



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
Amphipterygium adstringens A PARTIR DE CULTIVOS
DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A :

MARTÍNEZ DE AQUINO PATRICIA

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: DRA. ROSAS ACEVEDO HORTENSIA

ASESORA: DRA. DE LA ROSA MERA CLAUDIA JANETTE

ASESOR: BIOL. ROMERO ARREDONDO JUAN

SINODAL: M. EN C. LUNA ROSALES BARBARA SUSANA

SINODAL: M. EN C. BECERRIL CRUZ FLORENCIA



MÉXICO, CDMX.

MAYO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi madre por ser mi brújula, mi apoyo inquebrantable y mi fortaleza. Esta tesis no solo representa mi esfuerzo, sino también el fruto de tu sacrificio y dedicación. A ti, cuyo amor incondicional ha sido mi mayor inspiración, dedico con amor este pequeño paso hacia nuestras grandes metas compartidas.

Con amor y gratitud.

AGRADECIMIENTOS

A mi amada universidad por abrirme a un mundo lleno de conocimiento infinito, por darme la oportunidad de convertirme en el ser humano que soy hoy, por los amigos, las experiencias y los gratos recuerdos.

A mi asesora de tesis, la Dra. Hortensia, por compartir su conocimiento, por su apoyo constante durante el proceso de desarrollo de esta tesis, su paciencia y dedicación han sido fundamentales para convertir este proyecto en una realidad. Por su compromiso con mi crecimiento académico y profesional que ha dejado una huella imborrable en mi vida.

A Carlos, Yamile, Jesús, Cynthia, Daphne, Liliana y Karina por su amistad sincera, por ser una parte importante de mi camino y hacer de mi paso por la universidad una de las mejores etapas de mi vida.

A mis hermanos por siempre estar y no rendirse a pesar de las dificultades, por no perder la sonrisa y las ganas de seguir adelante. A mis sobrinos por ser mi motorcito de alegría.

A César por desvelarse conmigo haciendo tarea, por llegar en el momento preciso a mi vida, por su amor y apoyo incondicional, por hacerme el camino más llevadero, pero sobre todo por hacerme tan feliz.

Con infinito cariño y gratitud

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Marco Teórico	4
<i>Amphipterygium adstringens</i> Schiede ex Schlencht.	4
Comercialización de la corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i>	12
Metabolitos secundarios.	14
Ácidos anacárdicos.	15
Ruta biosintética de ácidos anacárdicos.	16
Fitoquímica de <i>Amphipterygium adstringens</i>	19
Actividad biológica de los compuestos aislados.	25
Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.	27
Cultivo de células en suspensión.	29
Antecedentes de la producción de metabolitos secundarios de <i>Amphipterygium adstringens</i> por cultivo de células en suspensión.	30
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivo General	32
Objetivos Particulares.....	32
Material y Método	33
Zona de Estudio.	33
Recolecta del Material Biológico.	33
Obtención de explantes.	35
Pruebas de desinfección.	35
Preparación de medios de cultivo sólidos.	36
Siembra de los explantes y formación de callos.....	36
Preparación de medios de cultivo líquidos.	37

<i>Establecimiento de los cultivos de células en suspensión</i>	37
<i>Extracción y purificación de los metabolitos</i>	37
Resultados y análisis de resultados	38
<i>Pruebas de Desinfestación</i>	38
<i>Elección del Explante y Medios de Cultivo</i>	39
<i>Inoculación de los Medios y Desarrollo de los Cultivos</i>	39
<i>Identificación de compuestos</i>	40
Discusión	42
Conclusiones	44
Bibliografía	45

FIGURA

Figura 1. <i>Amphipterygium adstringens</i> (Martínez Deaquino Patricia).....	5
Figura 2. <i>Amphipterygium adstringens</i> ejemplar masculino (Cuevas, 2005).	7
Figura 3. <i>Amphipterygium adstringens</i> ejemplar femenino (Cuevas, 2005).	8
Figura 4. Fruto de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Martínez Deaquino Patricia).....	9
Figura 5. Mapa de distribución de <i>Amphipterygium adstringens</i> en México (Cuevas, 2005).	10
Figura 6. Ruta biosintética propuesta para ácidos anacárdicos de <i>Ginkgo biloba</i> (Tyman, 1979 en Rosas, 2005).	17
Figura 7. Ruta biosintética propuesta para ácidos anacárdicos producidos en geranio a partir de ácidos grasos (Walters et al., 1990 en Rosas, 2005).....	18
Figura 8. Descortezamiento de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Martínez Deaquino Patricia).	34

TABLA

Tabla 1. Formas de preparación y usos de <i>Amphipterygium adstringens</i>	12
Tabla 2. Compuestos aislados de la corteza de <i>Amphipterygium adstringens</i>	19
Tabla 3. Compuestos que se busca obtener por cultivo de células <i>in vitro</i>	29
Tabla 4. Concentraciones de hipoclorito de sodio usadas y lapsos de tiempo de desinfección en etanol e hipoclorito de sodio respectivamente (min, min).	36
Tabla 5. Porcentaje de frascos al tercer día de inoculación que no presentaron contaminación.	38
Tabla 6. Principales constituyentes identificados.	40

Resumen

Amphipterygium adstringens es un árbol endémico de México, con gran relevancia en la herbolaria mexicana, el uso de su corteza se ha convertido en un riesgo para la conservación de las poblaciones silvestres. Los métodos de propagación *in vitro* han abierto la posibilidad de reproducir los metabolitos de interés médico de algunas plantas, evitando así el daño que ocasiona el saqueo de las mismas.

El objetivo del presente estudio fue la obtención de metabolitos secundarios de *Amphipterygium adstringens* a partir de cultivos de células en suspensión. Para la obtención de callos se utilizaron como explantes diferentes partes del árbol, que se desinfectaron con etanol y una solución de hipoclorito de sodio a distintas concentraciones, por tiempos diferentes, estos se cultivaron en dos medios de cultivo sólidos a base de Murashige y Skoog. Los callos obtenidos se trasladaron a medio de cultivo líquido al igual que las células disgregadas de los mismos. Finalmente, se realizaron la extracción y purificación de las sustancias obtenidas en los cultivos celulares, que mediante cromatografía de gases acoplada a masas fueron identificados.

En medios adicionados con bencilaminopurina y ácido naftalenacético se obtuvieron callos a los 45 días, a partir de meristemas apicales.

Entre las sustancias extraídas y purificadas del cultivo de células en suspensión se detectaron ácidos grasos, que son precursores de ácidos anacárdicos uno de los grupos de metabolitos que han sido aislados del cuachalalate.

Introducción.

A través de los años, los humanos han acudido a la Naturaleza para tratar de satisfacer sus necesidades básicas. Así, se han empleado los recursos naturales para obtener, y más tarde producir alimentos, bebidas, ropas, calzado, tintes, medios de transporte y de calefacción, fertilizantes, fragancias, cosméticos, saborizantes, medicinas, etc. Las plantas han constituido la base de los sistemas de medicina tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre, por cientos de años (Newman *et al.*, 2000).

Durante todo el siglo XIX y los primeros 60 años del siglo pasado, la investigación científica de la flora mexicana se realizó sin atender adecuadamente su uso médico tradicional. El pensamiento neopositivista daba por hecho que los problemas de salud de la población tendrían su solución en los medicamentos químico farmacéuticos. Sin embargo, al paso del tiempo se fue descubriendo que esta premisa no era correcta, los medicamentos no fueron los suficientes para atender los problemas prioritarios de salud, sus costos cada día eran más altos e inalcanzables por amplios sectores de la población, eran muy pocos los medicamentos nuevos que se descubrían y un alto porcentaje de éstos seguían dependiendo de las plantas medicinales para su producción. A pesar de ello, no fue sino hasta el último cuarto de siglo que, a raíz del programa internacional de “Promoción de la Medicina Tradicional en los Países en Desarrollo”, promovido por la Organización Mundial de la Salud, aparecieron en México grupos de investigación científica para el estudio de las plantas medicinales, lo que constituye la primera etapa en la investigación de estas plantas y así surge en México la etnobotánica como una actividad científica (Osuna *et al.*, 2005).

En México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos para más de 40 millones de personas que no tienen acceso a los diferentes centros de salud. En nuestro país existe una gran diversidad de especies vegetales de origen tropical, de las cuales unas cinco mil plantas son usadas como medicinales, y que dada la diversidad vegetal podrían llegar a ser hasta 20 mil (Osuna *et al.*, 2005). Tal es el caso de *Amphipterygium*

adstringens Schiede ex Schlencht, árbol endémico de México de la familia Anacardiaceae, mejor conocida como cuachalalate, que ocupa el octavo lugar dentro de las cuatrocientas especies útiles registradas en el uso tradicional del estado de Morelos (Boyás *et al.*, 1988; Solares *et al.*, 2006), su aprovechamiento se concentra principalmente en los estados de Morelos y Guerrero (Solares *et al.*, 2006). Esta especie es una de las que más se comercializan en el centro y suroccidente de México (Hersch-Martínez, 1995; Rosas, 2005), ya que en la actualidad se utiliza para aliviar más de 25 enfermedades distintas; razones por las cuales la sitúan como una de las especies de mayor relevancia en la herbolaria mexicana (Solares *et al.*, 2006). Su efecto terapéutico se atribuye a la presencia de dos tipos de compuestos mayoritarios: los triterpenoides y los fenoles de cadena larga (Olivera, 1998; Rosas, 2005; Navarrete *et al.*, 2006), considerados metabolitos secundarios.

El aprovechamiento de *A. adstringens* es intensivo y destructivo por la forma tradicional de recolectar la corteza que ocasiona la muerte de los árboles, principalmente de aquellos ubicados en las cercanías de los centros de población o las áreas de fácil acceso, lo cual pone en riesgo la estabilidad de las poblaciones silvestres y la conservación de las especies (Solares y Gálvez, 2002). Aunado a esto, se ha informado sobre la dificultad que representa su reproducción de manera natural, ya que sus semillas presentan un porcentaje bajo de germinación (Cid, 2008; Guzmán, 2012).

El cultivo *in vitro* de células vegetales con el fin de obtener metabolitos secundarios de interés en farmacia, se ha vuelto una alternativa al cultivo tradicional de plantas y a la extracción química de metabolitos que va ganando protagonismo. Esta práctica resulta especialmente ventajosa en el caso de plantas cuyo cultivo es dificultoso, por requerir condiciones muy exigentes o necesitar largos periodos para desarrollarse, en muchos casos, sin conocer los ciclos ontogénicos y la relación productividad-desarrollo. En otros casos, la limitación está condicionada por un rendimiento demasiado bajo de los metabolitos de interés obtenidos o porque no existe la posibilidad de obtenerlos por síntesis química. En el cultivo *in vitro* es posible controlar las condiciones del medio de cara a alcanzar un mayor

rendimiento y calidad del producto final, así como preservar la biodiversidad cuando las plantas objeto de interés estén en peligro de extinción (Martín et al., 2018).

La finalidad del presente proyecto de investigación fue establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de células en suspensión de *Amphipterygium adstringens* para la obtención de sus metabolitos secundarios de interés médico.

Marco Teórico.

***Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlencht.**

Sinonimia: Juliania adstringens Schlenchtendal

Anteriormente se consideraba al cuachalalate dentro de la familia Julianacea (Fernández, 2003), en 2004 se realiza una reclasificación debido a que se encontraron ácidos anacárdicos en la corteza y pasa a formar parte de la familia de las Anacardiáceas (Domínguez, 2005).

Nombres comunes: En las zonas nahuas del altiplano central que comprenden los estados de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla Hidalgo y Distrito Federal, la especie se conoce como Cuachalalá, Cuachalalate, Cuachalalatl o muaxalaxlitli; en Michoacán, como matixeran, maceran y pacheco (tarasco); en Puebla, como volador; en Guerrero, le dicen macerán; y en Oaxaca, cuachinalá o yalaguitu (zapoteco) (Argueta *et al.*, 1994; Pennington y Sarukhán, 2005).

Clasificación:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Amphipterygium*

Especie: *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlencht.

Fisonomía: Árbol de hasta 15 m de alto y hasta 40 cm, con el tronco generalmente torcido, con pocas ramas gruesas, ascendentes y torcidas, de ramificación simpodial, copa aplanada (Fig. 1).



Figura 1. *Amphipterygium adstringens* (Martínez Deaquino Patricia).

Corteza: Externa lisa con grandes escamas engrosadas y suberificadas, la parte lisa de la corteza moreno grisácea a gris plomiza, con numerosas lenticelas protuberantes, redondas y pálidas. Interna de color crema rosado a rosado, fibrosa, con un exudado blanco cremoso y de olor picante. Grosor total de la corteza de 10 a 20 mm, sin incluir las escamas.

Madera: Albura de color crema claro a crema rosado con olor picante, vasos grandes, muy numerosos, dispuestos en líneas tangenciales. Madera esponjosa.

Ramas jóvenes: Ligeramente escamosas, con grandes cicatrices de hojas caídas, con abundantes lenticelas suberificadas y prominentes; pubescentes cuando jóvenes, glabras con la edad.

Hojas: Yemas 3mm de largo, obtusas, desnudas, amarillentas, muy pubescentes. Estípulas 2, 5mm de largo, lanceoladas. Hojas dispuestas en espiral, aglomeradas en las puntas de las ramas, imparipinnadas, de 6 a 13 cm incluyendo el pecíolo, compuestas por 3-5 folíolos opuestos y sésiles de 2.5 x 1.3 a 7 x 4.5 cm, con el folíolo terminal más grande; ovados o elípticos, con el margen crenado, ápice agudo, base aguda u obtusa; verde opaco y amarillento en el haz; verde grisáceo en el envés, tomentosos en ambas superficies, más densamente en el envés, raquis tomentoso y pulvinado en la base. Los árboles de esta especie pierden las hojas durante seis meses, desde noviembre hasta mayo.

Flores: Especie dioica (Fig. 2 y 3). Flores masculinas en panículas aglomeradas en las axilas de las hojas nuevas, de hasta 15 cm de largo, tomentosas; flores sésiles o sobre pedicelos de hasta 3 mm de largo, actinomorfas, de 3 a 4 mm de diámetro; perianto de 5 a 7 segmentos, de 1.5 a 2 mm de largo, lineares, agudos, tomentosos; estambres 5-7, de 1 a 1.5 mm de largo, con el filamento muy corto, la antera oblonga y tomentosa; ovario ausente (Fig. 2). Flores femeninas solitarias en las axilas de las hojas nuevas, en pedúnculos aplanados y alargados de 1 cm de largo y 3 a 4 mm de ancho, tomentosos; receptáculo globoso de 3 mm de largo, con 5 dientecillos agudos, que contiene un ovario de 2 carpelos

semiunidos, semiínferos, uniloculares, pubescentes; estilo grueso de 2 mm de largo, con 3 ramas estigmáticas recurvadas de 3 mm de largo; estilo y estigmas pubescentes (Fig. 3). Color blancas-amarillentas (Solares y Gálvez, 2002; Cid, 2008), florece de marzo a agosto (Monroy y Colín, 2000; Zamora, 2003; Solares y Gálvez, 2002; Martínez, 2015).



Figura 2. *Amphipterygium adstringens* ejemplar masculino (Cuevas, 2005).



Figura 3. *Amphipterygium adstringens* ejemplar femenino (Cuevas, 2005).

Frutos: Nueces abultadas con estigmas persistentes, sobre los pedicelos aplanados y acrescentes hasta formar una especie de ala, de 3 a 4 cm incluyendo el ala, moreno amarillentas o moreno rojizas, con una fina nervadura conspicua, glabras. Contienen 1 o 2 semillas muy aplanadas de 5 mm de largo (Fig. 4).



Figura 4. Fruto de *Amphipterygium adstringens* (Martínez Deaquino Patricia).

Polen: Isopolar, estefanocolporado, brevicolpado, 3 a 6 colporado, semitectado, suboblado a oblato-esferoidal, vista polar circular, de 34.4 a 46 μ , muro simplibaculado y algunas veces duplibaculado, al MEB (microscopio electrónico de barrido) con gránulos en los muros, colpos de 7.5 a 12.5 μ de largo y 1.3 a 3.8 μ de ancho, poros lalongados de 7.9 a 9.7 μ de largo y 4.7 a 8.0 μ de ancho (Jiménez y Cuevas, 2001)

Ecología y distribución.

Especie de bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo, en elevaciones de 600 a 1,320 m. Se asocia con *Bursera morelensis*, *B. longipes*, *B. fagaroides*, *B. lancifolia*, *B. copallifera*, *B. grabrifolia*, *B. submoniliformis*, *B. bipinnata*, *Pseudosmodingium perniciosum*, *Lysiloma microphylla*, *Ceiba parviflora*, *Cyrtocarpa procera*, *Hauya rusbyi*, *Ipomoea spp.* y en ocasiones con *Conzattia multiflora*. Su distribución está restringida a la vertiente del Pacífico, desde Nayarit, Sur de Zacatecas y Norte de Jalisco, Puebla, Morelos, hasta Oaxaca, incluyendo la cuenca del río Balsas (Argueta *et al.*, 1994; Pennington y Sarukhán, 2005) (Fig.5).



Figura 5. Mapa de distribución de *Amphipterygium adstringens* en México (Cuevas, 2005).

Usos.

Las primeras referencias del uso de esta corteza son del siglo XVI, posteriormente en 1791 durante la expedición de Malaspina, Pineda describió el uso que se daba a la “cáscara” del cuachalalate para el tratamiento de úlceras y llagas en personas, así como en animales (Navarrete y Mata 2009) y en el siglo XX en la obra de Máximo Martínez de 1944. Pero a partir de hace 30 años su uso se intensificó (Domínguez, 2005). Se conocen cerca de 40 usos terapéuticos tradicionales, se utiliza principalmente el cocimiento o té de la corteza, como tratamiento de úlceras, cáncer de estómago, gastritis, lesiones cutáneas, endurecimiento de encías, tifoidea, tifo, heridas antiguas y malaria (González y Delgado, 1962; Martínez, 1986; Olivera, 1998). En el caso de heridas, puede aplicarse hecha polvo o macerada en agua. Para el tratamiento de granos y llagas también se utiliza la resina de la corteza, que puede ser aplicada a animales domésticos. Para el tratamiento de las úlceras debe remojarse la corteza hasta que el agua adquiera coloración, después hay que ingerirla como agua de uso. En golpes, piquetes de animales ponzoñosos y como cicatrizante, se recomienda lavar durante cinco días, al menos, la zona a tratar con el agua de la planta macerada. Por otro lado, si hay infección o inflamación en la matriz u ovarios, la corteza se hierve para usarla como cataplasma (Martínez, 1994; Quintanar *et al.*, 1994) (Tabla 1).

Otros usos son: lavados vaginales en caso de infección, fiebres puerperales, flujo de mujeres, “frío en el cuerpo”, inflamaciones, caídas de matriz y ovarios, para tratar granos en los genitales, malestares estomacales, infecciones e inflamaciones intestinales, hígado, vesícula, gingivitis, dolor de muelas, fuegos en la boca, tos, anginas, tuberculosis, resfriado, enfermedades pulmonares, várices, circulación sanguínea, riñón, analgésico para la cintura, cabeza, espalda o pulmones, hernia, reuma y punzadas, caída del cabello, manchas en la piel, gangrena, antidiabético y astringente (Cortés, 1979; Argueta *et al.*, 1994; Martínez, 1994; Hersch-Martínez, 1995; Lara y Márquez, 1996; Martínez, 2015).

Tabla 1. Formas de preparación y usos de *Amphipterygium adstringens*.

FORMA DE PREPARACIÓN	USOS	APLICACIÓN
Macerado en agua	Cicatrizante	Agua de uso
Pomada	Cicatrizante	Local
Jarabe	Tos	Tomado 3-4 veces al día
Tónico	Fortalecimiento de pulmones, asma, tos.	Tomado 1-3 veces al día
Té	Cicatrizante	Tomado varias veces al día

Comercialización de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

Los resultados positivos a beneficio de su salud reportados por los usuarios han contribuido a la difusión de las propiedades medicinales del cuachalalate, promoviendo su comercialización principalmente en los mercados nacionales. Sin embargo, históricamente, la provisión de este recurso se ha llevado a cabo a través del trabajo de colectores en las regiones donde se encuentra de forma natural. En tiempos más recientes, la creciente fama del cuachalalate ha trascendido nuestras fronteras, generando una elevada demanda que ha llevado a los colectores a ignorar las prácticas tradicionales de recolección. Los intermediarios ahora imponen cuotas más altas, lo que ha llevado a una recolección más intensiva, extendiéndose cada vez más sobre las poblaciones naturales de cuachalalate. Este fenómeno no solo resulta en la degradación de los árboles, sino también en la amenaza para las poblaciones jóvenes, poniendo en riesgo la conservación a largo plazo de esta especie (Cid, 2008).

El proceso de descortezamiento es llevado a cabo por colectores de plantas medicinales que viven en las comunidades donde se localizan los árboles de cuachalalate, y también por colectores externos que llegan de otras comunidades rurales. La corteza fresca se lleva a los

mercados directamente con los vendedores de plantas medicinales o bien a centros de acopio manejados por intermediarios (Solares y Gálvez, 2002).

Lo estrecho del proceso de comercialización a lo largo de muchos años ha generado como consecuencia un método de descortezamiento irregular y altamente destructivo, ya que se centra principalmente en obtener el máximo volumen de corteza para conseguir una mejor compensación económica. El colector emplea el machete para descortezar el fuste sin tener en cuenta la profundidad del corte ni la extensión de la superficie descortezada. Esto resulta en árboles con una amplia sección del fuste no solo desprovista de corteza externa, sino también interna, exponiendo completamente el tejido xilemático comúnmente conocido como madera (Solares y Gálvez, 2002).

Por otro lado, aunque el colector es consciente de la presencia de corteza tanto rojiza como blanca, no establece una conexión directa con el género de la especie, por lo que, al preferir la corteza rojiza contribuye a la destrucción exclusiva de árboles masculinos. No obstante, con el paso del tiempo, se incrementa la distancia tanto entre las áreas de aprovechamiento del colector como entre los árboles masculinos y femeninos, esto podría tener como consecuencia la disminución del potencial de fecundación que representaría una amenaza para las poblaciones naturales (Solares y Gálvez, 2002).

Estos métodos de aprovechamiento tienen dos tipos de impacto: el impacto fisiológico, que ocurre instantes después de iniciar con el descortezamiento, al exponer el área descortezada, se desencadena un proceso de deshidratación donde el árbol comienza a usar el agua almacenada en el xilema, lo que ocasiona que disminuya su diámetro y su vigor. Como consecuencia de esto se origina la destrucción de tejidos vitales como el cambium vascular, cuya función es crear una nueva corteza, y destruido imposibilita su regeneración. Si el descortezamiento deja al descubierto la madera o xilema en un ancho no mayor a 3 cm, el daño puede ser reparado por el árbol dejando únicamente una cicatriz que puede percibirse en los primeros 6 meses. Sin embargo, si la herida es mayor, queda al descubierto

el tejido xilemático, facilitando el ataque de insectos, hongos y/o bacterias (Solares, 1995). Según datos de Solares y Gálvez (2002) al menos un 20% de los árboles que se descortezan por métodos tradicionales, mueren a consecuencia de los problemas antes mencionados y aunque es difícil tener un conteo exacto, se aproxima que entre 10 y 20 árboles mueren mensualmente (Solares y Gálvez, 2002).

Metabolitos secundarios.

Las plantas son organismos autótrofos, producen tanto metabolitos primarios como secundarios. El metabolismo primario comprende una serie de procesos metabólicos que permite a los organismos vivos sintetizar y degradar una serie de sustancias orgánicas (metabolitos primarios) que le son indispensables para vivir, las cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Revelo, 2010).

El metabolismo secundario, por su parte, sintetiza una diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios (Taiz y Zeiger, 2006), se forman a través de los metabolitos primarios y los procesos que conllevan a su formación, pueden diferir en los diferentes organismos.

Los metabolitos secundarios difieren de los primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, acil lípidos) porque tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

El estudio de estos compuestos fue iniciado por los químicos orgánicos del siglo XIX y principios del siglo XX (Taiz y Zeiger, 2006). Recientemente, se descubrió que muchos metabolitos secundarios tienen importantes funciones ecológicas en las plantas como

protegerlas de los depredadores y de la infección por patógenos microbianos, también sirven como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta (Revelo, 2010).

Los metabolitos secundarios, también son conocidos como productos naturales y tienen un importante valor medicinal y económico. Un gran número de estos productos, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes y principios activos (Revelo, 2010).

Su síntesis está regulada también por factores como la luz, los reguladores del crecimiento y la temperatura. Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados (Taiz y Zeiger, 2006).

En *Amphipterygium adstringens* el efecto terapéutico se atribuye a la presencia de dos tipos de compuestos mayoritarios: los triterpenoides y los fenoles de cadena larga (Olivera, 1998; Rosas, 2005; Navarrete *et al.*, 2006).

Ácidos anacárdicos.

Los ácidos anacárdicos son compuestos fenólicos, considerados ácidos grasos en los que el grupo carboxílico ha sido reemplazado por un ácido salicílico. La cadena lateral puede tener una, dos o tres insaturaciones. En algunos de estos compuestos la cadena lateral puede encontrarse entre las series homólogas de C₂ y C₇, los ácidos anacárdicos más comunes poseen cadenas laterales de 13, 15 ó 17 carbonos, con una insaturación en C-8 o C-10, aunque también puede existir con dos o tres insaturaciones en C-8, C-11 y C-8 y C-14, respectivamente; se sabe que sin excepción presentan configuración Z (Tyman, 2001).

Ruta biosintética de ácidos anacárdicos.

Los compuestos fenólicos son biosintetizados a partir de varias rutas metabólicas, la ruta del ácido shiquimico y la del ácido mevalónico, son las dos rutas básicas de biosíntesis.

La ruta biosintética de los ácidos anacárdicos no ha sido completamente descrita. Sin embargo, Tyman en 1979 propone que la biosíntesis de estos compuestos en *Ginkgo biloba* se lleva a cabo de forma similar a la del ácido 6-metil salicílico en *Penicillium griseofulvum* y supone que ésta ocurre mediante una condensación de Claisen del policétido precursor y la exclusión del aldol, y para la formación simultánea de cardol, 2-metilcardol y cardanol (Rosas, 2005) (Fig. 6).

Posteriormente en 1990, Walters y colaboradores propusieron que este tipo de compuestos se biosintetizan a partir de ácidos grasos como precursores y por la adición de tres unidades de acetato en un mecanismo biosintético similar al que se conoce para la producción de ácidos grasos, sin embargo, en la biosíntesis de los ácidos anacárdicos no todos los grupos cetos se reducen y se deshidratan durante la elongación de la cadena (como ocurre en la síntesis de los ácidos grasos), algunos grupos permanecen intactos y promueven la condensación aldólica intramolecular, la cual produce el anillo aromático (Rosas, 2005) (Fig. 7).

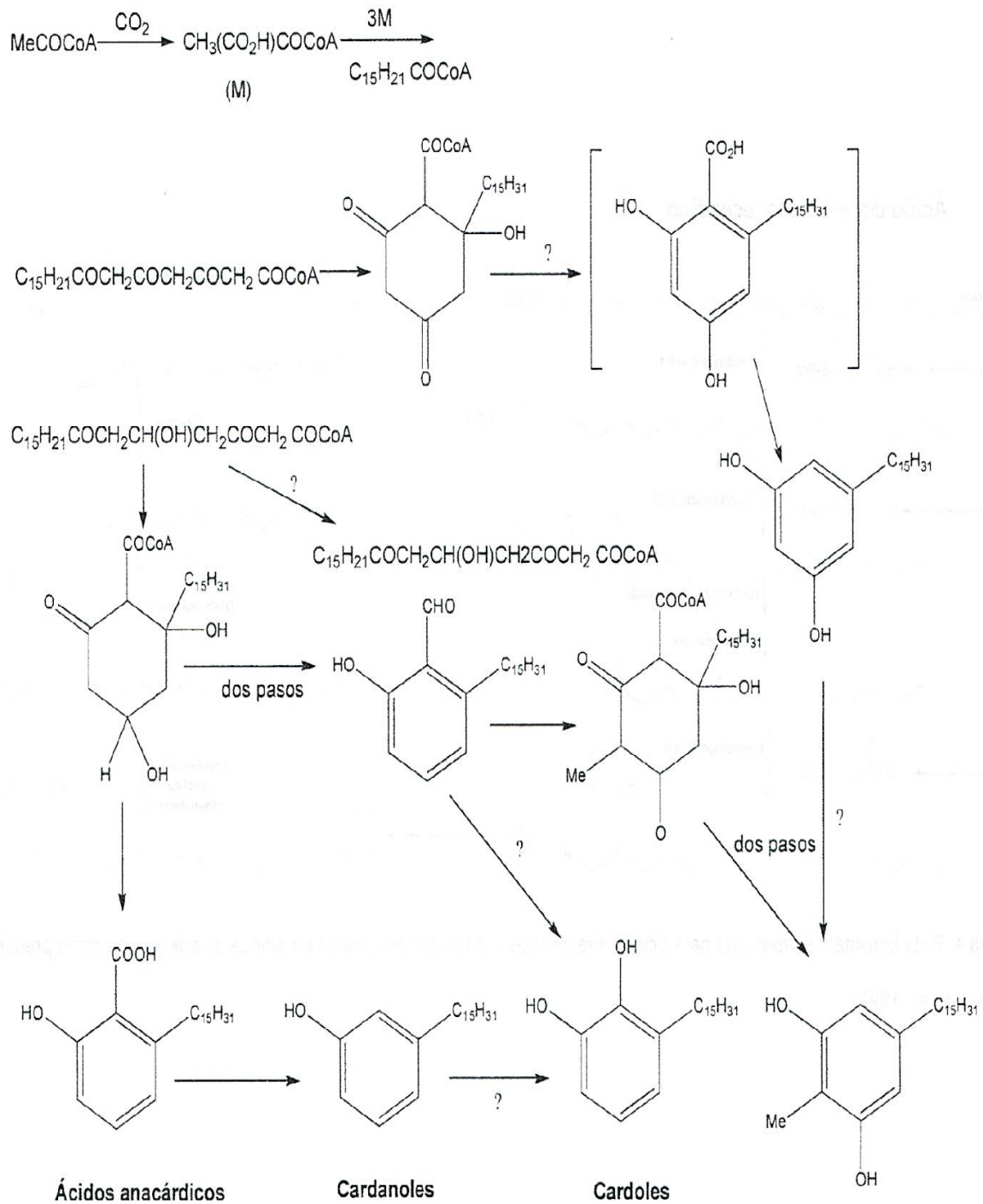


Figura 6. Ruta biosintética propuesta para ácidos anacárdicos de *Ginkgo biloba* (Tyman, 1979 en Rosas, 2005).

Ácido cis-*w*-5 hexadecenoico

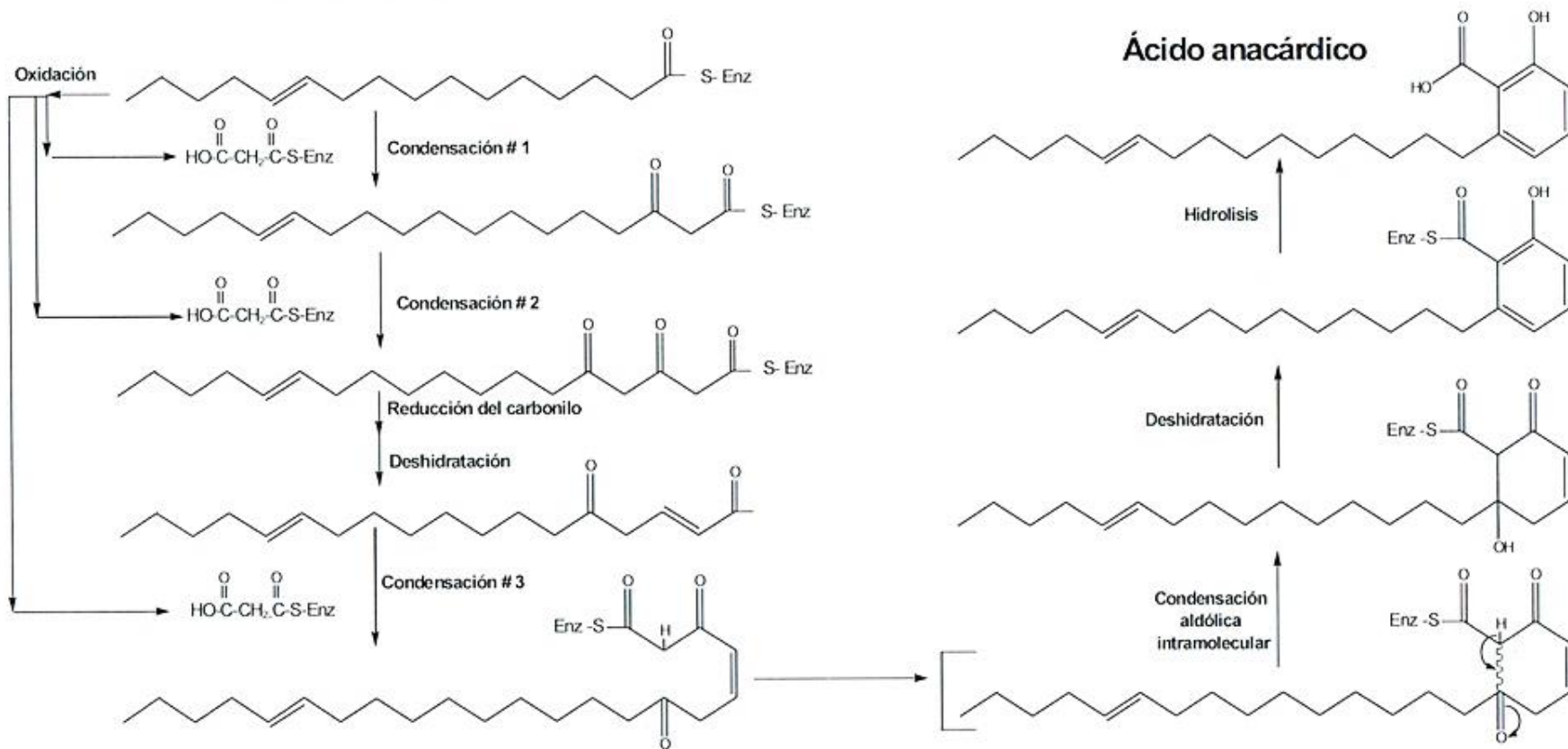


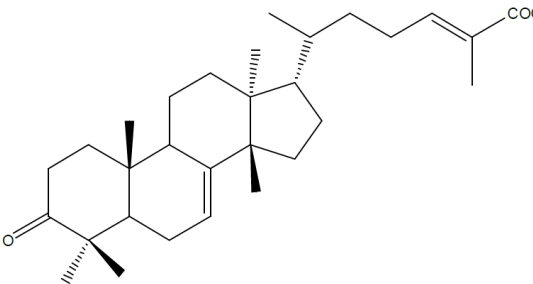
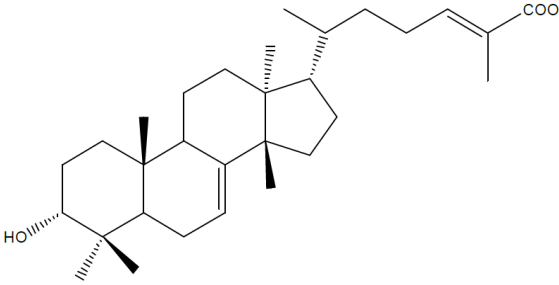
Figura 7. Ruta biosintética propuesta para ácidos anacárdicos producidos en geranio a partir de ácidos grasos (Walters et al., 1990 en Rosas, 2005).

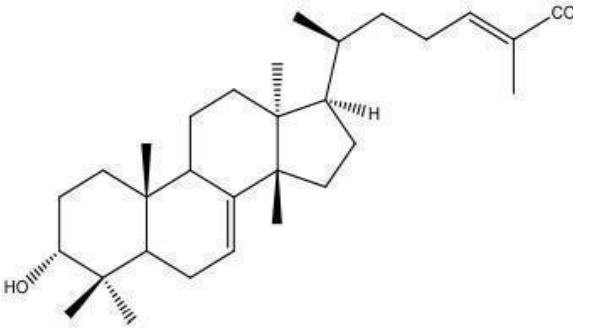
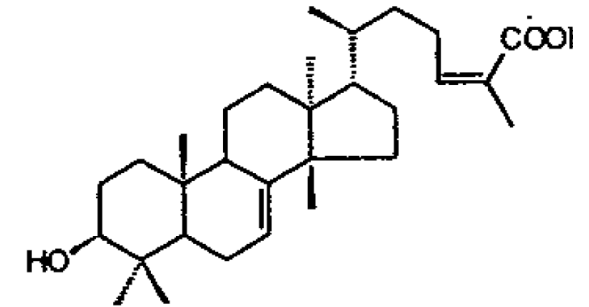
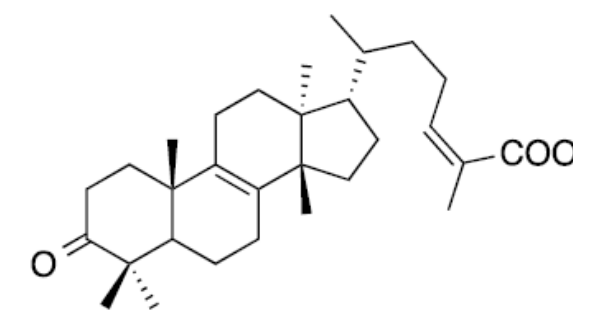
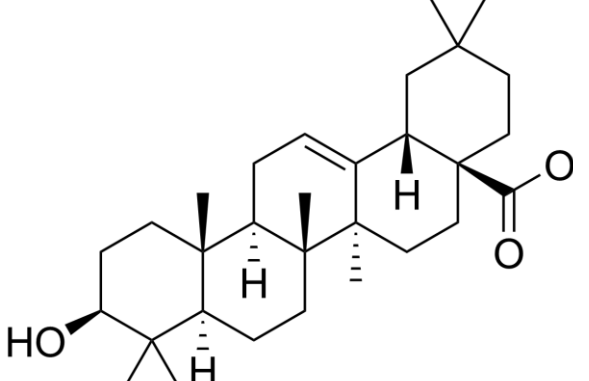
Fitoquímica de *Amphipterygium adstringens*.

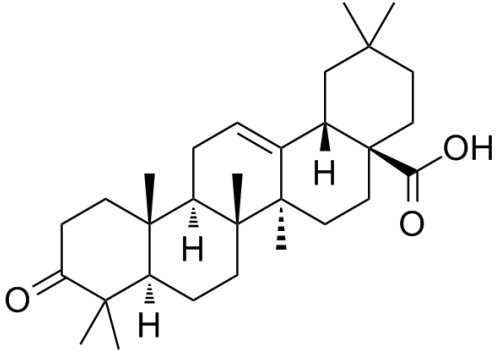
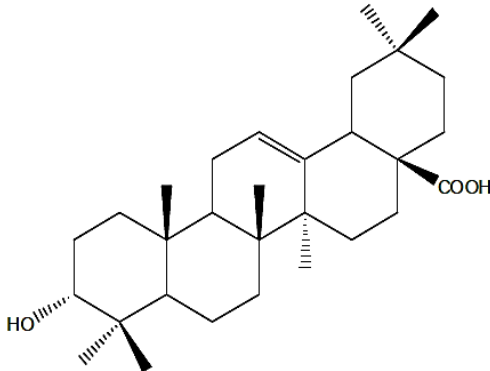
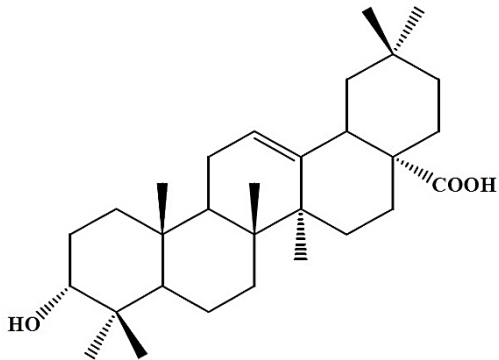
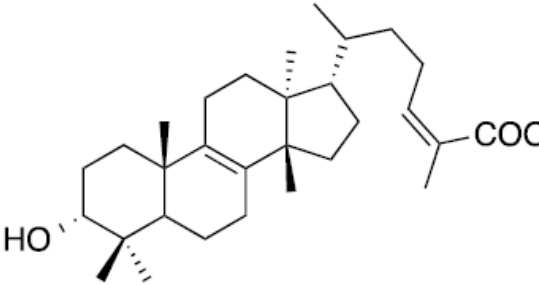
Los usos etnobotánicos conocidos de la corteza de cuachalalate han generado la realización de diversos estudios acerca de su composición química y de la actividad biológica generada por los compuestos aislados.

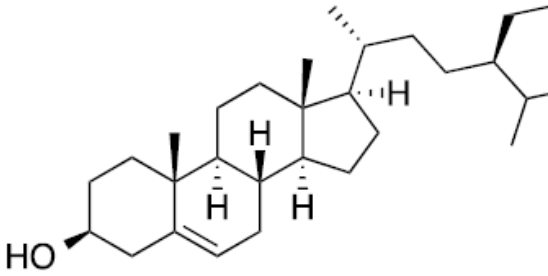
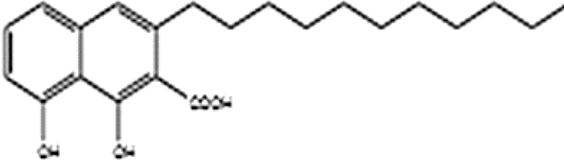
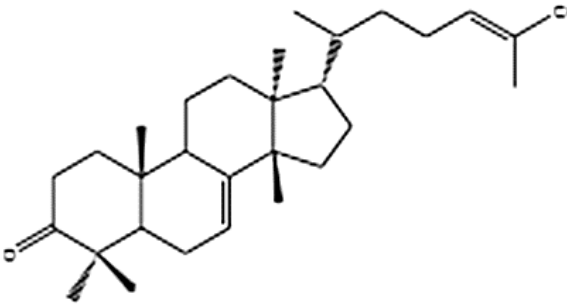
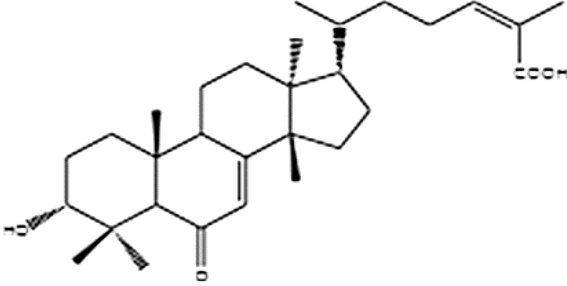
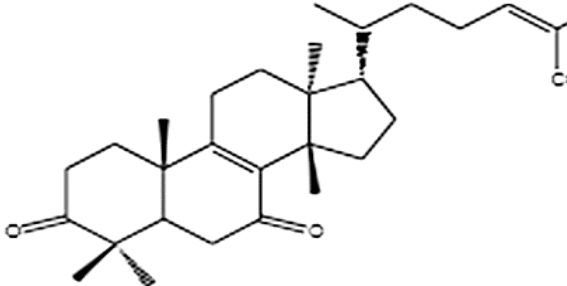
A continuación, se mencionan algunos de los compuestos aislados de la corteza. (Tabla 2).

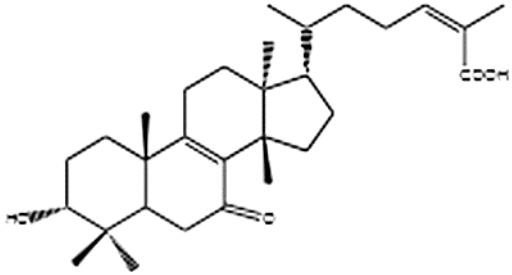
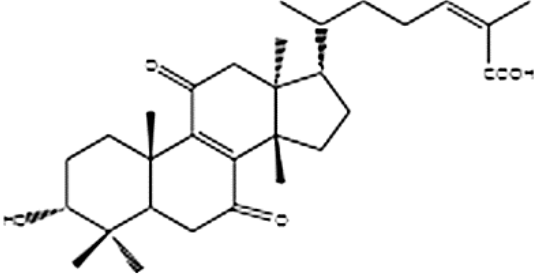
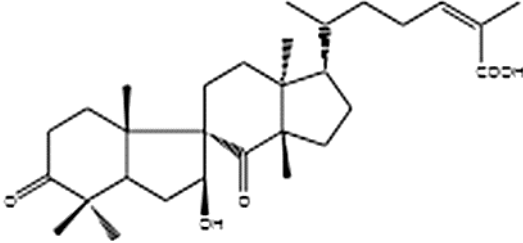
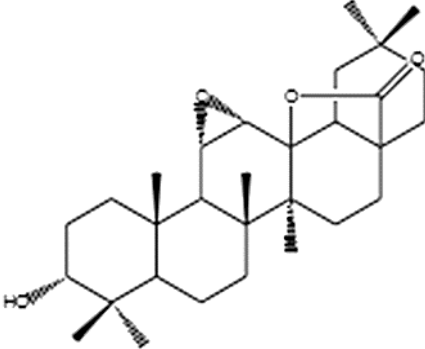
Tabla 2. Compuestos aislados de la corteza de *Amphipterygium adstringens*.

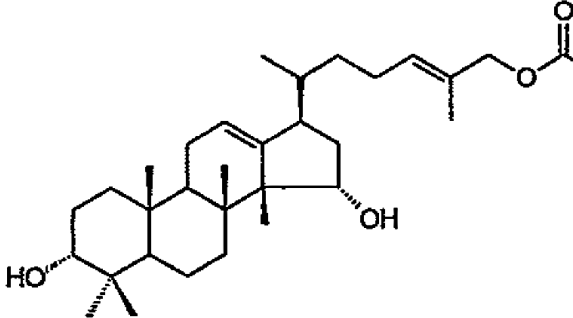
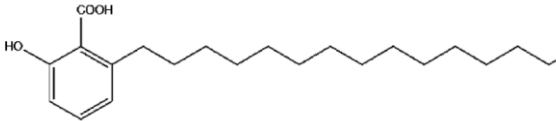

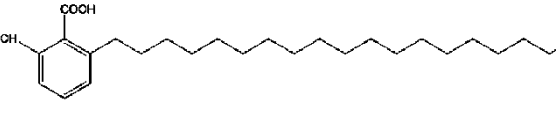
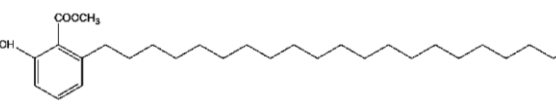
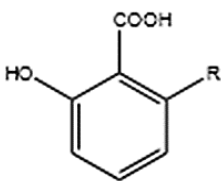
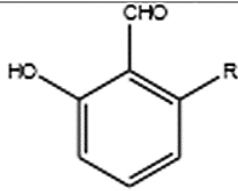
COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
Ácido masticadienónico		Navarrete, 1982; Soriano-García <i>et al.</i> , 1987; Olivera <i>et al.</i> , 1999; Oviedo-Chávez <i>et al.</i> , 2004; Rosas, 2005 y Revelo, 2010.
Ácido 3- α -hidroximasticadienónico		Navarrete, 1982; Olivera <i>et al.</i> , 1999; Rosas, 2005; Hernández, 2006; Carrasco y Rivera, 2009.

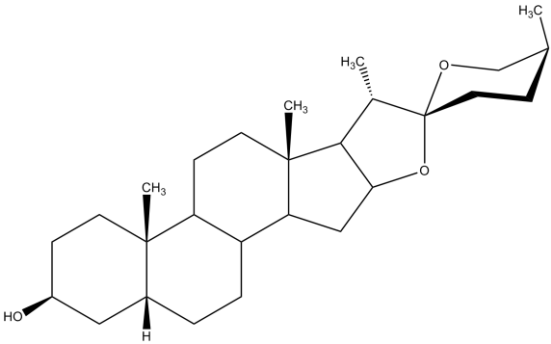
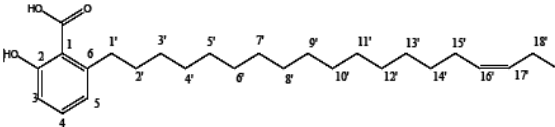
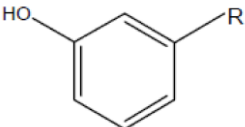
COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
<p>Ácido 3β-hidroximasticadienónico</p>		<p>Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>
<p>Ácido 3-epihidroximasticadienónico</p>		<p>Navarrete <i>et al.</i>, 1989.</p>
<p>Ácido isomasticadienónico</p>		<p>Navarrete <i>et al.</i>, 1989; Mata <i>et al.</i>, 1991.</p>
<p>Ácido oleanólico</p>		<p>Navarrete, 1986; Makino <i>et al.</i>, 2003.</p>

COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
Ácido oleanónico		Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido epi-oleanólico		Navarrete <i>et al.</i> , 1989; Mata <i>et al.</i> , 1991; Navarrete <i>et al.</i> , 2006; Carrasco y Rivera, 2009.
Ácido 3-epi-oleanólico		Navarrete <i>et al.</i> , 1989; Mata <i>et al.</i> , 1991; Benítez, 1998; Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007.
Ácido instipolinácico		Domínguez <i>et al.</i> , 1983; Navarrete <i>et al.</i> , 2006.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
B-sitoesterol		Navarrete <i>et al.</i> , 1989; Argueta <i>et al.</i> , 1994; Makino <i>et al.</i> , 2003; Carrasco y Rivera, 2009.
Ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-2-naftoico		Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005; Castillo <i>et al.</i> , 2007.
Ácido (14b, 24E)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oico		Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005.
Ácido 3- α -hidroxi-6-oxo-7, 24Z-tirucaladien-26-oico		Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 3,7-dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico		Makino <i>et al.</i> , 2003.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
3- α -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico		Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 7,11-dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico		Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 3,8-dioxo-7 β -hidroxi-7,9-cicro-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico		Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 3 α -hidroxi-11 α ,12 α -epoxi-oleanano-28,13 β -olido		Makino <i>et al.</i> , 2003.
Ácido 3 β -hidroxi-11 α ,12 α -epoxi-oleanano-28,13 β -olido		Makino <i>et al.</i> , 2003.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
27-acetoxi-3 α ,15 α - dihidroxidammara- 12,24-dieno		Pérez <i>et al.</i> , 1993.
Ácido 6-pentadecil salicílico		Navarrete <i>et al.</i> , 1989.
Ácido 6-heptadecil salicílico		Navarrete <i>et al.</i> , 1989.
Ácido 6-nonadecil salicílico		Navarrete <i>et al.</i> , 1989; Rosas <i>et al.</i> , 2006.
Ácido 6-heneicosenil salicílico		Rosas, 2005.
Ácidos anacárdicos	 <p> R = (CH₂)₁₄CH₃ (20) R = (CH₂)₁₅CH₃ (21) R = (CH₂)₁₆CH₃ (22) R = (CH₂)₁₈CH₃ (23) R = (CH₂)₁₄-CH=CH-(CH₂)₂CH₃ (24) </p>	Navarrete <i>et al.</i> , 1989; Mata <i>et al.</i> , 1991.
Aldehídos anacárdicos	 <p> R = (CH₂)₁₇-CH₃ (25) R = (CH₂)₁₉CH₃ (26) R = (CH₂)₂₁CH₃ (27) </p>	Mata <i>et al.</i> , 1991.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	REFERENCIA
Sarsapogenina		González y Delgado, 1962.
Ácido 2-hidroxi-6-(Z-nonadec-16-enil)-benzoico		Carrasco y Rivera, 2009.
Cardanoles		Rosas, 2005.

Actividad biológica de los compuestos aislados.

Los compuestos activos aislados a partir de la corteza de *Amphipterygium adstringens* presentan varios efectos en la salud humana, los cuales han motivado diversos estudios, entre los que podemos mencionar el realizado por González y colaboradores en 1962, como uno de los primeros en probar la actividad citotóxica del extracto de la corteza (Martínez y Flores, 2003; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004; Domínguez, 2005; Rosas, 2005; Knauth *et al.*, 2018).

Aguirre en 1983 reportó la actividad antiulcerogástrica del extracto, así como lo hicieron después Navarrete *et al.* en 1990, Argueta y colaboradores en 1994, Rosas en el 2000, Cubillo en el 2006 y Araiza en el 2007. Además, Benítez (1998), Navarrete y colaboradores (1998) y Arrieta y colaboradores (2003) concuerdan con dicha actividad específicamente

para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, el ácido masticadienónico, β -sitoesterol y el ácido 3-epi-oleanólico.

Martínez (1986) evaluó su acción cicatrizante, que es una de las más reconocidas de la corteza, concluyendo que ayuda a disminuir el tiempo de cicatrización (Rodríguez, 2015) y posteriormente Fernández (2003) argumenta que el extracto proporciona una mejor epitelización y remodelación de la cicatriz (Alvarado, 2018).

Una de las actividades que ha sido más estudiada es la antimicrobiana, resultando el extracto ser efectivo para diversas cepas como son: *Saprolegniasis* (Zacarías, 1993), *Fusarium moniliforme* (Bravo *et al.*, 2000), *Porphyromonas gingivalis* (Carrasco y Rivera, 2009; Rodríguez, 2011; Rodríguez-García *et al.*, 2015), *Escherichia coli* 43895 (Rodríguez, 2011; Rodríguez García *et al.*, 2015), *Pseudomonas aeruginosa* (Muñoz, 2013), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Rodríguez-García *et al.*, 2015), *Micobacterium tuberculosis* (Rivero-Cruz *et al.*, 2005), *Staphylococcus*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter agglomerans* (Canales *et al.*, 2005), *Vibrio cholerae* (Canales *et al.*, 2005; Jaury, 2009; Orozco, 2010), bacterias Gram (+), Gram (-) (Miranda, 2006; Orozco, 2010), *Helicobacter pylori* (Miranda, 2006; Castillo-Juárez *et al.*, 2007; Cruz, 2008; Castillo, 2011), *Bacillus cereus* (López *et al.*, 2015; Rodríguez, 2015), *Enterococcus faecalis* (López *et al.*, 2015), *Staphylococcus aureus* (Jaury, 2009; Orozco, 2010; López *et al.*, 2015), *Streptococcus mutans* (Carrasco y Rivera, 2009; Rodríguez-García *et al.*, 2015), *Staphylococcus epidermidis*, *Trichophyton mentagrophytes* (Jaury, 2009; Orozco, 2010), *Chromobacterium violaceum* (Muñoz, 2013), *Candida albicans*, *Salmonella typhi* (Rodríguez, 2015), y *Rhizoctonia solani* (Orozco, 2010).

La actividad antiinflamatoria del extracto cetónico y de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y 6-nonadecil salicílico fue evaluada por Rodríguez en 2015, Olivera y colaboradores en 1999 y Rosas en 2005 (Rosas, 2005; Rodríguez-Canales *et al.*, 2016).

También se han realizado diversos estudios sobre la actividad antígenotóxica del extracto hexánico y acuoso, como son los realizados por Martínez y Flores (2003), Jiménez (2004), Quintanar (2005), Hernández (2006) y Portilla (2007).

Por último, las actividades menos estudiadas han sido: contra colitis ulcerosa (Jiménez, 2016), la hipocolesterolémica (Navarrete, 1982), enzimática (Cajero, 2016), alelopática (Núñez, 2013), biológica en *Copaxa multifenestrata* (Pérez-Salgado, 2016), contra la gingivitis (Castillo, 2004) y como filtro solar (Quintanar *et al.*, 1994; Arroyo, 1994).

Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de protoplastos, células, tejidos y órganos vegetales; uno de ellos es el cultivo de células en suspensión, que fue introducido a finales de los años 60 del siglo XX, como herramienta para el estudio y la producción de los metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001) y desde entonces ha sido extensamente estudiado con el objetivo de incrementar la acumulación de los compuestos deseados.

Roca y Mroginski (1991) definen el cultivo de tejidos ampliamente como un conjunto de técnicas diversas en las cuales se cultiva un explante (una parte separada del vegetal) asépticamente en un medio artificial de composición química determinada y que se incuba en condiciones ambientales controladas. Para su establecimiento se debe tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Mroginski *et al.*, 2010).

Los explantes cultivados pueden ser diversos (protoplastos, células, tejidos u órganos), pero para lograr un sistema de callos lo ideal es cultivar cualquier órgano, tejido o célula viva. Las características propicias con las que deben cumplir los explantes a cultivar es que sean jóvenes, derivados de semillas en germinación, ya que en ellos se obtienen respuestas

rápidas y, en general, existen menores problemas de contaminación con microorganismos, además en cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la propagación de callos (Mroginski *et al.*, 2010).

Uno de los principales problemas que se presentan durante el establecimiento de cultivos es su contaminación con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus), generado por el ambiente creado por la relación explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación, que es sumamente favorable para su proliferación y que pueden causar la destrucción de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010).

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente, para esto se han utilizado diferentes compuestos, las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial y el alcohol a diferentes porcentajes, se encuentran entre los más comúnmente usados. La elección del desinfectante, su concentración y el tiempo de desinfección, va a depender en gran medida, de las características del explante; estos se establecen experimentalmente (Roca y Mroginski, 1991).

Mroginski y colaboradores (2010) definen al medio de cultivo como una preparación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. Para determinar la composición adecuada del medio, se debe experimentar con diversas formulaciones para obtener los resultados requeridos del explante (Roca y Mroginski, 1991).

Para establecer cultivos asépticos es conveniente; trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivos en el autoclave a una presión de 15 lb. durante 15 a 20 minutos; ya que a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente de 121 °C, suficiente para matar a todas las formas de vida; desinfectar los explantes, eliminando

bacterias y hongos exógenos; y preparar los cultivos con ciertas normas de asepsia (Roca y Mroginski, 1991).

Cultivo de células en suspensión.

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento, el cual constituye una forma para mantener y propagar células vegetales. Los beneficios esperados de la industrialización de estos cultivos se pueden resumir en:

- Producción, en escala industrial de algunas sustancias naturales.
- Producción de sustancias difíciles de obtener por extracción o por síntesis química.
- Reducción de los costos de producción de estas sustancias, a largo plazo.
- Producción continua y controlada de sustancias, independientemente de los factores del ambiente.
- Precios estables.

Algunos de los compuestos químicos de importancia económica cuya producción por células cultivadas *in vitro* se está investigando se resumen en el siguiente cuadro (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos que se busca obtener por cultivo de células *in vitro*.

PRODUCTO	ESPECIE VEGETAL	USO INDUSTRIAL
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Anticonceptivo
Quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	Antimalárico Amargorizante
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Antihipertensivo
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antileucémico

PRODUCTO	ESPECIE VEGETAL	USO INDUSTRIAL
Piretréina	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> ; <i>Pyrethrum sp.</i>	Insecticida
Taumatina	<i>Thaumatococcus danielli</i>	Edulcolorante
Jasmina	<i>Jasminum sp.</i>	Perfume
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Colorante
Teobromina	<i>Theobroma cacao</i>	Saborizante
Reserpina	<i>Ranwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo
Vainillina	<i>Vainilla planifolia</i>	Saborizante
Menta	<i>Mentha piperita</i> , <i>M. viridis</i>	Saborizante
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	Saborizante
Esteriosida	<i>Stevia rebaudiana</i>	Edulcolorante

Antecedentes de la producción de metabolitos secundarios de *Amphipterygium adstringens* por cultivo de células en suspensión.

Dada la importancia farmacológica que poseen los compuestos derivados del metabolismo secundario de *Amphipterygium adstringens* y, por otra parte, debido a que es una especie silvestre con daños graves en sus poblaciones a causa del aprovechamiento comercial, el cultivo *in vitro* de células en suspensión es una alternativa viable para la producción de los metabolitos secundarios. Pese a esto, no existen estudios previos que refieran protocolos para la obtención de dichos compuestos a través de cultivos de células en suspensión, ni para el establecimiento de este tipo de cultivos *in vitro*, para esta especie o para su género. En este sentido, el interés de esta propuesta de trabajo es establecer dicho protocolo.

Justificación.

El cuachalalate es un árbol cuya corteza ha sido empleada en la medicina tradicional desde tiempos prehispánicos. En la actualidad se utiliza para tratar más de 25 enfermedades diferentes, destacando su eficacia en el tratamiento de la gastritis, la eliminación de úlceras gástricas y la cicatrización de heridas. Estas propiedades le confieren un estatus destacado en la herbolaria mexicana (Solares *et al.*, 2012).

Diversos estudios han demostrado que los extractos y compuestos obtenidos de la corteza del cuachalalate poseen propiedades antiinflamatorias, antiulcerogástricas, citotóxicas, antifúngicas y antimicrobianas (Navarrete *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2000; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004; Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Rosas, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

Sin embargo, Solares y sus colegas (2012) señalan que el método tradicional de obtención de la corteza es destructivo, ya que provoca la muerte de al menos el 40% de los árboles por deshidratación. Este problema se agrava cuando aumenta la demanda del cuachalalate por parte de empresas transnacionales, debido al descubrimiento de un compuesto con potencial para el control efectivo del adenocarcinoma.

Además, se ha informado sobre las dificultades en la reproducción natural de esta planta. Las investigaciones sobre métodos de propagación han revelado que las semillas de cuachalalate tienen una viabilidad de solo entre el 10% y el 50%, con un bajo porcentaje de germinación, según los resultados de Cid de la Torre en 2008.

Ante estos desafíos, el cultivo de células en suspensión resulta una alternativa prometedora para obtener metabolitos de interés, especialmente en el caso de plantas silvestres que requieren largos períodos de cultivo, tienen bajos rendimientos de metabolitos secundarios o carecen de procesos de síntesis química establecidos. Este sistema permite producir de manera independiente de factores externos como la disponibilidad de tierra, el clima y las

condiciones geopolíticas, al tiempo que ofrece un mayor control sobre las condiciones de cultivo, alcanzando mayor rendimiento y calidad. Por esta vía se han obtenido más de 30 productos naturales en mayores cantidades que las producidas en las plantas enteras (Fernández *et al.*, 2002).

Por todo esto, el cultivo *in vitro* podría ser una opción viable para la obtención de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica de *Amphipterygium adstringens*, ya que esta técnica ha sido utilizada de forma exitosa en diversas especies vegetales.

Hipótesis.

Debido a la grave destrucción de las poblaciones silvestres de *Amphipterygium adstringens* ocasionado por el aprovechamiento comercial derivado de su relevancia dentro de la herbolaria, se espera establecer el primer protocolo de cultivo *in vitro* de células en suspensión de dicha especie, que permita la obtención de alguno o varios de los compuestos con importancia farmacológica que produce en su metabolismo secundario la planta silvestre.

Objetivo General.

Obtener metabolitos secundarios de *Amphipterygium adstringens* a partir de cultivos de células en suspensión.

Objetivos Particulares.

- Determinar el explante y método de desinfestación más adecuado para generar tejido de callo friable.

- Evaluar diferentes concentraciones de hormonas vegetales para la obtención de callos.
- Obtener e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios obtenidos del cultivo de células en suspensión de *Amphipterygium adstringens*.

Material y Método.

Zona de Estudio.

La zona de recolección se encuentra localizada en la comunidad de Tecolapa, ubicada dentro del municipio de Olinalá, Guerrero. Esta comunidad pertenece a la región de La Montaña; se ubica entre los 98° 76' 41" de longitud oeste y los 17° 97' 30" de latitud norte, a una mediana altura de 1000 m.

El clima predominante es el subhúmedo semicálido, la temperatura media anual es de 22 °C, siendo en enero cuando oscila entre 5 y 7 °C. Las lluvias se presentan de junio a septiembre con una precipitación pluvial media anual de 800 mm. La flora se compone de selva baja caducifolia y una pequeña porción de bosques de pino–encino donde la altura de los árboles va desde 5 a 30 metros y la fauna está integrada por conejo, venado, armadillo, coyote, tejón, zorro, tlacuache, liebre, iguana, paloma, zopilote, culebra y víbora de cascabel, alacrán, rata y lagartija.

Recolecta del Material Biológico.

La recolecta del material biológico de *Amphipterygium adstringens* se llevó a cabo el 22 de septiembre del 2012 en la comunidad de Tecolapa, del municipio de Olinalá, Guerrero; en ejemplares femeninos, puesto que Olivera (1998) y Rosas-Acevedo y colaboradores (2011) reportan que la acumulación del ácido masticadienónico y el α -hidroximasticadienónico, compuestos con mayor actividad terapéutica, es mayor en las plantas femeninas que en las

plantas masculinas. Se recolectaron ramas completas, frutos secos y trozos de corteza, los cuales se transportaron en una hielera para mantenerlas frescas hasta el momento de ser utilizados.

La corteza se retiró con la ayuda de un cuchillo desinfectado siguiendo las recomendaciones de Solares y Gálvez (2002), haciendo un corte longitudinal de aproximadamente 10 cm de ancho y procurando que la profundidad no fuera mayor a 5 mm, para de esta forma evitar un daño al sistema vascular (Fig. 8); en cuanto a las ramas, se cortaron las de menor altura con ayuda de una navaja y los frutos secos se retiraron de las mismas.



Figura 8. Descortezamiento de *Amphipterygium adstringens* (Martínez Deaquino Patricia).

Obtención de explantes.

Procurando utilizar la mayor parte del material recolectado, los pedazos de corteza se cortaron en trozos de 1 cm² aproximadamente; los frutos secos se usaron una parte enteros y del resto se extrajeron las semillas y los embriones ubicados dentro de éstas.

Por otra parte, las ramas se dividieron en pequeños trozos de aproximadamente 2 cm, a los que se les realizó un corte de forma longitudinal; de éstas mismas ramas se desprendieron las hojas más jóvenes, se les retiró el peciolo, que también fue utilizado; al igual, los meristemas apicales se cortaron de los extremos superiores y posteriormente fueron cortados de forma longitudinal para su posterior cultivo.

Pruebas de desinfección.

Las pruebas se llevaron a cabo por lotes de 45 explantes de corteza, ramas, hojas, semillas, embriones y meristemas, se lavaron y cepillaron perfectamente con una solución jabonosa y enjuagados con agua corriente, para después ser colocados en etanol al 70%, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril en una ocasión, después se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones preparada con agua destilada, a la que se le agregó una gota de detergente líquido, y a continuación se volvieron a enjuagar con agua destilada estéril en tres ocasiones. Finalmente, se llevaron a una solución fungicida (1 g/L) y se dejaron ahí durante un minuto, antes de ser llevados a los medios de cultivo.

Las concentraciones de hipoclorito de sodio que se evaluaron y el tiempo en que los explantes se mantuvieron sumergidos tanto en el etanol como en el hipoclorito de sodio se pueden observar en el siguiente cuadro (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de hipoclorito de sodio usadas y lapsos de tiempo de desinfección en etanol e hipoclorito de sodio respectivamente (min, min).

		Hipoclorito de Sodio					
		5%	10%	15%	20%	25%	30%
E t a n o l	70%	1, 1	5, 1	5, 1	5, 1	5, 1	5, 1
		1, 5	5, 5	5, 5	5, 5	5, 5	5, 5
		1, 10	5, 10	5, 10	5, 10	5, 10	5, 10
		1, 15	5, 15	5, 15	5, 15	5, 15	5, 15
		1, 20	5, 20	5, 20	5, 20	5, 20	5, 20
		1, 25	5, 25	5, 25	5, 25	5, 25	5, 25

Preparación de medios de cultivo sólidos.

Medio de Cultivo 1: Se emplearon el medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con agar gel, agua de coco, azúcar y 2.5 mg/L de bencilaminopurina y adenina. Posteriormente se procedió a esterilizarlos en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio de Cultivo 2: Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con agar gel, agua de coco, azúcar, bencilaminopurina y ácido naftalenacético. La concentración de fitohormonas fue de 1 y 3 mg/L respectivamente. Finalmente, se esterilizaron en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Siembra de los explantes y formación de callos.

Se inocularon 3 explantes por frasco, bajo condiciones de esterilidad, para evitar así la contaminación de los cultivos, los cuales al concluir la inoculación se colocaron a temperatura ambiente y con un fotoperiodo de 10 horas luz, para el desarrollo favorable de los callos.

Preparación de medios de cultivo líquidos.

Estos medios de cultivo se elaboraron con Murashige y Skoog adicionado con agua de coco y azúcar, sin la presencia de ningún agente gelificante. Fueron esterilizados en la autoclave en condiciones estándar.

Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.

Para realizar los cultivos de células en suspensión los callos friables obtenidos se pasaron a los medios de cultivo líquidos, donde se mantuvieron en agitación constante para que se disgregaran y de esta forma se obtuvieron las suspensiones celulares. Finalmente estas células producidas se subcultivaron a medios de cultivo líquidos nuevos donde continuaron su propagación.

Extracción y purificación de los metabolitos.

Para separar el tejido vegetal del medio de cultivo, se realizó un filtrado a vacío. Las células recuperadas se maceraron exhaustivamente con hexano a temperatura ambiente.

Por otro lado, el medio de cultivo líquido recuperado se extrajo con acetato de etilo (4 X 200 mL), posteriormente la fase orgánica fue concentrada en el rotavapor. Finalmente, el extracto hexánico fue analizado por cromatografía de gases acoplada a masas.

Resultados y análisis de resultados.

Pruebas de Desinfestación.

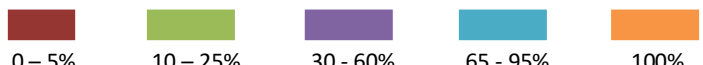
En cuanto a la desinfestación del material biológico, únicamente en el grupo desinfestado con etanol al 70% por 5 minutos e hipoclorito de sodio al 30% durante 25 minutos se pudo observar un porcentaje de desinfestación del 100% en los explantes de *Amphipterygium adstringens*.

Aunque con otras concentraciones de hipoclorito de sodio (15, 20, 25 y 30%, está última en los tiempos menores a 25 minutos) también se logró la desinfestación (Cuadro 5), ninguno de esos casos nos dio el 100%, ya que los explantes presentaban contaminación a los dos o tres días de la inoculación y con el paso de los días aumentaba dicha contaminación hasta que el lote completo estaba contaminado.

Por otra parte, con las concentraciones menores (5, 10% y 15% en los lapsos menores a 20 minutos) la contaminación de los explantes comenzó a observarse desde el día siguiente a la inoculación, hasta que finalmente el lote completo estaba contaminado.

Tabla 5. Porcentaje de frascos al tercer día de inoculación que no presentaron contaminación.

		Hipoclorito de Sodio					
		5%	10%	15%	20%	25%	30%
E t a n o l	70%	1, 1	5, 1	5, 1	5, 1	5, 1	5, 1
		1, 5	5, 5	5, 5	5, 5	5, 5	5, 5
		1, 10	5, 10	5, 10	5, 10	5, 10	5, 10
		1, 15	5, 15	5, 15	5, 15	5, 15	5, 15
		1, 20	5, 20	5, 20	5, 20	5, 20	5, 20
		1, 25	5, 25	5, 25	5, 25	5, 25	5, 25



0 – 5% 10 – 25% 30 - 60% 65 - 95% 100%

Elección del Explante y Medios de Cultivo.

Mediante la observación del desarrollo de los explantes cultivados se ha determinado, que el medio de cultivo adecuado para la obtención de callos es el Murashige and Skoog adicionado con agua de coco, 1 y 3 mg/L de bencilaminopurina y ácido naftalenacético respectivamente, ya que únicamente en este medio se obtuvieron callos friables de meristemas apicales, lo cual no ocurrió con el otro medio de cultivo utilizado con ninguno de los explantes en las 5 repeticiones que se hicieron.

Inoculación de los Medios y Desarrollo de los Cultivos.

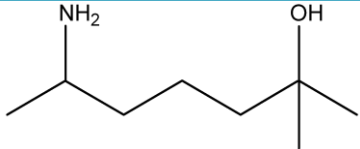
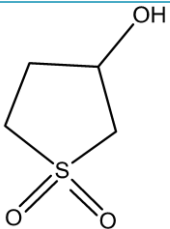
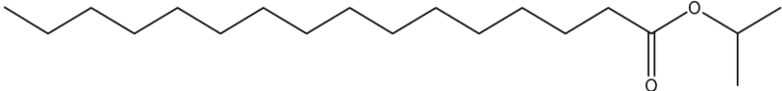
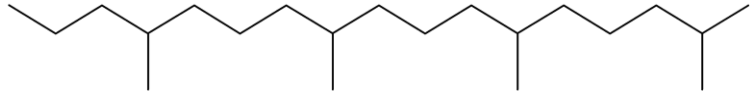
La inoculación de los cultivos no presentó ninguna contaminación a lo largo de su desarrollo.

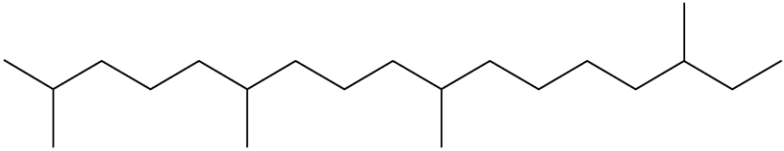
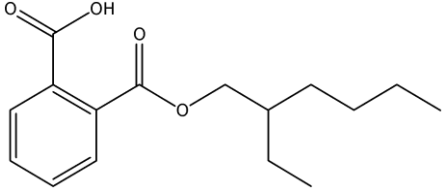
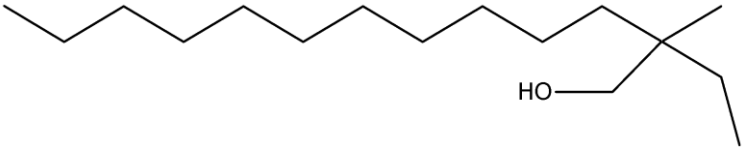
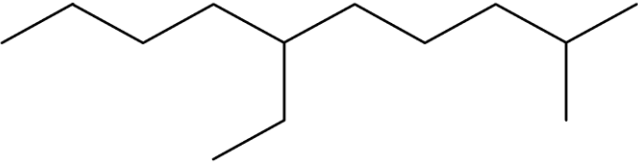
Los callos se formaron a partir de meristemas apicales, los cuales comenzaron su desarrollo después de transcurridos 45 días de su inoculación a los medios y sólo el 10% de ese lote presentó formación de callo.

En cuanto al resto de explantes, ningún otro presentó formación de callo.

Identificación de compuestos.

Tabla 6. Principales constituyentes identificados.

Compuesto	[M] ^{+a}	Fórmula	R _t (min)	Abundancia (%) ^b	Estructura
6-amino-2-metil-2-heptanol	145	C ₈ H ₁₉ NO	4.09	3.8	
Tetrahidro-1,1-dioxido-tiofeno-3-ol	136	C ₄ H ₈ O ₃ S	4.28	7.2	
Isopropil palmitato	298.5	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	22.75	3.4	
2,6,10,14-tetrametil-heptadecano	296.5	C ₂₁ H ₄₄	24.74	11.4	

Compuesto	[M] ⁺ ^a	Fórmula	R _t (min)	Abundancia (%) ^b	Estructura
2,6,10,15-tetrametil-heptadecano	296.5	C ₂₁ H ₄₄	25.82	17.2	
Ácido mono(2- etilhexil) ester 1,2- bencenodicarboxílico	278.5	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	28.83	16.6	
2-etil-2-metil- tridecanol	242.6	C ₁₆ H ₃₄ O	32.36	3.4	
6-etil-2metil-decano	184.36	C ₁₃ H ₂₈	37.57	3.5	

^a determinados de CG-SM.

^b determinados en base a las áreas de los picos obtenidos en CG-SM.

Discusión.

El presente estudio reveló que es posible la inducción de callos y el establecimiento de suspensiones celulares de *Amphipterygium adstringens*, a partir de meristemos apicales, con una desinfección de etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 30%, en lapsos de 5 y 25 minutos respectivamente, cultivados en medio Murashige and Skoog adicionados con 1 mg/L de bencilaminopurina y 3 mg/L de ácido naftalenacético. Este protocolo sería el primero en establecerse para el cultivo *in vitro* de células en suspensión de esta especie y su género, por lo que estos resultados son de gran interés.

Por otra parte, en los cultivos de células en suspensión de *Amphipterygium adstringens*, no se encuentran presentes ninguno de los compuestos reportados en la literatura para esta especie, sin embargo, se identificaron ácidos grasos que de acuerdo con la ruta biosintética propuesta por Walters y colaboradores son precursores de los ácidos anacárdicos (Rosas, 2005), uno de los grupos de metabolitos principales de esta especie y que se han reportado con diferentes actividades farmacológicas.

La ausencia de los metabolitos de interés en los cultivos celulares puede atribuirse a que el tejido de callo está conformado por células indiferenciadas, y se sabe que muchos metabolitos secundarios se sintetizan integrados a eventos de diferenciación (Kreis, 2007). Por ejemplo, los resultados de las investigaciones realizadas con aceites esenciales mostraron que las células indiferenciadas no son capaces de producir monoterpenos por la ausencia de estructuras capaces de acumular estas sustancias (Dörnenberg y Knorr, 1997). El estudio anatómico de la corteza de cuachalalate ha demostrado la presencia de abundantes radios con canales resiníferos en la corteza (Orduño, 1998; Rosas-Acevedo *et al.*, 2011), y Olivera (1998) detectó la presencia de los ácidos 3 α - hidroximasticadienónico y masticadienónico en la resina de la corteza la cual obtuvo solamente pinchando la corteza, por lo cual es probable que los metabolitos de interés se sintetizen en estructuras especializadas.

Otro factor importante en la producción de metabolitos secundarios es que las plantas en la naturaleza producen estos compuestos como mecanismo de defensa en respuesta a condiciones adversas. Por lo que se ha vuelto frecuente el uso de inductores bióticos o abióticos para la producción de metabolitos secundarios por cultivo de células en suspensión para mejorar la productividad de diversos productos de interés farmacéutico (Bhatia, 2015; Furusaki y Takeda, 2011).

Finalmente, se ha detectado que bajo condiciones de cultivo *in vitro* se pueden obtener nuevas sustancias no sintetizadas por las plantas en su hábitat natural, algunas de ellas con actividad biológica, lo cual pone de manifiesto la relevancia de este tipo de cultivo de células para obtener nuevos metabolitos secundarios (Furusaki y Takeda, 2011; Martín *et al.*, 2018; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Conclusiones

De acuerdo con los resultados se puede concluir que:

- Los meristemos apicales de *Amphipterygium adstringens* son el tejido más adecuado para obtención de callos friables.
- El medio de cultivo Murashige & Skoog adicionado con bencilaminopurina y ácido naftalenacético induce la formación de tejido de callo en *Amphipterygium adstringens*.
- El cultivo de células en suspensión permitió detectar la presencia de ácidos grasos que son los precursores de ácidos anacárdicos uno de los grupos de metabolitos que han sido aislados del cuachalalate.
- El conocimiento generado y experiencia adquirida, brindan una base para futuros estudio orientados a la obtención de metabolitos secundarios mediante el cultivo *in vitro* de células en suspensión de esta especie.

Bibliografía

- Aguirre A., M. T. (1983). Estudio farmacológico del efecto antiulcerogástrico de una fracción pura de la planta *Juliania adstringens*, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 35-52.
- Alvarado F., J. (2018). Evaluación del efecto cicatrizante y angiogénico de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico, masticadienónico y anacárdicos aislados de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), Tesis licenciatura, UNAM, México, pp 56-60.
- Araiza T., D. (2007). Evaluación del efecto antiulceroso del té de la corteza de cuachalalate (*A. adstringens*) en ratas Wistar, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 13-57.
- Argueta, A., M. Cano y E. Rodarte. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, tomo 1, Instituto Nacional Indigenista, México, pp 58, 542-543.
- Arrieta, J., J. Benítez, E. Flores, C. Castillo y A. Navarrete. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. En: *Planta Medica*, Vol. 69, Núm. 10, pp 905-909.
- Arroyo R., G. (1994). Estudio de las propiedades fotoprotectoras-cosméticas del extracto de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate), Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 59-83.
- Bhatia, S. (2015). Application of plant biotechnology, en: *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R. y Bera, T. Capítulo 5. pp. 157-207

- Benítez Y., J. (1998). Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 90-95.
- Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi y E. Gontier. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. En: Plant Science, Vol. 161, pp 839-851.
- Boyás, D., F. Solares, J. M. Javelly, M. M. Linares y M. A. Cervantes. (1988). Diagnóstico forestal del estado de Morelos, INIFAP-SAHR, México, p 333.
- Bravo, L., Y. Bermúdez y B. Montes. (2000). Inhibición de *Fusarium miniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. En: Manejo Integrado de Plagas, CEPROBI, Instituto Politécnico Nacional, Núm. 57, pp 29-34.
- Cajero S., W. (2016). Efecto inhibitor del extracto hexánico y acuoso de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre las subfamilias de los citocromos P450 1A y 2B, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 38-45.
- Canales M., T. Hernández, J. Caballero, A. Romo de Vivar, G. Ávila, A. Duran y R. Lira. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla; México. En: Journal Ethnopharmacol, Vol. 97, Núm. 3, pp 429-439.
- Carrasco C., A. L. y E. Rivera A. (2009). Actividad antibacteriana de compuestos aislados de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre bacterias patógenas de la cavidad oral, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 34-46.

- Castillo J., A. (2004). Uso del Cuachalalate como enjuague bucal para el tratamiento de gingivitis, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 31-71.
- Castillo J., A. (2011). Estudio de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de la corteza de *Amphipterygium adstringens*, Tesis de doctorado, UNAM, México, pp 61-127.
- Castillo-Juárez, I., F. Rivero-Cruz, H. Celis, e I. Romero. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. En: Journal of Ethnopharmacology, Vol. 114, Núm. 1, pp 72-77.
- Cid de la T., K. S. (2008). Propagación Sexual del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), Especie de Uso Medicinal, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 68-86.
- Cortes R., P. (1979). Estudio bibliográfico de la planta denominada cuachalalate, desde el punto de vista de la toxicología, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 33-44.
- Cruz R., C. M. (2008). Efecto del extracto acuoso de *A. adstringens* (Cuachalalate) en *Helicobacter pylori*, evidenciado por el método de Mosmann y microscopía electrónica de transmisión, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 64-79.
- Cubillo C., L. (2006). Evaluación del efecto antiulceroso de la infusión de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en un modelo ulcerogénico experimental en ratas Wistar, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp. 39-59.
- Cuevas F., X. M. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). En: Ibugana, Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara, Vol. 13, Núm. 1, pp 27-47.

- Domínguez R., M. (2005). Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico aislado de la corteza de cuachalalate y de su éster metílico evaluada en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 47-57.
- Domínguez, X.A., R. Franco, S. García, M. E. Porras y G. Vázquez. (1983). Plantas medicinales mexicanas XLVIII. Estructura del ácido instipolinácico separado de la corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) Schl. En: Revista latinoamericana de química, Vol. 14, Núm. 2, pp 99-100.
- Dörnenberg, H. y D. Knorr. (1997). Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. En: Revista Food technology Vol. 51, Núm. 11, pp 47-54.
- Fernández R., J. (2003). Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en lesiones cutáneas de rata Wistar, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 57-85.
- Fernández C., O., E. Ojito C., L. Pérez A. (2002). Obtención de flavonoides a partir del cultivo en suspensión de células vegetales de *Matricaria recutita* L. En: Rev. Universidad Eafit, Núm. 127, pp 63-67.
- Furusaki, S. y Takeda, T. (2011). Bioreactors for plant cell culture. En: Comprehensive Biotechnology, 2ª edición, volumen 2. Moo-Young, M. (editor). pp. 361-372.
- González, E. y J. Delgado. (1962). Phytochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*. En: Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 51, Núm. 8, pp 786-790.

- González, E., G. Mckenna y J. Delgado. (1962). Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringens*. En: Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 51, Núm. 9, pp 901-903.
- Guzmán P., A. M. (2012). Germinación de semillas de tres procedencias de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl (Julianiaceae), Tesis de licenciatura, Universidad del mar Campus Puerto Escondido, México, pp 45-84.
- Hernández G., C. (2006). Estudio del efecto antígeno tóxico del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) evaluado con el ensayo cometa (electroforesis unicelular en gel), Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro, México, pp 31-45.
- Hersch-Martínez, P. (1995). Commercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla, México. En: Economic Botany, Vol. 49, Núm. 2, pp 197-206.
- Jaury C., A. (2009). Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de *Juliania adstringens* (Schldl.) Schldl (cuachalalate), Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 13-31.
- Jiménez A., M. B. (2004). Estudio de la capacidad apoptótica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) evaluada con el ensayo cometa (*electroforesis unicelular en gel*), Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 35-45.
- Jiménez R., R. (2016). Actividad terapéutica del extracto etanólico de *Juliania adstringens* en un modelo murino de colitis experimental, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 26-58.
- Jiménez R., N. y X. M. Cuevas F. (2001). Morfología del polen de *Amphipterygium Schiede ex Standley* (Julianiaceae). En: Ibugana, Vol. 7, Núm. 1-3, pp 65-73.

- Knauth P., G. J. Acevedo-Hernández, M. E. Cano, M. Gutiérrez-Lomelí y Z. López. (2018). *In vitro* bioactivity of methanolic extracts from *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl., *Chenopodium ambrosioides* L., *Cirsium mexicanum* DC., *Eryngium carlinae* F. Delaroché, and *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. used in traditional medicine in Mexico. En: Hindawi, Evidence-Based complementary and alternative medicine, Vol. 2018, pp 1-11.
- Kreis W. (2007). In-Vitro Culturing Techniques of Medicinal Plants. En: Kayser O, Quax WJ (eds) Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications. Wiley-VCH, Weinheim, pp 159–185
- Lara O., F., y Márquez A., C. (1996). Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica, UNAM, México, p 43.
- López Z., J. Villarruel-Muñoz, J. Rico, T. Terrazas, J. Salazar-Flores y P. Knauth. (2015). Cytotoxic effects and antimicrobial activity of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) extracts as used in a traditional way. En: Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, Vol. 5, Núm. 2, pp 47-54.
- Makino, M., T. Motegi y Y. Fijimoto. (2003). Tirucallane-type triterpenes from *Juliana adstringens*. En: Phytochemistry, Vol. 65, Núm. 7, pp 891-896.
- Manzanilla R., M. A. (2004). Inducción de embriogénesis somática de tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.), Tesis de maestría, Universidad de Colima, México, pp 48-70.
- Martín, S., Torres, M. y Saco, D. (2018). Biotecnología vegetal. Cultivos vegetales *in vitro*. Obtención de productos de interés farmacéutico. En: Fundamentos de biotecnología

farmacéutica. Martín Brieva, H. (coord.). Capítulo 14. pp. 353-376. Dextra Editorial, Madrid.

Martínez F., J. (2015). Impacto de la cosecha de corteza de *Amphipterygium adstringens* (Schiede ex Schlecht) Standl sobre las funciones reproductivas (floración y fructificación) en la localidad de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla, Tesis de maestría, UNAM, México; pp 11-46.

Martínez U., L. S. (1994). Evaluación de la actividad citoprotectora del extracto metanólico del *Amphipterygium adstringens* sobre úlcera gástrica en rata Wistar, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 50-77.

Martínez V., J. de J. (1986). Estudio químico y determinación de las acciones hipoglucemiantes y cicatrizante del cuachalalate (*Juliania adstringens*), Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Guadalajara, México, pp 46-62.

Martínez, R. E. y G. R. Flores. (2003). Estudio de la acción anti-clastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 32-50.

Mata, R., F. Calzada, A. Navarrete, F. Del Río y G. Delgado. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. En: Journal of Ethnopharmacology, Vol. 34, Núm. 2-3, pp 147-154.

Monroy M., R. y H. Colín. (2000). La aplicación del conocimiento etnobotánico, el caso de un vivero en el Estado de Morelos. En: Revista de Geografía Agrícola, estudios regionales de la agricultura mexicana, Universidad Autónoma Chapingo, Núm. 30, pp. 21-31.

- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. (2010). Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales, En: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, Ed. INTA, Argentina, pp 17-24.
- Muñoz C., N. R. (2013). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad inhibidora del sistema de censado quórum bacteriano, de las cortezas de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. Y *Ceiba spp.* Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México, pp 85-96.
- Navarrete C., A. (1982). Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliania adstringens* (Cuachalalate), Tesis de Licenciatura, UNAM, México, pp. 45-53.
- Navarrete C., A. (1986). Estudio químico de plantas usadas en medicina tradicional: Constituyente de *Chenopodium graveolens* Willd, *Chenopodium ambrosioides* L., y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlencht. Tesis de maestría, UNAM, México, pp. 189.
- Navarrete, A., B. Ávila, V. C. Joshi, y X. Ji. (2006). Quantitative determination of triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by liquid chromatography and thin-layer chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations. En: *Journal of Association of Official Analytical Chemist International*, Vol. 89, Núm. 1, pp 1-7.
- Navarrete C., A. y R. Mata E. (2009). *Plantas medicinales de México. Monografía científica. Pruebas de control de calidad (identidad y composición), eficacia y seguridad. Cuachalalate (Amphipterygium adstringens)*, Ed. Doctrina y ley LTDA, México, pp 2-23.

- Navarrete, A., R. Mata y G. Delgado. (1989). Alkylsuccinic acids from *Amphipterygium adstringens*. En: *Planta Medica*, Vol. 55, Núm. 6, p 579.
- Navarrete, A., L. S. Martínez-Urbe, y B. Reyes. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. En: *Phytotherapy Research*, Vol. 12, Núm. 1, pp 1-4.
- Navarrete C., A., B. Reyes T., A. Silva M., C. Sixto A., V. Islas P. y E. Estrada L. (1990). Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate). En: *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, Vol. 21, núm. 3, pp 28-32.
- Newman D. J., G. M. Cragg y K. M. Snader. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. En: *Natural Products Report*, Vol. 17, Núm. 3, pp 215-234.
- Núñez L., I. G. (2013). Evaluación de la capacidad alelopática de las fracciones hidrosolubles del extracto etanólico de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht*), Tesis de licenciatura, UNAM, México, 30-60.
- Olivera O., A. G. (1998). Estudio fitoquímico del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Estado de México, p 73.
- Olivera O., A. G., M. Soto H., M. Martínez V., T. Terrazas S. y F. Solares A. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht*). En: *Journal Ethnopharmacology*, Vol. 68, Núm. 1-3, pp 109-113.
- Orduño, C. A. (1998). Anatomía de la corteza de cuatro especies de selva mediana caducifolia en el estado de Morelos: origen, desarrollo y regeneración. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

- Orozco M., J. (2010). Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *Juliania adstringens* y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, Tesis de maestría, UNAM, México, pp 39-100.
- Osuna T., L., M. E. Tapia P. y A. Aguilar C. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico, Universitat de Barcelona, España, pp 9-18.
- Oviedo-Chávez, I., T. Ramírez-Apan, M. Soto-Hernández y M. Martínez-Vázquez. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. En: Phytomedicine, Vol. 11, Núm. 5, pp 436-445.
- Pennington D., T. y J. Sarukhán, (2005). Árboles tropicales de México, manual para la identificación de las principales especies, 3ª edición, UNAM, México, p 413.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011) Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal. 11(4). pp 195-211
- Pérez G., R. M., C. Pérez G. y M. S. Pérez G. (1993). A new triterpenoid from the bark of *Juliana adstringens*. En: International Journal of Pharmacognosy, Vol. 31, Núm. 3, pp. 185-188.
- Pérez-Salgado J., M. D. Ángel-Ríos, M. Cayetano-Catarino, T. Bernabé-González y E. I. Pérez-Ángel. (2016). Efectividad biológica *in vitro* de *Tagetes lucida* CAV, *Ricinus communis* L., *Nicotiana glauca* Graham, *Amphipterygium adstringens* Schltdl y el hongo *Ganoderma lucidum* Curtis en larvas de *Copaxa multifenestrata* Herrich-Schaffer 1858 en aguacate. En: Entomología mexicana, Vol. 3, pp 255-261.

- Portilla L., E. (2007). Evaluación genotóxica *in vitro* del extracto acuoso de la corteza de *Amphipterygium adstringens* por medio de los intercambios entre cromátidas hermanas, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 38-45.
- Quintanar, D., J. Ávila y G. Arroyo. (1994). Estudio de las propiedades fotoprotectoras-cosméticas del extracto de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate). En: Ciencia cosmética, Vol. 1, pp. 16-17.
- Quintanar T., M. (2005). Inducción de intercambios de cromátidas hermanas y modificación de la cinética de proliferación celular provocada por el extracto hexánico de cuachalalate en cultivo de linfocitos humanos, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 51-60.
- Revelo G., J. C. (2010). Obtención de derivados, por métodos químicos, de triterpenos aislados de *Amphipterygium adstringens* y su evaluación como agentes citotóxicos y antiinflamatorios, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 23-32.
- Rivero-Cruz, I., L. Acevedo, J. A. Guerrero, S. Martínez, R. Bye, R. Pereda-Miranda, S. Franzblau, B. N. Timmermann y R. Mata. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. En: Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 57, Núm. 9, pp 1117-1126.
- Roca, W. y L. Mroginski. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones, CIAT, Colombia, pp 595-604.
- Rodríguez B., V. (2015). Determinación del efecto cicatrizante de los extractos de *Amphipterygium adstringens* y *Datura innoxia* Miller, Tesis de licenciatura, IPN, México, pp. 24-67.

- Rodríguez G., A. (2011). Elaboración de biopelículas a base de quitosán y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos periodontopatógenos, Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, pp 48-92.
- Rodríguez-Canales M., R. Jiménez-Rivas, M. M. Canales-Martínez, A. J. García-López, Nelly Rivera-Yáñez, O. Nieto-Yáñez, Y. Ledesma-Soto, L. E. Sánchez-Torres, M. Rodríguez-Sosa, L. I. Terrazas y M. A. Rodríguez-Monroy. (2016). Protective effect of *Amphipterygium adstringens* extract on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice. En: Mediators of Inflammation, vol. 2016, pp 1-10.
- Rodríguez-García A., I. T. A. Peixoto, M. J. Verde-Star, S. De la Torre-Zavala, H. Aviles-Arnaut y A. L. T. G. Ruiz. (2015). *In Vitro* antimicrobial and antiproliferative activity of *Amphipterygium adstringens*. En: Evidence-Based complementary and alternative medicine, vol. 2015, pp 1-7.
- Rosas A., H. (2000). Análisis fitoquímico de *Cyrtocarpa procera* H.B.K. y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht, Tesis de maestría, Instituto de Recursos Naturales Colegio de Postgraduados, México, pp 3-19.
- Rosas, A. H. (2005). Estudio químico y biológico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht, Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, México, p 110.
- Rosas A., H, M. Domínguez R., S. Díaz B. A., M. Soto H., M. Martínez V., T. Terrazas y G. Valencia del T. (2006). Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. En: Mutation Research, Vol. 609, Núm. 1, pp 43-46.

- Rosas-Acevedo H., T. Terrazas, M. E. González-Trujano, Y. Guzmán y M. Soto-Hernández. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. En: Journal of Ethnopharmacology, Vol. 134, Núm. 1, pp 67-73.
- Solares A., F. (1995). Capacidad de regeneración de la corteza y evaluación fitoquímica antes y después del descortezamiento en Cuachalalate, Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, México, p 97.
- Solares A., F. y M. C. Gálvez C. (2002). Diagnóstico biofísico y socioeconómico de las Áreas Naturales Protegidas de jurisdicción estatal en Morelos. INIFAP-CEAMA-Morelos, México, p 168.
- Solares A., F. y M. C. Gálvez C. (2002). Manual para una producción sustentable de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht), En: Revista Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Publicación especial, Núm.34, pp 1-7.
- Solares A., F., J. Jasso M., J. Vargas H., M. R. Soto H. y C. Rodríguez F. (2006). Capacidad de regeneración en grosor y lateral en corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en el estado de Morelos. En: Rev. Ra Ximhai, Universidad Autónoma Indígena de México, Vol. 2, Núm. 2, pp 481-495.
- Solares A. F., J. M. P. Vázquez A. y M. C. Gálvez C. (2012). Canales de comercialización de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en México. En: Revista Mexicana Ciencias Forestales, Vol. 3 Núm. 12, pp 29-42.

- Soriano-García, M., R. A. Toscano, B. Ortiz, A. Navarrete, R. Sánchez-Obregón, H. Barrios, F. Yuste. (1987). Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α ,13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z) -3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). En: Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, Vol. 43, Núm. 5, pp 990-992.
- Taiz L. y E. Zeiger. (2006). Fisiología vegetal, Vol. I, Publicacions de la Universitat Jaume, España, pp 529-536.
- Tyman, J. H. P. (1979). Non-isoprenoid long Chain phenols. En: Chemical Society Reviews, Vol. 8, Núm. 4, pp. 499-537.
- Tyman, J. H. P. (2001). Chemistry and biochemistry of anacardic acids. En: Recent Research Developments in lipids, Vol. 5, pp. 125-145.
- Walters D. S., R. Craig y R. O. Mumma. (1990). Fatty acid incorporation in the biosynthesis of anacardic acids of geraniums. En: Phytochemistry, Vol. 29, Núm. 6, pp. 1815-1822.
- Zacarías S., M. del R. (1993). Estudios preliminares del efecto fungicida del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y de la cancerina (*Hemiangium excelsum*) sobre *Saprolegnia* sp., Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 31-45.
- Zamora T., P. E. (2003). Evaluación del aprovechamiento potencial del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht) en San Juan Bautista Jayacatlán Oaxaca, Tesis de licenciatura, UNAM, México, pp 22-43.