



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Análisis del perfil fitoquímico y actividad citotóxica de callos y células en suspensión de
Bursera fagaroides

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA

María Nancy Pérez Mejía

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA

CUERNAVACA, MORELOS

junio, 2026

Esta tesis fue desarrollada en:

Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB-UAEM). Bajo la codirección de la Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega.



Laboratorio 321 de Biomoléculas del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ-UAEM), dirigido por la Dra. Laura Patricia Alvarez Berber.



Laboratorios 07 y 09 de la Facultad de Farmacia (UAEM), dirigido por las doctoras Leticia González Maya y Jessica Nayelli Sánchez Carranza.



Laboratorio del Centro de Investigación Biomédicas del Sur (CIBIS-IMSS), dirigido por los doctores Manasés González Cortazar y Alejandro Zamilpa Álvarez.



Jurado Revisor:

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (directora de tesis, CIQ UAEM)

Dra. Anabel Ortíz Caltempa (CEIB UAEM)

Dr. Manases González Cortázar (CIBIS IMSS)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB UAEM)

Dr. Mario Rodríguez Monroy (IPN)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dedicatorias

A Fabián, mi compañero de vida, por ser el puerto seguro en medio de las tormentas académicas. Gracias por tu paciencia infinita, por entender mis ausencias. Este título es tan tuyo como mío, pues fuiste el motor que me permitió llegar al final de este largo camino.

A mi bella hija Juliette, para que vea en este trabajo que la perseverancia es el único camino hacia los sueños. Que este logro sea testimonio de que nunca es tarde para aprender.

A mis maestros y mentores, que no solo me enseñaron la técnica, sino el rigor ético y la pasión por la verdad. Gracias por cuestionarme, pues en sus dudas encontré mis mejores respuestas.

A mi “yo” de hace cinco años, que estuvo a punto de rendirse tantas veces, pero decidió seguir adelante una noche más. Lo logramos.

A Dios por enseñarme que se le puede conocer en momentos de angustia y desesperación, por mostrarme el camino correcto y ser un guía invisible pero que siempre está presente.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Especie <i>Bursera fagaroides</i>	4
2.2 Estudios químicos de la identificación de lignanos de <i>Bursera fagaroides</i>	5
2.3 Cumarinas	6
2.4 Cultivo de células vegetales.....	9
2.4.1 Cultivos de Callos.....	10
2.4.2 Cultivo de células en suspensión	11
2.4.3 Cinética de crecimiento celular	14
2.5 Medios de Cultivo	15
2.5.1 Medio MS.....	15
2.5.2 Componentes de los medios de cultivo.....	16
2.5.2.1 Agua	16
2.5.2.2 Macronutrientes	16
2.5.2.3 Micronutrientes	16
2.5.2.4 Carbohidratos.....	17
2.5.2.5 Vitaminas.....	17
2.5.2.6 Mioinositol.....	18
2.5.2.7 Hormonas vegetales y reguladores de crecimiento	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos.....	25

6. METODOLOGÍA	26
6.1 Diagrama general	27
6.2 Identificación del material vegetal	27
6.3 Estudio Fitoquímico de las hojas de la planta silvestre de <i>B. fagaroides</i>	28
6.3.1 Material y equipo.....	28
6.3.2 Obtención de los extractos orgánicos	29
6.3.3 Separación e identificación de los compuestos de tipo lignano a partir del extracto con CH ₂ Cl ₂	29
6.3.3.1 Purificación de la reunión NPM40-02	33
6.3.3.2 Purificación y datos espectroscópicos de Yateina (1).....	34
6.3.3.3 Purificación de la reunión NPM40-04	34
6.4 Obtención de callos <i>B. fagaroides</i>	37
6.4.1 Obtención del material vegetal.....	37
6.4.2 Inducción a callo friable.....	37
6.4.3 Cinética de crecimiento del cultivo de callos.....	40
6.4.4 Morfología y viabilidad celular del cultivo de callos	41
6.5 Establecimiento de los cultivos en suspensión en matraz	41
6.5.1 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos del cultivo en suspensión.....	42
6.5.2 Morfología y viabilidad celular de los cultivos en suspensión	42
6.5.3 pH	43
6.5.4 Cuantificación del consumo de azúcares en el medio de cultivo de <i>B.</i> <i>fagaroides</i>	43
6.6 Estudio fitoquímico de los cultivos in vitro de <i>Bursera fagaroides</i>	44
6.6.1 Obtención de los extractos	44
6.6.2 Perfil químico e identificación de los compuestos mayoritarios.....	45
6.7 Actividad citotóxica	47
6.8 Análisis estadístico	48

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1 Rendimiento de los extractos de las hojas de la planta silvestre de <i>B. fagaroides</i> ...	50
7.2 Estudio fitoquímico del extracto con CH ₂ Cl ₂ de las hojas de la planta silvestre.....	50
7.2.1 Caracterización del compuesto yateina presente en el extracto de CH ₂ Cl ₂ de las hojas de la planta silvestre	52
7.3 Estudio biotecnológico	58
7.3.1 Cultivo de clones por esqueje.....	58
7.3.2 Inducción de callo en explantes de hoja de <i>B. fagaroides</i>	60
7.3.3 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos del cultivo de callos.....	64
7.3.4 Porcentaje de viabilidad, apariencia y morfología celular del cultivo de callos	65
7.4 Perfil químico de la biomasa seca del cultivo de callos de <i>B. fagaroides</i> presente en la cinética de crecimiento y comparación con el estándar de escopoletina.....	67
7.4.1 Perfil químico del fraccionamiento por CCA del extracto con CH ₂ Cl ₂ del cultivo de callos de <i>B. fagaroides</i>	71
7.5 Establecimiento de los cultivos en suspensión	76
7.5.1 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos del cultivo de células en suspensión	76
7.5.2 Cuantificación del consumo de azúcares en el medio de cultivo de <i>B. fagaroides</i>	79
7.5.3 Viabilidad celular y pH durante el crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>B. fagaroides</i>	81
7.6 Análisis del perfil químico de la biomasa y sobrenadante en la cinética de los cultivos en suspensión de <i>B. fagaroides</i>	82
7.7 Producción de escopoletina del extracto del cultivo de callos respecto al extracto de las hojas de la planta silvestre.....	88
7.7.1 Producción de escopoletina del extracto del cultivo de callos respecto al extracto de las hojas de la planta silvestre	88

7.7.2 Comparación de los parámetros cinéticos del cultivo de callos y cultivos en suspensión de <i>B. fagaroides</i>	90
7.8 Evaluación de la actividad citotóxica	93
8. CONCLUSIONES.....	95
9. PERSPECTIVAS	97
10. LITERATURA CITADA.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bursera fagaroides</i> . A) hojas y frutos, B) Corteza y C) Mapa de distribución.	4
Figura 2. Estructura química de los diecinueve lignanos aislados de la corteza de <i>B. fagaroides</i> . Tomado de: (Antúñez-Mojica et al., 2021).	6
Figura 3. Estructura química de la escopoletina.	7
Figura 4. Diferentes tipos de callo en las células vegetales..	11
Figura 5. Esquema general para la obtención de un cultivo celular en suspensión.	13
Figura 6. Sistemas de cultivo de suspensiones celulares vegetales. A) Cultivos cerrados, B) Cultivos continuos cerrados y C) Cultivos continuos abiertos.	14
Figura 7. Fases del crecimiento celular.	15
Figura 8. Diagrama general de trabajo	27
Figura 9. Cromatograma de HPLC de la fracción NPM-40-2 que contiene al compuesto yateina (1) TR = 13.57 minutos. 240 nm.	33
Figura 10. Cromatograma de CLAR de las fracciones NPM-40-3 y NPM-40-4 que contienen los compuestos 7'8-dehidropodofilotoxina (2) TR = 11.76 minutos y acetil podofilotoxina (3) TR = 16.24 minutos. 250 nm.	35
Figura 11. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna Abierta para la obtención de compuestos del tipo Lignano obtenidos a partir del extracto de CH ₂ Cl ₂ de las hojas de <i>Bursera fagaroides</i>	36
Figura 12. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna Abierta para la identificación de los compuestos mayoritarios obtenidos a partir del extracto de CH ₂ Cl ₂ del cultivo in vitro de <i>Bursera fagaroides</i>	47
Figura 13. Estructuras químicas de los compuestos de tipo lignano caracterizados mediante CLAR. (1) yateina, (2) 7'8'-dehidropodofilotoxina y (3) acetilpodofilotoxina.	52
Figura 14. Expansión de la región de δ 5.80 a δ 6.65 del espectro de RMN 1H de la yateina (1).	54

Figura 15. Expansión de $\delta 3.50$ a $\delta 3.94$ del espectro de RMN ^1H de la yateína (1).	55
Figura 16. Expansión de $\delta 2.30$ a $\delta 4.3$ del espectro de RMN ^1H de la yateína (1).	56
Figura 17. Cultivo los esquejes de <i>B. fagaroides</i> cultivados en condiciones de invernadero, observados en diferentes días y empleando dos sustratos: fibra de coco y arena de río. A y E) día 12, B y F) día 25, C y G) día 70 y D y H) día 139.	59
Figura 18. Inducción y desarrollo de callos a partir de explantes de hoja de <i>B. fagaroides</i> cultivados en fotoperiodo. (A) Desinfección de los explantes, (B) callo desdiferenciado después de 30 días en medio MS suplementado con 2,4-D: cinetina en una proporción de 2:2 mgL ⁻¹ , (C) cultivo de callos en medio MS suplementado con 2,4-D: cinetina en una proporción de 2:2 mgL ⁻¹ tras los subcultivos, (D) cultivo de callos a los 30 días en medio B5 con 2,4-D: ANA: zeatina en una proporción de 4:1:1 mgL ⁻¹ , (E, F) morfología y viabilidad celular en medio B5 con 2,4-D: ANA: zeatina en una proporción de 4:1:1 mgL ⁻¹ , medio B5 con 2,4-D: ANA: zeatina en una proporción de 4:1:1 mgL ⁻¹ , respectivamente, a los 30 días de cultivo. Barra = 0.5 cm y objetivo 40X.	61
Figura 19. A) Curva de crecimiento celular, B) Porcentaje de viabilidad celular, C y D) Apariencia y morfología celular de <i>Bursera fagaroides</i>	66
Figura 20. CCF de los extractos con CH_2Cl_2 de callos de <i>B. fagaroides</i> en diferentes días de cultivo. E= estándar de escopoletina. Rf= factor de retención.	68
Figura 21. Cromatograma del estándar de escopoletina a 350 nm (50 $\mu\text{g/mL}$).	68
Figura 22. Curva de producción de escopoletina respecto a la biomasa del peso seco en los diferentes días del cultivo de callos de <i>B. fagaroides</i> . Los valores se expresan como la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.	70
Figura 23. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) para la identificación de los compuestos mayoritarios obtenidos a partir del extracto de CH_2Cl_2 del cultivo in vitro de <i>Bursera fagaroides</i>	73
Figura 24. Estructuras químicas de los compuestos identificados por GC-MS y aislados por CC a partir del cultivo de callos de <i>B. fagaroides</i>	74
Figura 25. Cultivo en suspensión de <i>B. fagaroides</i> . A) cinética de crecimiento celular y B) apariencia del cultivo y C) morfología celular.	78

Figura 26. Curvas de calibración de los azúcares: A) sacarosa, B) glucosa y C) fructosa	79
Figura 27. Consumo de azúcares contra biomasa seca de los cultivos en suspensión de <i>B. fagaroides</i>	80
Figura 28. Viabilidad celular contra pH del cultivo de células en suspensión de <i>Bursera fagaroides</i> . A) Células teñidas con DAF a 4X, B) Gráfico viabilidad celular contra biomasa de peso seco.	82
Figura 29. CCF del Análisis cualitativo de extractos de cultivos en suspensión de <i>B. fagaroides</i> en diferentes días de cultivo con CH ₂ Cl ₂ . Fase normal 5:5 hexano:AcOEt en luz UV 366 a una concentración de 4mg/mL. A) biomasa y B) medio de cultivo. S=extracto CH ₂ Cl ₂ de las hojas de la planta silvestre, E= escopoletina y Rf= factor de retención.	84
Figura 30. Perfil cromatográfico del extracto con CH ₂ Cl ₂ del cultivo de células en suspensión de <i>B. fagaroides</i> . A) Biomasa del día 15, B) medio de cultivo del día 15 y C) medio de cultivo del día 22. 335 nm.	86
Figura 31. Producción de escopoletina en el extracto de callo y la hoja de la planta silvestre de <i>B. fagaroides</i>	88
Figura 32. Proceso de extracción de compuestos en hojas y cultivo de callos de <i>B. fagaroides</i>	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferentes tipos de cumarinas con algunas propiedades farmacológicas. (Tomado y modificado de Venugopala <i>et al.</i> , 2013).	8
Tabla 2. Ejemplos de auxinas y citoquininas utilizadas en el cultivo <i>in vitro</i> de plantas. ...	19
Tabla 3. Eluatos obtenidos a partir del fraccionamiento por columnas.	30
Tabla 4. Fraccionamiento de la columna 5.....	32
Tabla 5. Protocolo de desinfección de los explantes de hoja de <i>B. fagaroides</i> desarrollados a partir del cultivo de estacas.....	38
Tabla 6. Tratamientos seleccionados para la inducción a callo friable.....	39
Tabla 7. Compuestos encontrados en el extracto con diclorometano (CH_2Cl_2) en las hojas de la planta silvestre de <i>B. fagaroides</i>	51
Tabla 8. Efecto de los Reguladores de Crecimiento Vegetal y medios de cultivo en la inducción de callos de <i>Bursera fagaroides</i>	62
Tabla 9. Comparación de parámetros cinéticos en cultivos de callos y suspensiones celulares de <i>B. fagaroides</i>	91
Tabla 10. Valores IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ -1) de extractos de CH_2Cl_2 de plantas silvestres y cultivos de callos de <i>B. fagaroides</i>	94

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
-------------	-------------

μ	Velocidad específica de crecimiento
2,4-D	2,4-Diclorofenoxiacético
AcoEt	Acetato de etilo
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
B	Boro
B5	Gamborg
BAP	6-bencilaminopurina
C	Carbono
Ca	Calcio
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCV	Cultivo de células Vegetales
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CH_2Cl_2	Doclorometano
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
Da	Dalton
DAF	Diacetato de fluoresceína
DE	Desviación estándar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Escopoletina
eV	Electrovoltio

GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas
H1299	Carcinoma de pulmón
HeLa	Carcinoma cervical
HepG2	Carcinoma hepatocelular
HFF-1	Línea celular de fibroblastos humanos inmortalizados
IC	Índice de crecimiento
M	Molar
MeOH	Metanol
MS	Medio Murashige y Skoog
nm	Nanómetro
p/v	Peso/Volumen
PC3	Carcinoma de próstata
PVP	Polivinilpirrolidona
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
td	Tiempo de duplicación celular
TMS	Tetrametilsilano
tR	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Bursera fagaroides es una especie vegetal utilizada tradicionalmente en México por sus propiedades medicinales, destacando la presencia de lignanos con actividad citotóxica en su corteza. No obstante, la extracción a partir de la corteza compromete la supervivencia de los ejemplares y los rendimientos son limitados. El objetivo de este trabajo fue establecer y caracterizar cultivos de callos y células en suspensión de *B. fagaroides* como fuentes alternativas de compuestos bioactivos. Se logró la inducción de callos friables a partir de explantes de hoja utilizando el medio B5 suplementado con reguladores de crecimiento vegetal (4 mgL^{-1} de 2,4-D, 1 mgL^{-1} de ANA y 1 mgL^{-1} de Zeatina). El incremento en la biomasa cuantificada en peso seco (gL^{-1}) de los callos permitieron identificar las diferentes fases de crecimiento celular a partir del cual se observó una fase exponencial comprendida entre los días 14 a 42 con una $\mu=0.059 \text{ días}^{-1}$ y un $\text{td}=11.76 \text{ días}$, con un rendimiento máximo de biomasa de 0.94 en día 28. Con respecto a los cultivos en suspensión se obtuvieron con la combinación de 4 mgL^{-1} de 2,4-D y 2 mgL^{-1} de cinetina, con un punto de máximo crecimiento celular de 1.19 en el día 15 con un $\mu=0.153 \text{ días}^{-1}$ y $\text{td}=4.51 \text{ días}$. Los estudios fitoquímicos del extracto de diclorometano de la biomasa del callo permitieron identificar por primera vez en esta especie la producción de escopoletina ($10.7 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco), así como de fitoesteroles como γ -sitosterol y estigmasterol. Paralelamente, en las hojas de la planta silvestre se identificaron yateina, acetilpodofilotoxina y 7',8'-dehidropodofilotoxina. En las pruebas de actividad citotóxica, la línea de carcinoma de próstata PC-3 fue más sensible al extracto CH_2Cl_2 de la planta silvestre (IC_{50} de $12.6 \pm 4.6 \mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que la línea de carcinoma cervical HeLa mostró mayor sensibilidad

frente al extracto CH₂Cl₂ del cultivo de callos (IC₅₀ de 72 ± 5 µgmL⁻¹). Estos resultados demuestran que el cultivo de tejidos *in vitro* representa una plataforma viable y sostenible para la producción de metabolitos secundarios con potencial farmacológico.

ABSTRACT

Bursera fagaroides is a plant species traditionally used in Mexico for its medicinal properties, notably the presence of cytotoxic lignans in its bark. However, extraction from the bark compromises the survival of the plants, and yields are limited. The objective of this study was to establish and characterize biotechnological cultures of callus and suspension cells of *B. fagaroides* as alternative sources of bioactive compounds. Friable callus was successfully induced from leaf explants using B5 medium supplemented with plant growth regulators (4 mgL⁻¹ 2,4-D, 1 mgL⁻¹ ANA, and 1 mgL⁻¹ Zeatin). The increase in biomass quantified as dry weight (gL⁻¹) of the calli allowed for the identification of different phases of cell growth, revealing an exponential phase occurring between days 14 and 42 with a μ of 0.059 day⁻¹ and a td of 11.76 days, with a maximum biomass yield of 0.94 on day 28. Regarding suspension cultures, the combination of 4 mgL⁻¹ of 2,4-D and 2 mgL⁻¹ of kinetin yielded a peak cell growth of 1.19 on day 15, with a μ of 0.153 days⁻¹ and a td of 4.51 days. Phytochemical studies of the dichloromethane extract of callus biomass allowed for the first identification in this species of scopoletin production (10.7 μ g g⁻¹ dry weight), as well as phytosterols such as γ -sitosterol and stigmasterol. Concurrently, yateine, acetylpodophyllotoxin, and 7',8'-dehydropodophyllotoxin were identified in the leaves of the wild plant. In cytotoxic activity assays, the wild plant extract was more sensitive against the PC-3 prostate carcinoma cell line (IC₅₀ of 12.6 $\pm$ 4.6 μ g mL⁻¹), while the callus culture extract showed greater sensitivity against the HeLa cervical carcinoma cell line (IC₅₀ of 72

60 $\pm 5 \mu\text{g mL}^{-1}$). These results demonstrate that *in vitro* tissue culture represents a viable and
61 sustainable platform to produce secondary metabolites with pharmacological potential.

62

63

64

65

66

67

68

69

1. INTRODUCCIÓN

70

México es reconocido como un centro de biodiversidad para el género *Bursera*, cuyas especies han sido fundamentales en la medicina tradicional para el tratamiento de inflamaciones, tumores y verrugas. Dentro de este género, *Bursera fagaroides* destaca por su capacidad de sintetizar lignanos, moléculas de gran interés biotecnológico debido a su potente actividad citotóxica y efectos antitumorales. Sin embargo, la obtención de estos compuestos enfrenta retos significativos: los métodos convencionales dependen de la extracción de la corteza, lo que provoca daños irreversibles a los árboles y una baja disponibilidad de biomasa debido a factores como la baja tasa de germinación y la deforestación de sus hábitats naturales (12 y 13 ref).

Ante esta problemática, el cultivo de células vegetales se presenta como una alternativa sostenible y renovable que permite la producción controlada de metabolitos secundarios sin comprometer las poblaciones silvestres. La biotecnología vegetal aprovecha la totipotencia de las células para generar biomasa capaz de sintetizar compuestos idénticos a los de la planta madre o incluso inducir la producción de nuevas moléculas, como las fitoalexinas, en respuesta a condiciones de estrés específicas *in vitro*. La presente investigación se enfoca en el análisis del perfil fitoquímico y la evaluación de la actividad citotóxica de callos y células en suspensión de *B. fagaroides* obtenidos a partir de hojas. A través de técnicas de cromatografía y espectrometría, se buscó no solo caracterizar los compuestos producidos en estos sistemas biotecnológicos, sino también realizar un estudio comparativo con los perfiles metabólicos de la planta silvestre. Este trabajo aporta conocimientos fundamentales para el desarrollo de fuentes alternativas de fármacos antitumorales, alineándose con las tendencias actuales de aprovechamiento sustentable de los recursos naturales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Especie *Bursera fagaroides*

Bursera fagaroides (Kunth) Engl. pertenece a la familia *Burseraceae*, se conoce comúnmente como “aceitillo”, “copalillo”, “copal”, “cuajote amarillo”, “palo del diablo” o “papelillo”. Es un árbol o arbusto aromático de entre 0.5 a 8 metros de altura, dioico, hojas generalmente imparipinadas, sus ramas poseen abundante resina transparente y su tronco es de color verde. Se distribuye desde el suroeste de los Estados Unidos de América hasta el Sur de México (figura 1). (Noge & Becerra, 2009), (Rzedowski *et al.*, 2004), (Rzedowski *et al.*, 2005). Su corteza es gris-amarillenta, se utiliza en la medicina tradicional para aliviar la inflamación, los tumores en la piel y las verrugas (Marcotullio *et al.*, 2018).

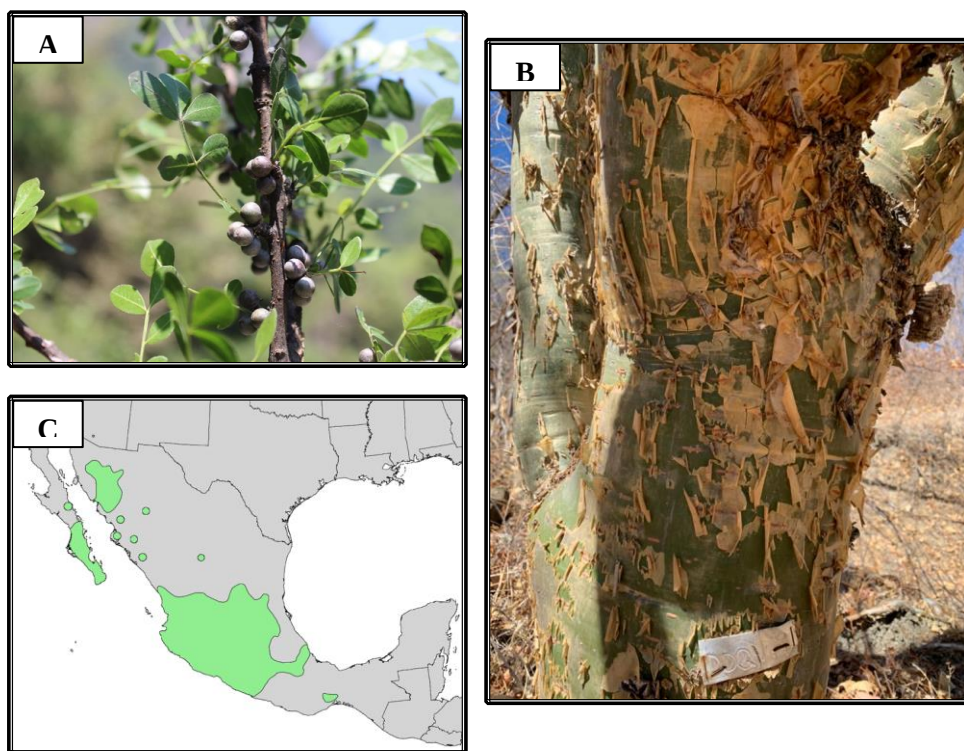
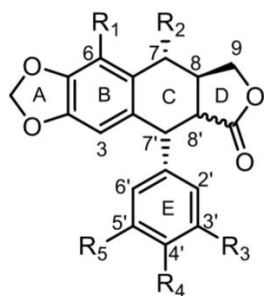


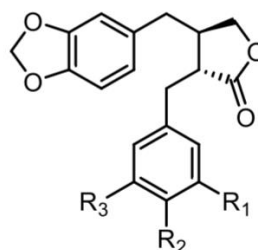
Figura 1. *Bursera fagaroides*. A) hojas y frutos, B) Corteza y C) Mapa de distribución.

2.2 Estudios químicos de la identificación de lignanos de *Bursera fagaroides*

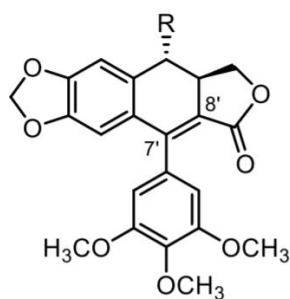
El estudio químico de *B. fagaroides* a través de los años muestra la caracterización de 19 lignanos clasificados en cuatro grupos: ocho son ariltetralinos llamados podofilotoxina (1), éter metílico de β -petatina-A (2), éter metílico de 5'-desmetoxi- β -peltatina-A (3), desoxipodofilotoxina (4), acetilpodofilotoxina (5), Morelensina (6), Burseranina (7) y Acetilpicropodofilotoxina (8); tres son dibencilbutirolactonas: Desmetoxyateina (9), Yateina (10), Hinoquinina (11); tres son arilhidronaftalenos: 7',8'-dehidropodofilotoxina (12), 7'8'-dehidro acetil podofilotoxina (13) y 7'8'-dehidro trans-p-cumaroilpodofilotoxina (14) y cinco son lignanos dibencilbutanos: 9-acetil-9'-pentadecanoildihidroclusina (15), 2,3-desmetoxi secoisolintetralin diacetato (16), Diacetato de dihidroclusina (17), 2,3-desmetoxi secoisolintetralin monoacetato (18) y Monoacetato de dihidroclusina (19), Figura 2. (Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012), (Mojica *et al.*, 2016), (Antúnez-Mojica *et al.*, 2021). Dichos compuestos han sido aislados de la corteza, empleando solventes con diferentes polaridades como cloroformo, diclorometano, etanol, hexano, mezclas agua-metanol, y metanol (Bianchi *et al.*, 1968), (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2011), (Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012), (Acevedo *et al.*, 2014) y (Mojica *et al.*, 2016). Estos compuestos presentan una importante actividad citotóxica con valores de IC_{50} que oscilan entre los $12 \mu g mL^{-1}$ (burseranina, 7) y los $4.43 \times 10^{-6} \mu g mL^{-1}$ (éter metílico de β -petatina-A, 2). Algunos de ellos han sido evaluados por su efecto antitumoral (2 y 3). Además, se ha demostrado que algunos de ellos (1, 2, 5 y 9) promueven el arresto mitótico, retrasan la migración celular y alteran los microtúbulos (Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012), (Mojica *et al.*, 2016), (Antúnez-Mojica *et al.*, 2021), (Bianchi *et al.*, 1969), (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2011), (Acevedo *et al.*, 2015) y (Antúnez-Mojica *et al.*, 2018).



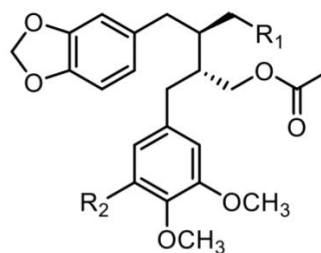
- 1 $R_1 = H$, $R_2 = OH$; $R_3 = R_4 = R_5 = OCH_3$, H-8' β
- 2 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$; $R_3 = R_4 = R_5 = OCH_3$, H-8' β
- 3 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = R_5 = H$; $R_3 = R_4 = OCH_3$, H-8' β
- 4 $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = R_4 = R_5 = OCH_3$, H-8' β
- 5 $R_1 = H$; $R_2 = OAc$; $R_3 = R_4 = R_5 = OCH_3$, H-8' β
- 6 $R_1 = R_2 = R_5 = H$; $R_3 = R_4 = OCH_3$, H-8' β
- 7 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$; $R_3, R_4 = OCH_2O$, $R_5 = H$, H-8' α
- 8 $R_1 = R_2 = OAc$, $R_3 = R_4 = R_5 = OCH_3$, H-8' α



- 9 $R_1 = R_2 = OCH_3$; $R_3 = H$
- 10 $R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$
- 11 $R_1, R_2 = OCH_2O$; $R_3 = H$



- 12 $R = OH$
- 13 $R = OAc$
- 14 $R = trans\text{-}p\text{-cumaroil}$



- 15 $R_1 = OCO(CH_2)_{14}CH_3$; $R_2 = OCH_3$
- 16 $R_1 = OAc$; $R_2 = H$
- 17 $R_1 = OAc$; $R_2 = OCH_3$
- 18 $R_1 = OH$; $R_2 = H$
- 19 $R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$

Figura 2. Estructura química de los diecinueve lignanos aislados de la corteza de *B. fagaroides*.

Tomado de: (Antúnez-Mojica *et al.*, 2021).

Por otro lado, se ha reportado que *B. fagaroides* además de sintetizar lignanos, sintetiza diversos constituyentes químicos como flavonas y cumarinas.

2.3 Cumarinas

Las cumarinas son compuestos orgánicos heterocíclicos originados de la vía de fenilpropanoides. Se clasifican principalmente en seis tipos basados en su estructura química

de los compuestos. El esqueleto principal está formado por una α -benzopirona que se divide de acuerdo con los sustituyentes presentes en el anillo de benceno dentro de los cuales pueden ser: cumarinas simples, furano cumarinas, dehidrofurano cumarinas, pirano cumarinas, fenil cumarinas y biocumarinas (Venugopala *et al.*, 2013) y (He *et al.*, 2022). Algunas propiedades biológicas reportadas de las cumarinas son: antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, ansiolíticas, antitumorales, antioxidantes, hepatoprotectoras, inmunosupresoras, entre otras. (Tabla 1).

Por otro lado, se ha observado que las cumarinas contribuyen esencialmente a la persistencia de las plantas, ya que intervienen en procesos de defensa contra fitopatógenos, respuesta al estrés abiótico, así como la regulación hormonal (Bourgaud *et al.*, 2006). La mayoría de ellas existen en forma de glucoconjugados y parecen acumularse en las vacuolas en las plantas superiores (Taguchi *et al.*, 2000).

Dentro de las cumarinas simples destaca la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi cumarina), derivada del esqueleto de carbonos C6-C3. La ruta de biosíntesis de las cumarinas implica la transformación del ácido cinámico en cumarina. Esta transformación incluye la hidroxilación, isomerización trans/cis y lactonización del ácido cinámico. En las plantas, la cumarina se produce a través de la vía fenilpropanoide, donde el ácido cinámico se convierte en ácido cumárico y luego en cumaroil-CoA, que finalmente se convierte en cumarina.

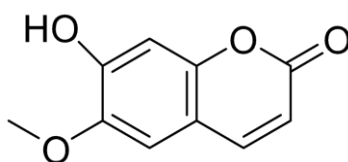
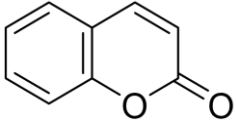
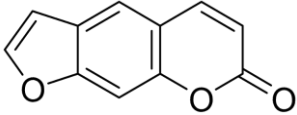
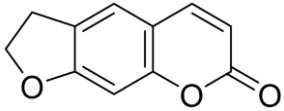
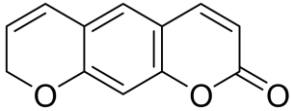
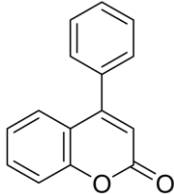
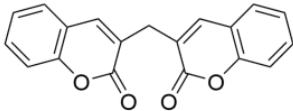


Figura 3. Estructura química de la escopoletina.

Tabla 1. Diferentes tipos de cumarinas con algunas propiedades farmacológicas. (Tomado y modificado de Venugopala *et al.*, 2013).

No.	Tipo de cumarina	Estructura química general	Actividad farmacológica
1	Cumarina Simple		Antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante, neuroprotectiva, antibacteriana, antifúngica, anticonvulsiva,
2	Furano Cumarina		Antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena, anticonvulsiva, inhibidor del citocromo P450, anti-TB (tuberculosis).
3	Dehidrofurano cumarinas		Antibacteriana Anti-TB
4	Pirano cumarinas		Antibacteriana, anti-TB, antiviral.
5	Fenil cumarinas		---
6	Bio cumarinas		Anticoagulante

Se ha descubierto que algunas cumarinas aisladas de varias familias de plantas como Apiceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae por mencionar algunas poseen actividad antibacteriana y antifúngica (Fritig et al., 1970a), (Modafar et al., 1993), (Habibullah et al., 2010), (Ara et al., 2009) y (Matos et al., 2015). También se han encontrado en la corteza de algunas especies del género *Bursera* tales como *Bursera grandifolia* (Aguilar et al., 2012), *Bursera Serrata* (Habibullah et al., 2010), (Ara et al., 2009) y *Bursera morelesis* (Rojas-Sepúlveda et al., 2012). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de su presencia en las hojas de *B. fagaroides*.

La especie *B. fagaroides* es una planta que sintetiza compuestos para contrarrestar diferentes enfermedades de interés farmacológico, sin embargo, su extracción y purificación se ha realizado principalmente de la corteza y se requieren grandes cantidades de biomasa vegetal para su obtención. Además, el alto porcentaje de semillas vacías, las bajas tasas de germinación y la diferencia entre el tamaño de los folíolos entre arbustos y árboles limitan la producción de biomasa en sus poblaciones naturales (Ramos-Ordoñez et al., 2016), (García-Aguilar et al., 2021). Asimismo, dada la magnitud de la deforestación tropical en las últimas décadas, el hecho de que cerca del 70% de los bosques tropicales de frondosas se han perdido drásticamente perdido (Bonfil et al., 2007) y que además es uno de los ecosistemas más amenazados del país, es necesario buscar alternativas para su extracción.

2.4 Cultivo de células vegetales

El cultivo de células vegetales (CCV) está reconocido hoy en día como una alternativa prometedora, renovable, sostenible y respetuosa con el medio ambiente para obtener metabolitos secundarios derivados de plantas a partir de plantas silvestres (Motolinía-

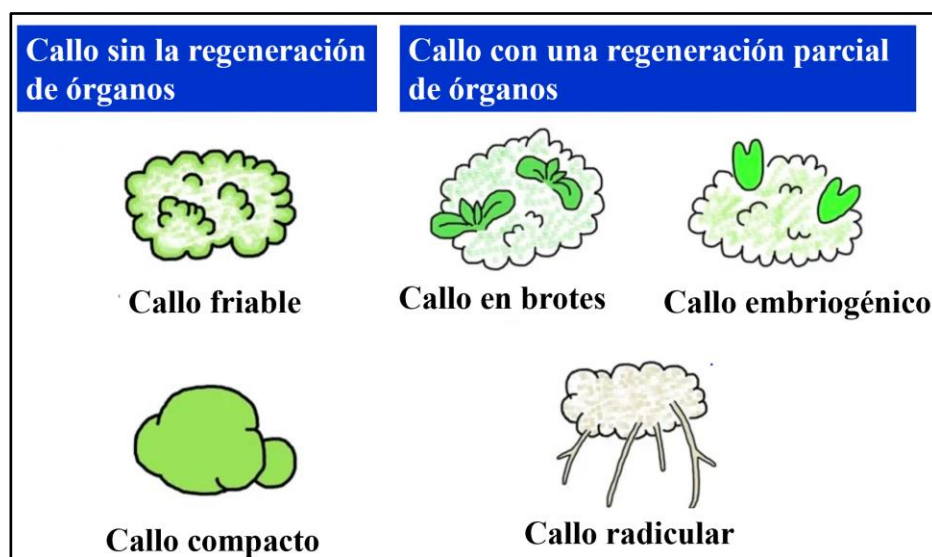
Alcántara *et al.*, 2021). El CCV comprende un grupo de técnicas biotecnológicas que permite el cultivo de explantes de una planta en medios nutritivos adecuados, en condiciones asépticas y bajo condiciones controladas (Sathyanarayana & Varghese, 2007). Se basa en el principio de la totipotencia celular que establece que una célula vegetal es capaz de formar un nuevo individuo completo e idéntico al de la planta progenitora mediante un proceso de regeneración mediante esquejes o explantes que mantienen la información genética de la planta donante (Santos & Torné, 1986), (Braybrook & Harada, 2008), (Motolinía-Alcántara *et al.*, 2021). El cultivo de células vegetales incluye la producción de callos, embriones, raíces, brotes y suspensiones celulares (Narayani & Srivastava, 2017), (Motolinía-Alcántara *et al.*, 2021).

2.4.1 Cultivos de Callos

Las plantas generan masas celulares desorganizadas denominadas callos o tumores en respuesta a situaciones de estrés, como heridas o infecciones por patógenos. El término “callo” tiene su origen en la palabra latina *callum*, que significa duro, en biología vegetal se refiere a las masas celulares desorganizadas que pueden producirse a partir de una única célula diferenciada. Muchas células de callos son totipotentes, pudiendo regenerar todo el cuerpo de la planta (Ikeuchi *et al.*, 2013).

El término callo incluye células con diversos grados de diferenciación. En determinadas condiciones, las células de callo experimentan embriogénesis somática, un proceso en el que se generan embriones a partir de células somáticas adultas (Steward *et al.*, 1958). También se ha reconocido que los callos son muy diversos y pueden clasificarse en subgrupos en función de sus características macroscópicas (Figura 4). Por ejemplo, los callos sin

208 regeneración aparente de órganos suelen denominarse callos friables o compactos. Otros
 209 callos que muestran cierto grado de regeneración de órganos se denominan callos enraizados
 210 o radicales, en brotes o embriones, dependiendo de los órganos que generen.



211

212 **Figura 4.** Diferentes tipos de callo en las células vegetales. Tomado y modificado de Ikeuchi *et al.*,
 213 2013.

214 Una vez descubierto que el callo puede generarse por técnicas de cultivo *in vitro* y que el
 215 equilibrio entre dos hormonas vegetales (auxinas y citocininas) determina el estado de
 216 diferenciación y dediferenciación (Melnik, 2023), el callo se ha utilizado ampliamente tanto
 217 en investigación básica como en aplicaciones industriales. Una vez obtenidos los callos se
 218 han utilizado para producción y escalamiento de laboratorio de metabolitos secundarios de
 219 alto valor agregado a través de un cultivo celular en suspensión.

220 **2.4.2 Cultivo de células en suspensión**

221

222 El cultivo de células en suspensión es un conjunto de células indiferenciadas en forma libre
 223 o agregados, distribuidos en un medio de cultivo líquido homogéneo que se encuentra en

224 constante agitación que se utiliza generalmente para mantener y propagar células vegetales.
225 Permite obtener condiciones adecuadas para que las células produzcan compuestos idénticos
226 a los de las células parentales ofreciendo ventajas como el establecimiento de sistemas
227 estables para producción continua de compuestos con homogeneidad en los rendimientos y
228 la calidad, además de ofrecer la posibilidad de sintetizar nuevas moléculas con potencial en
229 su aplicación comercial (Motolinía-Alcántara *et al.*, 2021).

230 Los pasos para la obtención de un cultivo en suspensión se ilustran en la Figura 5. Comprende
231 cuatro etapas, primero inicia con la selección del material vegetal, seguido de la desinfección
232 de los explantes, posteriormente la inducción y obtención de callo friable mediante el uso de
233 Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) como auxinas y citocininas. La etapa final
234 comprende la transferencia, disgregación, el mantenimiento y propagación masiva del cultivo
235 celular en medio líquido.

236 Para el establecimiento de los cultivos en suspensión se requiere de un inóculo grande
237 (densidad mínima inicial requerida del 10 %) fácil de disgregar (friable) de lo contrario, pocas
238 células se desprenden por lo que el tamaño del inóculo de las células tardará en alcanzar una
239 densidad alta para poder ser subcultivar en cultivos posteriores. El material calloso no
240 desprendido se remueve bajo condiciones de esterilidad (Flanklin & Dixon, 1994).

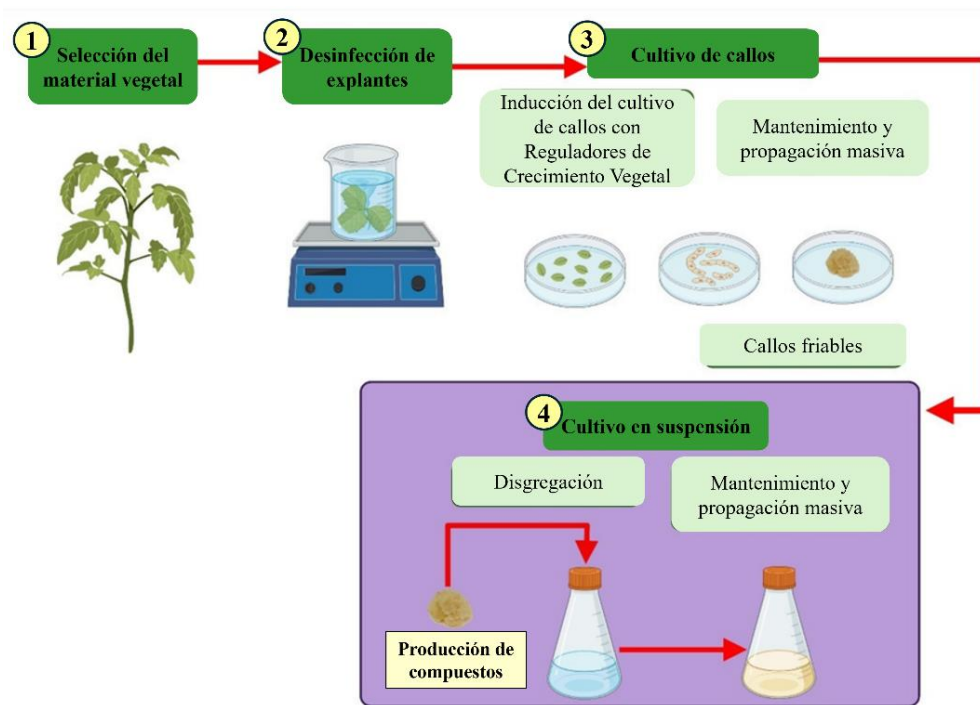


Figura 5. Esquema general para la obtención de un cultivo celular en suspensión. Tomado y modificado de Motolinía-Alcántara *et al.*, 2021.

Los sistemas de mantenimiento de un cultivo de suspensión de células vegetales pueden ser cultivos cerrados, cultivos continuos cerrados y cultivos continuos abiertos (Figura 6).

A) Cultivos cerrados: En este sistema las células producidas se quedan todo el tiempo en el medio, implica el crecimiento de células en un medio líquido dentro de un recipiente cerrado. En él se toman muestras para subcultivarse en medio fresco y de esa manera inicia el ciclo de crecimiento. Este es el sistema más utilizado en los laboratorios de investigación.

B) Cultivos continuos cerrados: En este sistema se suministra a la solución medio fresco de manera continua, y simultáneamente se retira solo el medio usado, las células separadas mecánicamente se acumulan en el sistema.

C) Cultivos continuos abiertos: Al igual que en el sistema anterior, se suministra medio fresco, pero el medio usado sale junto con las células.

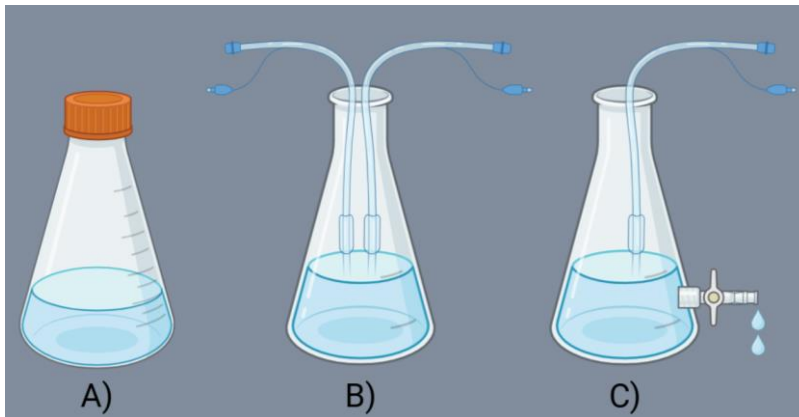


Figura 6. Sistemas de cultivo de suspensiones celulares vegetales. A) Cultivos cerrados, B) Cultivos continuos cerrados y C) Cultivos continuos abiertos.

2.4.3 Cinética de crecimiento celular

El crecimiento de las células vegetales se ha modelado de forma similar al de los microorganismos, lo cual tiene limitaciones e incluso puede ser cuestionado, ya que, a diferencia de los microorganismos, los cultivos vegetales son asincrónicos, es decir, no todas las células pasan por la misma fase del ciclo celular en un mismo tiempo. A pesar de esta situación, existen evidencias en la literatura de que muchos cultivos vegetales en suspensión presentan un perfil de crecimiento como el que se muestra en la Figura 7. Este inicia con una *fase lag o de adaptación* donde el crecimiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende el éxito del nuevo cultivo, las condiciones ambientales como temperatura, pH e iluminación pueden causar un retardo en el crecimiento inicial del cultivo, seguida por una *fase de crecimiento rápido*, también llamada exponencial donde la velocidad de crecimiento adquiere su máximo valor, luego inicia la *fase*

estacionaria, durante esta fase las condiciones del cultivo son limitantes por lo que la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. El crecimiento de tipo exponencial se observa cuando una célula madre se divide en dos células hijas, las cuales son capaces de dividirse posterior y finalmente la *fase de muerte* donde se registra una disminución de la biomasa como resultado de ausencia de nutrientes, lo que conlleva a la muerte o lisis celular (Rodríguez-Monroy *et al.*, 2007).



Figura 7. Fases del crecimiento celular.

2.5 Medios de Cultivo

2.5.1 Medio MS

El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) es un medio de cultivo ampliamente utilizado en cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Fue desarrollado por Murashige y Skoog en 1962 y se ha convertido en un estándar en la investigación y la propagación de plantas. Proporciona los nutrientes esenciales, incluyendo macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, y a

menudo, reguladores de crecimiento vegetal, para apoyar el crecimiento de células y tejidos vegetales *in vitro*. Es especialmente utilizado para la micropropagación, producción de plántulas, germinación de semillas y conservación de germoplasma (Murashige & Skoog, 1962).

2.5.2 Componentes de los medios de cultivo

2.5.2.1 Agua

Es el componente que se encuentra en mayor cantidad en el medio y es una fuente potencial de impurezas que puede afectar el crecimiento de los cultivos. El agua utilizada en la preparación de medios de cultivo debe ser destilada y desionizada, o bidestilada.

2.5.2.2 Macronutrientes

Los macronutrientes son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de gramos/litro (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Son incluidos en los medios de cultivo en forma de sales inorgánicas, pudiendo el nitrógeno y el azufre ser incorporados como suplemento orgánico (por ejemplo, caseína hidrolizada, urea, aminoácidos). La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar la máxima de crecimiento varía considerablemente entre especies.

2.5.2.3 Micronutrientes

Los micronutrientes son elementos esenciales que la planta requiere en cantidades del orden de mg/litro (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B). Los micronutrientes del medio de Murashige & Skoog incluyen todos aquellos elementos minerales aceptados como esenciales para plantas

superiores, con el agregado de Co y I. El agregado de Na^+ o Cl^- se verifica para algunos medios en particular, como acompañantes de otros iones.

2.5.2.4 Carbohidratos

Las células, tejidos y plántulas cultivadas *in vitro* no poseen las condiciones de irradiancia ni la concentración de CO_2 adecuada para realizar fotosíntesis que sustente su crecimiento. Por ello los carbohidratos proporcionan la energía metabólica y los esqueletos carbonados necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, polisacáridos estructurales como celulosa, etc. La sacarosa es el carbohidrato más utilizado en la preparación de medios de cultivo. Las concentraciones varían dentro de ciertos rangos de acuerdo con el tipo de respuesta esperada, la más utilizada es de 3 % p/v. Otros azúcares como fructosa, glucosa, celobiosa, maltosa, rafinosa y galactosa son recomendados para algunas especies en particular.

2.5.2.5 Vitaminas

Las vitaminas, en la mayoría de los casos, cumplen funciones de cofactores de reacciones enzimáticas (tiaminafosfato, piridoxina), en otros se comportan como sustrato de reacciones metabólicas (ácido nicotínico). La combinación de vitaminas en el medio de cultivo se definió a partir de los primeros estudios de cultivo de raíces. La composición vitamínica, en el caso de medio MS, está constituida por tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina (vitamina B6), a la que normalmente se le adiciona el aminoácido glicina. Las concentraciones más usuales oscilan entre 0.1 a 0.5 mg por litro de solución de medio. Otros compuestos utilizados son: ácido ascórbico, ácido fólico, riboflavina y biotina. En todos los

casos las variaciones en la formulación están dada por la especie utilizada y la respuesta buscada.

2.5.2.6 Mioinositol

El mioinositol es una hexosa cíclica hidroxilada, que se incorpora al medio MS y a la mayoría de los medios de cultivo usados en la actualidad. Su presencia es necesaria en todas las células para lograr la ciclación de la glucosa. Debido a que la biosíntesis no siempre se verifica *in vitro*, se hace imprescindible su incorporación a los medios. Posee efecto estimulador para el crecimiento de callos y en la organogénesis directa de algunas especies. Se usa en concentraciones de 100 mgL⁻¹. Actualmente se sabe que el mioinositol se incorpora a las moléculas de fosfolípidos de la membrana plasmática. Otra función estaría asociada a la conjugación de auxinas, formando un complejo auxina-inositol, que es inactivo como regulador de crecimiento.

2.5.2.7 Hormonas vegetales y reguladores de crecimiento

Las hormonas son compuestos orgánicos, no nutrientes, sintetizados por la planta, que actúan en muy baja concentración (entre 10⁻⁶ M y 10⁻⁸ M) y que desencadenan diversas respuestas fisiológicas. Se caracterizan por expresar su acción en lugares distantes de su sitio de síntesis. Existen sustancias sintéticas, con similares características, a las que se denomina reguladores de crecimiento. En ambos casos se trata de moléculas de relativamente bajo peso molecular (28 Da a 346 Da). Las hormonas vegetales se agrupan en 5 clases, fundamentalmente en base a su acción fisiológica: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido ascórbico.

En la planta pueden encontrarse en forma libre o ligadas, considerando a esta última como una forma de “almacenaje”. Son considerados mensajeros químicos pues establecen una comunicación intercelular a través de toda la planta. En la célula, las hormonas interactúan con una proteína específica denominada receptor. El complejo hormona- receptor es la forma activa de la hormona. Una segunda fase incluye la activación o represión de genes específicos. De la misma forma que en la naturaleza, en donde cada hormona interactúa con otras hormonas para producir una respuesta en la planta, los RCV son utilizados, en cultivo *in vitro*, en concentraciones del orden de partes por millón (ppm) y la elección del tipo de RCV y la cantidad relativa de cada uno de ellos en el medio de cultivo está determinada por la respuesta esperada (Laimer & Rücker, 2003), (Sathyanarayana & Varghese, 2007).

Tabla 2. Ejemplos de auxinas y citoquininas utilizadas en el cultivo *in vitro* de plantas.

Clase de RCV	Abreviatura o nombre común	Nombre químico
Auxinas	AIA	Ácido 3-indolacético
	ANA	Ácido Naftalenacético
	AIB	Ácido Indolbutírico
	ApCFA	Ácido (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
	ANOA	Ácido naftoxiacético
Citoquininas	Cinetina (CIN)	6-furfurilaminopurina
	BAP (BAP)	6-benzilaminopurina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranyl-9H-purina
	Tidiazurón (TDZ)	1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il) urea

3. JUSTIFICACIÓN

369

370 *Bursera fagaroides* es una planta con propiedades medicinales, antitumorales y citotóxicas

371 debido a los diferentes componentes que sintetiza. El método tradicional de extracción o

372 síntesis química se ha realizado a partir de la corteza, pero esta práctica se considera

373 insostenible debido a los altos costes de producción, los bajos rendimientos y los graves

374 daños a la planta. Por ello, es necesario buscar alternativas atractivas para su producción.

375 Se ha reportado que la biotecnología por cultivo de células vegetales permite obtener y

376 potenciar compuestos con alto valor agregado, representando una alternativa atractiva

377 para su producción, además es importante realizar estudios relacionados con la

378 caracterización de los compuestos responsables de la actividad citotóxica de *B.*

379 *fagaroides* en cultivos de callos y células en suspensión, y aprovechar las ventajas que

380 representa el cultivo de tejidos vegetales.

381 El objetivo de este trabajo fue caracterizar y analizar los cultivos de callos friables y

382 suspensiones celulares de *Bursera fagaroides* y comparar su producción con la de las

383 hojas de la planta silvestre.

384

385

386

387

388

389

390

4. HIPÓTESIS

391

El cultivo de callos y células en suspensión de *B. fagaroides* producirá metabolitos con actividad biológica, y será factible identificarlos y cuantificarlos, así como comparar los perfiles químicos de los cultivos *in vitro* contra el obtenido de la planta silvestre.

392

393

394

395

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

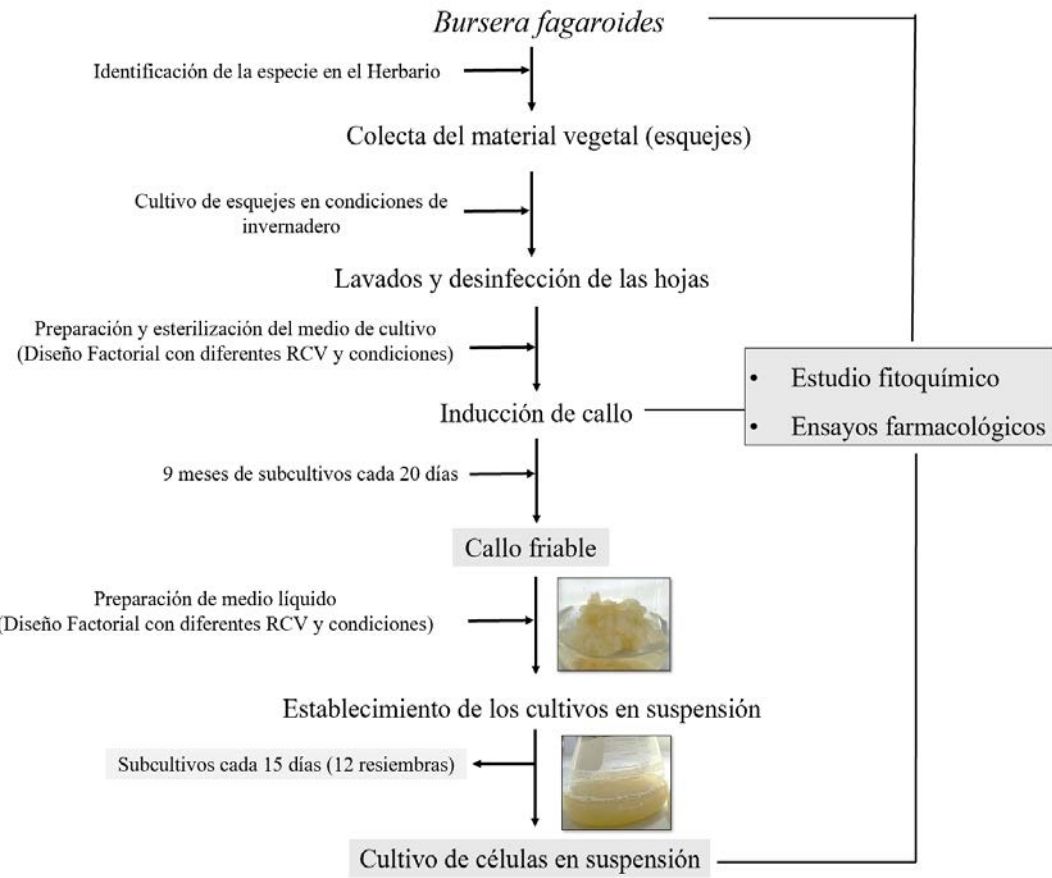
Establecer cultivos de callos y células en suspensión de *B. fagaroides*, productoras de metabolitos con actividad biológica.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en hojas de la planta silvestre de *B. fagaroides*.
2. Establecer y caracterizar cultivos *in vitro* de callos a partir de explantes de hojas de *B. fagaroides*.
3. Establecer y caracterizar cultivos de células en suspensión a partir de callos friables de *B. fagaroides*.
4. Comparar los perfiles químicos de la planta silvestre contra los de los cultivos de callos y células en suspensión.
5. Evaluar la actividad citotóxica de extractos y compuestos puros de hojas de la planta silvestre, cultivos de callos y células en suspensión de *B. fagaroides*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama general



419

420 **Figura 8.** Diagrama general de trabajo

421 **6.2 Identificación del material vegetal**

422

423 Se colectaron hojas de un árbol silvestre y un ejemplar de *Bursera fagaroides* (Kunth) Engl.
424 en el mes de julio del 2021 en la localidad “el Mango”, en el municipio de Puente de Ixtla
425 (14 Q 046300, UTM 2043732, DDQH9), altura: 1382 m, por el Dr. Fidel Ocampo Bautista,
426 fue identificada por el Biólogo Gabriel Flores Franco y depositada en el herbario HUMU de
427 la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), con un número de folio 39796.

6.3 Estudio Fitoquímico de las hojas de la planta silvestre de *B. fagaroides*

6.3.1 Material y equipo

Los compuestos se separaron y purificaron mediante técnicas convencionales de Cromatografía en Columna Abierta (CCA). Las fracciones, así como la pureza de los compuestos se comprobaron mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 F₂₅₄ ALUGRAM® visualizadas mediante luz ultravioleta y aplicando como revelador sulfato cérico amoniacal ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron en un Bruker AVANCE III HD 500 MHz a 500 y 125 MHz, respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) con tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los extractos diclorometánicos de las hojas de la planta silvestre se analizaron mediante GC-MS Agilent GC 6890, MSD 5973N (Agilent Technologies, EE. UU.), para determinar la composición química de los compuestos principales. El análisis se realizó utilizando la columna HP-5MS (30 mm × 0,25 mm × 0,25 μm). El gas portador fue helio con un flujo de gas de 1 mLmin⁻¹ y una velocidad lineal de 37 cm/s. La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C (sin división). La temperatura inicial del horno fue de 40 °C y se aumentó a 250 °C durante 5 min y a razón de 10 °C/min, y la temperatura final se mantuvo a 285 °C durante 20 min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo de ionización por electrones a 70 eV. modo de ionización de electrones a 70 eV, y el voltaje del multiplicador de electrones fue de 1859 V. Los compuestos se identificaron comparando los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de los de referencia de la base de datos NIST versión 1.7a.

6.3.2 Obtención de los extractos orgánicos

Se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por (Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012) y (Mojica *et al.*, 2016). Para ello se colectaron hojas con ramas en el municipio de Puente de Ixtla, (señalado en la sección 6.1). Posteriormente, se pusieron a secar a temperatura ambiente bajo la sombra por 20 días obteniendo 1.3 Kg de material vegetal seco. Después se molió hasta obtener un tamaño de partícula de entre 2 a 5 mm y se realizó una maceración por triplicado con hexano, diclorometano (CH_2Cl_2) y metanol. Los extractos obtenidos se concentraron por destilación a presión reducida empleando un rotaevaporador (Buchi). Se obtuvo 15.5 g del extracto de CH_2Cl_2 con un 1.25 % de rendimiento, mismo que se empleó para realizar el fraccionamiento y separación como se describe a continuación.

6.3.3 Separación e identificación de los compuestos de tipo lignano a partir del extracto con CH_2Cl_2

El aislamiento y purificación de los posibles compuestos de tipo lignano del extracto con CH_2Cl_2 (15.5 g) se realizó mediante diferentes fraccionamientos sucesivos por CCA (malla 70-230) empleando varios disolventes orgánicos (Tabla 3).

Tabla 3. Eluatos obtenidos a partir del fraccionamiento por columnas.

No. columna	Disolvente	Gradiente (%)	Fracciones	Reuniones	Clave
1 (15.5 g)	hexano	100	1-5	1	NPM14-01
	hexano-acetona	90:10	6-10	2	NPM14-02
		80:20	11-15	3 y 4	
		70:30	16-20	5 y 6	
		60:40	21-25	7	
		50:50	26-30	7	
		20:80	31-35	8 y 9	
	acetona	100	36-40	9	NPM14-03
	MeOH	100	41-48	10	
2 (7.78 g)	hexano-AcoEt	90:10	1-5	1, 2 y 3	NPM-26-01
		80:20	6-12	4, 5 y 6	
		70:30	13-19	7, 8 y 9	
		60:40	20-26	10 y 11	NPM26-02
		50:50	27-34	12	NPM14-03
		40:60	35-41	12	
		30:70	42-50	12	NPM14-04
	AcoEt	100	51-54	12	
	MeOH	100	55-56	13 y 14	NPM14-05
3 (1.8 g)	CH ₂ Cl ₂	100	1-10	1	NPM-30-01
	CH ₂ Cl ₂ -acetona	99:1	11-65	2 y 3	NPM-30-02
		98:2	66-87	3 y 4	
		95:5	88-99	4	
		90:10	100-109	4 y 5	NPM-30-03
		85:15	110-119	5 y 6	
		80:20	120-125	6	
	Acetona	100	126-131	6 y 7	NPM-30-04
	MeOH	100	132-133	8	

4 (280 mg)	hexano-AcoEt	95:5	1-10	1, 2 y 3	NPM-38-01
		93:7	11-20	4 y 5	
		91:9	21-30	5 y 6	
		89:11	31-40	7	
		87:13	41-50	7	
		85:15	51-60	7, 8, 9 y 10	NPM-38-02
		83:17	61-94	11 y 12	
		81:19	95-103	12 y 13	NPM-38-03
		79:21	104-114	13 y 14	
		74:26	115-124	14	
		69:31	125-135	15, 16 y 17	
	AcoEt	100	136-144	18	NPM-38-04
	MeOH	100	145-148	18	NPM-38-05
5 (169 mg)	hexano-AcoEt	95:5	1-9	1	NPM-40-01
		93:7	10-19	2	
		91:9	20-28	3	
		89:11	29-37	3	
		87:13	38-49	3 y 4	
		85:15	50-82	4, 5 y 6	NPM-40-02 NPM-40-03 NPM-40-04
		83:17	82-205	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 , 13, 14, 15, 16	
		78:22	206-215	17, 18 y 19	
		73:17	216-224	19	NPM-40-05
		68:32	225-234	19 y 20	
	hexano-AcoEt	50:50	235-243	21 y 22	
	AcoEt	100	244-253	22 y 23	NPM-40-06
	MeOH	100	254-255	24	NPM-40-07

Así mismo, se realizaron pruebas cualitativas de identificación mediante CCF empleando dos estándares de referencia (acetil podofilotoxina y éter metílico de 5-desmetoxi- β -peltatina A). Para ello, el extracto inicialmente se fraccionó eluyendo con mezclas de polaridad ascendente de hexano acetona, en el cual se obtuvieron 40 fracciones. De dicho fraccionamiento, las fracciones F11 a F15 eluidas en un sistema 80:20 mostraron tener el mismo contenido metabólico y similitud con los estándares de referencia por lo que se reunieron, y la mezcla (NPM14-02, 7.78 g) se separó en una segunda columna eluída con un gradiente de hexano acetato de etilo, misma que permitió obtener 50 fracciones de las cuales, las fracciones F20 a F26 (NPM-26-02, 1.8 g) eluidas con un sistema 60:40 fueron sometidas nuevamente a separación en columna, utilizando diclorometano-acetona en gradiente obteniendo un total de 125 fracciones, de las cuales la número las fracciones F11 a F87 (NPM-30-02, 280 mg) y empleando un sistema de elución 99:1, se empleó para volver a fraccionar con un sistema hexano acetato de etilo. Las fracciones F51 a F94 (NPM-38-02, 169 mg) se emplearon para montar la quinta y última columna fraccionada en 144 fracciones empleando un sistema de elución hexano-acetato de etilo. Los datos del fraccionamiento se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Fraccionamiento de la columna 5.

Clave	No. de reuniones	Eluyente	Gradiente (%)	Peso
NPM40-01	R1-R6	Hexano-AcoEt	95:5-83:17	67 mg
NPM40-02	R7-R10		83:17	41.6 mg
NPM40-03	R11		83:17	14.7 mg
NPM40-04	R12		83:17	7.9 mg
NPM40-04	R13-R21		78:22-50:50	55 mg

R= Reunión, acetato de etilo (AcoEt).

6.3.3.1 Purificación de la reunión NPM40-02

La reunión NPM40-02, correspondiente de las reuniones R7 a R10 obtenida de la columna cinco (Tabla 4) se purificó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) de acuerdo con lo reportado por Rojas-Sepúlveda en 2012 para la separación final de los compuestos empleando una columna fase reversa X-Terra RP-18 semipreparativa (7.8mm×50mm; 5µm tamaño de partícula); la fase móvil fue 25:75 acetonitrilo-agua, con un flujo de 1.0 mL min⁻¹ con un módulo de separación y un detector arreglo de diodos con detección a 215, 250, 300 y 350 nm y con un flujo de 1 ml/min, llevando un perfil isocrático durante 30 min. Cada inyección fue de 10 µL. Dicha separación permitió obtener un lignano identificado como Yateina (1) (2.9 mg, t_R=13.57 min), Figura 9.

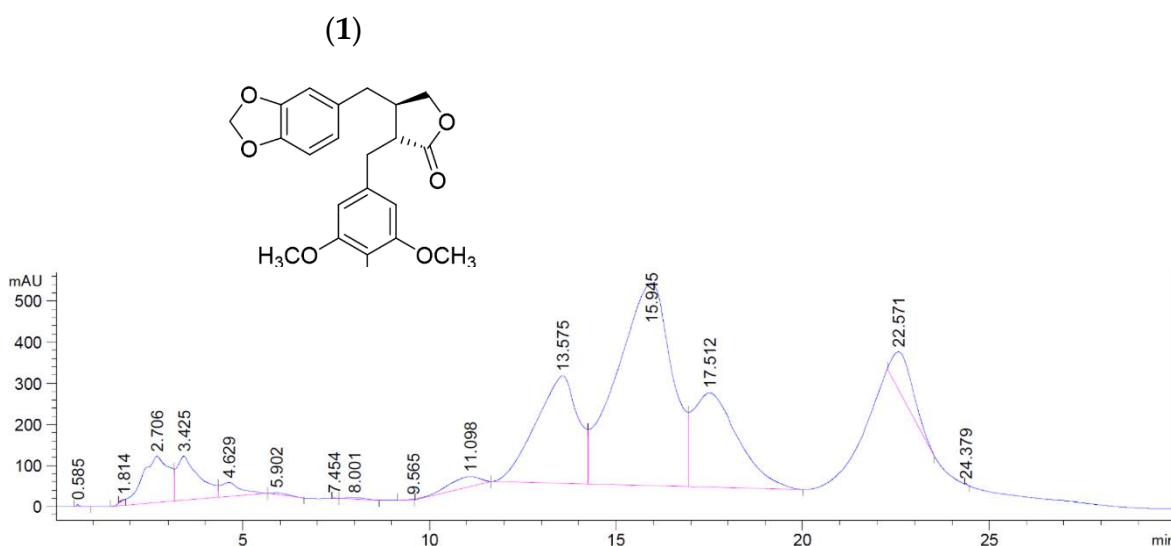
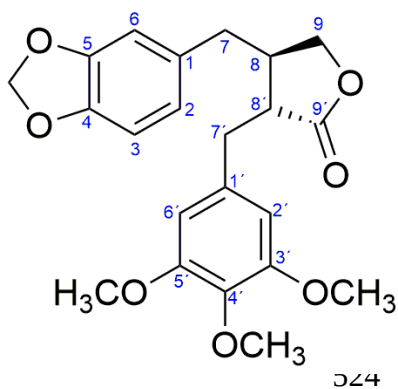


Figura 9. Cromatograma de HPLC de la fracción NPM-40-2 que contiene al compuesto yateina (1) TR = 13.57 minutos. 240 nm.

6.3.3.2 Purificación y datos espectroscópicos de Yateina (1)



Se obtuvo un sólido blanco ^1H RMN (600 MHz- CDCl_3) δ :

6.64 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H5), 6.45 (1H, dd, $J=7.8, 1.6$ Hz, H6), 6.43 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H2), 6.32 (2H, s, H2' y H-6'), 5.8 (2H, O-CH₂-O), 4.17 (1H, dd, $J=9.4, 7.5$ Hz, H9 β), δ 3.88 (1H, dd, $J=9.1, 5.0$ Hz, H9 α), 3.77 (6H, s, OMe-3', Ome-5'), 3.74 (3H, s, OMe-4'), 3.57 (1H, dd, $J = 14.1, 7$

Hz, H-7'), 3.83 (1H, dd, $J = 14.1, 5$ Hz, H-7'), 2.59 (1H, m, H-8'), 2.54 (2H, m, H7), 2.42 (1H, m, H-8). ^{13}C RMN (600 MHz- CDCl_3) δ : 179.7 (C-9'), 153.1 (C-3'), 147.9 (C-3), 146.4 (C-4), 136.5 (C-4'), 133.6 (C-1'), 131.7 (C-1), 121.5 (C-6), 108.8 (C-5), 108.7 (C-2), 106.2 (C-2', C-6'), 101.0 (O-CH₂-O), 71.62 (C-9), 60.6 (OCH₃-C4'), 55.8 (OCH₃-C3', OCH₃-C-5') 46.1 (C-8'), 31.0 (C-8), 38.1 (C-7), 35.0 (C-7'). Las asignaciones se corroboraron por las correlaciones H-C 1J y 3J de los espectros HSQC y HMBC. Los datos espectroscópicos fueron idénticos a los descritos en la literatura para la yateina (Ikeda *et al.*, 1998).

6.3.3.3 Purificación de la reunión NPM40-04

La reunión NPM40-04, correspondiente de la reunión R12 obtenida de la columna cinco (Tabla 5), se purificó por CLAR de acuerdo con lo reportado por Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012 para la separación final de los compuestos empleando la misma metodología que la empleada en la sección anterior para la identificación de Yateina. Dicha separación permitió obtener dos lignanos: 7'8'-dehidropodofilotoxina (**2**) (1.6 mg, $t_R=11.76$ min) y acetilpodofilotoxina (**3**) (1.5 mg, $t_R=16.24$ min) (Figura 10). Estos compuestos fueron

caracterizados por comparación directa (CCF, RMN1H) con muestras auténticas disponibles en el laboratorio Los espectros de RMN1H de **2** y **3** se muestran en el Anexo 1 (espectros 5 y 6). En la Figura 11 se resume el fraccionamiento cromatográfico efectuado.

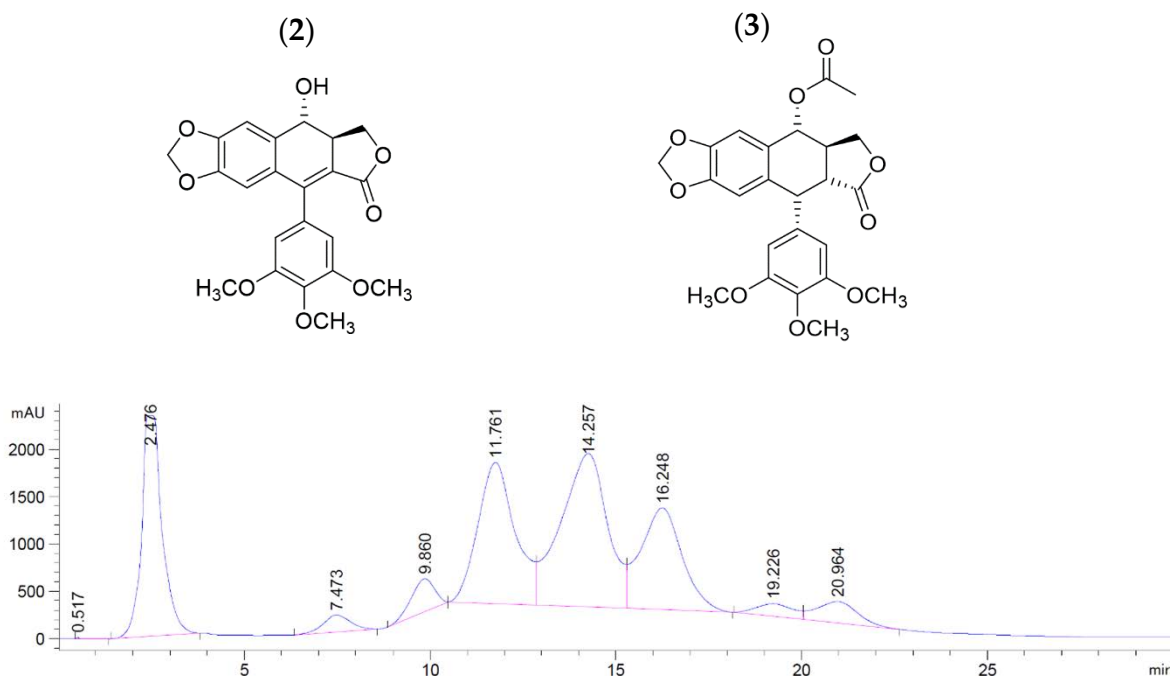


Figura 10. Cromatograma de CLAR de las fracciones NPM-40-3 y NPM-40-4 que contienen los compuestos 7'-dehidropodofilotoxina (**2**) TR = 11.76 minutos y acetil podofilotoxina (**3**) TR = 16.24 minutos. 250 nm.

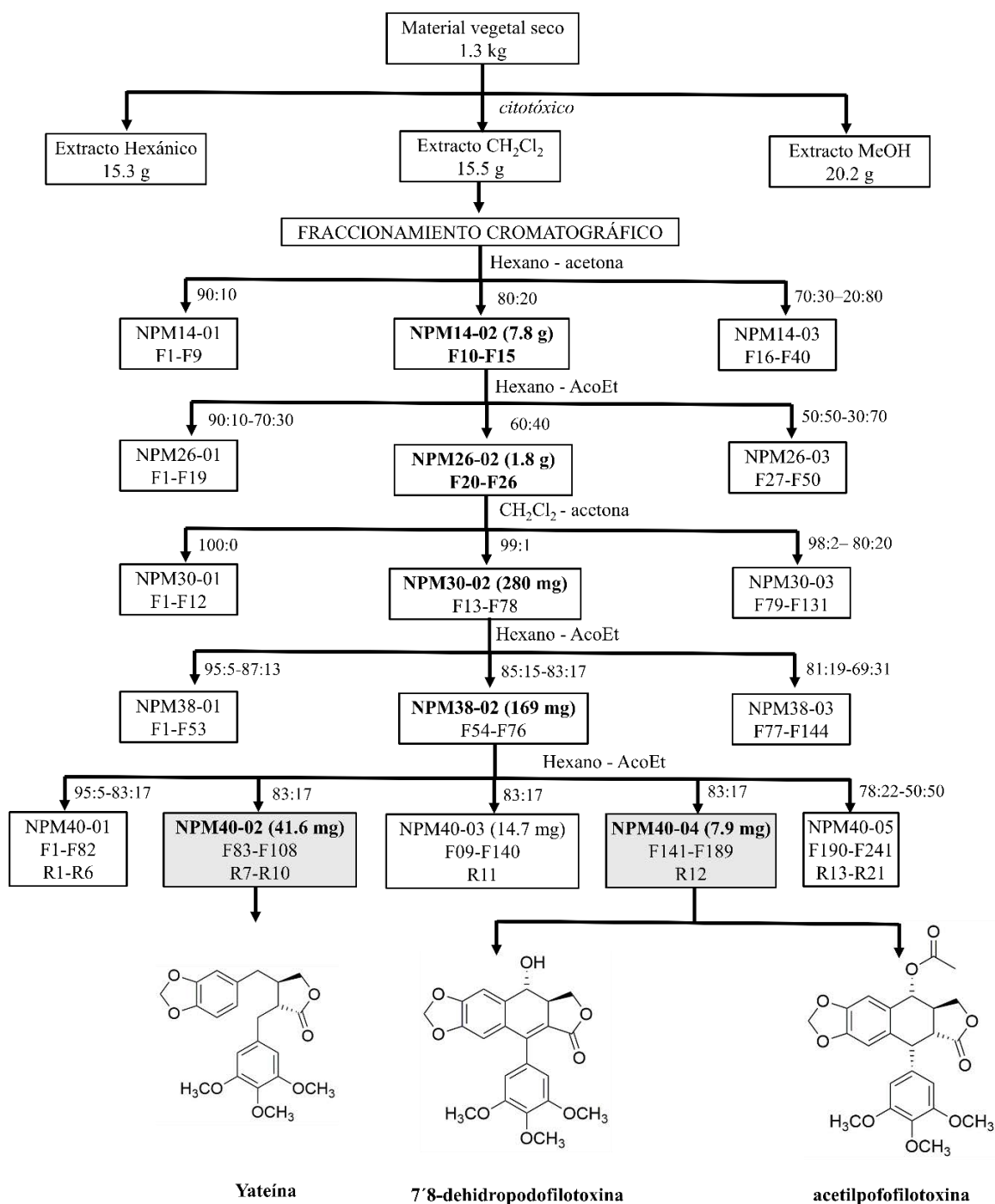


Figura 11. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna Abierta para la obtención de compuestos del tipo Lignano obtenidos a partir del extracto de CH₂Cl₂ de las hojas de *Bursera fagaroides*.

6.4 Obtención de callos *B. fagaroides*

Para la obtención de células desdiferenciadas (callos), primero se realizó un cultivo de estacas como se describe a continuación.

6.4.1 Obtención del material vegetal

Estacas de aproximadamente 20 cm de longitud se cortaron aleatoriamente de ramas terminales de un árbol adulto y se sumergieron en agua por 12 horas. Posteriormente a cada punta se adicionó un enraizador (Raizone Plus®) y se colocaron 10 de ellas por maceta. Las macetas fueron rellenas con dos sustratos diferentes: fibra de coco y arena de río, cada experimento se realizó por triplicado (en total 60 estacas), con una $n=10$. El experimento se realizó por triplicado. Las macetas se colocaron en condiciones de invernadero tipo capilla a 41 ± 2 °C, con una humedad relativa del 35 ± 2 °C y regándose cada tercer día por nebulización por 139 días. El material vegetal obtenido del mejor tratamiento se utilizó para la inducción del cultivo *in vitro* de callos.

6.4.2 Inducción a callo friable

La inducción a callo se realizó utilizando un protocolo de desinfección como se describe en la Tabla 5. Para ello, primeramente, se tomaron hojas jóvenes de entre 2 y 3 cm de longitud desarrolladas a partir del cultivo de estacas, se lavaron con agua miliQ estéril y con jabón neutro (Hycel) por 4 minutos, luego, se adicionó un antifúngico (Ting) por 3 min, después se realizaron lavados sucesivos con agua estéril y seguido con hipoclorito de sodio al 40 % y 10 % durante 3 min cada uno. Posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se

sumergieron con un antibiótico de amplio espectro (Curamycín Agrícola 500) por 4 minutos, se realizaron enjuagues con agua miliQ estéril. Finalmente, se secaron con papel filtro estéril.

Tabla 5. Protocolo de desinfección de los explantes de hoja de *B. fagaroides* desarrollados a partir del cultivo de estacas.

Desinfección de tejidos	Concentración	Tiempo (min)
3 lavado con agua MiliQ estéril	-	1 c/u
1 jabón neutro Hycel	10%	4
1 lavado con Ting	-	3
2 enjuagues con agua estéril	-	1 c/u
1 lavado con hipoclorito de sodio	40%	3
1 lavado con hipoclorito de sodio	10%	3
1 lavado con bactericida y fungicida Curamycin	1 mg/L	3
4 enjuagues con agua estéril	-	1 c/u

Una vez realizada la desinfección a los explantes, se les hicieron cortes empleando un bisturí, se colocaron en cajas Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 25 mL de medio MS, empleando como fuente de carbono 30 gL⁻¹ de sacarosa y suplementado con 6 gL⁻¹ de Polivinilpirrolidona (PVP), 10 mgL⁻¹ de gentamicina y 1.5 gL⁻¹ de phytagel. Se ajustó el pH a 5.7 más fitorreguladores. El medio de cultivo fue previamente esterilizado en autoclave a 121 °C, 15 psi, por 15 minutos. Se sembraron cinco explantes por caja Petri con tres repeticiones y se colocaron en diferentes condiciones: oscuridad constante, luz constante y fotoperiodo (16/8 luz-oscuridad) a 25±2 °C por 30 días. Para determinar qué combinación de RCV indujo una mejor formación de callos, se utilizaron veinte combinaciones con medio MS y B5 (Gamborg, 1968) empleando los RCV 2,4-D y Cinetina (Tabla 6). Los callos obtenidos de la combinación 2,4-D: Cinetina (2:2 mgL⁻¹) en fotoperiodo, mostraron mejor apariencia (tratamiento No. 3), por lo que se transfirieron a medio B5 conteniendo 4 mgL⁻¹

de 2,4-D, 1 mg/L⁻¹ de Ácido Naftalenacético (ANA) y 1 mg/L⁻¹ de Zeatina, empleando sacarosa como fuente de carbono (30 g/L⁻¹), suplementado con PVP (6 g/L⁻¹), phytigel (1.5 g/L⁻¹) y ajustando el pH a 5.7. Dicha combinación de RCV con medio B5 favoreció la obtención de callos friables. Los cultivos se resembraron cada 28 días por un periodo de seis meses, se incubaron a 25±2 °C en fotoperiodo con luz fluorescente blanca (50 μmol m⁻²s⁻¹).

Tabla 6. Tratamientos seleccionados para la inducción a callo friable.

NO. TRATAMIENTO	MEDIO	RCV (mgL ⁻¹)	
		2,4-D	CINETINA
1	MS	2	0
2	MS	2	1
3	MS	2	2
4	MS	3	1
5	MS	3	2
6	MS	3	3
7	MS	4	1
8	MS	4	2
9	MS	4	3
10	MS	4	4
11	B5	2	0
12	B5	2	1
13	B5	2	2
14	B5	3	1
15	B5	3	2
16	B5	3	3
17	B5	4	1
18	B5	4	2
19	B5	4	3
20	B5	4	4

RVC = Reguladores de Crecimiento Vegetal; **MS** = Medio Murashige & Skoog; **B5** = Gambord; **2,4-D** = ácido 2,4 diclorofenoxiacético.

6.4.3 Cinética de crecimiento del cultivo de callos

La cinética de crecimiento se realizó mediante un lote por triplicado empleando 60 frascos tipo Gerber que contenían medio B5 adicionado con 4 mgL⁻¹ de 2,4-D, 1 mgL⁻¹ de ANA y 1 mgL⁻¹ de Zeatina y colocando un inóculo de 1±05 g de biomasa fresca e incubando durante un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad a 25 ± 2 °C. Se determinaron las biomásas frescas y secas tomando muestras cada siete días después de la inoculación hasta los 63 días. Durante el ensayo se registraron los pesos de las biomásas frescas colocándola en un papel filtro previamente pesado, posteriormente, y para determinar la biomasa seca, el material vegetal se liofilizó a -50 °C y 0.1-0.3 mBar hasta llegar a un peso constante. La curva de crecimiento de los callos se realizó con el tiempo de cultivo contra los pesos de las biomásas frescas y secas para así conocer las diferentes fases del crecimiento celular (adaptación, exponencial, estacionaria y muerte). Finalmente, se calcularon los parámetros cinéticos: la velocidad específica de crecimiento μ (tiempo⁻¹) que indica la rapidez con la que ocurre el crecimiento, esta se obtuvo utilizando un método gráfico, donde los valores de la biomasa en la fase exponencial de crecimiento se transformaron a Ln (logaritmo natural) y se grafican contra el tiempo, la gráfica se ajustó a una línea recta y la pendiente de esta correspondió a μ y a partir de este se calculó el tiempo de duplicación celular (td) que es el tiempo que tarda en duplicar la cantidad de biomasa correspondiente al inóculo, obteniéndose mediante la siguiente fórmula $td = \ln(2)/\mu$ (Kieran *et al.*, 1997) y (Rodríguez-Monroy *et al.*, 2000) y el índice de crecimiento (IC) dado por la biomasa seca final menos la biomasa seca inicial dividido por la biomasa seca inicial.

6.4.4 Morfología y viabilidad celular del cultivo de callos

La viabilidad celular de los cultivos se midió empleando el método del diacetato de fluoresceína (DAF) (Nadel, 1989). Para preparar la solución se pesaron 5 mg de DAF, se disolvió en 1 mL de acetona y se almacenó a 4°C. Al momento de la medición, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se tomó con una espátula una alícuota del cultivo de callos y se resuspendió en medio líquido. Por otro lado, en otro tubo eppendorf se adicionaron 500 µL de la mezcla antes mencionada y se combinaron con 500 µL de la suspensión celular, se dejó reposar por 1 min, se tomaron 50 µL de esta suspensión y se colocó en un portaobjetos para ser observada la morfología haciendo observaciones al microscopio y utilizando objetivos de 40 y 10X. Seguido se encendió la lámpara de epifluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF) para observar la viabilidad celular.

El porcentaje de viabilidad de cada muestra se determinó dividiendo el número de células teñidas de verde dividido por el número total de células contadas. Los análisis de morfología celular y viabilidad realizadas tanto en los cultivos de callos como en suspensión se realizaron empleando un microscopio de epifluorescencia (Jones & Senft, 1985).

6.5 Establecimiento de los cultivos en suspensión en matraz

Una vez obtenido y caracterizado el cultivo de callos friables de *B. fagaroides* de 28 días de edad se establecieron cultivos de células en suspensión añadiendo 2 g de biomasa fresca de callos, se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad conteniendo 75 mL de medio líquido y se emplearon los siguientes tratamientos: **T3** (MS 2,4-D: CIN 2:2 mgL⁻¹), **T8** (MS 2,4-D: CIN 4:2 mgL⁻¹), **T10** (MS 2,4-D: CIN 4:4 mgL⁻¹), **T13** (B5 2,4-D: CIN 2:2 mgL⁻¹) debido a que en la inducción de callo fueron los favorecieron su desarrollo, así como el tratamiento con medio B5 2,4-D:ANA:Zeatina 4:1:1 mgL⁻¹. El cultivo celular con

la combinación de RCV que favoreció al establecimiento de un cultivo celular estable se resembró cada 15 días durante seis meses.

6.5.1 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos del cultivo en suspensión

La cinética del cultivo de células en suspensión se realizó utilizando 42 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL con 75 mL de medio MS líquido y empleando la combinación de RVC 4 mgL^{-1} de 2,4-D y 2 mgL^{-1} de Cinetina. A cada matraz se le adicionó un inóculo de $2 \pm 0.5 \text{ g}$ de células (previamente filtradas con embudo Buchner sin llevarlas a sequedad total). Los cultivos se incubaron en fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se determinaron las biomásas frescas y secas tomando muestras cada tres días después de la inoculación hasta los 39 días. Durante el ensayo se registraron los pesos de las biomásas frescas de la misma manera como se describió en la sección 6.2.3.

6.5.2 Morfología y viabilidad celular de los cultivos en suspensión

La viabilidad celular de los cultivos se midió empleando el método DAF (Nadel, 1989) y se preparó como se mencionó previamente en la sección 6.4.1. Al momento de la medición, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se adicionaron 500 μL de la mezcla de DAF y se combinaron con 500 μL de la suspensión celular, se dejó reposar por 1 min, se tomaron 50 μL de esta suspensión y se colocó en un portaobjetos para ser observada al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF). El porcentaje de viabilidad de cada muestra se determinó como se describió previamente en la sección 6.4.1.

6.5.3 pH

El pH es la medida de la concentración de iones hidronio $[H^+]$ en el cultivo *in vitro* vegetal, que usualmente se ajusta entre 5 y 6 (McDonald & Jackman, 1989). El pH de los cultivos en suspensión se determinó cada tercer día empleando un potenciómetro (Marca Science-Med). Para ello primero se filtraron y se separaron las células de la biomasa y al medio líquido filtrado se le realizó las mediciones de pH cada tercer día.

6.5.4 Cuantificación del consumo de azúcares en el medio de cultivo de *B. fagaroides*

Para la cuantificación del consumo de azúcares en los cultivos en suspensión se realizaron curvas de calibración de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa para determinar el consumo de carbohidratos presentes en el medio de cultivo de las células en suspensión. Para cada uno de los tres azúcares se realizó una curva empleando siete concentraciones diferentes, las cuales fueron: 30, 15, 7.5, 3.75, 1.87, 0.94 y 0.47 mg/mL. La cuantificación se realizó por CLAR, en el equipo Waters 7117 plus Autosampler con un flujo de operación de 1 mL/min a 25°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna amino UG80, tamaño 5 μ m (4.6 mm x 150 mm), como fase móvil $H_2O:CH_3CN$, en una proporción 80:20 respectivamente. Los datos obtenidos se reportaron como gramos de sustrato por litro de medio S (g/L^{-1}).

6.6 Estudio fitoquímico de los cultivos *in vitro* de *Bursera fagaroides*

6.6.1 Obtención de los extractos

La obtención de los extractos del cultivo *in vitro* se realizó a los cultivos de callos y células en suspensión. Para ello, la biomasa fresca del cultivo de callos de los días 0, 7, 14, 21, 28,

35, 48, 49 y 56 así como las células filtradas de los cultivos de células en suspensión de los días 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 y 39 se colocaron en tubos falcón con capacidad de 50 mL (previamente pesados). Las muestras se congelaron y posteriormente se liofilizaron hasta llevarlos a sequedad total. Una vez secas las muestras se molieron hasta obtener un polvo fino. El material pulverizado se maceró por triplicado con diclorometano (CH_2Cl_2) durante 24 h con una proporción de 1 g de material vegetal por 10 mL de disolvente, las muestras se concentraron separando el disolvente por destilación a presión reducida utilizando un rotaevaporador (Büchi R-100). Por otro lado, se realizaron extracciones líquido-líquido a los sobrenadantes de los cultivos en suspensión colectados y filtrados en las diferentes etapas de crecimiento empleando CH_2Cl_2 , siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente. Los productos obtenidos se llevaron a sequedad completa a temperatura ambiente y el procedimiento se repitió tres veces. Los rendimientos, expresados en porcentaje, se determinaron para cada uno de los extractos y se almacenaron hasta su posterior uso.

6.6.2 Perfil químico e identificación de los compuestos mayoritarios

Una vez obtenidos los extractos de cada uno de los días de los cultivos de callos y células en suspensión (biomasa y sobrenadante), se analizó el perfil químico.

En primer lugar, se realizó una CCF, utilizando hexano-acetato de etilo (5:5) como sistema de elución. Las placas sin revelador se expusieron a irradiación con luz UV de onda corta a 254 nm, de onda larga a 360 nm, y luego se revelaron con sulfato cérico amoniacal. Las placas sin tratamiento químico y expuestas a irradiación con luz ultravioleta a 360 nm

717 permitieron la identificación de la escopoletina (mancha azul brillante con $R_f=0.32$) como
718 compuesto principal. Posteriormente, y para confirmar la presencia de escopoletina en los
719 cultivos, se inyectó mediante CLAR una alícuota de 10 μL de cada uno de los extractos (2
720 mg mL^{-1}), utilizando un sistema de elución de mezcla agua/acetonitrilo (70:30), y
721 manteniendo un flujo constante de 1 mL min^{-1} durante 30 min.

722 Para la cuantificación de la escopoletina, primero se realizó una curva de calibración
723 utilizando un estándar comercial como referencia. Se utilizaron cinco concentraciones
724 diferentes: 50, 25, 12,5, 6,25 y $3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ del compuesto disuelto en acetonitrilo de grado
725 CLAR. El cromatograma se leyó a una longitud de onda de 350 nm. Por último, se cuantificó
726 la producción de escopoletina para cada punto de la cinética de crecimiento del cultivo de
727 callos trazando la biomasa seca frente a la producción de este metabolito. El análisis se realizó
728 por triplicado y los resultados se mostraron como mg mL^{-1} de biomasa seca. Por último, los
729 resultados obtenidos se compararon con el extracto de las hojas de la planta silvestre.

730 Tras realizar el análisis de identificación y cuantificación de escopoletina en los diferentes
731 días de cultivo del callo, se procedió a separar e identificar los compuestos mayoritarios. El
732 extracto con CH_2Cl_2 (3.3 g) obtenido de cultivos *in vitro* de los días 15 a 35 se fraccionó
733 mediante CCA, previamente empacada con gel de sílice. Se recogieron fracciones de 150
734 mL, obteniéndose 182 fracciones monitorizadas por CCF. Las fracciones que mostraron
735 similitud en CCF se agruparon obteniendo 6 grupos (Figura 12).

736 El grupo NPM 2 (cristales blancos, 12 mg) mostró por CCF contener un único compuesto, y
737 el análisis CG/EM indicó que estaba constituido por γ -sitosterol (**4**), el grupo NPM 4 (cera
738 amarilla clara, 4,9 mg) presentó una mezcla de los compuestos dehidrodiosgenina (**5**) y
739 stigmasterol (**6**), finalmente el grupo NPM 6 (sólido amarillo claro, 28,1 mg) indicó la

presencia de una mezcla de varios compuestos, el principal era la escopoletina (7) (Figura 12).

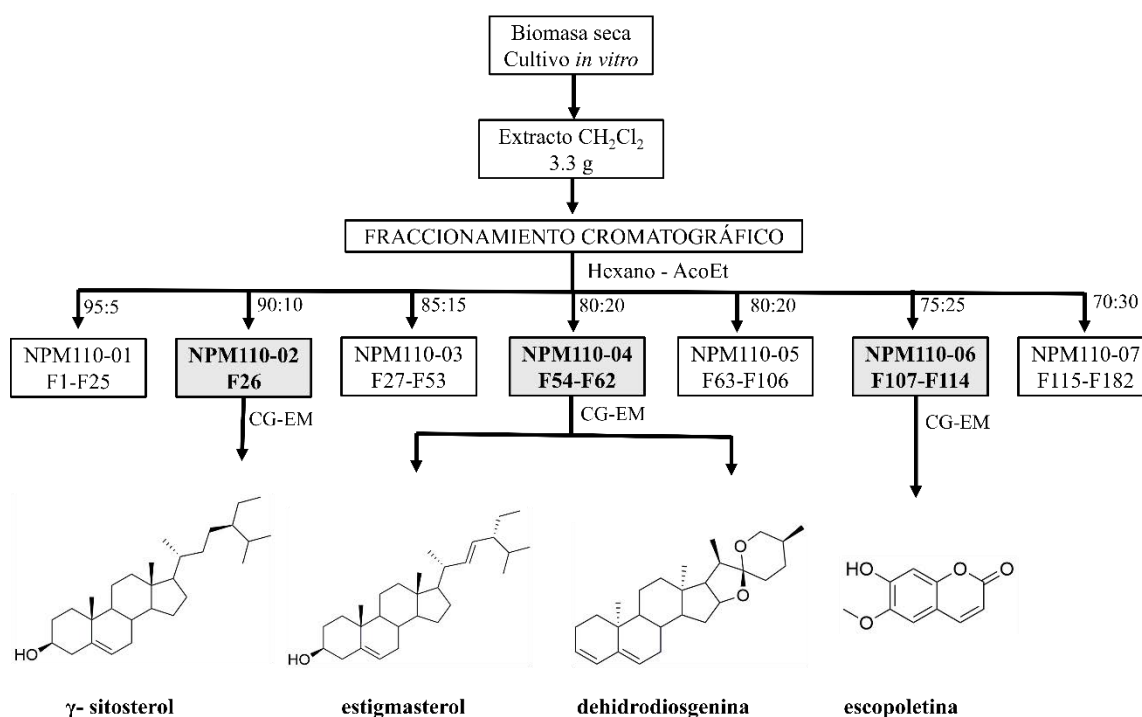


Figura 12. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna Abierta para la identificación de los compuestos mayoritarios obtenidos a partir del extracto de CH_2Cl_2 del cultivo *in vitro* de *Bursera fagaroides*.

6.7 Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los extractos de CH_2Cl_2 de las hojas de la planta silvestre y el cultivo de callos se evaluó mediante el método MTS (Bork *et al.*, 1997). Se utilizaron diferentes líneas celulares HepG2 (carcinoma hepatocelular), HeLa (carcinoma cervical), PC3 (carcinoma de próstata) y H1299 (carcinoma de pulmón). Las líneas celulares se obtuvieron de ATCC. También se incluyó una línea celular de fibroblastos humanos

inmortalizados (HFF-1) como control de células no cancerosas. Las líneas celulares PC3 y H1299 se cultivaron en medio RPMI-1640, mientras que HepG2, HeLa, MCF7 y HFF-1 se cultivaron en DMEM suplementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 10 % de suero bovino y 2 mM de glutamina. Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C en una atmósfera con el 5 % de CO₂. Se sembraron células (5×10³ células/pocillo) en placas de 96 pocillos para iniciar la evaluación citotóxica. Las soluciones madre de cada extracto se prepararon a partir de 10 mg/mL⁻¹ (10.000 µg/mL⁻¹). Se pesó una cantidad de 1 mg de extracto y se disolvió en 100 µL de DMSO. Se realizó una curva de respuesta utilizando concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL⁻¹, mientras que, en las células HFF-1, las concentraciones fueron 400, 200, 100, 50 y 25 µg/mL⁻¹. El control negativo fue DMSO al 0.5 % en medio de cultivo. Tras el tratamiento, las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se utilizó paclitaxel como control positivo. Para determinar el número de células viables en proliferación, se utilizó un CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega Corporation. Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se determinó por absorbancia a 450 nm utilizando un lector ELISA automatizado (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con el programa estadístico Prism 8.0 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.), y las concentraciones inhibitorias (IC₅₀) se determinaron mediante análisis de regresión.

6.8 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento y se repitieron tres veces y se presentan como medias ± DE. Los análisis estadísticos se realizaron análisis de varianza

777 de una vía (ANOVA), seguido de una comparación múltiple de medias (Tukey). Se utilizó el
778 programa GraphPad Prism 9.4.1 (681) y se consideró que un valor $p < 0.05$ de significancia
779 estadística.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas de la planta silvestre de *B. fagaroides*.

7.1 Rendimiento de los extractos de las hojas de la planta silvestre de *B. fagaroides*

La maceración con hexano, CH₂Cl₂ y metanol permitió obtener los siguientes rendimientos: (15.3 g, 1.18 %) para el extracto hexánico, (15.5 g, 1.2 %) para el extracto con CH₂Cl₂ y (60.90 g, 5.4 %) para el extracto metanólico.

7.2 Estudio fitoquímico del extracto con CH₂Cl₂ de las hojas de la planta silvestre

Los compuestos volátiles presentes en el extracto de CH₂Cl₂ fueron analizados por CG-EM. El estudio muestra que las hojas de la planta silvestre de *B. fagaroides* producen 22 metabolitos volátiles distribuidos en seis terpenos (14.9 %), 5 ácidos grasos (7.4 %), 4 alcanos (27.3%), un esteroide (0.05%) y cinco triterpenos (22.0 %). Los metabolitos más abundantes fueron el alcano hentriacontano con un tiempo de retención de 32.06 minutos y abundancia relativa de 19.1 %, y el triterpeno friedelina (RT = 40.28 min y abundancia relativa = a 10.1 %). En conjunto los alcanos representan el mayor porcentaje de abundancia seguido por los triterpenos los cuales fueron identificados como betulina (2.8 %), β-amirina (1.5 %), betulinaldehído (0.8 %), lupenona (1.3 %), lupeol (6.3 %) y friedelina (10.1 %).

Tabla 7.

800 **Tabla 7.** Compuestos encontrados en el extracto con diclorometano (CH₂Cl₂) en las hojas de la planta silvestre de *B. fagaroides*.

No	Compuesto	TR (min)	Abundancia (%)	Fórmula Molecular	Ión molecular
1	Hexahydrofarnesyl acetone	17.67	4.4	C ₁₈ H ₃₆ O	268.3
2	2-Hydroxy-1,1,10-trimethyl-6,9-epidioxydecalin	20.20	0.6	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	226.2
3	1-Hexadecyn-3-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-	20.58	0.5	C ₂₀ H ₃₈ O	294.3
4	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	22.45	1.4	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324.3
5	Methyl tetracosanoate	27.28	1.4	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382.4
6	α-tocospiro A	29.50	8.1	C ₂₉ H ₅₀ O ₄	462.4
7	Nonacosane	29.69	2.4	C ₂₉ H ₆₀	408.5
8	Methyl hexacosanoate	30.10	2.4	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	410.4
9	Pentacosanoic acid, 2,10-dimethyl-, methyl ester	30.80	0.9	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	424.4
10	Ethyl cholate	31.83	0.5	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	436.3
11	Hentriacontane	32.06	19.1	C₃₁H₆₄	436.5
12	methyl octacosanoate	32.49	1.3	C ₂₉ H ₅₈ O ₂	438.4
13	Vitamin E	32.62	0.5	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.4
14	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-	33.38	0.8	C ₂₆ H ₅₄	366.4
15	Triacontane-1,30-diol	34.17	5.0	C ₃₀ H ₆₂ O ₂	454.5
16	Azafrin	35.72	0.8	C ₂₇ H ₃₈ O ₄	426.3
17	Betulin	38.78	2.8	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.4
18	Beta-Amyrin	36.19	1.5	C ₃₀ H ₅₀ O	426.4
19	Betulinaldehyde	36.31	0.8	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	440.4
21	Lupen-3-one	36.59	1.3	C ₃₀ H ₄₈ O	424.4
22	Lupeol	37.12	6.3	C ₃₀ H ₅₀ O	426.4
22	Friedelin	40.28	10.1	C₃₀H₅₀O	426.4

801

Por otro lado, el análisis fitoquímico del extracto CH_2Cl_2 de las hojas de la planta silvestre permitió la identificación de tres compuestos correspondientes al grupo de los lignanos, los cuales fueron caracterizados como yateina (**1**), 7'8'-dehidropodofilotoxina (**2**) y acetilpodofilotoxina (**3**) purificados por una combinación de cromatografía en columna con CLAR como se describe en la sección 6.3.3. Los cromatogramas de la purificación de estas sustancias se describen previamente.

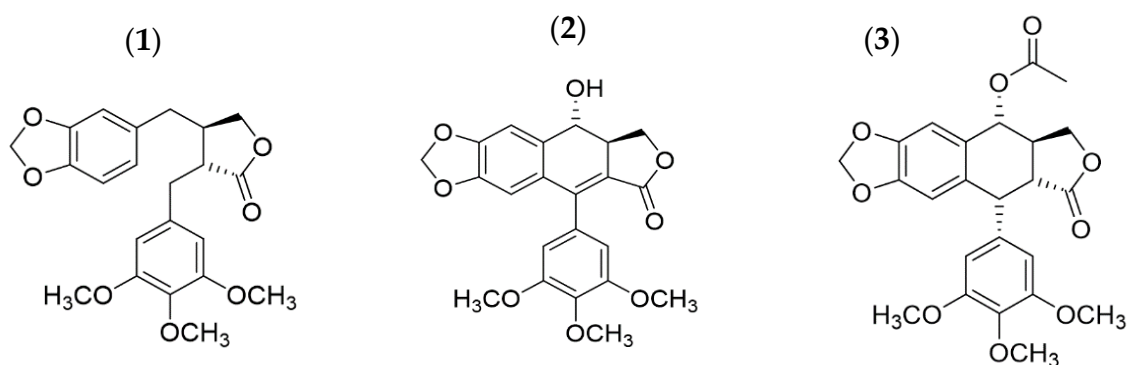


Figura 13. Estructuras químicas de los compuestos de tipo lignano caracterizados mediante CLAR. (1) yateina, (2) 7'8'-dehidropodofilotoxina y (3) acetilpodofilotoxina.

7.2.1 Caracterización del compuesto yateina presente en el extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de la planta silvestre

A continuación, se describe en detalle la caracterización por RMN del lignano más abundante caracterizado e identificado como yateina (1), los lignanos 2 y 3 fueron identificados por comparación directa (CCF, RMN- ^1H) con muestras auténticas disponibles en el laboratorio.

El espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto 1 correspondiente a la yateina yateina (Espectro 1) muestra señales aromáticas correspondientes a un sistema ABX: una señal doble de doble en δ 6.45 (1H, dd, $J=7.8, 1.6$ Hz) un doblete en δ 6.64 (1H, d, $J=7.8$ Hz)

y otro doblete en δ 6.43 (1H, d, $J=1.6$ Hz), que corresponden a un anillo aromático trisustituido (Figura 14), el cual contiene un anillo de metilendioxi cuya señal aparece en δ 5.8 (2H, d, $J=5.6$ Hz). Por otro lado, en δ 6.32 aparece una señal ancha que integra para 2H, los cuales se asignan a los protones del anillo C, que está sustituido por tres metoxilos como se evidencia en las señales en δ 3.77, s (6H), y δ 3.74, s (3H) asignables a los metilos de los metoxilos (Figura 15). Este análisis permite corroborar la presencia de un lignano de tipo dibencilbutano, que contiene un anillo de lactona, evidenciado por la presencia de un sistema ABX alifático asignado al metileno de la posición base del oxígeno de la lactona (H9) que resuenan como dos dobles de dobles en δ 4.17 (1H, dd, $J=9.4, 7.5$ Hz) y δ 3.88 (1H, dd, $J=9.1, 7.5$ Hz). Así mismo, las señales para los protones H8 y H8' se localizan en δ 2.42 y 2.59 como multipletes, mientras que los protones del metileno asignado a H7 resuenan como un multiplete centrado en δ 2.54; los dobles de dobles en δ 3.57 (14.1, 7.0 Hz) y δ 3.83 (14.1, 5.0 Hz) se asignan al metileno de C-7 (Figura 16). Estos datos fueron corroborados mediante las correlaciones 1H-1H y 1H-13C observadas en los espectros COSY, HSQC y HMBC. Las evidencias espectroscópicas discutidas hasta el momento indican que este lignano presenta estructura de dibencil butirolactona y el patrón de sustitución deducido (metilendioxi y 3 OMe) sugiere que se trata de la yateina, lignano presente en *Anthriscus sylvestris* (Ikeda et al., 1998). La comparación de los datos de RMN ^1H y ^{13}C con los descritos para la yateina corroboraron la identidad de este lignano. Los lignanos 7'8'-dehidropodofilotoxina y acetil podofilotoxina fueron aislados anteriormente de la corteza de *B. fagaroides* (CITA) por lo que su caracterización se llevó a cabo por comparación directa con muestras auténticas existentes en el laboratorio.

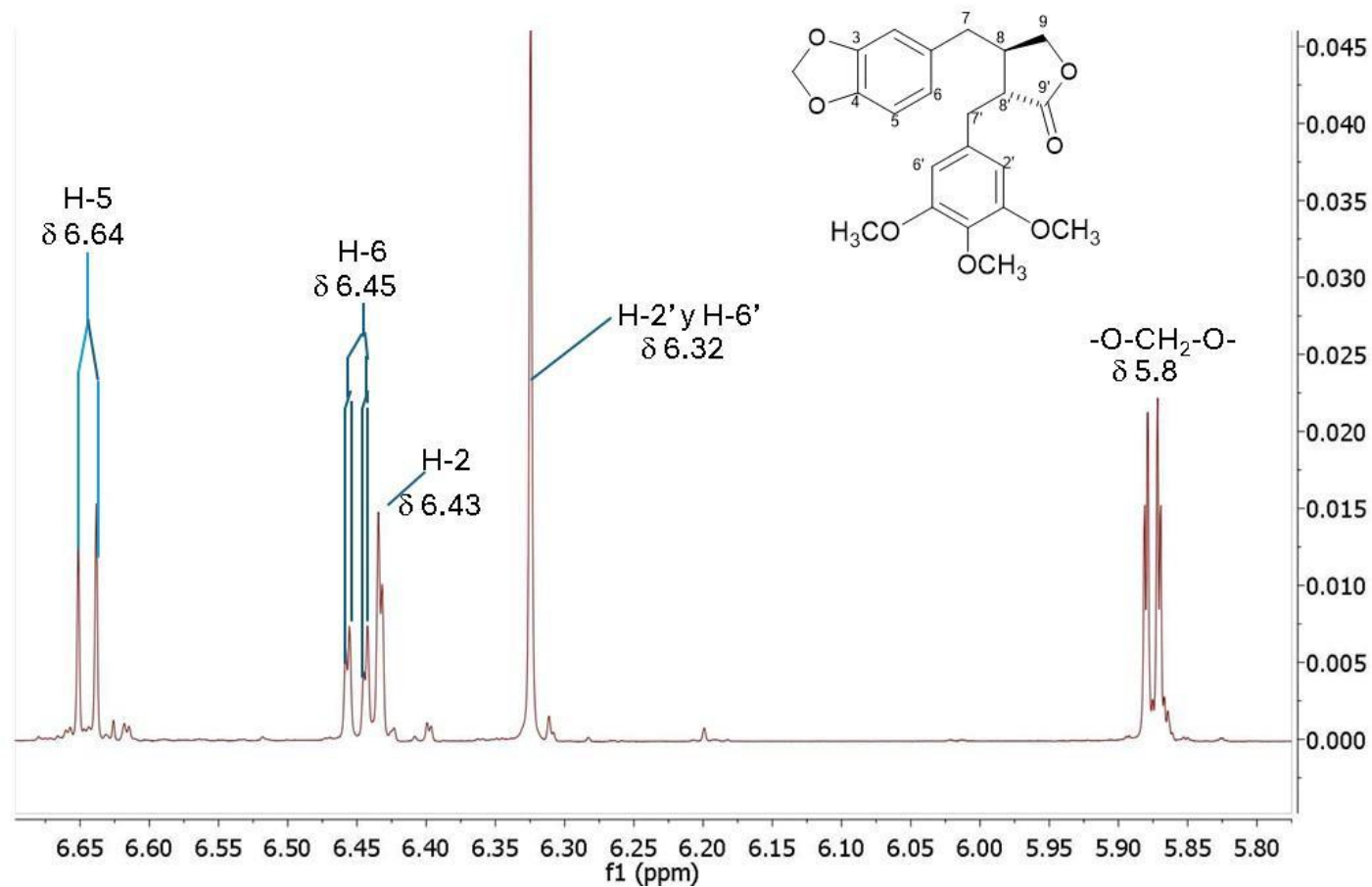


Figura 14. Expansión de la región de δ 5.80 a δ 6.65 del espectro de RMN ^1H de la yateina (**1**).

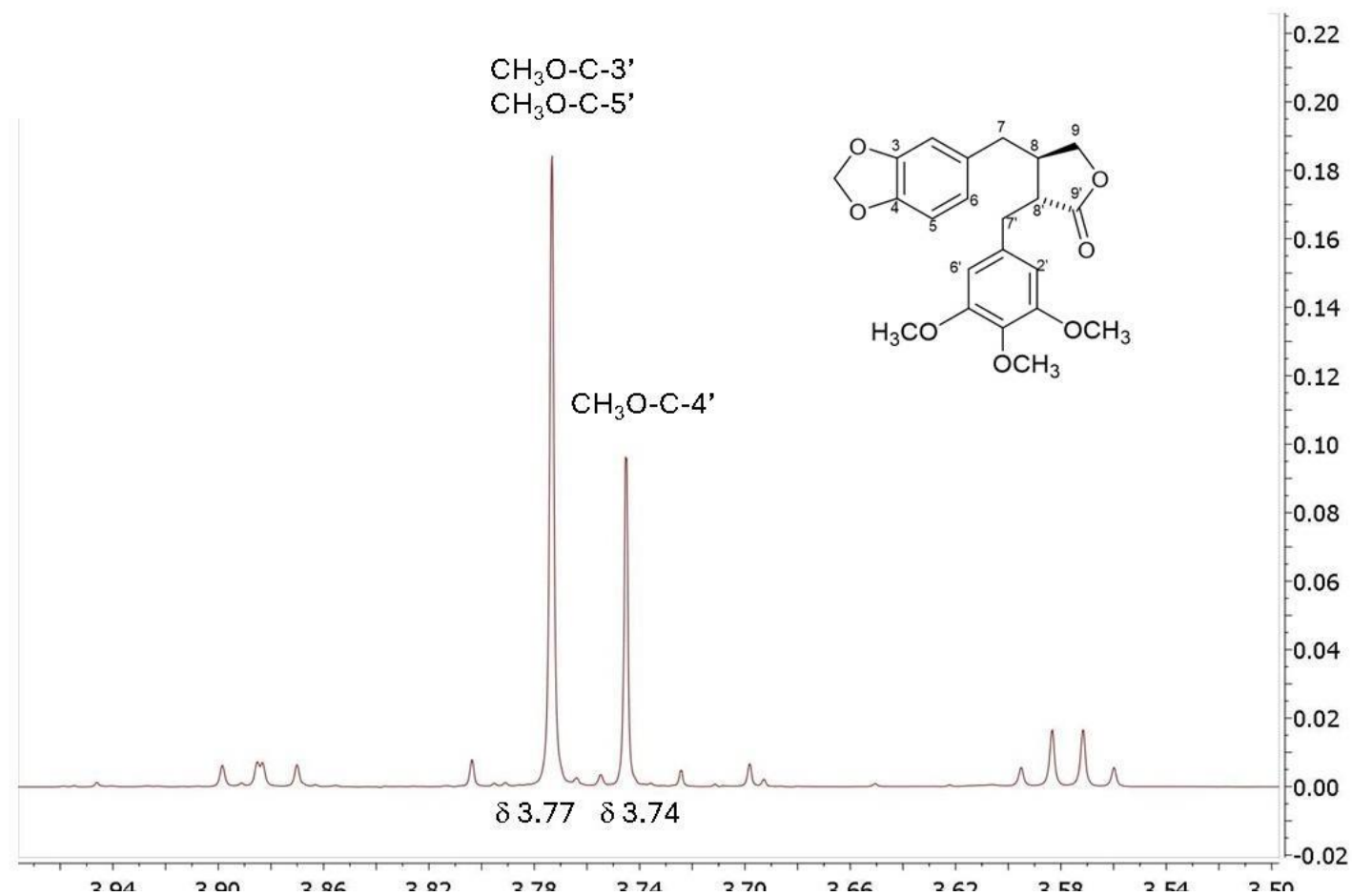
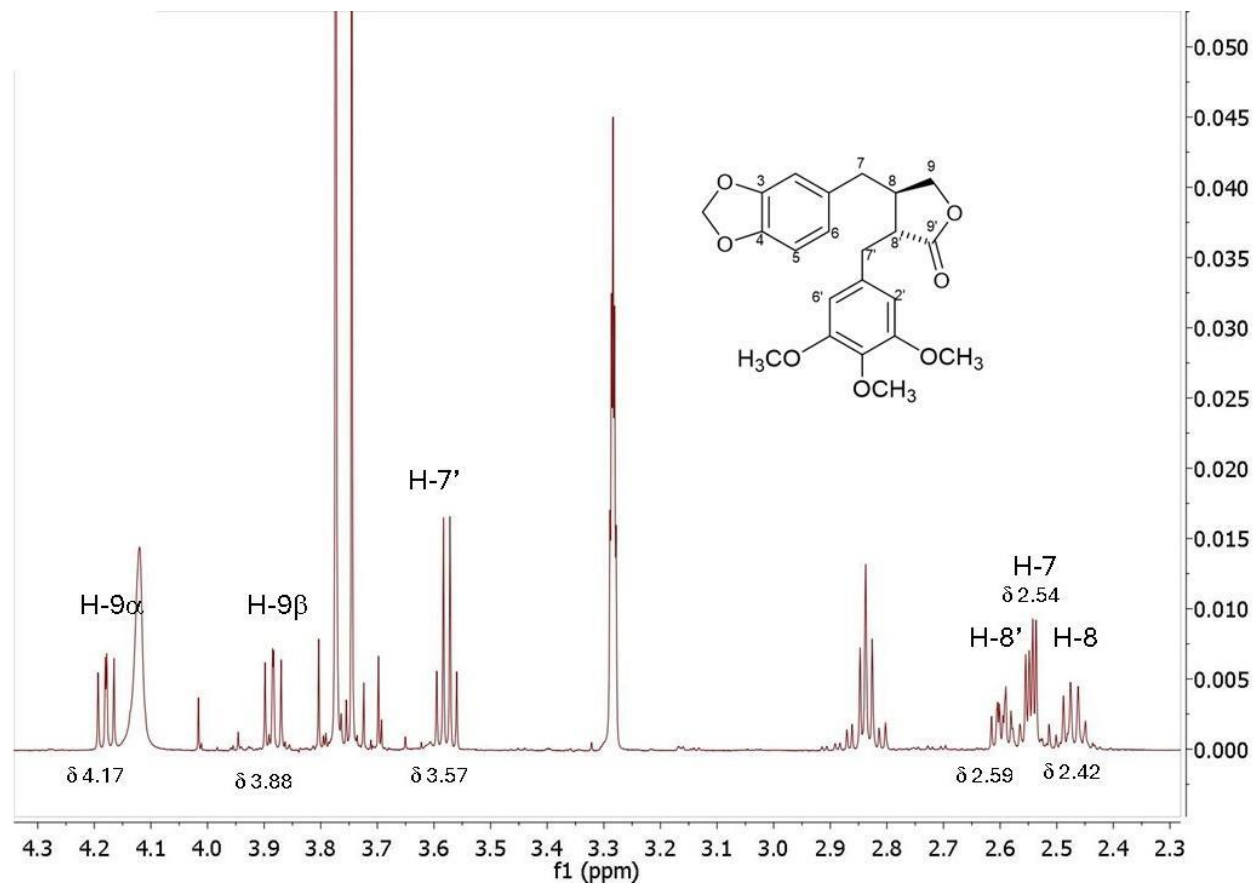


Figura 15. Expansión de $\delta 3.50$ a $\delta 3.94$ del espectro de RMN ^1H de la yateina (**1**).

852



853

854 **Figura 16.** Expansión de $\delta 2.30$ a $\delta 4.3$ del espectro de RMN ^1H de la yateina (**1**).

855

856

857

858

859

860

861

862

863

Establecimiento y caracterización de cultivos *in vitro* de callos a partir de
explantes de hojas de *B. fagaroides*.

864

865

866

867

868

869

7.3 Estudio biotecnológico

7.3.1 Cultivo de clones por esqueje

El mejor tratamiento para el desarrollo y cultivo de clones por esquejes en macetas de la planta mantenida en condiciones de invernadero fue al emplear fibra de coco como sustrato (Figura 17, A-D). Como se puede observar, casi al inicio del cultivo de los esquejes (día 12, 17A), estos favorecieron la presencia de brotes foliares de aproximadamente 0.5 cm de longitud, posteriormente, a los 25 y 70 días se desarrollaron hojas sanas y jóvenes con una longitud de entre 2 a 3 cm con una coloración verde claro (B y C), mismas que a los 2 meses y medio (140 días, 14D) la coloración de las hojas se tornó verde más oscuro.

No obstante, al emplear arena de río como sustrato en las macetas para el desarrollo de esquejes (Figura 17, E-H) esta no fue favorable. Como se puede apreciar en las figuras 17E-G, se desarrollaron brotes foliares, sin embargo, no se desarrollaron ni obtuvieron hojas como con el tratamiento de fibra de coco. Cabe señalar que a los dos meses y medio (17-H) los brotes se secaron y no volvieron a desarrollarse.

Las hojas jóvenes desarrolladas a partir del sustrato con fibra de coco se utilizaron para el establecimiento de los cultivos de células desdiferenciadas (callos) como se describe a continuación.

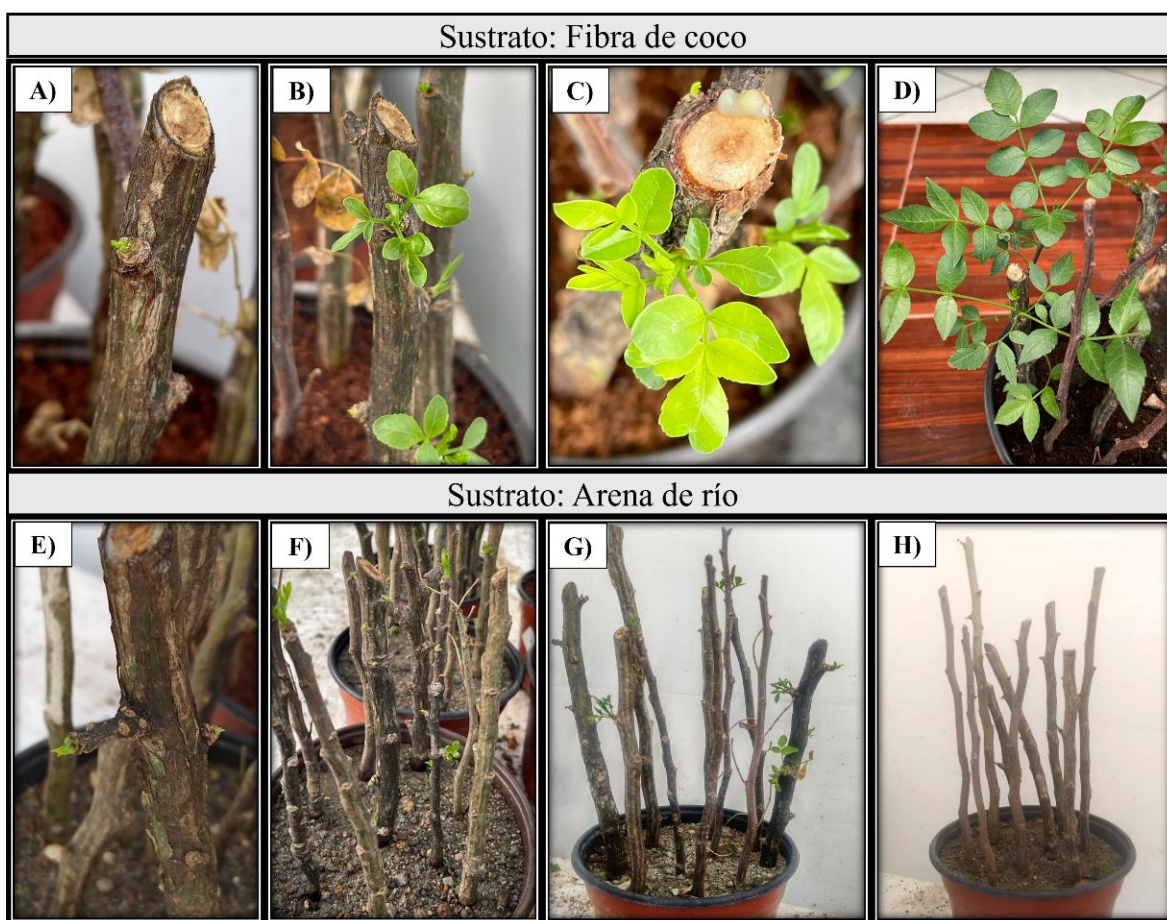


Figura 17. Cultivo los esquejes de *B. fagaroides* cultivados en condiciones de invernadero, observados en diferentes días y empleando dos sustratos: fibra de coco y arena de río. A y E) día 12, B y F) día 25, C y G) día 70 y D y H) día 139.

7.3.2 Inducción de callo en explantes de hoja de *B. fagaroides*

Para la inducción de callo, primero se desinfectaron hojas cultivadas por esquejes. El protocolo de desinfección empleado resultó favorable debido a que los explantes mantuvieron su coloración y apariencia verde, además, dicho proceso, permitió obtener 90 % de las hojas libres de contaminación en los diferentes tratamientos y condiciones probadas (Figura 18A), por lo que este método resultó eficaz no solo para obtener material vegetal, sino también para la desdiferenciación de explantes y la obtención de callos.

De los veinte tratamientos probados, el tratamiento número tres que contenía medio MS y la combinación de 2 mgL^{-1} de 2,4-D y 2 mgL^{-1} de cinetina promovieron la inducción de callo en un 86.7 % como se resume en la tabla 8.

Cabe señalar que, como se aprecia en la figura 18B hubo una mayor proliferación de callos en la base de los explantes (región marcada con flechas negras) posterior a los 30 días. Sin embargo, después de los subcultivos de las células con dicho tratamiento, se desarrollaron callos más compactos, oxidados y con una coloración café (Figura 18C), por lo que se transfirieron a medio B5 con 4 mgL^{-1} de 2,4-D, 1 mgL^{-1} de ANA y 1 mgL^{-1} de zeatina. Como se muestra en la figura 18D, ese medio y con esa combinación de RVC promovió una mejor formación de callos, una mejor respuesta de crecimiento con aspecto friable, que al observar al microscopio se disgregaron fácilmente y se pudieron apreciar células individuales donde predominó una morfología alargada y encontrando además células circulares (Figura 18E, flechas negras), con un porcentaje de viabilidad celular del 98 % (Figura 18F).

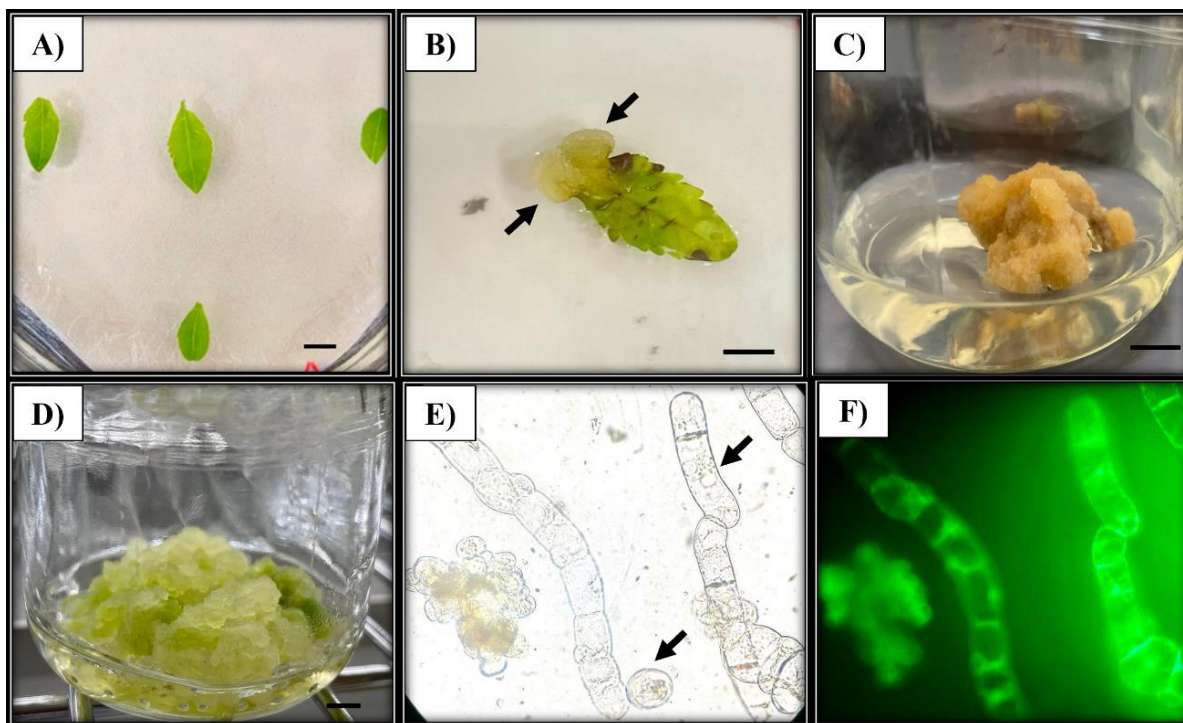


Figura 18. Inducción y desarrollo de callos a partir de explantes de hoja de *B. fagaroides* cultivados en fotoperiodo. (A) Desinfección de los explantes, (B) callo dediferenciado después de 30 días en medio MS suplementado con 2,4-D: cinetina en una proporción de 2:2 mgL⁻¹, (C) cultivo de callos en medio MS suplementado con 2,4-D: cinetina en una proporción de 2:2 mgL⁻¹ tras los subcultivos, (D) cultivo de callos a los 30 días en medio B5 con 2,4-D: ANA: zeatina en una proporción de 4:1:1 mgL⁻¹, (E, F) morfología y viabilidad celular en medio B5 con 2,4-D: ANA: zeatina en una proporción de 4:1:1 mgL⁻¹, medio B5 con 2,4-D: ANA: zeatina en una proporción de 4:1:1 mgL⁻¹, respectivamente, a los 30 días de cultivo. Barra = 0.5 cm y objetivo 40X.

Tabla 8. Efecto de los Reguladores de Crecimiento Vegetal y medios de cultivo en la inducción de callos de *Bursera fagaroides*.

No. TRAT.	MEDIO	RVC (mgL ⁻¹)		CALLO (%) ± DE
		2,4-D	CINETINA	
1	MS	2	0	0.00±0.00 ^d
2	MS	2	1	0.00±0.00 ^d
3	MS	2	2	86.67±5.77^a
4	MS	3	1	0.00±0.00 ^d
5	MS	3	2	0.00±0.00 ^d
6	MS	3	3	0.00±0.00 ^d
7	MS	4	1	0.00±0.00 ^d
8	MS	4	2	33.33±5.77 ^b
9	MS	4	3	0.00±0.00 ^d
10	MS	4	4	26.67±5.77 ^b
11	B5	2	0	0.00±0.00 ^d
12	B5	2	1	13.33±5.77 ^c
13	B5	2	2	16.67±5.77 ^c
14	B5	3	1	0.00±0.00 ^d
15	B5	3	2	0.00±0.00 ^d
16	B5	3	3	0.00±0.00 ^d
17	B5	4	1	0.00±0.00 ^d
18	B5	4	2	0.00±0.00 ^d
19	B5	4	3	0.00±0.00 ^d
20	B5	4	4	0.00±0.00 ^d

RVC = Reguladores de Crecimiento Vegetal. Los datos muestran las medias ± la Desviación Estándar. Los valores con la misma letra en las columnas no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey), con una significancia definida de $p < 0.05$.

Es importante mencionar que existen pocos estudios sobre la formación y el desarrollo de callos en la familia Burseraceae, ya que algunas especies son arbóreas y leñosas, con un alto contenido de hongos endofíticos, algunas de ellas están en peligro de extinción y son muy recalcitrantes, lo que conlleva a que haya una germinación reducida (Bonfil *et al.*, 2007), (Mishra & Kumar, 2010), (Bonfil-Sanders, *et al.*, 2008). Además, los copales y cuajiotos del

944 género *Bursera* presentan dificultades para la germinación y/o obtención de plántulas y callos
945 a partir de semillas. Estas dificultades se deben a que el fruto tiene una cubierta relativamente
946 dura y pasa por el sistema digestivo de ciertas especies de aves, donde se ablanda y facilita
947 la germinación (Cultid-Medina & Rico, 2020), (Rzedowski & Guevara-Féfer, 1992). Otra
948 opción es utilizar tratamientos de pregerminación como la inmersión en ácido clorhídrico o
949 escarificación mecánica, para obtener plantas *in vitro*. Así mismo, se ha descrito el uso de
950 algunas auxinas para obtener callos en el género *Bursera*. Por ejemplo, en un cultivo de
951 esquejes *ex vitro* de *B. fagaroides*, el tratamiento con 1500 ppm de ácido indolbutírico (AIB)
952 permitió la formación de un 70-85 % de callos tras cuatro meses (Bonfil-Sanders, *et al.*,
953 2008). Por otro lado, la aplicación de 1.5 mgL^{-1} de ácido indolbutírico (AIB) sobre explantes
954 de tallos de *B. laxiflora* permitió la inducción del 80 % de callos después de 30 días (Mc-
955 Caughey *et al.*, 2020). En otro trabajo, al utilizar una combinación de ácido naftalenacético
956 (ANA, 3 mgL^{-1}) y 6-bencilaminopurina (BAP, 0.5 mgL^{-1}), se obtuvo un 95 % de inducción
957 de callo a partir de *B. linaloe* a los 40 días de tratamiento (Pavón-Reyes *et al.*, 2017).

958 Entre los diferentes tipos de auxinas se encuentra el 2,4-D, una auxina sintética que provoca
959 una rápida proliferación celular, formación y un crecimiento óptimo del callo. Además de ser
960 el regulador del crecimiento más utilizado en el cultivo de tejidos de cereales, así mismo, se
961 ha utilizado para la inducción de callos iniciando la dediferenciación a partir del quinto día
962 en cultivos (Malik *et al.*, 2003), (Zheng & Konzak, 1999) y (Carsono *et al.*, 2021). Algunos
963 estudios sugieren que, cuando la concentración de 2,4-D es igual o superior a 3 mgL^{-1} , se
964 observa un crecimiento desorganizado que favorece la formación de callos, pero, cuando se
965 utilizan concentraciones más elevadas, se produce una inhibición de la división celular
966 (Malik *et al.*, 2003), (Zheng & Konzak, 1999) y (Ozias-Akins & Vasil, 1983).

7.3.3 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos del cultivo de callos

La cinética de crecimiento del cultivo de callos de los pesos de las biomásas frescas y secas se muestran en la figura 19A. La curva de la cinética de crecimiento mostró un comportamiento sigmoideo durante los 63 días (9 semanas), en la cual se observó la fase de adaptación en los días 1 al 14, posteriormente, la fase exponencial que comprendió los días 14 a 42 alcanzando una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.059 \text{ días}^{-1}$ y un tiempo de duplicación celular $td = 11.8 \text{ días}$. La fase estacionaria comprendió los días 42 a 56 y finalmente la fase de muerte en los días 56 a 63. Cabe señalar que el mayor Índice de Crecimiento Celular (IC) se observó en el día 28. Este es el primer informe sobre la caracterización de un cultivo de callos de *Bursera fagaroides*. (Mishra & Kumar, 2010) realizaron la inducción de callos en *Commiphora wightii* (Burseraceae) utilizando 5 mgL^{-1} de 2,4-D y 0.5 mgL^{-1} de BAP, obteniendo 5.78 g de biomasa fresca máxima. Por otro lado, (Al-Abdallat *et al.*, 2023) obtuvieron 32.41 g de biomasa fresca y 0.89 g de biomasa seca en un cultivo de callos de *Commiphora gileadensis* (Burseraceae) utilizando altas concentraciones de auxina con respecto a la citoquinina. En este estudio, se obtuvieron concentraciones ligeramente inferiores de biomasa seca (0.78 g). Esto debido probablemente a la combinación y concentración de los RCV utilizados. Además, los resultados obtenidos se compararon con estudios de la misma familia (Burseraceae); sin embargo, las especies del género *Bursera* son muy recalcitrantes y difíciles de propagar, como se ha descrito anteriormente (Ramos-Ordoñez *et al.*, 2016) y (García-Aguilar *et al.*, 2021).

Por lo anterior, se puede observar que la combinación de los RCV con el medio utilizado en esta investigación favoreció la acumulación de biomasa, lo que permitió caracterizar el cultivo. La curva de crecimiento determinada por los puntos analizados, expresada en biomasa fresca y seca, presentó una curva sigmoidea con cuatro fases distintas (adaptación, exponencial, estacionaria y muerte).

7.3.4 Porcentaje de viabilidad, apariencia y morfología celular del cultivo de callos

El porcentaje de viabilidad celular se muestra en la figura 19B, así como la apariencia de los cultivos de callos vistos al microscopio (morfología y células teñidas con DAF) en las fases adaptación, exponencial, estacionaria y muerte se presentan en la figura 19C y 19D. Como se puede observar, al inicio del cultivo (día 0) se observó una viabilidad celular del 81% el cual incrementó considerablemente a 91 % en el día 14, en esta etapa, el cultivo presentó una consistencia friable con una coloración amarillo claro, observando principalmente células alargadas. Posteriormente, en la fase exponencial que comprendió los días 14 a 42 los callos adquirieron una coloración que cambió de verde claro a verde más oscuro con una media de entre el 80 y 90 % de viabilidad, en esta fase principalmente células con una morfología circular. Después, en la fase estacionaria, los callos tomaron una coloración café claro en las partes más externas, y la forma de las células en esta fase se empezó a alargar y el porcentaje de viabilidad en promedio fue del 80 %. Finalmente, en la fase de muerte celular se observó un agotamiento en el medio de cultivo donde los callos tomaron una coloración café oscuro alcanzando una viabilidad del 56 %

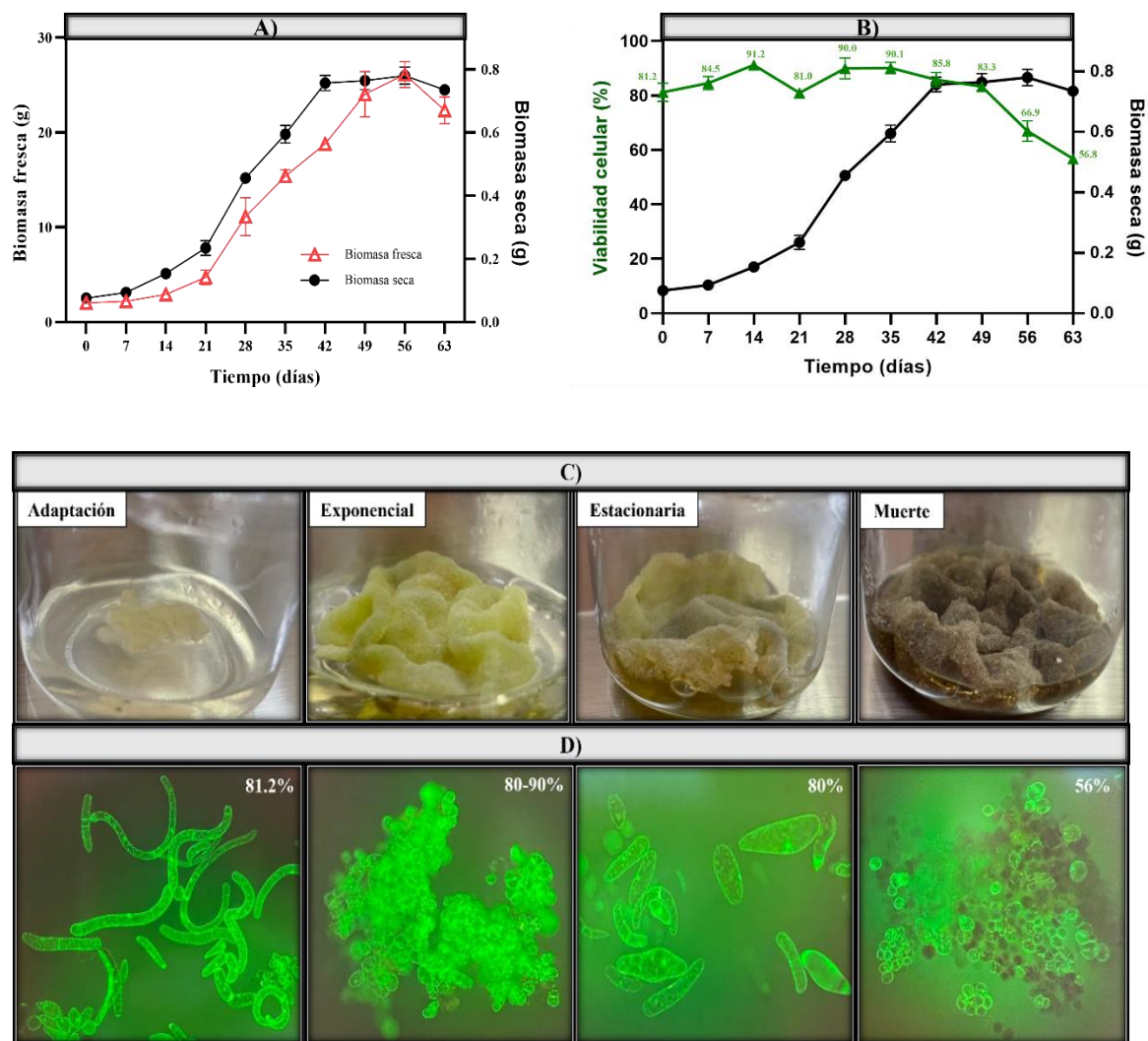


Figura 19. A) Curva de crecimiento celular, B) Porcentaje de viabilidad celular, C y D) Apariencia y morfología celular de *Bursera fagaroides*.

Como se puede observar, la mejor respuesta de inducción de callos se observó con concentraciones de 4 mgL^{-1} de 2,4-D en combinación con ANA y zeatina en una proporción de 1:1 mgL^{-1} en medio B5, con un callo de color amarillo claro, friable y sin oxidación, con altos porcentajes de viabilidad celular y morfologías circulares y alargadas en las diferentes etapas de crecimiento (Figura 19C). Estos resultados coinciden parcialmente con los

1019 reportados por (Pádua *et al.*, 2014), quienes mostraron dos tipos de morfologías de callos en
1020 *Coffea arabica*.

1021 **7.4 Perfil químico de la biomasa seca del cultivo de callos de *B. fagaroides***
1022 **presente en la cinética de crecimiento y comparación con el estándar de escopoletina**
1023

1024 El extracto de CH₂Cl₂ de la biomasa vegetal seca de cada uno de los días de la cinética de
1025 crecimiento de *B. fagaroides* se analizó primero cualitativamente mediante CCF (Figura 20).
1026 En la fase de adaptación (días 0 y 7), se observó una producción mínima de metabolitos
1027 secundarios en comparación con la fase estacionaria, en la que se observaron compuestos de
1028 baja polaridad asociados al crecimiento celular. Sin embargo, en la fase estacionaria, su
1029 producción aumentó considerablemente, manteniendo la concentración máxima desde los
1030 días 42 a 56. Este análisis sugiere que el cultivo de callos de esta especie sintetiza compuestos
1031 de menor polaridad en la fase estacionaria, posiblemente en respuesta a la ausencia de
1032 nutrientes en el medio. Cabe señalar que, durante el cultivo, uno de los compuestos
1033 principales fue el que presentó un R_f igual a 0.35 con una coloración azul brillante observada
1034 a 360 nm, que se obtuvo constantemente a partir del día 14 y se mantuvo hasta el final de la
1035 fase estacionaria, disminuyendo su presencia considerablemente en la fase de muerte celular.
1036 Esa molécula se comparó con el estándar de escopoletina (E) mostrado en el último carril.

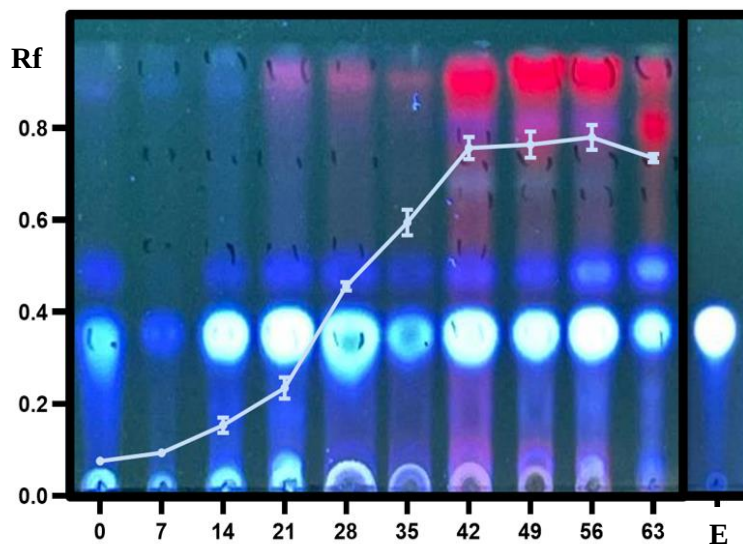


Figura 20. CCF de los extractos con CH_2Cl_2 de callos de *B. fagaroides* en diferentes días de cultivo. E= estándar de escopoletina. Rf= factor de retención.

Para confirmar la presencia de escopoletina en el cultivo de callos, se utilizó un estándar comercial y se analizó por CLAR a 360 nm, el cual presentó un TR de 10.27 min (Figura 21).

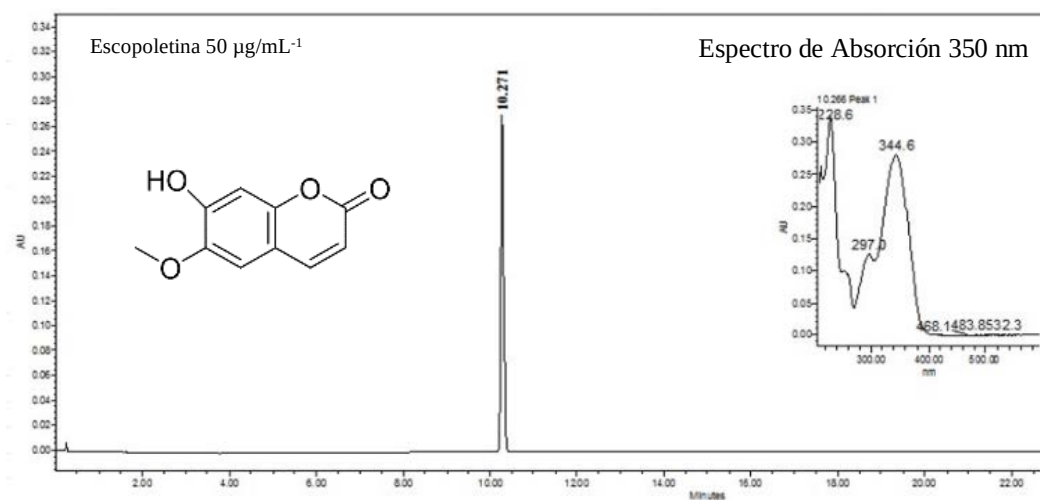


Figura 21. Cromatograma del estándar de escopoletina a 350 nm ($50 \mu\text{g/mL}^{-1}$).

Posteriormente, se analizó cada una de las manchas de los diferentes días del cultivo de callos. Para ello, se cuantificó la concentración del compuesto escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) entre los días 14 y 56. La concentración del metabolito se expresó en μg de compuesto por g de biomasa seca. Como se puede observar en la figura 22, en el día 21, correspondiente al inicio de la fase exponencial, se observó el primer pico de producción del metabolito ($10.7 \mu\text{g g}^{-1}$), que disminuyó a medida que la célula se encontraba en crecimiento y división celular. Esto puede deberse a que el medio de cultivo se suplementó con 4 mgL^{-1} de 2,4-D. Estudios previos señalan que cuando se adiciona escopoletina a una concentración superior de 1 mgL^{-1} de 2,4-D de forma endógena a las células de callo de *Nicotiana tabaccum*, estas absorben la escopoletina del medio y la acumulan en su glicoconjugado (escopolina), principalmente en las vacuolas (Okazaki *et al.*, 1982; Taguchi *et al.*, 2000). Por otro lado, se han utilizado algunos elicitores para su síntesis. Por ejemplo, se ha descrito que la síntesis de escopoletina se asocia con el crecimiento celular en cultivos de callos y suspensiones de *Tilia americana* después de aumentar la concentración de cobre hasta $1.2 \mu\text{M}$ (Cisneros-Torres *et al.*, 2019), y que el sulfato de cobre estimula su producción en cultivos de suspensiones de *Angelica archangelica* (Siatka *et al.*, 2017).

Así mismo, como se aprecia en la figura 22, hubo un segundo pico de producción de escopoletina que comenzó el día 41 con un pico mayor al final de la fase estacionaria (día 56) ($9.6 \mu\text{g g}^{-1}$), posiblemente en respuesta a la ausencia de nutrientes. Cabe señalar que este compuesto es una de las fitoalexinas inducidas por diferentes tipos de estrés (Cisneros-Torres *et al.*, 2019; Gnonlonfin *et al.*, 2012; Siatka *et al.*, 2017). Cabe señalar que existen muy pocos informes sobre el efecto de las cumarinas naturales en la división celular y la callogénesis en tejidos vegetales cultivados *in vitro* (Bagni & Fracassini, 1971).

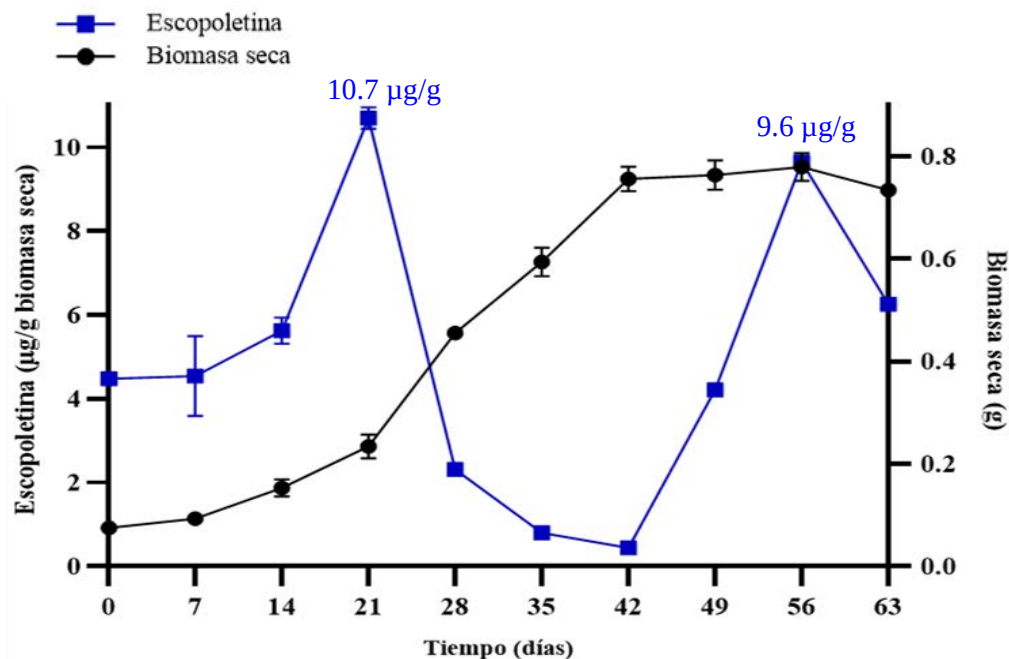


Figura 22. Curva de producción de escopoletina respecto a la biomasa del peso seco en los diferentes días del cultivo de callos de *B. fagaroides*. Los valores se expresan como la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Se ha descrito que la escopoletina posee actividades antibacterianas, citotóxicas y antifúngicas (Ara *et al.*, 2009; Fritig *et al.*, 1970b; Habibullah *et al.*, 2010; Modafar *et al.*, 1993) y previene el aumento de peso y el efecto lipémico en ratones (Aguilar *et al.*, 2012). Así mismo, algunas cumarinas se ha aislado de varias familias de plantas, como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae y Fabaceae, por mencionar algunas (Matos *et al.*, 2015). Además, también se ha encontrado en la corteza de algunas especies del género *Bursera*, como *B. grandifolia*, *B. serrata* y *B. morelensis*, así como en las hojas de *B. simuraba* (Aguilar *et al.*, 2012; Ara *et al.*, 2009; Habibullah *et al.*, 2010; Infante-Rodríguez *et al.*, 2022; Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta ahora no hay informes de su presencia en las hojas de *B. fagaroides*.

7.4.1 Perfil químico del fraccionamiento por CCA del extracto con CH₂Cl₂ del cultivo de callos de *B. fagaroides*

Como se describió en la sección 6.7.2 posterior a la identificación y cuantificación de escopoletina en los diferentes días de cultivo del callo, se procedió a separar e identificar los compuestos mayoritarios. Del fraccionamiento se obtuvieron 182 fracciones las cuales fueron agrupadas en seis grupos principales (Figuras 23 y 24). La investigación fitoquímica demostró la presencia de fitoesteroles además de escopoletina. La mezcla de γ -sitosterol y estigmasterol se aisló del extracto tras la separación cromatográfica, y sus estructuras (figuras 23 A y C) se identificaron comparando sus datos espectroscópicos con los publicados (Infante-Rodríguez *et al.*, 2022; Rojas-Sepúlveda *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2013). Además, se compararon sus espectros de masas con la base de datos NIST versión 1.7. Estos compuestos están presentes en diversas especies vegetales, sus actividades biológicas han sido investigadas a fondo y se han establecido sus efectos farmacológicos. Dichos compuestos también mostraron efectos antiinflamatorios, antibacterianos y antitumorales. En general, se encuentran aproximadamente 250 fitoesteroles en las plantas, incluidos el sitosterol, el estigmasterol, el campesterol, el brassicasterol, el ergosterol y el β -sitosterol. Se ha propuesto que una dieta rica en fitoesteroles puede reducir el riesgo de cáncer en un 20 % (Shahzad *et al.*, 2017). Los esteroides vegetales alquílicos C-24 están presentes en todas las plantas superiores y se encuentran en las fracciones ricas en lípidos de las plantas (Sonawane *et al.*, 2016). Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la actividad citotóxica y antitumoral de los esteroides, principalmente el β -sitosterol, un isómero del γ -sitosterol que se encuentra en la biomasa del callo de *B. fagaroides* (Rubis *et al.*, 2008).

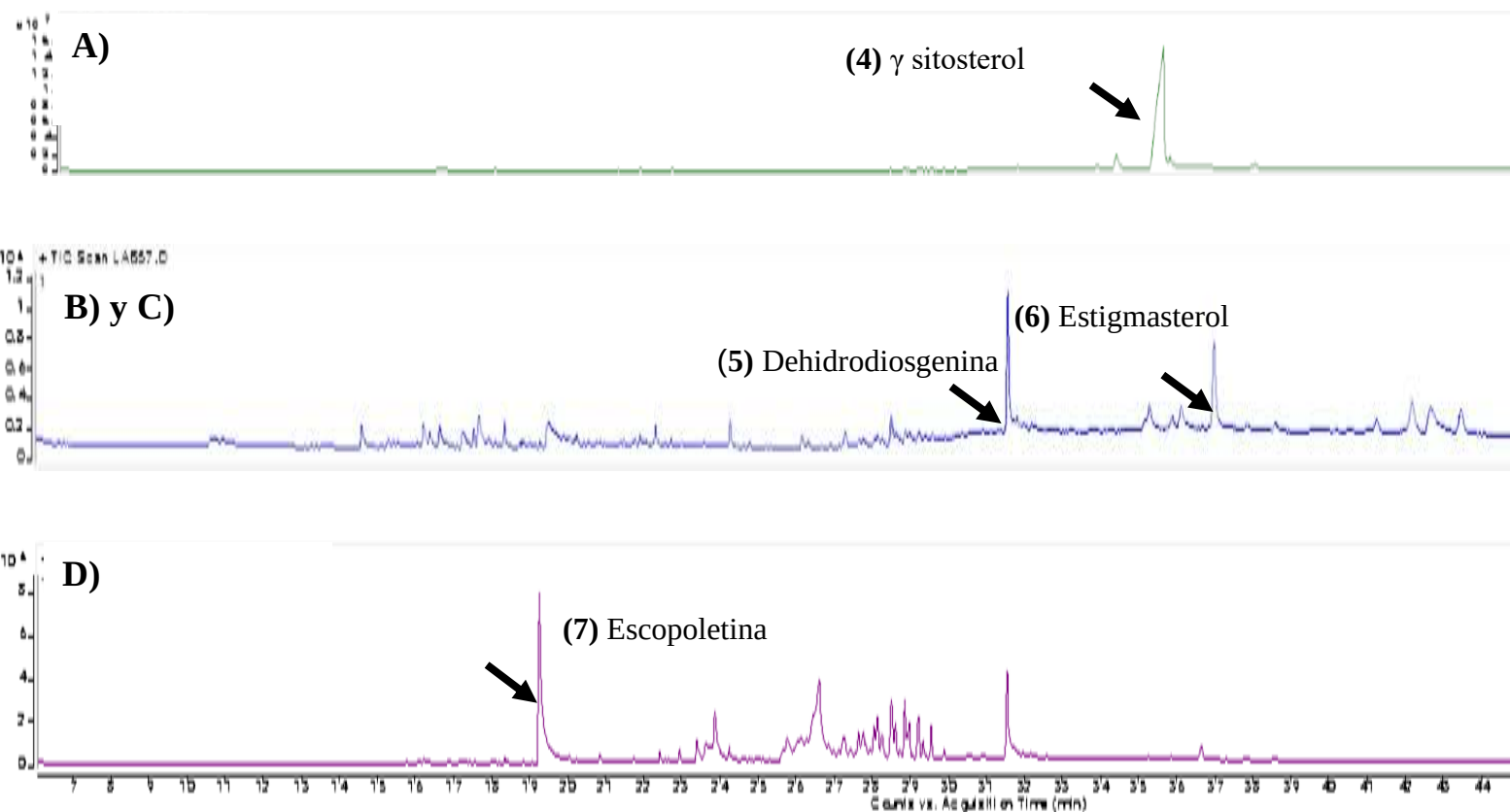
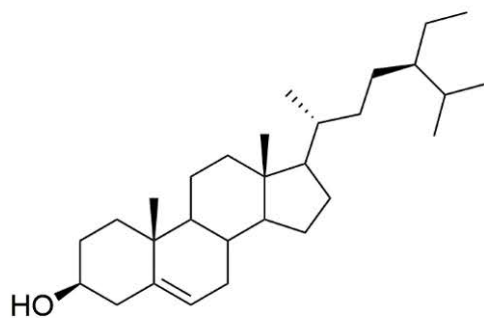
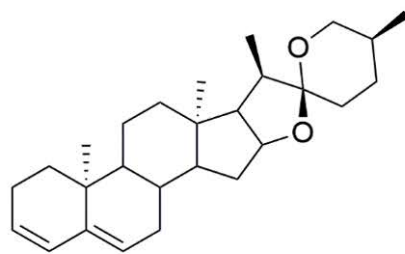


Figura 23. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) para la identificación de los compuestos mayoritarios obtenidos a partir del extracto de CH_2Cl_2 del cultivo *in vitro* de *Bursera fagaroides*.

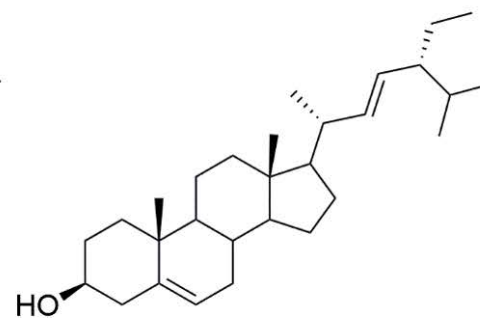
1126



(4) γ -sitosterol



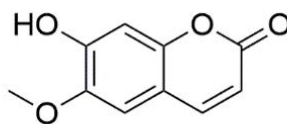
(5) dehidrodiosgenina



(6) estigmasterol

1127

1128



(7) escopoletina

1129

1130 **Figura 24.** Estructuras químicas de los compuestos identificados por GC-MS y aislados por CC a partir del cultivo de callos de *B. fagaroides*.

1131

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

Establecimiento y caracterización de cultivos de células en suspensión a
partir de callos friables de *B. fagaroides*.

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

7.5 Establecimiento de los cultivos en suspensión

El cultivo de células en suspensión se estableció empleando cinco tratamientos como se describe en la sección 6.5. El cultivo celular empleando medio MS y con la combinación de 4 mgL⁻¹ de 2,4-D y 2 mgL⁻¹ de Cinetina favoreció el establecimiento de los cultivos en suspensión lo que permitió realizar su caracterización como se describe a continuación.

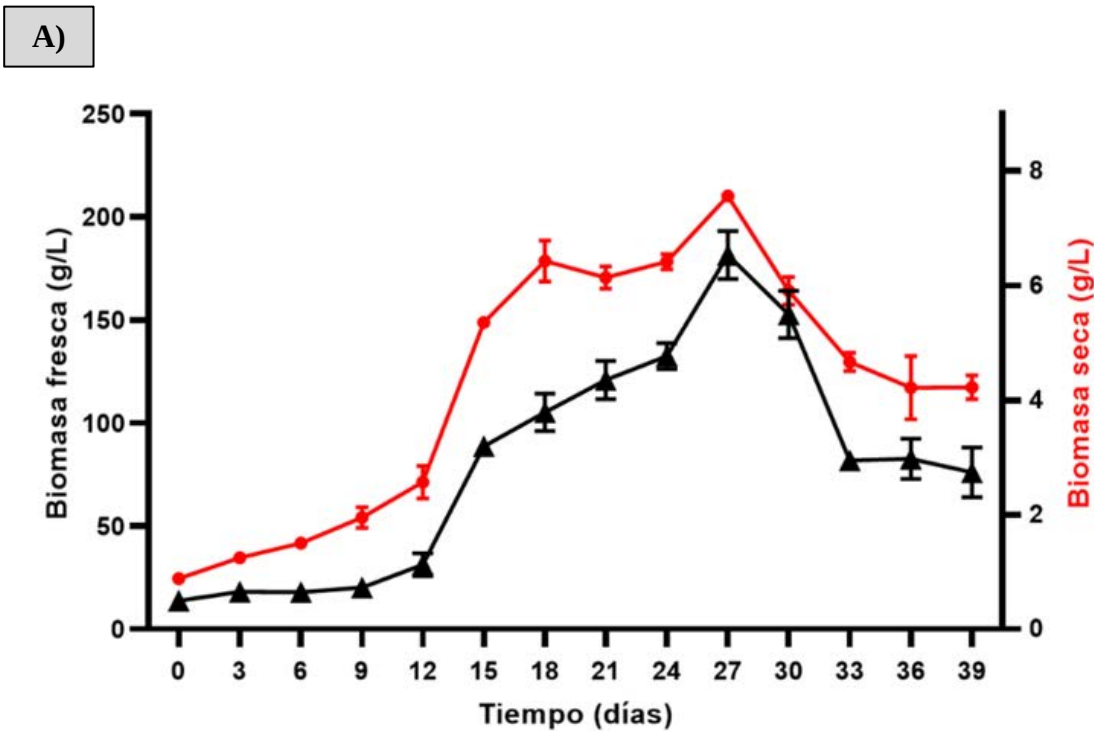
7.5.1 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros cinéticos del cultivo de células en suspensión

La descripción y caracterización del cultivo de células en suspensión de *B. fagaroides* se realizó primero obteniendo las biomásas frescas y secas en g/L⁻¹ como se aprecia en la figura 25. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de viabilidad celular empleando el método de DAF como se describió previamente en el cultivo de callos, así mismo, se monitoreó el pH, así como el consumo de azúcares totales.

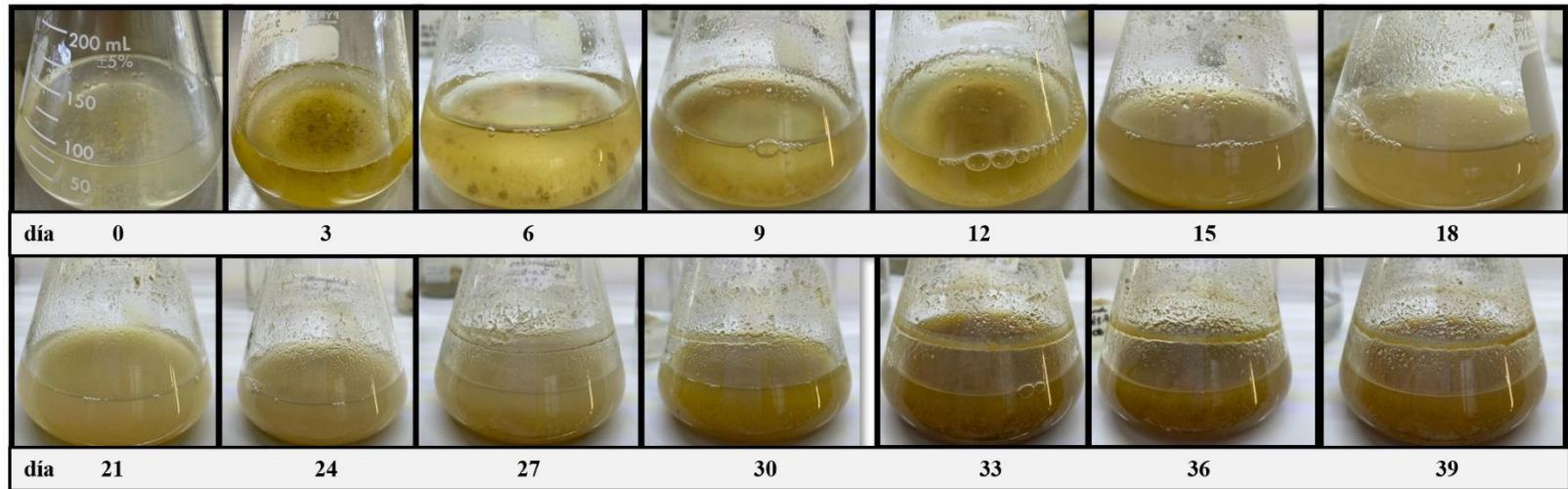
La figura 25 muestra la comparación entre biomasa fresca y seca de los días de cultivo 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 y 39 (figura 25A). También se presenta el aspecto de los cultivos en cada uno de los días en que se realizaron los diferentes ensayos antes mencionados (figura 25B) y finalmente se aprecia la morfología de las células en suspensión en cada una de las diferentes fases del cultivo (figura 25C).

Primeramente, con respecto al gráfico mostrado en la figura 25A se observa la fase de adaptación que comprendió los días 0 al 9, donde se observó principalmente una morfología circular y una apariencia del cultivo amarillo claro, la fase exponencial de los días 12 a 18 alcanzando una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0.153 \text{ días}^{-1}$, un tiempo de duplicación celular t_d de 4.51 días con un $R^2 = 0.99$, y mostrando un índice de crecimiento

mayor (1.09) en el día 15. Durante dicha fase se presentó tanto una morfología circular como alargada y el cultivo se tornó amarillo más oscuro y con más densidad celular, este resultado es similar a lo reportado por Pavón-Reyes y colaboradores en 2016 en la especie *Bursera lináloe*, cuyo cultivo de células en suspensión en matraces generó una $\mu=0.14$ días⁻¹ y un td de 4.9 días. La fase estacionaria comprendió los días 18 a 27, durante esa fase se formaron agregados celulares y predominó la morfología alargada de la circular, con respecto el aspecto del cultivo, este se observó de color café claro. Finalmente, la fase de muerte inició a partir del día 27 al 39, como se aprecia en la figura 25B en los días 33-39.



B)



C)



Figura 25. Cultivo en suspensión de *B. fagaroides*. A) cinética de crecimiento celular y B) apariencia del cultivo y C) morfología celular.

7.5.2 Cuantificación del consumo de azúcares en el medio de cultivo de *B. fagaroides*

Para la cuantificación del consumo de azúcares se realizaron curvas de calibración de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa para determinar el consumo de carbohidratos presentes en el medio de cultivo de las células en suspensión. Para cada uno de los tres azúcares se realizó una curva empleando siete concentraciones diferentes, las cuales fueron: 30, 15, 7.5, 3.75, 1.87, 0.94 y 0.47 mg/mL. La cuantificación se realizó por CLAR, en el equipo Waters 7117 plus Autosampler con un flujo de operación de 1 mL/min a 25°C. Como fase estacionaria se utilizó una columna amino UG80, tamaño 5 µm (4.6 mm x 150 mm), como fase móvil H₂O:CH₃CN, en una proporción 80:20 respectivamente. Los datos obtenidos se reportaron como gramos de sustrato por litro de medio S (g/L⁻¹). Como se observa en la figura 26, las tres gráficas presentaron un valor de R² muy cercano a 1 (sacarosa: 0.9969; glucosa: 0.9999; y fructosa: 0.9937) en relación con la concentración y área bajo la curva.

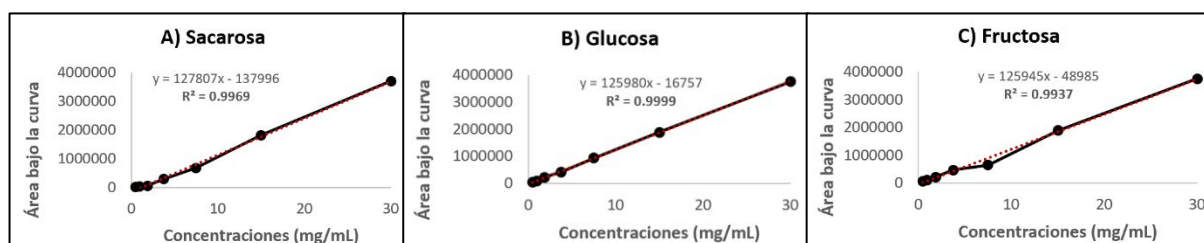


Figura 26. Curvas de calibración de los azúcares: A) sacarosa, B) glucosa y C) fructosa

Una vez realizada la curva de calibración de los azúcares antes mencionados se realizó la cuantificación del consumo de azúcares del medio de cultivo de cada uno de los puntos de la cinética de crecimiento. La figura 27 muestra la comparación entre la biomasa seca (línea negra) contra el patrón de consumo de cada uno de los carbohidratos (líneas naranja, verde y azul). Al medio de cultivo se le adicionó una concentración de 30 g/L⁻¹ de sacarosa, sin

embargo, debido a que dicho carbohidrato tiene una naturaleza lábil al calor, se puede descomponer ligeramente en D-glucosa y D-fructosa después del proceso de esterilización (Wang, J. *et al.*, 2007), eso se observó en el día 0. La sacarosa se hidrolizó casi completamente en el día 9 que se correlacionó con un incremento en la concentración de los monosacáridos glucosa (27 g/L⁻¹) y fructosa (26 g/L⁻¹), posterior al consumo de sacarosa, las células usaron glucosa como segunda fuente de carbono la cual se agotó en el día 21 (0.1g/L⁻¹) e iniciando la fase estacionaria, seguido de eso, la última fuente de carbono en ser consumida fue la fructosa (línea azul) esto generó que el cultivo tuviera un ligero incremento en la generación de biomasa, no obstante, en el día 27 que fue cuando se agotó completamente la fuente de carbono las células entraron a la fase de muerte.

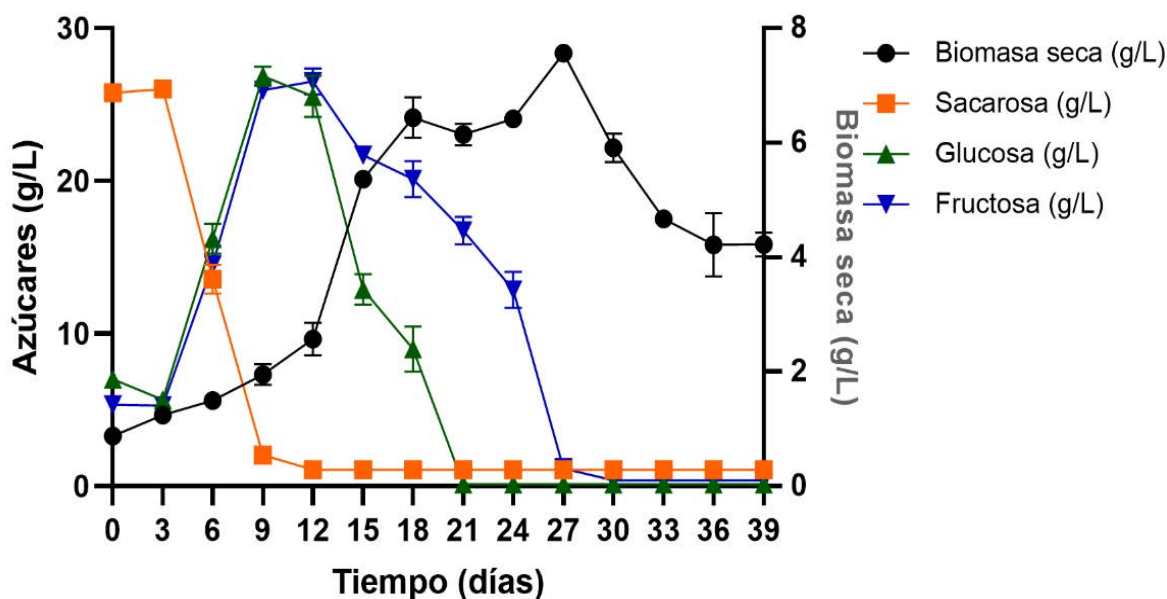


Figura 27. Consumo de azúcares contra biomasa seca de los cultivos en suspensión de *B. fagaroides*.

7.5.3 Viabilidad celular y pH durante el crecimiento del cultivo de células en suspensión de *B. fagaroides*

Con el método de diacetato de fluoresceína se logró observar la viabilidad celular debido a la actividad enzimática de la esterasa en las diferentes fases (figura 28). El porcentaje de viabilidad celular al inicio del cultivo fue del 88 % con una morfología circular, posteriormente en los días 3 y 6 (fase de adaptación) los valores disminuyeron a un 75 %, así mismo, en los días 15 al 27 los valores oscilaron entre el 90-93 % (fases exponencial y estacionaria). Finalmente, después del día 27 dicho parámetro disminuyó hasta un 31 %, que es cuando al cultivo se le agotan las fuentes de carbono y por lo tanto entran a la fase de muerte. Otro parámetro que se midió fue el pH durante el cultivo (figura 25 línea azul).

El pH es la medida de la concentración de iones hidronio $[H^+]$ en el cultivo *in vitro* vegetal, que usualmente se ajusta entre 5 y 6 (McDonald & Jackman, 1989). Se utilizó medio líquido MS, el pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizarlo. Se puede observar que en el día 0 el pH fue de 4.9, en el día 3 aumentó ligeramente a 5.4, seguido de una nueva disminución a 4.9 en el día 6, fue a partir del día 6 que dicho parámetro fue aumentando a través de las fases exponencial y estacionaria con valores de entre 4.9 a 7.1 en día 30 (que es cuando el cultivo entra a la fase de muerte celular), pasados los 30 días el pH tuvo una ligera disminución de 6.8 en el día 39. La concentración de iones de hidrógeno (pH) en el medio cambia durante el desarrollo del cultivo, ya que los tejidos vegetales tienden a acidificar ligeramente el medio de cultivo en las primeras horas, debido a la asimilación del amoníaco que provoca que baje el pH; posteriormente, cuando los nitratos son consumidos, el pH incrementa durante la absorción de nitrato (Caspeta L., 2004).

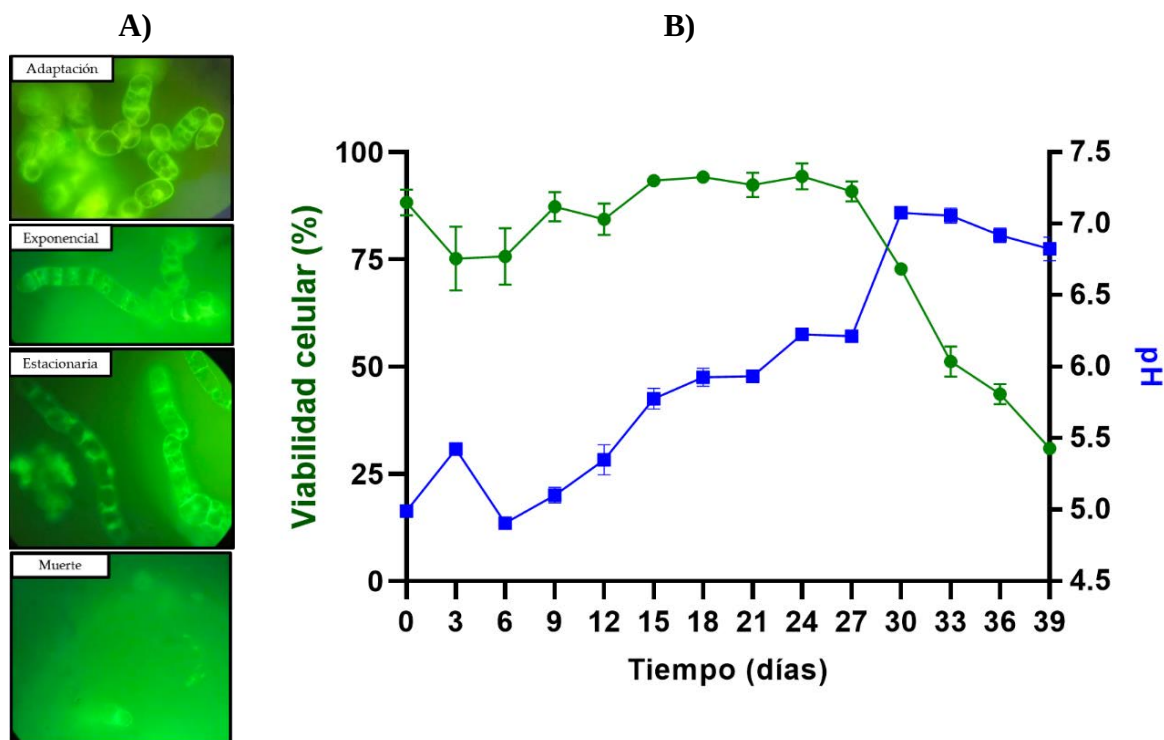


Figura 28. Viabilidad celular contra pH del cultivo de células en suspensión de *Bursera fagaroides*.

A) Células teñidas con DAF a 4X, B) Gráfico viabilidad celular contra biomasa de peso seco.

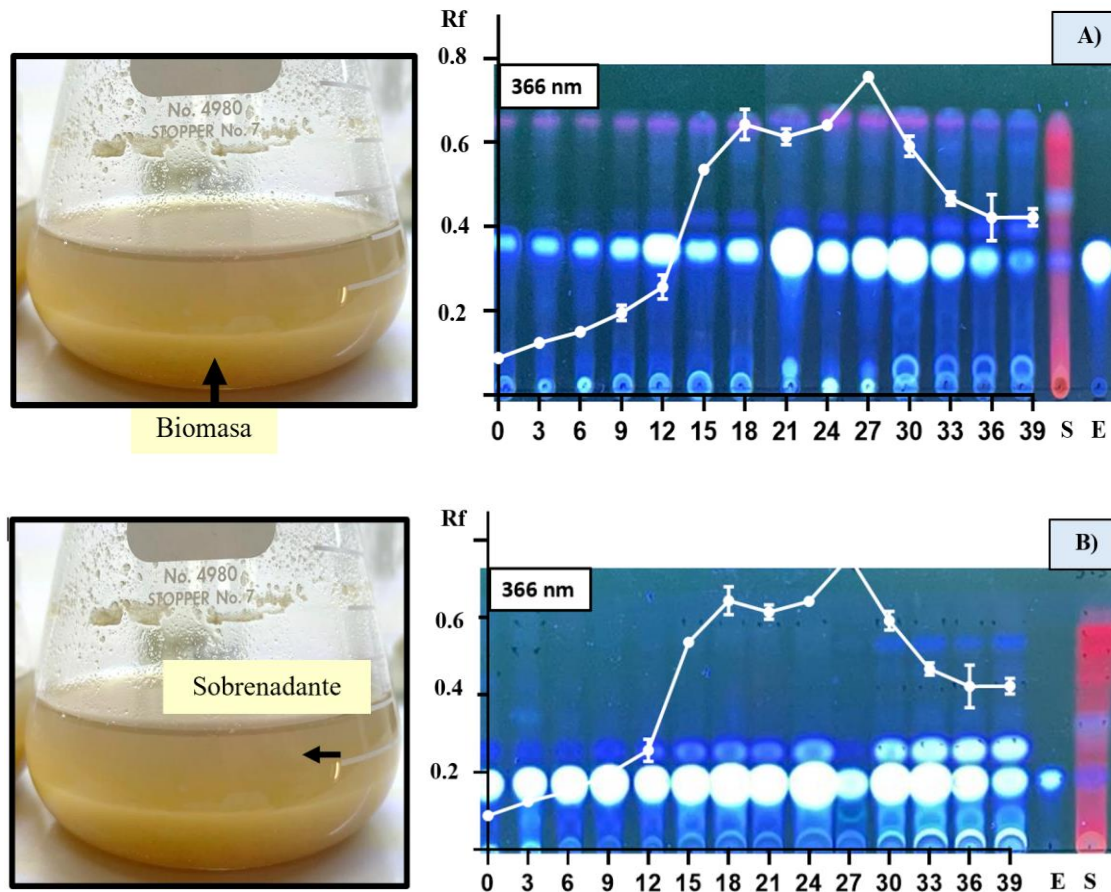
7.6 Análisis del perfil químico de la biomasa y sobrenadante en la cinética de los cultivos en suspensión de *B. fagaroides*

En cuanto a la producción de los compuestos presentes en la biomasa celular (figura 29-A), se observa de manera cualitativa por CCF que el compuesto con $R_f=0.4$ correspondiente a escopoletina se encuentra presente durante todo el cultivo teniendo una concentración mayor en los días 12 (cuando el cultivo descompone completamente la sacarosa en glucosa y fructosa y se encuentra en la fase exponencial), teniendo una concentración máxima al día 21 (cuando se agota la glucosa y las células se encuentran en la fase estacionaria y

1275 disminuyendo ligeramente en los días 24 a 33, disminuyendo considerablemente a partir del
1276 día 36 al 39.

1277 Con respecto a la síntesis de los metabolitos presentes en el medio se puede apreciar en las
1278 cromatoplasmas tanto a 254 como a 366 nm (figura 29-B) que la escopoletina con $R_f = 0.3$ se
1279 sintetiza de manera constitutiva durante las fases exponencial y estacionaria (3 al 30),
1280 disminuyendo notablemente en la fase de muerte.

1281 Los resultados anteriores sugieren que la escopoletina es excretado en mayor cantidad al
1282 medio de cultivo en el sobrenadante respecto a la biomasa; sin embargo, se encuentra
1283 presente prácticamente en todo el cultivo, por lo tanto, es importante cuantificar por CLAR
1284 la concentración de dicho metabolito.



1285

1286

1287 **Figura 29.** CCF del Análisis cualitativo de extractos de cultivos en suspensión de *B. fagaroides* en diferentes días de cultivo con CH₂Cl₂. Fase normal
 1288 5:5 hexano:AcOEt en luz UV 366 a una concentración de 4mg/mL. A) biomasa y B) medio de cultivo. S=extracto CH₂Cl₂ de las hojas de la planta
 1289 silvestre, E= escopoletina y Rf= factor de retención.

Posterior al análisis cualitativo por CCF mostrado anteriormente, se realizó un estudio general por CLAR a 260 nm (con el método descrito previamente) de la producción de escopoletina tanto en la biomasa como en el medio de cultivo en diferentes días. En la figura 30-A se observa la presencia de un pico con un tiempo de retención de 10.2 min relacionado a escopoletina presente en el día 15 de la biomasa con una concentración baja respecto al sobrenadante donde se aprecia notablemente un incremento en su expresión en el mismo día (figura 30-B), no obstante, el metabolito disminuye en el día 21 y sintetiza otro grupo de compuestos con tiempos de retención: 11.7, 12.2 y 14.4 (figura 30-C) que por los espectros de UV se sugiere que sean de la familia de las cumarinas. Por lo tanto, es importante cuantificar por CLAR la presencia de dicha molécula en toda la cinética tanto de la biomasa como del medio de cultivo para conocer los picos máximos de producción, así como conocer qué otros compuestos son los mayoritarios.

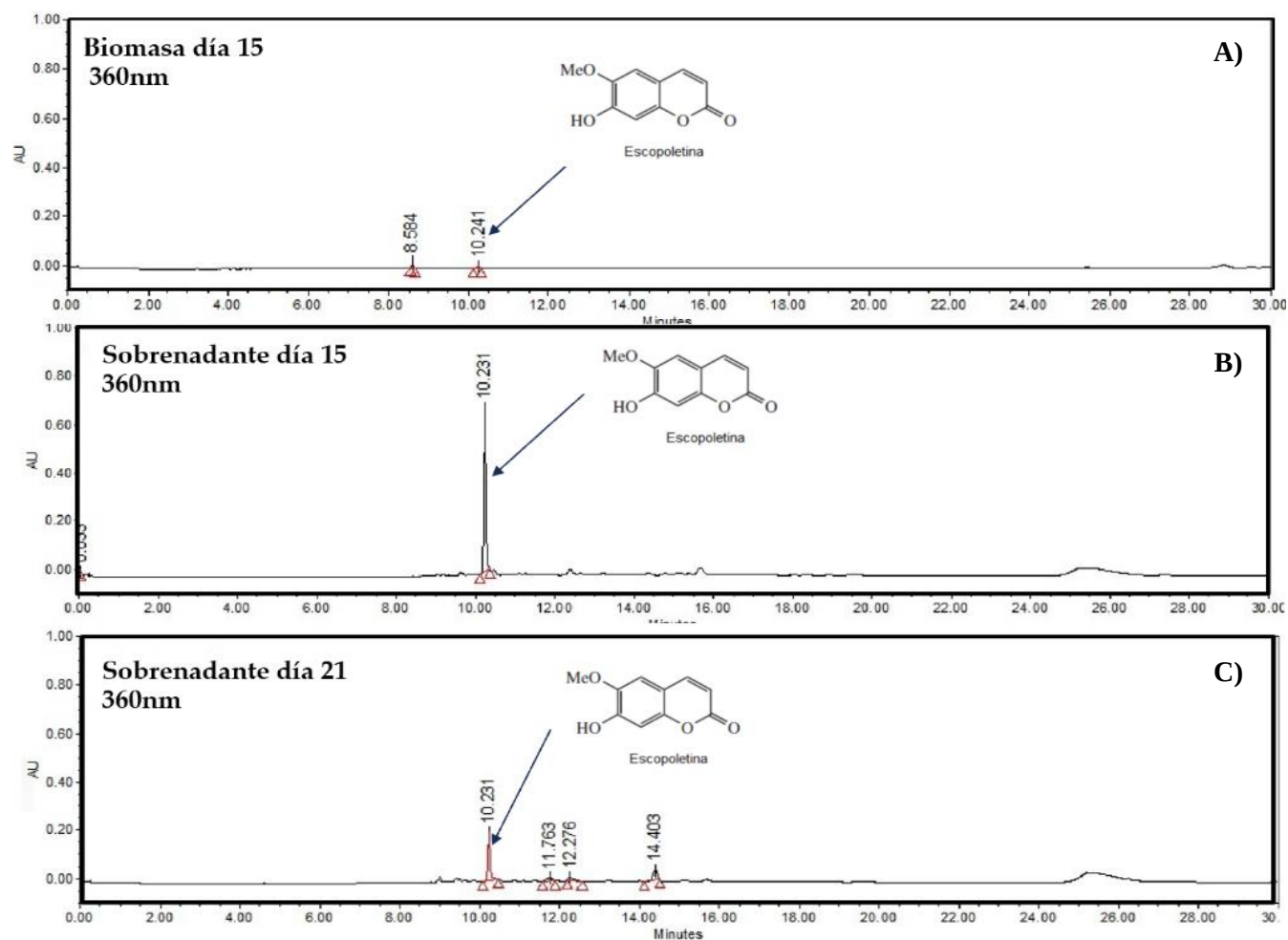


Figura 30. Perfil cromatográfico del extracto con CH_2Cl_2 del cultivo de células en suspensión de *B. fagaroides*. A) Biomasa del día 15, B) medio de cultivo del día 15 y C) medio de cultivo del día 22. 335 nm.

1320

1321

1322

1323

1324

1325

1326

Comparación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta silvestre, cultivos de callos y células en suspensión de *B. fagaroides*.

1327

1328

1329

1330

1331

1332

1333

7.7 Producción de escopoletina del extracto del cultivo de callos respecto al extracto de las hojas de la planta silvestre

Se comparó la producción de escopoletina del extracto del cultivo de callos con la del extracto de las hojas de la planta silvestre, y se observó que la acumulación de escopoletina en la planta silvestre es baja en comparación con el cultivo de callos (Figura 31).

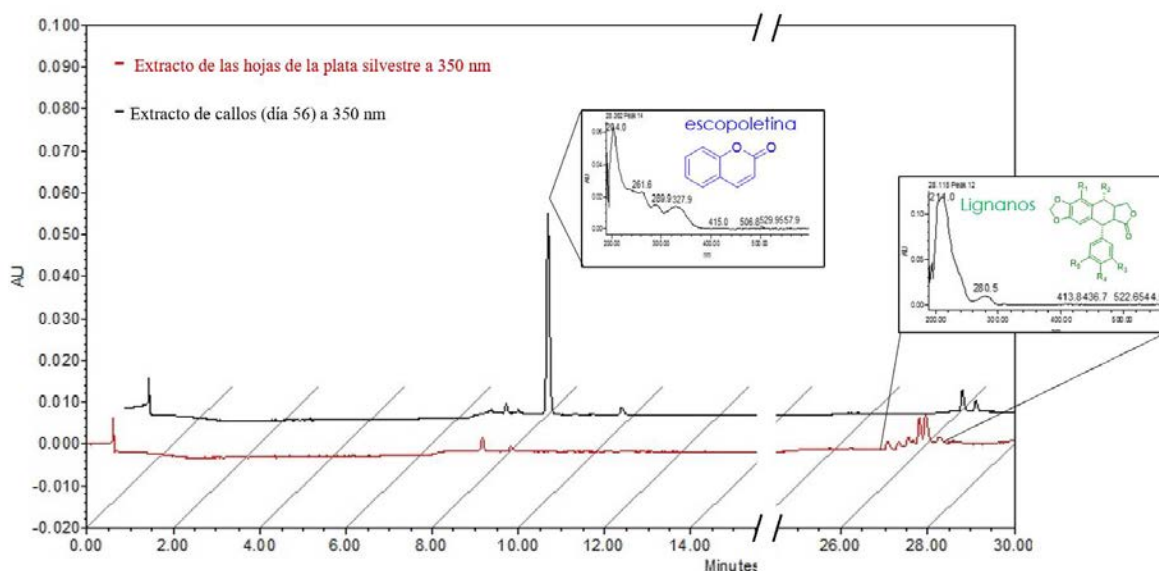


Figura 31. Producción de escopoletina en el extracto de calo y la hoja de la planta silvestre de *B. fagaroides*.

7.7.1 Producción de escopoletina del extracto del cultivo de callos respecto al extracto de las hojas de la planta silvestre

Cabe señalar que en el estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de las hojas se demostró la presencia principalmente de lignanos y triterpenos (Figura 32). Estos resultados concuerdan con nuestros estudios previos sobre la corteza de *B. fagaroides*, donde se describe

1350 el aislamiento de varios lignanos de tipo ariltetralin con potente actividad citotóxica contra
1351 las células de cáncer de próstata (PC3) en comparación con otras células cancerosas humanas
1352 (Antúnez-Mojica et al., 2021). Cabe señalar que, los lignanos obtenidos en este trabajo
1353 (yateina, 7'8'-dehidropodofilotoxina y acetil podofilotoxina) se obtuvieron previamente de la
1354 corteza.

1355 Así mismo, es evidente la diferencia entre los perfiles químicos de las hojas de las plantas
1356 silvestres y la biomasa de los callos, ya que las hojas biosintetizan lignanos y triterpenos
1357 pentacíclicos, mientras que los callos producen principalmente escopoletina cumarina, junto
1358 con fitoesteroles. La diferencia en el perfil metabólico de la biomasa de callos en
1359 comparación con las hojas de plantas silvestres puede deberse a la edad de la planta y/o a la
1360 composición nutricional del medio B5, que contiene todos los micronutrientes y
1361 macronutrientes, vitaminas, suplementos orgánicos y reguladores del crecimiento vegetal
1362 necesarios para el crecimiento y la proliferación de las células vegetales *in vitro*. Es
1363 importante subrayar las ventajas de utilizar estudios biotecnológicos que, cuando se aplican
1364 correctamente, pueden conducir a una producción constante de biomoléculas, en contraste
1365 con el material vegetal silvestre, que está sujeto a factores climáticos, de crecimiento, bióticos
1366 y abióticos, y otras condiciones del ecosistema.

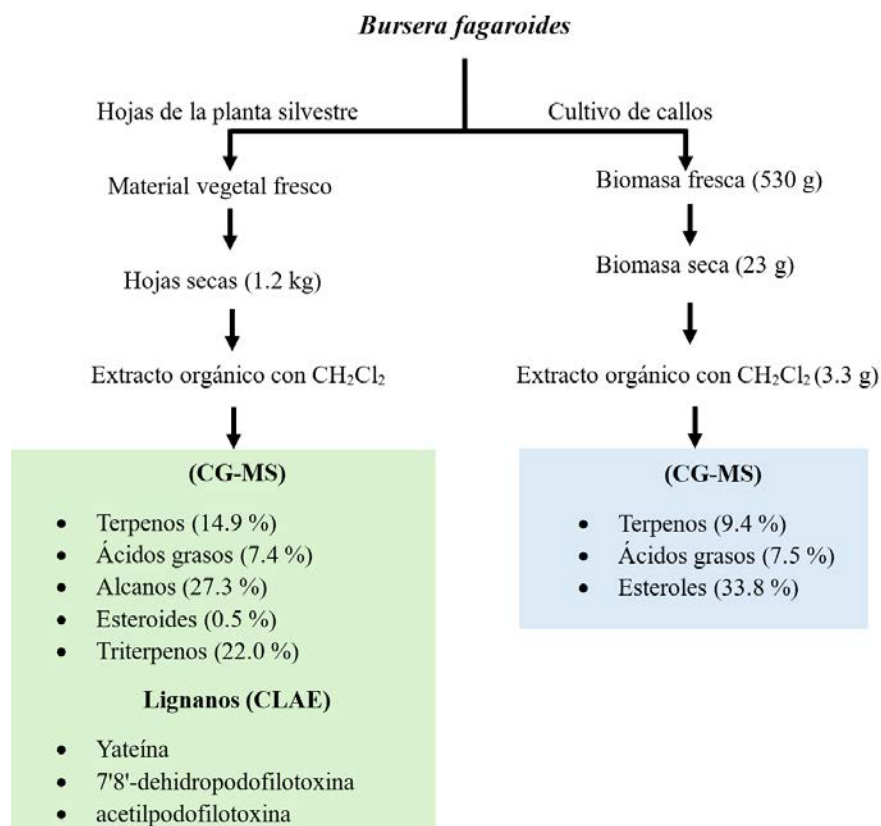


Figura 32. Proceso de extracción de compuestos en hojas y cultivo de callos de *B. fagaroides*.

7.7.2 Comparación de los parámetros cinéticos del cultivo de callos y cultivos en suspensión de *B. fagaroides*

Al comparar los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación celular) en los cultivos de callos y células en suspensión mostrados en la tabla 9 se puede observar que el cultivo de callos tiene un crecimiento más lento, al mostrar un tiempo de duplicación mayor (11.76 días) respecto al cultivo en suspensión (4.51 días). Esto puede ser debido principalmente a limitaciones físicas en la absorción de nutrientes y oxigenación, características del medio sólido, a la naturaleza heterogénea del callo.

Los callos crecen en un medio sólido (gelificante como agar), lo que limita la difusión de nutrientes y oxígeno a las células internas de la masa de callo. Las células exteriores consumen la mayoría de los nutrientes, dejando a las interiores con recursos limitados, lo que restringe el crecimiento. Así mismo, los cultivos en suspensión están en un medio líquido que suele agitarse, esto mantiene a las células individuales o pequeños grupos celulares en contacto constante con el medio nutritivo y el oxígeno, acelerando la división celular, de igual manera es importante mencionar que los callos suelen ser masas de células organizadas de forma heterogénea y más compactas. En cambio, los cultivos en suspensión son más desorganizados (friables), lo que permite que una mayor parte de la población celular se divide activamente. (L. Szabados, capítulo 8), (W. Röper, 2012).

Tabla 9. Comparación de parámetros cinéticos en cultivos de callos y suspensiones celulares de *B. fagaroides*.

Tipo de Cultivo	μ	td
Callos	0.059 días ⁻¹	11.76 días
Suspensiones	0.153 días ⁻¹	4.51 días

td = tiempo de duplicación celular

Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y compuestos puros de
hojas de la planta silvestre y cultivos de callos de *B. fagaroides*.

7.8 Evaluación de la actividad citotóxica

Los resultados de la evaluación citotóxica de los extractos de CH_2Cl_2 del cultivo de callos y de la planta silvestre se muestran en la Tabla 10. En general, se observó que el extracto de la planta de tipo silvestre tuvo una importante citotoxicidad contra HepG2 ($\text{IC}_{50} = 20.3 \pm 3.38$), HeLa ($\text{IC}_{50} = 18.6 \pm 5.2$) y PC3 ($\text{IC}_{50} = 12.6 \pm 4.6$), siendo esta última la más sensible. Por otro lado, este extracto no mostró actividad contra H1299 ($\text{IC}_{50} = 69.1 \pm 6.2$) y, en comparación con su efecto contra la línea celular no cancerosa HFF-1 ($\text{IC}_{50} = 79.6 \pm 5.2$), se observó selectividad para las líneas celulares cancerosas. Las líneas con el extracto de cultivo de callos tuvieron un efecto insignificante contra todas las líneas celulares analizadas: HepG2 ($\text{IC}_{50} = 155.4 \pm 4.95$), HeLa ($\text{IC}_{50} = 72 \pm 5$), PC3 ($\text{IC}_{50} = 141 \pm 5.8$), H1299 ($\text{IC}_{50} = 210.4 \pm 5$) y HFF-1 ($\text{IC}_{50} = 95.4 \pm 6.2$). La línea celular HeLa fue la más sensible ($\text{IC}_{50} = 72 \pm 5$).

La planta silvestre mostró la mayor actividad contra la línea celular PC3 ($\text{IC}_{50} = 12.6 \pm 4.6$), mientras que el extracto de biomasa de callo fue más tóxico contra la línea celular HeLa ($\text{IC}_{50} = 72 \pm 5$). Esta diferencia podría deberse a la presencia de los lignanos citotóxicos yateina (1), 7',8'-dehidropodofilotoxina (2) y acetil podofilotoxina (3) en las hojas, que mostró valores IC_{50} de 2.42×10^{-5} y $0.0109 \mu\text{M}$ cuando se probó contra células PC-3 (Antúñez-Mojica et al., 2021). Sin embargo, la biomasa del callo no produce lignanos, sino que sintetiza la escopoletina cumarínica, que se ha descrito como poseedora de actividad citotóxica contra la línea celular HeLa de cáncer cervical humano ($\text{IC}_{50} = 7.5$ a $25 \mu\text{M}$) (Qi Tian, 2019).

Tabla 10. Valores IC₅₀ (µgmL⁻¹) de extractos de CH₂Cl₂ de plantas silvestres y cultivos de callos de *B. fagaroides*.

Tipo de extracto	HepG2	HeLa	PC3	H1299	HFF-1
Hojas ^b	20.3±3.38****	18.6±5.2***	12.6±4.6****	69.1±6.2****	79.6±5.2*
Callo ^b	155.4±4.95****	72±5***	141±5.8****	210.4±5****	95.4±6.2*
Paclitaxel ^a	10.12±2.5	40.23 ±7.2	17.5 ±2.8	45.25 ±7	989 ±21

^a Los valores de paclitaxel están en nM. ^b Los extractos de hojas y callos están en µgmL⁻¹. Los valores se expresan como la media ± SD de tres experimentos independientes. El análisis de la prueba t de Student mostró que todos los valores de IC₅₀ entre las hojas y el callo eran estadísticamente significativos con los siguientes valores p: * p = 0.0276; *** p = 0.0002; **** p < 0.0001.

8. CONCLUSIONES

1439

1440 1. Se establecieron por primera vez las condiciones para obtener un cultivo *in vitro* de
1441 callos friables de *B. fagaroides* utilizando una combinación de RCV 2,4-
1442 D:ANA:zeatina 4:1:1 mgL⁻¹. Identificando cuatro fases de crecimiento celular con un
1443 punto de máximo crecimiento celular en el día 28 con un $\mu = 0.059$ días⁻¹ y $t_d = 11.8$
1444 días.

1445

1446 2. Se establecieron por primera vez cultivos de células en suspensión de *Bursera*
1447 *fagaroides* con un punto de máximo crecimiento celular en el día 15 con un $\mu = 0.15$
1448 días⁻¹ y $t_d = 4.51$ días.

1449

1450 3. Los cultivos *in vitro* sintetizan escopoletina (tanto de manera intracelular como
1451 extracelular), así como γ -sitosterol, dehidrodiosgenina y estigmasterol.

1452

1453 4. Mediante cromatografía en columna abierta se pudieron separar e identificar tres
1454 compuestos presentes en las hojas de la planta silvestre: yateina, acetil podofilotoxina
1455 y 7'8'-dehidropodofilotoxina. Los dos últimos presentes en la corteza mientras que
1456 yateina es la primera vez que se describe en hojas. Así como friedelina, lupeol y alfa
1457 tocospiro A.

1458

1459 5. Se probó la actividad citotóxica de cuatro líneas celulares siendo la más sensible PC3
1460 (IC₅₀ de 12.6±4.6) en el extracto de la planta silvestre y HeLa (IC₅₀ de 72±5) en el
1461 extracto de cultivo de callos.

9. PERSPECTIVAS

- 1462
- 1463 **1.** Analizar y cuantificar la concentración de escopoletina así como de los compuestos
- 1464 mayoritarios presentes en los diferentes días de los cultivos en suspensión de *B.*
- 1465 *fagaroides* mediante CLAR.
- 1466
- 1467 **2.** Realizar la evaluación citotóxica de los extractos de los cultivos en suspensión de *B.*
- 1468 *fagaroides* empleando las mismas líneas celulares empleadas para callos y las hojas
- 1469 de la planta silvestre.
- 1470
- 1471 **3.** Escalar y caracterizar el cultivo en biorreactor para potenciar la producción de
- 1472 escopoletina.
- 1473
- 1474
- 1475
- 1476
- 1477
- 1478
- 1479
- 1480
- 1481
- 1482
- 1483
- 1484
- 1485

10. LITERATURA CITADA

1486 **Aguilar**, L., . O., . M., & . J. (2012). Efecto de *Bursera grandiflora* sobre el peso corporal y
1487 lipemia en ratones obesos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y*
1488 *Aromáticas*, 11, 138–146.

1489 **Antúñez-Mojica**, M., Rojas-Sepúlveda, A., Mendieta-Serrano, M., Gonzalez-Maya, L.,
1490 Marquina, S., Salas-Vidal, E., & Alvarez, L. (2018). Lignans from *Bursera fagaroides* Affect
1491 In Vivo Cell Behavior by Disturbing the Tubulin Cytoskeleton in Zebrafish Embryos.
1492 *Molecules*, 24(1), 8. <https://doi.org/10.3390/molecules24010008>

1493 **Antúñez-Mojica**, M., Romero-Estrada, A., Hurtado-Díaz, I., Miranda-Molina, A., &
1494 Alvarez, L. (2021). Lignans from *Bursera fagaroides*: Chemistry, Pharmacological Effects
1495 and Molecular Mechanism. A Current Review. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(7), 11.
1496 <https://doi.org/10.3390/life11070685>

1497 **Ara**, K., Rahman, M. S., Rahman, A., Hasan, C. M., & Rashid, M. A. (2009). Terpenoids
1498 and Coumarin from *Bursera serrata* Wall. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical*
1499 *Sciences*, 8(2), 107–110.

1500 **Bianchi**, E., Caldwell, M. E., & Cole, J. R. (1968). Antitumor Agents from *Bursera*
1501 *microphylla* (Burseraceae) I. Isolation and Characterization of Deoxypodophyllotoxin.
1502 *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(4), 696–697.
1503 <https://doi.org/10.1002/jps.2600570436>

1504 **Bianchi**, E., Sheth, K., & Cole, J. R. (1969). Antitumor agents from *bursera fagaroides*
1505 (burseraceae): (β -peltatin-a-methylether and 5'-desmethoxy- β -peltatin-a-methylether).
1506 *Tetrahedron Letters*, 10(32), 2759–2762. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)88262-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)88262-9)

1507 **Bonfil**, C., Hernández, P., & Nieto, J. (2007). Enraizamiento y formación de callos en estacas
 1508 de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia*, ISSN 1405-3195, Vol. 41, N°. 1, 2007,
 1509 pags. 103-109, 41.

1510 **Bourgaud**, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., & Matern, U.
 1511 (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for
 1512 cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2–3), 293–308.
 1513 <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>

1514 **Braybrook**, S., & Harada, J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant*
 1515 *Science*, 13(12), 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.09.008>

1516 **García-Aguilar**, J. Á., Luna-Cedeño, J. J., Rodríguez-Ortiz, G., & Leyva-López, J. C.
 1517 (2021). Acumulación de biomasa en estacas de cuatro especies de *Bursera* en Oaxaca.
 1518 *CIENCIA ergo-sum*, 28(2). <https://doi.org/10.30878/ces.v28n2a9>

1519 **Franklin**, C. I., Dixon, R. A. (1994). Initiation and maintenance of callus and cell suspension
 1520 cultures. In: Dixon: R. A., Gonzalez, R. A. (Eds.). *Plant Cell Culture-A practical Approach*.
 1521 2nd edition

1522 **Habibullah**, M., Al-Mansur, M., Mahboob, M., Siddiqi, A., Chowdhury, A. M. S., Sohrab,
 1523 M., & Hasan, C. (2010). *Scopoletin Isolated from Stem Bark of Bursera serrata Wall. With*
 1524 *Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Crude Extract*. 54.

1525 **He**, B.-T., Liu, Z.-H., Li, B.-Z., & Yuan, Y.-J. (2022). Advances in biosynthesis of
 1526 scopoletin. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 152. [https://doi.org/10.1186/s12934-022-01865-](https://doi.org/10.1186/s12934-022-01865-7)
 1527 7

1528 **Ikeuchi**, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and
 1529 Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>

1530 **Laimer**, M., & Rücker, W. (2003). *Plant tissue culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*.
 1531 Springer.

1532 **Marcotullio**, M. C., Curini, M., & Becerra, J. X. (2018). An Ethnopharmacological,
 1533 Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera* spp.
 1534 *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081976>

1535 **Matos**, M. J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O. A., Molina, E., & Yordi, E. G. (2015).
 1536 Coumarins—An Important Class of Phytochemicals. En A. V. Rao & L. G. Rao (Eds.),
 1537 *Phytochemicals—Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. InTech.
 1538 <https://doi.org/10.5772/59982>

1539 **Melnyk**, C. W. (2023). Quantitative regeneration: Skoog and Miller revisited. *Quantitative*
 1540 *Plant Biology*, 4, e10. <https://doi.org/10.1017/qpb.2023.9>

1541 **Modafar**, C. E., Clerivet, A., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1993). Inoculation of *Platanus*
 1542 *acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* F. Sp. *Platani* induces scopoletin and umbelliferone
 1543 accumulation. *Phytochemistry*, 34(5), 1271–1276. [https://doi.org/10.1016/0031-](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80014-R)
 1544 [9422\(91\)80014-R](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80014-R)

1545 **Mojica**, M. A., León, A., Rojas-Sepúlveda, A. M., Marquina, S., Mendieta-Serrano, M. A.,
 1546 Salas-Vidal, E., Villarreal, M. L., & Alvarez, L. (2016a). Aryldihydronaphthalene-type
 1547 lignans from *Bursera fagaroides* var. *Fagaroides* and their antimitotic mechanism of action.
 1548 *RSC Adv.*, 6(6), 4950–4959. <https://doi.org/10.1039/C5RA23516B>

1549 **Mojica**, M. A., León, A., Rojas-Sepúlveda, A. M., Marquina, S., Mendieta-Serrano, M. A.,
 1550 Salas-Vidal, E., Villarreal, M. L., & Alvarez, L. (2016b). Aryldihydronaphthalene-type
 1551 lignans from *Bursera fagaroides* var. *Fagaroides* and their antimitotic mechanism of action.
 1552 *RSC Advances*, 6(6), 4950–4959. <https://doi.org/10.1039/C5RA23516B>

1553 **Motolinía-Alcántara**, E. A., Castillo-Araiza, C. O., Rodríguez-Monroy, M., Román-
 1554 Guerrero, A., & Cruz-Sosa, F. (2021). Engineering Considerations to Produce Bioactive
 1555 Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. *Plants*, 10(12), 2762.
 1556 <https://doi.org/10.3390/plants10122762>

1557 **Murashige**, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays
 1558 with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
 1559 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

1560 **Narayani**, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: A stimulation of stress in in vitro plant
 1561 cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry*
 1562 *Reviews*, 16(6), 1227–1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>

1563 **Noge**, K., & Becerra, J. X. (2009). Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus
 1564 *Bursera* (Burseraceae). *Molecules*, 14(12), 5289–5297.
 1565 <https://doi.org/10.3390/molecules14125289>

1566 **Ramos-Ordoñez**, M. F., Del Coro Arizmendi, M., Flores-Enríquez, V., & Márquez-
 1567 Guzmán, J. (2016). Extracción y morfología del embrión de *Bursera bipinnata* (Burseraceae).
 1568 *Acta Botanica Mexicana*, 117, 27–35. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1165>

1569 **Rodríguez-Monroy**, M., Jiménez-Aparicio, A., Trejo-Tapia, G. y De Jesús-Sánchez, A.
 1570 (2000). Evaluación de un medio B5 modificado para el crecimiento en cultivos de células

1571 de *Beta vulgaris* en un biorreactor tipo tanque agitado. En: Memoria de Investigación 2001
1572 CEPROBI-IPN. México. 55-59.

1573 **Rojas-Sepúlveda**, A. M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M. Y. A., Salas-Vidal, E.,
1574 Marquina, S., Villarreal, M. L., Puebla, A. M., Delgado, J. I., & Alvarez, L. (2012). Cytotoxic
1575 podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *Fagaroides*.
1576 *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(8), 9506–9519.
1577 <https://doi.org/10.3390/molecules17089506>

1578 **Rzedowski**, J., Lemos, R. M., & de Rzedowski, G. C. (2005). Inventario del conocimiento
1579 taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas
1580 de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*, 70, 85–111.

1581 **Rzedowski**, J., Medina Lemus, R., & Calderón de Rzedowski, G. (2004). Las especies de
1582 *Bursera* (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México). *Acta botánica*
1583 *mexicana*, 66, 23–151.

1584 **Santos**, M. A., & Torné, J. M. (1986). A Comparative Analysis between Totipotency and
1585 Growth Environment Conditions of the Donor Plants in Tissue Culture of *Zea mays* L.
1586 *Journal of Plant Physiology*, 123(4), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0176-](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80090-6)
1587 [1617\(86\)80090-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80090-6)

1588 **Sathyanarayana**, B. N., & Varghese, D. B. (2007). *Plant Tissue Culture: Practices and New*
1589 *Experimental Protocols*. I.K. International Publishing House Pvt. Limited.
1590 <https://books.google.com.mx/books?id=4MdNDYBEwZAC>

1591 **Steward**, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). GROWTH AND ORGANIZED
1592 DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. II. Organization in Cultures Grown from Freely

1593 Suspended Cell. *American Journal of Botany*, 45(10), 705–708.
 1594 <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x>

1595 **Taguchi**, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., &
 1596 Okazaki, M. (2000). Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the
 1597 vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science: An*
 1598 *International Journal of Experimental Plant Biology*, 151(2), 153–161.
 1599 [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00212-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00212-5)

1600 **Velázquez-Jiménez**, R., Torres-Valencia, J. M., Cerda-García-Rojas, C. M., Hernández-
 1601 Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Manríquez-Torres, J. J., Gómez-Hurtado, M. A.,
 1602 Valdez-Calderón, A., Motilva, V., García-Mauriño, S., Talero, E., Avila, J., & Joseph-
 1603 **Nathan**, P. (2011). Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera*
 1604 *fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*, 72(17), 2237–2243.
 1605 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.07.017>

1606 **Venugopala**, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on Natural Coumarin Lead
 1607 Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International*, 2013, 1–
 1608 14. <https://doi.org/10.1155/2013/963248>

1609 **Acevedo**, M., González-Maya, L., Cardoso, T. A., & Villarreal, M. L. (2014). Cytotoxic and
 1610 Anti-inflammatory Activities of *Bursera* species from Mexico. *Journal of Clinical*
 1611 *Toxicology*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000232>

1612 **Aguilar**, L., . O., . M., & . J. (2012). Efecto de *Bursera grandiflora* sobre el peso corporal y
 1613 lipemia en ratones obesos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y*
 1614 *Aromáticas*, 11, 138–146.

1615 **Al-Abdallat**, A. M., Adayileh, B. K., Sawwan, J. S., Shibli, R., Al-Qudah, T. S., Abu-
 1616 Irmaileh, B., Alb daiwi, R. N., Almaliti, J., & Bustanji, Y. (2023). Secondary Metabolites
 1617 Profiling, Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Commiphora gileadensis L. Leaves,
 1618 Seeds, Callus, and Cell Suspension Extracts. *Metabolites*, 13(4), 537.
 1619 <https://doi.org/10.3390/metabo13040537>

1620 **Antúñez-Mojica**, M., Rojas-Sepúlveda, A., Mendieta-Serrano, M., Gonzalez-Maya, L.,
 1621 Marquina, S., Salas-Vidal, E., & Alvarez, L. (2018). Lignans from Bursera fagaroides Affect
 1622 In Vivo Cell Behavior by Disturbing the Tubulin Cytoskeleton in Zebrafish Embryos.
 1623 *Molecules*, 24(1), 8. <https://doi.org/10.3390/molecules24010008>

1624 **Antúñez-Mojica**, M., Romero-Estrada, A., Hurtado-Díaz, I., Miranda-Molina, A., &
 1625 Alvarez, L. (2021). Lignans from Bursera fagaroides: Chemistry, Pharmacological Effects
 1626 and Molecular Mechanism. A Current Review. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(7), 11.
 1627 <https://doi.org/10.3390/life11070685>

1628 **Ara**, K., Rahman, M. S., Rahman, A., Hasan, C. M., & Rashid, M. A. (2009). Terpenoids
 1629 and Coumarin from Bursera serrata Wall. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical*
 1630 *Sciences*, 8(2), 107–110.

1631 **Bagni**, N., & Fracassini, D. S. (1971). The effect of coumarin derivatives on organogenesis
 1632 and callus growth of Cichorium Intybus roots and Helianthus tuberosus tubers in vitro.
 1633 *Experientia*, 27(10), 1239–1241. <https://doi.org/10.1007/BF02286952>

1634 **Bonfil**, C., Hernández, P., & Nieto, J. (2007). Enraizamiento y formación de callos en estacas
 1635 de siete especies del género Bursera. *Agrociencia*, ISSN 1405-3195, Vol. 41, Nº. 1, 2007,
 1636 pags. 103-109, 41.

1637 **Bork**, P. M., Schmitz, M. L., Kuhnt, M., Escher, C., & Heinrich, M. (1997). Sesquiterpene
 1638 lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as
 1639 potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Letters*, 402(1), 85–90.
 1640 [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01502-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01502-5)

1641 **Carsono**, N., Juwendah, E., Liberty, L., Sari, S., Damayanti, F., & Rachmadi, M. (2021).
 1642 Optimize 2,4-D concentration and callus induction time enhance callus proliferation and
 1643 plant regeneration of three rice genotypes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*,
 1644 22(7). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220702>

1645 **Cisneros-Torres**, D., Cruz-Sosa, F., González-Cortazar, M., Martínez-Trujillo, A., &
 1646 Nicasio-Torres, P. (2019). Enhancing the production of scopoletin and quercetin 3-O- β -d-
 1647 glucoside from cell suspension cultures of *Tilia americana* var. Mexicana by modulating the
 1648 copper and nitrate concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(2),
 1649 305–316. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01683-7>

1650 **Cultid-Medina**, C. A., & Rico, Y. (2020). Los aliados emplumados de los Copales y
 1651 Cuajotes de México: Aves y la dispersión de semillas de *Bursera*. *Revista Digital*
 1652 *Universitaria*, 21(2). <https://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2020.v21n2.a5>

1653 **Fritig**, B., Hirth, L., & Ourisson, G. (1970a). Biosynthesis of the coumarins: Scopoletin
 1654 formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 9(9), 1963–1975.
 1655 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85348-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85348-0)

1656 **Fritig**, B., Hirth, L., & Ourisson, G. (1970b). Biosynthesis of the coumarins: Scopoletin
 1657 formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 9(9), 1963–1975.
 1658 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85348-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85348-0)

1659 **García-Aguilar**, J. Á., Luna-Cedeño, J. J., Rodríguez-Ortiz, G., & Leyva-López, J. C.
 1660 (2021). Acumulación de biomasa en estacas de cuatro especies de *Bursera* en Oaxaca.
 1661 *CIENCIA ergo-sum*, 28(2). <https://doi.org/10.30878/ces.v28n2a9>

1662 **Gnonlonfin**, G. J. B., Sanni, A., & Brimer, L. (2012). Review Scopoletin – A Coumarin
 1663 Phytoalexin with Medicinal Properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 47–56.
 1664 <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616039>

1665 **Habibullah**, M., Al-Mansur, M., Mahboob, M., Siddiqi, A., Chowdhury, A. M. S., Sohrab,
 1666 M., & Hasan, C. (2010). *Scopoletin Isolated from Stem Bark of Bursera serrata Wall. With*
 1667 *Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Crude Extract*. 54.

1668 **Ikeda**, R., Nagao, T., Okabe, H., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., & Mori, M. (1998).
 1669 Antiproliferative Constituents in Umbelliferae Plants. IV. Constituents in the Fruits of
 1670 *Anthriscus sylvestris* HOFFM. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46(5), 875–878.
 1671 <https://doi.org/10.1248/cpb.46.875>

1672 **Infante-Rodríguez**, D. A., Landa-Cansigno, C., Gutiérrez-Sánchez, A., Murrieta-León, D.
 1673 L., Reyes-López, C., Castillejos-Pérez, A. B., Pucheta-Fiscal, J. E., Velázquez-Narváez, A.
 1674 C., Monribot-Villanueva, J. L., & Guerrero-Analco, J. A. (2022). Análisis fitoquímico y
 1675 actividad antidiabética, antibacteriana y antifúngica de hojas de *Bursera simaruba*
 1676 (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*, (129). <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2109>

1677 **Jones**, K. H., & Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by
 1678 simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of*
 1679 *Histochemistry & Cytochemistry*, 33(1), 77–79. <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>

1680 **Kieran**, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. M. (1997). Plant cell suspension cultures:
 1681 Some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1–2), 39–52.
 1682 [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00163-6)

1683 **Malik**, S., Rashid, H., Yasmin, T., & MINHAS, N. (2003). Effect of 2,4-
 1684 dichlorophenoxyacetic Acid on Callus Induction from Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.)
 1685 Seeds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, 156.

1686 **Matos**, M. J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O. A., Molina, E., & Yordi, E. G. (2015).
 1687 Coumarins—An Important Class of Phytochemicals. En A. V. Rao & L. G. Rao (Eds.),
 1688 *Phytochemicals—Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. InTech.
 1689 <https://doi.org/10.5772/59982>

1690 **Mc-Caughey**, E. D., Ayala, A. G., García, B. G., & Buitimea, C. N. (2020). Germinación in
 1691 vitro e inducción de callo y raíz en *Bursera laxiflora* S. Watson. *Abanico Agroforestal*, 2(1).
 1692 <https://doi.org/10.37114/abaagrof/2020.4>

1693 **McDonald**, K. A., & Jackman, A. P. (1989). Bioreactor studies of growth and nutrient
 1694 utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 8(8), 455–458.
 1695 <https://doi.org/10.1007/BF00269047>

1696 **Mishra**, S. K., & Kumar, A. (2010). Biosynthesis of guggulsterone in the callus culture of
 1697 *Commiphora wightii*. Arnott. Bhandari (Burseraceae). *Research Journal of Pharmaceutical,*
 1698 *Biological and Chemical Sciences*, 1, 35–41.

1699 **Modafar**, C. E., Clerivet, A., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1993). Inoculation of *Platanus*
 1700 *acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* F. Sp. *Platani* induces scopoletin and umbelliferone

1701 accumulation. *Phytochemistry*, 34(5), 1271–1276. <https://doi.org/10.1016/0031->
1702 9422(91)80014-R

1703 **Mojica**, M. A., León, A., Rojas-Sepúlveda, A. M., Marquina, S., Mendieta-Serrano, M. A.,
1704 Salas-Vidal, E., Villarreal, M. L., & Alvarez, L. (2016). Aryldihydronaphthalene-type
1705 lignans from *Bursera fagaroides* var. *Fagaroides* and their antimitotic mechanism of action.
1706 *RSC Advances*, 6(6), 4950–4959. <https://doi.org/10.1039/C5RA23516B>

1707 **Nadel**, B. L. (1989). Use of fluorescein diacetate in citrus tissue cultures for the
1708 determination of cell viability and the selection of mutants. *Scientia Horticulturae*, 39(1),
1709 15–21. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90033-2)

1710 **Okazaki**, M., Hino, F., Kominami, K., & Miura, Y. (1982). Effects of Plant Hormones on
1711 Formation of Scopoletin and Scopolin in Tobacco Tissue Cultures. *Agricultural and*
1712 *Biological Chemistry*, 46(3), 609–614. <https://doi.org/10.1080/00021369.1982.10865138>

1713 **Ozias-Akins**, P., & Vasil, I. K. (1983). Callus induction and growth from the mature embryo
1714 of *Triticum aestivum* (Wheat). *Protoplasma*, 115(2), 104–113.
1715 <https://doi.org/10.1007/BF01279802>

1716 **Pádua**, M. S., Paiva, L. V., Silva, L. C. D., Livramento, K. G. D., Alves, E., & Castro, A. H.
1717 F. (2014). Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. *Ciência*
1718 *Rural*, 44(4), 660–665. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000400014>

1719 **Pavón-Reyes**, L., Evangelista-Lozano, S., Sepúlveda-Jiménez, G., Chávez Avila, V., &
1720 Rodríguez-Monroy, M. (2017). Cell Culture of *Bursera linanoe* in a Stirred Tank Bioreactor
1721 for Production of Linalool and Linalyl Acetate. *Natural Product Communications*, 12(3),
1722 319–322.

1723 **Qi Tian.** (s/f). *Scopoletin exerts anticancer effects on human cervical cancer cell lines by*
 1724 *triggering apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell invasion and PI3K/AKT signalling*
 1725 *pathway.*

1726 **Ramos-Ordoñez,** M. F., Del Coro Arizmendi, M., Flores-Enríquez, V., & Márquez-
 1727 Guzmán, J. (2016). Extracción y morfología del embrión de *Bursera bipinnata* (Burseraceae).
 1728 *Acta Botanica Mexicana*, (117), 27–35. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1165>

1729 **Rojas-Sepúlveda,** A. M., Mendieta-Serrano, M., Mojica, M. Y. A., Salas-Vidal, E.,
 1730 Marquina, S., Villarreal, M. L., Puebla, A. M., Delgado, J. I., & Alvarez, L. (2012). Cytotoxic
 1731 podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *Fagaroides*.
 1732 *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(8), 9506–9519.
 1733 <https://doi.org/10.3390/molecules17089506>

1734 **Rubis,** B., Paszel, A., Kaczmarek, M., Rudzinska, M., Jelen, H., & Rybczynska, M. (2008).
 1735 Beneficial or harmful influence of phytosterols on human cells? *British Journal of Nutrition*,
 1736 100(6), 1183–1191. <https://doi.org/10.1017/S0007114508981423>

1737 **Rzedowski,** J., & Guevara-Féfer, F. (1992). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes:*
 1738 *Familia Burseraceae / por Jerzy Rzedowski; Fernando Guevara-Féfer.* Instituto de
 1739 Ecología. <https://books.google.com.mx/books?id=No7buAAACAAJ>

1740 **Shahzad,** N., Khan, W., Md, S., Ali, A., Saluja, S. S., Sharma, S., Al-Allaf, F. A.,
 1741 Abduljaleel, Z., Ibrahim, I. A. A., Abdel-Wahab, A. F., Afify, M. A., & Al-Ghamdi, S. S.
 1742 (2017). Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective.
 1743 *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 786–794.
 1744 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.068>

1745 **Siatka**, T., Chlebekb, J., & Hoštálková, A. (2017). Copper(II) Sulfate Stimulates Scopoletin
 1746 Production in Cell Suspension Cultures of *Angelica archangelica*. *Natural Product*
 1747 *Communications*, 12(11), 1934578X1701201.
 1748 <https://doi.org/10.1177/1934578X1701201133>

1749 **Sonawane**, P. D., Pollier, J., Panda, S., Szymanski, J., Massalha, H., Yona, M., Unger, T.,
 1750 Malitsky, S., Arendt, P., Pauwels, L., Almekias-Siegl, E., Rogachev, I., Meir, S., Cárdenas,
 1751 P. D., Masri, A., Petrikov, M., Schaller, H., Schaffer, A. A., Kamble, A., ... Aharoni, A.
 1752 (2016). Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature*
 1753 *Plants*, 3(1), 16205. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.205>

1754 **Taguchi**, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., &
 1755 Okazaki, M. (2000). Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the
 1756 vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science: An*
 1757 *International Journal of Experimental Plant Biology*, 151(2), 153–161.
 1758 [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00212-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00212-5)

1759 **Tripathi**, N., Kumar, S., Singh, R., Singh, C. J., Singh, P., & Varshney, V. K. (2013).
 1760 Isolation and Identification of γ - Sitosterol by GC-MS from the Leaves of Girardinia
 1761 heterophylla (Decne). *The Open Bioactive Compounds Journal*, 4(1), 25–27.
 1762 <https://doi.org/10.2174/1874847301004010025>

1763 **Zheng**, M. Y., & Konzak, C. F. (1999). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus
 1764 induction and plant regeneration in another culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant*
 1765 *Cell Reports*, 19(1), 69–73. <https://doi.org/10.1007/s0029900507>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, a 04 de mayo del 2026.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **Análisis del perfil fitoquímico y actividad citotóxica de callos y células en suspensión de *Bursera fagaroides***, que presenta la **C. María Nancy Pérez Mejía**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección de la DRA. LAURA ALVAREZ BERBER y codirección de la DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER (directora de tesis, CIQ UAEM)

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA (CEIB UAEM)

DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR (CIBIS IMSS)

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA (CEIB UAEM)

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA (CEIB UAEM)

DR. MARIO RODRÍGUEZ MONROY (IPN)

DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO (CEIB UAEM)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2026-05-04 16:09:22 | FIRMANTE

XQf/iDgYvnYshyJ6PXiV3cFv2h2ywZtcOq6l/wYKDroyUnR+pY4lrPR3ks+FOueQ5V8VgsZWNuJOUcNruUbmQXl4QMujbkLq3PzmTe5LVw7Iz+TctcBPzxWKXtvchikOXtAFmoaFKJd07fI9t8pBaiBh0PnyAKQvfkSgAl+ktIWMIKU2neiAlnCOb11WnyxEk2GJDVNIzhReN6+7hRnoipwTGIC/c+jx0bubVfgGJ6GJLXowykJJBX1yp91KvoAHISjiQdGP/3q64xPmviPfaeQSZVSp+Pd2DN8WFmeoSdopG8js81PkidMv2OO+7udqEMwzu3lyZ0uf4/FCFAOHA==

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2026-05-04 16:30:09 | FIRMANTE

IS47YPWD5BIerU6KQA/81oeMJB07QG7jFdNb8rV3sCvaht0j51CJ7AniOrhyb7lpwdHUNI4KjKeFoDzyz4hB8CIPevWVMXFrQhDyKJTI1YZVA28NQOpekyC0BrOiv3ftP0RwZ4RUYWIIU2gCLbDxFMBfKoWqO7niX0dCUcC5DjqE3Pad8QEOJFjj2kEKAJkaniKyOPolmCJpCRhrrULITJhbPholXj1wp4TE+rjM1B8E/gncJky/axBlua7JG7I0baeJiHN1Ek5IWxNx+DE7Ij bHHMJC2eSjV6jhZhCLD/pF+qr6dYv4VaLbmn9bGPD8LEuhP5uKJGNgQ5btiEA7n+6A==

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2026-05-04 17:42:25 | FIRMANTE

HbBV85ETuGfKdsdFRLaaHR9inw9AWaYu6NYel2qU8j6MbVmrqZlqPMtqapbllsAmuuhlSh6X/i8KPMBYMQCXYAigc65tzNfTns+FWjhNdMZvfmgVR0g9cjBl6w7JGfXw7f/AzmUTNaZbSl6WV+Gzk4L+QU7XHHXUZbdu8qcllXEyCKa1ltPgFQihybbKf8WXICO8A/rUrKkrYsAtASPXVR5NyQ4QLcO/dk0Np25EISAn31yPCcNdXeg8hR54ncVxcAT77KZ7+LRtFGM+1LXmW2IAj0AolZw5t/qveH/rbS2iz3kwCP/dnRK/Ee2Y/qbmf603za0GIEZmZJxTvOGHoHw==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2026-05-05 09:20:28 | FIRMANTE

O3ZOkmZRKXfP3rMNX2FPEQNGt+57uDYXVwrvQ2p382t2ytvarLvdOTxzGvDKaiDLmR3S9SURFE63tm24C/B0hIMU3H2fSIEdyCuEtDJKGS/4jFPAXzJZQSGdXvpQs85HexoFfIElqJkxAc2j46TxN16gEID+Jiz6mpptVRfllzRVn1V0Jcz173S296faJmkBuMoFliYxN5oZAMMnO6Fq4EuVPUCoFamyWJgS7cybyQpbFvOWFiq0cJE6oLIZG56it4dVd/jVL+Cuq3EXrNGIRDbZNUgpZow1gcEYPPsJOyGX+xoyt6XeOnwOoJJLH7DpSQ5isgql43EbCe8gu2w==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2026-05-25 08:29:25 | FIRMANTE

TgBzooKbJPoCetQfLyRsluU+T24nldtLfwlaxW0wF5ZMxmAPrhmqMBqYgKqhEfrMQly+IodpJNm080fBi1KI0oqbEygZMlg+VWktWCiaJCx8yrtCgaSgAabWha5shKqkvqiy6yF7xYnQQZASLBJfDJKQSiV9CtuTfNBeb99BSuzbUz0VkreJnZGBAoc4hmWOFQlr2PBo+CZBG9749ornsVBs0Qvj0SjRQGullhqbPzKALj1k+Zt1bBngy9R4VydIkU3gZG8/qI0qWoJ46Xm6A4L6kyiCyFCswt/XQiamPIIMKfXO9pWJBtCyu114RFXRQa9TbmwwBLMkVaw+w==

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2026-05-27 15:34:07 | FIRMANTE

dRlPfiZ+rEQvkb7m46tWk8GX88/akosNK5NYFWN2h1OTEtkbTHKCVsHaggbkKyHLb3yOi918lc9ZkT55vBNJB3czmFK0mUigiutNawuGMd9FGpLQM8+7GmsV7Tc89QTt9WRoDyJrAeC4pjzYThrToFpshFSeCxsJg0mpEnhfSitaFvy84LSltvfgNLR+02G7mrwSSjRKKY7WXXJJuPwQKbRzWXAedqITXU0GsfPr0uh8QlowRRr+3PjmYSCaJcOhZb4e12dr/7U4aRLLlpQskH1kHxdTuqrp0qp+YV4451iOpsPm1dibPA8K4X1wfrXv2KzINO+uyZymO/1cf3fepA==

MARIO RODRÍGUEZ MONROY | Fecha:2026-05-31 11:18:48 | FIRMANTE

d2w2YrZXfUkhML/pB9vPDVHhV4MqngpHfQOQAjlyL+mmy0Hpl5IYQAtG0HB8BS/D7+IxOo6Zc/MhAA32RQ5LaE8F+eptv+f03L66uh3wFlosPan0FJMECWgNlasSI1BI1IPjg+sLNe3YW3Wrb3svhK6wFGqGJATmjARvVhRVpyrNVACoy431hBDXP5RkyHR66O5ZueQQytAt/9N56Z4I6s1iNiUKGAQeWSLnVkkHCK+5Zz5hMGIq7XEPGP4cPI4oBgHFK+K54J6BvruwMGNSsKuballjr2wAs0EDgb6EBZ3Leq7/FnHQ51Bg1pCUPQcx678Pz8pEjrrZirGuRo7w==

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



qw9XGY1z

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kAcBI6LInp9JhHsaXp8fhdyqf71pLKSq>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029