



**Universidad Nacional Autónoma De México**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Metabolitos secundarios de  
*Amphipterygium molle*, cuachalalate:  
Evaluación de su actividad citotóxica sobre  
*Mycobacterium tuberculosis* y la línea celular  
SW620 de cáncer de colon**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

**PRESENTA:**

**ALMA ANGÉLICA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ**

**TUTOR:**

**Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017**





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.

**1. Datos del alumno**

Hernández

Sánchez

Alma Angélica

044 55 45 25 12 49

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

309218243

**2. Datos del asesor.**

Dra.

Silvia Laura

Guzmán

Gutiérrez

**3. Datos del sinodal 1**

Dr.

Ignacio

González

Sánchez

**4. Datos del sinodal 2**

Dra.

Helia Reyna

Osuna

Fernández

**5. Datos del sinodal 3**

M. en C.

Jorge Iván

Castillo

Arellano

**6. Datos del sinodal 4**

M. en C.

Rosa María

Fonseca

Juárez

**7. Datos de la tesis**

Metabolitos secundarios de *Amphipterygium molle*, cuachalalate: Evaluación de su actividad citotóxica sobre *Mycobacterium tuberculosis* y la línea celular SW620 de cáncer de colon.

65 p.

2017

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-4A del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, en el Laboratorio 206 Edif. F del Departamento de Biología, Facultad de Química y en el Laboratorio de Bioseguridad (BSL3) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la UNAM.

La presente investigación fue financiada por Proyecto IN210016 “Bioprospección de la Flora Mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral” y el proyecto “Nuevas alternativas de tratamiento para enfermedades Infecciosas” (NUATEI-IIB-UNAM).

Agradezco por las becas otorgadas por el proyecto “Compuestos antivirales (VIH-1) de Árboles Tropicales (Clusiaceae) de México: Estudio Químico y Toxicogenómico” PAPIIT-DGAPA-UNAM (IG 2005-13) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el Convenio Ayudante De Investigador Nacional Nivel III o Emerito, Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

## Agradecimientos

A mi asesora, la Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez Investigadora Catedrática CONACYT, con toda sinceridad, admiración y un gran cariño. Agradezco el tiempo, la paciencia, la confianza, la amistad y todos los conocimientos que me ha brindado durante estos años como su alumna.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Investigador Titular B y titular laboratorio 2-4A del Instituto de Química UNAM, por tener siempre las puertas abiertas de su laboratorio, por su amistad, confianza y por brindarme los recursos necesarios que me permitieron realizar mi proyecto de titulación.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes Profesor de Carrera 'Titular' de TC en el Laboratorio 206 del Departamento de Biología de la Facultad de Química, Edif. F, UNAM.

Al Dr. Ignacio Gonzáles Sánchez, Investigador Catedrático CONACyT-UAM Xochimilco, por su asesoría para realizar los experimentos de viabilidad y análisis de citotoxicidad.

A la Dra. Mayra Silva Miranda, Investigadora Catedrática CONACyT-IIB, UNAM, por su apoyo en la realización de los experimentos con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

A la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, técnico académico en el Área de Resonancia Magnética Nuclear en el Instituto de Química de la UNAM, por su apoyo en la realización de la resonancia de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Al M. en C. Simón Hernández Ortega, técnico académico de Rayos X en el Instituto de Química de la UNAM, por su apoyo en la obtención de los análisis de Rayos X, de los compuestos aislados en esta tesis.

Al Dr. Francisco Javier Pérez Flores, Técnico académico en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de UNAM por su apoyo en la obtención de los espectros por impacto electrónico en un sistema acoplado a gases masas.

A la Dra. Xochitl Marisol Cuevas Figueroa, Botánica del Instituto de Botánica (IBUG), Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, por su ayuda para la identificación y colecta de material vegetal.

## ***Dedicatoria***

*A mis padres quienes me enseñaron el amor a la vida y han velado por mi bienestar,  
sin ustedes no lo hubiera logrado y sin ustedes no sería bióloga.*

*A mi hermana Ale por quererme y siempre apoyarme.*

*A mi hermana Alicia que me ha cuidado desde pequeña, eres mi ejemplo a seguir.*

*A mis amigos que siempre me han dado grandes momentos de felicidad y se han convertido  
en mi segunda familia.*

*A esa persona que amo y que se ha convertido en un gran apoyo.*

*Gracias por impulsarme a ser una mejor persona.*

*A todos ustedes Gracias.*

*Han estado en las buenas y en las malas,*

*Son parte de mí y de mis éxitos.*

*Los amo.*

*Las flores nacen y se marchitan, las estrellas brillan, pero se extinguen, la tierra, el sol, nuestra galaxia, incluso algo tan inmenso como este universo terminará extinguiéndose... en comparación, la existencia del ser humano es tan solo como un efímero suspiro.*

*Buda  
Caballeros del zodiaco  
La coalición dorada*

---

---

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	- 3 -
RESUMEN .....	- 4 -
1. INTRODUCCIÓN .....	- 5 -
2. ANTECEDENTES .....	- 6 -
2.1 Cuachalalate.....	- 6 -
2.1.1 Propiedades del cuachalalate.....	- 6 -
2.2 Género Amphipterygium .....	- 6 -
2.2.1 Descripción del género .....	- 7 -
2.2.2 Amphipterygium molle .....	- 9 -
2.2.3 Química y actividad biológica .....	- 10 -
2.3 Tuberculosis .....	- 14 -
2.4 Cáncer de colorrectal .....	- 15 -
3. JUSTIFICACIÓN .....	- 16 -
4. HIPÓTESIS .....	- 16 -
5. OBJETIVOS .....	- 16 -
5.1 General .....	- 16 -
5.2 Particulares .....	- 16 -
6. METODOLOGÍA .....	- 17 -
6.1 Estrategia experimental .....	- 17 -
6.2 Colecta de material vegetal.....	- 18 -
6.3 Preparación de extractos .....	- 18 -
6.4 Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina.....	- 18 -
6.5 Cromatografía en columna de los extractos (Fraccionamientos).....	- 18 -
6.6 Identificación de los compuestos aislados .....	- 19 -
6.7 Ensayo de Resazurina en placa (REMA o Resazurin Microtitter Assay).....	- 20 -
6.7.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) .....	- 20 -
6.8 Cultivo celular .....	- 21 -
6.8.1 Línea celular SW620 .....	- 21 -
6.8.2 Mantenimiento y propagación de la línea celular .....	- 22 -
6.8.3 Congelación de células .....	- 22 -
6.8.4 Descongelación de las células.....	- 23 -



---

---

6.8.5	Conteo celular .....	- 23 -
6.9	Evaluación de la actividad citotóxica. Ensayo MTT .....	- 24 -
6.9.1	Determinación de la actividad citotóxica.....	- 24 -
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	- 26 -
7.1	Colecta de material vegetal y rendimiento de los extractos.....	- 26 -
7.2	Análisis de Cromatográfico .....	- 26 -
7.3	Identificación de los compuestos aislados y análisis espectroscópico.....	- 30 -
7.3.1	Ácido 3-epi-oleanólico .....	- 30 -
7.3.2	Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico.....	- 35 -
7.3.3	Ácido masticadienónico.....	- 39 -
7.3.4	Ácido 3-oxo-6 $\beta$ - hidroxiolean-12-en 28-oico.....	- 43 -
7.3.5	Fridelan-3-ona.....	- 45 -
7.4	Actividad biológica de extractos y compuestos aislados de <i>A. molle</i> .....	- 47 -
7.4.1	Actividad sobre <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv .....	- 47 -
7.4.2	Actividad citotóxica sobre la línea celular SW620.....	- 49 -
8.	CONCLUSIONES .....	- 52 -
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	- 53 -
	ANEXO. ....	- 58 -

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	
AcOEt	Acetato de Etilo
ADC	Albumina-Dextrosa-Catalasa
<b>C</b>	
CC	Cromatografía en columna
CCF-FN	Cromatografía en Capa Fina-Fase Normal
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
<b>D</b>	
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O	Densidad óptica
<b>E</b>	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de masas
<b>H</b>	
HEPES	Ácido 4-(2 hidroxietil) 1-piperacil- etanosulfónico
CLAR	Cromatografía Líquida de alta resolución
<b>M</b>	
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MTT	Metil Tiazol Tetrazolio
M/z	Masa/carga
<b>O</b>	
OMS	Organización Mundial de la Salud
<b>P</b>	
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>R</b>	
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
<b>S</b>	
SW620	Línea celular de cáncer de colon
SFB	Suero fetal Bovino
<b>T</b>	
TB-MDR	Tuberculosis multirresistente
<b>V</b>	
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

---

## RESUMEN

En México las especies del género *Amphipterygium* son conocidas como “cuachalalate” y son valiosas por su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, dérmicas y respiratorias. El género *Amphipterygium* ha sido objeto de estudios etnobotánicos, químicos, farmacológicos, y toxicológicos; sin embargo, debido a que no se contaba con estudios de la actividad biológica ni de la composición química de *Amphipterygium molle*, en esta tesis se realizó el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios mayoritarios a partir de extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de corteza y ramas de *A. molle*. Se lograron aislar los siguientes triterpenos: ácido 3-*epi*-oleanólico, ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico, ácido masticadienónico, 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico y fridelan-3-ona. Se evaluó la actividad citotóxica de extractos y metabolitos secundarios sobre la línea celular de cáncer de colon SW620, donde el extracto de ramas obtuvo la mejor actividad (IC<sub>50</sub>: 108.76  $\pm$  9.94  $\mu$ g/mL) en comparación con el extracto de corteza (IC<sub>50</sub>: >150\*  $\mu$ g/mL), por otra parte el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico (IC<sub>50</sub>: 83.12 $\pm$ 2.06  $\mu$ M) presentó una moderada actividad citotóxica sobre la línea celular SW620. También se evaluó la actividad contra *M. tuberculosis* del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico y el ácido 3-*epi*-oleanólico que presentaron una MIC de 62.5  $\mu$ M y 125  $\mu$ M, respectivamente.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el hombre ha desarrollado su propia medicina tradicional, empleando plantas, hongos e incluso animales como remedio de diversas enfermedades. Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS<sup>A</sup>, 2016).

Hoy en día las plantas con propiedades medicinales son una fuente de compuestos que pueden ser utilizados como fármacos o como modelos para sintetizar moléculas para el tratamiento de diversas enfermedades como los quimioterapéuticos, que son sustancias químicas que tienen como finalidad ser tóxicas para los microorganismos patógenos o las células neoplásicas, pero con pocos efectos secundarios para el huésped.

En México la medicina tradicional se remonta al mundo prehispánico, donde alcanza gran proyección e importancia entre los diferentes pueblos mesoamericanos (Navarajo, 2004). El género *Amphipterygium* por su utilidad medicinal es valiosa para el pueblo mexicano, la corteza de sus árboles se utiliza para curar diversas enfermedades (Cuevas 2001) y ha sido objeto de estudios etnobotánicos, químicos, farmacológicos y toxicológicos, como los estudios realizados por Chávez *et al.*, en 2005, Oviedo *et al.*, 2005 y Gómez-Cansino *et al.*, 2015.

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cuachalalate

En México las plantas del género *Amphipterygium* son populares por su eficacia para curar distintas enfermedades y se les conoce comúnmente como cuachalalate que es la hispanización de "cuauchachalatli" palabra de origen náhuatl, pero también es conocido como cuachalalá, matixerán, pacueco, palo santo, volador y cuachinala (Cuevas 2001).

#### 2.1.1 Propiedades del cuachalalate

La corteza del cuachalalate es la parte más comúnmente utilizada para curar varias enfermedades y se comercializa en varias entidades de México (Solares y Gálvez, 2002).

Está reportado que, a nivel gastrointestinal, el cuachalalate ayuda en el tratamiento del cáncer de estómago, úlcera gástrica, gastritis, dolores de estómago, inflamación intestinal, para limpiar el estómago, para el hígado y el vaso; en el caso de enfermedades del sistema respiratorio, se utiliza para aliviar la tos, inflamación de las anginas, resfriados, y tuberculosis, entre otras enfermedades. También se reporta su eficacia en el tratamiento de lesiones cutáneas, acné, llagas, infecciones vaginales, inflamación o caída de la matriz y ovarios (Atlas De La Medicina Tradicional, 2009).

### 2.2 Género *Amphipterygium*

La clasificación del cuachalalate se muestra en el cuadro 1, tomando en cuenta a Angiosperm Phylogeny Website (Stevens, P. F. 2001). La familia Anacardiaceae comprende 75 géneros y cerca de 600(-700) especies en el mundo, de los cuales 20 géneros y 62 especies se distribuyen en México; son árboles o arbustos, rara vez trepadoras leñosas, dioicos, monoicos, polígamos, perennifolios o deciduos, corteza con conductos resiníferos y de aceites alergénicos, ocasionalmente exfoliante (Medina & Fonseca 2009).

Esta familia cuenta con árboles de importancia económica, llegan a ser cultivados por los frutos comestibles un ejemplo es *Mangifera indica L.* (mango) o *Spondias pupurea* (ciruelo), otras especies son apreciadas por las resinas y aceites que producen, inclusive algunas especies presentan valor medicinal como es el caso de las especies del género *Amphipterygium*.

---

---

Por otra parte, cabe mencionar que hay quienes clasifican al género *Amphipterygium* dentro de la familia Julianiaceae por una afinidad de sus conductos resiníferos en su corteza (Cuevas, 2001).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del género *Amphipterygium* (Stevens, P. F.2001).

---

<b>DIVISIÓN:</b>	MAGNOLIOPHYTA
<b>CLASE:</b>	MAGNOLIOPSIDA
<b>SUBCLASE:</b>	ROSIDAE
<b>ORDEN:</b>	SAPINDALES
<b>FAMILIA:</b>	ANACARDIACEAE
<b>GÉNERO:</b>	<i>Amphipterygium</i> Shiede ex Schldtl

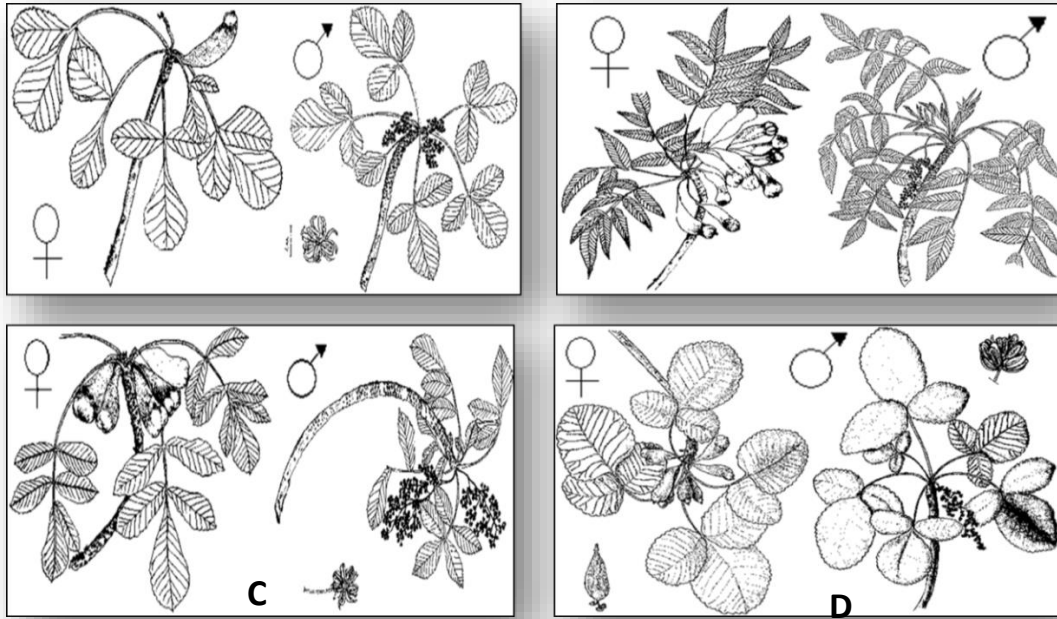
---

### 2.2.1 Descripción del género

El género *Amphipterygium* es uno de los componentes principales de la selva baja caducifolia de México. El género cuenta con 4 especies: *A. adstringens*, *A. glaucum*, *A. molle* y *A. simplicifolium* (Fig. 1), distribuidas en los estados de Aguascalientes, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Zacatecas (Cuevas, 2005) (Fig. 2).

Los árboles del género *Amphipterygium* son dioicos de 6 a 8 metros de alto, de corteza rugosa con protuberancias que parecen espinas achatadas, las ramas presentan cicatrices de hojas caídas y estipulas caedizas o las cicatrices de estas, las hojas están dispuestas en espiral y agrupadas al final de la rama, simples o compuestas (Cuevas, 2001).

Dada la importancia económica de este género se han realizado estudios de propagación con *A. adstringens* para evitar que la especie se encuentre en peligro de extinción ya que la obtención de la corteza es de ejemplares silvestres.



**Figura 1.** Especies del género *Amphipterygium*. A) *A. adstringens*, B) *A. molle* C) *A. glaucum*, y D) *A. simplicifolium* (Cuevas 2005).



**Figura 2.** Distribución del género *Amphipterygium* (Cuevas, 2005).

---

### 2.2.2 *Amphipterygium molle*

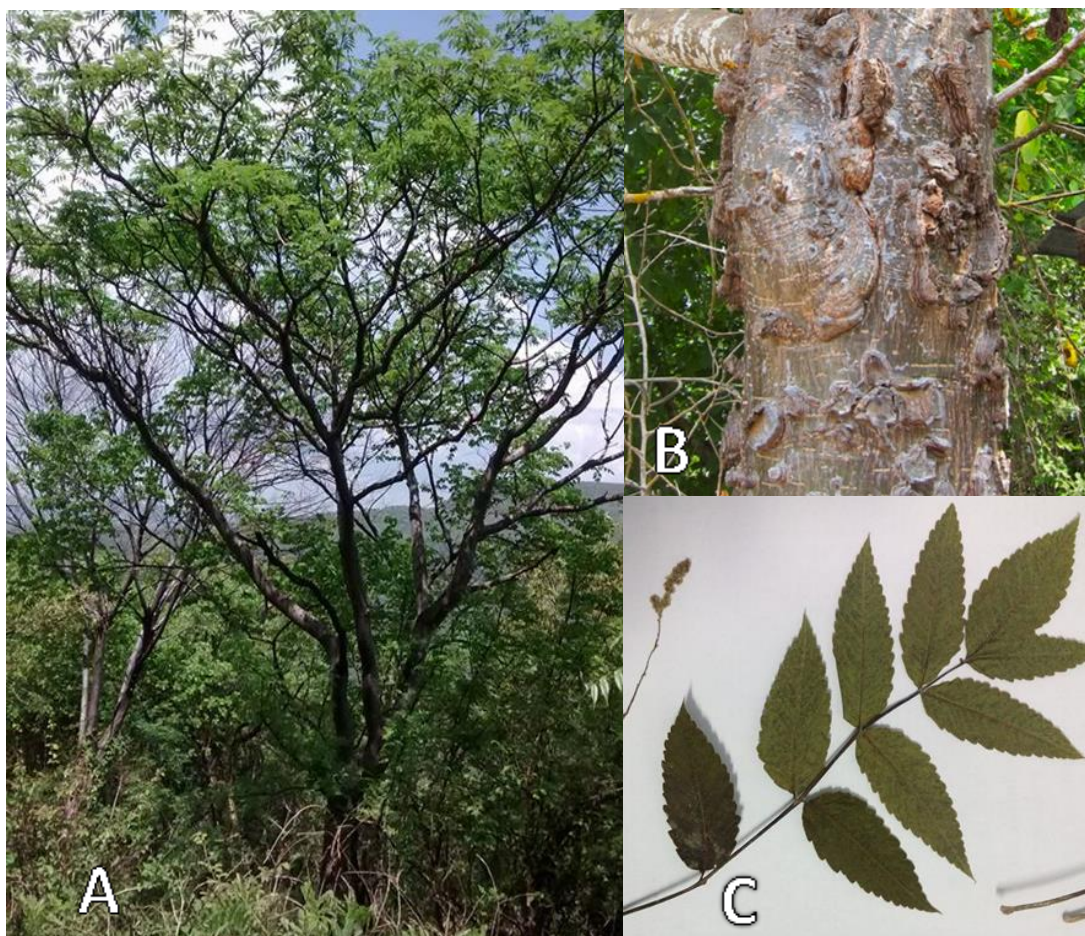
*Amphipterygium molle* (Fig. 3) y *Amphipterygium amplifolia*, son consideradas como sinónimos por Cuevas (2005).

**Árbol** de 3 a 8.5m de altura; corteza áspera con protuberancias corchosas; ramas rugosas pubescentes, glabrescentes, con las hojas agrupadas al final; **hojas** compuestas, imparinnadas; pecíolo de (3-) 6.7 –(10.5) cm de largo, piloso, glabrescente; **folíolos** de 7 a 11, sésiles o cortamente peciolados, el folíolo terminal posee o carece de un peciólulo distinto, base cuneada, ápice agudo o acuminado, a veces ligeramente arqueado, margen crenado a aserrado, dientes de tamaño desigual; **haz** velutina, villosa o pilosa, pelos dispersos, cortos, cónicos ganchudos, de (0.034-) 0.091 –(0.163) mm, en las venas muy abundantes y lo doble de largos; **envés** tomentoso a pubescente, pelos distribuidos en su mayoría sobre los nervios, más anchos de la base, acuminados, de (0.036-) 97 – (0.206) mm de largo, nervio central velutino, pelos 3 o 4 veces más largos, muy abundantes, pelos glandulares de (0.055-) 0.074 –(0.093) mm de largo, abundantes; **folíolos basales** lanceolados a oblongos-lanceolados, de (3.1-) 4.7 –(7) cm de largo y (0.8-) 1.8 –(3.1) cm de ancho; **folíolos centrales** lanceolados a oblongolanceolados, de (3.5-) 5 –(7.2) cm de largo y (1-) 1.9 –(3.4) cm de ancho; **folíolo terminal** oblongolanceolado, angosto-truliforme a rómbico-oblongo, de (3.4-) 5.6 –(9.5) cm de largo y (1.3-) 2.1 –(3.4) cm de ancho; **inflorescencia masculina** en forma de panícula, de (0.4-) 9.5 –(22.5) cm de largo, con flores abundantes, **flor masculina** con el pedúnculo floral (0.5-) 0.9 – (2.5) de largo, piloso; **perianto** de 6 a 8 segmentos; **sépalos** de (1.25-) 1.7 –(2) mm de largo; **estambres** con filamento corto, de (0.15-) a 0.25 –(0.5) mm de largo; **anteras** de (0.5-) 1.05 –(1.35) mm de largo; **inflorescencia femenina** situada entre las hojas, de 1.9 cm de largo, cubierta por un vello fino, translucido, que en la base del pedicelo forma un cúmulo velutino; **brácteas basales** 2, caedizas, protegen a la inflorescencia cuando es joven, pedicelo alargado, ligeramente arqueado, aplanado, clavado-fusiforme, con 2 - 4 flores; **estilos** 2 a 3, bífidos, enroscados sobre sí mismos, por lo general uno se desarrolla más que los otros; **brácteas apicales** de 4–5 de 1–4 mm de largo; **fruto** nuez indehiscente, de (4.5-)



6-1 –(8.5) cm de largo, (1.2-) 1.7 –(2) cm de diámetro, con el pedicelo aplanado, alargado y forma una ala claviforme, puberulento (Cuevas, 2001, p.35).

Para esta especie no se han realizado estudios químicos o farmacológicos, a diferencia de *A. adstringens* que pertenece al mismo género.

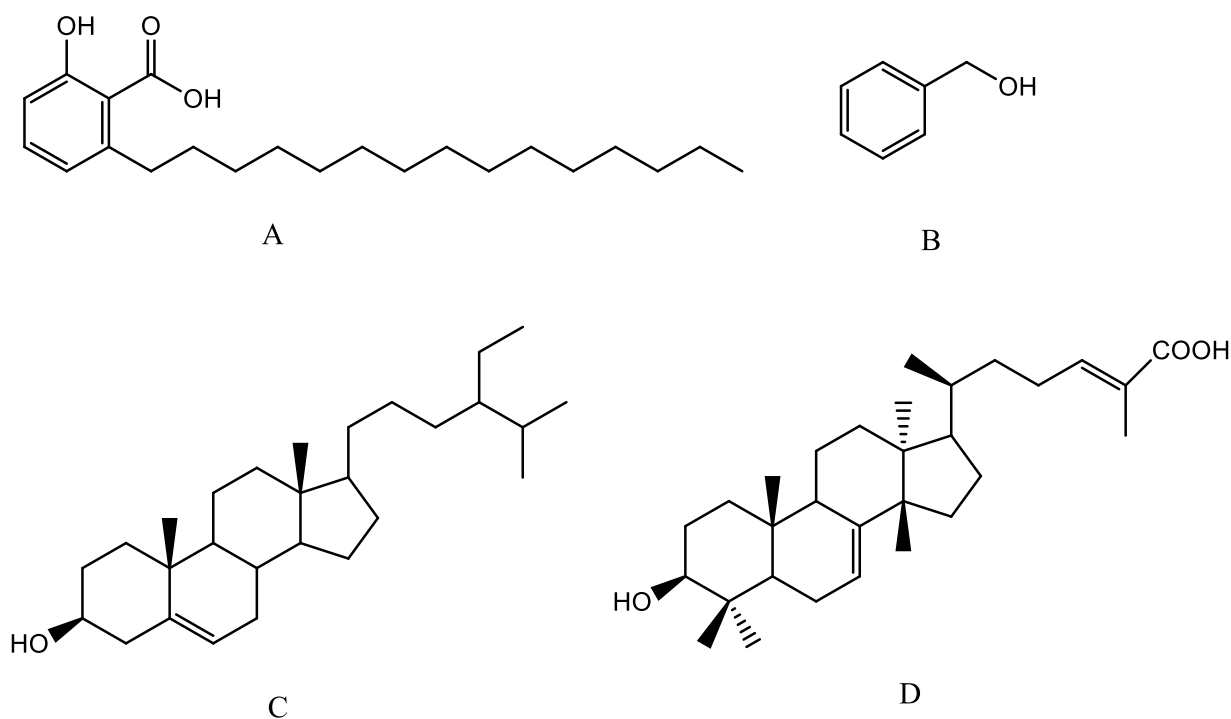


**Figura 3.** *Amphipterygium molle* sexo masculino  
A) Árbol, B) Corteza, C) Hojas y flores masculinas

### 2.2.3 Química y actividad biológica

La mayoría de los estudios reportados para el género *Amphipterygium* se han hecho de *A. adstringens*; y se han aislado principalmente triterpenos como los ácidos masticadienónico (Itokawa *et al.*, 1987, Chávez *et al.*, 2005), 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, 3-*epi*-oleanólico (Arrieta *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2005; Chávez *et al.*, 2005), 3-*epi*-masticadienólico,

oleanólico y 3-*epi*-oleanólico (Chávez *et al.*, 2005, Navarrete *et al.*, 2005); compuestos bencílicos como los ácidos 6-heptadecil-, 6-nonadecil-, y 6-pentadecil- salicílico (Itokawa *et al.*, 1987; Acevedo *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 2011), el esteroles,  $\beta$ -sitosterol (Castillo *et al.*, 2007), también ácidos anacárdicos, y aldehídos fenólicos (Makino *et al.*, 2004) (Fig. 4).



**Figura 4.** Estructura química de compuestos aislados de *A. adstringens*

A) Ácido anacárdico, B), Alcohol bencílico, C)  $\beta$ -sitosterol y D) Ácido 3 $\beta$ -hidroximasticadienónico.

Se ha demostrado el efecto gastroprotector del extracto metanólico de la corteza de *A. adstringens* y de los triterpenos como el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, 3-*epi*-oleanólico y el  $\beta$ -sitosterol aislados de la misma (Navarrete *et al.*, 2005; Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

La actividad antitumoral se atribuye a los ácidos masticadienónico, 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, ácidos 6-nonadecil salicílico y 6-metil nonadecil salicílico

---

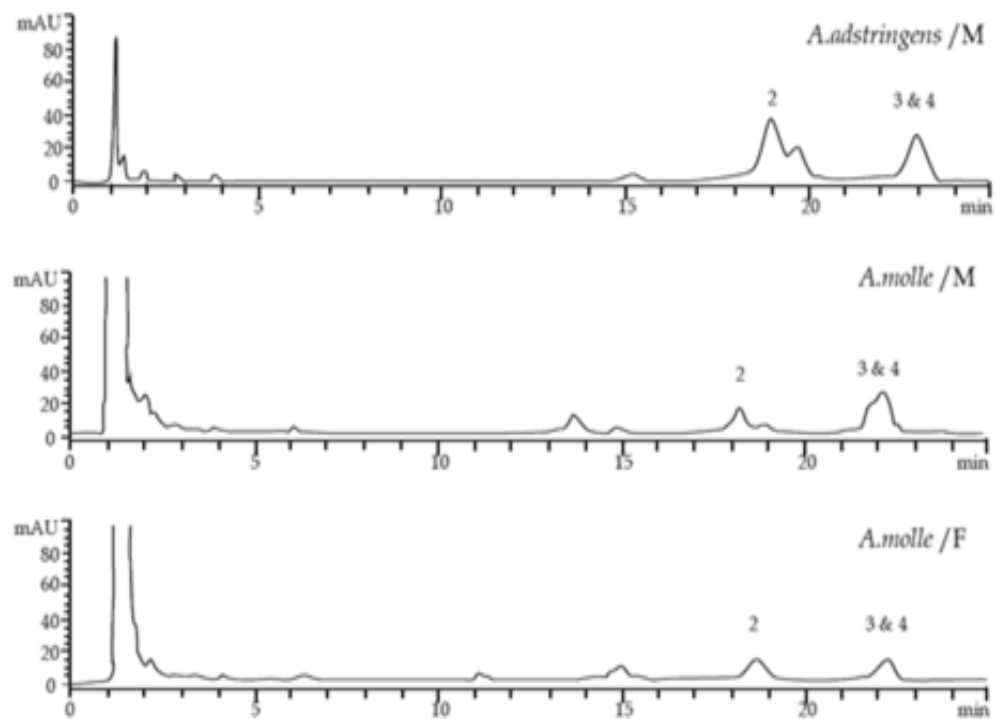
(Acevedo *et al.*, 2006; Itokawa *et al.*, 1987; Chávez *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Oviedo *et al.*, (2005) se evaluó la actividad citotóxica del extracto hexánico, ácido masticadienónico, ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico, ácido 24,25S-dihidromasticadienónico y el ácido masticadienólico sobre las líneas celulares de: cáncer de colon (HCT-15), cáncer de mama (MCF-7), leucemia (K-562), sistema nervioso central (U-251) y cáncer de próstata (PC-3). El extracto hexánico fue más citotóxico en las líneas MCF-7 y K562 (IC<sub>50</sub> 7.9  $\pm$  1.9  $\mu$ g/mL y 8.4  $\pm$  0.1  $\mu$ g/mL respectivamente). El ácido masticadienónico fue más citotóxico en las líneas MCF-7 y U251 (IC<sub>50</sub> 18.4  $\pm$  1.0  $\mu$ M y 20.4  $\pm$  2.2  $\mu$ M respectivamente). El ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico fue más citotóxico en las líneas K562 y HCT-15 (IC<sub>50</sub>: 24.2  $\pm$  0.7  $\mu$ M y 27.6  $\pm$  6.0  $\mu$ M respectivamente). El ácido 24,25S-dihidromasticadienónico fue más citotóxico en la línea HCT-15 (IC<sub>50</sub> 22.9 $\pm$ 5.2  $\mu$ M). Por último, el ácido masticadienólico fue más citotóxico en las líneas HCT-15 y K562 (IC<sub>50</sub> 20.2  $\pm$  8.4  $\mu$ M y 24.9  $\pm$  6.3  $\mu$ M respectivamente).

Otros estudios revelan que triterpenos, como el ácido anacárdico, aldehídos y fenoles de cadena larga poseen actividad antiinflamatoria, hipocolesterolémica y antiulcerosa (Mata *et al.*, 1991; Olivera-Ortega *et al.*, 1999; Arrieta *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2004; Navarrete *et al.*, 2005; Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2006; Castillo-Juárez *et al.*, 2013).

Por otra parte, en un estudio realizado por Rivero-Cruz *et al.*, (2005) se evaluó la actividad antimicobacteriana de compuestos derivados de plantas mexicanas, entre ellas *A. adstringens*. El sistema para obtener el extracto fue diclorometano/metanol (1:1) y fue evaluado en la cepa H37Rv utilizando un equipo BACTEC, en él determinaron que el ácido masticadienónico y el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico tuvieron moderada actividad con una MIC de 64 y 32  $\mu$ g/mL respectivamente.

En 2015 Gómez-Cansino *et al.*, evalúan la actividad antifímica de los extractos de corteza y hojas de las 4 especies del género *Amphipterygium*, las 4 especies mostraron una inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv mayor a 84 % al ser evaluados a 50  $\mu$ g/mL. De estos mismos extractos se realizaron los perfiles de CLAR (Fig. 5), los cuales mostraron algunas diferencias en la composición química de *A. adstringens* y *A. molle*. Ya que ambas especies muestran un nivel de efecto muy similar contra *M. tuberculosis* existe

la posibilidad de que tengan compuestos activos diferentes que estén actuando contra la tuberculosis.



**Figura 5.** Comparación de los perfiles de CLAR de los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  *A. molle* y *A. adstringens* (Gómez-Cansino *et al.*, 2015).

---

## 2.3 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. La TB afecta a los pulmones, donde las bacterias se multiplican causando tuberculosis pulmonar, aunque puede afectar otros órganos o partes del cuerpo como la TB meníngea. Los síntomas son tos con esputo (a veces con sangre) que dura 2 semanas o más, dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos y escalofríos (OMS<sup>D</sup> 2016).

Según datos de la OMS es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. En 2015 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.4 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos 0,4 millones de personas con VIH) y se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, es decir están infectadas por el bacilo pero que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección (OMS<sup>C</sup> 2016). En México, de acuerdo con la Evaluación Externa del Programa de Control de Tuberculosis de la Secretaría de Salud, durante el 2012 se diagnosticaron 19 697 casos nuevos de TB, de los cuales, 5.8% asociados con VIH (OMS<sup>F</sup> 2013). Sin embargo, la Diabetes Mellitus aparece como una de las principales comorbilidades asociadas a la Tuberculosis en México, siendo del 21% para el año 2012 con 3.677 del total de pacientes nuevos, seguido con la desnutrición, el alcoholismo y el VIH (OMS<sup>F</sup> 2013). La diabetes mellitus representa la mayor carga de comorbilidad, representa un foco de atención, manifestándose como una seria amenaza para el control actual y futuro de la tuberculosis, en nuestro país.

La tuberculosis multirresistente (TB-MDR) es la causada por una cepa que no responde a la isoniazida ni a la rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos más eficaces de primera línea. En 2015 se registraron en el mundo unos 480 000 casos de tuberculosis multirresistente. La TB-MDR se puede tratar y curar con medicamentos de segunda línea; sin embargo, estos medicamentos son limitados y requieren quimioterapia de larga duración (hasta dos años de tratamiento) con fármacos que además de caros, son tóxicos (OMS<sup>D</sup> 2016).

---

## 2.4 Cáncer de colorrectal

El cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Al cáncer que empieza en colon y recto se les llama cáncer colorrectal a menudo se agrupan porque tienen muchas características comunes (OMS<sup>B</sup> 2017).

La mayoría de los cánceres colorrectales comienzan con el crecimiento de un pólipo en el revestimiento interno del colon o del recto, la probabilidad de que un pólipo se transforme en un cáncer depende del tipo de pólipo. Los pólipos hiperplásicos son los más frecuentes, pero en general no son considerados precancerosos y pólipos adenomatosos (adenomas), que en algunas veces se transforman en cáncer, por ello, los adenomas se denominan afecciones precancerosas (Sociedad Americana Contra El Cáncer<sup>A</sup>, 2017).

Los principales síntomas del cáncer colorrectal son: evacuación anormal como diarrea, estreñimiento o reducción del diámetro de las heces fecales por varios días, sangrado rectal o sangre en las heces fecales que puede causar que las heces se vean oscuras, sensación de defecar que no desaparece después de tener una evacuación, cólicos o dolor abdominal, debilidad, cansancio y pérdida inexplicable de peso. Uno de los problemas de esta enfermedad es que puede confundirse con otras enfermedades como infecciones, hemorroides o síndrome de intestino irritable, por ello es importante la acudir al médico para determinar la causa y recibir tratamiento de ser necesario (Sociedad Americana Contra El Cáncer<sup>B</sup>, 2017).

Para el año 2012, GLOBOCAN estima que el cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en los hombres con 746 000 casos, (el 10 % del total de casos de cáncer) y la segunda en mujeres con 614 000 casos, (un 9.2 % del total de casos de cáncer) en todo el mundo y casi el 55 % de los casos ocurren en las regiones más desarrolladas. En México se reporta una incidencia de 8 651 casos, de los cuales 4 656 en hombres y 3 995 en mujeres, así como una mortalidad de 4 694, 2 528 en hombres y 2 166 en mujeres (GLOBOCAN 2012).

---

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer y las enfermedades infecciosas causan un alto número de defunciones anuales, por lo que se requieren nuevos fármacos con actividad citotóxica. Una de las alternativas para encontrar compuestos con actividad son las plantas medicinales y México cuenta con una gran diversidad de estas plantas. Utilizando el criterio quimiotaxonómico para la búsqueda de moléculas bioactivas, se seleccionó a *Amphiterygium molle* como fuente potencial de compuestos citotóxicos que puedan ser de ayuda en el tratamiento de dichas enfermedades.

### 4. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes sobre la actividad citotóxica de especies del género *Amphiterygium*, se espera que *Amphiterygium molle* tenga metabolitos secundarios con efecto sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y/ o contra la línea celular de cáncer de colon SW620

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 General

Evaluar la actividad citotóxica de extractos y metabolitos secundarios mayoritarios de *A. molle* sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y en células de cáncer de colon SW620.

#### 5.2 Particulares

- Aislar e identificar los metabolitos mayoritarios de *A. molle* a partir de extractos diclorometano metanol 1:1.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos y los compuestos aislados de la corteza y ramas, sobre la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos y los compuestos aislados de la corteza y ramas, en la línea celular SW620 de cáncer de colon.

---

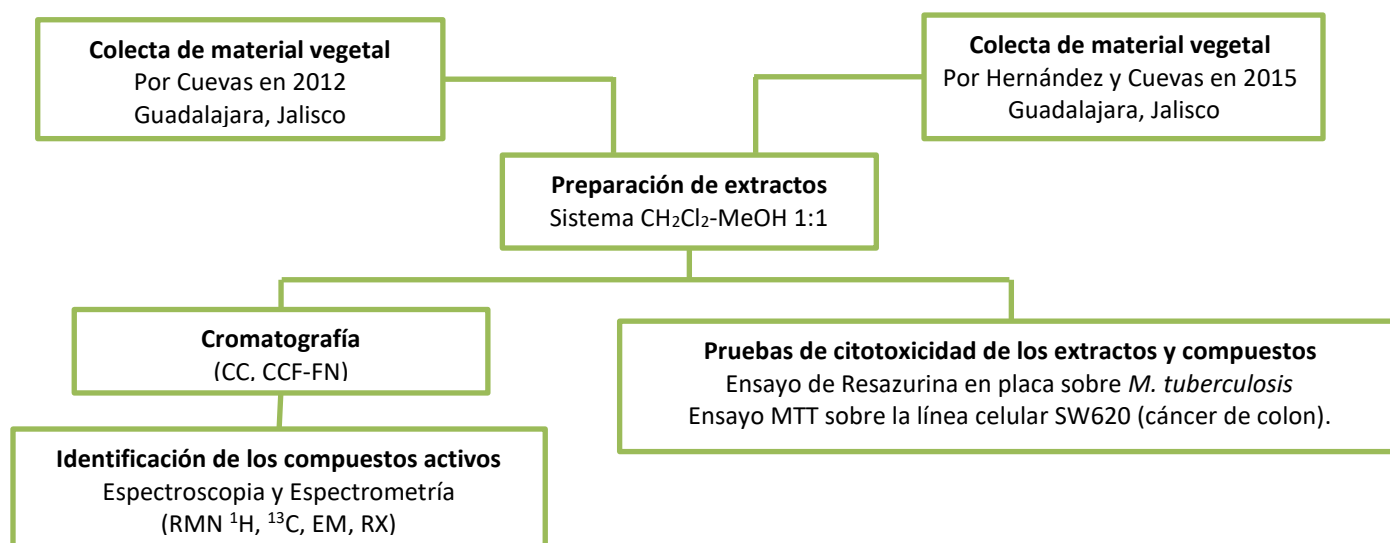
## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Estrategia experimental

En este estudio se desarrolló una estrategia experimental (Fig. 6) la cual parte de dos colectas vegetales en la Barranca de Oblatos Guadalajara, Jalisco, México. Una realizada en 2012 por la Dra. Xochilt Marisol Cuevas Figueroa. La segunda, una colecta propia en 2015, con la ayuda para la identificación de la especie de la Dra. Cuevas Figueroa.

El aislamiento de los compuestos se realizó a partir de los extractos preparados en un sistema de diclorometano-metanol 1:1 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH). Los extractos se fraccionaron por cromatografía en columna fase normal (CC-FN) para el aislamiento de compuestos y los compuestos aislados fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron sobre sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv, empleando el ensayo Resazurina en placa (REMA o resazurin microtiter assay) para la de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y sobre la línea celular SW620 de cáncer de colon y se evaluaron con el ensayo colorimétrico MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), como se explica más adelante.



**Figura 6.** Estrategia experimental seguida durante la realización del proyecto de tesis.



---

## **6.2 Colecta de material vegetal**

La colecta de *A. molle* en el año 2012 fue realizada por la Dra. Xochilt Marisol Cuevas Figueroa en la Barranca de Oblatos Guadalajara, Jalisco, cuyos ejemplares de respaldo fueron depositados en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM) con número de registro 15639 y 15640 a nombre de la Dra. Cuevas.

El 25 de julio del 2015 se realizó una colecta de ramas y corteza de *Amphiterygium molle* (sexo masculino) en la Barranca de Oblatos, Guadalajara, Jalisco, con ayuda para la identificación de la Dra. Cuevas Figueroa. A partir de esta colecta se montó un ejemplar de herbario y se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias con número de registro 159308.

## **6.3 Preparación de extractos**

El material vegetal colectado (corteza y ramas) se secó a temperatura ambiente, se trituró en un molino y se maceró con un sistema diclorometano-metanol (1:1) por 1 semana. Los extractos obtenidos se filtraron por gravedad y concentraron en un rotavapor BÜCHI R-205 a presión reducida.

## **6.4 Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina**

Se analizaron los perfiles cromatográficos de los extractos y sustancias de referencia (3 $\alpha$  y 3 $\beta$ -hidroximasticadienónico, masticadienónico y ácido oleanólico) por 1.1 cromatografía en capa fina-fase normal (CCF-FN) en un cromatofólio de 10 cm de alto por 20 cm de ancho (Alugram Sil G/UV254, silica gel 60, 0.2 mm, con indicador fluorescente UV 254 nm), con una fase móvil de hexano – acetato de etilo 7:3 (hexano-AcOEt). Al concluir la elución se observaron bajo luz UV a 366 nm y 254 nm, se rociaron con una solución de sulfato cérico Ce (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 1N en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se revelaron en una placa de calentamiento a 90°C.

## **6.5 Cromatografía en columna de los extractos (Fraccionamientos)**

Se realizaron dos cromatografías en columna (CC), una de ellas de extractos preparados a partir de una colecta realizada en el año 2012, que corresponden a dos muestras de corteza,

---

una de un árbol de sexo masculino más otra de uno de sexo femenino y a una muestra de hojas de sexo femenino, todas sin diferencia cromatográfica apreciable. La otra cromatografía en columna se realizó a partir de la colecta realizada en el año 2015 de ramas de un árbol sexo masculino. Los extractos fueron disueltos en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) y se le agregó celita para formar una suspensión (la cantidad de celita fue equivalente al peso del extracto), una vez que quedó adsorbida en la celita y libre de disolvente se colocó en una columna cromatográfica previamente empacada con silica gel fase normal malla de 70-230, Macherey-Nagel (la cantidad de extracto equivalente a veinte veces su peso). El sistema de elución fue el mismo para ambas columnas, mezcla hexano-AcOEt con polaridad creciente (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100).

Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor y analizadas por CCF-FN usando una fase móvil de hexano-AcOEt 7:3. Se observaron bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (366 nm) y se revelaron con sulfato cérico. Todas las fracciones con similitud cromatográfica se reunieron.

## **6.6 Identificación de los compuestos aislados**

La identificación de los compuestos aislados se realizó mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con lo ya reportado en literatura. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 400 MHz y para disolver las muestras se utilizó metanol (CD<sub>3</sub>OD) o cloroformo (CDCl<sub>3</sub>) deuterado. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron en un equipo JEOL JMS GC mate II con una inyección directa de la muestra y un modo de ionización por impacto electrónico (70 eV). También se utilizó cromatografía de gases acoplado a masas con el equipo Agilent Technologies 6890N Network GC system con una columna Agilent Technologies, INC HP-5 de 30 m x 0.320 mm. En el caso de las sustancias cristalinas se utilizó Difracción de Rayos X en el equipo Bruker Apex 2 con detector de área.

---

---

## 6.7 Ensayo de Resazurina en placa (REMA o Resazurin Microtitter Assay)

El ensayo de REMA fue realizado con el apoyo de la Dra. Mayra Silva Miranda en el laboratorio de Bioseguridad BSL-3, utilizando un inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (American Type Culture Collection).

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv que es una de las cepas más comúnmente usadas para el estudio de la tuberculosis, a partir de alícuotas congeladas de la cepa de trabajo, se toman 500 µL del inóculo bacteriano a 50 mL de medio 7H9 Middlebrook enriquecido con ADC (albumina-dextrosa-catalasa) y tyloxapol al 0.02 %, 5 días antes del ensayo y se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 37°C.

Una vez pasado el tiempo de incubación se mide la densidad óptica (D.O) a 600 nm del cultivo y se ajusta a una D.O de 0.4 con un nefelómetro. De esta suspensión se realiza una dilución 1 a 25 en medio de cultivo (más o menos D.O final 0.025).

### 6.7.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Se prepararon Stocks de trabajo a una concentración de 10 mg/mL del extracto de corteza, ramas y 5 mg/mL el ácido 3α-hidroximasticadienólico en DMSO. Dichos stocks de trabajo y pequeñas alícuotas del mismo se conservan a -20°C por máximo un mes para evitar la degradación por el congelamiento-descongelamiento.

En una placa de 96 pozos de poliestireno transparente con fondo plano se agregan 100 µL de medio de cultivo 7H9 (glicerol, 10 % ADC) y tyloxapol, 100 µL del inóculo de *M. tuberculosis*, dejando la periferia de la placa con 200 µl de agua o PBS para evitar la pérdida de muestra por evaporación.

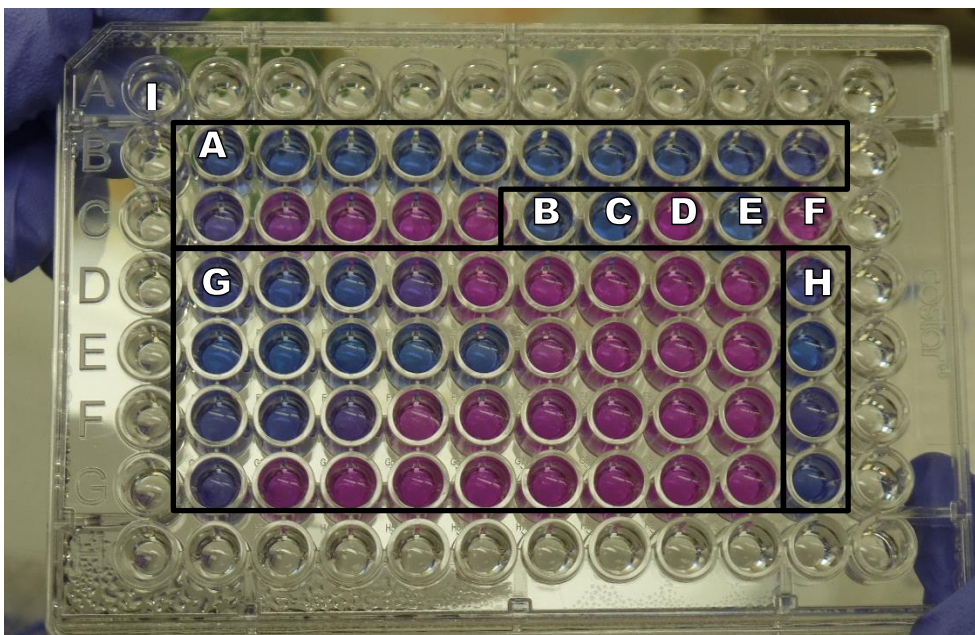
Se adiciona una curva de rifampicina (fármaco de referencia) desde una concentración 16 µg/mL hasta 0.00095 µg/mL y se colocan 6 controles extra en 6 pozos distintos, rifampicina sin bacteria, DMSO sin bacteria, DMSO con bacteria, medio sin bacteria, medio con bacteria y medio sin bacteria con sustancia de prueba.

Por último, se agregan los compuestos evaluados a concentraciones finales desde 500 y 250 µg/mL (extractos y compuestos puros respectivamente). Se incubaron durante 6 días a 37°C en cámara húmeda; una vez finalizada la incubación se agregaron 30 µl de Resazurina

---

al 0.01 % en agua (filtrada por 0.22  $\mu\text{m}$ ), se dejó incubar por 48 horas y se procedió a leer las placas (Fig. 7).

Las lecturas se hicieron visuales y la MIC se definió como la mínima concentración de extracto crudo o compuesto a la cual ocurre un cambio de color de azul a rosa.



**Figura 7.** Ensayo REMSA. *A)* Curva de rifampicina, *B)* Rifampicina con bacteria, *C)* DMSO sin bacteria, *D)* DMSO con bacteria, *E)* Medio sin bacteria, *F)* Medio con bacteria, *G)* Extractos y compuestos a evaluar, *H)* Compuestos y extractos solo con medio de cultivo y *I)* PBS o agua para evitar pérdida de muestra por evaporación.

## 6.8 Cultivo celular

Los experimentos con la línea celular SW60 se llevaron a cabo en el Laboratorio 206 del Departamento de Biología de la Facultad de Química, Edif. F, cuyo responsable es el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, con la asesoría del Dr. Ignacio Gonzáles Sánchez. Todos los procedimientos del cultivo celular se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, con material limpio y estéril.

### 6.8.1 Línea celular SW620

La línea celular SW620 fue aislada de adenocarcinoma de colon, derivado del sitio metastásico de un hombre de 51 años caucásico. Esta línea celular consiste en pequeñas

---

células esféricas y bipolares, con morfología epitelial y crecimiento adherente. Las células sintetizan sólo pequeñas cantidades de antígeno carcinoembrionario (CEA), y son altamente tumorigénicas en ratones desnudos (ATCC, 2014).

### **6.8.2 Mantenimiento y propagación de la línea celular**

Las células se mantuvieron en crecimiento constante en condiciones óptimas para el cultivo celular (en incubación con 5 % de CO<sub>2</sub>, con una humedad relativa del 98 %, a 37°C) en cajas Petri desechables con medio DMEM al 10 % de suero fetal bovino (SFB). Las células SW620 requieren un cambio de medio aproximadamente cada tercer día de acuerdo a su confluencia. Como crecen de manera adherente, el medio se elimina por decantación, posteriormente se lavan con 1mL de PBS para eliminar los detritos y por último se agrega nuevamente medio DMEM y se vuelven a incubar.

Cuando se observa al microscopio que la línea celular ocupa el 90 % de la superficie de la caja Petri se puede hacer una propagación celular. Para ello, se decanta el medio de cultivo y se hace un lavado con 1 mL PBS moviendo lentamente la caja por unos segundos y decantándolo. Posteriormente se agregaron 1.5 mL PBS-EDTA y se incubó de 5 a 7 minutos para favorecer el desprendimiento de las células de la monocapa, pasado este tiempo se elimina el PBS-EDTA con una micropipeta. Las células que se desprendieron se recuperan con 2 mL medio de cultivo usando una micropipeta y se colocan en un frasco estéril llevando a un volumen de 10 mL para el conteo celular.

### **6.8.3 Congelación de células**

Para preservar las células en congelación se necesita tener una confluencia de células al 90 % y se procede como se indica en el apartado anterior de propagación celular hasta obtener a suspensión celular, la cual se colectó en un tubo y se centrifugó a 1 200 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 4.5 mL medio de congelamiento (Anexo 1) por caja de cultivo, se distribuyó 1 mL de la suspensión por criotubo y se conservaron a -70°C.

#### 6.8.4 Descongelación de las células

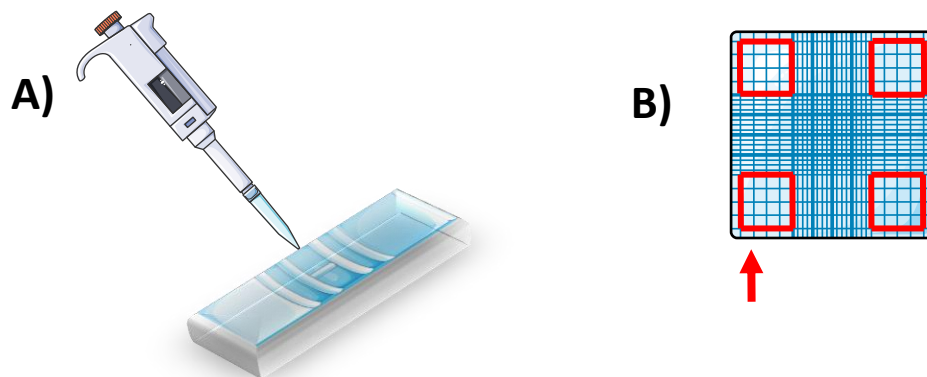
Para iniciar el cultivo celular se descongelaron frotando con las manos las células de un criotubo. El tubo fue centrifugado a 800 rpm durante 5 min. Posteriormente, el medio de congelamiento fue decantado y el paquete celular se transfiere a una caja Petri con 4 mL de medio de cultivo a temperatura ambiente y se incubó a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se hacen lavados con PBS para eliminar las células no adheridas y se añaden 4 mL de DMEM y se incuban nuevamente.

#### 6.8.5 Conteo celular

Para el conteo se parte de la suspensión de 10 mL que se indica anteriormente. Se realiza con una cámara de Neubauer de dos áreas de conteo con 4 cuadrantes para conteo de linfocitos cada una, la suspensión celular debe estar homogeneizada con una micropipeta para hacer un conteo más confiable. Se tomó una alícuota con 10 µL de la suspensión y se colocó en la cámara como se muestra en la imagen (Fig. 8). Dicho conteo se realizó usando microscopio invertido. Para calcular del número de células por mililitro se contaron las células de los 8 cuadrantes y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Células /mL} = (\text{Promedio de células}) \times [1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}]$$

on el conteo de células por mililitro se calculó el volumen de suspensión adecuado para agregar un total de 4 000 células por pozo, con el fin de evitar saturación y estrés celular durante las 72 h de la exposición del tratamiento.

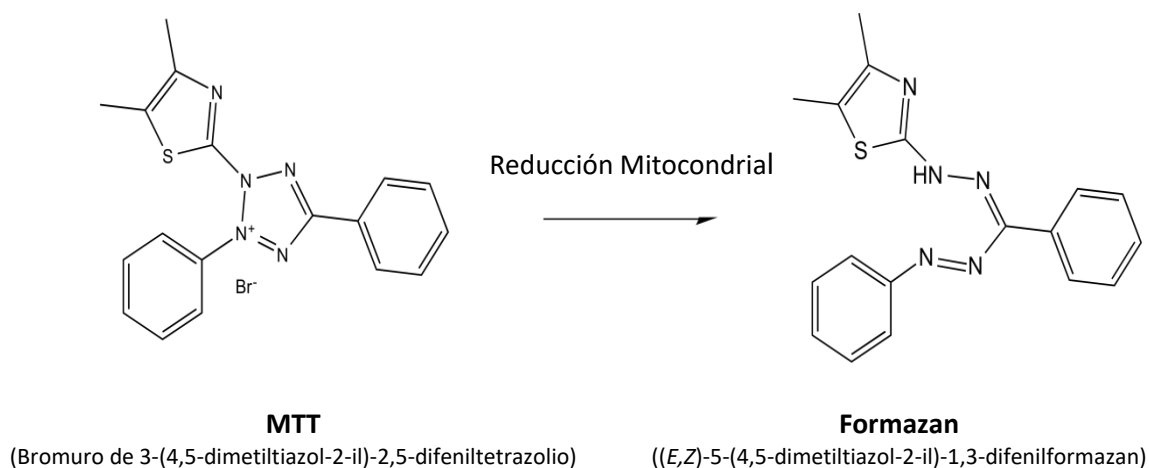


**Figura 8.** Esquematización de la cámara de Neubauer **A)** el modo de aplicar la alícuota para que la suspensión penetre por capilaridad. **B)** Representación del área de conteo (la flecha indica una de las áreas de conteo).

## 6.9 Evaluación de la actividad citotóxica. Ensayo MTT

La actividad citotóxica de los extractos y compuestos de *A. molle* se evaluó mediante el ensayo colorimétrico MTT sobre la línea celular SW620 de cáncer de colon con un tiempo de exposición de 72 horas. Se anexa la lista de las soluciones utilizadas y su preparación en el Anexo 1 (González-Sánchez, 2009).

El ensayo de MTT ocupa una sal de tetrazolio color amarillo que se utiliza para medir la actividad celular por la reducción (aceptación de un  $H^+$ ) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales (succinato-deshidrogenasa) (Fig. 9) para formar cristales de formazán de color morado solubles en dimetil sulfóxido (DMSO) (Castro, 2006).



**Figura 9.** Reducción de las sales de tetrazolio MTT por enzimas mitocondriales de las células viables en cristales de formazán.

### 6.9.1 Determinación de la actividad citotóxica

Una vez realizado el conteo, se colocaron 4000 células en un volumen de 200  $\mu$ L por pozo en una placa de 96 pozos, y se dejaron reposar por 24 h. Se preparó una solución *stock* de los extractos o compuesto a evaluar utilizando DMSO como vehículo. Cada *stock* fue evaluado a 6 concentraciones y se incubaron durante 72 h.

Posteriormente se agregaron 20  $\mu$ l de MTT (2.5 mg/mL) por pozo y se incubaron por 1 h, transcurrido ese tiempo se retira todo el líquido (DMEM, tratamiento y MTT) y se agregan

---

---

200  $\mu$ L de DMSO para disolver los cristales de formazán precipitados al fondo de los pozos y se lee la absorbancia a 550 nm (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Concentraciones evaluadas para los extractos y el ácido 3  $\alpha$ -hidroximasticadienólico.

No. STOCK	Extractos	Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico
	Concentración final por pozo $\mu$ g/mL	Concentración final por pozo ( $\mu$ M)
1	280	104.39
2	230	78.29
3	140	52.19
4	110	26.10
5	70	12.53
6	40	6.26
7 (DMSO)	0	0
8 (Medio)	0	0



---

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Colecta de material vegetal y rendimiento de los extractos

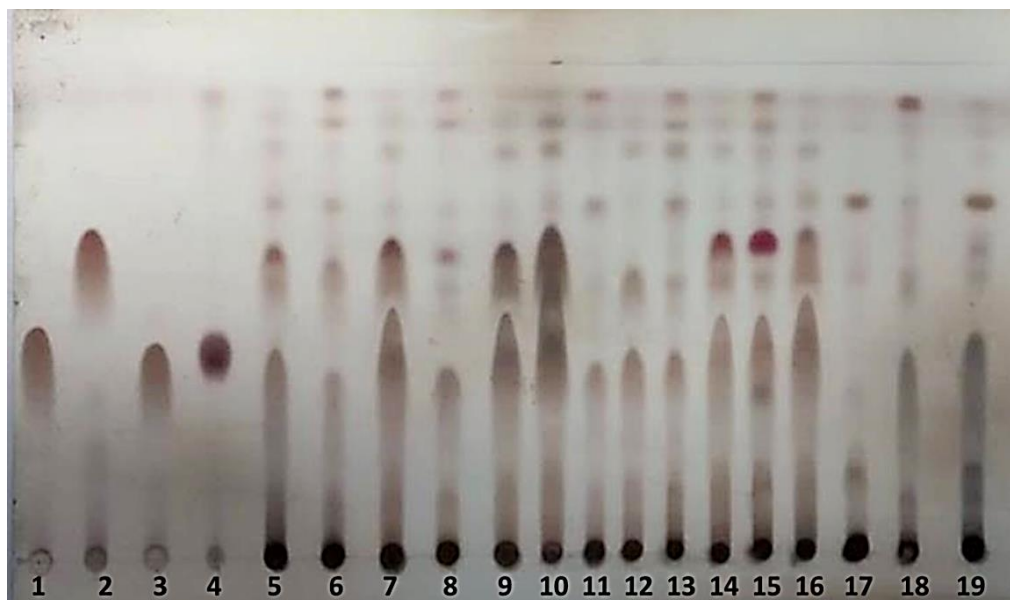
Se colectaron 500 g de corteza (peso seco) y 250 g de ramas (peso seco) de 2 árboles de *A. molle* sexo masculino. Se depositó un ejemplar en el Herbario de la Facultad de Ciencias con número de 159308 (Fig. 10). Se obtuvieron 57.87 g de extracto de corteza y 20.48 g de extracto de ramas, lo que corresponde a un porcentaje de rendimiento mayor del 11.57 % para el de corteza en comparación con un 8.19 % para el de ramas.



**Figura 10.** Ejemplar de herbario de *A. molle* con flores de sexo masculino depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias con el número de registro 159308.

### 7.2 Análisis de Cromatográfico

Se realizó una primera cromatografía CCF- FN de los extractos donados de corteza y hojas de las 4 especies del género colectadas por la Dra. Cuevas en 2012 y de 4 estándares de compuestos previamente aislados de *A. adstringens* (Fig. 11).

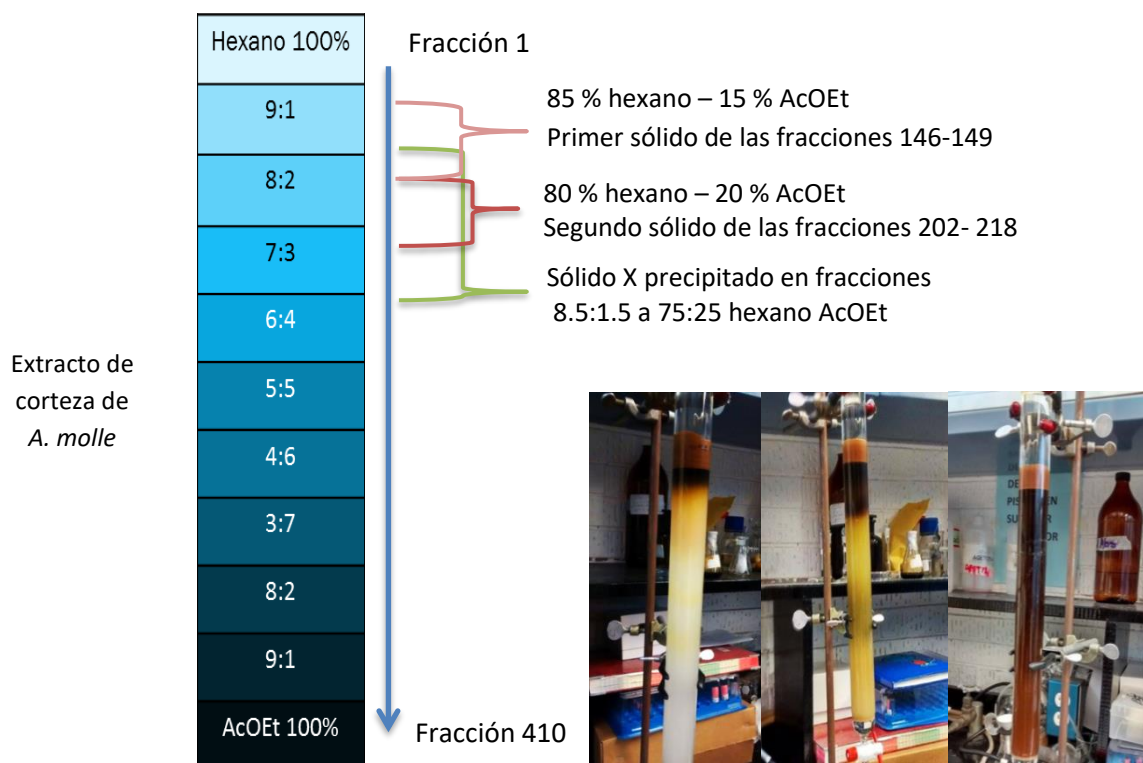


**Figura 11.** CCF-FN, fase móvil hexano:AcOEt 7:3. 1) 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, 2) ácido masticadienónico, 3) ácido instipolinámico, 4) ácido oleanólico, 5) corteza ♀ *A. molle*, 6) hojas ♀ *A. molle*, 7) corteza ♂ *A. molle*, 8) hojas ♂ *A. molle*, 9) corteza ♂ *A. molle*, 10) corteza ♂ *A. adstringens*, 11) hojas ♂ *A. adstringens*, 12) corteza ♀ *A. simplicifolium*, 13) hojas ♀ *A. simplicifolium*, 14) corteza ♀ *A. molle*, 15) hojas ♀ *A. molle*, 16) corteza ♂ *A. molle*, 17) corteza ♀ *A. glaucum*, 18) hojas ♂ *A. glaucum*, 19) corteza ♂ *A. glaucum*.

En la cromatografía (CCF-FN) podemos observar que los extractos 14 (corteza ♀ *A. molle*), 15 (hojas ♀ *A. molle*) y 16 (corteza ♂ *A. molle*) si bien coinciden en metabolitos que tiene *A. adstringens* (10 y 11) como el ácido 3 $\alpha$  y 3 $\beta$ -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico, presentan una variación en su composición con respecto a la cantidad y tipo de metabolitos de las demás especies de *Amphipterygium*. Por otra parte, también se puede observar en la cromatografía que entre los tres extractos de *A. molle*, dos de corteza (sexo masculino y femenino) y uno de hojas (sexo femenino) no hay una diferencia en composición apreciable, por lo que debido a la poca cantidad que se tenía de ellos se decidió mezclarlos y analizar su composición por cromatografía en columna.

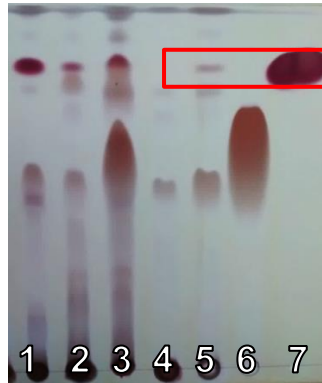
La primera CC se realizó con 5 g de la mezcla de los tres 3 extractos de *A. molle*. Se eluyeron 410 fracciones de 25 mL cada una y se obtuvieron 3 sólidos (Fig. 12). El primero marcado con la clave 146-149 (fase móvil 85:15) y posteriormente fue identificado como ácido 3-*epi*-oleanólico, el segundo con clave 202-218 (fase móvil 8:2) posteriormente

identificado como ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, y el tercero un sólido que precipitó en las fracciones eluidas entre la fase móvil 8.5:1.5 a 75:25, el cual fue nombrado como sólido X y posteriormente fue identificado como fridelan-3-ona.



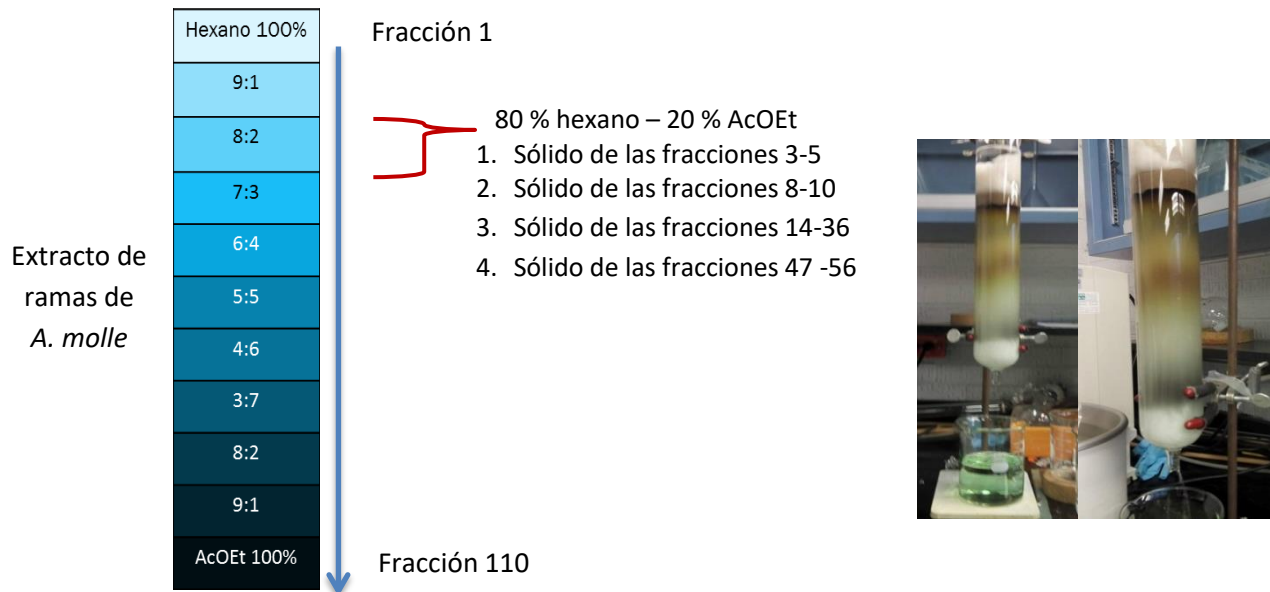
**Figura 12.** Representación de la obtención de sólidos en una CC-FN con fase móvil de 100 %.

El sólido con clave 146-149 (ácido 3-*epi*-oleanólico) no cuenta reportes de su actividad citotóxica ya sea sobre *M. tuberculosis* o sobre alguna línea celular de cáncer, por lo que se propuso aislar una mayor cantidad para realizar las pruebas biológicas. Para ello se realizó otra CCF-FN para saber cuál de los dos extractos obtenidos a partir de la colecta realizada en 2015 (ramas y corteza) tenía una mayor concentración de ácido 3-*epi*-oleanólico. Se observó que el extracto de ramas de *A. molle* presentaba el compuesto (Fig. 13), aunque no en la misma cantidad que en la colecta del 2012 (Cuevas 15639 y 15640), esto puede deberse a que el material se colectó en diferentes fechas.



**Figura. 13.** CCF-FN con fase móvil hexano:AcOEt 7:3 de: Extractos de la colecta de *A. molle* en 2012 (Cuevas 15639 y 15640). 1) corteza ♀, 2) hojas, 3) corteza ♂. Extractos de la colecta de *A. molle* en 2015 (Hernández 159308). 4) corteza ♂, 5) ramas ♂), Compuestos obtenidos en la primera cromatografía. 6) ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico (202-218). 7) ácido 3-*epi*-oleanólico (146-154).

La segunda CC se realizó con 13.1 g del extracto de ramas de *A. molle* (colecta del 2015, Hernández 159308). Se eluyeron 110 fracciones de 800 mL cada una y se obtuvieron 4 sólidos, todos eluidos con una fase móvil de 8:2 hexano- AcOEt (Fig. 14). El primero marcado con la clave 3-5, el segundo con clave 8-10, el tercero con clave 14-36 y el tercero con la clave 47-56.



**Figura 14.** Representación de la obtención de sólidos en una CC-FN con fase móvil de 100 % Hexano a 100 % AcOEt.

### 7.3 Identificación de los compuestos aislados y análisis espectroscópico

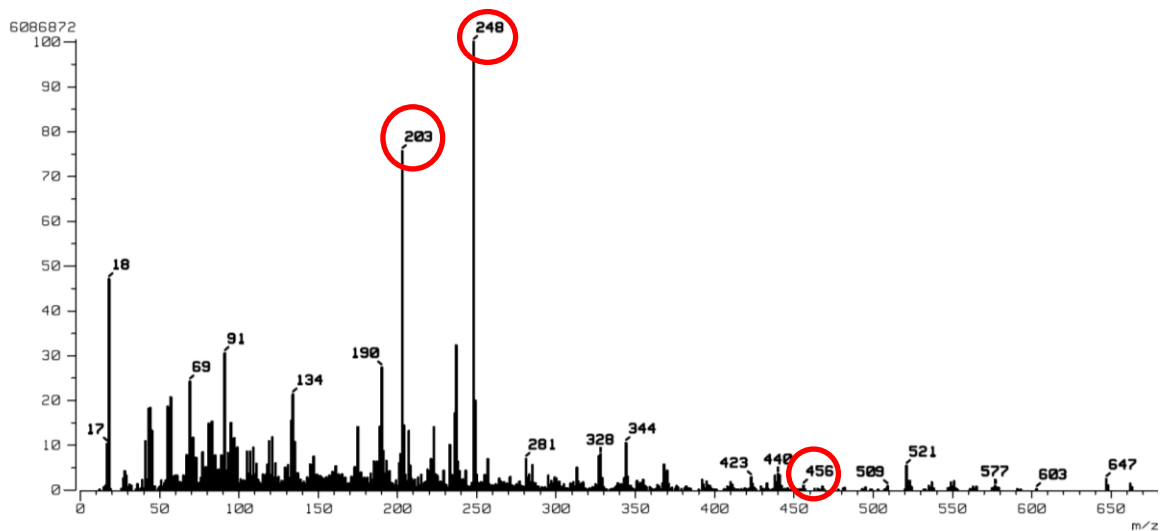
Al comparar los EM y las RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se observan similitudes entre los compuestos aislados en las dos CC, los cuales fueron identificados por comparación con los datos ya reportados en la literatura, por otra parte, el rendimiento de compuestos aislados no fue el mismo (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Rendimiento para cada compuesto aislado de *A. molle*.

Nombre del compuesto aislado	Compuestos obtenidos de colecta 2012 (Cuevas 15639 y 15640).		Compuestos obtenidos de colecta 2015 (Hernández 159308)	
	Clave	Cantidad (mg)	Clave	Cantidad (mg)
Ácido 3- <i>epi</i> -oleanólico	146-149	15.9	3-5	9.5
Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico	202-218	24.24	14-36	198.6
Fridelan-3-ona	Solido X	26.5	-	-
Ácido masticadienónico	-	-	8-10	6
Ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico	-	-	47-56	3.1

#### 7.3.1 Ácido 3-*epi*-oleanólico

El ácido 3-*epi*-oleanólico ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ ) fue aislado como un sólido blanco con un punto de fusión de 285°C con degradación y no formó cristales. En el espectro de masas (EM) (Fig. 15) podemos observar el pico con una relación  $m/z$  456, correspondiente al núcleo básico estructural perteneciente a la serie aleanano y/o del urseno, responsable de la formación de los iones de  $m/e$  248 (pico base) y 203 (68.4 %) característicos de los triterpenos pentacíclicos  $\Delta^{12}$ -insaturados (Budzikiewicz *et al.*, 1963).



**Figura 15.** Espectro de masas del ácido 3 *epio*-leanolico

Con respecto al espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) a 400 MHz, podemos observar un patrón de señales característico de los triterpenos a campo alto, en el que sobresalen 7 singuletes a 0.76, 0.83, 0.91, 0.92, 0.93, 0.95, y 1.15 ppm, que integran para 3 hidrógenos cada uno, correspondientes a grupos metilo (Fig. 16). Por otra parte, a campo más bajo, podemos observar en el espectro tres señales que integran para un hidrógeno cada una; la primera, una señal dd ( $J=14, 4.8$ ) a 2.82 ppm correspondiente a un hidrógeno acoplado con otros dos hidrógenos; la segunda, un triplete ancho ( $J=2.4$  Hz) a 3.3 ppm, su desplazamiento indica que es un hidrógeno unido a un carbono base de oxígeno; la tercera, un triplete ancho ( $J=3.6$  Hz) a 5.25 ppm, su desplazamiento indica que se trata de un protón vinílico.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 400 MHz (Cuadro 4), corroboró la información de que se trata de un triterpeno, ya que se observan señales correspondientes a 30 átomos de carbono. Los experimentos DEPT indicaron que 5 señales corresponden a metinos, 10 a metilenos y 7 a metilos. Las señales que nos proporcionaron más información sobre la identidad del compuesto fueron las siguientes: una señal a 182.41 ppm correspondiente a un carbono cuaternario que por su desplazamiento corresponde a un carbono de un grupo carbonilo, una señal a 143.72 ppm y otra a 122.86 ppm correspondientes a carbonos vinílicos y una señal a 76.32 ppm correspondiente a un carbono base de oxígeno.

Comparando la información obtenida con lo reportado en la literatura (Pereda-Miranda, 1994) encontramos que las señales eran muy similares a aquellas reportadas para el ácido

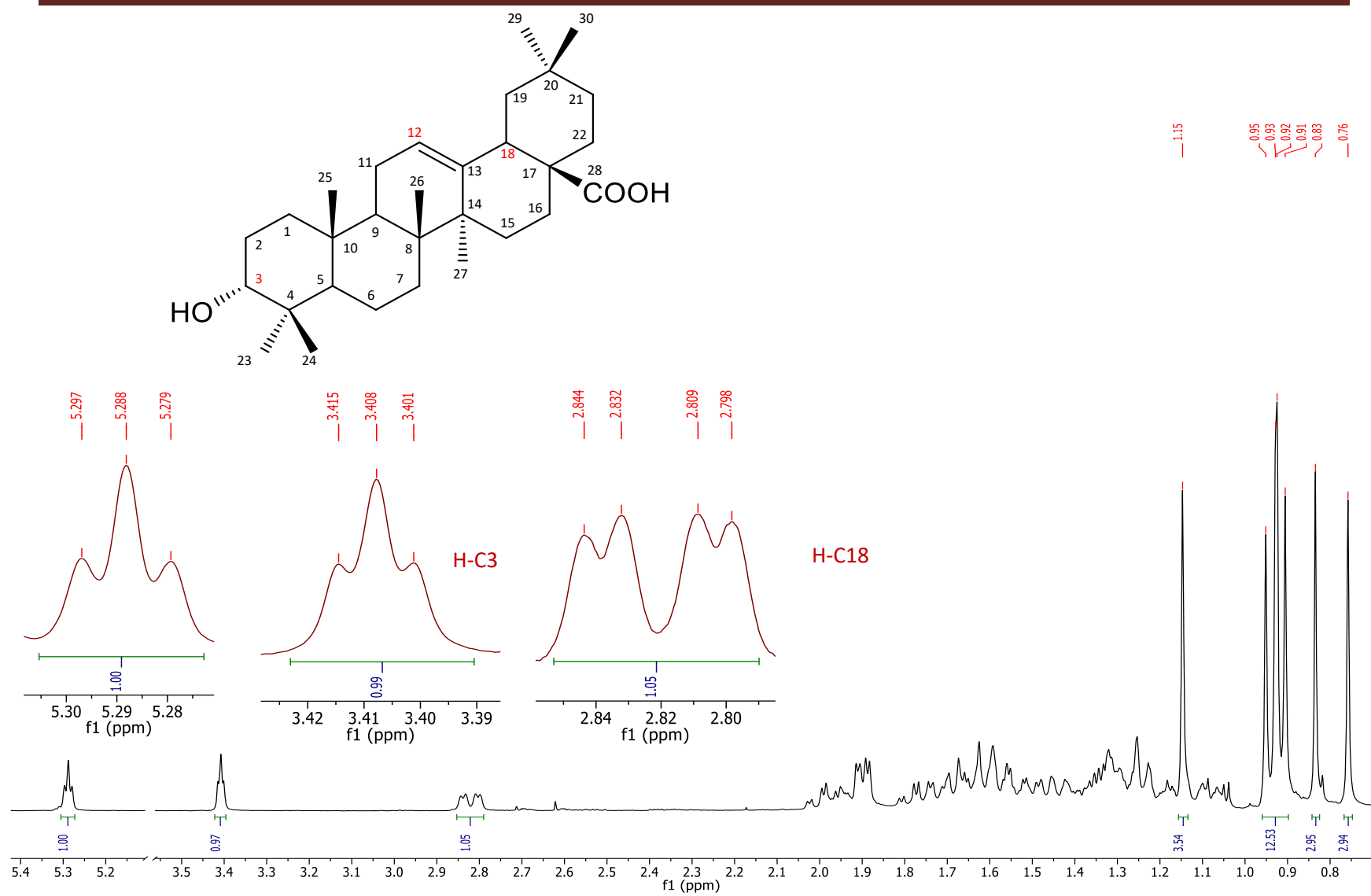
---

oleanólico; sin embargo, la multiplicidad no es la misma para el hidrógeno unido C-3. En el ácido oleanólico el grupo hidroxilo unido al C-3 está en posición  $\beta$  y la señal del hidrógeno unido al mismo carbono se desplaza a 3.21 ppm y es una claro dd ( $J= 10.2$  y  $4.8$ ) debido al ángulo entre el hidrógeno en cuestión y sus dos hidrógenos vecinos unidos a C-2, por lo tanto, se propuso que tenemos el ácido 3-*epi*-oleanólico (Fig. 16) (Pereda-Miranda, 1994). Por lo que la señal en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 2.82 ppm corresponde al hidrógeno en C-18, la señal en 3.3 ppm al hidrógeno en C-3 y la señal en 5.25 ppm corresponde al hidrógeno en C-12.

**Cuadro 4.** Asignaciones de las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$  del ácido 3epi-oleanolico a 400 MHz.

Posición	$^{13}\text{C}$ (J, Hz) $\text{CD}_3\text{OD}$	$^{13}\text{C}$ (J, Hz) $\text{CDCl}_3$
1	38.18	37.3
2	26.48	26.23
3	76.87	76.32
4	38.91	37.49
5	50.02	49.12
6	22.89	22.41
7	33.84	32.65
8	40.7	39.58
9	48.64	47.55
10	34.91	33.93
11	23.99	23.12
12	123.72	122.86
13	145.18	143.72
14	43.01	41.85
15	28.8	27.76
16	24.07	23.46
17	47.65	46.64
18	42.74	41.17
19	47.26	46.03
20	31.62	30.83
21	34.17	33.22
22	33.57	32.6
23	29.04	28.43
24	15.76	15.26
25	17.72	17.28
26	19.36	18.39
27	26.21	25.33
28	181.88	g182.41
29	33.95	33.01
30	24.45	23.74

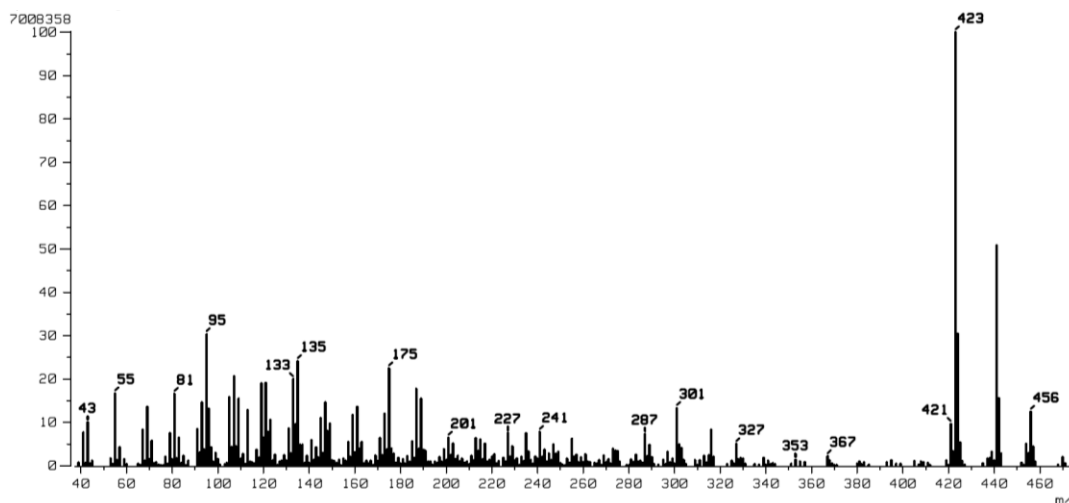




**Figura 16.** Estructura del ácido 3-*epi*-oleanólico y RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) a 400 MHz.

### 7.3.2 Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico

El ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>) tiene un punto de fusión con degradación de 175°C, es de color blanco y forma cristales cúbicos. En su EM podemos observar el pico base con una m/z de 456 (Fig. 17).



**Figura 17.** Espectro de masas del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) a 400 MHz podemos observar a campo alto las señales características de los siete metilos de un triterpeno (0.79, 0.86, 0.90, 0.91, 0.92, 1.01 y 1.87 ppm). Para este triterpeno las señales más características son tres: la primera un td a 5.94 ppm (J=7.6 y 1.5 Hz) y la segunda un dd a 5.27 ppm (J=6.4 y 2.8 Hz), que corresponden hidrógenos unidos a carbonos que forman un doble enlace; la tercera señal corresponde a un triplete ancho a 3.39 ppm (J=2.8 Hz) lo que indica que el hidrógeno unido a un carbono base de oxígeno (Fig. 18).

Por su parte, en el espectro de <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD) presenta señales para 30 átomos de carbono (Cuadro 5), el experimento DEPT nos indicó que de los carbonos que tiene la molécula 6 son metinos, 9 metilenos y 7 metilos. Las señales de los carbonos que nos proporcionaron mayor información sobre la identidad de los carbonos fueron las siguientes: la primera a 171.7 ppm correspondiente a un carbono de un grupo carbonilo; las señales en 147.3, 144.1, 128.5 y 119.3 ppm correspondiente a carbonos vinílicos, lo que indica que la molécula tiene dos dobles enlaces y una señal en 77.0 que es para un carbono base de oxígeno.

---

Comparando estos datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura (Gómez-Cansino *et al.*, 2015. 2015; Morales-Martínez, 2011) encontramos que las señales eran muy similares a aquellas reportadas el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico, el cual ya ha sido aislado de *Amphipterigyum adstringens*. Por lo tanto, en el espectro de  $^1\text{H}$  la señal en 5.94 ppm corresponde al hidrógeno unido C-24, la señal en 5.27 ppm corresponden al hidrógeno unido a C-7 y la señal en 3.39 ppm corresponde al H unido a C-3. Las asignaciones completas para el espectro de  $^{13}\text{C}$  se presentan en el cuadro 5. De dicho compuesto se obtuvieron cristales para su análisis en RX, los cuales confirmaron la estructura.

**Cuadro 5.** Asignaciones de las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$  del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico a 400 MHz (Gómez-Cansino *et al.*, 2015. 2015; Morales-Martínez, 2011).

Posición	$^{13}\text{C}$ *(J, Hz) CD <sub>3</sub> OD	$^{13}\text{C}$ *(J, Hz) CDCl <sub>3</sub>
1	32.5	31.39
2	26.5	25.54
3	77	76.51
4	38.35	37.56
5	45.7	44.71
6	25.01	24.08
7	119.3	118.83
8	147.3	147.33
9	49.9	48.8
10	35.79	34.89
11	19.2	18.4
12	35.16	34.15
13	44.7	43.66
14	52.3	51.39
15	35.15	33.95
16	29.2	28.36
17	54.1	52.98
18	22.38	21.97
19	13.6	13.15
20	37.4	36.26
21	18.8	18.15
22	36.8	35.83
23	27.6	27.08
24	144.1	146.28
25	128.5	125.83
26	171.77	172.57
27	21	20.72
28	28.6	27.95
29	22.38	22.04
30	27.9	27.42

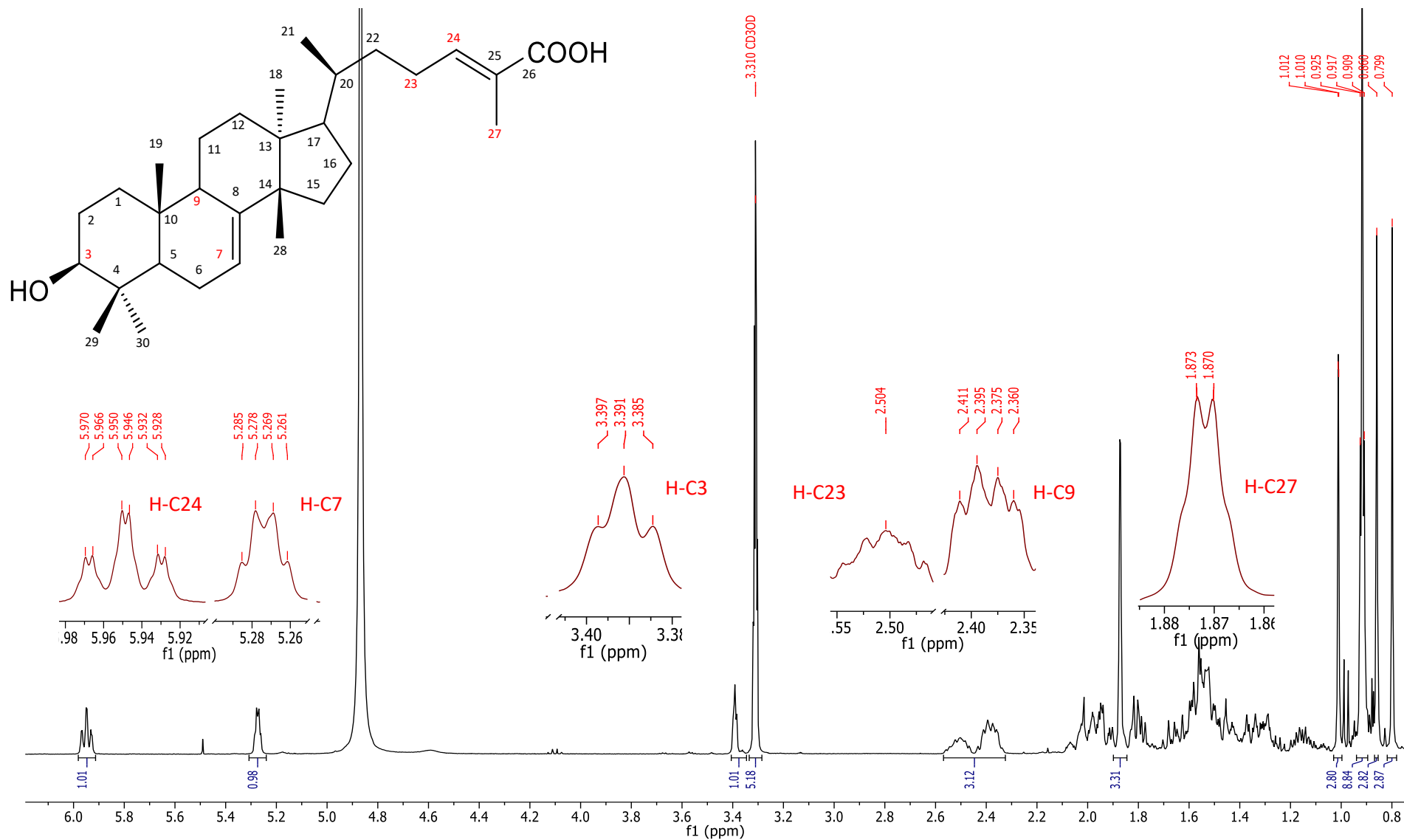
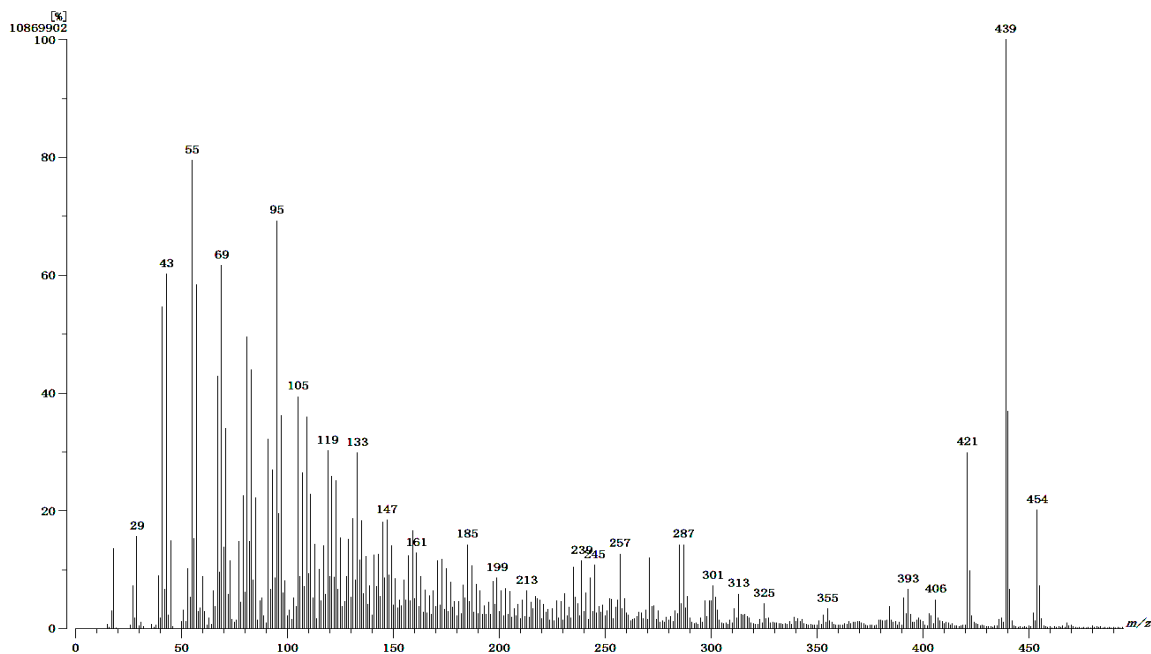


Figura 18. Estructura del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico y RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) a 400 MHz.

### 7.3.3 Ácido masticadienónico

El ácido masticadienónico ( $C_{30}H_{46}O_3$ ) tiene un punto de fusión de  $185^{\circ}C$ , presenta una coloración blanca y forma cristales en forma de aguja. En su EM observamos el pico base con una  $m/z$  de 454 coincide con lo reportado en la literatura (Fig. 19).



**Figura 19.** Espectro de masas del ácido masticadienónico

En el espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ) a 300 MHz observamos las señales características de los siete metilos de un triterpeno (0.81, 0.88, 0.9, 1, 1.05, 1.12 y 1.92 ppm). Para este triterpeno las señales características son dos: la primera un dd 6.08ppm ( $J= 6.6$  y  $1.8$ ) y la segunda otro doblete en 5.3 ppm ( $J=3.3$ ), por su desplazamiento, ambas señales indican que son debidas a protones de dobles enlaces (Fig. 20).

Por su parte, en el espectro de  $^{13}C$  presenta señales para 30 átomos de carbono (Cuadro 6), el experimento DEPT nos indicó que de los carbonos que tiene la molécula 6 son metinos, 9 metilenos y 7 metilos Las señales de los carbonos que nos proporcionaron mayor información sobre la identidad de los carbonos fueron las siguientes: la primera a 172.04 ppm y otra en 217.11 ppm correspondientes a un carbonos con un grupo carbonilo; las señales en 146.11, 147.25, 125.77 y 117.96 ppm correspondiente a carbonos vinílicos, lo que indica que la molécula tiene dos dobles enlaces.

---

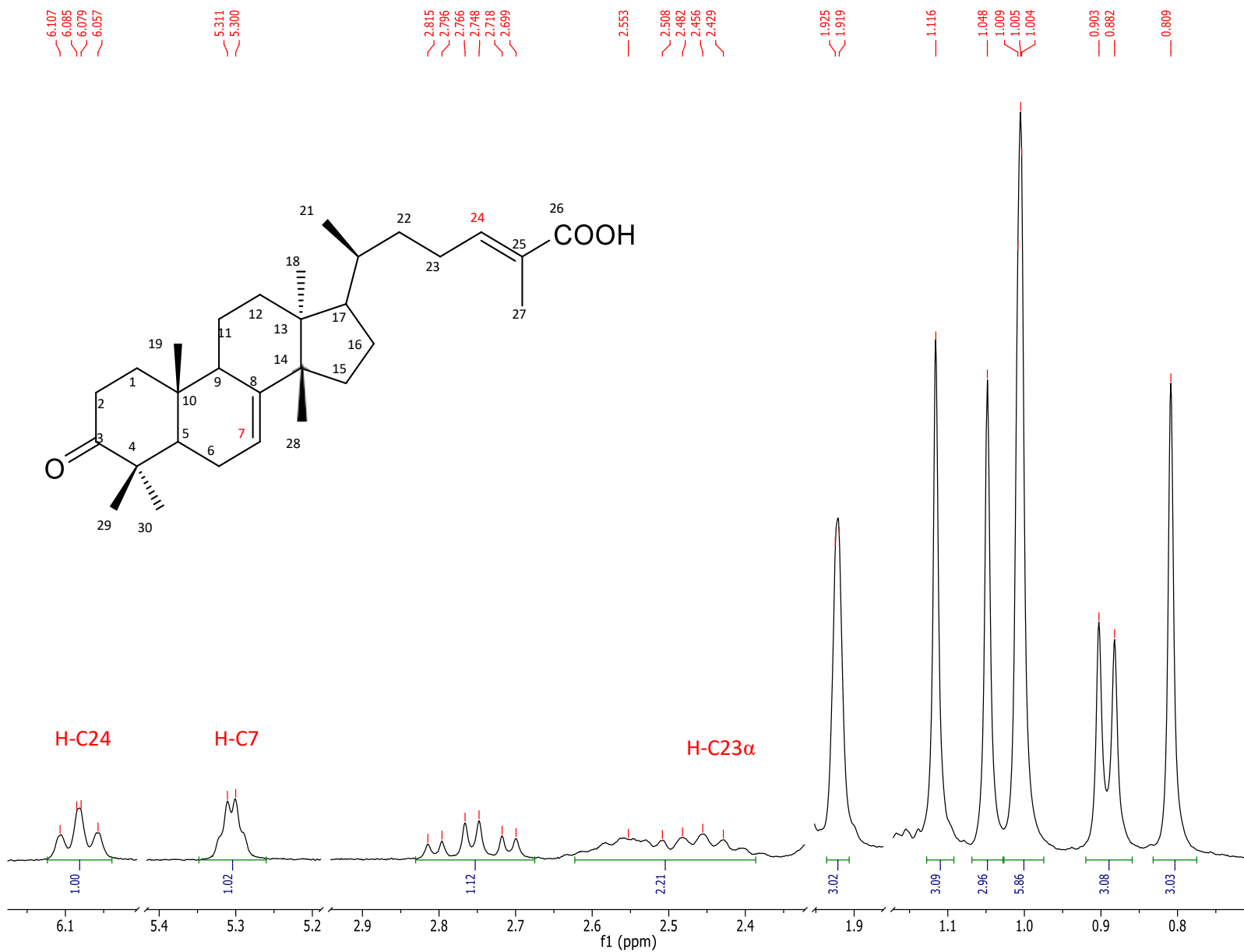
Comparando estos datos espectroscópicos con lo reportado en la literatura (Morales-Martínez 2011, Konno C *et al.*, 1981, Nicholson *et al.*, 2011) encontramos que las señales eran muy similares a aquellas reportadas para el ácido masticadienónico el cual ya ha sido aislado de *Amphipterigyum adstringens* y es un compuesto característico para el género.

Por lo tanto, en el espectro de  $^1\text{H}$  la señal en 6.08 ppm corresponde al hidrógeno unido al C-24, la señal en 5.3 ppm corresponden al hidrógeno unido al C-7. Las asignaciones completas para el espectro de  $^{13}\text{C}$  se presentan en el cuadro 6. De dicho compuesto se obtuvieron cristales para su análisis en RX, los cuales confirmaron la estructura.

**Cuadro 6.** Asignaciones de las señales de  $^{13}\text{C}$  del ácido masticadienónico a 300 MHz.

<b>Posición</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math> *(J, Hz) <math>\text{CDCl}_3</math></b>
1	38.69
2	35.09
3	217.11
4	48.04
5	52.49
6	24.53
7	117.96
8	146.11
9	48.63
10	35.18
11	18.45
12	34.21
13	43.68
14	51.34
15	33.21
16	28.36
17	53.03
18	12.96
19	18.38
20	36.21
21	22.12
22	35.79
23	27.07
24	147.25
25	125.77
26	172.04
27	20.74
28	27.58
29	24.7
30	21.76

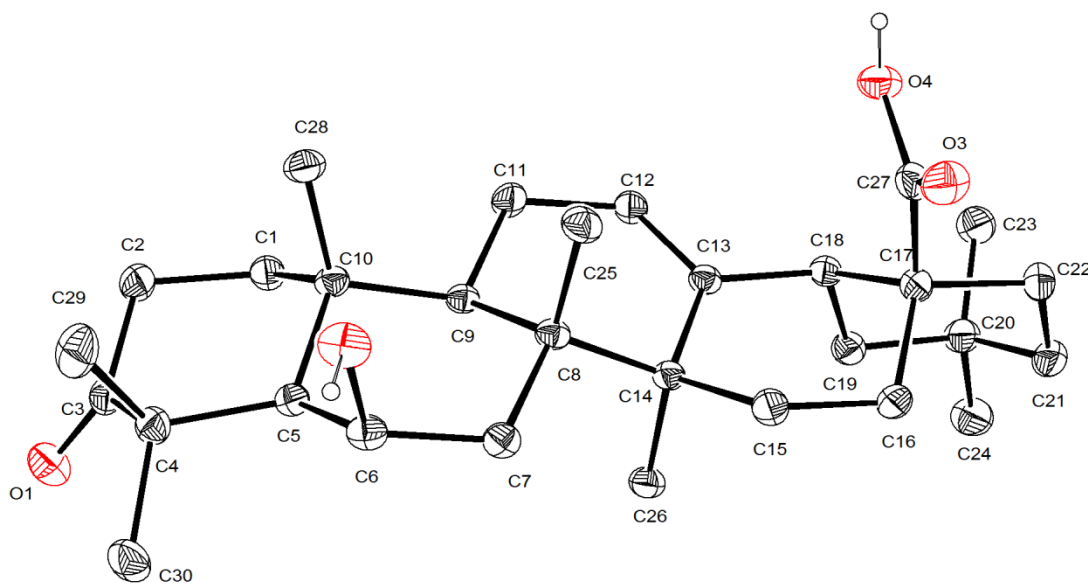




**Figura 20.** Estructura del ácido masticadienónico y RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) a 300 MHz.

### 7.3.4 Ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico

La identificación del ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico (C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>) se realizó mediante difracción de rayos X (Fig 21) y a continuación se muestra la estructura proporcionada.



**Figura 21.** Estructura de rayos X del ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico

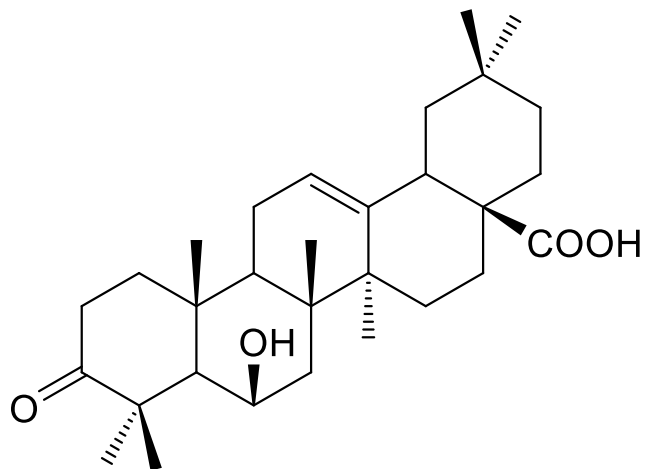
El experimento DEPT nos indicó la molécula presenta 5 metinos, 9 metilenos y 7 metilos y espectro de RMN <sup>13</sup>C presenta señales para 30 átomos de carbono, las asignaciones de las señales se realizaron a 300 MHz  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>): 16.6 (CH<sub>3</sub>), 18.74 (CH<sub>3</sub>), 23.62 (CH<sub>2</sub>), 23.71 (CH<sub>3</sub>), 24.08 (CH<sub>3</sub>), 26.03 (CH<sub>3</sub>), 26.03 (CH<sub>3</sub>), 27.79 (CH<sub>2</sub>), 29.85 (CH<sub>2</sub>), 30.52 (C), 32.41 (CH<sub>2</sub>), 33.2 (CH<sub>3</sub>), 33.98 (CH<sub>2</sub>), 34.53 (CH<sub>2</sub>), 36.58 (C), 38.71 (C), 40.44 (CH<sub>2</sub>), 41.17 (CH), 41.62 (CH<sub>2</sub>), 42.56 (C), 45.95 (CH<sub>2</sub>), 46.68 (C), 47.45 (CH), 48.88 (C), 56.8 (CH), 69.42 (CH), 122.76 (CH), 143.08 (C), 183.47 (COOH), 216.73 (CO).

Las señales de los carbonos que proporcionan mayor información sobre la identidad de la molécula son: las señales en 183.47 y 216.73 ppm correspondientes a dos grupos carbonilo con carbonos en las posiciones 27 y 3 respectivamente; las señales en 122.76 y 143.08 ppm correspondientes a carbonos vinílicos, lo cual indica que la molécula tiene un doble enlace, correspondiente a los carbonos de las posiciones 12 y 13.

---

Este compuesto fue aislado por primera vez de *Orthopterygium huancuy*, (González *et al.*, 1983) recordemos que es árbol perteneciente a la familia Julianiaceae al igual que *A. molle* no obstante, aunque se clasifica en otro género llamado *Orthopterygium* nos recuerda la relación de estas especies.

Cabe resaltar, el aislamiento de esta molécula (Fig. 22) por primera vez en una especie del género *Amphipterygium* y que es la primera vez que se reporta su estructura de rayos X.

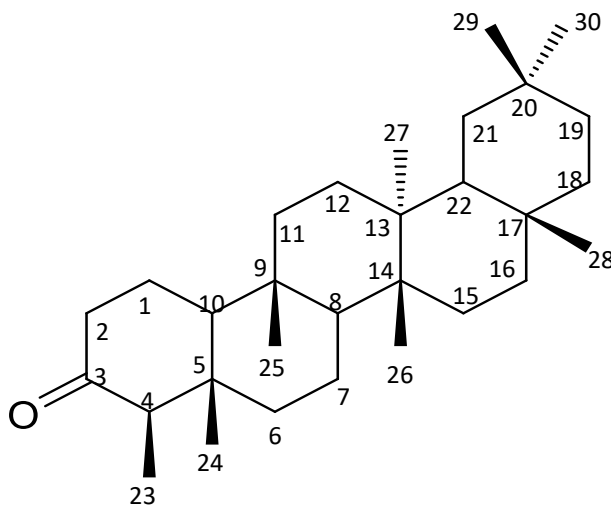


**Figura 22.** Estructura del 3-oxo-6 $\beta$ - hidroxiolean-12-en 28-oico.

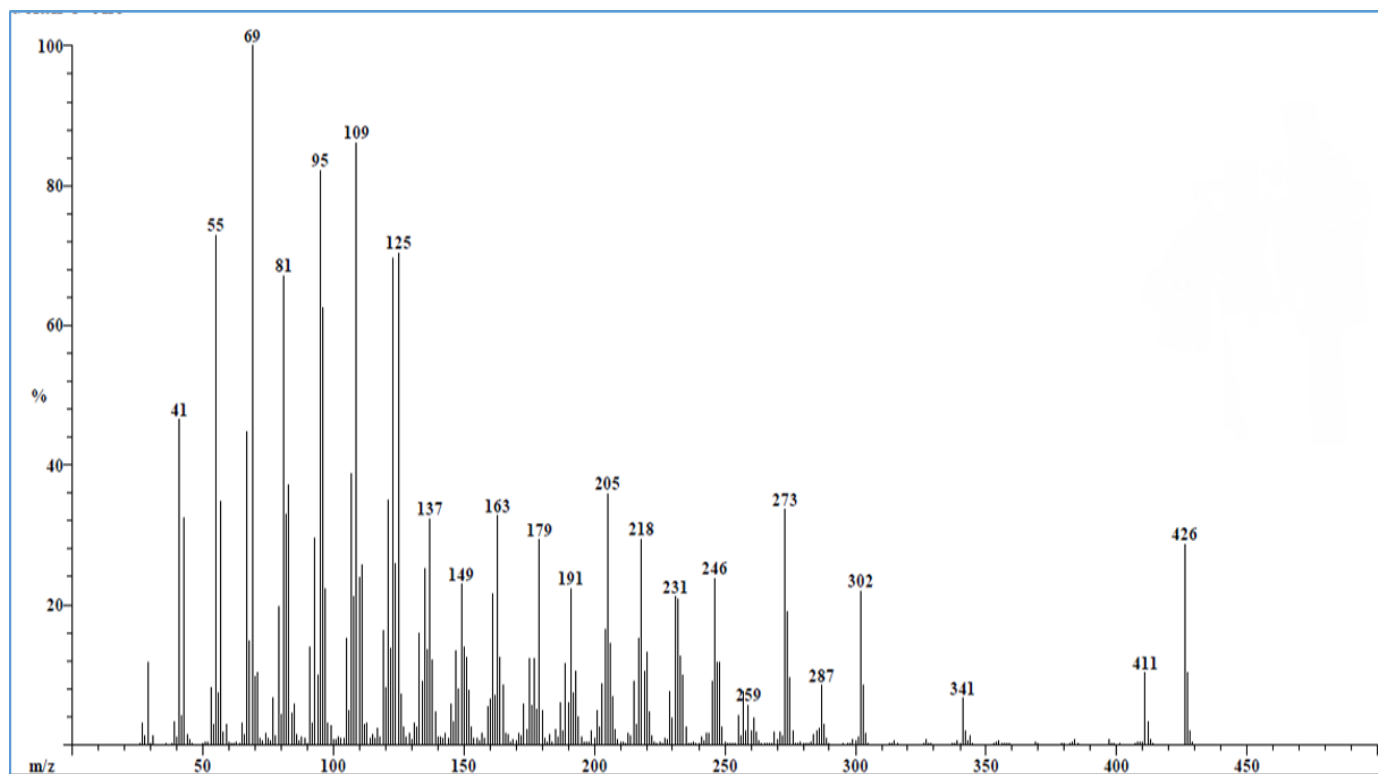
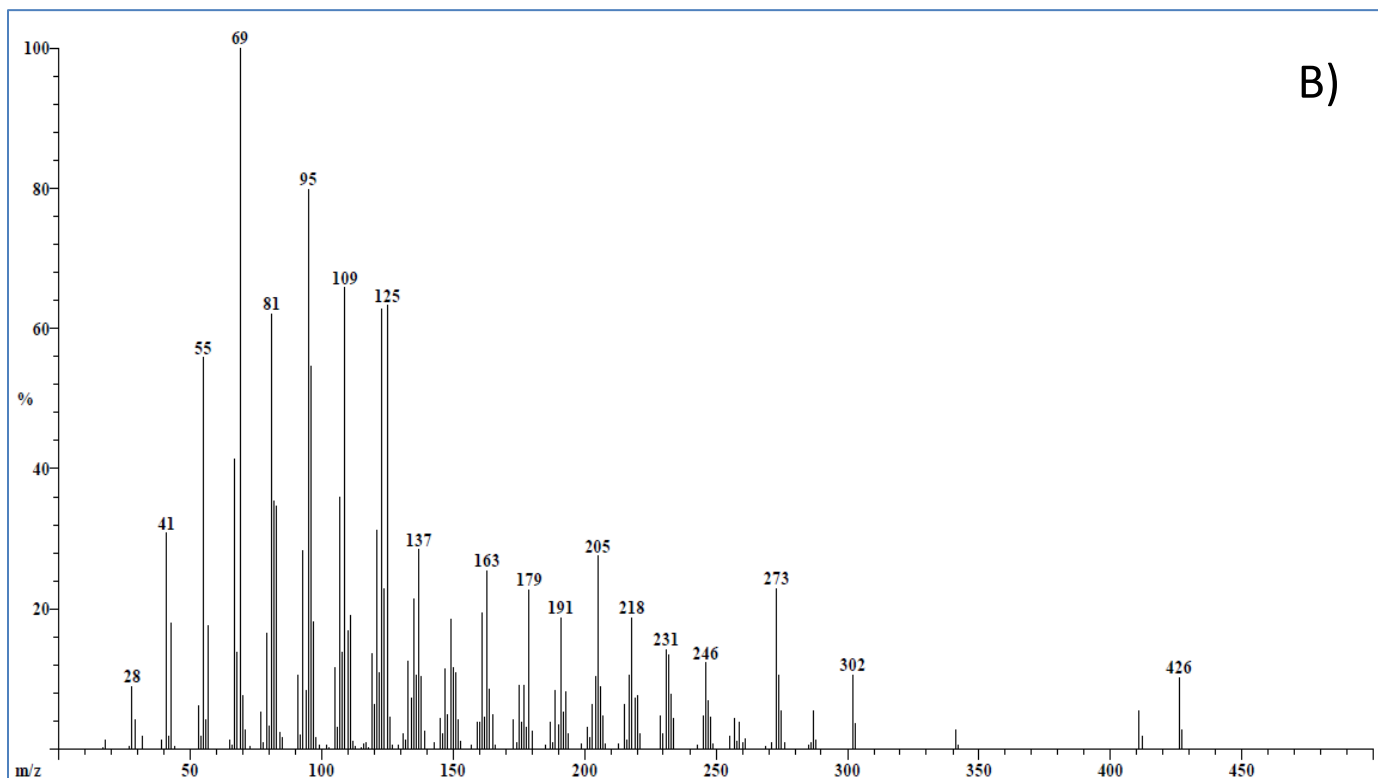
### 7.3.5 Fridelan-3-ona

La Fridelan-3-ona ( $C_{30}H_{50}O$ ) también llamada fridelina, friedelina o friedelanona (Fig. 23) tiene una masa molecular 426 g/mol (UNIIQUIM 2016), es un polvo de coloración amarillo claro y no se obtuvieron cristales. Esta molécula es muy conocida ya que se puede aislar de muchas y diferentes plantas como *Calophyllum inophyllum* (Yan-Zhi 2010), *Pterocarpus erinaceus* (Noufou O *et al.*, 2016) y *Azima tetracantha* (Paulrayer Antonisamy *et al.*, 2011). La fridelan-3-ona posee actividad antiinflamatoria, analgésica, antipirética (Paulrayer Antonisamy *et al.*, 2011) y antioxidante (Christudas Sunil *et al.*, 2013).

Este compuesto se analizó con cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (Fig. 24). Para su identificación únicamente se comparó su espectro masas con lo reportado en la base de datos.



**Figura 23.** Estructura química de la Fridelan-3-ona.



**Figura 24.** Espectro de masas por impacto electrónico  
 A) Muestra con clave Solido X, B) Muestra comparada con la base de datos

---

## 7.4 Actividad biológica de extractos y compuestos aislados de *A. molle*

### 7.4.1 Actividad sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv

La tuberculosis (TB) es una enfermedad oportunista causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, la OMS informa que en 2015 el número estimado de muertes por TB fue de 1.4 millones, más otros 0.4 millones de muertes por TB en personas VIH-positivas. Si bien las muertes por TB disminuyeron en un 22 % entre 2000 y 2015, la TB continuó siendo una de las diez principales causas mundiales de muerte en 2015, por ello las Naciones Unidas adoptaron en 2015 bajo los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para 2030; una de sus metas es poner fin a la epidemia mundial de tuberculosis (TB).

Sin embargo, la aparición de nuevos casos, el aumento en la incidencia de cepas multiresistentes (TB-MDR) y ultra resistentes (TB- XDR), los efectos adversos que causan los medicamentos de la primera y segunda línea, así como el aumento de la incidencia de la tuberculosis asociada con infecciones virales (virus de inmunodeficiencia humana, VIH), han ocasionado un renovado interés en la investigación de productos naturales, con la esperanza de descubrir nuevas pistas antituberculosos (García *et al.*, 2012).

En México se conoce el uso etnomédico de algunas especies vegetales en el tratamiento de la tuberculosis, entre ellas se encuentra *A. adstringens*, también conocida cuachalalate. Se ha demostrado que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *A. adstringens* ha inhibido *in vitro* el crecimiento de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (Rivero-Cruz 2005, Gómez-Cansino *et al.*, 2015.).

Siguiendo un criterio quimiotaxonómico, en este estudio se hizo la evaluación de la actividad del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *A. molle* sexo masculino y de los compuestos 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico y el Ácido 3-*epi*-oleanólico, utilizando un inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 la cual es una cepa virulenta, por ello se contó con el apoyo de Dra. Mayra Silva Miranda para el manejo de dicha cepa en el laboratorio de Bioseguridad BSL-3, utilizando en ensayo de REMA se presentan los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Valores de MIC para compuestos evaluados y el extracto de *A. molle*

Tratamiento	MIC sobre <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv
Ácido 3 $\alpha$ -Hidroximasticadienólico	62.5 $\mu$ M
Ácido 3- <i>epi</i> -oleanólico	125 $\mu$ M
Extracto de <i>A. molle</i>	250 $\mu$ g/mL

Con base en lo ya reportado, se considera que una buena MIC contra la *M. tuberculosis* cepa H37Rv debe tener un valor inferior a 100  $\mu$ g/mL para extractos y 10  $\mu$ g/mL para compuestos puros (Ríos- Recio 2005), no obstante, otros autores mencionan una MIC menor a 10  $\mu$ M para compuestos puros (Kei Katsuno *et al.*, 2015). Al analizar nuestros datos observamos que los valores sobrepasan el valor estándar para una buena MIC sobre *M. tuberculosis* (Cuadro 7), en un estudio realizado por Rivero-Cruz en 2005 exploraron el potencial antimicobacteriano de compuestos derivados de plantas mexicanas, entre ellas *A. adstringens*, se calcularon las MIC para el ácido masticadienónico (64  $\mu$ g/mL o 140.96  $\mu$ M), y para ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico (32  $\mu$ g/mL o 70.17  $\mu$ M), este último dato concuerda con nuestra MIC para el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico (62.5  $\mu$ M), lo que indica que el compuesto es medianamente activo. Valdría la pena probar este compuesto en otros modelos con *M. tuberculosis*, por ejemplo, macrófagos infectados con la bacteria, para determinar si continúa teniendo efecto o probar la sinergia que presenta con otros compuestos obtenidos a partir de las especies del género y/o fármacos ya utilizados en la terapéutica. Por otro lado, los estudios de Rivero-Cruz (2005) menciona un % de inhibición para el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *A. adstringens* 95 %, mientras que en 2015 Gómez-Cansino *et al.*, mencionan un % de inhibición de 88.2 % extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *A. adstringens* y del y 89.6 % para *A. molle*, sin embargo, la MIC obtenida indica que no es un extracto muy activo.

---

#### 7.4.2 Actividad citotóxica sobre la línea celular SW620

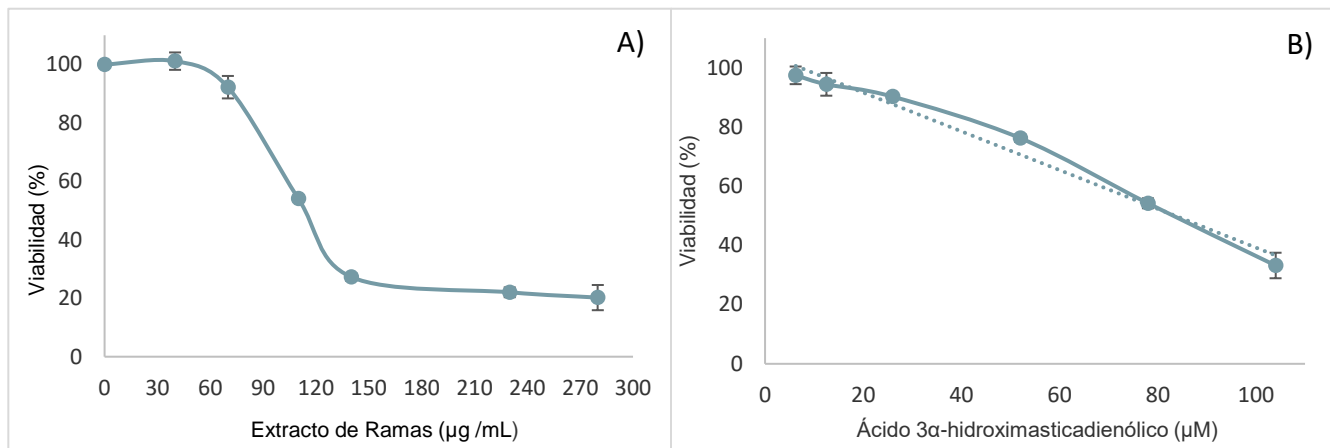
El cáncer colorrectal es uno de los cánceres de mayor incidencia en el mundo, de acuerdo con los datos más recientes publicados por Globocan en 2012, entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer colorrectal se encuentra en el tercer lugar de incidencia con 1 360 602 casos a nivel mundial y en el cuarto lugar de mortalidad con 723 073 casos a nivel mundial.

Las plantas medicinales se han utilizado en la lucha contra el cáncer como la base para el descubrimiento de fármacos y en la actualidad más del 70 % de los fármacos contra el cáncer tienen un origen natural (Jacobo-Herrera *et al.*, 2016). México es un país que se caracteriza por tener una riqueza en cuanto al conocimiento y uso de plantas medicinales para el tratamiento de muchas enfermedades y el cáncer no es la excepción. La información etnobotánica relacionada con el uso de especies para el tratamiento del cáncer o afecciones relacionadas con éste, como el dolor de estómago, inflamación de intestinos, etc. es muy valiosa para la selección de especies a evaluar; es decir la información etnobotánica crea un cernimiento de especies o extractos con posible potencial actividad citotóxica sobre líneas tumorales.

*A. molle* es una de las cuatro especies en México del género *Amphipterygium*, en su conjunto son conocidas en la medicina tradicional mexicana con el nombre popular de “cuachalalate”, la infusión de la corteza del cuachalalate tiene un reconocido uso por la población como remedio para diferentes afecciones estomacales, entre ellas el cáncer. De las cuatro especies de *Amphipterygium*, solo *A. adstringens* tiene estudios sobre su actividad citotóxica y el aislamiento e identificación de sus principios activos, así que, en este trabajo, siguiendo un criterio quimiotaxonómico, uno de los objetivos fue evaluar la actividad citotóxica sobre el modelo de *A. molle* y la búsqueda de sus principios activos.

En este estudio se realizó la evaluación del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de ramas y corteza de *A. molle* árbol masculino. Con los datos viabilidad celular en función a la concentración (Fig. 25) se determinó una IC<sub>50</sub> es decir la concentración a la que se disminuye la viabilidad celular en 50 %, los resultados se muestran en el cuadro 8.





**Figura 25.** Grafica de concentración vs viabilidad celular **A)** Extracto de ramas de *A. molle* sobre la viabilidad de las células SW620 a una concentración máxima de 280 µg/mL. **B)** Ácido 3α-hidroximasticadienónico sobre la viabilidad de las células SW620 a una concentración máxima de 104.39 µM

**Cuadro 8.** Valores de IC<sub>50</sub> para extractos y compuestos evaluados

Tratamiento	IC <sub>50</sub> de SW620
Extracto de corteza diclorometano metanol 1:1	>150* µg/mL
Extracto de ramas diclorometano metanol 1:1	108.76 ±9.94 µg/mL
Ácido 3α-hidroximasticadienónico	83.12±2.06 µM
Ácido 3 epi-oleanólico	ND

El National Cancer Institute (NCI) considera a un extracto o a un compuesto puro activo in vitro, en líneas celulares la CE<sub>50</sub> es ≤ 20 µg/mL o ≤ 4 µg/mL, respectivamente (Jacobo-Herrera *et al.*, 2016). El extracto de ramas de *A. molle* resultó activo (108.76 ±9.94 µg/mL) a diferencia del extracto de corteza; sin embargo, poco activo con respecto a los criterios del NCI. Por otra parte, Oviedo *et al.*, (2005) reportaron la IC<sub>50</sub> del extracto hexánico de la corteza de *A. adstringens* (IC<sub>50</sub>: 13.7 ± 1.0 µg/mL) y como constituyentes activos al ácido 3α-hidroximasticadienónico (IC<sub>50</sub>: 27.6 ± 6.0 µM) y al ácido masticadienónico (42.1 ± 6.4 µM) sobre la línea celular HCT-15 de cáncer de colon. Sin embargo, no mencionan la cantidad de los principios activos en el extracto, lo que nos ayudaría a explicar la diferencia en la actividad, ya que, de nuestro extracto evaluado, también se aisló el ácido 3α-hidroximasticadienónico y el ácido masticadienónico.

---

Por otra parte, hay que recordar que a pesar de que ambas líneas celulares sean aisladas de adenocarcinoma de cáncer de colon pueden actuar de diferente modo, como observamos en un estudio realizado por Ozawa *et al.*, (2012) en el que calculan la IC<sub>50</sub> de un nuevo fármaco anticanceroso llamado indisulam sobre 4 líneas celulares de cáncer de colon: HCT116 (IC<sub>50</sub>: 0.198 ± 0.009), SW620 (IC<sub>50</sub>: 13.3 ± 0.4), HCT15 (IC<sub>50</sub>: 67.9 ± 4.9) y WiDr (IC<sub>50</sub>: 48.4 ± 0.6) donde los resultados dan una diferente IC<sub>50</sub> a pesar de usar el mismo fármaco. Esto podría explicar la diferencia entre las IC<sub>50</sub> reportadas en la literatura para el 3α-hidroxiimasticadienólico sobre la línea HCT-15 (Oviedo *et. al.* 2005) y lo obtenido para ácido 3α-hidroxiimasticadienólico sobre la línea celular SW620. Para profundizar y hacer más objetivo este estudio se deben homogeneizar las variantes, como es el caso de los extractos, hay que probar un mismo sistema de elución y ampliar las líneas celulares para demostrar el efecto citotóxico de *A. molle*.

---

## 8. CONCLUSIONES

- Se lograron aislar e identificar 5 compuestos diferentes para *A. molle* sexo masculino: ácido 3-*epi*-oleanólico, ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico, ácido masticadienónico, ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico y la fridelan-3-ona.
- La fridelan-3-ona, los ácidos 3-*epi*-oleanólico y 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico no se habían aislado para el género *Amphipterygium*.
- Es la primera vez que se reporta la estructura de Rayos X para el ácido 3-oxo-6 $\beta$ -hidroxiolean-12-en 28-oico.
- El extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de ramas de *A. molle* presenta una mejor actividad sobre la línea celular SW620 en comparación con el extracto de corteza.
- El ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico presentó una baja actividad sobre la línea SW620, pero se debe probar en otras líneas celulares para confirmar su efecto citotóxico, ya que se ha reportado su eficacia sobre otras líneas celulares.
- El ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico es medianamente activo contra *M. tuberculosis*.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo HR, Rojas MD, Arceo SD, Soto Hernández M, Martínez Vázquez M, Terrazas T, del Toro GV. (2006). Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res*, **609**: 43-46.
- Arrieta J, Benítez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med*, **69**: 905-909.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). Cuachalalate [En línea] Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Etnobotánica y Antropológica UNAM. México. Consultado el 7 de marzo de 2016. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t&id=7945>
- Budzikiewicz H, Wilson J.M, Djerassi C. (1963). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J of the American Chemistry Society*, **85**: 3688-3690.
- Konno C, Saito T, Oshima Y, Hikino H, Kabuto C. (1981). Structure of methyl adenophorate and triphyllol, triterpenoids of *Adenophora triphylla* var. *japonica* roots. *Planta Med*, **42**: 268-274.
- Castillo-Juárez I, García-Contreras R, Velázquez-Guadarrama N, Soto-Hernández M, Martínez-Vázquez M. (2013). *Amphipterygium adstringens* anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Med Res*, **44**: 488-494.
- Castillo-Juárez I, Rivero-Cruz F, Celis H, Romero I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol*, **114**: 72-77.
- Castro de Pardo (2006) Práctica IV. Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT [En línea] Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia. Consultado 8 de marzo de 2017. [http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-IV-2.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf)
- Chávez IO., Apan TR., Martínez-Vázquez M. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J Pharm Pharmacol*, **57**: 1087-1091.

- 
- Christudas Sunil, Veeramuthu Duraipandiyan, Savarimuthu Ignacimuthu, Naif Abdullah Al-Dhabi (2013). Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. *Food Chem*, **139** (1-4): 860-865.
- Cuevas FX. (2001). Familia *Julianiaceae* en el estado de Jalisco, México 2001. Universidad de Guadalajara.
- Cuevas FX. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *IBUGANA*, **13**, 27-47.
- García A, Bocanegra-García V, Palma-Nicolás JP, Rivera G. (2012). Recent advances in antitubercular natural products. *Eur J Med Chem* **49**: 1-23.
- GLOBOCAN (2012). Colorectal Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [En línea] International Agency for Research on Cancer (IARC) WHO. Consultado: 11 de febrero de 2017. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
- Gómez-Cansino R., Espitia-Pinzón CI, Campos-Lara MG, Guzmán-Gutiérrez SL, Segura SE, Echeverría VG, Torras CL, Cuevas FX, Reyes CR. (2015). Anti-mycobacterial and HIV-1 Reverse Transcriptase Activity of Julianaceae and Clusiaceae Plant Species from Mexico. *Hindawi*, **2015**, 1-8.
- González G, Amaro J, Fraga BM, Gutiérrez L, Fayos J, Perales A, Méndez P. (1984). Minor triterpenes from *Orthopterygium huancuy*. *Phytochemistry*, **23**, **9**: 2079-2080.
- González-Sánchez I. (2009). Evaluación in vitro del uso combinado del derivado Tiazolo[5,4-B]Quinolina D3CLP con antineoplásicos de uso clínico. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Jacobo-Herrera NJ, Jacobo-Herrera FE, Zentella-Dehesa A, Andrade-Cetto A, Heinrich M, Pérez-Plasencia C. (2006). Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *J Ethnopharmacol*, **179**: 391-402.
- Kei Katsuno, Burrows J, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen, Kaneko T, Kita K, Mowbray C, Schmatz D, Warner P, Slingsby B. (2015). Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, **14**: 751-758
- Morales-Martínez E. (2011). Estudios de absorción in vitro de los ácidos 3-hidroximasticadienónico y masticadienónico aislados de Cuachalalate

- 
- (*Amphipterygium adstringens*). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin JP, Asakawa Y. (1987). Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **35**: 3016-3020.
- Makino M, Motegi T, Fujimoto Y. (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry*, **65**: 891-896.
- Mata R, Calzada F, Navarrete A, del Rio F, Delgado G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol*, **34**: 147-154.
- Medina Lemos R, Fonseca R.M, (2009) Flora del valle de tehuacán-cuicatlán. Fascículo 71. Anacardiaceae Instituto de Biología, UNAM **71**: 1-54.
- Navarijo, L. (2004). Presencia e importancia de los animales en la medicina tradicional de los grupos otomíes. *Estudios de Cultura Otomíes*, **4**: 197-214.
- Navarrete A, Oliva I, Sánchez-Mendoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Castañeda Hernández G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*, **57**: 1629-1636.
- Nicholson TM, Gradl M, Welte B, Metzger M, Pusch CM, Albert K. (2011). Enlightening the past: analytical proof for the use of Pistacia exudates in ancient Egyptian embalming resins. *J Sep Sci*, **34**: 3364-3371.
- Noufou O, Anne-Emmanuelle H, Claude W, Richard SW, André T, Marius L, Jean-Baptiste N, Jean K, Marie-Genevieve DF, Pierre GI. (2016). Biological and phytochemical investigations of extracts from *Pterocarpus erinaceus* poir (Fabaceae) root barks. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **14**: 187-195.
- Olivera-Ortega AG, Soto-Hernández M, Martínez-Vázquez M, Terrazas T, Solares-Arenas F. (1999). Phytochemical study of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede Ex Schlecht). *J Ethnopharmacol*, **68**: 109-113
- OMS<sup>A</sup> (2016). Medicina tradicional: Definiciones. [En línea] Organización Mundial De La Salud, Ginebra, Suiza. Consultado: 3 de octubre de 2016, [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)

- 
- OMS<sup>B</sup> (2017). Cáncer. Nota descriptiva. [En línea] Organización Mundial De La Salud, Ginebra, Suiza. Consultado: 3 de abril de 2017 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OMS<sup>C</sup> (2016). Global Tuberculosis Report 2016. Organización mundial de la salud. Ginebra, Suiza.
- OMS<sup>D</sup>. (2016). Tuberculosis. Nota descriptiva. [En línea] Organización Mundial De La Salud, Ginebra, Suiza. Consultado: 3 de abril de 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- OMS<sup>F</sup>. (2013) Misión de evaluación externa del programa de control de tuberculosis. Secretaría de Salud de México. México.
- Oviedo Chávez I, Ramírez Apan T, Martínez-Vázquez M. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J Pharm Pharmacol*, **57**:1–5.
- Ozawa Y, Kusano K, Owa T, Yokoi A, Asada M, Yoshimatsu K. (2012). Therapeutic potential and molecular mechanism of a novel sulfonamide anticancer drug, indisulam (E7070) in combination with CPT-11 for cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, **69**: 1353–1362.
- Paulrayer A, Veeramuthu D, Savarimuthu I. (2011). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. *J Pharm Pharmacol*, **63**: 1070-1077.
- Pereda-Miranda RG, (1994). Estructura de la tricolorina A, un glicolípido modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C y principal agente alelopático de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ríos J.L, Recio M.C, (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, **100**: 80-84.
- Rivero-Cruz I, Acevedo L, Guerrero JA, Martínez S, Bye R, Pereda-Miranda R, Franzblau S, Timmermann BN, Mata R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican Medicinal Plants. *J Pharm Pharmacol*, **57**: 1117-1126.
- Rosas-Acevedo H, Terrazas T, Gonzalez-Trujano ME, Guzman Y, Soto-Hernandez M. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *J Ethnopharmacol*. **134**: 67-73

- 
- Sociedad Americana Contra El Cáncer<sup>A</sup> (2017). Acerca del cáncer colorrectal. ¿Cómo se origina el cáncer colorrectal? [En línea] Sociedad Americana Contra El Cáncer. Consultado el 9 de agosto del 2017. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-y-sintomas.html>
- Sociedad Americana Contra El Cáncer<sup>B</sup> (2017). Detección temprana, diagnóstico y clasificación por etapas. Señales y síntomas del cáncer colorrectal [En línea] Sociedad Americana Contra El Cáncer. Consultado el 9 de agosto del 2017. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-y-sintomas.html>
- Solares Arenas, Gálvez Corté (2002). Manual para UNIIQUIM (2016). Fridelina [En línea] Unidad de Informática del Instituto de Química una producción sustentable de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* schiede ex schlecht). SAGARPA. Morelos, México
- Stevens, P. F.(2001) Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [En línea] Missouri Botanical Garden. Consultado el 9 de octubre del 2017 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- UNIIQUIM (2016). Fridelina [En línea] Unidad de Informática del Instituto de Química. UNAM Consultado 22 de mayo de 2017. <https://uniiquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/fridelina/>
- Yan-Zhi, Zhan-Lin, Shi-Liang, Guang Shi, Ming-Sheng, Yong-Kui, Hui-Ming. (2010). Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. *Fitoterapia* **81**: 586–589



---

## **ANEXO.**

Soluciones y forma de preparación (González Sánchez, 2009)

### **Solución de MTT (2.5 mg/mL)**

Preparar 50 mL

MTT	125 mg
PBS	50 mL

Para la preparación de MTT se debe usar guantes y cubre bocas ya que es tóxico. Se pesaron 125 mg de MTT en un tubo estéril de 50 mL, y se agregaron 25 mL de PBS, una vez disuelto y se llevó a un volumen final de 50 mL y se cubrió con papel aluminio y se conservó en refrigeración.

### **Medio de cultivo.**

Medio DMEM con SFB (suero fetal bovino) al 10 %

Medio DMEM	10 g (1 sobre) Gibco-InvitroGene
NaHCO <sub>3</sub>	3.7 g
HEPES	2.2 g
L-Piruvato 100X	10 mL Gibco-InvitroGene
Antibiótico-Antimicótico 100X	10 mL Gibco-InvitroGene
Aminoácidos no esenciales 100X	10 mL
Agua desionizada estéril	870 mL
SFB	100 mL

La preparación de un litro de DMEM se realizó en una campana de flujo laminar, bajo condiciones estériles. A un vaso de precipitado (1L) se agregan 700 mL de agua desionizada estéril y los complementos sólidos para disolverlos por agitación constante con un agitador magnético, una vez disueltos se adicionaron los constituyentes líquidos y se llevó a un volumen de 900 mL. Para asegurar la esterilidad del medio se filtró usando una membrana con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Por último, se adicionó suero fetal bovino (SFB) a una concentración de 10 % final (100 mL). Para comprobar la esterilidad del medio se colocaron 4 mL del medio en una caja Petri y se incubó a 37°C por 48 h.

---

### **Medio de congelación**

Medio de cultivo DMEM complementado	95 %
DMSO	5 %

Los componentes se homogenizaron en un tubo falcón estéril y se conservaron en congelación a -20°C.

### **PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) y PBS- EDTA**

NaCl	7.93 g
KCl	0.198 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.239 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.439 g
EDTA	0.292
Agua destilada	1L

Para preparar un litro de PBS se mezclan las sales mencionadas sin EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en 1 litro de agua destilada y de ser necesario se ajusta el pH a 7.4. Para esterilizar se utiliza la autoclave. En el caso del el PBS-EDTA Se siguen los mismos pasos del PBS pero se agrega el EDTA.