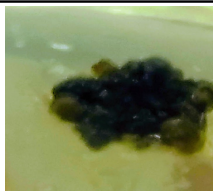
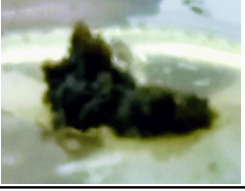
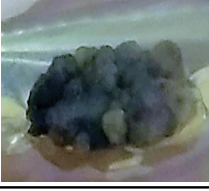
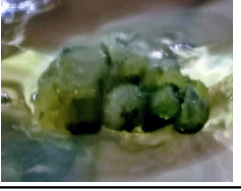
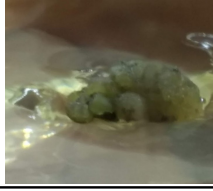


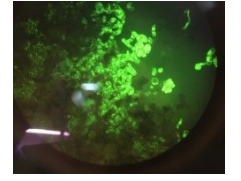
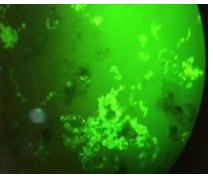
Los callos generados de hoja colectada en Xoxocotla Morelos, después de 60 días de haber iniciado los cultivos, se observó una respuesta favorable del 43% con la formación de callo tipo friable y para los callos obtenidos del Campo Experimental de Zacatepec se observó al día 66 con un 30% de generación de callo, como se muestran en la tabla 9. Los callos generados de los explantes presentan una coloración negra desde los 20 días de haber colocado el explante en el medio de cultivo y a un año de haber generados los callos estos intensifican su color negro como se muestra en el último panel de la tabla 9, sin embargo la viabilidad de las células está en el rango de 90 a 95%.

Tabla 8. Producción de callo de *A. adstringens* en tratamientos con diferente concentración y combinación de reguladores de crecimiento.

Tratamiento	Regulador de crecimiento		medio de cultivo	
	Cinetina + 2,4-D (4 mg/L)	Cinetina + 2,4-D (2 mg/L)	MS callo Friable (%)	B5 Callo Friable (%)
Oscuridad	*	***	40	60% ***
Luz Constante	NC	NC	NC	NC
Fotoperiodo	*	*	10	90

*** Alto crecimiento celular *Poco crecimiento celular, NC= no creció

Tabla 9. Generación de callo a partir de hojas de jóvenes de *A. adstringens* colectadas en Xoxocotla y del Campo Experimental de Zacatepec.

Fecha	Callos de Xoxocotla Explant 1	Callos de Campo Experimental de Zacatepec. Esplante 2	RESIEMBRA de Callos de Explant 1 Xoxocotla	RESIEMBRA de callos explant 2 Campo experimental
4 abril 2019			DESARROLLO DE CALLO	DESARROLLO DE CALLO
11 Abril 2019				AUN NO CRECIA
30 Abril 2019				
27 Mayo 2019				
30 Julio 2020	No. de resiembras 13 	No. de resiembras 13 		

8.5.3 Análisis de los compuestos producidos a partir de cultivo *in vitro* (callos) de Cuachalalate.

Con el fin de verificar si los cultivos *in vitro* (callos) producían los mismos compuestos sintetizados en los árboles de Cuachalalate, se analizó el perfil químico por HPLC de una de las líneas que se han establecido. Los resultados obtenidos muestran al parecer uno de los compuestos mayoritarios de presentes en el árbol de *A. adstringens*, el compuesto con $R_f =$ de 0.54 (figura 21).

Figura 21. Perfil cromatográfico en capa fina, donde se observa los compuestos producidos en cultivos de callos y su comparación con los producidos en partes aéreas de Cuachalalate. Carril 1: Corteza de Xoxocotla. Carril 2: Callos generados *in vitro*. Carril 3: Polen. Carril 4: Pecíolo (macho). Carril 5: Pecíolo (hembra).

*Sin embargo es necesario corroborar este compuesto químico por métodos analíticos más finos como HPLC y RMN.

Con los resultados obtenidos hasta el momento se plantea poder realizar la elaboración de productos a partir de extractos *Amphipterygium adstringens*, Cuachalalate, sin embargo, es necesario terminar de analizar los demás compuestos que se tienen ya puros para conocer sus estructuras químicas y poder aportar al control de calidad del material vegetal, además de posibilitar la evaluación de compuestos puros en ensayos farmacológicos.

9 DISCUSIÓN.

9.1 Colecta de *A. adstringens*.

La colecta de *A. adstringens* (Cuachalalate) se realiza en diferentes partes del país, sin embargo, el 90% del total del producto que se consume anualmente en México se produce y se abastece de la región de Sierra de Huautla, Morelos, Mixteca Poblana y parte de la Cuenca del Balsas (Solares y Gálvez, 2002a; Solares, 2009). Para la realización de este estudio también se colectó material vegetal en el municipio de Xoxocotla Morelos, donde se localizó un árbol (hembra) del cual se tomaron las muestras y además del ejido de Juchitán en la Sierra de Huautla (árbol macho y hembra). Los resultados obtenidos han mostrado por primera vez que tanto la corteza como las partes aéreas del cuachalalate de 3 zonas diferentes presentan perfiles químicos similares.

9.2 Resultados de los perfiles metabólicos observados en la cromatografía en capa fina (CCF).

Una observación muy particular que se hizo notar fue que Méndez (1954), Martínez (1969), Díaz (1976), Cortés (1979), Navarrete (1986), García (1992) y Carretero (2000) realizaron sus estudios partiendo de muestras de material vegetal de “corteza” del árbol leñoso de Cuachalalate, y de estos diferentes estudios se desprendió toda la información reportada por ellos, que es de fácil acceso para su consulta. Sin embargo, en el caso de esta investigación se tomó la decisión de primero realizar un estudio de todas las partes aéreas y terrestres (con excepción de raíz) de un solo árbol para determinar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios. Para un segundo estudio se llevó a cabo una segunda recolección de material vegetal en el ejido de Juchitán de la Sierra de Huautla, con el objetivo de determinar las diferencias y similitudes entre árboles macho y hembra de diferentes zonas (a saber, Xoxocotla y Sierra de Huautla).

9.3 Compuestos de interés encontrados en Cuachalalate.

La presencia de los compuestos de interés es uno de los recursos potenciales que hacen del estudio de que esta planta leñosa (cuachalalate) sea considerado como un recurso potencialmente importante en la industria farmacéutica. Tanto Navarrete (1986), Soriano (1987), Mata (1991), y Solares (1995), entre otros, mencionaron que la presencia del ácido masticadienónico representa uno de los compuestos presentes en el cuachalalate con un interés muy particular debido a sus propiedades anticancerígenas, e incluso se llega a reportar que el compuesto 3-alfa-hidroxi-masticadienónico posee una eficiencia del 80% contra el cáncer estomacal.

Tan importante es este tema que algunas terapias con triterpenos ya cuentan con patente registrada en la WIPO como tratamiento contra algunas enfermedades. En el caso del presente estudio se pudo comprobar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios del cuachalalate en las diferentes partes de la planta (aéreas terrestres), e incluso en las diferentes zonas de las cuales se obtuvo el material vegetal, tanto de Xoxocotla Morelos, como del ejido de Juchitán Morelos; además de que se realizó la comparación entre árboles macho y hembra.

Cabe mencionar que también estos autores, como Mata *et al.*, 1991 específicamente, han reportado la presencia de diferentes ácidos anacárdicos (tanto aquellos con cadena lateral de 15

carbonos sin dobles enlaces, como aquellos con doble y triple enlaces). En el caso de este estudio nosotros reportamos la presencia (según los resultados del análisis de gases-masas) de un ácido anacárdico de 13 carbonos con tres dobles enlaces (aunque aún falta corroborar este resultado mediante el análisis por resonancia magnética nuclear de los cristales obtenidos).

9.4 Determinación de la presencia de compuestos de interés mediante HPLC.

Los principales estudios reportados para el cuachalalate concluyen en su corteza ocurre la presencia de los principales metabolitos principales como ácidos anacárdicos, ácido masticadienónico y 3 alfa-hidroxi-masticadienónico.

En el caso de este desarrollado en el presente trabajo de investigación, a las diferentes partes del árbol de cuachalalate, se pudo apreciar una diferencia significativa en el perfil químico obtenido por HPLC entre un meristemo joven y un meristemo maduro. Además, se ha identificado un derivado de 13 carbonos del ácido anacárdico que se aisló del Pecíolo, que también ocurre en la corteza. Esta evidencia es trascendente, ya que la corteza es el material que se comercializa, con el uso masivo por la población mexicana, además de su exportación a diferentes mercados, por lo que el uso del Pecíolos podría representar un aprovechamiento racional de la planta.

Un logro importante del presente proyecto de investigación fue lograr por primera vez el cultivo de callos a partir de hojas de cuachalalate productores de un compuesto también sintetizado por la planta silvestre, lo que abre puertas para el desarrollo de propuestas productivas de metabolitos utilizando estrategias biotecnológicas para la producción controlada de metabolitos de interés farmacéutico.

10 CONCLUSIONES.

- De acuerdo a los resultados de HPLC y gases-masas, se reporta que varios de los metabolitos que se encuentran en la corteza también están presentes en otras partes de la planta.
- Se ha demostrado que la producción de metabolitos de la corteza del árbol de cuachalalate de Morelos y la corteza de los árboles de Puebla presentan perfiles cromatográficos similares.

- Se identificó el ácido anacárdico trieno con una cadena lateral de 13 carbonos, en el árbol colectado en Sierra de Huautla en el ejido Juchitán.
- La eficiencia de desinfección de los explantes de hojas de *A. adstringens* fue de 30 %.
- Se determinó al tratamiento de oscuridad (2 mg/ de 2,4-D: Cinetina respectivamente como inductor de callogenesis de *A. adstringens*, lo que generó callos friables.
- En callos se observó la producción de uno de los compuestos mayoritarios que se producen en las partes aéreas de *A. adstringens*. Aún se debe identificar su estructura química.

11 PERSPECTIVAS.

- Caracterizar las moléculas presentes en el extracto de tallo hoja y corteza del cuachalalate de las moléculas de ácido masticadienónico (MDA), 3 α -hidroximasticadienónico, ácido anacárdico de 15 carbonos (monoeno y trieno) en Pecíolo.
- Analizar los extractos de los meristemos a diferentes edades del Cuachalalate, ya que derivado del estudio de HPLC se observaron compuestos interesantes debido a su polaridad muy diferente a la reportada en corteza.
- Caracterizar la estructura química del compuesto producido *in vitro* por los callos obtenidos.
- Concretar la colaboración con el Grupo de Ejidatarios de Sierra de Huautla, Cadena Productiva de aprovechamiento de Plantas Medicinales de la Sierra de Huautla Morelos S.P.R. de R.L.
- Generar el registro de la empresa por Leonel Andres Ortega, para el desarrollo y venta de los productos formulados desarrollados a partir de cuachalalate (jabón, gel, pasta dental, fitomedicamento).

12 ANEXO I

Paralelamente a este proyecto de tesis, y de manera independiente a este posgrado, se llevó a cabo la elaboración de productos a partir de extractos *Amphipterygium adstringens*, Cuachalalate. Con la investigación realizada sobre esta planta medicinal se desarrollaron productos interesantes teniendo como base el extracto etílico, de diferentes partes del árbol de cuachalalate, específicamente el extracto crudo de hoja.

12.1 Jabón con extracto etílico de *A. adstringens*.

En abril del 2019, se inició la elaboración de un producto que para tratar la “Alopecia androgénica” caída de cabello, que tuviera como característica ser de fácil aplicación diaria. De acuerdo con la revisión bibliográfica algunos de los compuestos químicos del cuachalalate presentan actividad como bloqueadores de la enzima 5-alfa-reductasa, que propone la teoría de la regeneración celular; ya que se ha demostrado que se logra la apertura de los poros del cuero cabelludo paulatinamente. Sin embargo, es importante realizar estudios sustentados científicamente. Se realizó la elaboración del jabón y se mostró un stand en la feria de la Academia Mexicana de Morelos, donde hubo la presencia de científicos y población, y se expusieron los jabones elaborados de Cuachalalate, que fue bien aceptado por el público, ya que decían que tratándose de un producto natural y de una planta bien estudiada y conocida popularmente se atrevían a consumirlo.

Producción de jabones, ya elaborados bajo un proceso más estandarizado, con la concentración estandarizada del extracto etílico de *A. adstringens*. 14 de abril de 2019.



Presentación del prototipo.
12 de junio de 2019



Comparación del primer prototipo del
Jabón enriquecido con biotina.



PRESENTACIÓN DEL JABÓN A BASE DE CUACHALALTE

12.2 Preparación de gel a base de extractos de *A. adstringens*, como regenerador celular y posible activador del gen MUTYH involucrado en la reparación del ADN.

En este proyecto también se propuso elaborar un gel a base de extracto acuoso de *A. adstringens*, ya que es de interés en la regeneración celular.

Se ha reportado que existen células humanas con daño oxidativo dañando principalmente al gen MUTYH responsable de reparar el ADN mutado, este gen se encuentra en el brazo corto (p) del cromosoma 1 (1p34.1), este gen codifica un enzima llamado glicosilasa MYH, que participa en la reparación del ADN (Kevin J. McDonnell, *at al.*,2018) .

Esta enzima corrige los errores que se introducen cuando se divide el ADN celular. Las mutaciones en este gen afectan a la capacidad de las células para corregir los errores cometidos durante la división del ADN, que dan como resultado la producción de una glicosilasa MYH no funcional o de función débil. Cuando se altera la reparación por escisión de nucleótidos en la célula se acumulan las mutaciones en otros genes, lo que lleva a la célula al crecimiento excesivo descontrolado, y a la posible formación del tumor.

Por ejemplo, los tumores epiteliales tienen un nivel inferior al normal de la glicoproteína E-caderina, que es responsable de la adhesión célula-célula en los tejidos normales. Además, en muchos tumores extremadamente malignos algunas enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas se encuentran presentes en niveles más altos que los normales. Por ejemplo, las células de cáncer de mama que se metastatizan al hueso expresan de manera normal el gen de la metaloproteinasa MMP1, los que se difunden a los pulmones sobre expresan los genes MMP1 y MMP2. Se ha demostrado que el grado de agresividad de un tumor presenta una correlación positiva con el nivel de enzimas proteolíticas que expresa el tumor. Además, las células malignas no son sensibles a los controles normales conferidos por moléculas reguladoras como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) (Klug, *et al.* 2013).

La desaminación de bases puede ocurrir de forma espontánea o inducida por agentes químicos (p. e. ácido nitroso). En este caso se elimina un grupo amino de `forma oxidativa' con la formación de un grupo ceto. Esta transformación altera seriamente la formación de puentes de hidrógeno. La reparación de estos desapareamientos debe ocurrir antes de la replicación y por tanto no cuenta con el indicador de la metilación del ADN, ya que al ser mutaciones independientes de la replicación pueden ocurrir en ADN completamente metilado. La reparación se ha de llevar a cabo por un sistema de escisión de nucleótidos, pero independiente de la metilasa. También existen glicosilasas específicas capaces de reparar este tipo de errores.

Uno de los daños más frecuentes en el ADN es la producción de 6-O-metil-guanina que puede aparearse con timina en vez de citosina y una de las vías de reparación usa una serie de enzimas llamadas glicosilasas que hidrolizan el enlace glicosídico del nucleótido eliminando la base y dejando un sitio apurínico o apirimidínico. La etapa final de la reparación mediada por glicosilasas es común en todos los casos e incluye la acción de una endonucleasa que reconoce el sitio sin base

e introduce una mella en 5', y a continuación el ADN polimerasa 1 inicia la síntesis en el extremo 3' y finalmente la cadena es cerrada por la ADN ligasa (Serrano, *et al.* 1992). Con base en lo anterior, ha surgido la idea de producir un gel de cuachalalate, ya que se ha reportado que sirve como antioxidante para estos daños genéticos. La preparación del gel a base de extracto acuoso quedó como se muestra en la siguiente figura:



Gel a base de extracto acuoso de cuachalalate con un pH de 7.

12.3 Daño del dedo izquierdo por hongo.

El paciente refirió que tenía hongo en la piel del dedo izquierdo, por lo que se le recomendó realizar lavados con el jabón a diario y aplicarse el gel a base cuachalalate tres veces al día. El paciente mostró solo fotografías del día en que inicio la aplicación del gel y después de un su dedo estaba completamente recuperado, como se muestra en la fotografía 1.

Fotografía 1: Piel dañada en dedo de pie (hongo).



En estas fotografías se puede apreciar, como el gel de extracto etílico de *Amphipterygium adstringens* ha logrado eliminar (de manera lenta) la presencia de hongo.

12.4 Regeneración de daño celular en un pie de paciente con diabetes mellitus.

Una mujer de 50 años, con diabetes, utilizó un gel a base del extracto acuoso donde se le pidió realizar lavados con agua limpia y aplicar el gel por 1 mes 3 veces al día. Claro siempre y cuando estuviera de acuerdo con su médico de control diabético. Al mes la paciente comento que la herida se había cerrado y el malestar había calmado totalmente. A los 5 meses el daño de su pie tanto el talón y tobillo se restablecieron completamente.


Talón del pie dañado	Tobillo de pie derecho	
		Tiempo 0
		Tres meses después de aplicar el gel diario tres veces al día.
		5 meses después de aplicar gel, cada 3 días solo por la noche.

Fotografía 2. Piel dañada Regeneración en piel de diabético.

12.5 Regeneración de daños celulares por la enfermedad de Ictiosis.

Posteriormente, me fue solicitada ayuda para apoyar a una familia cuyo hijo sufre de ictiosis ligada al "X" de la que sufre su hijo (diagnostico dado en el Hospital infantil, donde es atendido). Debido a la solicitud de los padres se procedió a informarles de la existencia de estos productos desarrollados a base de Cuachalalate. Ya informados al respecto de los productos desarrollados, se procedió a implementar una serie de productos en cantidades necesarias para mitigar primeramente el sufrimiento del menor.

Se recomendó un tratamiento a base de infusión de cuachalalate en su baño, para proceder a bañarlo con el jabón a base de Cuachalalate. Posteriormente, ya que este totalmente seco, se procedió a aplicar en todo su cuerpo el gel a base de cuachalalate. Se han logrado grandes avances en la salud del niño, (fotografía 3); sin embargo es necesario dar seguimiento para esta enfermedad por más tiempo.

Talón del pie dañado	
	Tiempo 0
	8 días después de aplicar el jabón y el gel diario tres veces al día.

Fotografía 3. Regeneración en paciente con daños por la enfermedad de Ictiosis.

12.6 CONVENIO CON EL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta la fecha se contactó a la directora del departamento de genética del Hospital General de México, para mostrar estas evidencias científica de un personal experto en el tema, con el objetivo de dar acompañamiento al caso antes mencionado y estudiar la posibilidad de un convenio para realizar un estudio clínico directamente para pacientes con la enfermedad de ICTIOSIS en dicho hospital. La directora de investigación del hospital ha mostrado interés en este tratamiento, para que sea aplicado en un estudio clínico con 10 o 20 pacientes.

De tal forma que se está en espera de que el comité de bioética del Hospital de su aprobación para aplicar este tratamiento en las personas que sufren este tipo de enfermedad.

12.7 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE METABOLITOS PRESENTES EN EL CUACHALALATE CON BLANCOS PROTEICOS DEL SARS-CoV2

Paralelamente al presente proyecto de tesis de generó un análisis bioinformático (docking) del acoplamiento molecular de derivados triterpénicos y del ácido anacárdico con blancos proteicos virales del SARS-CoV2 y blancos proteicos humanos relacionados al proceso inflamatorio. Se cuenta con la redacción de una patente y se está trabajando en un artículo científico.

13 BIBLIOGRAFÍA.

1. A. Sharma et al. (2017), Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional Medicine, journal of Ethnopharmacology, vol. 208, pp. 264-329.
2. Acevedo et al. (2010), Antiulcerous activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both analyzed in the experimental gastric lesion in rats, Diario de etnofarmacología 134, pág. 67-73, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.057>
3. Anónimo (1998), Acuerdo sobre derechos y cultura indígena. FZLN, México, pág. 33.
4. Argueta V., et al. (1984), Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana; tomo III, Editorial Instituto Nacional Indigenista, México D. F., INI Publicaciones.
5. Argueta A., et al., (1994), Atlas de las plantas de la medicina mexicana (tomo 1; pp. 542-543), México D.F., Instituto Nacional Indigenista.
6. Beyl CA, (2005). Getting started with tissue culture: Media preparation, sterie technique and laboratory equipment. En: Trigiano RN y Gray DJ. Plant development and biotechnology. USA: CRC Press. ISBN 0-8493-1614-6
7. Castillo-Juárez I., et al. (2007), Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*, Editorial Elsevier US, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.022>
8. Da Silva H. (2016), Estudios visando á obtencao do LCC técnico e cardanol com a rastreabilidade exigida para prospeccao de productos de interesse biotecnológicos, Universidad de Brasília, Instituto de Química, Trabajo de fin de curso.
9. Dagla H. R. (2012), Plant Tissue Culture: Historical developments and applied aspects, Resonance 17:759:767.
10. García, G. K. Y., Principales usos y posibles acciones farmacológicas del cuachalalate, inFARMate, 2006; 7:1-7.
11. Gellerman et al. (1969), Antimicrobial effects of anacardiac acids, Canadian journal of microbiology, Editorial Scopus US, Vol. 15, Issue 10, Oct 1969, pág. 1219-1223, <https://doi.org/10.1139/m69-220>
12. Grazzini et al. (1991), Inhibition of lipoxigenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 176, Issue 2, 30 April 1991, pág. 775-780, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80252-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80252-9)
13. <http://www.herbalsafety.utep.edu/hojas-de-datos-a-base-de-hierbas/cuachalalate/>
14. <http://jpet.aspetjournals.org/content/339/2/403.short>
15. <https://natureduca.com/plantas-medicinales-sustancias-los-alcaloides.php>
16. Hurtado V., et al. (2014), Cultivo de tejidos vegetales, México D. F., editorial Trillas, pp. (93-98).
17. Khalil, M. (1998), Biodiversity and the conservation of medicinal plants: issues from the perspective of the developing world. En: Swanson, T (ed.). Intellectual property rights and biodiversity conservation: and interdisciplinary analysis of the values of medicinal plants. Cambridge University Press. Cambridge, U. K. pp. 232-253.
18. Klug W. (2013), Conceptos de genética, 10a. edición, Editorial Pearson, Madrid España, pág. 534, 535.

19. Knauth P., et al. (2018), In vitro Bioactivity of Methanolic Extract from *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl., *Chenodium ambrosioides* L., *Cirsium mexicanum* DC., *Eryngium carlinae* F. Delaroché, and *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. Used in Traditional Medicine in México, Hindawi Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2018. Article ID 3610364, 11 page.
20. Kubo et al. (1993a), Structure-antibacterial Activity Relationships of Anacardic Acids, journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 41, Issue 6, 1993, pág. 1016-1019, <https://doi.org/10.1021/jf00030a036>
21. Kubo et al. (1993b), Antitumour agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice, J. Agric. Food Chem., Vol. 41, pág. 1012-1015
22. Kubo et al. (1995), Structural Functions of Antimicrobial Long-chain Alcohols and Phenols, Biorganic and Medical Chemistry, Vol.3, No. 7, pp. 873-880, [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(95\)00081-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0896(95)00081-Q)
23. Kubo et al. (1999), Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 47, Issue 2, February 1999, pág. 533-537, <https://doi.org/10.1021/jf9808980>
24. Kuskoski E. et al., (2005); Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividades antioxidantes en pulpa de frutas; Ciencia, Tecnología y Alimentos; págs. (726-732).
25. Lara-Márquez (1996), Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica, México D. F., UNAM, pág. 43.
26. Lodish, et al. (2012); Biología Celular y Molecular; EE. UU.; Editorial Panamericana.
27. Luque J., et al. (2000), Biología Molecular e Ingeniería Genética, España, Editorial Elsevier Science
28. León S. (1992), Manual de genética molecular, Editorial Síntesis, Madrid España, págs. 87-91.
29. Martínez F. et al. (2002); Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes; España; Universidad de León; Nutrición hospitalaria; págs. (1-8).
30. Mata et al. (1991), Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 34, Issue 2-3, September 1991, pág. 147-154, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90032-9)
31. Mittermeier, et al. (1992), La importancia de la diversidad biológica de México, in México ante los retos de la biodiversidad, Sarukhán J., pp. 1-14, Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
32. Morais S. et al. (2017), Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities, Article pharmaceuticals MDPI, <https://doi.10.3390/ph10010031>
33. Murch S. J., et al. (2004), Journey a single cell to a plant, USA, Science Publisher, Inc. ISBN 1-57808-352-4.
34. Navarrete A., et al., (2006), Farmacología preclínica, seguridad, autenticidad y metodología analítica de la corteza de cuachalalate, en primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, México D. F. 30 de noviembre-2 de diciembre de 2006, Revista fitoterapia, publicaciones y documentación, s. L. 6,85.

35. Nothias, et al. (2016); Antibiotic Discovery is a walk in the park, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; vol. 113, no. 51, pp 14477-14479, 2016.
36. Olivera-Ortega et al., (1999), Phytochemical study of Cuachalalate (*A. adstringens*, Schiede ex Schlecht), Elsevier Science Ireland, Journal of Ethnopharmacology 68:109-113.
37. Pierik R. (1990), Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, España, editorial Mundiprensa.
38. Pinna G., et al. (2008), Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice, Editorial Springer US, 33:1990. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9718-5>
39. Rodriguez-Garcia, et al. (2015), *in vitro* antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Amphipterygium adstringens*, Hindawi Publishing Corporation, Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, volumen 2015, article ID 175497, 7 pages.
40. Rodríguez V., (2015), Tesis de grado de doctorado: Determinación del efecto cicatrizante de los extractos de **A. adstringens** y D. Miller, Departamento de farmacología UPIBI del IPN, 19 de febrero de 2015.
41. Rosas G. (2007), establecimiento del cultivo *in-vitro* de Castilleja tenuiflora Benth. Tesis de maestría en desarrollo de productos bióticos, CEPROBI-IPN.
42. Solares A. (1999), Estudio Químico-Biológico para una producción Sostenida de Corteza de Cuachalalate para uso Farmacéutico-Industrial en el Estado de Morelos, informe técnico, INIFAP-SAGARPA, Centro Experimental Zacatepec, Zacatepec Morelos, pág. 37.
43. Solares A. et al. (2002); Manual para una producción sustentable de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht); Zacatepec Morelos México; publicación especial SAGARPA-INIFAP-CIRCE.
44. Solares A. (2009), Aprovechamiento Sustentable de Cuachalalate (**A. adstringens** Schiede ex Schlecht), bajo marco legal: Tecnología INIFAP. Resumen, memoria, IV Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal, Saltillo Coahuila, México, pp. 315.
45. Soto, et al. (1999), Phytochemical Study of Cuachalalate (*A. adstringens*, Schiede ex Schlecht), en Journal of Ethnopharmacology 68:109-113.
46. Spencer et al. (1980), Alkil and phenylalkil anacardic acids from knema elegans seed oil, Journal of Natural Products, Vol. 43, Issue 6, November 1980, pág. 724-730, <https://doi.org/10.1021/np50012a005>
47. Sullivan, et al. (1982), Anacardic acid: Molluscicide in cashew nut Shell liquid, Chemicals and CAS Registry Numbers, Editorial Elsevier US, Vol. 44, Issue 3, 1982, pág. 175-177, <https://doi.org/10.1055/s-2007-971434>
48. Thorpe T. A. (2007), History of plant tissue culture. In: Methods in Molecular Biology, vol. 318; Plant Cell Culture protocols, second Edition, Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota, Humana Press Inc., Totowa, N. J. págs. (9-32).
49. Toyomizu et al. (1993), β -glucosidase and aldose reductase inhibitors: Constituents of cashew, *Anacardium occidentale*, nut Shell liquids, Phytotherapy Research, Vol. 7, Issue 3, May/June 1993, pág. 252-254, <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070309>

50. Trevisan MT. et al. (2005), Caracterización de alquifenoles en productos de anacardos (*Anacardium occidentale*) y análisis de su capacidad antioxidante, *Food Chem. Toxicol.* 2006, 44:188-197, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.06.012>
51. Trevisan et al. (2006), Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 44, Issue 2, February 2006, pág. 188-197, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.06.012>
52. Trujillo I. et al. (2007), Criocirugía en dermatología. Experiencia en el Hospital Clínico Quirúrgico Universitario "Hermanos Ameijeiras", *Dermatología Peruana*, volumen 17(3):161-169.
53. Tyman, et al. (1979), Non-isoprenoid long chain phenols, *Chemical Society Reviews* Editorial Scopus US 8, pág. 499537, <https://doi.org/10.1039/CS9790800499>
54. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941927
55. WHO, Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, WHO, Geneva, Switzerland, 2015.
56. Wu Y. et al. (2011), Ácido anacárdico (ácido 6-pentadecilsalicílico) inhibe la angiogénesis tumoral al apuntar a Scr/FAC/Rho GTPasa señalización vía. *J. Pharmacol, exp. Ther.* 2011, 339:403-411, <https://doi.org/10.1124/jpet.111.18189>

Cuernavaca, Mor., a 31 de julio de 2020.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **ESTUDIO FITOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DE *Amphipterygium adstringens* SCHIEDE EX SCHLECHTER (CUACHALALATE)**

Alumno que presenta tesis a revisión: **LEONEL ANDRES ORTEGA**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Director de tesis)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co-director de tesis)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Porfirio Juárez López

Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. Anabel Ortiz Caltempa

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2020-08-07 23:19:32 | Firmante

CwV2EVloryWaxNsfHXTwkmD51hy/MuSMYMIhbcq2L16zCeN4BwFBWRFGLNvAh3xVG442nZJopfp3cpAlmzpNQdl6EEM20q7kwjk2InIADsBOR6ORjInXTWq1FfHO4oG5gC5d5fVLWJxQzgfWwYGDxlOfhH50sFBqfTa+dhqmKGwy9AP8J8efmjqluuNPokMYqHkBR/6vIN0gwqMS7+PUsLF1En2hzQuWFHOizr20MNV/zOaPLlthh51yNN0nIDu+umlea2oAGRFvQEhZDnu29v3vlaahKUMPL/Y9sGWG39SNDrOPdNww0afCS5XqYT+0w9BVajPMA21D+vM5GQ1sg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

EMJ3Hs

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QNhKjkBkUripH4mAFEv8AyFWMX37P7U>

Cuernavaca, Mor., a 31 de julio de 2020.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **ESTUDIO FITOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DE *Amphipterygium adstringens* SCHIEDE EX SCHLECHTER (CUACHALALATE)**

Alumno que presenta tesis a revisión: **LEONEL ANDRES ORTEGA**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Director de tesis)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co-director de tesis)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Porfirio Juárez López

Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2020-08-07 23:13:44 | Firmante

CF64Bltt+ahJH0U3mAdRuz2fJ3jigxNQoMXqROPOTpZKfTJdCdFWgmzrQZ9CosZGul7FtmqDTE5dAVxm7ezl84wY47LRw/aVU2OaCZniCpHj/RQs2pJsFleaNEOSdsiVjSamzSoEnOHcTZRy8qxpFtDWZ79bd1hUp/8urWTEHYpN0SKTnyQuhX9fwTUxjj49wEgF5lu2zlVy1y4Yo2K9kcmPdu/De+Y952AauYD8ua533f91DxDVgQWMTzjtb/uLyOoluZoLY9gB60ihGKVpbMU1OVURBSif1p7bi8WNmZdUJGQX77LaRM5NYAVHen6wToI9x93T37qRIqQzw/Tx5w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

Sf9XIU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ovclffdkOVHLFJsoWsR7FXsVfXYhm3Qx>

Cuernavaca, Mor., a 31 de julio de 2020.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **ESTUDIO FITOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DE *Amphipterygium adstringens* SCHIEDE EX SCHLECHTER (CUACHALALATE)**

Alumno que presenta tesis a revisión: **LEONEL ANDRES ORTEGA**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Director de tesis)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co-director de tesis)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Porfirio Juárez López

Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2020-08-10 10:09:53 | Firmante

S0PRoDtGR+W715WMq7RG4j0xjSxyTlicnlC/wBoFxaHlkVJ117b72nW+j8/UbjzcbJKoDcDjzgzgkonaNQq7ZxWhBY6EEKE0zbRaMeQzD7giOzAYOGzzWW3Z8y4UJOYjskBQzkQNFvD4Nj1n5vcgYnfsIE66mEF4STJZNB8AZuC7Fly+Y1ONuBIWAYNnQZ3me3gtSt2mSd6qBZ91Ee/1EA4VuS/QiAR/Q0tefdTcXZGfwPPsZ4kpZ8bcifwp6FE4dW4olGTGFyW0zOsNxCeNO4mK6C91ntStzwE72cJNpdhnRkHJAxnYAsB819qSZqGBblqu4rGcXri83UZmuR6MX1A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

sUnKPQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8VRVlWxulvUouFO3DtbbJyPDXqGHd9zu>

Cuernavaca, Mor., a 31 de julio de 2020.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **ESTUDIO FITOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DE *Amphipterygium adstringens* SCHIEDE EX SCHLECHTER (CUACHALALATE)**

Alumno que presenta tesis a revisión: **LEONEL ANDRES ORTEGA**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Director de tesis)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co-director de tesis)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Porfirio Juárez López

Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Porfirio Juárez López

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PORFIRIO JUAREZ LOPEZ | Fecha:2020-08-08 09:09:08 | Firmante

yHfFhoLxx9vUishUri0lc+QWHmx0lwntFYvTbAlkvO+1Ld4Ak4x5h6dchgHqwORD1mXN5Qp/hM0H//ubG4CJIn+ykJRpQBgz/JVLYnbEWgUzfPECguaYvr9nd84SW7TQbXiOYnJ0xvInLq+gN1HAwKsbl91533wjPGwbZQpbodjVi0ENEp/bzShR/74kxieB+AZpKYU6dJh7M1rmzDdxh2BbpRvwU2LytVzmJZmmkLPXocuvSiXS24fqZI2YKK/NXTGxVqExtZc2P/RwfEK9Za/lpgEgADVvQXkOdm7PJaH7MFhs6WJJlwPVsM90PXgj/FL4YvYBOR7FTa6UljMt06g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

1M4tyr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DRYaEY02hBZKArF9DXFSZHyMUpwks8dQ>

Cuernavaca, Mor., a 31 de julio de 2020.

Programa:

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **ESTUDIO FITOQUÍMICO Y BIOTECNOLÓGICO DE *Amphipterygium adstringens* SCHIEDE EX SCHLECHTER (CUACHALALATE)**

Alumno que presenta tesis a revisión: **LEONEL ANDRES ORTEGA**

Comité de revisión de tesis:

Dra. Anabel Ortiz Caltempa (Director de tesis)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co-director de tesis)

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega

Dr. Porfirio Juárez López

Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dra. Nayeli Monterrosas Brisson

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

NAYELI MONTERROSAS BRISSON | Fecha:2020-08-10 10:18:02 | Firmante

bvC2Ds1gRtVfVR8UWk66Y6Nki8stlWVPJTGR1jriiqWLdSjrBrRYheAl0q6t319Cy7iSyBTFZAvBo80ZpLn7aCUa5vwNy2smdG4Nr56+Lk0IKhjDMJX8kRPETQNE0i645ybveHdELoCB3wDuoJci5SIMt5YI9+A6bVFqZc7B+fl.3HEzRe3+1GYhEFoOX2IFlwh/r2ASecy7DTpNuSowaOCattleShO6qxdHSdRgdtrRdZ4nhGRwrjmTUdS+vfU5sduumjTTP9Z8Yx47TKkAHt1+6CnUYkU14um/lrBzqTzehPSUZEPRkNhJclrbWSBH+tvNnVUajNQoEQ+qNc7yrKA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

RUKshJ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/idMbB1hgCT89DOrK3oHi5VPvpH4giz5b>