



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN BOTÁNICA

## ANÁLISIS DE METABOLITOS BIOACTIVOS EN RAMAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DE *Amphipterygium adstringens* (ANACARDIACEAE)

BEATRIZ REYES GARCÍA

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2024



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Análisis de metabolitos bioactivos en ramas primarias y secundarias de *Amphipterygium adstringens* (Anacardiaceae)**, realizada por la estudiante: **Beatriz Reyes García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

DRA. LUCERO DEL MAR RUIZ POSADAS

CO-DIRECTOR

DR. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ

ASESOR

DR. JORGE ALBERTO GUTIÉRREZ GALLEGOS

ASESOR

M. EN C. ANTONIO GARCÍA ESTEVA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, junio de 2024

# ANÁLISIS DE METABOLITOS BIOACTIVOS EN RAMAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DE *Amphipterygium adstringens* (ANACARDIACEAE)

Beatriz Reyes García, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2024

## RESUMEN

La corteza del tallo (CT) de cuachalalate (*A. adstringens*) se obtiene de poblaciones silvestres, por lo que la supervivencia del árbol está en riesgo debido a la alta demanda y las incorrectas prácticas de descortezado. Si bien se han propuesto algunas estrategias de manejo sustentable, se centran en la CT como la única fuente de compuestos bioactivos. En este contexto, esta investigación se destaca al explorar la composición química de la corteza de las ramas (CR) y su potencial capacidad antivirulencia y antipatogénica. El estudio se realizó en Chiautla de Tapia, Puebla, donde se recolectó corteza de diez árboles durante la temporada de lluvias. Los compuestos bioactivos (masticadienónico, 3  $\alpha$ -hidroximasticadenónico y ácidos anacárdicos) se identificaron en extractos de acetato de etilo de las cortezas mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC). Los extractos acuosos de las cortezas se liofilizaron y analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS-SQ-TOF) y redes moleculares. Además, se utilizó un modelo murino de lesión térmica e infección con *Pseudomonas aeruginosa* para evaluar la actividad antipatogénica de un método tradicional con la CR. También, se evaluó la propiedad antivirulenta de los extractos de acetato de etilo al inhibir la formación de biopelículas, la actividad caseinolítica y la producción de pirocianina de *P. aeruginosa*. Se demostró que el CR también contiene compuestos bioactivos, mientras que los extractos acuosos de las cortezas comparten flavonoides, catequinas y saponinas. Además, el método tradicional con CR redujo significativamente la mortalidad de los ratones, previno la sepsis e inhibió la producción de factores de virulencia. Por lo tanto, se concluye que la CR también contiene metabolitos bioactivos y mantiene la capacidad antivirulencia y antipatogénica reportada previamente para CT. Este descubrimiento es fundamental para diseñar estrategias de manejo sostenible del cuachalalate utilizando estructuras renovables como las ramas.

**Palabras clave:** Cuachalalate, metabolitos bioactivos, actividad antipatogénica, método tradicional, descortezado.

# ANALYSIS OF BIOACTIVE METABOLITES IN PRIMARY AND SECONDARY BRANCHES OF *Amphipterygium adstringens* (ANACARDIACEAE)

Reyes García Beatriz, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2024

## ABSTRACT

Stem bark (SB) of cuachalalate (*A. adstringens*) is obtained from wild populations, so the tree's survival is at risk due to high demand and incorrect debarking practices. While some sustainable management strategies have been proposed, they focus on SB as the only source of bioactive compounds. In this context, this research explores the chemical composition of branch bark (BB) and its potential antivirulence and antipathogenic capacity. The study was conducted in Chiautla de Tapia, Puebla, where bark was collected from ten trees during the rainy season. Bioactive compounds (masticadienoic, 3  $\alpha$ -hydroxymasticadenoic and anacardic acids) were identified in ethyl acetate extracts of the barks by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Aqueous extracts of the barks were freeze-dried and analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS-SQ-TOF) and molecular networking. Furthermore, a murine model of thermal injury and infection with *Pseudomonas aeruginosa* was used to evaluate the antipathogenic activity of a folk method that contains BB. Also, the antivirulence property of ethyl acetate extracts were evaluated by inhibiting biofilm formation, caseinolytic activity, and pyocyanin production of *P. aeruginosa*. BB was also shown to contain bioactive compounds, while aqueous extracts of the barks share flavonoids, catechins, and saponins. Furthermore, the folk method significantly reduced mouse mortality, prevented sepsis, and inhibited the production of virulence factors. Therefore, it is concluded that BB also contains bioactive metabolites and maintains the antivirulence and antipathogenic capacity previously reported for SB. This discovery is fundamental to designing sustainable management strategies for cuachalalate using renewable structures such as branches.

**Keywords:** Cuachalalate, bioactive metabolites, antipathogenic activity, traditional method, debarking.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el financiamiento para llevar a cabo el Proyecto de Investigación, Numero de becario: 1171646.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y al Posgrado en Botánica por la formación académica que me brindó durante el desarrollo del Proyecto de Investigación.

Al Dr. Israel Castillo Juárez por su orientación, confianza y pasión por la investigación.

A mi Consejo particular: la Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas, el Dr. Jorge Alberto Gutiérrez Gallegos y el M.C. Antonio García Esteva.

Al Dr. Mario Luna Cavazos por sus observaciones y comentarios para hacer este trabajo.

A la Dra. Monserrat Vázquez Sánchez por su apoyo y orientación.

Al Sr. Daniel por permitirnos recolectar en su terreno y por brindarnos su conocimiento.

Al Dr. José Luis Díaz Núñez por compartir su conocimiento, paciencia y entusiasmo.

A los colaboradores que apoyaron en el desarrollo de este Proyecto: el Dr. José Alberto Rivera Chávez (Instituto de Química, UNAM) y Dr. Luis Francisco Salome Abarca.

Al Dr. Martín Hernández Juárez, Dr. Aurelio León Merino y Dra. Areli Romero Padilla, por sus enseñanzas y orientación.

A mis compañeros con quienes compartí el trabajo del laboratorio: el Ing. Janitzio Nieto Blancas y la M.C. Nadine Heidi Espíndola Rodríguez

## **DEDICATORIA**

A mis abuelitos Candido García<sup>†</sup> y Modesta Vitinio

A mi mamá Elvia que siempre me brinda apoyo incondicional y me guía

A mis hijos Emmanuel y Samara por ser el motor para seguir cada día de mi vida

A mi esposo Carlos Eduardo por su apoyo y confianza, por creer en mi

A mis hermanos Vero, Emma y Andrés, que siempre me han apoyado y me animan a seguir adelante

A mis sobrinos Edwin, Axel, Dany, Cami y Jayden; a las pequeñas Aria y Erandi

A mis amistades y colegas compañeras de vida Ere, Kareen y Silvia Púlido

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
SIGLAS, ABREVIATURAS O GLOSARIO .....	xiv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO II. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN .....	4
CAPÍTULO III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos Específicos:.....	5
3.3. Hipótesis .....	5
CAPÍTULO IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Características generales del cuachalalate.....	6
4.2. Morfología de la corteza.....	8
4.3. Fitoquímica .....	9
4.4. Importancia etnobotánica.....	12
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
4.6. Virulencia y patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i> .....	15
4.7 Propiedades antivirulencia y antipatogénica de <i>A. adstringens</i> .....	16
4.8. Descortezamiento de <i>A. adstringens</i> .....	17
4.9. Análisis por redes moleculares .....	20
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Área de estudio.....	21
5.2. Colecta de material vegetal.....	21
5.3. Extractos orgánicos con acetato de etilo.....	25
5.4. Extractos acuosos.....	26
5.5. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).....	27

5.6. Redes moleculares .....	28
5.7. Evaluación de la actividad antipatogénica de un método tradicional con la corteza de las ramas.....	29
5.8. Evaluación de la actividad antivirulencia .....	33
5.8.1. Formación de biopelícula .....	34
5.8.2. Actividad caseinolítica.....	34
5.8.3. Producción de piocianina .....	34
5.9. Análisis estadísticos.....	35
CAPÍTULO VI. RESULTADOS .....	36
6.1. Características generales de la corteza de cuachalalate .....	36
6.2. Cromatografía en capa fina de los extractos con acetato de etilo.....	38
6.3. Cuantificación de metabolitos bioactivos por HPTLC.....	40
6.4. Análisis de redes moleculares en extracto acuoso de ramas primarias y secundarias.....	42
6.5. La corteza de las ramas tiene actividad antipatogénica .....	44
6.6. Inhibición de factores de virulencia controlados por QS .....	46
CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN .....	49
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIÓN .....	54
CAPÍTULO IX. LITERATURA CITADA .....	55
ANEXOS .....	65



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Propiedades medicinales de <i>A. adstringens</i> .....	14
<b>Cuadro 2.</b> Datos obtenidos del muestreo. ....	37

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árbol de cuachalalate. a) Árbol de cuachalalate; b) fructificación en el período de julio de 2022; c) fruto alado (sámara)..... 7
- Figura 2.** Mapa de distribución de *Amphipterygium adstringens* en la República Mexicana. Basado en Tropicos | Name - Amphipterygium adstringens Fuente: INEGI. Marco Geoestadístico Nacional, febrero 2018..... 8
- Figura 3.** Corteza de cuachalalate. a) Corte transversal del eje principal de cuachalalate (Foto Israel Castillo Juárez). Exudado (látex); b) corteza seca de ramas; c) corte longitudinal del descortezamiento; d) corteza seca del tallo. .... 9
- Figura 4.** Moléculas de los compuestos mayoritarios de la corteza de *A. adstringens*: a) ácido masticadienónico, b) ácido 3  $\alpha$ -hidroximasticadienónico, c)  $\beta$ -sitosterol, d) ácido 3- epioleanólico y e) ácidos anacárdicos (Tomado y modificado de González *et al.*, 1962; Navarrete *et al.*, 1982; Soriano-García *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1988; Navarrete *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1991). .... 10
- Figura 5.** Extracto acuoso de cuachalalate, con presencia de saponinas. .... 12
- Figura 6.** El Centro sur de México es la principal área de distribución de *A. adstringens*. En Chiautla de Tapia, Puebla, la corteza del tallo se vende localmente. Sin embargo, las técnicas destructivas de descortezado y el cambio de uso del suelo para la agricultura y la ganadería han reducido drásticamente las poblaciones naturales del árbol. En la foto se muestran mujeres de origen mixteco y el Sr. Daniel Arista Aguilar en un bosque de cuachalalate de su propiedad..... 21
- Figura 7.** Representación de los árboles de cuachalalate seleccionados y marcados para su posterior recolecta. .... 22
- Figura 8.** Árbol de cuachalalate. Descortezamiento del tallo principal de aproximadamente 40 cm. .... 23
- Figura 9.** Árbol de cuachalalate. Representación de las ramas primarias (RP), secundarias (RS) y corteza del tallo (CT). .... 24

<b>Figura 10.</b> Árbol de cuachalalate. Rama de aproximadamente 1.5 m, junto a un machete. Representación de las ramas primarias (RP) y secundarias (RS).....	25
<b>Figura 11.</b> Proceso para la obtención de los extractos de las cortezas con acetato de etilo.....	26
<b>Figura 12.</b> Imagen representativa del equipo automatizado para el análisis de las muestras por HTPLC. Imagen tomada y cedida por Marina Vera Ku del CICY.....	28
<b>Figura 13.</b> a) Extractos acuosos de corteza de cuachalalate; b) corteza pulverizada. ....	30
<b>Figura 14.</b> Modelo murino de lesión e infección con <i>P. aeruginosa</i> . ....	31
<b>Figura 15.</b> Aplicación de tratamiento por el Método tradicional (Gómez-Salgado <i>et al.</i> , 2022). ....	32
<b>Figura 16.</b> Diagrama general de aplicación del método tradicional. ....	33
<b>Figura 17.</b> Corteza de cuachalalate. CT= Corteza de tallo; CRP= Corteza de ramas primarias y CRS= Corteza de ramas secundarias. a) color de la corteza; b) corteza pulverizada; c) extracto con acetato de etilo de las cortezas; d) corteza seca de cuachalalate; e) extracto acuoso de cuachalalate; f) liofilizado de la corteza. ....	38
<b>Figura 18.</b> Cromatografía en capa fina de los extractos con acetato de etilo. Referencias $\alpha$ = ácido $\alpha$ -hidroximasticadienónico; m = ácido masticadienónico. CT=Corteza del tallo (1-10); CRP= corteza de ramas primarias (11-20) y CRS= corteza de ramas secundarias (21-30). Sistema de elución hexano-acetato de etilo (7:3), revelado con vainillina + ácido sulfúrico al 1%. ....	39
<b>Figura 19.</b> Cromatografía en capa fina de los extractos con acetato de etilo de cortezas. Referencia ANA = ácidos anacárdicos. CT=Corteza del tallo (1-10); CRP= corteza de ramas primarias (11-20) y CRS= corteza de ramas secundarias (21-30). Sistema de elución hexano-acetato de etilo (7:3), se observó bajo luz ultravioleta de longitud alta a 254 nm. ....	40

- Figura 20.** Identificación de metabolitos bioactivos por HTPLC en el extracto con acetato de etilo de las cortezas. a) Placas derivatizadas con anisaldehído-ácido sulfúrico. b) Placas visualizadas con luz ultravioleta. STD = estándares de referencia: 1, mezcla de ácidos anacárdicos; 2, ácido masticadienónico; 3, ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico. QC extracto hexánico de corteza del tallo de cuachalalate (Gómez-Salgado *et al.*, 2024), es el control de calidad. CT= Corteza del tallo, CRP= Corteza de ramas primarias, CRS= Corteza de ramas secundarias..... 41
- Figura 21.** Análisis de Componentes Principales (PCA), CT= Corteza de tallo, CRP= Corteza de ramas primarias, CRS= Corteza de ramas secundarias..... 42
- Figura 22.** Análisis de los componentes químicos de los extractos acuosos de cuachalalate. a) Red molecular generada a partir de los datos MS<sup>2</sup>. La construcción de esta red implicó el algoritmo MolNetEnhancer. b). Ejemplos seleccionados de redes moleculares y sus correspondientes compuestos desreplicados..... 43
- Figura 23.** Actividad antipatógena del método tradicional con corteza de ramas primarias (CRP) y ramas secundarias (CRS) de cuachalalate; Control sin tratamiento (C). a) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier; b) Establecimiento de *P. aeruginosa* en el tejido quemado; c) La presencia de la bacteria en el hígado determina la dispersión de la bacteria. n = 10. \*p = 0.05..... 45
- Figura 24.** Efecto del Extracto con acetato de etilo en la producción de Biopelícula de PA14. Los extractos empleados fueron de la corteza del tallo (CT), corteza de ramas primarias (RP) y de corteza de ramas secundarias (RS). Las concentraciones empleadas fueron a 250  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL y 1000  $\mu$ g/mL para cada extracto.  $\Delta$ lasR/ $\Delta$ rhIR= QS doble mutante utilizado como control positivo. \*p = 0.05. .... 46
- Figura 25.** Actividad caseinolítica del extracto con acetato de etilo de la corteza del tallo (CT), corteza de ramas primarias (RP) y corteza de ramas secundarias (RS). Las concentraciones fueron a 250  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL

y 1000  $\mu\text{g/mL}$  para cada extracto.  $\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ = QS doble mutante utilizado como control positivo. \* $p = 0.05$ . ..... 47

**Figura 26.** Actividad piocianina del extracto con acetato de etilo de la corteza del tallo (CT), corteza de ramas primarias (RP) y corteza de ramas secundarias (RS). Las concentraciones fueron a 250  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$  y 1000  $\mu\text{g/mL}$  para cada extracto.  $\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ = QS doble mutante utilizado como control positivo. \* $p = 0.05$ . ..... 48

## SIGLAS, ABREVIATURAS O GLOSARIO

**ATP** Trifosfato de adenosina

**AHL** acil-homoserina lactona

**CCF** Cromatografía en capa fina

**CT** Corteza de tallo

**CR** Corteza de rama

**CRP** Corteza de rama primaria

**CRS** Corteza de rama secundaria

**DAP** Diámetro a la altura de pecho

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**D.O.** Densidad óptica

**EA** Extracto acuoso

**EM** Extracto metanólico

**GNPS** Global Natural Products Social molecular networking

**HPTLC** Cromatografía en capa fina de alta resolución

**LB** Medio de cultivo Luria-Bertani

**LC-HRMS** Espectrometría de masas de alta resolución

**LPS** Lipopolisacárido

**mL** Mililitros

**μL** Microlitros

**mM** Milimolar

**MN** Redes moleculares, Molecular networking

**MO** El Herbario del Jardín Botánico de Missouri

**MS** Espectrometría de masas

**msn** Metros sobre el nivel del mar

**m/z** masa carga (reacción)

**NET's** neutrófilos

**nm** Nanómetros

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PC** Patrón cromatográfico

**PCA** Análisis de componentes principales

**QS** Quorum sensing

**rpm** Revoluciones por minuto

**SST3** Sistema de Secreción tipo 3

**T0** Control sin tratamiento

**T1** Tratamiento con corteza de ramas primarias

**T2** Tratamiento con corteza de ramas secundarias

**UFC** Unidades formadoras de colonias

**UICN** Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

**VU** Varianza unitaria

**v/v** Volumen a volumen

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una fuente valiosa en la medicina tradicional. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004), el 80% de las personas hacen uso de las plantas para tratar algún padecimiento. Las plantas medicinales son definidas por la OMS como “cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser usadas con fines terapéuticos o que sus principios activos puedan servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos” (Bermúdez *et al.*, 2005). El conocimiento de las plantas con uso medicinal nos permite desarrollar nuevos planes de salud combinando el conocimiento tradicional con el científico (Argueta *et al.*, 1994).

De acuerdo con lo reportado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), en México se estiman alrededor de 4 500 especies de plantas con propiedades medicinales, de las cuales solo se han analizado farmacológicamente un 5 % (Alamilla y Neyra, 2020).

Los tratamientos medicinales emplean el uso de extractos de las plantas o sus principios activos y son de gran interés para el tratamiento de diversas enfermedades (Corrales y Reyes, 2015). Cada vez es mayor el interés de personas que recurren a ellas, no solo como pacientes, sino que también las grandes empresas farmacéuticas, que buscan nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades que afectan a la población humana (González, 2010). Entre ellas, las infecciones causadas por patógenos microbianos, debido a la resistencia que han desarrollado a los antibióticos (Bertrand *et al.*, 2023).

Una de las propiedades antimicrobianas más relevantes que se ha descubierto en los últimos años en las plantas, son su capacidad para reducir la virulencia y la patogenicidad bacteriana (Díaz-Núñez *et al.*, 2021). Hasta el momento se han descrito un gran número de productos naturales y fitoquímicos con esta capacidad, la cual representa una opción real para combatir infecciones microbianas con la posibilidad de reducir la aparición de resistencia (Muñoz-Cazares *et al.*, 2017).

Se han descrito diversos blancos antivirulencia, pero uno de los más estudiados y de gran interés, es la inhibición de la comunicación bacteriana mediante la interferencia de



los sistemas de percepción de quorum o quorum sensing (QS). Se ha demostrado que inhibir estos sistemas reducen la producción de factores de virulencia y la patogenicidad en modelos animales (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). El QS es un sistema de regulación global bacteriano que facilita a las bacterias patógenas establecerse y generar daño mediante la producción de factores de virulencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2015).

En la actualidad la OMS ha señalado un grupo de bacterias para las cuales se requiere urgentemente del desarrollo de nuevos antibacterianos debido al gran aumento de aparición de cepas con resistencia a múltiples antibióticos y para las cuales ya no se cuenta con tratamiento (OMS, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales bacterias responsables de las infecciones nosocomiales, principalmente en pacientes con quemaduras de tercer grado.

En estudios previos nuestro grupo de investigación ha reportado la capacidad de extractos orgánicos y fitoquímicos con capacidad de inhibir la virulencia y la patogenicidad de *P. aeruginosa*. (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Gómez-Salgado *et al.*, 2024). Los extractos orgánicos con hexano o acetato de etilo inhiben la producción de factores de virulencia de *P. aeruginosa* como son la producción de pirocianina, ramnolípidos, proteasas, elastasas entre otros (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). De igual manera, la aplicación de un método tradicional que emplea la corteza del tallo se ha demostrado que posee capacidad antipatogénica en un modelo de quemadura e infección con *P. aeruginosa* (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). La aplicación de la corteza de cuachalalate utilizando este método tradicional reduce la muerte de los animales al evitar la sepsis y su efecto es mayor al de la sulfadiazina de plata (Gómez-Salgado *et al.*, 2024), el cual es un bactericida de amplio espectro utilizado en el tratamiento de quemaduras en la clínica.

Las propiedades bioactivas del cuachalalate son relevantes y con gran potencial para resolver problemas de salud como es el cáncer, la úlcera péptica y enfermedades infecciosas entre otras (Sotelo-Barrera *et al.*, 2022). Sin embargo, la alta demanda de este recurso y las malas prácticas de descortezamiento han puesto en riesgo su supervivencia (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2021).

En este sentido, aunque se han propuesto técnicas para un aprovechamiento sostenible estas se basan en el descortezamiento del tallo del árbol ya que se considera que es la principal fuente de metabolitos bioactivos (Sotelo-Barrera *et al.*, 2022). Sin embargo, no se ha demostrado que este tipo de recomendaciones sean exitosas y faltan estudios relacionados con la promoción de plantaciones. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan desarrollar estrategias para un manejo sostenible eficiente que permita mantener poblaciones silvestres o plantaciones sanas. En este sentido, la corteza de las ramas presenta una similitud estructural con la del tallo, que hace factible que también produzcan los metabolitos bioactivos identificados. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo identificar la presencia de compuestos bioactivos en la corteza de las ramas primarias y secundarias del cuachalalate, así como corroborar su capacidad antivirulencia y antipatogénica.

## **CAPÍTULO II. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN**

El árbol de cuachalalate (*A. adstringens*) es un recurso no maderable de consumo local y nacional, pero a medida que se han ido descubriendo sus propiedades biológicas, está aumentando su comercio fuera de México. De tal manera, que se requieren realizar más estudios para lograr su aprovechamiento sostenible y su protección. También, es importante conservar el conocimiento tradicional sobre su uso y proteger los saberes ancestrales. El aumento en la demanda de la corteza de cuachalalate y las incorrectas prácticas de descortezamiento (para obtener una mayor ganancia económica) han reducido rápidamente su distribución en las últimas décadas. También, las poblaciones silvestres son la única fuente de obtención de la corteza, sin regulación y sin un comercio justo, en el cual los recolectores reciben la menor ganancia a cambio de la destrucción de sus recursos naturales.

Aunque se han realizado algunos estudios para su manejo sostenible, estos se basan en el descortezamiento del tallo, debido a que es la estructura donde se han realizado los estudios de composición química y bioactividad. Sin embargo, la corteza del tallo es una estructura fundamental para la viabilidad del árbol, por lo que las recomendaciones que se han realizado son limitadas como: 1.- El descortezamiento está restringido a una pequeña sección del tallo, en el que se debe de considerar la profundidad del corte, el sexo del árbol, que se realice en un periodo determinado como la época de lluvias, entre otras variables. 2.- El área del tallo descortezada queda expuesta a la deshidratación y enfermedades. 3.- Se desconoce cuántas veces se puede descortezar el tallo del árbol sin afectar su viabilidad. 4.- No hay estudios sobre la composición química y calidad de la corteza regenerada. 5.- Las recomendaciones para su manejo sustentable se hace principalmente para poblaciones silvestres. Es necesario que se realicen estrategias sostenibles orientadas al desarrollo de plantaciones sanas y económicamente redituables. De tal manera que, conocer la composición y la concentración de los principales metabolitos activos, así como corroborar la bioactividad de estructuras que se pueden regenerar, es de gran importancia. Los resultados obtenidos ayudarán al desarrollo de estrategias sostenibles robustas, basadas en podas controladas y para el manejo adecuado de esta especie endémica de México.

## CAPÍTULO III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 3.1. Objetivo general

Efectuar un análisis fitoquímico de la corteza de las ramas de *A. adstringens* y determinar su capacidad antivirulencia y antipatogénica.

### 3.2. Objetivos Específicos:

- Identificar el ácido masticadienónico, el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y los ácidos anacárdicos en la corteza de ramas primarias y secundarias.
- Comparar la composición química de los extractos acuosos de las cortezas mediante el análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y redes moleculares (Molecular Networking).
- Determinar la actividad antipatogénica de un método tradicional con la corteza de las ramas en un modelo murino de quemadura e infección con *P. aeruginosa*.
- Analizar la propiedad antivirulencia de la corteza de las ramas mediante la inhibición de factores de virulencia en *P. aeruginosa*.

### 3.3. Hipótesis

La corteza de las ramas primarias y secundarias de *A. adstringens* tiene una composición química y concentración de metabolitos activos similar a la de la corteza del tallo, por lo tanto, el mismo efecto farmacológico.

## CAPÍTULO IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Características generales del cuachalalate

*Amphipterygium adstringens*, es un árbol endémico de México que pertenece a la Familia Anacardiaceae y comúnmente se conoce como “cuachalalate”, aunque puede tener nombres variados dados principalmente por los habitantes de los pueblos en donde habita este árbol.

De acuerdo con la Base de datos del Jardín Botánico de Missouri ([Tropicos | Name - Amphipterygium adstringens](#)), la nomenclatura taxonómica del cuachalalate es:

División	Embriophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Amphipterygium</i>
Especie	<i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.
Sinónimos	<i>Juliana adstringens</i> (Schltdl.) Schltdl. (1843)

La Familia Anacardiaceae comprende alrededor de 80 géneros y 873 especies (Arbonnier, 2002; Nie *et al.*, 2009). Ha sido relacionada con la Familia Julianaceae por la anatomía de la madera y por su química de flavonoides. El género *Amphipterygium* ha tenido diversos cambios taxonómicos a lo largo de los años y actualmente en México se reconocen cuatro especies: *A. adstringens*, *A. molle*, *A. glaucum* y *A. simplicifolium* (Cuevas-Figueroa, 2005).

El cuachalalate es una especie de árboles dioicos y perennes que llega a medir hasta diez metros de altura y aproximadamente 40 centímetros de diámetro a la altura del pecho (DAP). Presenta un eje principal con varias ramificaciones. Ramas pilosas a glabrescentes, hojas compuestas imparipinnadas; pecíolo de hasta 6.9 cm de largo, piloso, base velutinoso; foliolos de 3 a 7, verdes, pecíolo con abundantes tricomas en el nervio principal; base cuneada; ápice obtuso a redondeado; margen dentado a crenado

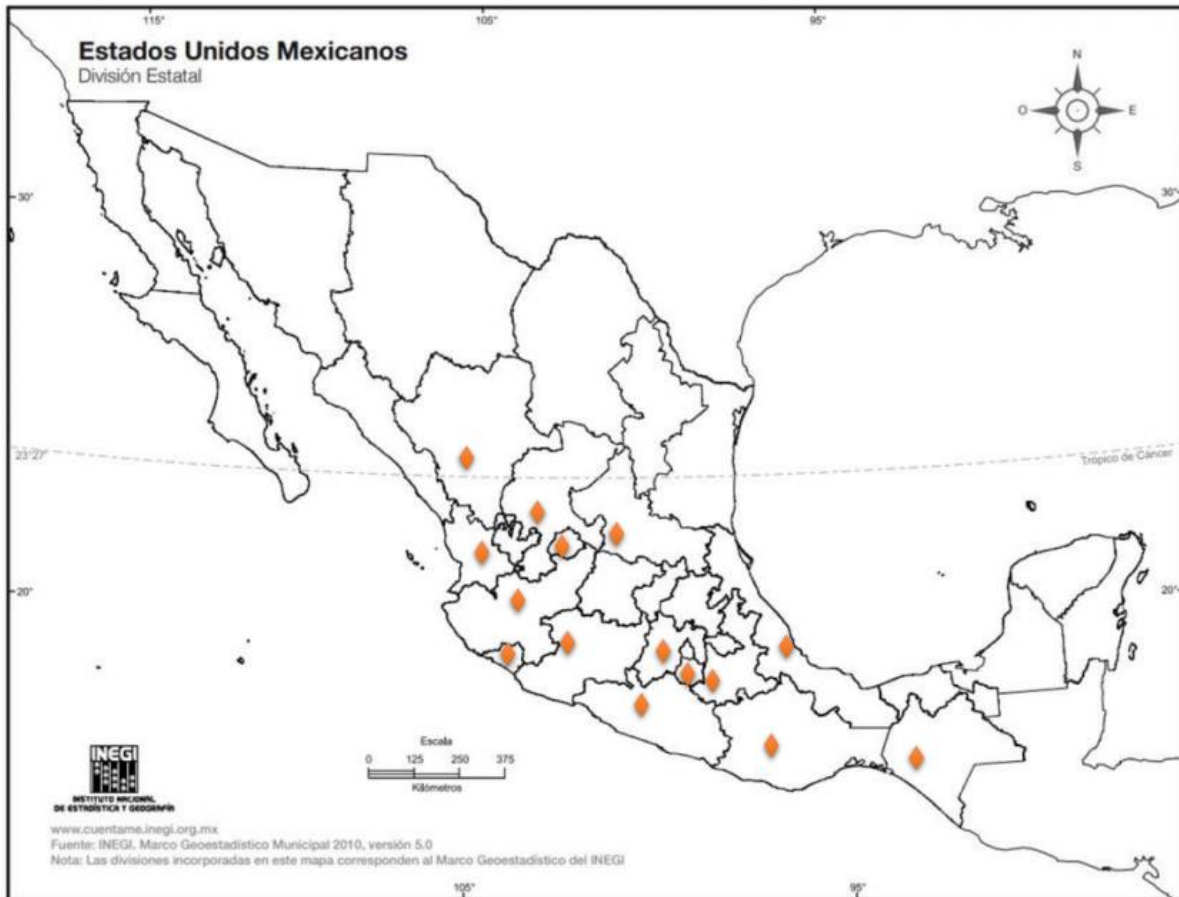
en la porción distal; superficie adaxial pilosa y superficie abaxial tomentosa o pilosa. La inflorescencia masculina de 7 y 2 cm de largo, actinomorfa, inflorescencias en panículas tomentosas, inflorescencia femenina solitaria con pedúnculos aplanados. Fruto una sámara, seco e indehisciente, de 2.5 a 5 centímetros de largo y persistente por varios meses (Orduño y Terrazas, 1998; Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002; Cuevas-Figueroa, 2005; Pennington y Sarukhán, 2005; Guzmán-Pozos y Cruz-Cruz, 2014) (Figura 1).

La floración ocurre en la época de lluvias (mayo a julio), mientras que la fructificación inicia su desarrollo en agosto, y la dispersión alcanza su máximo con el inicio del periodo de sequía en octubre, algunos frutos persisten hasta por cinco meses (Luna-Nieves *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Árbol de cuachalalate. a) Árbol de cuachalalate; b) fructificación en el período de julio de 2022; c) fruto alado (sámara).

El cuachalalate es una especie dominante en la selva baja caducifolia de México a Centroamérica, se distribuye en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, incluyendo la cuenca del río Balsas. Se puede encontrar en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas, como se observa en la Figura 2.



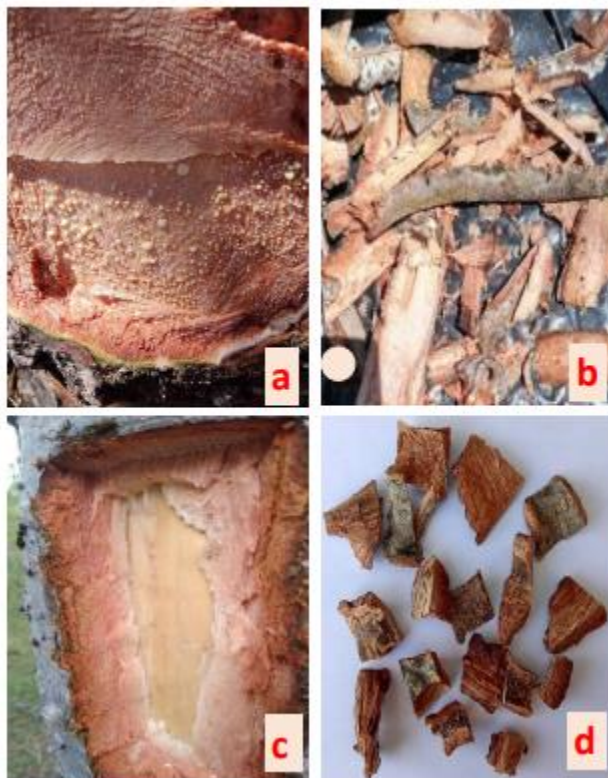
**Figura 2.** Mapa de distribución de *Amphipterygium adstringens* en la República Mexicana. Basado en [Tropicos | Name - Amphipterygium adstringens](#) Fuente: INEGI. Marco Geoestadístico Nacional, febrero 2018.

#### 4.2. Morfología de la corteza

La corteza del tallo del cuachalalate es gruesa y dura, ornamentada de aspecto áspero, de color café rojizo a café oscuro y con varias lenticelas. Tiene una corteza externa lisa (peridermis) color grisáceo de 1 a 2 cm de grosor, en ocasiones presenta una apariencia acostillada; corteza interna con floema secundario funcional de color rosáceo a



blanquecino o rojizo, de entre 0.4 a 0.8 cm de grosor (Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002). Algunos autores señalan que el color rojizo de la corteza se asocia con los árboles femeninos (Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002), mientras que, otros autores sugieren que la coloración rojiza corresponde a los árboles machos (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2021) (Figura 3). En este sentido, resulta interesante hacer estudios más profundos para evitar relaciones erróneas.



**Figura 3.** Corteza de cuachalalate. a) Corte transversal del eje principal de cuachalalate (Foto Israel Castillo Juárez). Exudado (látex); b) corteza seca de ramas; c) corte longitudinal del descortezamiento; d) corteza seca del tallo.

### 4.3. Fitoquímica

La corteza del cuachalalate se emplea tradicionalmente para tratar más de 30 enfermedades, entre ellas el cáncer de estómago, la úlcera péptica, la diabetes, así como enfermedades causadas por agentes infecciosos fármaco-resistentes (Solares, 1995).

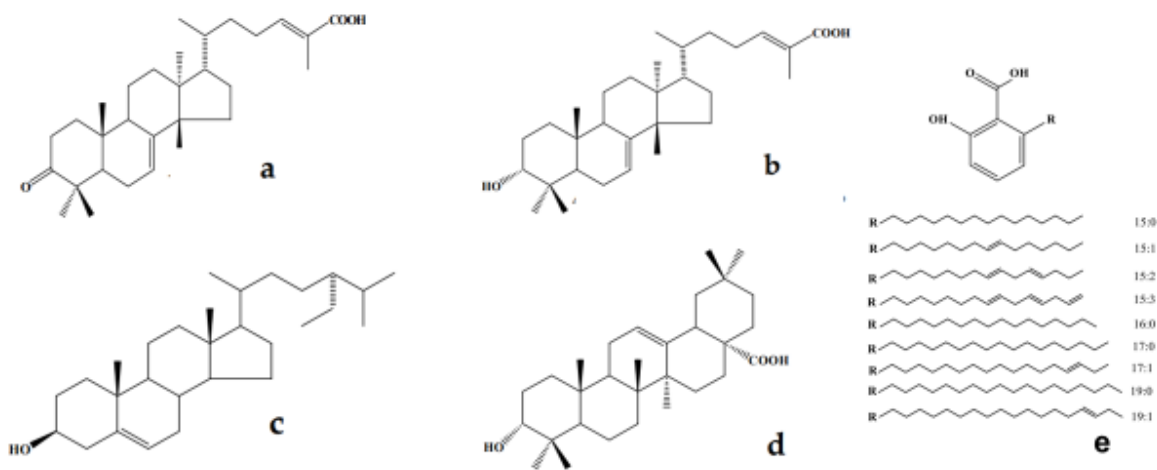
Su efecto terapéutico se atribuye a metabolitos secundarios presentes en la corteza, los cuales son *moléculas exclusivas* de un grupo taxonómico de plantas, no son necesarios



para su crecimiento y desarrollo, pero tienen la función de protección contra depredadores y patógenos microbianos y son importantes para la comunicación de las plantas con otros organismos (Schafer y Wink, 2009).

Para conocer los compuestos presentes en la corteza, se han hecho diversos estudios fitoquímicos a partir de la corteza del tallo. De acuerdo con los estudios realizados, se reporta la presencia de tetracíclicos y pentacíclicos, ácidos y aldehídos anacárdicos. Entre los compuestos mayoritarios se encuentran tritérpenos y fenoles de cadena larga (Navarrete, 1988; Mata *et al.*, 1991).

Entre los metabolitos secundarios de tipo terpenos y esteroides, destacan el ácido 3-epioleanólico,  $\beta$ -sitosterol, ácido masticadienónico y 3 $\alpha$ -ácido hidroximasticadienónico, (Watson *et al.*, 1987; Soriano-García *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1989). Algunos de estos compuestos se encuentran representados en la Figura 4.



**Figura 4.** Moléculas de los compuestos mayoritarios de la corteza de *A. adstringens*: a) ácido masticadienónico, b) ácido 3  $\alpha$ -hidroximasticadienónico, c)  $\beta$ -sitosterol, d) ácido 3-epioleanólico y e) ácidos anacárdicos (Tomado y modificado de González *et al.*, 1962; Navarrete *et al.*, 1982; Soriano-García *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1988; Navarrete *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1991).

Se reporta que los ácidos anacárdicos son cadenas saturadas de 15 a 19 átomos de carbono, entre los cuales se encuentran el ácido 6-pentadecil salicílico (**C15:0**), ácido 6-hexadecil salicílico (**16:0**), ácido 6-heptadecil salicílico (**17:0**), ácido 6-nonadecenil salicílico (**19:0**); ácido 6-[15'(Z)-nonadecenil]-salicílico (**19:1**) (Navarrete *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1991; Rosas-Acevedo *et al.*, 2006; Castillo-Juárez *et al.*, 2007; Pérez-

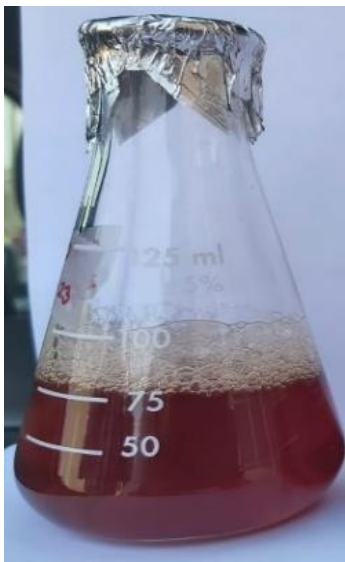
Contreras *et al.*, 2022), ácido 6[16'(*Z*)-nonadecenil]-salicílico, (**C19:1**) (Rivero-Cruz *et al.*, 2011).

Además, se han identificado naftalenos de cadena larga como el ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-2-naftoico (Rivero-Cruz *et al.*, 2005), ácido (14b,24E)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oico (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

Otros trabajos reportan la presencia del ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 3,7- dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico, 3 $\alpha$ -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 7-11-dioxo-3 $\alpha$ -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 3,8-dioxo-7 $\beta$ -hidroxi-7,9-ciclo7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico, 3 $\alpha$ -hidroxi-11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -epoxi-oleonano-28,13 $\beta$ -olido, ocotillona (Makino *et al.*, 2004).

También, se ha identificado la presencia de los terpenos en la resina-látex exudada, sin embargo, es parcialmente renovable y para obtenerla se requiere lesionar la corteza, lo cual la hace vulnerable a infecciones (Olivera-Ortega *et al.*, 1999).

Por otro lado, a pesar de que el modo tradicional de uso es el extracto acuoso (EA), ha sido poco estudiado y sólo se ha identificado una saponina esteroidea llamada sarsasapogenina. Esta molécula se encuentra glicosilada con residuos de *D*-glucosa y *D*-ramnosa (González *et al.*, 1962). Algo interesante que pasa al agitar el extracto acuoso es la formación de espuma, lo cual indica la presencia de dichas saponinas (Figura 5).



**Figura 5.** Extracto acuoso de cuachalalate, con presencia de saponinas.

#### **4.4. Importancia etnobotánica**

Entre las primeras evidencias del uso de la corteza de cuachalalate está la descrita por Méndez (1954), como adstringente por la cantidad de taninos que contiene. De acuerdo con Martínez (1944), “el extracto resultante del cocimiento de esta corteza se usa como endurecedor de encías, cura la fiebre intermitente y el agua la usan para lavar heridas crónicas”.

La decocción de la corteza se toma como agua de tiempo o se aplica en fomentos sobre los tumores o "cáncer". Se usa en lavados vaginales cuando se presentan infecciones en la vagina, fiebre puerperal, flujo en mujeres, frío, inflamación, infección o caída de la matriz y caída de ovarios. Los reportes también lo mencionan para malestares digestivos, para el hígado, la vesícula, para inflamación o infección intestinal, para la tos, para fiebres intermitentes, caída del cabello, antidiabético, rozaduras de bebés, piquetes de animales venenosos, entre otros (Hersch-Martínez, 1995; Argueta *et al.*, 1994; Olivera *et al.*, 1999).

La principal forma de uso es la toma del EA y la aplicación de la corteza molida o pulverizada sobre las lesiones a tratar. Para las enfermedades cutáneas la corteza pulverizada se aplica directamente sobre la piel o es preparada con agua y se lava localmente. En algunos casos se utiliza la goma o la resina de la corteza para tratar granos y abscesos (Wences, 2010). La corteza se macera o se hierve en agua hasta que

tome color y se bebe como agua de tiempo para aliviar las úlceras gástricas (Gómez-Cansino *et al.*, 2017). Sus propiedades son diversas y de acuerdo con Solares (1995) son más de 30 usos terapéuticos.

Durante las últimas décadas se han corroborado las propiedades biológicas de la corteza del tallo e identificado diversos compuestos bioactivos obtenidos a partir de extractos orgánicos de polaridades media y baja. Las propiedades que se le atribuyen son diversas y algunas se mencionan en el Cuadro 1:

**Cuadro 1.** Propiedades medicinales de *A. adstringens*.

<b>Propiedad</b>	<b>Referencia</b>
Anticancerígena	González <i>et al.</i> , 1962; Makino <i>et al.</i> , 2004; Oviedo-Chávez <i>et al.</i> , 2005; Rosas-Acevedo <i>et al.</i> , 2006; Ramírez-León <i>et al.</i> , 2012; Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2015; Alam-Escamilla <i>et al.</i> , 2015; Gnanaprakasam <i>et al.</i> , 2021; Galot-Linaldi <i>et al.</i> , 2021; Piñón-Zárate <i>et al.</i> , 2022
Gastroprotector	Navarrete <i>et al.</i> , 1990; Navarrete <i>et al.</i> , 1998; Navarrete <i>et al.</i> , 2005; Arrieta <i>et al.</i> , 2003
Antiinflamatoria	Olivera <i>et al.</i> , 1999; Oviedo-Chávez <i>et al.</i> , 2004; Rodríguez-Canales <i>et al.</i> , 2016
Antimicrobiana	Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2005; Rivero-Cruz <i>et al.</i> , 2011; Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2015; Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007; Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2009; Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2013.
Antivirulencia	Gómez-Salgado <i>et al.</i> , 2024
Antifúngica	Bravo <i>et al.</i> , 2000
Cicatrizante	Resenos, 2003; Pérez-Contreras <i>et al.</i> , 2022.
Hipercolesterolémico	Mata <i>et al.</i> , 1991.

#### **4.5. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista Gram negativo que tiene la forma de bastón de aproximadamente 1 a 5  $\mu\text{M}$  de largo y 0.5 a 1.0  $\mu\text{M}$  de ancho y pertenece a la Familia Pseudomonadaceae (Diggle y Whiteley, 2020). Es un importante agente causal de infecciones de heridas y nosocomiales, además, se pueden multiplicar fácilmente en pacientes inmunocomprometidos. Dentro de la lista de “Patógenos Prioritarios Resistentes a Antibióticos” se encuentra como categoría de **prioridad crítica** (Ganesh y Rai, 2016).

Es el principal microorganismo identificado en pacientes con quemaduras graves que genera factores de virulencia que le permiten establecerse, dispersarse e incluso causar sepsis. Los brotes de *P. aeruginosa* en las unidades de quemados siguen estando asociados a tasas de mortalidad elevadas de hasta un 60 % (Richard *et al.*, 1994). Debido a sus mecanismos de patogenicidad y a la resistencia a antimicrobianos que han desarrollado, resulta difícil el tratamiento de las infecciones causadas por este agente.

#### **4.6. Virulencia y patogenicidad de *P. aeruginosa***

Los factores de patogenicidad que presenta *P. aeruginosa* se dividen en dos grupos: los factores asociados a la célula bacteriana y los factores secretados. El primer grupo involucra al **flagelo** (que da motilidad a la célula) y el lipopolisacárido (LPS) que da la capacidad de adherirse a la mucosa de vías respiratorias. Así mismo, contiene otras proteínas que desencadenan la secreción de péptidos antimicrobianos por el sistema inmune, la liberación de trampas extracelulares mediadas por neutrófilos (NET's) y posee la capacidad de ser reconocida por diversos receptores.

Otro factor que contiene es un **pili tipo IV** que le confiere la capacidad de adherirse y tener otro tipo de movilidad llamada “*swarming*”. Contiene diversas proteínas motoras y otras para la transducción de energía química ATP (trifosfato de adenosina). También está asociada a dos proteínas lectinas solubles, presentes en la membrana exterior de la bacteria, que participan en la adhesión hacia la célula del hospedero, induciendo daño y la formación de biopelículas.

Los factores de virulencia **secretados** poseen la secreción de toxinas, *P. aeruginosa* tiene cinco (I, II, III, IV, V). El tipo III (SST3) es el principal factor de patogenicidad asociado a la secreción de toxinas como Exo A, Exo T, Exo S, Exo U y Exo Y, que pueden llegar a inducir apoptosis (Diggle y Whiteley, 2020).

En ratones se ha observado que la proteína Exo S induce apoptosis de células endoteliales, linfocitos T, macrófagos y células epiteliales de las vías aéreas (Jia *et al.*, 2006). La proteína Exo T está relacionado con el retraso de la cicatrización de heridas aumentando la capacidad de establecerse de la bacteria *P. aeruginosa*. (Hauser, 2009).

Finalmente, otro factor secretado es el pigmento piocianina, el cual puede ocasionar efectos proinflamatorios y oxidativos que dañan a las células.

El quorum sensing (QS) es un factor ampliamente estudiado, el cual es un proceso de comunicación célula-célula bacteriana en el que las células producen, detectan y responden a moléculas señal extracelular llamadas autoinductores o acil-homoserina lactona (AHL). Estas moléculas dependen de la densidad de bacterias que coordinan la expresión de genes. Es así como, el QS controla comportamientos colectivos como la formación de biopelículas, la cual las hace más resistentes a antibióticos.

#### **4.7 Propiedades antivirulencia y antipatogénica de *A. adstringens***

La antivirulencia es un mecanismo antibacteriano que interfiere en la capacidad de los patógenos para establecerse mediante el bloqueo de la síntesis de sus factores de virulencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). En este sentido, se ha reportado que el extracto de hexano de la corteza del tallo y los ácidos anacárdicos del cuachalalate reducen la actividad de elastasa, la producción de piocianina y ramnolípidos de *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). Además, los ácidos anacárdicos inhiben la secreción de la fosfolipasa ExoU (Castillo-Juárez *et al.*, 2022).

Por otro lado, el extracto acuoso liofilizado también inhibe la producción de piocianina y la actividad elastolítica en bacterias (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). Recientemente, se demostró la capacidad antipatogénica de la corteza del tallo del cuachalalate en un modelo animal quemado e infectado con *Pseudomonas aeruginosa* (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). El método tradicional combina el lavado del tejido quemado con el extracto acuoso y la aplicación de la corteza pulverizada, lo que aumenta la supervivencia de los ratones al reducir el establecimiento de *P. aeruginosa* y la sepsis (Gómez-Salgado *et al.*, 2024).

Es importante destacar que el extracto acuoso, o los extractos de mediana y baja polaridad, carecen de actividad bactericida contra *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez *et al.*, 2013, Pérez-Contreras *et al.*, 2022); por lo tanto, se sugiere que sus efectos antibacterianos es debido a sus propiedades antivirulencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Gómez-Salgado *et al.*, 2024).

Por otra parte, la composición química de los extractos acuosos de la corteza del tallo ha sido menos estudiada, aunque se sugiere la presencia de saponinas debido a que, al agitarlo vigorosamente, genera espuma (González *et al.*, 1962, Gómez-Salgado *et al.*, 2024). De igual manera, no obstante que no contiene los triterpenos (masticadienónico y 3  $\alpha$ -hidroximasticadenónico) y ácidos anacárdicos (Gómez-Salgado *et al.*, 2024) se ha reportado que posee propiedades gastroprotectoras (Navarrete *et al.*, 1990), antiinflamatorias (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004), inmunomoduladoras (Ramírez-León *et al.*, 2012), antitumorales (González *et al.*, 1962), antipatogénicas (Gómez-Salgado *et al.*, 2024) y antivirulencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2013, Castillo-Juárez *et al.*, 2022).

En estudios recientes confirman la presencia de sarsasapogenina aislada de la corteza del tallo mediante extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> (Arenas-Quevedo y Gracia-Fadrique, 2024). Además, el análisis de redes moleculares se determinó en el extracto acuoso la presencia de derivados terpenoides del ácido cólico y panaxatriol, flavonoides como kaempferol-3-O-glucósido y catequinas como epicatequina, galato de epigalocatequina y galato de catequina (Gómez-Salgado *et al.*, 2024).

De tal manera, que las propiedades bioactivas del cuachalalate, en particular las relacionadas con su capacidad antipatogénica y su actividad antivirulencia, son muy prometedoras para desarrollar opciones de tratamiento efectivas y sostenibles para pacientes con quemaduras infectados con bacterias resistentes a los antibióticos (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Gómez-Salgado *et al.*, 2024).

#### **4.8. Descortezamiento de *A. adstringens***

Dadas las propiedades que presenta el cuachalalate, su uso ha aumentado y por consiguiente se lleva a cabo el descortezamiento no controlado del árbol. La corteza de cuachalalate se comercializa en mercados locales o regionales. Principalmente los recolectores de la corteza son habitantes de la localidad, sin embargo, también se da el caso de que las personas de otras localidades lleven a cabo el descortezamiento, pero, sin considerar la profundidad de corte ni la superficie descortezada, ocasionando daños en los tejidos vitales de los árboles.



Solares *et al.* (2012), mencionan que las principales áreas de oferta y demanda de la corteza de cuachalalate son el estado de Morelos, la Mixteca poblana y el norte de la cuenca del Río Balsas, la recolección promedio anual es de 57.5 toneladas. Detectaron cinco canales de comercialización que corresponden al Canal de exportación; Canal de acopiadores de Puebla-Tlaxcala; Canal centro de acopio Axochiapan, Morelos; Canal de comercialización en mercados de Morelos y; el principal canal de abastecimiento es el mercado de Sonora en la Ciudad de México, ya que es el medio por el cual se llega a los otros mercados de abastecimiento. En todos los canales de comercialización, el recolector es el que recibe la porción más pequeña del precio final.

A pesar de su importancia terapéutica, actualmente el cuachalalate solo ha sido catalogado en 2019 como una especie **Vulnerable** por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

Es por ello que, se han propuesto estrategias de manejo sustentable de este recurso, como es el “Manual para una producción sustentable de corteza de cuachalalate”, publicado por el INIFAP, en donde se presentan técnicas de descortezamiento, en donde se sugiere descortezar en placas de 60 cm de longitud y 50 % del perímetro del árbol, además, se recomienda que por ningún motivo se deben descortezar árboles menores de 10 años; se presentan tablas de productividad y manejo de plantaciones (Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002).

También se ha evaluado la capacidad de regeneración en el grosor y lateral de la corteza de cuachalalate y se reporta que esta tiene una alta capacidad de regeneración, aunque esto depende de diversos factores, como la temperatura, la temporada de lluvia o secas, el sexo del árbol, entre otros factores (Solares *et al.*, 2006).

Así mismo, Beltrán-Rodríguez *et al.* (2021), reportan que la capacidad de regeneración es mejor en árboles cosechados en la estación húmeda que en la seca, esto independientemente del sexo del árbol. Aunque se observó que los árboles hembras presentan una mayor capacidad de regeneración (de un 93 %) que los árboles machos (89 %), cuando son descortezados en temporadas húmedas y con un 50 % de descortezamiento. Sin embargo, no se recomienda hacer un descortezamiento selectivo,

ya que esto provocaría alteraciones en las poblaciones silvestres del cuachalalate. El efecto por descortezamiento no sólo modifica la estructura espacial y poblacional del cuachalalate, sino que también influye en la proporción de sexos, afectando así la conservación a largo plazo de *A. adstringens* (Beltran-Rodríguez *et al.*, 2024).

Por otro lado, son pocos los estudios de composición química que se han hecho relacionados con la época de cosecha y el sexo del árbol. De acuerdo con Olivera *et al.* (1999), el ácido masticadienónico y el 3- $\alpha$  hidroximasticadienónico presentan diferentes concentraciones en la corteza. En árboles femeninos se identificó una mayor acumulación de terpenos, presentándose el ácido masticadienónico en mayor proporción en el mes de febrero, de un 0.89 %, mientras que en el mes de noviembre la proporción fue de 0.24 % en peso seco.

A partir de la resina-látex exudada se ha identificado la presencia de los principales terpenos ya reportados en cuachalalate, sin embargo, no se recomienda el descortezamiento del árbol, ya que para obtener la resina se requiere lesionar la corteza haciéndola vulnerable a infecciones, además tampoco se ha cuantificado la concentración de estos terpenos (Olivera *et al.*, 1999).

Un aspecto importante por mencionar es que no se ha realizado un análisis de la concentración de otros compuestos activos como son los ácidos anacárdicos, los cuales tienen un gran potencial anticancerígeno, ni del ácido 3-epioleanólico (con propiedad gastroprotectora).

Finalmente, hasta el momento no se han realizado estudios relacionados con posibles diferencias de actividad biológica (eficacia farmacológica) en función del sexo, época de colecta, entre otros. Aunque se reporta que las plantas responden bien al descortezado profundo, el cual incluye xilema secundario funcional, lo ideal es ocupar partes renovables como las hojas, los frutos y las ramas, que permitan un uso sostenible de este recurso.

#### 4.9. Análisis por redes moleculares

Las moléculas de origen vegetal representan una porción química importante dentro del vasto universo de los productos naturales, la mayoría de ella sin explorar. En particular muchas innovaciones en el campo del análisis de mezclas complejas han tenido un gran avance en años recientes (Porras *et al.*, 2021). En este sentido la desreplicación (identificación de compuestos conocidos) es fundamental para identificar de manera rápida moléculas conocidas dentro de extractos o mezclas altamente complejas (Allard *et al.*, 2016). En particular, el uso de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) ha dado buenos resultados.

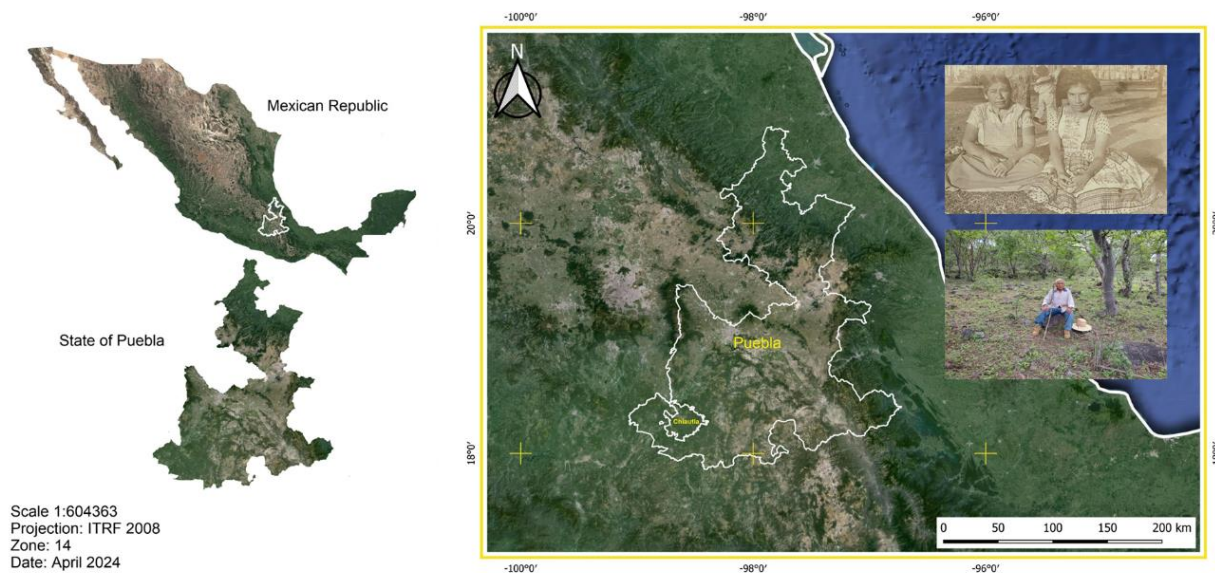
Esta metodología genera una gran cantidad de información detallada sobre la composición química de extractos altamente complejos (Allard *et al.*, 2016). De tal manera, que el análisis de la gran cantidad de información, requiere de enfoques bioinformáticos para procesamiento de datos con acceso a bases de espectros de masas y patrones de fragmentación de moléculas conocidas.

Una de las herramientas informáticas más relevantes dentro del estudio de los productos naturales son las Redes Moleculares (RM) (Molecular Networking) que facilitan la identificación y agrupación de moléculas. Las RM se introdujeron en 2012 y hoy en día representan una herramienta novedosa de desreplicación que se basa en la organización de una gran cantidad de espectros de masas en tándem (MS/MS), agrupándolos en relación con la base de datos de compuestos conocidos (Wang *et al.*, 2016). Uno de los repositorios de datos MS/MS más grande del mundo es la Red Social Molecular de Productos Naturales Globales (Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (Porras *et al.*, 2021).

## CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Área de estudio

La recolecta del material biológico se hizo con autorización del señor Daniel Aguilar Arista, dueño del terreno ubicado en la localidad de “Chiautla de Tapia”, estado de Puebla, en las Coordenadas  $18^{\circ}15'30.30''$ ,  $98^{\circ}35'0.9''$ , con una altitud de 1020 msnm, durante el mes de julio del año 2022 (Figura 6).

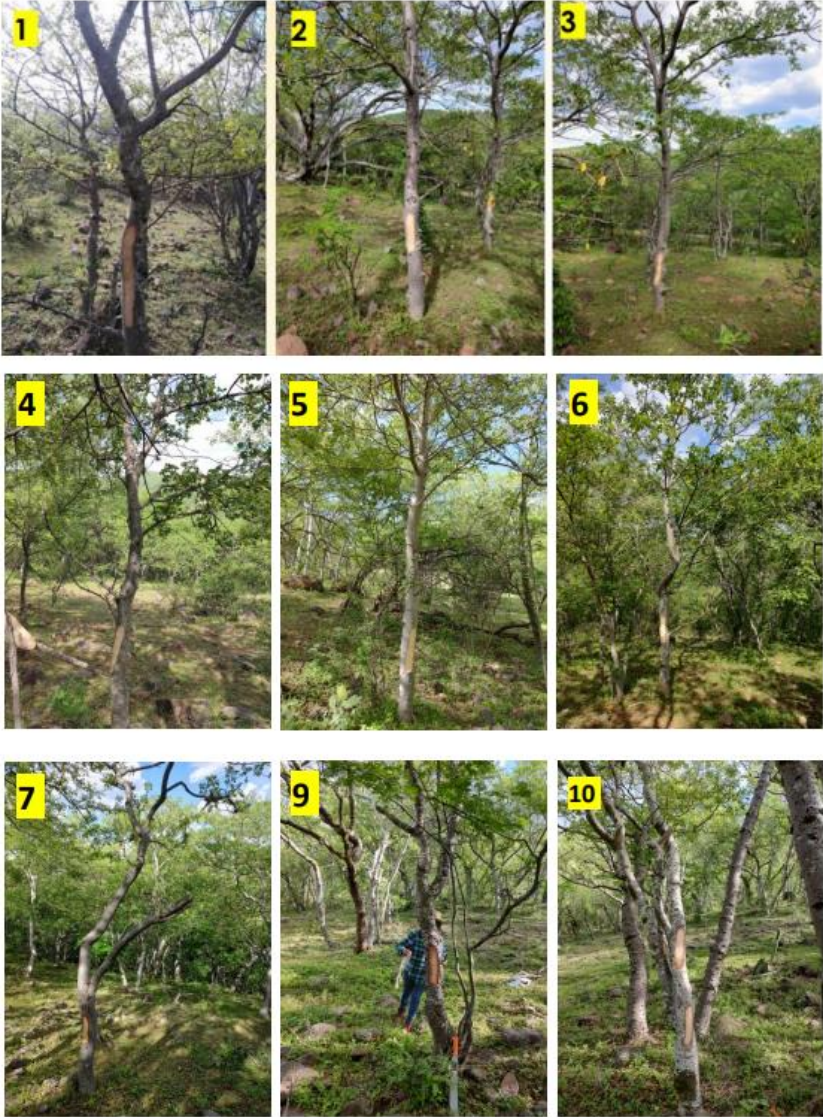


**Figura 6.** El Centro sur de México es la principal área de distribución de *A. adstringens*. En Chiautla de Tapia, Puebla, la corteza del tallo se vende localmente. Sin embargo, las técnicas destructivas de descortezado y el cambio de uso del suelo para la agricultura y la ganadería han reducido drásticamente las poblaciones naturales del árbol. En la foto se muestran mujeres de origen mixteco y el Sr. Daniel Arista Aguilar en un bosque de cuachalalate de su propiedad.

### 5.2. Colecta de material vegetal

Se hizo un muestreo no probabilístico, se seleccionaron y marcaron 10 árboles de diámetro de tallo principal entre 30 y 55 cm (Figura 7) de los cuales se tomaron muestras de aproximadamente 40 cm de corteza del tallo (Figura 8) y se cortó una rama con ramas adyacentes. Las muestras se etiquetaron con la información de procedencia: fecha, sitio, municipio, diámetro del eje principal y sexo del árbol. Se tomaron ejemplares con frutos y hojas para hacer la identificación taxonómica con el apoyo del Dr. Jorge Alberto Gutiérrez Gallegos, y un ejemplar se resguardó en el Herbario de la Facultad de Estudios

Superiores Zaragoza (FEZA) de la UNAM con número de etiqueta de identificación FEZA 19745 (Holmgren *et al.*, 1990).



**Figura 7.** Representación de los árboles de cuachalalate seleccionados y marcados para su posterior recolecta.

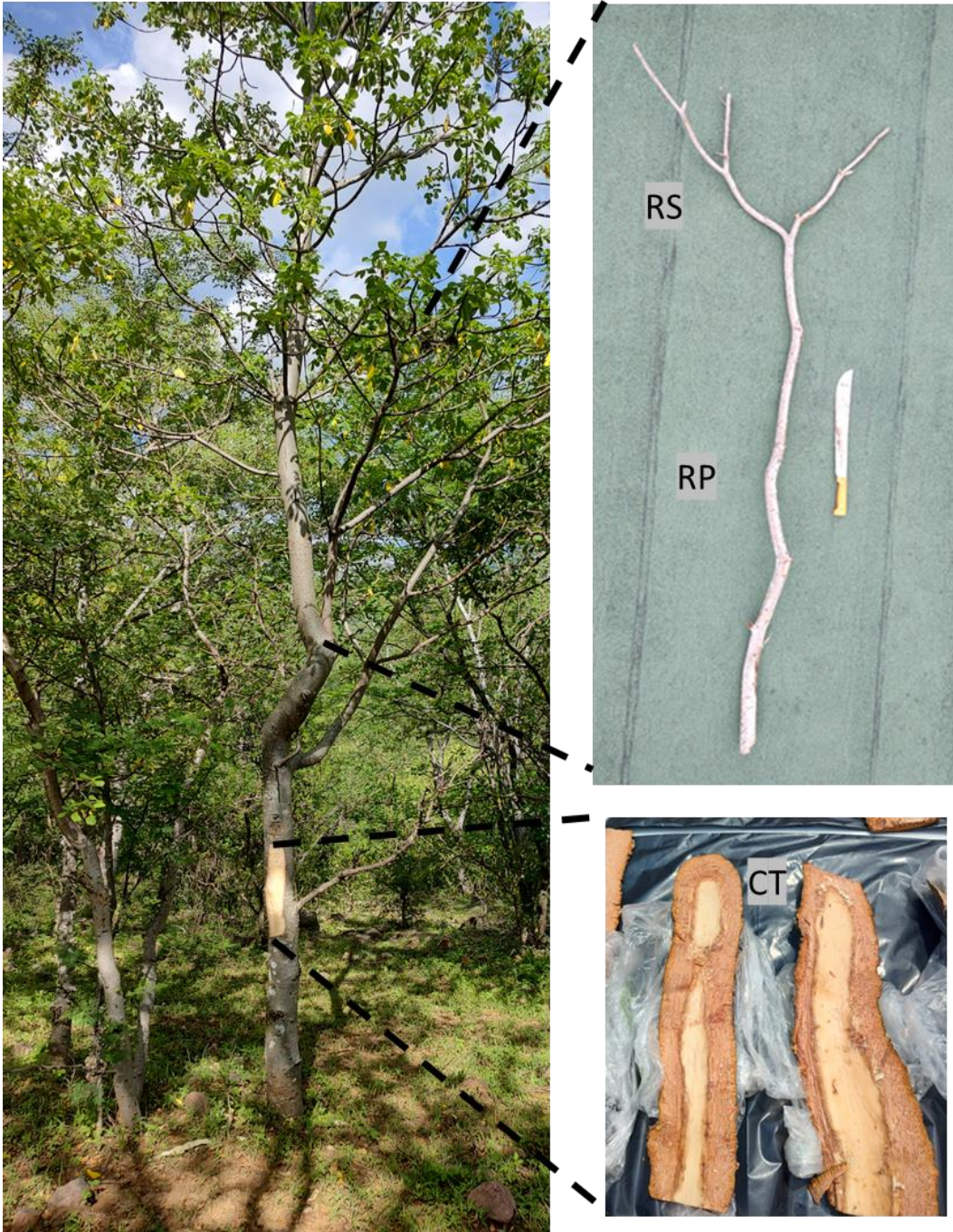




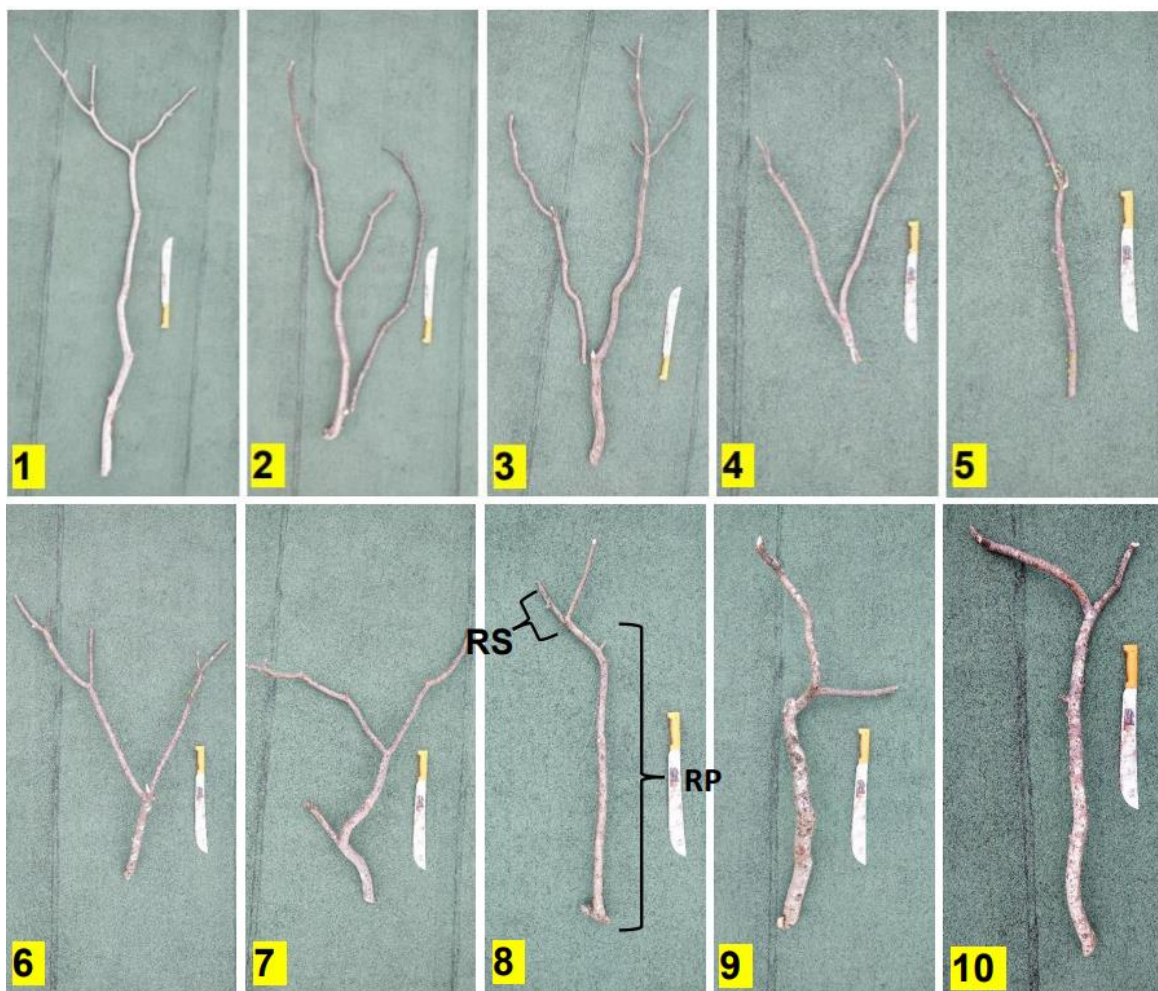
**Figura 8.** Árbol de cuachalalate. Corteza del tallo principal de aproximadamente 40 cm.

En el laboratorio se clasificaron las ramas: la primera división se consideró como la rama primaria, la segunda división como la rama secundaria y así sucesivamente (Figuras 9 y 10), cada una de ellas se descortezaron. Todas las muestras se secaron al aire libre y al sol, posteriormente se trituraron con un molino mecánico.





**Figura 9.** Árbol de cuachalalate. Representación de las ramas primarias (RP), secundarias (RS) y corteza del tallo (CT).

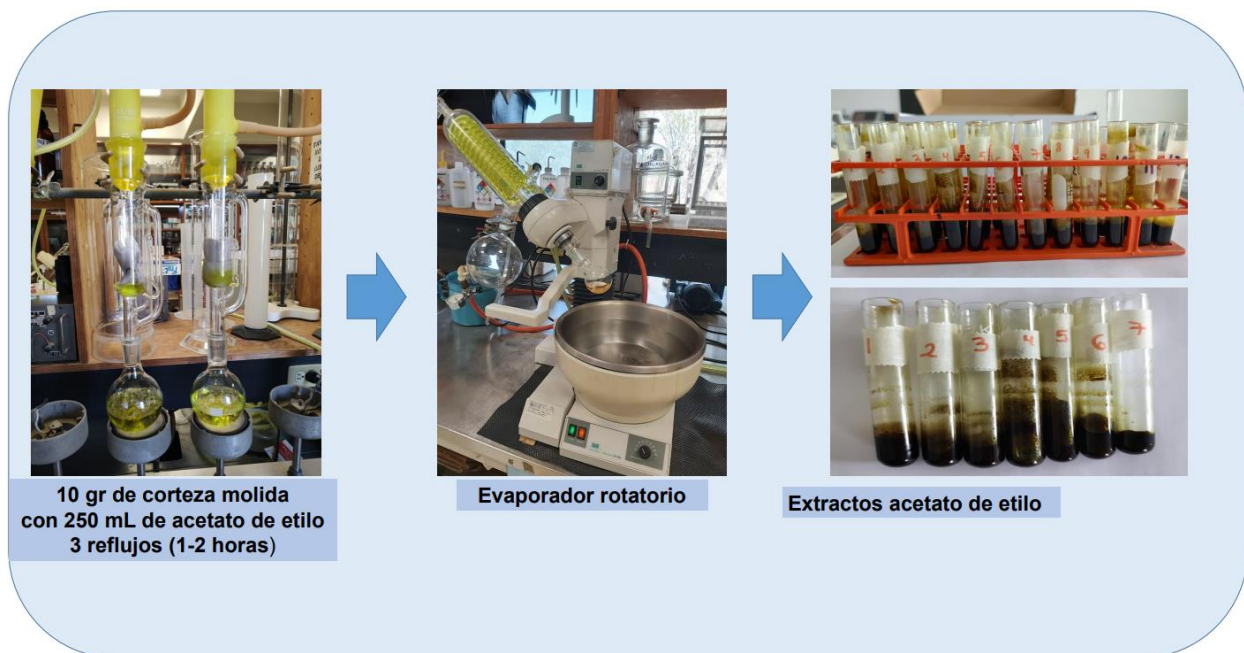


**Figura 10.** Árbol de cuachalalate. Rama de aproximadamente 1.5 m, junto a un machete. Representación de las ramas primarias (RP) y secundarias (RS).

### 5.3. Extractos orgánicos con acetato de etilo

Una vez que se obtuvo la corteza molida, se tomaron 10 g de cada muestra y se hizo una extracción continua con aparato Soxhlet con 250 mL de acetato de etilo (J.T. Baker) (7:3). Se hicieron tres reflujos, de aproximadamente dos horas. El disolvente se eliminó por presión reducida con un evaporador rotatorio (BUCHI-R114) (Figura 11).





**Figura 11.** Proceso para la obtención de los extractos de las cortezas con acetato de etilo.

La identificación preliminar de los compuestos del extracto de las cortezas con acetato de etilo, se hizo mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando las referencias del ácido masticadienónico, el ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico y ácidos anacárdicos que son los principales metabolitos bioactivos identificados en la corteza del tallo.

Se utilizaron cromatoplasmas de aluminio recubiertas de gel de sílice (TLC sílica Gel 60 F254 Merck de 0.25 mm de espesor con soporte de aluminio de 20 x 20 cm). El sistema de elución fue hexano-acetato de etilo (7:3) y se reveló con vainillina + ácido sulfúrico al 1 %.

#### **5.4. Extractos acuosos**

Se prepararon extractos acuosos de las tres cortezas (del tallo, ramas primarias y ramas secundarias). Se usaron 10 g de corteza en 200 mL de agua, las cuales se llevaron a decocción durante diez minutos. El extracto obtenido se guardó en tubos falcón en congelación. Posteriormente, las muestras se colocaron en la liofilizadora durante tres días. Una vez liofilizadas las muestras, se disolvieron en metanol (45 mL) y se dejaron en agitación durante una noche. Luego se filtraron las muestras con papel Whatman No. 1 y el filtrado se evaporó en un evaporador rotatorio (BUCHI-R114). El concentrado se

recuperó con un poco de metanol y se guardó en tubos eppendorf para el análisis de redes moleculares.

### **5.5. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)**

Se tomaron 10 mg/mL de los extractos con acetato de etilo (EtOAc) y se disolvieron en metanol por sonicación durante tres minutos. La separación de las muestras se hizo en placas HPTLC de gel sílice (20 X 10 cm, F254) adquiridas en Merck (Darmstadt, Alemania). El análisis se hizo en un sistema CAMAG-HPTLC (Muttenz, Suiza) equipado con un aplicador de muestras (ATS4), un desarrollador de cámara automático (ADC2), un visualizador (versión 2), un derivatizador de inmersión automático (versión 1.0 AT) y una placa caliente (versión 3).

Todos los extractos se aplicaron en bandas de 6 mm con 10 mm entre cada banda. Había 20 mm desde el borde izquierdo y derecho de la placa hasta cada muestra del borde, y las muestras se aplicaron 10 mm por encima del fondo de la placa cromatográfica. Se aplicó una muestra de control de calidad de todas las muestras, en el extremo derecho de cada placa cromatográfica.

Las muestras se separaron con un sistema de elución de hexano: EtOAc (7:3, v/v). El tiempo de saturación de la cámara se fijó en 20 minutos y la humedad se fijó en 47 % utilizando una solución saturada de KSCN. Después del desarrollo, las placas se secaron y derivatizaron automáticamente con anisaldehído sulfúrico a 100 °C por tres minutos.

Las imágenes de las placas se obtuvieron bajo luz blanca de reflectancia/transmisión. Para la representación visual y el análisis de datos multivariados, las imágenes de las placas se procesaron con rTLC (Fichou *et al.*, 2016). Las dimensiones de extracción de datos fueron las mismas utilizadas para la aplicación de la muestra. Para la extracción de datos, se utilizaron 28 píxeles como dimensión de integración y los datos del canal gris se normalizaron con la muestra de control de calidad de cada placa correspondiente y se utilizaron para análisis posteriores.

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó utilizando información entre el rango de Rf 0.14 – 0.37, que correspondía a las bandas de ácido anacárdico, ácido

masticadienónico y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico. El modelo se amplió según la varianza unitaria (VU) y el gráfico de puntuación se coloreó según el tipo de rama. Este análisis se hizo con apoyo del Dr. Luis Francisco Salomé-Abarca. En la Figura 12 se puede observar el equipo para llevar a cabo el análisis por HPTLC.



**Figura 12.** Imagen representativa del equipo automatizado para el análisis de las muestras por HTPLC. Imagen tomada y cedida por Marina Vera Ku del CICY.

## 5.6. Redes moleculares

Se efectuó con el apoyo del Dr. José Rivera Chávez del Instituto de Química de la UNAM. Las muestras del extracto acuoso liofilizadas y extraídas con metanol, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 2 mg/mL y se sometieron a un sistema HPLC-EM-SQ-TOF Agilent G6530AB. Se logró la separación utilizando una columna de fase inversa Gemini-NX C18 (3  $\mu$ m, 2.0 x 75 mm; Phenomenex) con un sistema de elución binario de CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (ácido fórmico al 0.1 %). El gradiente inició en una proporción de 15:85 y alcanzó gradualmente 100:0 durante un período de ocho minutos, seguido de una retención isocrática de 1.5 minutos. El flujo se mantuvo constante a 0.4 mL/minuto.

Para el análisis de espectrometría de masas, se empleó el modo de ionización positiva dentro del rango de 100 a 2500 m/z, con los iones más abundantes seleccionados por ciclo para la fragmentación utilizando el modo automático (Auto MS<sup>2</sup>).

Para el procesamiento de datos se hizo un análisis clásico para Molecular Network (MN) en el Sitio Web GNPS. Los archivos sin formato (.d) se convirtieron en archivos mzML, utilizando el programa MSConvert2 y luego fue transferido al servidor GNPS para su análisis. Para el análisis de MN, se aplicaron parámetros específicos: se filtraron los iones del fragmento MS<sup>2</sup> dentro de  $\pm 0.5$  Da del precursor m/z, y las tolerancias tanto para el precursor como para las fragmentaciones se establecieron en 0.5 Da.

Para formar conexiones entre los nodos de la red, se asignaron valores de borde en función de una puntuación de coseno superior a 0.7 y al menos seis picos deben ser alineados. Posteriormente, los picos MN se compararon con los presentes en las bibliotecas espectrales GNPS. Para garantizar la coherencia los espectros de la biblioteca también se filtraron utilizando los mismos parámetros. Para obtener información sobre la diversidad estructural de las moléculas contenidas en las muestras, se realizó un análisis MolNetEnhancer.3.

La visualización gráfica y la edición de las redes moleculares se realizaron utilizando Cytoscape 3.9.1,4 y a los grupos se les asignaron colores según la subclase química.

### **5.7. Evaluación de la actividad antipatogénica de un método tradicional con la corteza de las ramas**

Para la evaluación del método tradicional con la corteza de las ramas de cuachalalate se prepararon los extractos acuosos y se pulverizaron las cortezas como se indica en Gómez-Salgado *et al.* (2024) y que se ilustra en la Figura 13.

Para el extracto acuoso, se usaron 50 g de la corteza de las ramas primarias y secundarias. Las muestras se pusieron en decocción con un litro de agua potable (Epura®) durante diez minutos de ebullición. Posteriormente, el extracto se vació en tubos falcón y se guardó en congelación para ser usados durante los tratamientos.



**Figura 13.** a) Extractos acuosos de corteza de cuachalalate; b) corteza pulverizada.

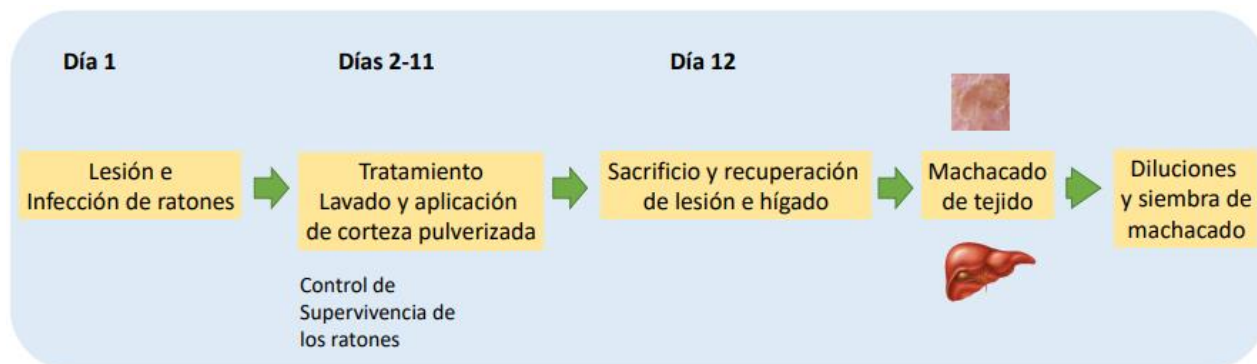
**Modelo animal:** La actividad antipatogénica se determinó en un modelo de quemadura e infección con *P. aeruginosa* en ratones (DeLeon *et al.*, 2009). Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 de seis a ocho semanas y el desarrollo experimental se realizó en el Laboratorio de Investigación y Aplicación de Fitoquímicos Bioactivos, siguiendo las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para manejo y uso de animales de laboratorio. El protocolo fue previamente aprobado por el Comité de Bienestar Animal del Colegio de Postgraduados (número de protocolo: COBIAN/016/23) (Anexo 1).

**Preparación de los animales:** Veinticuatro horas antes de inducir la quemadura y la infección, los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con 24 mg/kg de pentobarbital sódico (Pisabental, PiSA) y se eliminó el pelo del dorso con rasuradora eléctrica (Wahl) y removedor tópico (Loquay®). Se alojaron de 10 a 15 ratones por jaula (32 x 47 x 20 cm) en camas de aserrín estéril, con acceso libre al alimento (Lab rodent diet 5001, LabDiet ®) y agua, con un ambiente controlado de 23 a 27 °C y ciclos de luz oscuridad de 12 horas.

**Preparación del inóculo:** Un mililitro de cultivo de *P. aeruginosa* PA14 crecido por una noche en medio LB se ajustó a una D.O. 600 nm = 0.08, que equivale a  $10^6 - 10^7$  unidades formadoras de colonias (Spectronic®, Genesys™). Posteriormente, el cultivo bacteriano se lavó con solución inyectable estéril y centrifugó a 4000 x g (Microfuge E BECKMAN) durante cinco minutos. Este proceso se repitió dos veces y la pastilla bacteriana final se homogenizó en un mililitro de solución para inocular en las lesiones de los animales.

**Desarrollo experimental:** El primer día se anestesiaron vía intraperitoneal con 24 mg/kg de pentobarbital sódico (Pisabental, PiSA). Posteriormente, los ratones se colocaron en un templete metálico con una abertura de 1 x 2 cm, para exponer la zona dorsal afeitada en agua a 90°C durante diez segundos y producir una quemadura de tercer grado (DeLeon *et al.*, 2009).

Después del procedimiento, se mantuvieron en una fuente de calor (lámpara incandescente) para evitar la muerte por hipotermia debida a la alta dosis del anestésico empleado. Posteriormente, se inocularon en la lesión 0.1 mL de inóculo bacteriano ( $10^6$  UFC) de *P. aeruginosa* PA14WT (Figura 14). Inmediatamente después, se aplicó la terapia de reemplazamiento de fluidos que consiste en una inoculación subcutánea de 0.1 mL de solución Hartman (solución HT, PiSA). A su vez, se hizo la cuenta viable para determinar las UFC (Reynolds, 2005). Del inóculo final se tomaron 100  $\mu$ L de bacterias y se hicieron diluciones seriales 1/10, en volúmenes de 900  $\mu$ L de agua inyectable. Se tomaron las diluciones pares y se sembraron en placas de medio LB + agar. Estas se incubaron a 28° C durante 3 días.



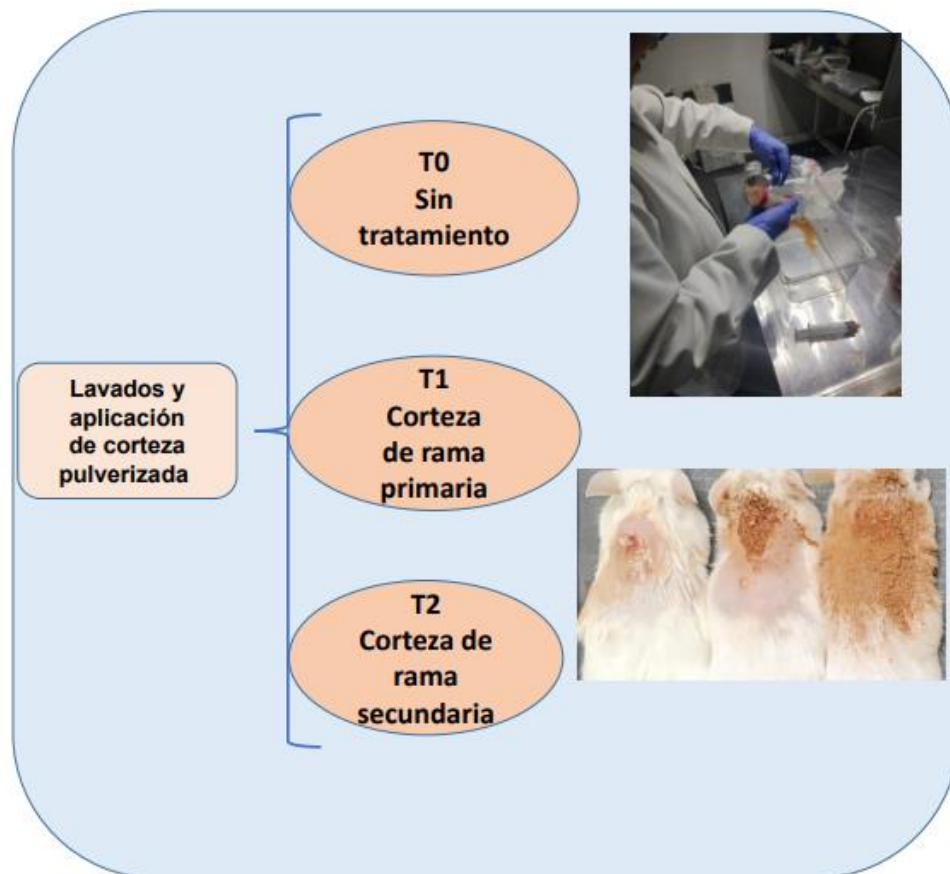
**Figura 14.** Modelo murino de lesión e infección con *P. aeruginosa*.

En ese mismo día, después de la infección se aplicaron los tratamientos con corteza de acuerdo con el método descrito por Gómez-Salgado *et al.* (2024), que consiste en hacer lavados de la herida con el extracto acuoso de la corteza (al 5%) y la aplicación de la corteza pulverizada hasta cubrir la lesión (Figura 15).

**Grupos experimentales:** Se consideraron tres grupos con *n* de diez animales: (T0) es el grupo control sin tratamiento; (T1) grupo al que se le hizo lavado con extracto acuoso



y se colocó corteza pulverizada de ramas primarias y (T2) grupo al que se le hizo lavado con extracto acuoso y corteza pulverizada de ramas secundarias. El tratamiento se aplicó cada 24 horas durante 12 días, se observó el estado general de los animales y se registró la mortalidad cada 24 horas. Para reducir las molestias en los animales se administró analgésico (Temptra) en sus bebederos.

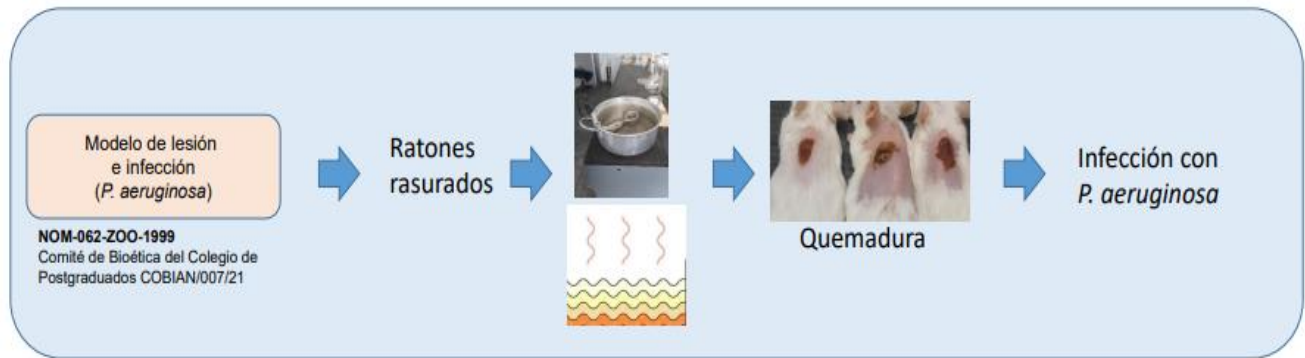


**Figura 15.** Aplicación de tratamiento por el Método tradicional (Gómez-Salgado *et al.*, 2022).

**Toma de muestras:** Pasados los 12 días de tratamiento, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico y sacrificados por dislocación cervical para recuperar lesión e hígado y determinar la presencia de la bacteria mediante el método de recuento viable y se expresaron en UFC/g de tejido.

El material se dejó preparado un día previo. Se consideraron dos tubos falcón por cada ratón y siete tubos eppendorf con 900  $\mu$ L de agua inyectable para hacer las diluciones. De cada uno de los ratones sobrevivientes, se tomó la lesión y una parte de hígado y se

colocaron en tubos falcón con 3 mL de agua inyectable, se homogenizaron y del sobrenadante de cada tubo se tomó 100  $\mu$ L para hacer diluciones seriales 1/10, en volúmenes de 900  $\mu$ L de agua inyectable y las placas se incubaron a 37 °C durante dos días (Figura 16).



**Figura 16.** Diagrama general de aplicación del método tradicional.

## 5.8. Evaluación de la actividad antivirulencia

Debido a que *P. aeruginosa* es una bacteria patógena que usa los sistemas de percepción de quorum para regular los mecanismos que median el daño del hospedero (Castillo-Juárez *et al.*, 2013), se evaluó la actividad anti-quorum sensing de los extractos con acetato de etilo de la corteza del tallo del cuachalalate y de la corteza de las ramas primarias y secundarias. Los factores que se evaluaron fueron la formación de biopelículas, la actividad caseinolítica y la actividad piocianina.

**Cepas bacterianas:** Se utilizó *P. aeruginosa* PA14 silvestre y  $\Delta lasR/\Delta rhIR$  que es una doble mutante QS como control positivo. Se reactivaron previamente en placas con medio Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich) colocadas en una cámara con ambiente controlado a 37 °C durante 24 h (Thermo Scientific ®).

**Extractos con acetato de etilo:** Los extractos se prepararon de soluciones madre de 10 mg mL<sup>-1</sup> y se usaron a concentraciones finales en los ensayos *in vitro* de 250, 500 y 1000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.



### **5.8.1. Formación de biopelícula**

Los cultivos previos se ajustaron a una D.O.  $660\text{ nm} = 0.1$ , se transmitieron a tubos de vidrio y se incubaron durante 48 h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  (de Oca *et al.*, 2015). Posteriormente, los tubos se lavaron con agua destilada y se secaron a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de agregar 1 mL de cristal violeta al 0.1 % e incubar durante 20 minutos, se repitió el procedimiento. Finalmente, el cristal violeta se solubilizó con 1 mL de etanol al 80 % y se midió la absorbancia a 570 nm. Los datos se normalizaron con crecimiento bacteriano a 660 nm.

### **5.8.2. Actividad caseinolítica**

Los cultivos se centrifugaron a 13, 000 rpm durante dos minutos. En microplacas de 96 pozos (Sarstedt), se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante con 100  $\mu\text{L}$  de azocaseína al 1.2 % (Tris-base 20 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 8) y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 35 minutos. Luego se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a tubos con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  al 1 % (la agitación fue suave) y se centrifugaron a 13, 000 rpm durante dos minutos. Finalmente, en la placa con 96 pozos, se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con 150  $\mu\text{L}$  de NaOH al 0.5 % y se midió la D.O. a 440 nm (Victor NIVO).

### **5.8.3. Producción de piocianina**

La piocianina se obtuvo siguiendo el método descrito por Juárez-Rodríguez *et al.* (2021). Las bacterias PA14 WT,  $\Delta\text{lasR}/\Delta\text{rhIR}$ , se reactivaron en 5 mL de LB líquido y agitación a 200 rpm (Heidolph, Multi Reax) en una cámara con ambiente controlado,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Se tomó 1 mL del cultivo, el cual se ajustó a una D.O.  $600\text{ nm} = 0.08$ , que equivale a  $10^7$ - $10^8$  UFC. Los cultivos bacterianos se lavaron dos veces (4000 x g (Microfuge E Beckman), durante cinco minutos) con PBS y se suspendieron en 1 mL de LB. Posteriormente, se adicionaron los extractos para obtener las concentraciones finales de los tratamientos. Las muestras se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm por 24 horas. Finalmente, se centrifugaron a 4000 x g y cinco min y recuperó 0.8 mL de los sobrenadantes. Se agregaron 0.40 mL de cloroformo a los sobrenadantes y agitaron en un vórtex (vórtice 2, IKA®) durante dos minutos. Después se centrifugaron (4000 x g y 5 min) y se recuperó la fase orgánica, a la cual se añadió 0.08 mL de ácido clorhídrico 0.2 N. Las muestras se

agitaron vigorosamente durante un min, luego a 0.65 mL de la fase acuosa se agregaron 0.65 mL de agua destilada. La piocianina se cuantificó a una D.O. de 520 nm.

### **5.9. Análisis estadísticos**

Los datos experimentales se analizaron con SigmaPlot versión 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Alemania). En los pies de figura se indican las diferentes pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas utilizadas (Figura 23).

## **CAPÍTULO VI. RESULTADOS**

### **6.1. Características generales de la corteza de cuachalalate**

A partir de la recolecta de corteza en una población silvestre de cuachalalate, se obtuvieron los siguientes datos: se seleccionaron tres árboles hembras y siete árboles machos (de acuerdo con su disponibilidad), con un diámetro del tallo principal que varió de entre 34 y 52 cm. Además, se pudo observar datos interesantes de color de la corteza del tallo, ya que su patrón varía independientemente del sexo del árbol de un color rojizo-rosáceo a blanquecino. En el caso de las ramas, la coloración de la corteza se notó de un color blanquecino, sin haber una relación con el color de la corteza del tallo. Tales diferencias, no son perceptibles después del secado, ya que tornan a un color marrón-rojizo, aunque se nota que es más fibrosa y delgada la corteza de las ramas que la del tallo principal, permitiendo que se trituren más fácilmente. Así mismo, el grosor del cambium vascular es más grueso en la corteza del tallo que el de las ramas superiores. En el Cuadro 2, se pueden observar los datos registrados de la corteza.

**Cuadro 2.** Datos obtenidos del muestreo.

<b>Muestras corteza</b>	<b>Sexo</b>	<b>Diámetro del tallo principal</b>	<b>Rama</b>	<b>Color de la corteza</b>
A1	Hembra	34	Primaria secundaria	Roja
A2	Hembra	43	Primaria secundaria	Blanca
A3	Hembra	52	Primaria secundaria	Blanca
A4	Macho	40	Primaria secundaria	Blanca
A5	Macho	49	Primaria secundaria	Blanca
A6	Macho	39	Primaria secundaria	Blanca
A7	Macho	52	Primaria secundaria	Roja
A8	Macho	48	Primaria secundaria	Roja
A9	Macho	49	Primaria secundaria	Roja
A10	Macho	38	Primaria secundaria	Roja

En cuanto a los extractos orgánicos, obtenidos con acetato de etilo, la textura era viscosa con un color verde oscuro y se obtuvo un rendimiento similar en corteza del tallo, corteza de ramas primarias y corteza de ramas secundarias. Para el caso de los extractos acuosos (al 5%), la coloración fue rojiza y formaban espuma al ser agitados, el liofilizado de este extracto presentó un rendimiento del 10 % en los tres tipos de corteza (Figura 17)



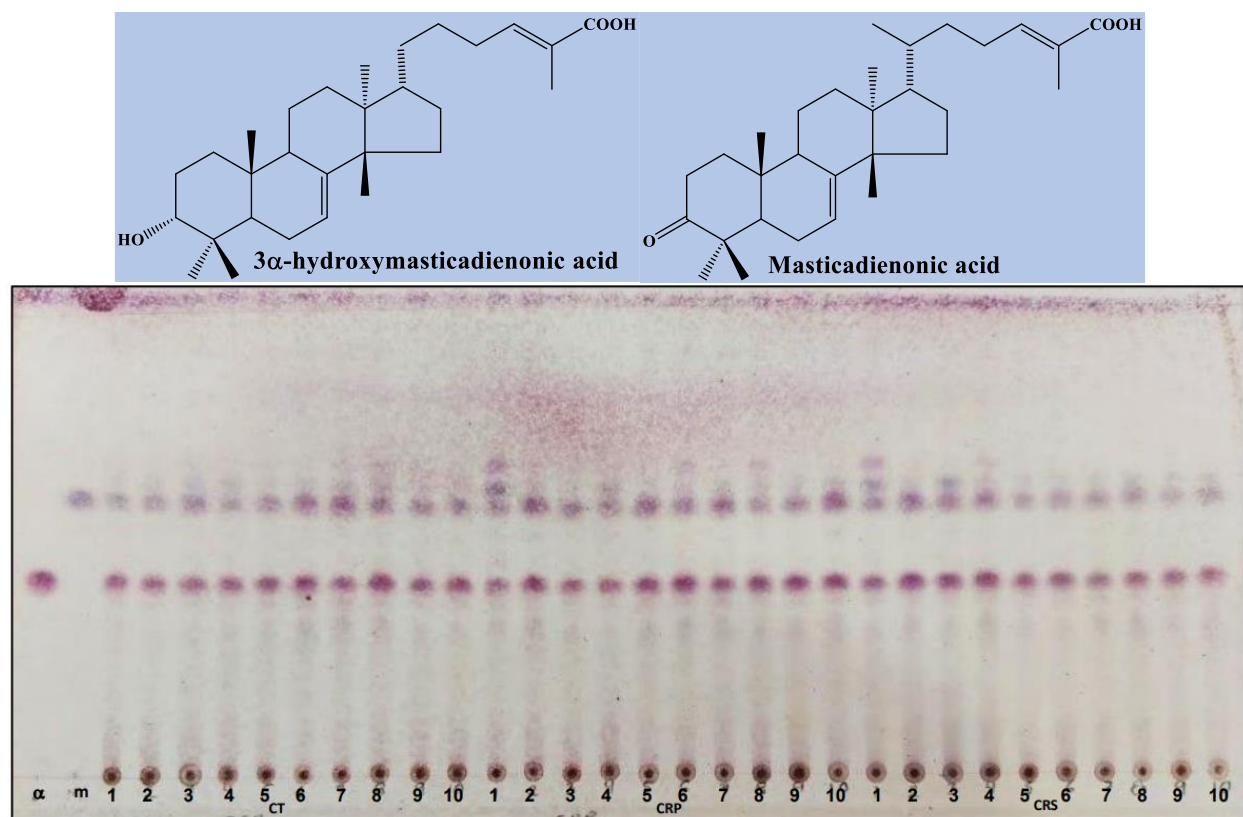
**Figura 17.** Cortezas de cuachalalate. CT= Corteza de tallo; CRP= Corteza de ramas primarias y CRS= Corteza de ramas secundarias. a) color de la corteza; b) corteza pulverizada; c) extracto con acetato de etilo de las cortezas; d) corteza seca de cuachalalate; e) extracto acuoso de cuachalalate; f) liofilizado de la corteza.

A partir de la corteza del tallo y de las ramas primarias y secundarias se obtuvieron extractos por extracción Soxhlet con acetato de etilo, los cuales se usaron para hacer una Cromatografía en capa fina (CCF) y determinar la presencia de los principales compuestos bioactivos ya reportados del cuachalalate. Las muestras de referencia fueron: el ácido masticadienónico, el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y los ácidos anacárdicos.

## 6.2. Cromatografía en capa fina de los extractos con acetato de etilo

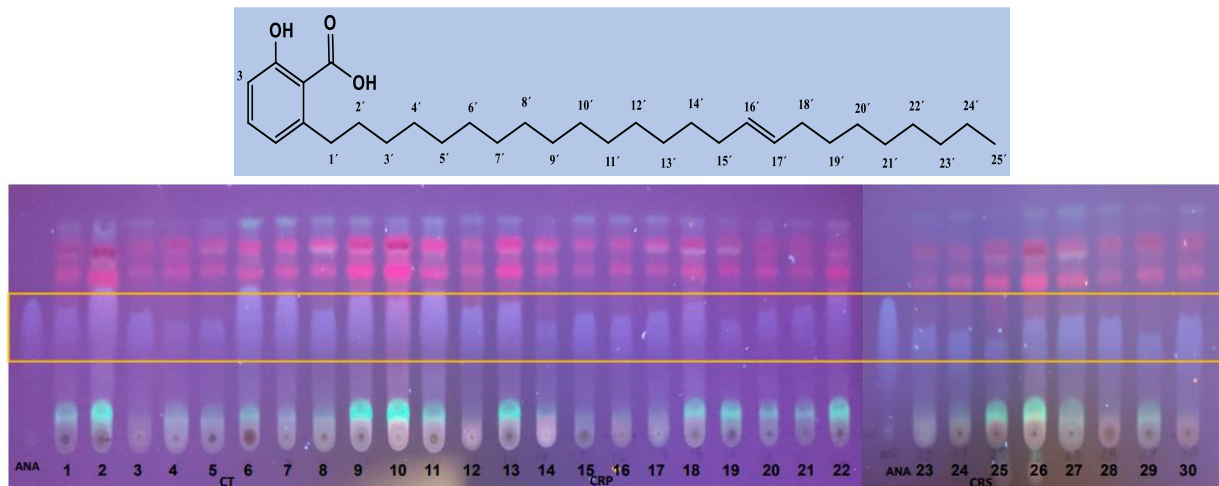
Con base en los resultados obtenidos, en el perfil cromatográfico por CCF (Figura 18), se pudo observar la presencia de los principales compuestos terpénicos (ácido masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico), en las cortezas de ramas primarias y secundarias. En la CCF, los carriles número 1 al 10 corresponden a la corteza del tallo, del 11 al 20 corresponden a la corteza de ramas primarias y del 21 al 30 corresponden

a la corteza de ramas secundarias. Como se puede observar, ambos compuestos terpénicos están presentes en todas las muestras.



**Figura 18.** Cromatografía en capa fina de los extractos con acetato de etilo. Referencias  $\alpha$  = ácido  $\alpha$ -hidroximasticadienónico; m = ácido masticadienónico. CT=Corteza del tallo (1-10); CRP= corteza de ramas primarias (11-20) y CRS= corteza de ramas secundarias (21-30). Sistema de elución hexano-acetato de etilo (7:3), revelado con vainillina + ácido sulfúrico al 1%.

Por otro lado, se presenta un perfil cromatográfico con fenoles de cadena larga como referencia (los ácidos anacárdicos). En la Figura 19 se representa la molécula y el carril 1 al 10 corresponden a la corteza del tallo; los carriles 11 al 20 corresponden a la corteza de ramas primarias y del carril 21 al 30 corresponden a la corteza de ramas secundarias. Como se puede observar, en todas las muestras están presentes los ácidos anacárdicos con su característica forma de cohete y que, al ser observados bajo luz ultravioleta a una longitud de onda alta, se observan que fluorescen (enmarcados con color amarillo).

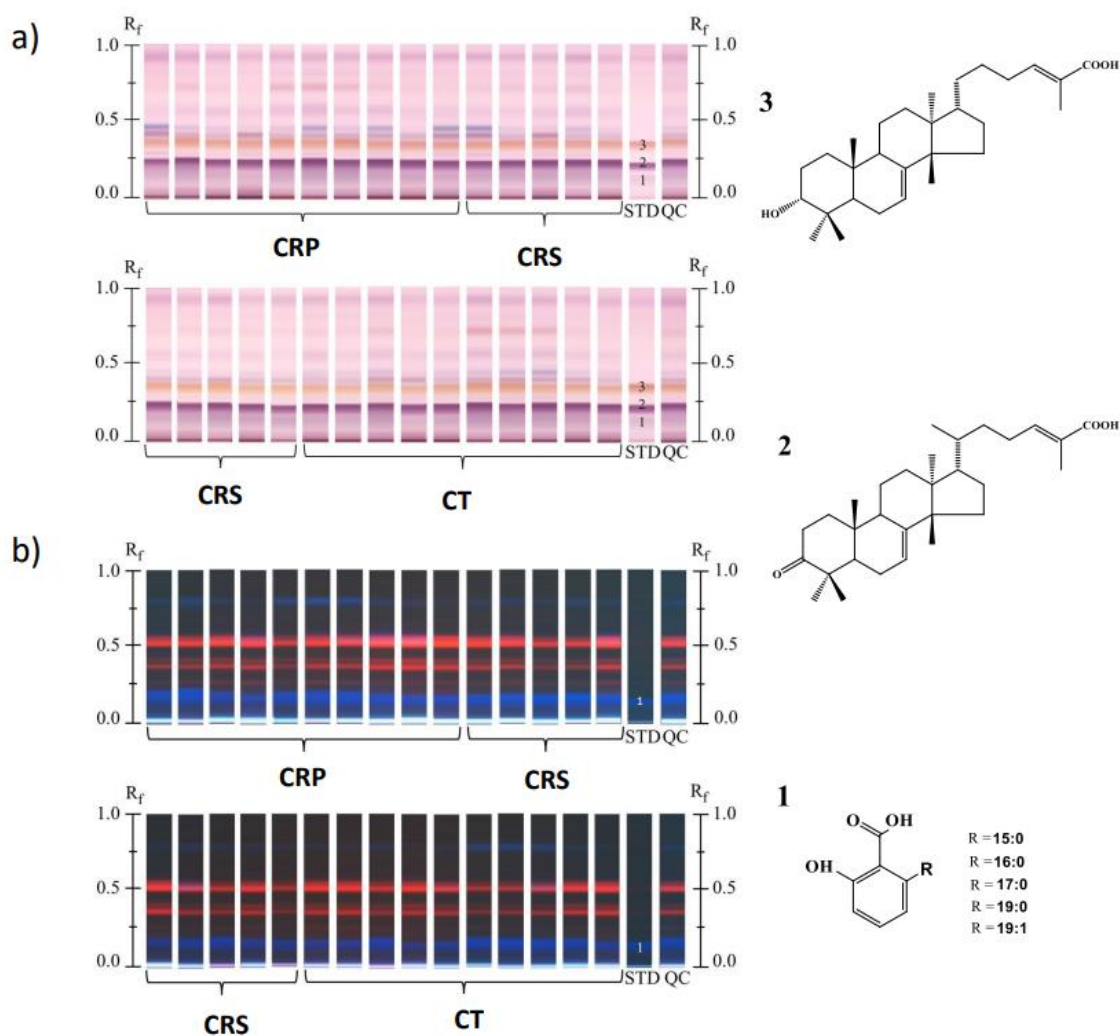


**Figura 19.** Cromatografía en capa fina de los extractos con acetato de etilo de cortezas. Referencia ANA = ácidos anacárdicos. CT=Corteza del tallo (1-10); CRP= corteza de ramas primarias (11-20) y CRS= corteza de ramas secundarias (21-30). Sistema de elución hexano-acetato de etilo (7:3), se observó bajo luz ultravioleta de longitud alta a 254 nm.

Al observar la presencia de los principales compuestos bioactivos se procedió a llevar a cabo la cuantificación de dichos compuestos por HPTLC.

### 6.3. Cuantificación de metabolitos bioactivos por HPTLC

La inspección visual de las placas cromatográficas indicó pequeñas diferencias cuantitativas entre replicas biológicas y tipo de rama (Figura 20), no obstante, el área que mostraba los tres compuestos de la corteza de cuachalalate mostró diferencias no significativas entre todas las muestras.

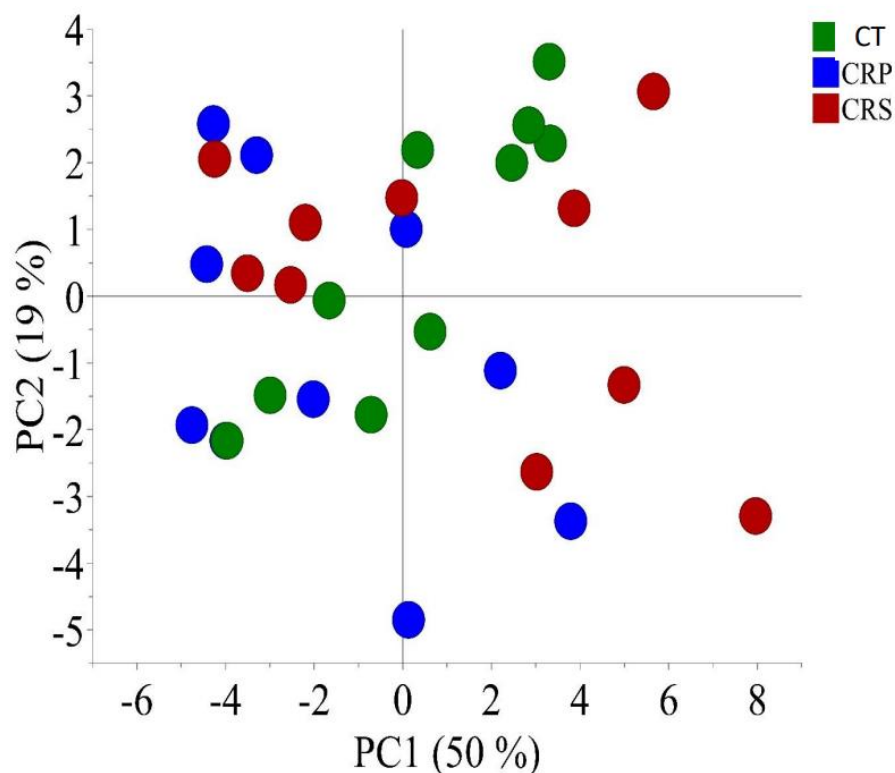


**Figura 20.** Identificación de metabolitos bioactivos por HPLC en el extracto con acetato de etilo de las cortezas. a) Placas derivatizadas con anisaldehído-ácido sulfúrico. b) Placas visualizadas con luz ultravioleta. STD = estándares de referencia: 1, mezcla de ácidos anacárdicos; 2, ácido masticadienónico; 3, ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico. QC extracto hexánico de corteza del tallo de cuachalalate (Gómez-Salgado *et al.*, 2024), es el control de calidad. CT= Corteza del tallo, CRP= Corteza de ramas primarias, CRS= Corteza de ramas secundarias.

Para obtener más información sobre estas posibles diferencias, los datos cromatográficos fueron analizados mediante PCA. El modelo resultó en cuatro componentes principales (PCs) que explicaron 87 % de la variabilidad del modelo ( $RX^2_{cum} = 0.87$ ). El PC1 capturó 50 % de la variabilidad del modelo, mientras que el PC2 capturó únicamente el 19 %. No obstante, no se observó diferenciación de grupos en el gráfico de puntuación, lo cual es indicativo de que prácticamente no existen



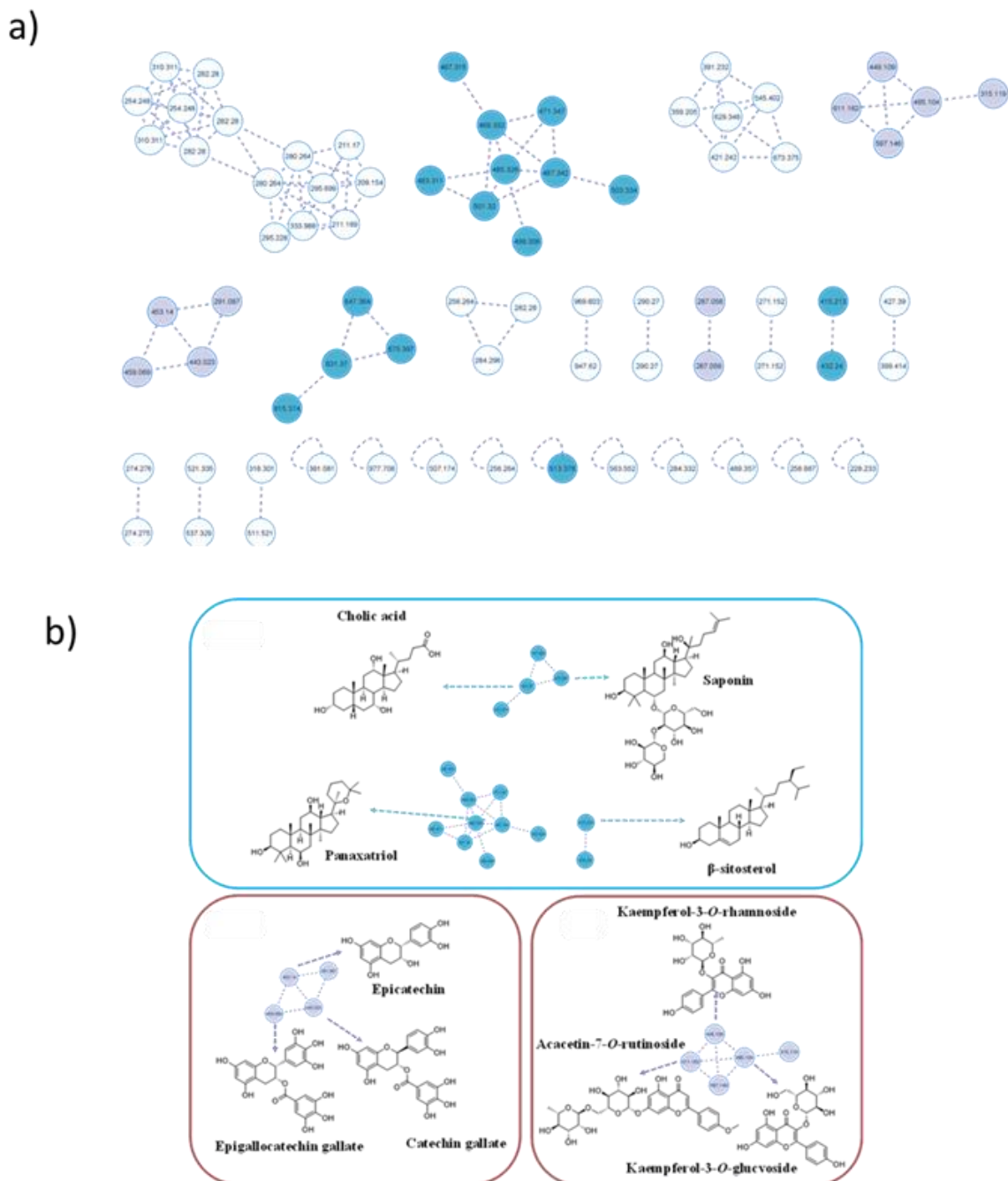
diferencias cualitativas ni cuantitativas en el contenido de ácido anacárdico (Rf 0.14), ácido masticadienónico (Rf 0.23) y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (Rf 0.37) entre la corteza del tallo y ramas primarias y secundarias del cuachalalate (Figura 21).



**Figura 21.** Análisis de Componentes Principales (PCA), CT= Corteza de tallo, CRP= Corteza de ramas primarias, CRS= Corteza de ramas secundarias.

#### 6.4. Análisis de redes moleculares en extracto acuoso de ramas primarias y secundarias

La diversidad química presente en las muestras de corteza de ramas primarias y secundarias fue analizada por redes moleculares MN (Molecular networking). Las redes se construyeron considerando 740 espectros de espectrometría en masas (MS), los cuales están condensados en 110 nodos agrupados en 62 grupos formando 16 familias moleculares (grupos de espectros de fragmentación con un alto grado de similitud, representados como un cluster de nodos conectados en la red) y 46 nodos aislados (Figura 22). El análisis de MN utilizando el MolNetEnhancer mostró la presencia de terpenoides, flavonoides y catequinas en las muestras.



**Figura 22.** Análisis de los componentes químicos de los extractos acuosos de cuachalalate. a) Red molecular generada a partir de los datos MS<sup>2</sup>. La construcción de esta red implicó el algoritmo MolNetEnhancer. b). Ejemplos seleccionados de redes moleculares y sus correspondientes compuestos desreplicados.

El análisis de desreplicación permitió la identificación putativa de algunas moléculas: entre los terpenoides se detectaron el ácido cólico, saponinas,  $\beta$ -sitosterol y panaxatriol, mientras que los compuestos polifenólicos epicatequina, galato de epigallocatequina,

galato de catequina, kaempferol-3-O-ramnósido, kaempferol-3-O-glucósido y acacetina-7-O-rutinósido fueron identificados de forma putativa. Las catequinas, ácido cólico,  $\beta$ -sitosterol, saponinas, flavonoides, son compuestos que comparten los extractos acuosos de la corteza de ramas primarias y secundarias.

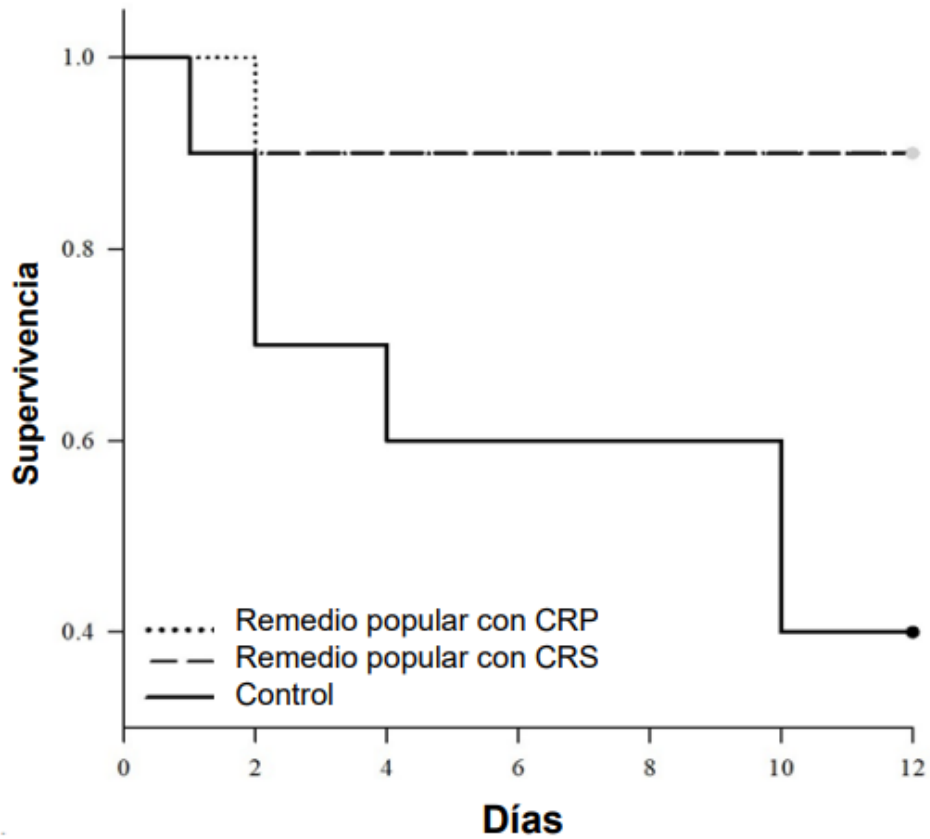
### **6.5. La corteza de las ramas tiene actividad antipatogénica**

En un estudio previo utilizando un método tradicional y un modelo de quemadura en ratones, se demostró la capacidad antipatogénica de la corteza del tallo de cuachalalate (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). El procedimiento tradicional consistió en lavar la quemadura infectada con el extracto acuoso de la corteza del tallo y aplicar la corteza molida (Gómez-Salgado *et al.*, 2024).

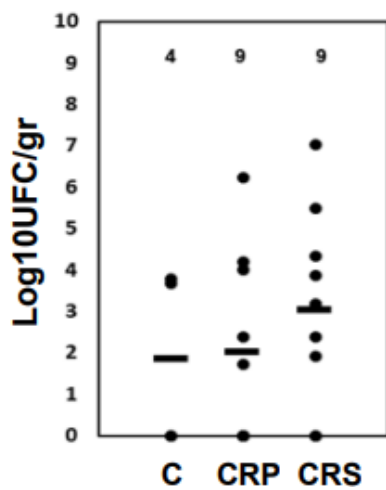
Aplicando el método tradicional con la corteza de las ramas, también registramos la capacidad antipatogénica. En el modelo de quemaduras, los animales no tratados sucumbieron a la infección dentro de las primeras 24 horas, y esta tendencia se mantuvo hasta los 12 días cuando se registró una tasa de supervivencia final del 40%. En comparación con el grupo tratado con el método tradicional, se evitaron las muertes de los animales y se registró una supervivencia del 90% (Figura 23a).

Aunque el método tradicional con las ramas de corteza no redujo el establecimiento de las bacterias en el tejido quemado de los animales sobrevivientes (Figura 23b), el tratamiento evitó la dispersión sistémica ya que no se registraron bacterias en los hígados (Figura 23c).

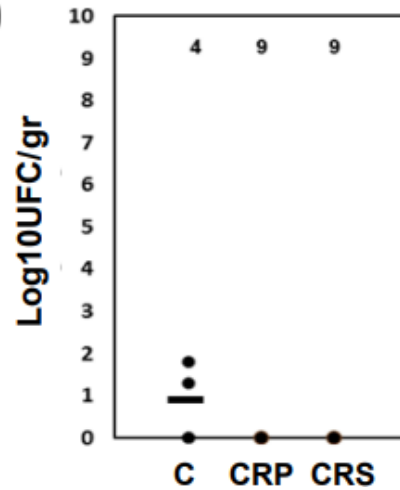
a)



b)



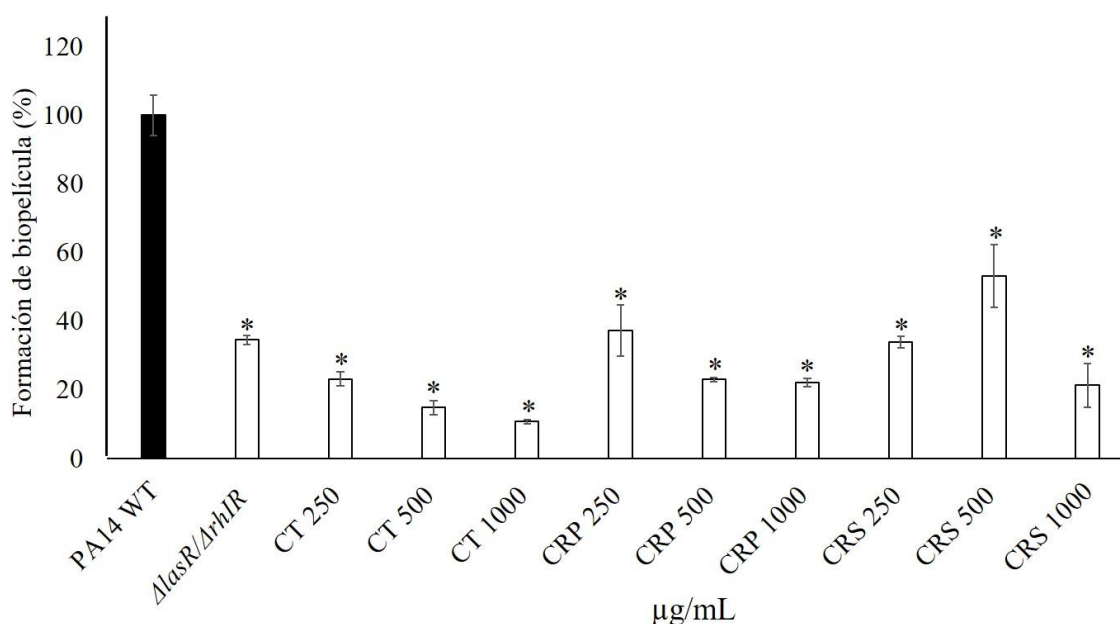
c)



**Figura 23.** Actividad antipatógena del método tradicional con corteza de ramas primarias (CRP) y ramas secundarias (CRS) de cuachalalate; Control sin tratamiento (C). a) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier; b) Establecimiento de *P. aeruginosa* en el tejido quemado; c) La presencia de la bacteria en el hígado determina la dispersión de la bacteria. n = 10. \*p = 0.05.

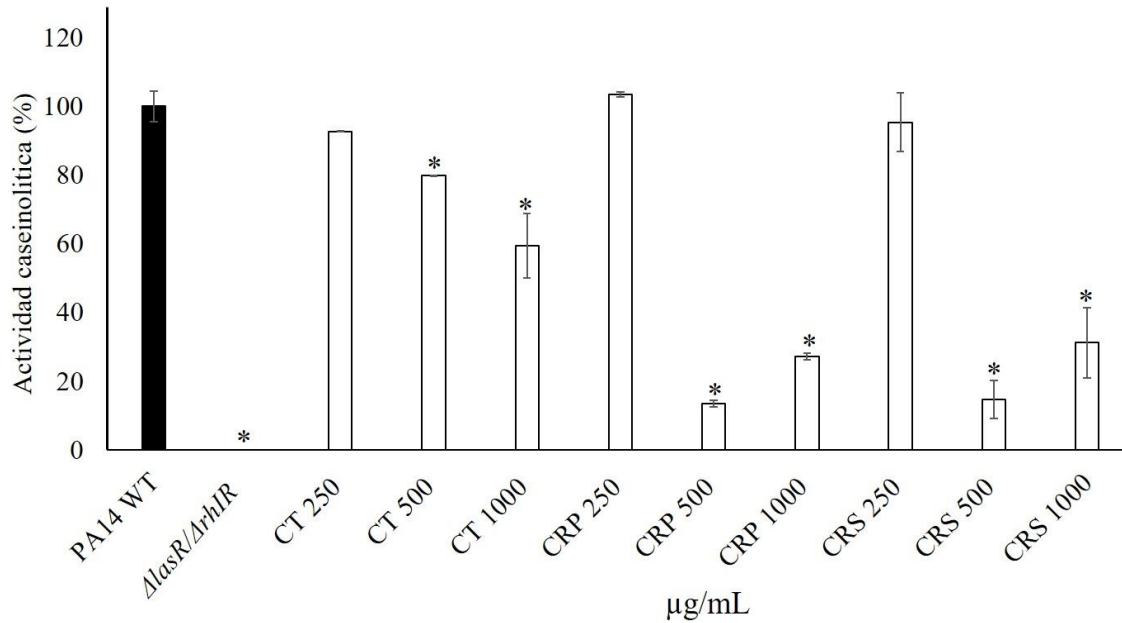
## 6.6. Inhibición de factores de virulencia controlados por QS

Los resultados muestran que los extractos con acetato de etilo de las cortezas inhiben la producción de formación de *biopelícula* en forma dosis/respuesta. El extracto con acetato de etilo de la corteza del tallo tuvo inhibición del 90% a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que los extractos con acetato de etilo de las ramas primarias y secundarias tuvieron inhibición del 80 % a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 24).



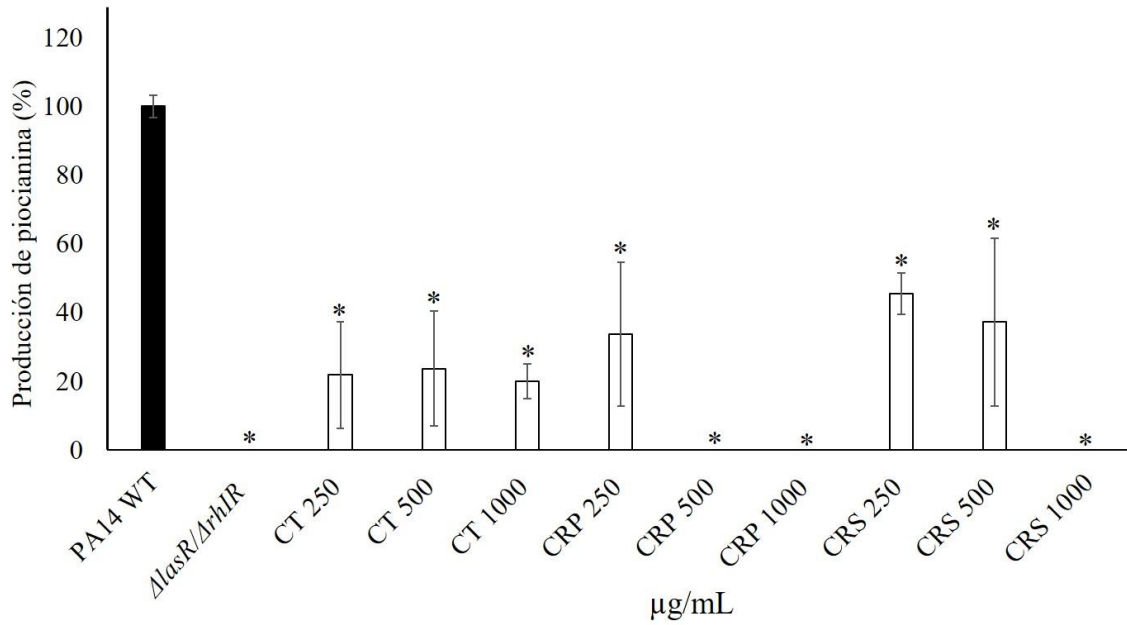
**Figura 24.** Efecto del Extracto con acetato de etilo en la producción de Biopelícula de PA14. Los extractos empleados fueron de la corteza del tallo (CT), corteza de ramas primarias (RP) y de corteza de ramas secundarias (RS). Las concentraciones empleadas fueron a 250  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$  y 1000  $\mu\text{g/mL}$  para cada extracto.  $\Delta lasR/\Delta rhIR$ = QS doble mutante utilizado como control positivo. \* $p = 0.05$ .

Para la actividad **caseinolítica**, el efecto inhibitor se observa a partir de la concentración de 1000  $\text{mg/mL}$ , con un 40 % de inhibición en corteza del tallo. Mientras que, los extractos de la corteza de ramas tanto primarias como secundarias, tuvieron un efecto a una concentración de 500  $\text{mg/mL}$  con un 80 % de inhibición (Figura 25).



**Figura 25.** Actividad caseinolítica del extracto con acetato de etilo de la corteza del tallo (CT), corteza de ramas primarias (RP) y corteza de ramas secundarias (RS). Las concentraciones fueron a 250  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$  y 1000  $\mu\text{g/mL}$  para cada extracto.  $\Delta lasR/\Delta rhIR$ = QS doble mutante utilizado como control positivo. \* $p = 0.05$ .

Para la producción de **piocianina**, el efecto inhibitor se observa a partir de la concentración más baja probada que fue de 250  $\text{mg/mL}$ , con un 45 % de inhibición en corteza del tallo (Figura 26).



**Figura 26.** Actividad picocianina del extracto con acetato de etilo de la corteza del tallo (CT), corteza de ramas primarias (RP) y corteza de ramas secundarias (RS). Las concentraciones fueron a 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL para cada extracto.  $\Delta lasR/\Delta rhIR$ = QS doble mutante utilizado como control positivo. \* $p = 0.05$ .

## CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN

La selva baja caducifolia (SBC) de México se distribuye principalmente en la vertiente del Pacífico mexicano hasta Chiapas, con algunas áreas al norte de la Península de Yucatán (CONABIO, 2014). Se estima que su superficie cubre 11.7% del territorio nacional y contiene muchas especies vegetales endémicas (Trejo y Dirzo 2000). Además, al estar sujeta a cambios estacionales en el clima, su aspecto fenológico es diferente en la época de secas, donde las plantas pierden sus hojas para compensar el déficit de humedad (Trejo, 2005). Reportes alarmantes indican que la mitad de la cobertura original de la SBC ya ha desaparecido, y la pérdida continúa a una tasa estimada de 2% anual (Trejo y Dirzo 2000). Esta vegetación única se encuentra bajo amenaza por la explotación descontrolada, la ganadería extensiva, el cambio de uso del suelo y la alteración de los patrones climáticos (Dirzo *et al.*, 2011; Osorio-García *et al.*, 2018; Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2018).

Una especie que destaca de la SBC es el “cuachalalate”, *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl., una especie de árbol endémico de México y Centroamérica (Cuevas-Figueroa, 2005). *A. adstringens* es una especie usada ampliamente desde tiempos prehispánicos para tratar diversos padecimientos. Sus propiedades como cicatrizante, calmante, antibiótico, hipocolesterolémico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antitumoral, entre otros (Argueta, 1994; Méndez, 1954; Navarrete *et al.*, 1989; Solares *et al.*, 1992, 2006, 2012; Solares, 1995, 2009; Wences, 2010), lo hacen un candidato importante para el desarrollo de nuevos planes de salud combinando el conocimiento tradicional con el científico. Cabe señalar que en el género *Amphipterygium* se reconocen cuatro especies (*A. adstringens*, *A. molle*, *A. glaucum* y *A. simplicifolium*) que habitan en México, pero sólo a la especie *adstringens* se le ha investigado sus propiedades bioactivas (Sotelo-Barrera *et al.*, 2022).

La amplia demanda y el descortezamiento desmedido de este recurso hacen necesario implementar medidas de protección para evitar su agotamiento. Se calcula que la recolección media anual de la corteza es de 57.5 toneladas (Solares *et al.*, 2012). Además de las incorrectas prácticas de descortezamiento que causan la muerte del 60



% de los árboles (Solares *et al.*, 2006); la tala del árbol o la eliminación completa de la corteza del tallo, contribuyen en la pérdida de poblaciones silvestres de cuachalalate (Martínez, 1996; Solares y Gálvez-Cortés, 2002). En este sentido, se recomienda descortezar árboles adultos en láminas de 60 cm que no superen el 50 % del perímetro del eje principal y se debe evitar hacerlo en árboles juveniles de menos de diez años (Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002).

Cabe mencionar que esta planta es nativa de México y no es una especie que se cultive y actualmente se encuentra bajo el estatus de vulnerable por la UICN (2019). Así mismo, los reportes indican que el cuachalalate presenta un alto porcentaje de frutos sin semilla, lo cual sugiere que la reproducción sexual represente una limitante en el mantenimiento de las poblaciones (Guzmán-Pozos y Cruz-Cruz, 2014). Esto se debe a diversos factores, como la baja capacidad de reproducir estructuras reproductivas, el lento crecimiento del árbol, la escasez de la especie, entre otros (Martínez-Pérez *et al.*, 2012). En el caso de la recolecta hecha en la localidad de Chiahutla de Tapia, se observó mayor presencia de árboles machos.

Por otro lado, aunque en trabajos previos se asocia la coloración rojiza de la corteza con árboles femeninos (Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002), en este estudio observamos que esta coloración se presentó tanto en árboles machos como en hembras. Se sabe que la colecta tradicional de cuachalalate se enfoca en los árboles de coloración rojiza, sin embargo, es importante que no se haga un descortezamiento selectivo (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2021). Por lo tanto, es necesario realizar estudios comparativos sobre la composición química o bioactividad de las especies y color de la corteza.

Algunos estudios indican que la corteza tiene una alta capacidad de regeneración, aunque esto puede variar dependiendo de la temperatura, la época de lluvias y el sexo del árbol (Solares *et al.*, 2006). Se reportó que la capacidad de regeneración del cuachalalate es mayor del 90 % en individuos descortezados durante la época de lluvias, independientemente del sexo de los árboles (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2021). Estos datos proporcionan información valiosa para promover un manejo sostenible (Solares-Arenas y Gálvez-Cortés, 2002; Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2020). Sin embargo, aún no se ha

determinado la calidad de la corteza regenerada ni cuántas veces es posible descortezar el árbol antes de comprometer su viabilidad.

Por otro lado, las propuestas que se sugieren para un manejo sostenible consideran a la corteza del tallo como la única fuente bioactiva. En este trabajo se demostró que los principales compuestos bioactivos (triterpenos y ácidos anacárdicos) ya reportados en la corteza del tallo, también están presentes en la corteza de ramas primarias y secundarias. Así mismo, no se registraron diferencias significativas en los análisis cualitativos y cuantitativos respecto a las muestras de corteza.

De tal manera, que conocer la composición, concentración y bioactividad de los metabolitos de ramas primarias y secundarias, permite desarrollar estrategias de manejo sostenible basado en podas controladas del cuachalalate, con el fin de evitar que desaparezcan las poblaciones silvestres de esta especie.

Por otra parte, es importante señalar que los triterpenos y los ácidos anacárdicos se extraen con disolventes orgánicos como el hexano o acetato de etilo y no están presentes en extractos acuosos (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). La forma tradicional del uso es mediante el extracto acuoso, presentando propiedades como gastroprotector, antiinflamatorio, antitumoral y antivirulencia (Sotelo-Barrera *et al.*, 2022). Entre las características particulares del EA está la formación de espuma al ser agitado vigorosamente, lo cual indica la presencia de saponinas (González *et al.*, 1962; Gómez-Salgado *et al.*, 2024), y esta misma característica se pudo observar en extractos acuosos de ramas primarias y secundarias. El análisis de redes moleculares también permitió identificar compuestos glicosilados en extractos acuosos de corteza de dichas ramas.

En estudios previos, se demostraron las propiedades de la corteza de tallo en la reducción de la virulencia de *P. aeruginosa* y su efecto benéfico en el tratamiento de quemaduras infectadas con esta bacteria (Gómez-Salgado *et al.*, 2024). Cabe señalar que la efectividad del método tradicional depende de lavar el tejido quemado con el extracto acuoso y aplicar corteza pulverizada. Utilizando cuachalalate de esta manera, demostramos que la corteza de rama también es activa ya que reduce la muerte de

ratones al prevenir la dispersión de la bacteria y la sepsis, efecto similar al reportado para la corteza de tallo (Gómez-Salgado *et al.*, 2024).

Inhibir los factores y mecanismos que permiten a las bacterias patógenas establecerse y causar daño es una estrategia antibacteriana novedosa con el potencial de combatir infecciones sin generar resistencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). A diferencia de los antibacterianos bactericidas, los agentes antivirulencia interfieren con blancos específicos que regulan la producción de factores de virulencia sin afectar directamente la viabilidad de la bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2015).

Conocemos los mecanismos y sistemas responsables de producir factores de virulencia en *P. aeruginosa*, particularmente aquellos que le permiten resistir a los antimicrobianos (biopelículas) y aquellos que le causan daño, como las proteasas, elastasas, fosfolipasas y piocianina (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). Esta investigación también demuestra que los extractos orgánicos de la corteza de la rama exhiben capacidad antivirulencia *in vitro* ya que reducen significativamente la formación de biopelículas, la producción de piocianina y la actividad de las proteasas.

Cabe resaltar, que no obstante el principal interés del estudio fue analizar las propiedades antivirulencia y antipatogénicas del cuachalalate; la presencia de triterpenos y ácidos anacárdicos en la corteza de la rama sugiere que también puede tener actividad gastroprotectora, antiinflamatoria y antitumoral, aunque se requieren estudios complementarios para corroborarlo.

En contraste, la respuesta de los árboles a la remoción de corteza es un proceso complejo influenciado por varios factores. Estos incluyen la edad del árbol, la época de cosecha, el grado de remoción de corteza, la velocidad de cierre de la herida y la susceptibilidad del árbol a patógenos como insectos, hongos y microorganismos (Delvaux *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2023). Por lo tanto, la frecuencia de cosecha, la calidad de la corteza regenerada y el número de veces que se puede remover la corteza sin comprometer la supervivencia del árbol limitan las estrategias de sostenibilidad. Sin embargo, esta investigación identificó compuestos bioactivos y actividad biológica en la

corteza de la rama, lo que puede ayudar a proponer mejores estrategias y soluciones para el manejo sostenible del árbol de cuachalalate.

La obtención de la corteza de las ramas puede favorecer una cosecha sostenible. La poda controlada puede ofrecer ventajas y solucionar algunos problemas que se presentan con el uso de la corteza del tallo. El área expuesta a patógenos o deshidratación es mucho menor, por lo que es más fácil cubrir la zona dañada para ayudarla a sanar rápidamente. Al retirar ramas, no es necesario esperar a que la corteza se recupere para realizar otro descortezado y se mantiene la calidad del material. Asimismo, la corteza de las ramas es más delgada y contiene menos agua, lo que facilita su secado, transporte, almacenamiento y procesamiento. Si bien se requieren estudios complementarios, esta tesis es la base para diseñar plantaciones sanas de cuachalalate con producción sostenible, ya que su manejo no compromete la supervivencia del árbol y la calidad de la corteza provocada por el descortezado continuo.

## **CAPÍTULO VIII. CONCLUSIÓN**

En México, el comercio de especies medicinales es un sustento para muchas comunidades rurales. Sin embargo, en la cadena de comercialización del cuachalalate, los recolectores de corteza están experimentando una disminución en sus ganancias económicas y presenciando la rápida degradación de sus recursos naturales. Las propuestas aquí señaladas sugieren la poda controlada y el cultivo que favorezca el proceso de domesticación del árbol de cuachalalate, que permita conservar las poblaciones silvestres. Sin embargo, establecer estándares oficiales es un paso crítico para regular, proteger y certificar eficazmente el origen de la corteza, asegurando así la sostenibilidad a largo plazo de este comercio.

La cosecha no regulada de corteza de cuachalalate en las últimas décadas ha sido perjudicial y peligrosa para la supervivencia de sus poblaciones silvestres. Por lo tanto, es necesario desarrollar opciones de cosecha no destructivas y sostenibles. En este estudio, demostramos que no existen diferencias significativas entre los metabolitos bioactivos contenidos en la corteza del tallo y la corteza de las ramas, lo que también se reflejó en su actividad antipatogénica y antivirulencia. Por lo tanto, el uso de la corteza de las ramas como agente medicinal es una excelente estrategia que debe ser utilizada para prevenir la muerte de los árboles por descortezamiento del tallo.

## CAPÍTULO IX. LITERATURA CITADA

- Alam-Escamilla, D., Estrada-Muñiz, E., Solís-Villegas, E., Elizondo, G. and Vega, L. (2015). Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 777: 43–53.
- Alamilla, L. y Neyra, L. (2020). Plantas medicinales. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Cd. de México. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdicia. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>.
- Allard, P.M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham V. C., Roussi, F., Litaudon, M. and Wolfender, J.L. (2016). Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Anal Chem.* 15;88(6): 3317-23. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04804. Epub 2016 Mar 1. PMID: 26882108.
- Arbonnier, M. (2002). Arbres, arbustes et lianes des zones cèches d'Afrique de l'Ouest. Deuxième édition. *Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris, Quae, Versailles: 576 p.
- Arenas-Quevedo, M. G., y Gracia-Fadrique, J. (2024), *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) extract by supercritical CO<sub>2</sub>. *Chemical Thermodynamics and Thermal Analysis.* 13: 100128. <https://doi.org/10.1016/j.ctta.2024.100128>
- Argueta, V., Cano, I. y Rodarte, M. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Instituto Nacional Indigenista*, México D. F. 1: pp 58.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C. and Navarrete, Á. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* 69(10): 905–909.
- Beltrán-Rodríguez, L., Valdez-Hernández, J.I., Luna-Cavazos, M., Romero-Manzanares, A., Pineda-Herrera, E., Maldonado-Almanza, B., Borja de la Rosa, A. y Blancas-Vázquez, J. (2018). Estructura y diversidad arbórea de bosques tropicales caducifolios secundarios en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, Morelos, *Rev. Mex. Biodiv.* 89: 108-122. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.1.2004>
- Beltrán-Rodríguez, L., Cristians, S., Sierra-Huelsz, A., Blancas, J., Maldonado-Almanza, B. and Bye, R. (2020). Barks as non-timber forest products in Mexico: national analysis and recommendations for their sustainable use. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): México.

- Beltrán-Rodríguez, L., Valdez-Hernández, J. I., Saynes-Vásquez, A., Blancas, J., Sierra-Huelsz, J. A., Cristians, S., Martínez-Ballesté, A., Romero-Manzanares, A., Luna-Cavazos, M. and Borja de la Rosa, M. A. (2021). Sustaining medicinal barks: survival and bark regeneration of *Amphipterygium adstringens* (Anacardiaceae), a tropical tree under experimental de barking. *Sustainability*. 13: 1-19.
- Beltrán-Rodríguez, L., Romero-Manzanares, A., Ticktin, T., Blancas, J., Martínez-Ballesté, A., Gaoue, O. and Bye, R. (2024). Can debarking affect the sex ratio, population structure and spatial segregation? Insights of unsustainable harvesting in a Mesoamerican tropical tree. *Ethnobiology and Conservation*. 13:08. <https://doi.org/10.15451/ec2024-01-13.08-1-23>
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A. y Dilia Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales 30(8), 453-459. Recuperado en 20 de junio de 2024, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442005000800005&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005&lng=es&tlng=es).
- Bertrand, B., Morales-Martínez, A., Hernández-Adame, P. L. and Muñoz-Garay, C. (2023). Multirresistencia a antibióticos y alternativas para resolver esta crisis. *Revista Digital Universitaria* (RDU). 24(3). <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2023.24.3.1>
- Bravo, L., Bermúdez, T. and Montes, B. (2000). Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Rev. Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica). 57:29-34
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. and Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal Ethnopharmacology*. 114(1): 72–77.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. and Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal Ethnopharmacology*. 122(2): 402–405.
- Castillo-Juárez, I., García-Contreras, R., Velázquez-Guadarrama, N., Soto-Hernández, M. and Martínez-Vázquez, M. (2013). *Amphipterygium adstringens* anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Med Res*. 44(7): 488–494. ISSN 0188-4409. [10.1016/j.arcmed.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.004) <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.004>
- Castillo-Juárez I., Maeda T., Mandujano-Tinoco E. A., Tomás M., Pérez-Eretza B., García-Contreras S. J., Wood T K. and García-Contreras R. (2015) Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases* 3(7): 575-598.
- Castillo-Juárez, I., Díaz-Núñez, J. L., Soto-Hernández, R. M., González-Pedrajo, B., García-Contreras, R. y Martínez-Vázquez, M. (2022). Formulación para el control de *Pseudomonas*. MX Patent 13, 132998. December.

- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2014). Los tipos de vegetación de México y su clasificación', Edición conmemorativa 1963-2013. Faustino Miranda y Efraím Hernández-X Ediciones Científicas Universitarias. 214 pp
- Corrales, R. I. E. y Reyes, C. J. J. (2015). Actividad etnofarmacológica y antimicrobiana de los componentes químicos de las plantas medicinales utilizadas en Estomatología. 54(257):71-83.
- Cuevas-Figueroa, X. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). Ibguna: *Boletín del Instituto de Botánica*. 13(1): 27-47.
- DeLeon K., Balldin F., Watters C., Hamood A., Griswold J., Sreedharan S. and Rumbaugh K.P. (2009). *Gallium maltolate* treatment eradicates *Pseudomonas aeruginosa* infection in thermally injured mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(4): 1331-7.
- Delvaux, C., Sinsin, B. and Van Damme, P. (2010). Impact of season, stem diameter and intensity of debarking on survival and bark re-growth pattern of medicinal tree species, Benin, West Africa. *Biological Conservation*. 143(11), 2664-2671. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.07.009>
- de Oca-Mejía, M.M., Castillo-Juárez, I., Martínez-Vázquez, M., Soto-Hernández, M. and García-Contreras, R. (2015). Influence of quorum sensing in multiple phenotypes of the bacterial pathogen *Chromobacterium violaceum*. *Pathog. Dis*. 73: 1–4. doi: 10.1093/femspd/ftu019. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25722489.
- Díaz-Núñez, J. L., García-Contreras, R. and Castillo-Juárez, I. (2021). The new antibacterial properties of plants: Quo vadis studies of anti-virulence phytochemicals?. *Frontiers in Microbiology-Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*. 12:1054-1063. doi.org/10.3389/fmicb.2021.667126. ISSN: 1664-302X.
- Diggle, S. P. D. y Witeley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*. 166(1):30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860. Erratum in: *Microbiology (Reading)*. 167(8). doi: 10.1099/mic.0.001073. PMID: 31597590; PMCID: PMC7273324.
- Dirzo, R., Young, H., Mooney, H. and Ceballos, G. (2011). Seasonally dry tropical forest. Ecology and conservation. *Island Press*. <https://www.perlego.com/book/3286883/seasonally-dry-tropical-forests-ecology-and-conservation-pdf>
- Fichou, D., Ristivojevic, P. and Morlock, G. E. (2016). Proof-of-principle of rTLC, an open-source software developed for image evaluation and multivariate analysis of planar chromatograms, *Analytical Chemistry* 88(24): 12494–12501. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04017>



- Galot-Linaldi, J., Hernández-Sánchez, K. M., Estrada-Muñiz, E. and Vega, L. (2021). Anacardic acids from *Amphipterygium adstringens* confer cytoprotection against 5-fluorouracil and carboplatin induced blood cell toxicity while increasing anti-tumoral activity and survival in an animal model of breast cancer. *Molecules*. 26(11): 1-14.
- Ganesh, P. S. y Rai, R. V. (2016). Inhibition of quorum-sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by *Murraya koenigii* essential oil: a study in a *Caenorhabditis elegans* infectious model. *Journal of Medical Microbiology*. 65:1528-1535. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000385>
- Gnanaprakasam, J. N. R., López-Bañuelos, L. and Vega, L. (2021). Anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 410: 1-11.
- Gómez-Cansino, R., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Campos-Lara, M. G., Espitia-Pinzón, C. I. and Reyes-Chilpa, R. (2017). Natural compounds from Mexican medicinal plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs. *An Acad Bras Cien*. 89(1): 31–43.
- Gómez-Salgado, Ma. Del Rosario H.; Beltrán-Gómez, J. A.; Díaz-Nuñez J. L.; Rivera-Chávez, J. A.; García-Contreras, R.; Estrada-Velasco, A. Y.; Quezada, H.; Serrano Bello, C. A. and Castillo-Juárez I. (2024). Efficacy of a Mexican folk remedy containing cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl) for the treatment of burn wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ethnopharmacol*. 319: 117305: 1-10. Print ISSN: 03788741. Online ISSN: 18727573. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117305.
- González, E. E., McKenna, G. F. and Delgado, J. N. (1962). Anticancer Evaluation of *Amphipterygium adstringens*. *J Pharm Sci*. 51(9): 901–903.
- González, M. M. V. (2010). Plantas medicinales, situación actual y perspectivas de desarrollo *Revista CEDAMAZ* 1(1). <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/299>
- Guzmán-Pozos, A. M. and Cruz-Cruz, E. (2014). Características físicas de frutos de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl) de tres precedencias. *Rev. fitotec. Mex*. 37(3): 255-260. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802014000300012&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000300012&lng=es&nrm=iso). ISSN 0187-7380
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*. 7(9): 654- 65. doi: 10.1038/nrmicro2199
- Hersch-Martínez, P. (1995). Comercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla, México. *Econ. Botany*. 49(2): 197-206.

- Holmgren, P. K., Holmgren, N. H. y Barnett, L. C. (1990). Index Herbariorum Part I: The Herbaria of The World, *Regnum vegetabile* 120, eighth ed. New York Botanical Garden, New York
- Jia, J., Wang, Y., Zhou, L. and Jin S. (2006). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in host cells. *Infect. Immun.* 74 (12): 6557-70. doi: 10.1128/IAI.00591-06.
- Juárez-Rodríguez, M. M., Cortes-López, H., García-Contreras, R., González-Pedrajo, B., Díaz-Guerrero, M., Martínez-Vázquez, M., Rivera-Chávez, J. A., Soto-Hernández, R. M. and Castillo-Juárez, I. (2021). Tetradecanoic acids with anti-virulence properties increase the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine cutaneous infection model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 10, 1-10.
- Luna-Nieves, A., Meave, J., Cerdeira, L. and Ibarra-Manríquez, G. (2017). Reproductive phenology of useful Seasonally Dry Tropical Forest trees: guiding patterns for seed collection and plant propagation in nurseries. *For Ecol Manag.* 393:52–62.
- Makino, M., Motegi, T. and Fujimoto, Y. (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry.* 65 (7): 891–896.
- Martínez, M. (1944). Plantas medicinales de México. Tercera edición. Botas Ed. México. 377 p.
- Martínez, P. H. (1996). Destino Común: Los recolectores y su flora medicinal. El comercio de flora medicinal silvestre desde el Suroccidente Poblano. Instituto Nacional de Antropología e Historia: Ciudad de México, México.
- Martínez-Pérez, A., López, P. A., Gil-Muñoz, A. y Cuevas-Sánchez, J. A. (2012). Plantas silvestres útiles y prioritarias identificadas en la Mixteca Poblana, México. *Acta Botánica Mexicana.* 98: 73-98.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F. and Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 34, 147-54.
- Méndez, S. A. (1954). Estudio químico de la corteza de *Juliania adstringens* Schiede L. (cuachalalate). Tesis Profesional de licenciatura, Facultad de Química. ENCB-IPN, México.
- Muñoz-Cazares N., García-Contreras R., Pérez-López M, and Castillo-Juárez I. (2017). Phenolic compounds with anti-virulence properties. *Phenolic Compounds-Biological Activity*. INTECH. 139-167. ISBN 9789535129608.
- Navarrete, A. (1982). Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza *Juliana adstringens* (Cuachalalate). Tesis profesional. Químico Farmacéutico Biólogo. ENEP Zaragoza, UNAM.

- Navarrete, A. (1988). Estudio químico de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional: constituyentes de *Chenopodium graveolens* Willd., *Chenopodium ambrosioides* L. y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Facultad de Química, UNAM.  
Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3562640>
- Navarrete, A., Mata, R. and Delgado, G. (1989). Alkylsuccinic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Med.* 55(6): 579.
- Navarrete, A., Reyes, B., Silva, A., Sixtox, C., Islas, V. y Estrada, E. (1990). Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate). *Rev Mex Cienc Farm.* 21: 28–32.
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L.S. and Reyes, B. (1998). Gastroprotective Activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother Res.* 12: 1-4.
- Navarrete, A., Sánchez-Mendoza, M. E., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., Oliva, I. and Castañeda-Hernández, G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol.* 57(12): 1629–1636.
- Nie, Z. L., Sun, H., Meng, Y. and Wen, J. (2009). Phylogenetic analysis of *Toxicodendron* (Anacardiaceae) and its biogeographic implications on the evolution of north temperate and tropical intercontinental disjunctions. *Journal of Systematics and Evolution.* 47(5): 416-430. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2009.00045.x>
- Olivera Ortega, A. G., Soto Hernández, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas Salgado, T. and Solares Arenas, F. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J Ethnopharmacol.* 68(1-3): 109-113.
- OMS (Organización Mundial de Salud) (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. ARP-Sociedad para el avance del pensamiento crítico.
- OMS (Organización Mundial de Salud) (2017). Centro de prensa: La Organización Mundial de la Salud (OMS) publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.
- Orduño-Cruz, A. y Terrazas, T. (1998). Anatomía de la corteza de tres especies de leguminosas. Origen y desarrollo. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 63: 51-65. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1567>
- Osorio-García, A., Macías-López, A., Tornero-Campante, M.A., Loera-Martínez, J. y Garza-Bueno, L. E. (2018). Canales y márgenes de comercialización de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en la ciudad de Puebla y área conurbada. *Agroproductividad.* 11(2), 111-119. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/135>

- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M. and Martínez-Vázquez, M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. 11(5): 436–445.
- Oviedo Chávez, I. Ramírez Apan and M. Martínez-Vázquez (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57(9): 1087–1091.
- Patel, A., Hegde, H. T. and Gunaga, R. P. (2023). Importance of Sustainable Bark Harvesting in Medicinal Trees. *Journal of Applied Forest Ecology*. 11(1), 14-19. [https://www.researchgate.net/publication/372401419\\_Importance\\_of\\_Sustainable\\_Bark\\_Harvesting\\_in\\_Medicinal\\_Trees](https://www.researchgate.net/publication/372401419_Importance_of_Sustainable_Bark_Harvesting_in_Medicinal_Trees)
- Pennington D. T. y J. Sarukhán (2005). Árboles tropicales de México. In: Manual para la Identificación de las Principales Especies. 3ra ed. Fondo de Cultura Económica, México. 523 p.
- Pérez-Contreras, C. V., Alvarado-Flores, J., Orona-Ortiz, A., Balderas-López, J. L., Salgado, R. M., Zacaula-Juárez, N., Kröttsch, E. and Navarrete, A. (2022). Wound healing activity of the hydroalcoholic extract and the main metabolites of *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) in a rat excision model. *J Ethnopharmacol*. 293: 1-11.
- Piñón-Zárate, G., Reyes-Riquelme, F., Sánchez-Monroy, M. B., Velasco-Torrez, M., Martínez-Vázquez, M., Cárdenas-Monroy, C. A., Hernandez-Téllez, B., Jarquín-Yáñez, K., Herrera-Enríquez, M. Á. and Castell-Rodríguez, A. E. (2022). Immunomodulatory properties of masticadienonic acid and 3 $\alpha$ -hydroxy masticadienoic acid in dendritic cells. *Molecules*, 27(4): 1-12.
- Porras, G., Chassagne, F., Lyles, J. T., Marquez, L., Dettweiler, M., Salam, A. M., Samarakoon, T., Shabih, S., Farrokhi D. R. and Queavev, C. L. (2021). Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chem Rev*. 121(6): 3495-3560. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00922. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33164487; PMCID: PMC8183567.
- Ramírez-León, A., Barajas-Martinez, H., Flores-Torales, E. and Orozco-Barocio, A. (2012). Immunostimulating effect of aqueous extract of *Amphipterygium adstringens* on immune cellular response in immunosuppressed mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 10(1): 35-39.
- Resenos, F. (2003). Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Subprograma 127 “Formación básica en Investigación” de la Facultad de Química, UNAM.
- Reynolds, J. (2005). Serial dilution protocols. Protocol. *American Society for Microbiology*.

- Richard, P., Le, F. R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E. and Richet, H. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J Infect Dis.* 170:377-83.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R., Bye, R., Franzblau, S. and Timmermann, B. N. (2005). *Antimycobacterial agents* from selected Mexican medicinal plants. *J Pharm Pharmacol.* 57(9): 1117-1126.
- Rivero-Cruz, B. E., Esturau, N., Sánchez-Nieto, S., Romero, I., Castillo-Juárez, I. and Rivero-Cruz, J. F. (2011). Isolation of the new anacardic acid 6-[16'Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Nat Prod Res.* 25(13): 1282–1287.
- Rodríguez-Canales, M., Jiménez-Rivas, R., Canales-Martínez, M. M., García-López, A. J., Rivera-Yáñez, N., Nieto-Yáñez, O., Ledesma-Soto, Y., Sánchez-Torres, L. E., Rodríguez-Sosa, M., Terrazas, L. I. and Rodríguez-Monroy, M. A. (2016). Protective effect of *Amphipterygium adstringens* extract on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Mediators Inflamm*, 1–12.
- Rodríguez-García, A., Peixoto, I.T., Verde-Star, M.J., De la Torre-Zavala, S., Aviles-Arnaut, H. and Ruiz, A.L. (2015). *In vitro* Antimicrobial and antiproliferative activity of *Amphipterygium adstringens*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 1-7.
- Rosas-Acevedo, H. R., Rojas, M. D., Arceo, S. D. B., Soto Hernández, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas, T. and del Toro, G. V. (2006). Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 609(1): 43–46.
- Schafer, H. y Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal.* 4(12): 1684- 1703.
- Solares A., F., V. Díaz, B. y J. C. Boyás, D. (1992). Avances del estudio sobre efecto del descortezamiento en la capacidad de regeneración de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en el estado de Morelos. Memoria INIFAP-SARH. Campo Experimental "Zacatepec". Publicación especial 7. Zacatepec, Morelos, México. pp. 91-98.
- Solares A., F. (1995). Capacidad de regeneración de la corteza y evaluación fitoquímica antes y después del descortezamiento en Cuachalalate. Tesis de Maestría. Programa Forestal. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 97p.
- Solares-Arenas F. y Gálvez-Cortés M. C. (2002). Manual para una Producción Sustentable de Corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht). SAGARPA. INIFAP. Publicación especial No.34. C. E. Zacatepec Mor., México. 13 p.

- Solares Arenas, F., Jasso Mata, J., Vargas Hernández, J., Soto-Hernández, and R., Rodríguez-Franco, C. (2006). Capacidad de regeneración en grosor y lateral en la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Sclect.) En el estado de Morelos. *Revista Ra Ximhai*. 2 (2): 481–495.
- Solares A., F. (2009). Aprovechamiento sustentable de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) bajo un marco legal: Tecnología INIFAP. In: Memoria. IV Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. Saltillo, Coah. México. pp 315.
- Solares, A. F., Vázquez-Alvarado, J. M. P. and Gálvez-Cortés, M. (2012). Canales de comercialización de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 3: 29-42.
- Soriano-García, M., Toscano, R. A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, R., Barrios, H. and Yuste, F. (1987). Structure and 617 stereochemistry of the methyl ester of (5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20S,24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communication*. 43: 990–992.
- Sotelo-Barrera, M., Cília-García, M., Luna-Cavazos, M., Díaz-Núñez, J. L., Angélica Romero-Manzanares, A., Soto-Hernández, R. M. and Castillo-Juárez, I. (2022). *Amphipterygium adstringens* (Anacardiaceae) is an endemic 2 plant with relevant pharmacological properties. *Plants*. 11(13): 1776. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/13/1766#>
- Trejo, I. y Dirzo, R. (2000) Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation*. 94(2):133-142. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00188-3)
- Trejo, I. (2005). Análisis de La diversidad de la Selva Baja Caducifolia en México, in Halffter, G., Soberón, J., Koleff, P. and Melic, A. (eds.), Sobre la diversidad biológica el significado de las diversidades Alfa beta y gama. 111-122. <https://www.researchgate.net/publication/286337232>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 16 Jan 2024 <<https://tropicos.org/name/16800004>>© 2024 [Missouri Botanical Garden](#) - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110 [feedback](#)[Send feedback](#)[Terms of Use](#)[API](#)[Linking to Tropicos](#)[FAQ](#)[Additional Info](#)
- UICN (2019). Red List of Threatened Species. Available online: <https://www.iucnredlist.org/species/136749685/137375999>
- Wang M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D., Pace, L. A., Quinn, R. A., Duncan, K. R., Hsu, C.-C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot, D., Carlson, E. E., Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner,



P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B. T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R. A., Sims, A. C., Johnson, A. R., Sidebottom, A. M., Sedio, B. E., Klitgaard, A., Larson, C. B., Boya P, C. A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D. J., Silva, D. B., Marques, L. M., Demarque, D. P., Pociute, E., O'Neill, E. C., Briand, E., Helfrich, E. J. N., Granatosky, E. A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J. J., Zeng, Y., Vorholt, J. A., Kurita, K. L., Charusanti, P., McPhail, K. L., Nielsen, K. F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M. F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O. B., Baric, R., Silva, R. R., Mascuch, S. J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P. G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A. M. C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B. M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J. E., Metz, T. O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K. M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P. R., Palsson, B. Ø., Pogliano, K., Linington, R. G., Gutiérrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W. H., Moore, B. S., Dorrestein, P. C., Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*. 34, 828.

Watson, W. H., Domínguez, A., Vázquez, G. and García, S. (1987). Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Latinoam Quim.* 18, 89–90.

Wences, L. (2010). El cuachalalate: una planta medicinal con el sustento científico para desarrollar un Fitomedicamento. *Gaceta de la facultad de medicina*. 633 (22).

## ANEXOS



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Campeche – Córdoba – México – Puebla - San Luis Potosí – Tabasco - Veracruz



### CAMPUS MONTECILLO

NÚMERO DE OFICIO: 016

ASUNTO: Autorización protocolo de investigación

Montecillo, Estado de México, 13 de octubre, 2023.

**DR. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ**  
**P R E S E N T E**

Por este medio hago de su conocimiento que después de haber hecho la evaluación del protocolo de investigación "Análisis de compuestos bioactivos en ramas primarias y secundarias de *Amphipterygium adstringens* (Anacardiaceae)", Protocolo COBIAN/016/23, este fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal del Colegio.

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**DRA. MA. ESTHER ORTEGA CERRILLA**  
**PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIENESTAR ANIMAL**  
**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**