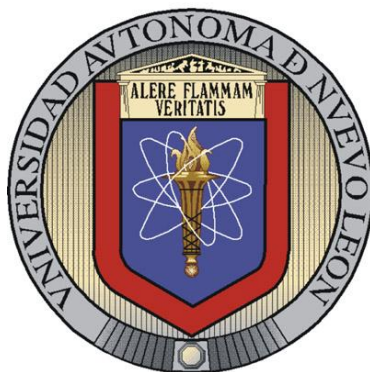


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
TALLOS Y TEJIDO *IN VITRO* DE *Astrophytum myriostigma* (LEMAIRE, 1839) Y
Astrophytum capricorne (DIETRICH, 1922) FAM. CACTACEAE

Por

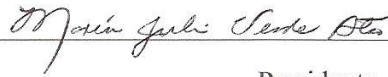
RUTH AMELIA GARZA PADRÓN

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con acentuación en Química de Productos Naturales

Abril 2010

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS
DE TALLOS Y TEJIDO *IN VITRO* DE *Astrophytum myriostigma* (LEMAIRE, 1839) Y
Astrophytum capricorne (DIETRICH, 1922) FAM. CACTACEAE

Comité de Tesis



Presidente

DRA. MARIA JULIA VERDE STAR



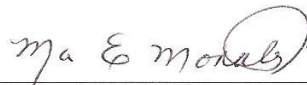
Secretario

DRA. MA. ADRIANA NÚÑEZ GONZÁLEZ



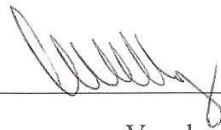
Vocal

DRA. CATALINA RIVAS MORALES



Vocal

DRA. MA. EUFEMIA MORALES RUBIO



Vocal

DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS

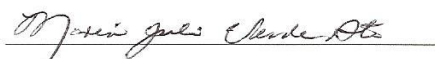
Abril 2010

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
TALLOS Y TEJIDO *IN VITRO* DE *Astrophytum myriostigma* (LEMAIRE, 1839) Y
Astrophytum capricorne (DIETRICH, 1922) FAM. CACTACEAE

Por

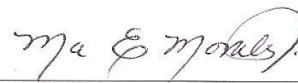
RUTH AMELIA GARZA PADRÓN

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con acentuación en Química de Productos Naturales



DRA. MA. JULIA VERDE STAR

Director



DRA. MA. EUFEMIA MORALES RUBIO

Co-director

Abril 2010

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que durante mi proceso formativo me brindaron palabras de aliento para seguir adelante y poder culminar éste trabajo. Gracias a Todos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado con la beca número 191654 para la realización de los estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo mediante el Proyecto PAICYT CN 1550-07, para la realización de la investigación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, de manera especial a los Departamentos de Biología Celular y Genética (Lab. de Micropropagación y Lab. de Biología Celular) y Química (Lab. de Fitoquímica y Lab. de Química Analítica), por las atenciones brindadas en la realización del trabajo.

A la Suddirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por llevar a cabo todos los trámites administrativos para la obtención del grado.

A la Dra. Ma. Julia Verde Star por su valiosa participación como Directora del presente trabajo. Muchísimas gracias por su apoyo, asesoría y comprensión para la realización del mismo.

A la Dra. Ma. Eufemia Morales Rubio y al Dr. Jaime Francisco Treviño Neávez, por ser mis papás adoptivos por más de 12 años, gracias por todos sus consejos, por su apoyo moral, gracias por tener siempre palabras de aliento cuando las cosas no salían como se deseaban, no tengo palabras para describir todo mi agradecimiento.

A las Dras. Azucena Oranday Cárdenas, Catalina Rivas Morales y Ma. Adriana Núñez González, por su asesoría brindada durante mi proceso formativo doctoral.

A mis compañeros del Laboratorio de Micropropagación que estuvieron durante estos años, y en donde se compartieron festejos, posadas y alguno que otro almuerzo fuera de programa.

A mi amigo el Q.B.P. Ramón Gerardo Rodríguez Garza, por tantos años de compartir muchas experiencias y que siempre me toleró cuando se presentó alguna dificultad.

A todos mis compañeros de los diferentes laboratorios en donde realicé la parte experimental de este proyecto. A todos Gracias.

DEDICATORIA

A Dios, gracias por darme la vida y poder realizar muchos de los sueños que siempre tuve, por darme esa fuerza para cumplirlos, y que pese a las adversidades siempre estuviste en cada una de las personas que me asesoraron.

A mis papás el Sr. Juan José Garza Tabares y a la Sra. Amalia Padrón Méndez, porque hasta ahora, siempre me han apoyado en cada una de las decisiones brindándome consejos; saben que los quiero muchísimo, que los respeto, que son mi ejemplo a seguir y que son mi razón de vivir, porque sin ustedes no sería nadie.

A mis hermanas la L.I.A. Liliana Judith y a la Estudiante de Nivel Medio Superior Alejandra Lizeth, porque siempre me han apoyado, comprendiéndome cuando las cosas no salían como yo quería; gracias por sus consejos y doy gracias por tenerlas como hermanas.

A mis abuelitos el Sr. Alfonso Garza Luna (†), Sra. Juanita Tabares Saucedo (†), Sr. Casimiro Padrón Galván (†) que ya no están físicamente con nosotros pero que en nuestros corazones siempre estarán y a la Sra. Juanita Méndez Sánchez, que aun está compartiéndonos de sus experiencias.

ÁREA DE TRABAJO

La realización del trabajo práctico se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Biología Celular y Genética, y en los Laboratorios de Fitoquímica y Química Analítica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Descripción	Pág.
1.	RESUMEN	1
	1.1 Abstract	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	5
4.	HIPÓTESIS	6
5.	OBJETIVOS	7
	5.1 Objetivo General	7
	5.2 Objetivos Particulares	7
6.	ANTECEDENTES	9
	6.1 Generalidades de la familia Cactaceae	9
	6.1.1 Características y posición taxonómica de <i>Astrophytum myriostigma</i>	9
	6.1.2 Características y posición taxonómica <i>A. capricorne</i>	11
	6.2 Compuestos químicos de cactáceas	12
	6.3 Técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales	15
	6.4 Cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas	16
	6.5 Obtención de compuestos químicos mediante la técnica de CTV	18
	6.6 Actividad biológica	19
	6.6.1 Bactericida	19
	6.6.2 Letalidad contra <i>Artemia salina</i>	20
	6.6.3 Amebicida	21
	6.6.4 Antioxidante	22
	6.7 Cromatografía	24
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
	7.1 Material	26
	7.1.1 Reactivos, material y equipo	26
	7.1.1.1 Reactivos	26
	7.1.1.2 Material	27
	7.1.1.3 Equipo	28
	7.1.1.4 Material Biológico	28
	7.1.1.4.1 Material vegetal	28
	7.1.1.4.2 Cepas Bacterianas	29
	7.1.1.4.3 <i>Artemia salina</i>	29
	7.1.1.4.4 <i>Entamoeba histolytica</i> cepa HM1-IMSS	29
	7.2 Métodos	30
	7.2.1 Medio de Cultivo	30

7.2.2 Desinfección y Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	32
7.2.2.1 <i>Astrophytum myriostigma</i>	32
7.2.2.1.1 Semillas de <i>Astrophytum myriostigma</i>	33
7.2.2.2 <i>Astrophytum capricorne</i>	33
7.2.2.2.1 Escarificación de semillas de <i>Astrophytum capricorne</i>	34
7.2.3 Obtención de extractos de especies vegetales	34
7.2.4 Pruebas químicas de identificación de grupos funcionales	34
7.2.4.1 Insaturaciones	35
7.2.4.1.1 Prueba del KMnO_4	35
7.2.4.2 Grupo carbonilo	35
7.2.4.2.1 Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina	35
7.2.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)	35
7.2.4.3.1 Prueba del FeCl_3	35
7.2.4.4 Esteroles y triterpenos	35
7.2.4.4.1 Prueba de Liebermann-Burchard	36
7.2.4.4.2 Prueba de Salkowski	36
7.2.4.5 Carbohidratos	36
7.2.4.5.1 Prueba de Molish	36
7.2.4.5.2 Prueba de las coumarinas	36
7.2.4.5.3 Prueba de las lactonas	36
7.2.4.6 Sesquiterpenlactonas	37
7.2.4.6.1 Prueba de Baljet	37
7.2.4.7 Flavonoides	37
7.2.4.7.1 Prueba del H_2SO_4	37
7.2.4.7.2 Prueba de Shinoda	37
7.2.4.8 Alcaloides	37
7.2.4.8.1 Prueba de Dragendorff	37
7.2.4.9 Saponinas	38
7.2.4.9.1 Prueba de la agitación	38
7.2.4.9.2 Prueba del bicarbonato de sodio	38
7.2.4.9.3 Prueba de Salkowski para saponinas	38
7.2.4.10 Aromaticidad	38
7.2.4.10.1 Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído	39
7.2.4.11 Antioxidantes	39
7.2.4.11.1 Prueba de los radicales libres	39
7.2.5 Actividad Bactericida	39
7.2.5.1 Activación de las Bacterias	39
7.2.5.2 Cultivo de bacterias	40
7.2.5.3 Determinación de la actividad antimicrobiana empleando la técnica de difusión en placa	40
7.2.6. Bioensayo de letalidad contra <i>Artemia salina</i>	40
7.2.6.1 Eclosión de nauplios	40
7.2.6.2 Determinación de la dosis letal media	41
7.2.7 Actividad amebicida	41

7.2.7.1 Medio de cultivo para <i>E. histolytica</i> cepa HM1-IMSS	41
7.2.7.2 Mantenimiento de <i>E. histolytica</i> cepa HM1-IMSS	42
7.2.7.3 Cinética de crecimiento	43
7.2.7.4 Determinación de la actividad amebicida	43
7.2.8 Cuantificación de los radicales libres mediante el DPPH	43
7.2.8.1 Evaluación de la actividad antioxidante	43
7.2.8.2 Preparación del estándar y extractos metanólicos	44
7.2.8.3 Reacción de neutralización del radical	44
7.2.9 Comparación cromatográfica de los extractos	44
7.2.9.1 Cromatografía en capa fina	44
8. RESULTADOS	46
8.1 Material vegetal	46
8.2 Cultivo <i>in vitro</i> de especies vegetales	46
8.2.1 <i>Astrophytum myriostigma</i>	46
8.2.2 <i>Astrophytum capricorne</i>	47
8.2.2.1 Semillas de <i>Astrophytum capricorne</i>	47
8.3 Rendimiento en la extracción del material vegetal	48
8.4 Pruebas químicas de identificación de grupos funcionales	48
8.4.1 Comparación de los metabolitos secundarios presentes en la planta y tejido <i>in vitro</i> de <i>Astrophytum myriostigma</i>	48
8.4.2 Comparación de los metabolitos secundarios presentes en la planta y tejido <i>in vitro</i> de <i>Astrophytum capricorne</i>	51
8.5 Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos	53
8.5.1 Extractos metanólicos de <i>Astrophytum myriostigma</i>	53
8.5.2 Extractos metanólicos de <i>Astrophytum capricorne</i>	53
8.6. Determinación de la Dosis Letal Media sobre <i>Artemia salina</i>	54
8.7 Actividad sobre el cultivo axénico de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	55
8.7.1 Cinética de crecimiento	55
8.7.2 Extractos metanólicos de <i>A. myriostigma</i>	56
8.7.3 Extractos metanólicos de <i>A. capricorne</i>	57
8.7.4 Comparación del rendimiento celular de los cuatro extractos metanólicos sobre el crecimiento axénico <i>in vitro</i> de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS	58
8.7.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media	60
8.8 Actividad antioxidante de los extractos metanólicos mediante el DPPH	61
8.8.1 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante	61
8.8.2 Determinación de la Concentración Efectiva Media de los extractos metanólicos	62
8.9 Cromatografía en capa delgada	63
9. DISCUSIÓN	65
10. CONCLUSIÓN	72
11. LITERATURA CITADA	74
12. APÉNDICE	83
12.1 Resumen Curricular	83

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
I.	Composición del medio MS (1962).	31
II.	Procedimiento para elaborar medio MS (1962) con las soluciones concentradas.	32
III.	Procedimiento para elaborar medio PT.	42
IV.	Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos metanólicos de tallos y callo.	48
V.	Identificación de grupos funcionales en los extractos metanólicos de planta y callo de <i>A. myriostigma</i> .	50
VI.	Identificación de grupos funcionales en los extractos metanólicos de planta y callo de <i>A. capricorne</i> .	52
VII.	Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de <i>Astrophytum myriostigma</i> .	53
VIII.	Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de <i>Astrophytum capricorne</i> .	54
IX.	Actividad de los extractos metanólicos sobre <i>Artemia salina</i> .	55
X.	Efecto de los extractos metanólicos de <i>A. myriostigma</i> sobre la viabilidad celular y su morfología.	57
XI.	Efecto de los extractos metanólicos de <i>A. capricorne</i> sobre la viabilidad celular y su morfología.	58
XII.	Actividad de los extractos metanólicos de tallo y callo de <i>A. myriostigma</i> y <i>A. capricorne</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	61
XIII.	Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de <i>A. myriostigma</i> y <i>A. capricorne</i> mediante el método con DPPH.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.	Planta adulta de <i>Astrophytum myriostigma</i> (Lemaire, 1839).	10
2.	Planta adulta de <i>Astrophytum capricorne</i> (Dietrich, 1922).	11
3.	Callo de <i>A. myriostigma</i> obtenido en medio MS (1962) adicionado con BAP 2 mg/L.	46
4.	Callo y plántula <i>A. capricorne</i> .	48
5.	Presencia de antioxidantes de manera cualitativa en los extractos metanólicos del género <i>Astrophytum</i> .	62
6.	Cromatografía comparativa de los cuatro extractos metanólicos del género <i>Astrophytum</i> con la mezcla de eluentes Benceno 3: Acetato de Etilo 3: Metanol 4.	64

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Descripción	Página
1.	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	56
2.	Rendimiento celular de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS en contacto con los extractos metanólicos de los tallos y cultivo <i>in vitro</i> de <i>Astrophytum myriostigma</i> y <i>Astrophytum capricorne</i> .	59

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
Ac.	<i>Astrophytum capricorne</i>
Am.	<i>Astrophytum myriostigma</i>
BAP	Bencilaminopurina
ccd	Cromatografía en capa delgada
Cel/mL	Células por mililitro
CE ₅₀	Concentración Efectiva Media
CI ₅₀	Concentración de Inhibición Media
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
d	Días
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-Difenil-2-picrihidrazil
EHP	Extracto de Hígado y Páncreas
g	Gramo
h	Hora
K	Cinetina
L	Litro
lb	Libra
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Murashige y Skoog

N	Normalidad
°C	Grados centígrados
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
Rf	Relación de frentes
s	Segundo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micra
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades formadoras de Colonia
UMA	Unidad de Manejo Ambiental
v/v	Volumen por volumen

1. RESUMEN

Las cactáceas son endémicas del Continente Americano, han desarrollado diversas adaptaciones que les permiten sobrevivir bajo condiciones extremas de temperatura, luz y salinidad. Sus usos son muy diversos: material para construir viviendas y cercos, como forraje, como plantas medicinales, como fuente de alimento, así como también son muy apreciadas por los coleccionistas. En la actualidad esta familia ha retomado importancia en diversas industrias como lo son la farmacéutica, cosmetológica y alimentaria, por la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes. Lo anterior, aunado al deterioro de las áreas silvestres, pone de manifiesto que es necesario investigar y desarrollar tecnologías que permitan preservar estas especies y conocer su posible potencial. Por lo que en el presente trabajo se estableció el cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire) y *Astrophytum capricorne* (Dietrich), se obtuvieron los extractos metanólicos de la planta y del tejido *in vitro* y se probó su actividad biológica. Se colectaron e identificaron las plantas, se estableció el proceso de desinfección y el cultivo *in vitro*. En la obtención de los extractos se utilizaron tallos y callos de ambas especies, utilizando metanol como solvente de extracción, después se determinó la presencia de grupos funcionales. Para las pruebas de actividad biológica se utilizaron bacterias de interés médico, además *Artemia salina*, *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS y para la cuantificación de los radicales libres se empleó la técnica de 1,1-Difenil-2-picrihidrazil. La dosis letal media (DL₅₀), la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y la concentración efectiva media (CE₅₀) se calcularon mediante el método estadístico Probit. Por cromatografía se analizó la semejanza entre los extractos metanólicos de ambas especies. En la determinación de metabolitos secundarios ambos extractos presentaron alcaloides y triterpenos, solo el extracto metanólico de callo de *Astrophytum myriostigma* fué positivo para oxidrilos fenólicos, triterpenos y flavonoides, mientras que el extracto metanólico de tallo de *A. capricorne* lo fué para grupo carbonilo, triterpenos, flavonoides y saponinas. Los resultados en cuanto a la actividad antimicrobiana y en el Bioensayo de letalidad contra *Artemia salina* no son relevantes. Los extractos de *Astrophytum myriostigma* resultaron efectivos contra *Entamoeba histolytica* con una CI₅₀ por debajo de los 100µg/mL. El fraccionamiento de los extractos metanólicos de *A. myriostigma* y *A. capricorne* indican que en ambas especies, tanto en el callo como en el tallo hay diferentes metabolitos secundarios, como se observa en la actividad antioxidante del callo de *A. myriostigma* con una CE₅₀ de 199.19 µg/mL, a diferencia del extracto de tallo con una CE₅₀ de 3961.39 µg/mL, el tamizaje fitoquímico nos indica que el callo posee oxidrilos fenólicos y flavonoides, mientras que en el tallo, no están presentes. La presencia de estos metabolitos en el callo de *A. myriostigma*, se deben probablemente a las condiciones *in vitro* bajo la que el explante se desarrolló y a los nutrientes presentes en el medio, que actúan como elicitores induciendo la producción de dichos metabolitos.

1.1 Abstract

Cactaceae family are endemic of America, have developed diverse adaptations that allow them to survive under extreme conditions of temperature, light and salinity. Their use, are very diverse: material to construct houses and walls, like forage, as medicinal plants, like food source, as well as appreciated by collectors. At the present time this family has retaken importance in industries: pharmaceuticals, alimentary, cosmetology and, by the great amount in secondary metabolites. For this reasons and combined to deterioration of wild areas, is necessary to investigate and to develop technologies that allow to preserve these species and to know their possible potential. Objective of present work was culture *in vitro* of *Astrophytum myriostigma* (Lemaire) and *Astrophytum capricorne* (Dietrich), obtained methanolics extracts of plant and *in vitro* culture and probe its biological activity. Plants were collected, and then established disinfection process and tissue culture. Stems and callus of both species were extracted, using methanol as solvent, and then tested for the presence of functional groups. For biological activity used: bacteria medical interest, brine shrimp, *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS strain and for quantification of free radicals employment technique 1,1-diphenyl-2-picrihidrazil. Lethal dose (LD_{50}), inhibitory concentration (IC_{50}) and the effective concentration (EC_{50}) were calculated using the Probit statistical method. Similarity between methanolics extracts of both species was determined by chromatography. Alkaloids and triterpens are presents in stems and callus but methanolic extract of *A. myriostigma* callus are positive to phenolics oxhidrile, triterpens and flavonoids, whereas that methanolic extract *A. capricorne* stem are positive carbonil group, triterpens, flavonoids and saponin. Results were not relevant in antimicrobial activity and activity against the brine shrimps nauplii. Results on *Entamoeba histolytica* were satisfactory for *Astrophytum myriostigma* since showed an IC_{50} than the $100\mu\text{g/mL}$. Fractionation of methanolics extracts *A. myriostigma* and *A. capricorne* indicate that in both species, callus and stem have different secondary metabolites, as shown in the antioxidant activity of the callus *A. myriostigma* with a EC_{50} $199.19\ \mu\text{g/mL}$ and stem wiyh EC_{50} $3961.39\ \mu\text{g/mL}$. Callus presents phenolics oxhidrile and flavonoids, unlike the stem. Presence of these metabolites in callus *A. myriostigma*, are probably due *in vitro* conditions under explant developed and nutrients present in medium, which act as elicitors inducing metabolites production.

2. INTRODUCCIÓN

Nuestro país es rico en biodiversidad de fauna y flora; diversos grupos de plantas revisten importancia en México, sin embargo en particular la familia Cactácea durante la historia de los pueblos indígenas y hasta la actualidad ha sido de gran importancia para la población. Las cactáceas son endémicas del Continente Americano, han desarrollado diversas adaptaciones que les permiten sobrevivir bajo condiciones extremas de temperatura, luz y salinidad. Se estima que a nivel mundial, esta familia, comprende alrededor de 1,500 especies representadas en 120 géneros aproximadamente, de los cuales, en México existen 48 con más de 500 especies, cuya distribución abarca principalmente las regiones áridas y semiáridas.

Sus usos son muy diversos: como proveedores de material para construir viviendas y cercos, como forraje, como plantas medicinales por sus propiedades curativas, en las prácticas mágico-religiosas realizadas por algunos grupos indígenas como el grupo náhuatl que usó el nopal como parte de sus símbolos y que aun persiste en el escudo nacional, los huicholes que emplean el peyote (*Lophophora williamsii*) en sus ritos; las cactáceas también han sido empleadas como fuente de alimento, ya sea sus tallos o frutos, así como también son muy apreciadas por los coleccionistas, lo que provoca una colecta desmedida e indiscriminada de especímenes; en la actualidad este grupo ha retomado importancia en diversas industrias por la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes como lo son, la farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. Lo anterior aunado al deterioro de las áreas silvestres, pone de manifiesto que es necesario investigar y desarrollar tecnologías que permitan preservar estas especies.

Actualmente las cactáceas se reproducen por tres métodos: a) por semilla, b) por estaca y c) por cultivo de tejidos vegetales. Esta última técnica es una herramienta

biotecnológica que presenta múltiples aplicaciones, como son: micropropagación, obtención de metabolitos secundarios, obtención de plantas libres de patógenos, preservación *in vitro* de germoplasma de especies que se encuentren amenazadas o en vías de extinción, entre otras; con la gran ventaja de que es una alternativa para el suministro continuo y homogéneo de compuestos naturales de interés con altos rendimientos en comparación con los obtenidos en plantas completas, no hay problemas de plagas, enfermedades, ni cambios climáticos que afecten el rendimiento del producto, ni se requiere de mano de obra para su mantenimiento, conservación y colecta.

De suma importancia es llevar a cabo estudios sobre los componentes químicos presentes en esta familia, así como determinar su actividad biológica y establecer protocolos para la propagación *in vitro* de estas especies para su uso sustentable.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Muchas especies de cactáceas mexicanas se encuentran amenazadas y/o en peligro de extinción, debido a situaciones importantes como son: destrucción de su hábitat, el interés de horticultores y coleccionistas aficionados que existen a nivel mundial, su uso por los pueblos indígenas (medicinal) así como a nivel industrial; es por eso que hoy en día es necesario desarrollar protocolos *in vitro* para: propagación masiva, producción de metabolitos secundarios, mejoramiento genético de los cultivos, preservación de germoplasma *in vitro*, entre otras.

4. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios de los extractos metanólicos obtenidos de los tejidos cultivados *in vitro* e *in vivo* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*, son semejantes así como la respuesta en cuanto a actividad biológica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General :

Comparar tamíz fitoquímico, así como actividad bactericida, amebicida, tóxica y antioxidante de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire) y *A. capricorne* (Dietrich) *in vivo* e *in vitro*.

5.2 Objetivos Particulares:

- Obtención de material vegetativo (semillas/tallos) de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*.
- Establecer el método de desinfección para los explantes de ambas especies.
- Establecer el método de escarificación para las semillas obtenidas de *Astrophytum capricorne*.
- Establecer el cultivo *in vitro* de las cactáceas *Astrophytum myriostigma* y *A. capricorne*.
- Obtener extractos metanólicos de los tallos y del tejido *in vitro* de las cactáceas en estudio.
- Determinar los metabolitos secundarios presentes en tallos y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *A. capricorne*.
- Determinar la actividad bactericida de los extractos metanólicos de tallo y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne* contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marsescens*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* y *Bacillus subtilis*.

- Determinar la letalidad sobre *Artemia salina* de los extractos metanólicos de tallo y del tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*.
- Determinar la actividad amebicida de los extractos metanólicos obtenidos de tallo y de tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne* sobre el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos de tallo y de tejido *in vitro* de las cactáceas en estudio mediante la técnica de secuestro de radicales libres utilizando la prueba de DPPH.
- Separar por cromatografía los extractos metanólicos obtenidos de tallo y de tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*.

6. ANTECEDENTES

6.1 Generalidades de la familia Cactaceae

Aproximadamente el 40 % de la superficie de la tierra está cubierta por regiones áridas y semiáridas. En México, estas zonas ocupan el 52.5% de la superficie total del país (Pimienta-Barrios, 1999), siendo el centro de diversificación de cactáceas más importante, con un elevado índice de endemismos (Bravo- Hollis y Sánchez-Mejorada,1991).

La cactáceas son endémicas de América y se caracterizan por su capacidad de adaptación a la escasez de agua (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000), Anderson (2001) estima que a nivel mundial, existen alrededor de 1,500 especies representadas en 120 géneros aproximadamente, de los cuales, en México existen 48 con más de 500 especies. Muchos de sus frutos y tallos son alimentos importantes en la dieta de los mexicanos, aunque también se usan como forraje, ornamento y fuente de obtención de sustancias químicas de interés farmacológico (Benítez y Dávila, 2002).

6.1.1 Características y posición taxonómica de *Astrophytum myriostigma*

Orden: Cactales Britton et Rose

Familia: Cactaceae Lindley

Subfamilia: Cactoideae Schum

Tribu: Cacteeae Buxbaum

Género: *Astrophytum* Lemaire

Especie: *A. myriostigma* Lemaire, Cact. Gen. Nov.
Sp. 4, 1839.

N.V. “mitra”, “bonete de obispo”.

Tallo simple o cespitoso, globoso hasta cilíndrico, de 10 a 60 cm de altura y de 10 a 20 cm de diámetro. Costillas generalmente 5 pero en algunas plantas hay 3, 4 o 6 y hasta 8, anchas y más o menos pronunciadas y con aristas desde muy agudas hasta ligeramente redondeadas, con surco bien marcado; superficie cubierta de diminutas borlas de pelos estrellados, blancos, que proporcionan a la planta un aspecto ceniciento, a veces este revestimiento falta, tegumentos muy duros (Fig. 1). Aréolas próximas, distantes entre sí 8 a 15 mm, circulares, pequeñas, de unos 3 mm de diámetro, lanosas. Espinas ausentes. Flor



Figura 1. Planta adulta de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire, 1839).

campanulada, de 4 a 6 cm de longitud, de color amarillo claro con tinte rojo en el centro; pericarpelo y tubo receptacular con escamas imbricadas, angostas, con el ápice escarioso, frecuentemente terminado por un mucrón; axilas de las escamas lanosas; segmentos del perianto angostos, acuminados, con la punta escariosa, de color castaño; segmentos interiores del perianto angostos y acuminados. Fruto globoso-alargado, verde, se abre al madurar en forma de estrella. Semillas naviculares; hilo muy amplio; testa casi negra, brillante, papilosa, de 3 mm de longitud y 2 mm de espesor.

Se encuentra ampliamente distribuida en matorrales rosetófilos en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. En San Luis Potosí ha sido colectado por D. Gold y Meyrán en cerros cercanos a El Huizache y en Matehuala; en Coahuila, por Mieg y Lindsay, entre Saltillo y Eagle Pass; por Cowper, en el Cerro de la Bola; en Nuevo León, por la autora cerca de Doctor Arroyo; en Tamaulipas, por la autora, cerca de Jaumave y Tula. Se reproduce únicamente por semillas con fácil proceso y crecimiento rápido. Cultivar a pleno sol en un sustrato estándar, regando normalmente durante el período de vegetación (Bravo y Sánchez, 1991; Anderson, 2001; Gómez, 2001).

6.1.2 Características y posición taxonómica *A. capricorne*

Orden: Cactales Britton et Rose

Familia: Cactaceae Lindley

Subfamilia: Cactoideae Schum

Tribu: Cacteeae Buxbaum

Género: *Astrophytum* Lemaire

Especie: *A. capricorne* (Dietrich) Britton et Rose,
Cactaceae 3: 184, 1922.

Tallo subgloboso o cortamente cilíndrico, hasta de 25 cm de altura y cerca de 10 cm de diámetro, al principio globoso, después ovoide hasta alargado. Costillas 7 u 8, altas y agudas, con la superficie provista de estigmas blancos, más o menos numerosos. Aréolas grandes, distantes entre sí 2 a 3 cm, con fieltro castaño. Espinas desde alrededor de 6 hasta cerca de 20, algunas gruesas, más o menos aplanadas, suaves, torcidas o recurvadas, de color rojizo, negruzco o ceniciento, largas, de 3 a 10 cm de longitud (Fig. 2). Flores de 6 a 7 cm de longitud, que abren ampliamente; segmentos exteriores del perianto rojizos, con el ápice mucronado; segmentos interiores del perianto de color amarillo con la base anaranjado rojiza, espatulados, con el ápice agudo o acuminado, con el margen entero o más o menos dentado; estambres numerosos; estilo delgado, de color crema; lóbulos del estigma 5 a 9, lineares, de color crema. Fruto pequeño, con escamas pungentes y axilas lanosas. Semillas de 2.5 mm de espesor, brillantes.

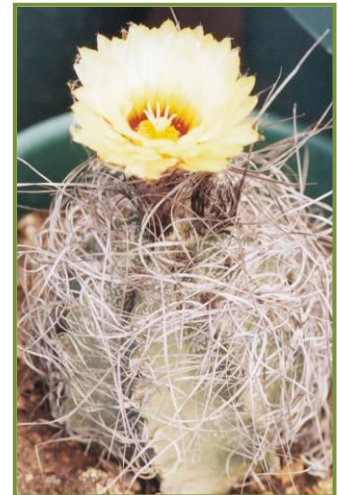


Figura 2. Planta adulta de *Astrophytum capricorne* (Dietrich, 1922).

Se encuentra en los estados de San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León. Ha sido anotada por Matuda y Schwarz de San Luis Potosí; por el ingeniero G. Aguirre Benavides, del Cerro de la Paila, Laguna de Mayrán y San Pedro de las Colonias, en Coahuila, y por la autora, entre Saltillo y Monterrey. Se cultiva únicamente por semillas. Las gruesas semillas, frágiles germinan rápidamente sin presentar dificultades su cultivo. Sustrato estándar (Bravo y Sánchez, 1991; Anderson, 2001; Gómez, 2001).

6.2 Compuestos químicos de cactáceas

En México y Estados Unidos las tribus indígenas como los huicholes, yaquis, apaches, tarahumaras, entre otras, han usado el “peyote” también conocido como “jículi”, “peyotl” o “mescal boton” (*Lophophora williamsii*) en sus ritos religiosos como un alucinógeno. Estas propiedades de psicofármacos despertaron el interés de numerosos viajeros y desde finales del siglo pasado se inició el estudio químico de ésta planta (Domínguez y Domínguez, 1976).

Cannell (1998) describe el concepto de metabolitos secundarios como moléculas o productos biológicos derivados del metabolismo como un resultado a limitación de nutrientes, mecanismos de defensa, moléculas reguladoras, etc. así, Domínguez X.A. (1973) ha tratado de conocer la función de los alcaloides en las plantas, considerándose como productos finales del metabolismo del nitrógeno, se asocian a la protección de la planta ante actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, no así para insectos.

Valencia (1995) menciona que las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde varios puntos de vista, muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos.

Ranieri y McLaughlin (1977) mencionan que de acuerdo a registros anteriores, un total de diez alcaloides se han identificado en extractos de una cactácea mexicana *Dolichothele uberiformis* (Zucc.), resaltando la presencia de un nuevo alcaloide denominado uberina.

Kuklinski (2000) menciona que los componentes procedentes del metabolismo secundario son: a) Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos; b) Derivados fenólicos: fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, antracénosidos; c) Alcaloides.

West y McLaughlin (1977) aislaron triterpenos de extractos etanólicos de *Epithelantha micromeris* mediante hidrólisis ácida obteniendo seis compuestos cristalizados, de los cuales a dos denominaron de la siguiente manera, como ácido epitelántico y metil epitelantato. Cabe mencionar que estos extractos, en trabajos anteriores fueron tóxicos para ratones.

Stenocereus gummosus o pitayo agrio presenta triterpenos y saponinas; los compuestos encontrados son: ácido machaérico, ácido machaerínico (isómero del ácido queretaroico de *Stenocereus queretaroensis* y del ácido cochálico de *Myrtillocactus cochal*) y gummosogenina (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

Anderson (1980) reporta que el peyote *Lophophora williamsii* contiene más de 50 alcaloides, y que el activo alucinógeno es la mescalina; al igual que para *Trichocereus pachanoi* (Cactus San Pedro).

Morales *et al.*, (2004) encontró en tallos de pitaya agria (*Stenocereus gummosus*) diversos compuestos como: esteroides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides; mientras que en los frutos se encontraron flavonas y leucoantocianinas (antioxidantes naturales), saponinas y alcaloides inespecíficos.

Domínguez y Domínguez (1976) encontraron un compuesto denominado lofenol del grupo de los triterpenos en *Lophocereus schottii* mientras que Morales (2006) determinó para el extracto acuoso de ésta especie los siguientes grupos funcionales: oxidrilos fenólicos, lactonas, esteroides y metilesteroides, flavonoides, triterpenos, alcaloides y saponinas.

Domínguez y Domínguez (1976) mencionan que la mezcalina y algunos de sus análogos se han encontrado en unas 40 cactáceas, incluyendo especies de los géneros de *Opuntia*, *Trichocereus* y *Ariocarpus*, así como la demostración de sus análogos de la tetrahidroisoquinolina que se forman en la planta a partir del aminoácido tirosina.

Garza *et al.*, (2004) realizó un estudio fitoquímico del "nopal estrella" o *Acanthocereus occidentalis* que indicó la presencia de insaturaciones, oxidrilos fenólicos, esteroides, triterpenos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides.

Wybraniec y Nowak-Wydra (2007), identificaron la betanidina 5-O-(6'-O-malonil)-beta-soforosido o mammillarina, una nueva betacianina. Se encontró en frutos de nueve especies de *Mammillaria*: *M. roseo-alba* (Boedeker), *M. donatii* (Berge), *M. coronata* (Scheidweiler), *M. karwinskiana* (Martius), *M. gummifera* (Engelmann), *M. infermillensis* (Craig), *M. centricirrha* (Lemaire), *M. krameri* (Muehlenpfordt) y *M. magnimamma* (Haworth).

Domínguez (1973) establece métodos químicos para la detección de metabolitos secundarios como la prueba del Br_2/CCl_4 o del KMnO_4 para insaturaciones; para grupo carboxilo la prueba de 2-4-dinitrofenilhidracina, para oxidrilos fenólicos se menciona la reacción con FeCl_3 , para esteroides y terpenos la prueba de Liebermann-Burchard y la de Salkowski, para la detección de carbohidratos la prueba de Molisch y el Reactivo de Dragendorff especialmente usado para la detección de muchas clases de alcaloides.

6.3 Técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales

La técnica de cultivo de tejidos se ha utilizado desde hace 120 años aproximadamente en las investigaciones de fisiología vegetal; Hurtado y Merino (1987) mencionan que la técnica consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hojas y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen.

En 1983, Mantell y Smith reconocieron la utilidad del sistema de cultivo de tejidos vegetales al servir como fuente de metabolitos de importancia económica para el hombre, micropropagación, fitomejoramiento (Murashige, 1978) y ayudar a la preservación *in vitro* de germoplasma (Withers, 1978; Beversdorf, 1990; Grout, 1990).

Murashige y Skoog (1962) diseñaron un medio de cultivo para aplicarlo en la técnica de micropropagación; contiene macro y micronutrientes, suplementado con azúcar, vitaminas; se puede utilizar en forma sólida o líquida. Así mismo mencionan que la aplicación de balances hormonales en el medio de cultivo, estimulan la formación de nuevas estructuras (brotes, callos, raíces), según lo adicionado al medio, como por ejemplo: citocininas que estimulan la división celular, la diferenciación de brotes, entre otras funciones; auxinas, las cuales promueven la diferenciación de callo, el crecimiento de cultivo de células en suspensión y de raíces.

Smith (2000) y Pierik (1990; 1997) mencionan que para el establecimiento del cultivo *in vitro*, la combinación y el tipo de reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas) es de suma importancia.

Hartman *et al.*, (1997) detallan que los explantes de casi cualquier parte de la planta o de la semilla pueden formar callo, previa desinfección y medio de cultivo apropiado. Las auxinas en una concentración moderada a alta son las sustancias

primarias de crecimiento para inducir callo (AIA, ANA, 2,4-D), pero también en menores cantidades debe suministrarse las citocininas (K, BA).

6.4 Cultivo *in vitro* de cactáceas

Durante años se han realizado estudios biológicos, fisiológicos, entre otros para la conservación de cactáceas. Hoy en día, el cultivo de tejidos vegetales (CTV), llamado también cultivo *in vitro* juega un papel importante, en donde el objetivo principal es la producción masiva de nuevos individuos bajo condiciones controladas, así su empleo en la producción vegetativa de cultivares de las plantas ornamentales, puede tener repercusiones de tipo económico muy importantes (Robert y Loyola, 1985).

Khalafalla *et al.*, (2007) establecieron una estrategia de micropropagación con areolas para el cactus *Opuntia ficus-indica* como una herramienta para combatir la desertificación de las regiones áridas y semiáridas en Sudán.

Molphe *et al.*, (1998) desarrollaron sistemas de micropropagación para 21 especies de cactáceas mexicanas utilizando explantes de semillas germinadas *in vitro*. Las especies propagadas corresponden a los géneros *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*. Logrando la múltiple formación de brotes en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado BA y ANA.

Gallegos *et al.*, (2002) establecieron un protocolo de propagación *in vitro* de la cactácea *Astrophytum asterias*, utilizando la brotación adventicia a partir del cultivo celular en suspensión. El inóculo consistió de epicotilos de plántulas germinadas *in vitro*. Para el proceso de desdiferenciación y suspensión celular se utilizó Benciladenina (BA) adicionada con distintas concentraciones del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). El proceso morfogénico de brotación adventicia se desarrolló en el medio basal Murashige y Skoog (MS) sin reguladores del crecimiento. El mejor tratamiento para la

desdiferenciación y suspensión celular, se obtuvo en el medio adicionado con 3 mg/L de 2,4-D con 2 mg/L de BA mientras que la regeneración de los brotes adventicios ocurrió en el medio basal MS sin reguladores de crecimiento con una media de 36; lo que demuestra que la técnica de células en suspensión potencia el recurso de propagación múltiple adventicia.

Cárdenas *et al.*, (1992) lograron la proliferación de brotes de *Astrophytum capricorne* utilizando medio MS (1962) adicionado con BAP 0.2 mg/L y K 0.1 mg/L.

Astrophytum myriostigma y *Trychocereus spachianus* fueron cultivadas *in vitro* utilizando explantes de areolas en medio enriquecido con 0.5 mg.l⁻¹ de Kinetina y 5 mg.l⁻¹ de IAA. El método promete alta estabilidad genética y uniformidad en las plantas obtenidas (Vyskot y Jára, 1984).

Villavicencio *et al.*, (1999) desarrollaron brotes de *A. myriostigma* a partir de plántulas germinadas *in vitro* con 4 meses de edad, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, sustituyendo el CaCl₂ por Ca(NO₃)₂ H₂O, sin adición de KI. Se evaluaron 2 tipos de explantes, dos tipos de citocininas (BA y K) con cuatro niveles de concentración. Todos los tratamientos a excepción del testigo fueron combinados con 0.1 mg/L de AIB. En número de brotes no existieron diferencias significativas entre explantes. Altos niveles de citocinina incrementan el número de brotes; sin embargo, la sobrehidratación de los mismos aumenta, por lo que es un esquema eficiente de multiplicación no solo hay que considerar el número y altura de los brotes sino también la calidad de los mismos.

Crisóstomo *et al.*, (2007) evaluaron la capacidad morfogénica en explantes longitudinales de *Astrophytum ornatum*, con plántulas germinadas *in vitro* de 5 meses de edad, usaron medio Murashige y Skoog (1962) (MS) adicionado con Kinetina. Posteriormente se enraizaron en medio MS 100% donde permanecieron 2 meses.

Recomiendan el tiempo óptimo de exposición en medio de inducción es de 2 meses para adquirir la capacidad morfogenética.

Santos *et al.*, (2003) propagaron *in vitro* a *Pelecypora aselliformis* un cactus mexicano considerado como raro y con valor comercial. Los explantes longitudinales de las semillas germinadas *in vitro* fueron cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) conteniendo BA y Kin a pH 7.0. Después de 120 días, cada explante dio 5 brotes y este número de brotes incrementó de 20 a 25% después de subcultivar. La hiperhidricidad fue similar en ambas medias, pero la formación de callo fue menor en el medio con BA.

Arredondo y Camacho (1995) encontraron que a temperatura controlada de 25°C se obtiene un 90 y 100% de germinación para *Astrophytum myriostigma* en un tiempo de 5 a 6 días, colocándolas sobre papel filtro húmedo en cajas petri.

6.5 Obtención de compuestos químicos mediante la técnica de CTV

En la producción de metabolitos secundarios existen diversos problemas pero a través de la técnica de cultivos vegetales, se puede incrementar eligiendo líneas genéticamente de alta productividad, o bien, optimizando las condiciones físicas y químicas del cultivo (Piñol, 1999).

Pierik (1990) recomienda que para la biosíntesis *in vitro* de sustancias se deben utilizar plantas seleccionadas para obtener elevada producción de metabolitos, por lo que es recomendable saber que parte u órgano de la planta es el que presenta mayor cantidad de la sustancia, para de él desarrollar el cultivo de callo.

Steinhart (1992) usó cultivo de callo de *Trichocereus spachianus* para estudiar la biosíntesis de alcaloides.

Carew y Krueger (1977) determinaron que 1mg/L de 2,4-D adicionado al medio para el cultivo de células en suspensión de *Catharanthus roseus*, es adecuado para la producción de alcaloides.

De Oliveira y Machado (2003) compararon la producción de alcaloides de la cactácea *Cereus peruvianus* en medio original y suplementado con tirosina. Como resultado obtuvieron que el medio adicionado produjo altas cantidades de alcaloides, lo que consideran que se pueden utilizar otros factores para eficientizar la producción mediante el callo de *C. peruvianus*.

Carvajal *et al.*, (2001) compararon la producción de alcaloides de *Uncaria tomentosa* entre tejidos *in vivo* y tejidos cultivados *in vitro*, observando que en los de cultivo *in vitro* la producción de alcaloides fue influenciada por las auxinas, por ejemplo, el ácido indolacético promueve la formación de alcaloides de tipo indol y oxindol en células cloróticas, mientras que el 2,4-D lo suprime.

6.6 Actividad biológica

6.6.1 Bactericida

Treviño *et al.*, (2004) obtuvo resultados positivos de actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y de *Stenocereus pruinosus*, no así de *Echinocereus stramineus*, el cual no presentó inhibición. *Pseudomonas aeruginosa* presentó mayor inhibición con extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Stenocereus pruinosus*. *Enterobacter aerogenes* fue inhibido mayormente por los extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, por último *Salmonella typhi* y *Listeria monocitogenes* fueron las que presentaron menor inhibición para estos extractos.

El extracto metanólico de *Lophocereus schottii* presentó actividad antibacteriana relevante sobre *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes* (Morales, 2006).

Rico - Bobadilla *et al.*, (2001) trabajaron con el Músaro (*Lophocereus schottii*), usaron extractos liofilizados contra 5 cepas bacterianas de las cuales, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* mostraron inhibición.

Extractos de *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Lophocereus schottii* mostraron actividad bactericida y fungicida (Fimbres y García, 1998).

Silva (2005), probó extractos de *Euphorbia pulcherrima*, *E. trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle* para la determinación de la actividad antimicrobiana, usando el método de difusión en placa con discos de papel filtro.

6.6.2 Letalidad contra *Artemia salina*

Para la búsqueda y fraccionamiento de extractos de plantas fisiológicamente activos, se utilizó un bioensayo de bajo costo, rápido, fácil de realizar en el que se emplea un pequeño crustáceo, para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos, conocido como “letalidad de las larvas de *Artemia salina*” (Meyer *et al.*, 1982; Mc Laughlin *et al.*, 1988).

Morales (2006) obtuvo una DL₅₀ de 64.57 µg/mL del extracto metanólico de *Lophocereus schottii* sobre la letalidad de crustáceo *Artemia salina*.

Abreu *et al.*, (2001) evaluaron el extracto hidroalcohólico concentrado de los frutos de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón) mediante un bioensayo sencillo y confiable determinando la toxicidad frente a *Artemia salina* Leach, el cual resultó muy

baja. A la mayor concentración empleada (1 000 µg/mL) solo se alcanzó el 30 % de mortalidad como valor medio.

Alluri *et al.*, (2005) evaluaron mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia* salina los extractos acuosos de diversas plantas que se usan en la medicina tradicional de la India, obteniendo las DL₅₀ de *Pistacia lentiscus* con 2.5 µg/mL, *Aristolochia indica* (Aristolochiaceae), *Boswellia serrata* (Burseraceae), *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Garcinia cambogia* (Clusiaceae) y *Semecarpus anacardium* (Anacardiaceae) con DL₅₀ de 13, 18, 21, 22 y 29.5 µg/mL respectivamente.

6.6.3 Amebicida

Sharma y Sharma (2001) hacen una recopilación de información que desde tiempos inmemorables la gente ha utilizado las plantas para el uso de enfermedades y debido al resurgimiento de las mismas ocasionadas por protozoarios como la amibiasis y la malaria, es necesario incrementar los reportes sobre las plantas que tengan actividad antiamebiana y antiplasmodial.

Los habitantes del Noreste de México usan hojas de *Artemisia ludoviciana* en infusión como remedio antidiarreico, por lo que se evaluaron extractos acuoso, metanólico, acetónico y hexánico de hojas de plantas adultas, obteniéndose como resultado que son efectivos contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* en condiciones *in vitro* (Said *et al.*, 2005).

Oranday *et al.*, (2004) determinaron la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*, siendo ésta última la más susceptible al extracto.

Calzada *et al.*, (2003) encontraron que un extracto crudo de *Lepidium virginicum* mostró actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* (trofozoitos) con una CI_{50} de 100.1 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados soportan las anécdotas del uso tradicional de *L. virginicum* en el control de la diarrea y disentería en Chiapas, México.

Calzada *et al.*, (2005) examinaron la actividad antiprotozoaria del extracto diclorometano-metanol, fracciones y compuestos puros de raíces de *Geranium mexicanum* sobre *E. histolytica* y *Giardia lamblia*. El resultado indicó que el extracto, la fracción orgánica y un flavonoide puro fueron activos contra ambos protozoarios con valores de CI_{50} de 1.9 a 79.2 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y de 1.6 a 100.4 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de *Giardia lamblia*.

Calzada *et al.*, (2007) fraccionaron el extracto metanólico de la parte aérea de *Helianthemum glomeratum* proporcionando 5 glicósidos flavonoles. El ensayo antiprotozoario *in vitro* mostró que el tilirósido fue el más potente antiamebicida y compuesto anti $giardial$ con valores de CI_{50} de 17.5 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y 17.4 $\mu\text{g/mL}$ para *G. lamblia*. Isoquercitina mostró selectividad contra *E. histolytica* con CI_{50} de 14.7 $\mu\text{g/mL}$ y quercitina hacia *G. lamblia* con una CI_{50} de 24.3 $\mu\text{g/mL}$. Todos los compuestos aislados mostraron menos actividad que el metronidazol y emetina, dos drogas antiprotozoarias usadas como controles positivos.

Moo-Puc *et al.*, (2007) utilizaron extractos metanólicos de hojas, raíces y corteza de *Senna racemosa* para determinar su actividad antiprotozoaria contra *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*. Los extractos de la corteza del tallo mostraron una CI_{50} de 2.10 $\mu\text{g/mL}$ para *Giardia intestinalis* y 3.87 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica*

6.6.4 Antioxidante

Treviño *et al.*, (2006) menciona que el extracto metanólico de *Echinocereus stramineus* presenta actividad antioxidante obteniendo una CI_{50} de 25 ppm; y en las

pruebas colorimétricas efectuadas a los extractos concentrados de esta cactácea, indican la presencia de oxidrilos fenólicos, lo que hace suponer que estos compuestos pueden ser los responsables de esta actividad.

Lee *et al.*, (2002) evaluaron la propiedad antioxidante de un extracto etanólico de *Opuntia ficus-indica* var. saboten, mediante varias técnicas, concluyendo que debido a la alta cantidad de fenoles (180.3 mg/g), puede ser que éstos compuestos sean los responsables de la propiedad antioxidante del extracto probado.

Saleem *et al.*, (2006) obtuvieron de *Opuntia ficus-indica* var. saboten tres compuestos mediante la técnica de cromatografía y HPLC fase reversa, (1) isoramnetina 3-O-(6''-O-E-feruroyl)neohesperidósido, (2) (6R)-9,10-dihidroxy-4,7-megastigmadien-3-uno-9-O-beta-D-glucopiranosido, (3) (6S)-9,10-dihidroxy-4,7-megastigmadien-3-uno-9-O-beta-D- glucopiranosido; de los cuales el compuesto 1 mostró moderada actividad inhibitoria en el ensayo de secuestro del radical DPPH con una CI_{50} de 45.58 $\mu\text{g/mL}$.

Cho *et al.*, (2006) evaluaron la actividad antioxidante mediante el radical DPPH y actividad antiinflamatoria de extractos de metanol, hexano, cloroformo acetato de etilo, butanol y agua de *Opuntia humifusa* Raf., obteniendo resultados con una CI_{50} de 3.6 a 48.2 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de acetato de etilo.

Casanova *et al.*, (2008) realizaron extractos clorofórmicos, de acetato de etilo y metanólico al 50% de hojas de *Verbena officinalis*, posteriormente determinaron la actividad antioxidante mediante la técnica del DPPH y la actividad antifúngica, concluyendo que el extracto 50% metanólico presentó mejor actividad en el ensayo con DPPH.

Argolo *et al.*, (2004) probaron mediante la técnica de secuestro de radicales libres con DPPH los extractos clorofórmicos y de acetato de etilo con una planta de Brasil, *Bauhinia monandra* Kurz, determinando que ambos extractos presentaron una CI_{50} de

aproximadamente 2 mg/g, lo cual indica que ésta planta tiene una potente actividad antioxidante.

6.7 Cromatografía

Bruhn y Lundstrom (1976) obtuvieron de *Carnegiea gigantea* Br. & R., mediante cromatografía cuatro alcaloides: carnegina, salsolidina, gigantina y arizonina. De los cuales la salsolidina la reportaron por primera vez en éste cactus.

Pummangura *et al.*, (1977) analizaron los extractos de la cactácea *Pilosocereus maxonii* (Rose) obteniendo seis alcaloides mediante cromatografía en capa delgada, obteniendo tiramina, N-metiltiramina, entre otros, los cuales se han obtenido en otras especies de cactáceas.

Mata y McLaughlin (1980) encontraron dos alcaloides del cactus *Backebergia militaris* (Andot) identificados como heliamina y 3,4-dimetoxi-beta-fetilamina, fueron cristalizados después del corrimiento de la cromatografía preparativa. Asimismo estos compuestos fueron aislados de otras especies de cactáceas.

Ferrigni *et al.*, (1982) determinaron mediante cromatografía, la posible presencia de alcaloides en *Echinocereus triglochidiatus* Engelm variedad *paucispinus*; es una cactácea abundante en Texas y presenta un efecto hipotensivo similar a la histamina, similar al evaluado en otra variedad *neomexicanus* que es consumido por los indios Tarahumaras ocasionando efectos psicotrópicos.

Treviño (2000) menciona que las pruebas sobre las placas de cromatografía en capa fina son más convenientes para identificar el número de componentes y, por la intensidad de las manchas, su abundancia relativa. Se recomienda emplear placas de 30 x 100 mm y aplicar a 20 mm del extremo, dos gotitas del extracto y una de una mezcla de dos o tres sustancias testigo que se consideren representativa. El número de placas

corridas en un disolvente depende del número de pruebas a efectuar. Algunas mezclas recomendadas son: a) cloroformo-acetona (9:1), b) benceno-cloroformo (9:1), c) cloroformo-tetrahidro furano-ter-butanol-agua (10:6:50:1), d) ácido acético-butanol-agua (7:2:1).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material

7.1.1 Reactivos, material y equipo

7.1.1.1 Reactivos

1,1-Difenil-2-picrihidrazil	Cinetina
2,4-Dinitrofenilhidracina	Citrato férrico de amonio
Ácido acético glacial	Cloroformo
Ácido ascórbico	Cloruro de Calcio
Ácido bórico	Cloruro de Calcio (Anhidro)
Ácido clorhídrico	Cloruro de cobalto
Ácido 2,4 diclorofenoxiacético	Cloruro de cobalto hexahidratado
Ácido nicotínico	Cloruro de fierro
Ácido pícrico	Cloruro de sodio
Ácido sulfúrico	Detergente no iónico (Tween)
Acetato de etilo	D-glucosa anhidra
Agar	Dicromato de potasio
Agua bidestilada	Dimetilsulfóxido
Agua bidestilada estéril	EDTA - disódico
Agua desionizada	Etanol absoluto
Agua-hielo	Extracto de hígado y páncreas
Alfa-naftol	Extracto de levadura
Anhídrido acético	Formaldehído
Benceno	Fosfato de potasio
Bencilaminopurina	Gentamicina
Bicarbonato de sodio	Hidróxido de sodio

L-cisteína	Piridoxina
Levadura de cerveza (Pronal Ultra)	Plata coloidal (Microdyn)
Limaduras de Magnesio	Sacarosa
Metanol	Sal de mar Coralife Scientific Grad
Metronidazol	Marine Salt
Molibdato de sodio dihidratado	Suero bovino
Myo-inositol	Sulfato de cobre pentahidratado
Nitrato de amonio	Sulfato de magnesio heptahidratado
Nitrato de bismuto	Sulfato de manganeso hidratado
Nitrato de potasio	Sulfato de zinc heptahidratado
Penicilina-estreptomicina	Sulfato ferroso heptahidratado
Peptona de caseína	Tiamina
Peptona de colágeno	Yoduro de potasio
Permanganato de potasio	

7.1.1.2 Material

Asa Driblasky	Matraz Erlenmeyer de 250 mL
Bisturí	Micropipeta 100 µL y 1000 µL
Cajas de petri	Microplaca de 96 pozos
Cámara de Neubauer	Papel filtro Whatman No. 2
Capilar	Pinzas
Cuba cromatográfica	Pipeta graduada de 1 mL, 5 mL y 10 mL
Embudos de vidrio	Placas de cerámica de 12 pozos
Filtros millipore de membrana de 0.22µm	Placas de Sílica gel 60 F ₂₅₄ Fisher
Frascos de vidrio de 250 mL	Probeta graduada de 100 mL
Kleen-pack	Tubos de ensaye 18x150 mm
Lámpara de alcohol	Tubos de rosca 13x100 mm
Matraz de aforación 500 mL y 1000 mL	Tubos de rosca 18x150 mm
	Tubos Eppendorf

Vaso de precipitado 500 mL y 1000 mL

Viales color ámbar

7.1.1.3 Equipo

Agitador Dual Action Shaker Lab Line

Autoclave All American Model 25x-1

Balanza analítica Sartorius

Balanza granataria Ohaus CS2000

Campana de flujo laminar

Estufa Despatch. Termostato de 150-550° C

Incubadora Binder

Lámpara de escritorio

Luz ultravioleta

Microscopio estereoscópico Leica ES2

Microscopio invertido Axiovert 25

Plancha de agitación Thermolyne

Potenciómetro Orion 420 A+

Refrigerador

Rotavapor Büchi 461

Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5

Timer

7.1.1.4 Material Biológico

7.1.1.4.1 Material vegetal

Las plantas adultas de *Astrophytum myriostigma* fueron adquiridas en Semillas y Plantas Desérticas de México en Saltillo, Coahuila con UMA-VIV-0002-COA, factura # 339. Una vez que las plantas llegaron al laboratorio de Micropropagación se les dieron los cuidados pertinentes hasta su posterior uso.

Para *Astrophytum capricorne* la colecta de las plantas adultas se realizó en el Municipio de Mina, N.L., con el permiso de colecta N°139.0.DDR2.22 2006, posteriormente fueron trasladadas al laboratorio para extraer las semillas y brindarles los cuidados pertinentes.

7.1.1.4.2 Cepas Bacterianas

Las cepas fueron obtenidas del laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, y fueron las siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marsescens*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* y *Bacillus subtilis*.

7.1.1.4.3 *Artemia salina*

Los huevecillos de *Artemia salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC), fueron adquiridos en USA.

7.1.1.4.4 *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS

La cepa de *E. histolytica* HM1-IMSS cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en medio de cultivo PT, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

7.2 Métodos

7.2.1 Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fue Murashige & Skoog (MS)(1962) sólido, el cual se elaboró a base de sales minerales, con alta proporción de nitratos, compuestos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores del crecimiento disueltos en agua bidestilada, como agente solidificante se usó agar. Algunos compuestos se usan en pequeñas proporciones, requieren su elaboración en soluciones stock o substock (Tablas I y II). El medio se esterilizó a 121°C, 15 lb/15 minutos y después se almacenó en refrigeración.

TABLA I
Composición del medio MS (1962)

SALES	mg/L	
MACROELEMENTOS		
	FÓRMULA	
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Cloruro de calcio (anhidro)	CaCl ₂	332
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	170
MICROELEMENTOS		
Ácido etilendinitrotetraacético-disódico	Na ₂ EDTA	37.3
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dohidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
COMPUESTOS ORGÁNICOS		
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100
Glicina	NH ₂ CH ₂ COOH	2
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS.HCl	4
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	1
Piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .ClH	1
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30 g/L
Agar		7 g/L
REGULADORES DEL CRECIMIENTO		
2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético)	Cl ₂ C ₆ H ₃ OCH ₂ CO ₂ H	3
BAP (Bencilaminopurina)	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	2
K (Cinetina)	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	1

Componentes para un litro de medio de cultivo sólido Murashige & Skoog (MS)(1962).

TABLA II
 Procedimiento para elaborar medio MS (1962) con las
 soluciones concentradas

Compuesto	Cantidad por L
Solución A (CaCl ₂ .2H ₂ O)	1 mL
Solución B	KNO ₃ 1.9 g
	NH ₄ NO ₃ 1.65 g
Solución C (KI, CoCl ₂ .6H ₂ O)	1 mL
Solución D (KH ₂ PO ₄ , H ₃ BO ₃ , Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	2.5 mL
Solución E (MgSO ₄ .7H ₂ O, MnSO ₄ .H ₂ O, ZnSO ₄ .7H ₂ O, CuSO ₄ .5H ₂ O)	2.5 mL
Solución F (FeSO ₄ .7H ₂ O, Na ₂ EDTA)	5 mL
Solución G (Glicina, Piridoxina, Ácido Nicotínico, Tiamina)	10 mL
Reguladores del crecimiento	2,4-D 3 mg/L BAP 2 mg/L K 1 mg/L
Myo-inositol	100 mg
Sacarosa	30 g
Adicionar todos los constituyentes y aforar a 1000 mL	
Ajustar pH a 5.7	
Agar	7 g

Componentes para un litro de medio Murashige & Skoog (MS)(1962) sólido con las soluciones Stock.

7.2.2 Desinfección y Establecimiento del cultivo *in vitro*

7.2.2.1 *Astrophytum myriostigma*

Desinfección de tallos (costillas): se lavaron en agua corriente por 30 min, después se sumergieron en etanol absoluto por 30 s, posteriormente las costillas fueron

introducidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial a 15 % v/v con 100 mg/L de ácido ascórbico y 5 gotas de detergente no iónico por 10 min en agitación constante, y ya dentro de la campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril. Para la siembra, las costillas se cortaron en fragmentos de 1cm³ aproximadamente, que fueron colocados en el medio Murashige & Skoog (MS)(1962) sin reguladores y adicionado con: BAP (Bencilaminopurina) 2mg/L y 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) 3mg/L. Los frascos fueron colocados bajo condiciones de luz (12h) y temperatura controlada en un rango de 24 a 26°C (Morales, 2000).

7.2.2.1.1 Semillas de *Astrophytum myriostigma*

Se realizó un preliminar de germinación para las semillas de *A. myriostigma* obtenidas en colectas de años anteriores, pero debido a su nula germinación, se optó por trabajar con tejido de las costillas de ésta especie.

7.2.2.2 *Astrophytum capricorne*

Para el cultivo *in vitro* de esta especie, se realizó como primer paso el lavado perfecto de la planta ya que presentó vellosidades en las areolas, posteriormente en la etapa de desinfección, los tallos (costillas) fueron lavados en agua corriente por 30 minutos, después se sumergieron en etanol absoluto por 30 s, así mismo las costillas fueron introducidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial a 20 % v/v con 100 mg/L de ácido ascórbico y 5 gotas de detergente no iónico por 10 min en agitación constante, y ya dentro de la campana de flujo laminar se enjuagaron con una solución de plata coloidal (Microdyn) y después se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril. Para la siembra, las costillas se cortaron en fragmentos de 1cm³ aproximadamente, que fueron colocados en el medio Murashige & Skoog (MS)(1962) sin reguladores y adicionado con: K (Cinetina) 1mg/L, BAP (Bencilaminopurina) 2mg/L y 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) 3mg/L. Los frascos fueron colocados bajo condiciones de luz (12h) y temperatura controlada en un rango de 24 a 26°C (Morales, 2000).

7.2.2.2.1 Escarificación de semillas de *Astrophytum capricorne*

Las semillas se extrajeron de frutos maduros, se lavaron y fueron sometidas a escarificación en H₂SO₄ concentrado por 15 s, posteriormente se procedió a su desinfección en agua bidestilada con jabón líquido por 30 min, seguido de un lavado en agua bidestilada con Microdyn (plata coloidal) por 30 min, después se sumergieron en etanol absoluto por 30 s, posteriormente fueron introducidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial a 30 % v/v con 3 gotas de detergente no iónico por 30 min en agitación constante, y ya dentro de la campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril y fueron sembradas en el medio Murashige & Skoog (MS)(1962) sin reguladores y adicionado con: BAP (Bencilaminopurina) 2mg/L y K (Cinetina) 1mg/L. Los frascos fueron colocados bajo condiciones de luz (12h) y temperatura controlada en un rango de 24 a 26°C (Avilés, 2001; Crisóstomo, 2009; Morales, 2000).

7.2.3 Obtención de extractos de especies vegetales

Se utilizaron tallos frescos y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*. Las muestras se pesaron, obteniéndose 4 a 134 g según la especie y el tipo de cultivo, fueron etiquetados, se colocaron en matraces Erlenmeyer que fueron perfectamente cerrados después de adicionarle metanol de 30 a 200 mL dependiendo de la cantidad de la muestra. Los matraces se mantuvieron en agitación constante en el agitador Dual Action Shaker Lab Line a temperatura ambiente durante 3 d. Después, cada uno de los extractos fueron filtrados con papel Whatman No. 2; se obtuvieron las muestras y se concentraron en el Rotavapor Büchi 461, posteriormente fueron almacenados cada extracto en su respectivo vial en refrigeración.

7.2.4 Pruebas químicas de identificación de grupos funcionales

Para la determinación inicial de los compuestos presentes en los extractos se

realizaron las pruebas químicas de identificación. Las soluciones utilizadas fueron a 10mg/mL de los extractos disueltos en metanol. Se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos (Domínguez, 1973).

7.2.4.1 Insaturaciones

7.2.4.1.1 Prueba del KMnO_4

Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añade gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de magnesio.

7.2.4.2 Grupo carbonilo

7.2.4.2.1 Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina

De 1 a 10 mg de la muestra se disuelven en etanol, se le añade una solución saturada de 2-4- dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo.

7.2.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)

7.2.4.3.1 Prueba del FeCl_3

Se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añaden unas gotas de cloruro de hierro al 12.5 % en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.

7.2.4.4 Esteroles y triterpenos

7.2.4.4.1 Prueba de Liebermann-Burchard

Se mezcla 1 mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfria a 0° y se le añade una gota de ácido sulfúrico. Gota a gota se añade este reactivo a la muestra o su solución clorofórmica. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 min) tiene cierto valor diagnóstico; así una coloración amarilla después de 15 min, parece corresponder a C-14-metilo y una variación -7 insaturación. La prueba es positiva con esteroides que contienen 2 enlaces dobles conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización.

7.2.4.4.2 Prueba de Salkowski

Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2 mg) en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

7.2.4.5 Carbohidratos

7.2.4.5.1 Prueba de Molish

A 1-2 mg de la muestra se les agrega gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.

7.2.4.5.2 Prueba de las coumarinas

Se disuelve 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.

7.2.4.5.3 Prueba de las lactonas

Se disuelven de 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indica la presencia del anillo lactónico.

7.2.4.6 Sesquiterpenlactonas

7.2.4.6.1 Prueba de Baljet

A 2-3 mg del compuesto se les agregan 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consiste de una solución A que contienen ácido pícrico al 1 % en etanol y una solución B: NaOH al 10 %.

7.2.4.7 Flavonoides

7.2.4.7.1 Prueba del H₂SO₄

Una pequeña cantidad de muestra se disuelve en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

7.2.4.7.2 Prueba de Shinoda

La muestra disuelta en etanol, se pone en contacto con limaduras de Mg, se aplica temperatura (flama) y después se le agregan unas gotas de HCl. Se considera la prueba positiva si se presentan colores naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

7.2.4.8 Alcaloides

7.2.4.8.1 Prueba de Dragendorff

Modificación de Munier y Machelobuf. Se elaboran 2 soluciones. Para preparar la solución A se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva cuando en placa de porcelana aparece una coloración rojo o naranja, que en cromatografía en capa delgada al revelar con el reactivo persiste por 24 h.

7.2.4.9 Saponinas

7.2.4.9.1 Prueba de la agitación

Una porción del residuo se disuelve con agua en un tubo de ensayo, se agita vigorosamente durante 3-5 min. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por 30 min, se considera prueba positiva.

7.2.4.9.2 Prueba del bicarbonato de sodio

La sal se prepara al 10% en agua. Se disuelven de 1-2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol y se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente. Luego se agregan 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indican la presencia de saponinas.

7.2.4.9.3 Prueba de Salkowski para saponinas

Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo y se añade 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo (Verástegui, 2000).

7.2.4.10 Aromaticidad

7.2.4.10.1 Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído

Se prepara una mezcla de 1mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregan de 1-5mg de la muestra disuelta en disolvente no aromático, se añaden unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva (Treviño, 2001).

7.2.4.11 Antioxidantes

7.2.4.11.1 Prueba de los radicales libres

Se prepara una solución de DPPH (1,1-Difenil-2-picrihidrazil) radicales libres desecados, al 0.04%. Esta solución es el revelador que se utiliza sobre una Placa de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fisher:

- a) Se coloca sobre la placa 1 gota de antioxidante estándar (Vitamina C como control positivo).
- b) Se coloca sobre la placa 1 gota del extracto a analizar.

Después de dejar secar las muestras, se agrega la solución reveladora de DPPH por aspersion sobre la placa cromatográfica. La presencia de una mancha de color amarillo sobre un fondo violeta o morado indica la presencia de sustancias antioxidantes.

7.2.5 Actividad Bactericida

7.2.5.1 Activación de las Bacterias

Se utilizó medio líquido C. Rivas (Patente IMPI MX/10892.2007 Rivas y col.) a base de peptona de colágeno, extracto de levadura. El medio se preparó con 8.5 g de medio en 100 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7, el medio se colocó en tubos de ensaye de 18 x 150, a cada tubo se le agregó 5 mL de medio, se esterilizó con calor húmedo (15lb/10 min) para luego inocularlas con las cepas bacterianas seleccionadas, se incubaron de 12 a 18 h a 37°C (Rivas, 1998; Silva, 1999).

7.2.5.2 Cultivo de bacterias

Se propagaron las bacterias en estudio en el medio de cultivo C. Rivas, se pesó 8.5 g en 100 mL de agua destilada, luego se esterilizó con calor húmedo y se sembró en cajas de petri (20 mL por caja) para posteriormente ser utilizadas en las pruebas de inhibición *in vitro* (Velásquez, 1997).

7.2.5.3 Determinación de la actividad antimicrobiana empleando la técnica de difusión en placa

Las pruebas microbiológicas se realizaron en cajas petri con 100 μ L del inóculo de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC y se difundió homogéneamente con una asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro impregnados con 50 μ L del extracto, un control negativo (etanol) y un control positivo (gentamicina), se incubaron durante 18-24 h a 37°C, después de este período se midió el halo de inhibición formado (Sánchez, 1995, Koneman *et al.*, 1989).

7.2.6. Bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*

7.2.6.1 Eclosion de nauplios

Para la incubación de huevecillos de *A. salina*, se elaboró agua de mar artificial, de la manera siguiente: se pesan 40 g de sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt), 0.006 g de levadura de cerveza (Pronal Ultra) se aforaron en un litro de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.8. El procedimiento se realizó incubando 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz. A las 24 h los nauplios fueron pasados

con la ayuda de una micropipeta a otro recipiente y mantenidos en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29°C por 24 h más.

7.2.6.2 Determinación de la dosis letal media

En una microplaca de 96 pozos fueron adicionados 100 µL de las diluciones de los extractos a probar, las concentraciones probadas fueron de 100 a 1000 µg/mL. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y como control negativo agua de mar. A las 24 h de aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis. Utilizando el método Probit se determinó la DL_{50} (Meyer *et al.*, 1982, Solís *et al.*, 1993).

7.2.7 Actividad amebicida

7.2.7.1 Medio de cultivo para *E. histolytica* cepa HM1-IMSS

Se preparó medio PT como se describe en la Tabla III, donde se mezclaron todos los componentes y se disolvieron en 62.5 mL de extracto de hígado y páncreas y se aforó a 500 mL con agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10N, el medio se colocó en tubos de ensayo de borosilicato de 18 x 150 mm con tapón de rosca conteniendo 10 mL del medio de cultivo y se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C/15 lb de presión, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C hasta su empleo (Barrón, 2008).

TABLA III
Procedimiento para elaborar medio PT

Compuesto	Cantidad en g
Peptona de caseína	7.5
Extracto de levadura	7.5
Extracto de hígado y páncreas	62.5
NaCl	0.5
L-cisteína	0.5
Ácido ascórbico	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ HPO ₄	0.3
Citrato férrico de amonio	0.00057
D-glucosa anhidra	8.0

Componentes para 500 mL de medio PT para el mantenimiento de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS.

7.2.7.2 Mantenimiento de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS

Se realizaron resiembras sucesivas de *E. histolytica* HM1-IMSS en el medio PT, el cual se encontraba en un volumen de 5 mL en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Cada tubo se adicionó con 0.5 mL de suero bovino, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y fueron inoculados con 1×10^4 células/mL, se incubaron a 37 °C por 72 h; posteriormente, se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo; cada tubo se agitó 10 veces por inversión y se procedió a determinar el número de células/mL con una cámara de Neubauer. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban a la mitad de la fase log de crecimiento.

7.2.7.3 Cinética de crecimiento

Se dispuso de 24 tubos (18 x 150 mm), adicionados con 5 mL del medio de cultivo PT, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino, cada tubo se inoculó con 1×10^4 células/mL. Posteriormente, se incubaron a 37 °C, y cada 24 h se determinó el crecimiento celular de tres tubos de cultivo hasta el cuarto día de incubación.

7.2.7.4 Determinación de la actividad amebicida

Para el análisis, los extractos se suspendieron en DMSO, se ajustaron a las concentraciones deseadas, enseguida fueron esterilizados por filtración con filtros millipore de membrana de 0.22µm. Las pruebas *in vitro* se realizaron empleando tubos de 13x100 mm de borosilicato con tapón de rosca, cada tubo conteniendo 5 mL del medio PT adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.05mL de la mezcla de antibiótico (penicilina-estreptomicina), se dispuso de 9 tubos a concentraciones en un rango de 0.01, 0.1, 0.3 y 0.7mg/mL de los extractos metanólicos de los tallos y tejido *in vitro* de *A. myriostigma* y *A. capricorne*; se incubaron a 37°C por 96 h. Se utilizó como control positivo el metronidazol y como control negativo el disolvente sin extracto. La CI_{50} se calculó mediante el método estadístico Probit.

7.2.8 Cuantificación de los radicales libres mediante el DPPH

7.2.8.1 Evaluación de la actividad antioxidante

Con base en el método de Cottele *et al.*, (1996) se evaluaron los extractos metanólicos de las especies para determinar la actividad antioxidante. Se utilizó el método del radical libre DPPH, el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en la 2,2-difenil-1-picril hidracina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos –OH que decoloran el reactivo DPPH.

7.2.8.2 Preparación del estándar y extractos metanólicos

La solución estándar se preparó a una concentración de 0.1 mM de DPPH en etanol absoluto mientras que los extractos concentrados de las especies en estudio se disolvieron en metanol, de cada uno se prepararon stocks de 5mg/5mL y a partir de cada solución concentrada se elaboraron las diluciones correspondientes para lograr soluciones de 10, 20, 50 y 100 μ L.

7.2.8.3 Reacción de neutralización del radical

La mezcla de reacción se realizó en tubos de ensaye, se hicieron 4 repeticiones por cada concentración de cada extracto, en 2 eventos independientes. A cada tubo se adicionó 750 μ L del estándar de DPPH y 250 μ L de las disoluciones por cada extracto disueltas en metanol. Se utilizó como blanco la solución estándar de DPPH y como control positivo el ácido ascórbico. Las mezclas de la reacción se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente por 30 min. La absorbancia se midió transcurridos los 30 min a una longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (Tamil *et al.*, 2003). Se determina la CE_{50} la cual nos indica la concentración necesaria para reducir el 50% del radical DPPH.

7.2.9 Comparación cromatográfica de los extractos

7.2.9.1 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ Fisher que fueron colocadas dentro de una cuba cromatográfica. Mediante un capilar se distribuyó una porción del extracto, se dejó evaporar el solvente, luego se efectuó el corrimiento dentro de una cámara de vidrio con la siguiente mezcla de solventes Benceno 3: Acetato de Etilo 3: Metanol 4. El eluente ascendió por la placa y arrastró los componentes a lo largo de ésta produciendo

“manchas” de los componentes. Si los componentes no se colorean se usará la técnica de revelación con CoCl_2 (Cloruro de cobalto).

8. RESULTADOS

8.1 Material vegetal

Los tallos secos fueron montados y depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas para identificación, extendiendo el voucher correspondiente para ambas especies, para *A. myriostigma* el folio No. 025519 y para *A. capricorne*, el folio No. 025518. El resto del material vegetal se conservó para el cultivo *in vitro* y elaboración de extractos.

8.2 Cultivo *in vitro* de especies vegetales

8.2.1 *Astrophytum myriostigma*

El método de desinfección empleado (agua corriente por 30 min, etanol absoluto por 30 s, solución de hipoclorito de sodio comercial 15 % v/v con 100 mg/L de ácido ascórbico más 5 gotas de detergente no iónico por 10 min en agitación constante y tres enjuagues con agua bidestilada estéril dentro de la campana de flujo laminar) para ésta especie fué adecuado ya que no se presentó contaminación. Los explantes de tallo fueron



Figura 3. Callo de *A. myriostigma* obtenido en medio MS (1962) adicionado con BAP 2 mg/L.

sembrados en el medio de cultivo MS (1962), un mes después, manifestaron la desdiferenciación hacia callo, teniendo la mejor respuesta morfogénica en el medio adicionado con BAP 2 mg/L, como se muestra en la Figura 3, en el resto de los tratamientos se observó lo siguiente: con medio MS sin reguladores del crecimiento, los

explantes se oxidaron y no se presentó cambio alguno, en el medio MS adicionado con BAP 2 mg/L y 2-4,D 3 mg/L fué escasa la desdiferenciación hacia callo teniendo una respuesta similar con medio MS adicionado con 2-4, D 3 mg/L.

8.2.2 *Astrophytum capricorne*

A diferencia del bioensayo anterior, los explantes de tallo de *A. capricorne* mostraron contaminación en los días posteriores a la siembra, lo que impidió el establecimiento del cultivo *in vitro* de dicha especie bajo las condiciones establecidas en el protocolo. Por lo que se optó por utilizar semillas de esta especie como alternativa para el cultivo *in vitro*.

8.2.2.1 Semillas de *Astrophytum capricorne*

La escarificación de las semillas en H₂SO₄ concentrado por 15 seg y la desinfección fué la adecuada (agua bidestilada con jabón líquido por 30 min, agua bidestilada con Microdyn (plata coloidal) por 30 min, etanol absoluto por 30 s, solución de hipoclorito de sodio comercial a 30 % v/v con 3 gotas de detergente no iónico por 30 min en agitación constante y tres enjuagues con agua bidestilada estéril dentro de la campana de flujo laminar), ya que las semillas desarrollaron callo, sembradas en el medio MS (1962) sin reguladores y adicionado con: BAP 2mg/L y K 1mg/L. En la Figura 4 se muestra el desarrollo de callo a partir de semillas germinadas en medio MS sin reguladores y otro adicionado con BAP 2mg/L y K 1mg/L. Las semillas comenzaron el proceso de germinación con la emergencia de la radícula, observándose que en el medio MS sin reguladores mostró mayor proliferación de callo.

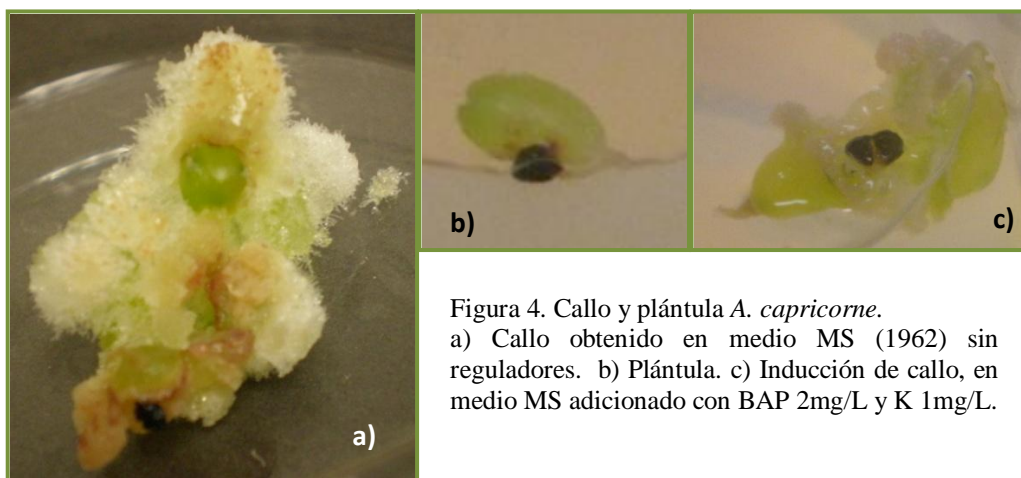


Figura 4. Callo y plántula *A. capricorne*.
a) Callo obtenido en medio MS (1962) sin reguladores. b) Plántula. c) Inducción de callo, en medio MS adicionado con BAP 2mg/L y K 1mg/L.

8.3 Rendimiento de la extracción del material vegetal

Los resultados del rendimiento de los extractos metanólicos de planta y tejido *in vitro* de las especies en estudio se muestran en la Tabla IV, en donde se observa que *A. myriostigma* y *A. capricorne* tuvieron mejor rendimiento para el tejido *in vitro* de 1.62% y 1.93% respectivamente, a diferencia de los rendimientos de los extractos metanólicos de los tallos, cuyos valores son menores.

TABLA IV
Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos metanólicos de tallos y callo

Especie	Rendimiento de la planta %	Rendimiento de callo %
<i>Astrophytum myriostigma</i>	1.45	1.62
<i>Astrophytum capricorne</i>	1.83	1.93

8.4 Pruebas Químicas de Identificación de Grupos Funcionales

8.4.1 Comparación de los metabolitos secundarios presentes en la planta y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma*

En la Tabla V se muestran los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos de la planta y del tejido *in vitro* de *A. myriostigma*, en donde se observa que ambos dan resultado positivo en las pruebas de insaturaciones, triterpenos o esteroides, carbohidratos y alcaloides, mientras que observamos que el tejido *in vitro* da positiva la reacción para oxidrilos fenólicos y flavonoides, a diferencia del extracto de la planta en el que la reacción es negativa.

TABLA V
Identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de planta y callo de *A. myriostigma*

Prueba química	Tallo	Callo
Insaturaciones Prueba del KMnO ₄	+	+
Grupo carbonilo Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina	-	-
Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales) Prueba del FeCl ₃	-	+
Esteroles y triterpenos Liebermann-Burchard Salkowski	+ -	+ +
Carbohidratos Molish Coumarinas Lactonas	+ - -	+ - -
Sesquiterpenlactonas Baljet	-	-
Flavonoides H ₂ SO ₄ Shinoda	- -	+ -
Alcaloides Dragendorff	+	+
Saponinas Agitación Bicarbonato de sodio Salkowski	- - -	- - -
Aromaticidad Ácido sulfúrico-formaldehído	-	-

8.4.2 Comparación de los metabolitos secundarios presentes en la planta y tejido *in vitro* de *Astrophytum capricorne*

Los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos de la planta y del tejido *in vitro* *Astrophytum capricorne* se muestran en la Tabla VI, donde es posible observar que comparten la presencia de oxidrilos fenólicos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas y alcaloides. El tallo presentó grupo carbonilo, triterpenos, flavonoides y saponinas, mientras que las pruebas para el callo fueron negativas.

TABLA VI
Identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de planta y callo de *A. capricorne*

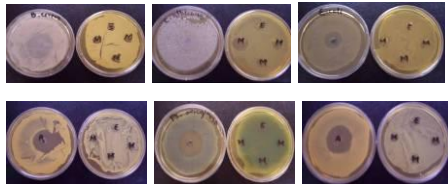
Prueba	Tallo	Callo
Insaturaciones Prueba del KMnO_4	+	+
Grupo carbonilo Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina	+	-
Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales) Prueba del FeCl_3	+	+
Esteroles y triterpenos Liebermann-Burchard Salkowski	+ +	- -
Carbohidratos Molish Coumarinas Lactonas	+ - -	+ - -
Sesquiterpenlactonas Baljet	+	+
Flavonoides H_2SO_4 Shinoda	+ -	- -
Alcaloides Dragendorff	+	+
Saponinas Agitación Bicarbonato de sodio Salkowski	- - +	- - -
Aromaticidad Ácido sulfúrico-formaldehído	-	-

8.5 Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos

8.5.1 Extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma*

En la Tabla VII se ilustra la actividad de los extractos metanólicos de la planta y del tejido *in vitro* de *A. myriostigma* sobre las cepas microbianas seleccionadas. En donde se observa que ninguno de los dos extractos mostró actividad bactericida.

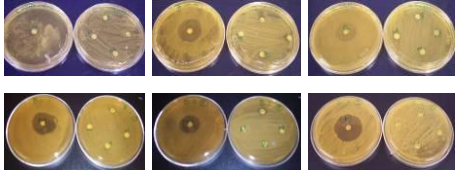
TABLA VII
Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de
Astrophytum myriostigma

Bacteria	Extractos metanólicos de <i>A. myriostigma</i>	
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Candida albicans</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Klebsiella sp.</i>		
<i>Proteus mirabilis</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		No hubo formación de halo de inhibición, sobre ninguna de las bacterias evaluadas.
<i>Salmonella sp.</i>		
<i>Serratia marsescens</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

8.5.2 Extractos metanólicos de *Astrophytum capricorne*

Se muestra en la Tabla VIII la actividad de los extractos metanólicos de *A. capricorne* sobre las cepas microbianas seleccionadas. Estos extractos no tuvieron actividad, ya que no hubo formación de halo de inhibición.

TABLA VIII
 Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de
Astrophytum capricorne

Bacteria	Extractos metanólicos de <i>A. capricorne</i>
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Klebsiella sp.</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Salmonella sp.</i>	
<i>Serrata marsescens</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

8.6. Determinación de la Dosis Letal Media sobre *Artemia salina*

Con el propósito de determinar la DL₅₀ (Dosis Letal Media) de cada uno de los extractos metanólicos de tallos y del cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*, se diseñó el experimento en base al análisis Probit, mediante el programa SPSS versión 17.

Los resultados del ensayo de toxicidad contra *A. salina* de los extractos metanólicos de ambas especies y cultivos se muestran en la Tabla IX.

TABLA IX
Actividad de los extractos metanólicos sobre *Artemia salina*

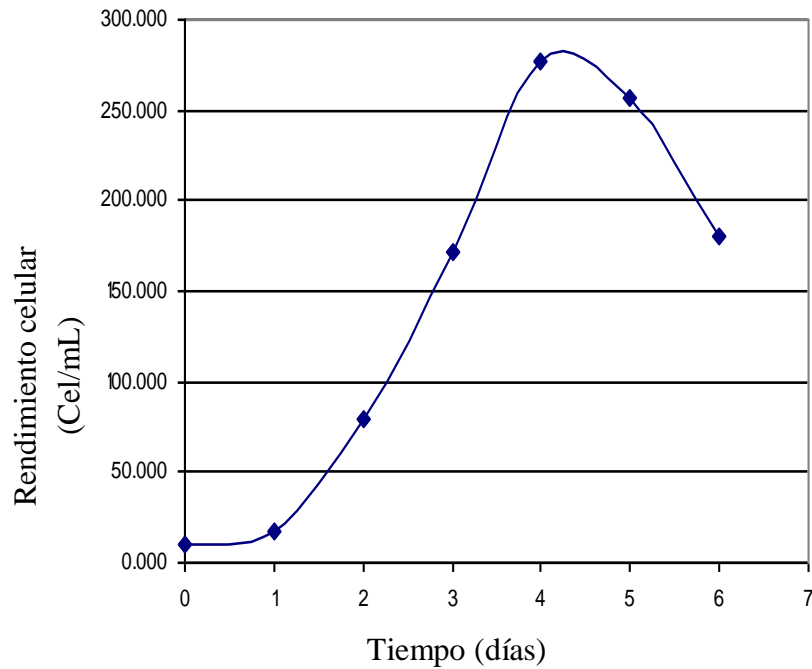
Extracto Metanólico	DL ₅₀ (µg/mL)	X ²	p
<i>Astrophytum myriostigma</i> (Tallo)	1527	96.20	0.000
<i>Astrophytum myriostigma</i> (Callo)	5651	56.20	0.144
<i>Astrophytum capricorne</i> (Tallo)	2152	94.85	0.000
<i>Astrophytum capricorne</i> (Callo)	-	-	-

Dosis Letal Media (DL₅₀) obtenidas mediante el diseño estadístico Probit. (-) Extracto no evaluado. Valores superiores a 1000 µg/mL, no son tóxicos.

8.7 Actividad sobre el cultivo axénico de *E. histolytica* HM1-IMSS

8.7.1 Cinética de crecimiento

En la cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS (Gráfica 1) se observa una ligera fase de adaptación durante las primeras 24 h de crecimiento, seguido de la fase logarítmica y presentando el máximo rendimiento celular al cuarto día de incubación a 37°C, con aproximadamente 280,000 cel/mL. Posteriormente, la cinética presenta una paulatina disminución celular.


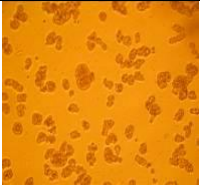
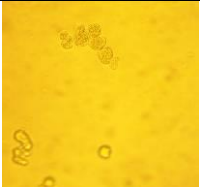
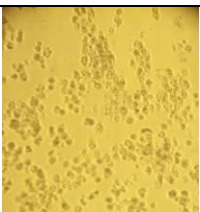


Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS, aproximadamente al cuarto día se observa el máximo rendimiento celular. Se dispuso de 24 tubos (18 x 150 mm), adicionados con 5 mL del medio de cultivo PT, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino, cada tubo se inoculó con 1×10^4 cél/mL. Posteriormente, se incubaron a 37 °C, y cada 24 h se determinó el crecimiento celular de tres tubos de cultivo hasta el cuarto día de incubación.

8.7.2 Extractos metanólicos de *A. myriostigma*

La aplicación de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS manifiesta daños en la morfología de las células. En la Tabla X se observan los daños que ocasionan los extractos aplicados a la cepa así como el efecto del metronidazol que es el compuesto puro.

TABLA X
Efecto de los extractos metanólicos de *A. myriostigma*
sobre la viabilidad celular y su morfología

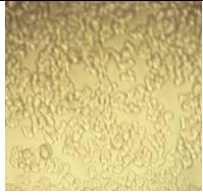
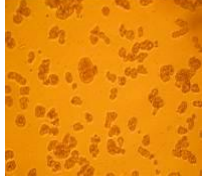
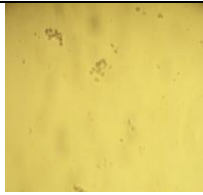
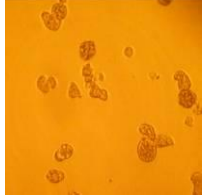
Tratamiento	Observación	Imagen
Control	Abundantes trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , los cuales presentan el aspecto típico pleomórfico.	
Metronidazol	Escasos trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , los cuales presentan alterada su típica morfología pleomórfica.	
Extracto Metanólico Planta	Se observan pocos trofozoítos y de morfología redondeada.	
Extracto Metanólico Tejido <i>in vitro</i> (Callo)	Se observa moderada cantidad de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> los cuales presentan el aspecto típico pleomórfico.	

Efecto de los extractos metanólicos de ambos tejidos de *A. myriostigma* sobre la viabilidad celular y daño morfológico.

8.7.3 Extractos metanólicos de *A. capricorne*

El cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS manifestó daños en la morfología al estar en contacto con los extractos metanólicos de *Astrophytum capricorne*. En la Tabla XI se observa la reacción morfológica de las células al estar en contacto con los extractos así como con el metronidazol.

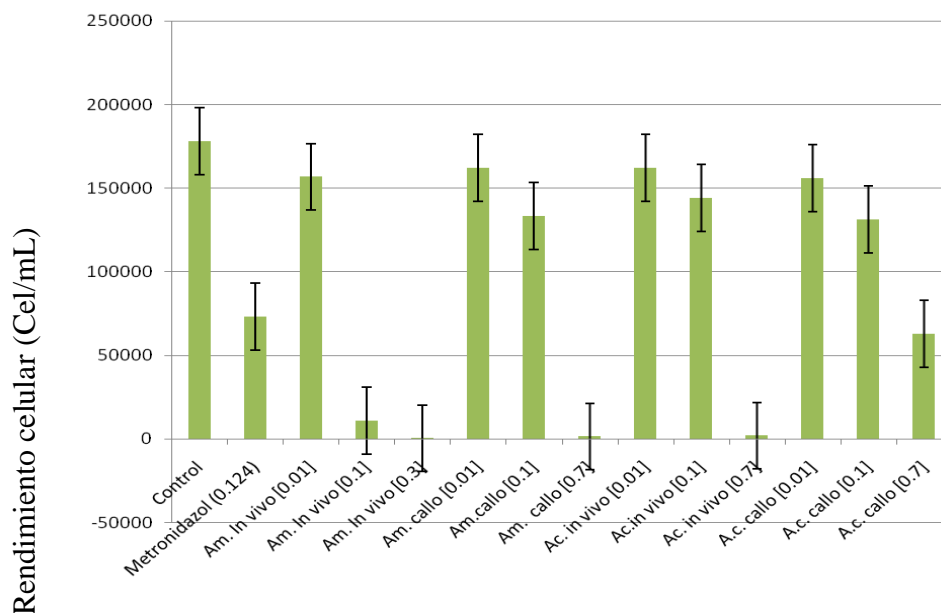
TABLA XI
Efecto de los extractos metanólicos de *A. capricorne*
sobre la viabilidad celular y su morfología.

Tratamiento	Observación	Imagen
Control	Abundantes trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , con el aspecto típico pleomórfico.	
Metronidazol	Escasos trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , con alteraciones en su morfología pleomórfica.	
Extracto Metanólico Planta	Se observa el efecto inhibitorio. Alteración en la morfología de los trofozoitos.	
Extracto Metanólico Tejido <i>in vitro</i> (Callo)	Moderada cantidad de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , los cuales presentan alteración en su aspecto pleomórfico.	

Efecto de los extractos metanólicos de ambos tejidos de *A. capricorne* sobre la viabilidad celular y daño morfológico.

8.7.4 Comparación del rendimiento celular de los cuatro extractos metanólicos sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

El rendimiento celular de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS con los cuatro extractos metanólicos obtenidos de ambas especies, así como con los controles positivo y negativo se muestran en la Gráfica 2.



Concentración

Gráfica 2. Rendimiento celular de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS en contacto con los extractos metanólicos de los tallos y cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne* así como los controles positivo y negativo. Las barras muestran el análisis de varianza entre los tratamientos.

En las cuatro muestras analizadas a la concentración de 0.01 mg/mL no se presentó diferencia significativa con respecto al control ni tampoco se observó diferencia entre ellas.

De las cuatro muestras analizadas a la concentración de 0.1 mg/mL sólo la muestra de *A. capricorne* tallo no presenta diferencia significativa con respecto al control, las muestra de *A. myriostigma* callo, *A. myriostigma* tallo y *A. capricorne* callo si presentaron diferencia significativa con respecto al control.

También se observa que entre las tres muestras, *A. myriostigma* callo, *A. capricorne* tallo y callo no presentan diferencia significativa entre ellas, pero estas tres muestras presentan marcada diferencia significativa con respecto a la muestra de *A. myriostigma* callo.

De las cuatro muestras analizadas, *A. myriostigma* tallo a 0.3 mg/mL presenta marcada diferencia significativa con respecto al control, así mismo las muestras de *A. myriostigma* callo, *A. capricorne* tallo y *A. capricorne* callo a la concentración de 0.7 mg/mL, presentan también marcada diferencia significativa con respecto al control. De las cuatro muestras analizadas aquí, *A. myriostigma* tallo y callo y *A. capricorne* tallo no presentan diferencia significativa entre ellas, mientras que la muestra de *A. capricorne* callo si presenta diferencia significativa.

Con respecto al metronidazol, las muestras si mostraron una diferencia significativa, a excepción de *A. capricorne* callo (0.7 mg/mL) no mostró diferencia significativa sobre la droga antes mencionada.

8.7.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media

En base al análisis Probit se aplicó al experimento, con el propósito de determinar la CI_{50} (Concentración de Inhibición Media) de cada uno de los extractos metanólicos de tallos y del cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*, mediante el programa SPSS versión 17. Los resultados obtenidos de la CI_{50} mediante el análisis Probit se muestran en la Tabla XII.

TABLA XII
 Actividad de los extractos metanólicos de tallo y callo de
A. myriostigma y *A. capricorne* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS

Extracto Metanólico	Dosis (mg/mL)	Media±D.E. (Trofozoitos/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	X ²	p
<i>A. myriostigma</i> (Tallo)	0.01	21,105±14,284	0.0270	3.6	0.056
	0.1	167,443±1,965			
	0.3	177,708±645			
<i>A. myriostigma</i> (Callo)	0.01	73,571±43,477	0.0553	140,594	0.000
	0.1	43,625±17,362			
	0.7	176,770±1,804			
<i>A. capricorne</i> (Tallo)	0.01	32,343±9,681	0.1001	86,771	0.000
	0.1	43,854±19,294			
	0.7	176,250±1,642			
<i>A. capricorne</i> (Callo)	0.01	59,374±37,353	0.4409	85.75	0.000
	0.1	81,110±42,150			
	0.7	105,485±50,952			

La Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) se calculó mediante el método estadístico Probit. Como control positivo se utilizó el metronidazol y como control negativo el disolvente sin extracto.

8.8 Actividad antioxidante mediante el método con DPPH de los extractos metanólicos de *A. myriostigma* y *A. capricorne*

8.8.1 Determinación cualitativa de la actividad antioxidante

Como prueba preliminar de la presencia de los radicales libres en los extractos metanólicos de las especies en estudio, se muestran en la Figura 5 la presencia de sustancias antioxidantes en los extractos y en el control positivo, con la aparición de manchas de color amarillo sobre un fondo morado.

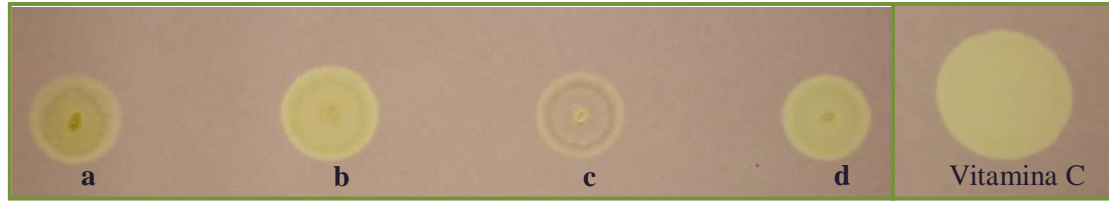


Figura 5. Presencia de antioxidantes de manera cualitativa en los extractos metanólicos del género *Astrophytum*. a) extracto de *A. myriostigma* tallo b) extracto de *A. myriostigma* callo c) extracto de *A. capricorne* tallo d) extracto de *A. capricorne* callo e) Vitamina C (control positivo).

8.8.2 Determinación de la CE_{50} de los extractos metanólicos

Para determinar la CE_{50} (Concentración Efectiva Media) de cada uno de los extractos metanólicos de tallos y del cultivo *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*, se diseñó el experimento en base al análisis Probit, mediante el programa SPSS versión 17.

En la Tabla XIII se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los extractos metanólicos en la reacción con DPPH.

TABLA XIII

Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *A. myriostigma* y *A. capricorne* mediante el método con DPPH

Extracto Metanólico	Dosis (µg/mL)	CE ₅₀ (µg /mL)	X ²	p
<i>A. myriostigma</i> (Tallo)	10	3961.39	3.86	0.974
	20			
	50			
	100			
<i>A. myriostigma</i> (Callo)	10	199.19	34.49	0.001
	20			
	50			
	100			
<i>A. capricorne</i> (Tallo)	10	302.86	8.16	0.880
	20			
	50			
	100			
<i>A. capricorne</i> (Callo)	10	274.06	5.46	0.907
	20			
	50			
	100			

La Concentración Efectiva (CE₅₀) indica la concentración necesaria para reducir el 50% del radical DPPH y se determinó mediante el diseño estadístico Probit. Se utilizó como blanco la solución estándar de DPPH y como control positivo el ácido ascórbico.

8.9 Cromatografía en capa delgada

Una vez aplicada la muestra de los cuatro Stock del género de *Astrophytum* en el punto de origen, se llevó a cabo el corrimiento de la cromatografía con la mezcla de eluentes Benceno 3: Acetato de Etilo 3: Metanol 4, en donde se observa en la Figura 6 que para el callo de *A. myriostigma* muestra una banda con un Rf 0.578, y el extracto de *A. capricorne* tallo muestra 2 bandas en la parte superior con los Rf 0.918 y 0.945, respectivamente.

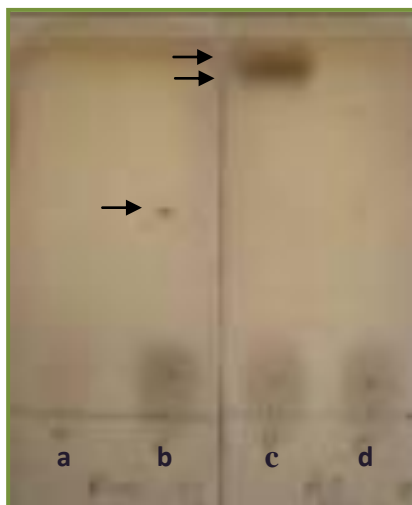


Figura 6. Cromatografía comparativa de los cuatro extractos metanólicos del género *Astrophytum* con la mezcla de eluentes (Benceno 3: Acetato de Etilo 3: Metanol 4). a) *A. myriostigma* Tallo, b) *A. myriostigma* Callo, c) *A. capricorne* Tallo, d) *A. capricorne* Callo.

Sólo el extracto de callo de *A. myriostigma* mostró una banda que al revelar con Cloruro de cobalto se pudo apreciar, al igual que con el extracto de tallo de *A. capricorne* y que a diferencia de los demás extractos, la mayoría o totalidad de la muestra se quedó en el punto de origen. Es importante mencionar que para determinar el número de bandas, se tienen que realizar las cromatografías de manera independiente, para determinar la mezcla de solventes adecuados para la obtención de un grupo funcional específico.

9. DISCUSIÓN

Los propósitos principales de éste trabajo fueron: la determinación de la actividad biológica de los extractos metanólicos de tallos de *Astrophytum myriostigma* y *Astrophytum capricorne*, la presencia de metabolitos secundarios y el cultivo *in vitro* de ambas especies.

Reyes & Arias, (1995) hacen alusión a que las condiciones de almacenamiento son muy importantes, ya que la mayoría de las semillas de cactáceas pueden permanecer viables entre 5 y 10 años almacenadas bajo condiciones controladas (contenido de humedad, temperatura), aunque algunas semillas pueden requerir de un período de almacenamiento en seco para alcanzar su máxima germinación. En el presente trabajo, no se logró la germinación de *A. myriostigma*, debido probablemente a que las condiciones de almacenamiento de las semillas no fueron las óptimas, por lo que se optó por trabajar con el material disponible, que eran secciones de tallo. Rojas-Aréchiga *et al.*, (1998) mencionan que la edad de las semillas en varias especies de cactáceas también influye en su respuesta a la germinación, las de mayor edad tardarán más en germinar; concordando con lo que se observó en este trabajo.

En cuanto a *Astrophytum capricorne* debido al alto grado de contaminación del material empleado, se optó por utilizar como explantes, semillas provenientes de frutos secos colectados. Sin embargo, su germinación se presentó después de ocho meses de haberse sembrado; quizá la inhibición de la germinación es producto de la presencia de compuestos endógenos en la testa como lo menciona Rojas-Aréchiga y Vázquez –Yanes (2000).

Camacho Morfín (1994) menciona que algunos compuestos químicos destruyen la cubierta que contiene a los inhibidores de la germinación o los lixivian, eliminando la

dormancia química, física y hasta la mecánica por degradación y desgaste de la testa, y agrega que uno de los más comunes es el ácido sulfúrico. Para éste trabajo, quizá el tiempo de exposición no fué el adecuado ya que se utilizó H₂SO₄ concentrado por 15 s y la germinación de las semillas se manifestó después de 7 meses, pero en preliminares realizados con la misma especie, se utilizó H₂SO₄ al 15% por 5 min y la respuesta obtenida fue hasta el octavo mes.

Por otra parte, al exponer las semillas en contacto con ácido, la temperatura se eleva, y es probable que éste fenómeno sirva como un activador metabólico que dé inicio a las primeras etapas de la germinación o que el inhibidor, de probable origen proteico, se desnaturalice.

Avilés (2001) menciona que el mejor tratamiento de escarificación para las semillas de *Stenocereus gummosus* es ácido sulfúrico concentrado por 4 min la cual produjo un 63% de germinación, Crisóstomo (2009) obtuvo a los 20 días casi el 100% de germinación de semillas escarificadas con H₂SO₄ al 15% de *Astrophytum ornatum* en medio MS 50%, en cambio, para éste trabajo el porcentaje de germinación fue bajo, ya que una semilla germinó después de 7 meses en medio MS.

En cuanto al establecimiento del cultivo *in vitro* de los explantes de tallo de *A. myriostigma*, la desinfección fué la adecuada ya que en la metodología implementada se preparó una solución adicional de ácido ascórbico (100 mg/L) como agente desinfectante, tal como lo menciona Blanco *et al.*, (2004) para desinfectar explantes de *Dracaena deremensis*, recordando que los segmentos de tallo de *A. capricorne* se contaminaron.

Los resultados del cultivo *in vitro* para las dos especies del presente trabajo, nos indican que tanto los procesos de escarificación, desinfección, medios de cultivo y concentración de los reguladores son adecuados para el desarrollo y crecimiento del callo, ya que Balen *et al.*,(2007) mencionan que las condiciones artificiales de la técnica de cultivo vegetales influyen en el desarrollo y crecimiento del tejido.

La combinación del medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2mg/L de Bencilaminopurina (citocinina) indujo la producción de callo para los explantes de *A. myriostigma* mientras que Gallegos y Vega (2002) obtuvieron un mejor rendimiento celular para *Astrophytum asterias* con MS adicionado de 3 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BA.

La germinación de las semillas de *A. capricorne* se llevó a cabo después de 8 meses, en donde, el medio MS basal favoreció la inducción de callo, caso contrario para *Leuchtenbergia principis* que bajo las mismas condiciones formó brotes (Starling, 1985), mientras que las semillas de *A. capricorne* sembradas en medio MS adicionado con BAP 2mg/L y K 1mg/L desarrollaron plántulas, al igual que *Stenocereus gummosus*, el cual produjo plántulas de muy alto vigor y rápido desarrollo, mientras que Morales (2000) y Garza (2005) trabajaron con las cactáceas *Hylocereus undatus* (pitahaya orejona) y *Acanthocereus occidentalis* (bajico), en medio MS adicionado con dos citocininas (BAP 2mg/L y K 1mg/L), obteniendo después de la germinación, plántulas con brotación múltiple.

Mediante las pruebas de tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de insaturaciones, triterpenos, carbohidratos, alcaloides y radicales libres para los extractos metanólicos, tanto de tallo y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma*, mientras que para los extractos de *A. capricorne* de ambos tejidos se encontró la presencia de insaturaciones, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, alcaloides.

En cuanto a los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos de *A. myriostigma*, el obtenido de tejido *in vitro* dió positivo para oxidrilos fenólicos, triterpenos, y flavonoides, no así para el extracto de tallo, lo cual coincide con Berger *et al.*, (2007) en el que mencionan que las condiciones artificiales pueden influir en la producción de productos naturales de plantas cultivadas.

El extracto metanólico de tallo de *Astrophytum capricorne*, dió positivas las pruebas coloridas de: grupo carbonilo, triterpenos, flavonoides y saponinas, a diferencia del extracto de callo, que no los presentó.

Es importante mencionar, que en estudios anteriores se han determinado tanto en tallos como en tejido *in vitro* de cactáceas diversos grupos funcionales, tal es el caso de Morales (2006) que determinó, para el extracto metanólico de tallo de *Lophocereus schottii*, sesquiterpenlactonas y alcaloides; y para *Stenocereus gummosus*, flavonoides, triterpenos, alcaloides; mientras que el callo de *S. gummosus* presentó oxidrilos fenólicos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y saponinas; en cuanto al fruto de ésta misma especie se encontró que presenta flavonas, leucoantocianinas, antioxidantes naturales, saponinas y alcaloides (Avilés, 2001); en cambio, Garza (2005) determinó flavonoides en el extracto metanólico de tallos de *Acanthocereus occidentalis*.

Wink (2004) menciona que algunos metabolitos secundarios han evolucionado como compuestos bioactivos que interfieren con ácidos nucleicos o proteínas y que a su vez, muestran propiedades farmacéuticas, antimicrobianas e insecticidas.

De acuerdo a lo anterior, se procedió a determinar la actividad antimicrobiana en las siguientes cepas: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia marsecens* y *Staphylococcus aureus*, observándose que ninguno de los extractos de las especies en estudio presentaron inhibición sobre el crecimiento de bacterias, a diferencia de lo reportado por Morales (2006) quien encontró que el extracto metanólico de tallo de *Lophocereus schottii* (Cactácea) presentó actividad bactericida relevante sobre *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes*.

Rodríguez (2008) menciona que otras especies de cactáceas: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* también han presentado actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*.

En los últimos 30 años, los nauplios de *Artemia salina* se han utilizado para detectar la toxicidad general de diversos compuestos. Desde un punto de vista farmacológico, se ha encontrado una buena relación con la prueba de mortalidad del camarón salino (*A. salina*) para detectar compuestos con actividad antitumoral en extractos de plantas, por lo que esta prueba es útil para identificar metabolitos con potencial terapéutico (Carballo, 2002).

Los resultados de la actividad biológica de los extractos metanólicos de tallos y tejido *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* y *A. capricorne* sobre *A. salina* Leach fueron bajos, ya que los valores de la DL₅₀ son muy altas, por lo que no tienen relevancia, coincidiendo con los resultados obtenidos por Rodríguez (2008) con las siguientes plantas: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens* que tampoco fueron relevantes, a diferencia de la DL₅₀ obtenida por Morales (2006) de 64.57 µg/mL del extracto metanólico de *Lophocereus schottii*.

Sharma y Sharma (2001) mencionan que es de suma importancia incrementar los reportes sobre plantas que tengan un significado terapéutico y así desarrollar nuevas drogas para combatir enfermedades ocasionadas por protozoarios. Tal es el caso de la amibiasis, enfermedad parasitaria infecciosa ocasionada por el protozoario parásito *Entamoeba histolytica*, que representa un problema de salud mundial (Barrón, 2008). En cuanto a la familia cactácea podríamos decir que son pocos los estudios de actividad amebicida, por lo que se evaluaron los extractos metanólicos de las especies en estudio, para determinar la concentración inhibitoria, observando que los extractos de tallo de *A. myriostigma* y *A. capricorne* tuvieron mayor actividad sobre *E. histolytica* que los extractos de callo, recordando que bajo condiciones naturales las plantas sintetizan metabolitos secundarios como mecanismo de defensa, lo cual hace mayor su actividad sobre este protozoario. Aunque, con la técnica de cultivos vegetales, una vez identificado el compuesto activo que presenta la actividad amebicida, se podría incrementar la eficiencia de la síntesis o producción del metabolito de interés, y así como lo menciona Sharma y Sharma (2001) desarrollar nuevas drogas (medicamentos) para el tratamiento de la enfermedad.

Kuklinski (2000) menciona que los flavonoides son sustancias fácilmente oxidables y por lo tanto, Colomb *et al.*, (2001), demostraron que las plantas que viven en hábitats áridos o semiáridos acumulan flavonoides lipofílicos en las hojas. Debido a su actividad antioxidante, los flavonoides son compuestos que absorben la luz UV y se localizan en la capa cerosa de las hojas y tallos (Avilés, 2001). La actividad antioxidante se puede determinar mediante el ensayo de secuestro del radical DPPH, Treviño *et al.*, (2006) reportaron a *Echinocereus stramineus* con una actividad antioxidante relevante (CE₅₀ de 25 ppm). Saleem *et al.*, (2006) obtuvieron mediante ésta misma técnica una CE₅₀ de 45.58 µg/mL, o sea, una moderada actividad inhibitoria de isoramnetina 3-O-(6''-O-E-feruoyl) neohesperidósido que es un compuesto de *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. Con respecto a las especies en estudio, el extracto metanólico de tallo de *Astrophytum myriostigma* tuvo una CE₅₀ de 3961.39 µg/mL, y para el callo la CE₅₀ fue de 199.19 µg/mL. En cuanto a *Astrophytum capricorne* los valores de CE₅₀ fueron de 302.86 µg/mL (tallo) y 274.06 µg/mL (callo), respectivamente. Si bien, los resultados no son relevantes, corroboran la tendencia de esta familia a sintetizar este tipo de metabolitos.

Los cromatogramas en capa fina realizados a los extractos metanólicos de *A. myriostigma* y *A. capricorne* utilizando el mismo sistema de eluentes y revelando con cloruro de cobalto mostraron diferentes bandas, por ejemplo, para el callo de *A. myriostigma* se muestra una banda con un Rf 0.578, y el extracto de *A. capricorne* tallo muestra 2 bandas en la parte superior con los Rf 0.918 y 0.945, respectivamente, mientras que para los extractos metanólicos de tallo de *A. myriostigma* y callo de *A. capricorne*, la muestra se quedó en el punto de aplicación.

Es importante mencionar que el extracto metanólico de callo de *A. myriostigma* mostró una banda diferente a los otros extractos probados, recordando que en la técnica de cultivo de tejidos vegetales, los explantes fueron sometidos a condiciones controladas (temperatura, luz,) mientras que para el tallo de *A. capricorne*, las condiciones ambientales a las que estuvieron expuestas las plantas se desconocen y que esto haya

favorecido o inhibido la síntesis de metabolitos secundarios. Ahora bien, con éste trabajo se da la pauta para mejorar la eficiencia de la técnica de cromatografía, y así determinar los metabolitos presentes en las bandas obtenidas, y/o realizar de manera independiente el corrimiento de cada uno de los cuatro extractos evaluados en éste trabajo, para estudios posteriores. Además sería recomendable, evaluar diferentes mezclas de solventes para lograr un mejor fraccionamiento de los extractos.

10. CONCLUSIONES

- * La obtención de callo a partir de explantes de tallo de *A. myriostigma* se logró en medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2mg/L de Bencilaminopurina.
- * El proceso de escarificación de semillas de *A. capricorne* con H₂SO₄ al 15% por 5 min, indujo germinación, la inducción de callo se logró en medio Murashige y Skoog (1962) sin reguladores.
- * En los extractos metanólicos de tallo y callo de *Astrophytum myriostigma* se determinó la presencia de insaturaciones, triterpenos, carbohidratos, alcaloides y radicales libres, el extracto metanólico de callo, también fué positivo para oxidrilos fenólicos, triterpenos y flavonoides.
- * En los extractos metanólicos de tallo y callo de *A. capricorne* se determinó la presencia de insaturaciones, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, alcaloides y radicales libres, el extracto metanólico de tallo también presentó grupos carbonilo, triterpenos, flavonoides y saponinas.
- * La actividad antimicrobiana sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia marsescens* y *Staphylococcus aureus*, fué negativa, con los extractos metanólicos de tallo y callo de ambas especies.
- * En el bioensayo de letalidad sobre *A. salina*, los valores obtenidos de la DL₅₀ en todos los extractos, fueron mayores de 1,500 µg/mL, por lo que se considera que no presentan toxicidad.
- * La concentración de inhibición media (CI₅₀) sobre *Entamoeba histolytica* de los extractos metanólicos de tallo y callo de *A. myriostigma* fueron bajas: de 27 y 55 µg/mL, respectivamente, mientras que para *A. capricorne* los valores fueron 100 y 440 µg/mL.

- * La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *A. myriostigma* se evaluó por el método de DPPH obteniéndose una Concentración efectiva media (CE₅₀) de 199.19 µg/mL para callo, considerándose mediana su capacidad secuestradora.
- * La actividad antioxidante de los extractos metanólicos para tallo y callo de *A. capricorne* por el mismo método se obtuvo una Concentración efectiva media (CE₅₀) de 302.86 y 274.06 µg/mL, considerándose baja la actividad secuestradora de radicales.
- * En el fraccionamiento de los extractos metanólicos de *A. myriostigma* y *A. capricorne* por cromatografía, se observaron diferencias en las bandas, entre callo y tallo de las dos especies, lo que indica que en ambas especies, tanto en el callo como en el tallo, hay diferentes metabolitos secundarios.
- * La presencia de oxidrilos fenólicos y flavonoides en el callo de *A. myriostigma*, son debido probablemente a las condiciones *in vitro* bajo las que el explante se desarrolló y a los nutrientes presentes en el medio, que actúan como elicitores induciendo la producción de estos metabolitos.

11. LITERATURA CITADA

1. Abreu PJ, Miranda MM, Toledo CG, Castillo GO. 2001. Rev Cubana Farm. 35(1):56-60.
2. Alluri VK, Tayi VNR, Dodda S, Mulabagal V, Hsin-Sheng T, Gottumukkala VS. 2005. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. International Journal of Applied Science and Engineering. 3, 2: 125-134.
3. Anderson EF. 1980. Peyote: The Divine Cactus. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. pp. 35-80.
4. Anderson EF. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Hong Kong. pp.18-19, 120-121.
5. Argolo AC, Sant´Ana AE, Pletsch M, Coelho LC. 2004. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. Bioresour Technol. 95(2): 229-33.
6. Arredondo GA, Camacho MF. 1995. Germinaci3n de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire) en relaci3n con la procedencia de las semillas y la temperatura de incubaci3n. Cact. Suc. M3x. XL: 34-38.
7. Avil3s AH. 2001. Germinaci3n mediante escarificaci3n con 3cido sulf3rico de *Stenocereus gummosus* (Engelm) Gibson y Horak (pitaya agria), y an3lisis fitoqu3mico del fruto. Tesis de Licenciatura. Universidad Aut3noma de Nuevo Le3n.
8. Balen B, Krsnik-Rasol M, Zamfir AD, Zadro I, Vakhrushev SY, Peter-Katalinic J. 2007. Assessment of N-Glycan Heterogeneity of Cactus Glycoproteins by One-Dimensional Gel Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. J Biomol Tech 18(3):162-72.
9. Barr3n GMP, Villarreal TL, Res3ndez PD, Mata CB, Morales VM. 2008. *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures *in vitro* induction. Experimental Parasitology. 118:600-603.
10. Ben3tez H, D3vila P. 2002. Las Cact3ceas en el contexto de las CITES. Biodiversitas. A3o 6. No. 40. 8-11.
11. Berger JM, Itagaki Y, Nakanishi K. 2007. The effect of Ultraviolet-Depleted Light on the Flavonol Contents of the Cactus Species *Opuntia wilcoxii* and *Opuntia violacea*. Chem Biodivers 4(7): 1525-32.

12. Beversdorf W. D. 1990. Micropropagation in crop species. In : H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas y J. Van Aartrijk (eds.), Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 3-12.
13. Blanco M, Valverde R, Gómez L. 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis*. Agronomía Costarricense 28(1): 07-15.
14. Bravo HH. y Sánchez, MH. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 110-453.
15. Bravo HH. y Sánchez MH. 1991. Las Cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México. Tomo 2. pp. 91-101, 252-263.
16. Bruhn JG, Lundstrom J. 1976. Alkaloids of *Carnegiea gigantea*. Arizonine, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. Lloydia. 39(4):197-203.
17. Calzada F, Velázquez C, Cedillo RR, Esquivel B. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. Phytother Res. 17(7):731-2.
18. Calzada F, Cervantes MJA, Yépez ML. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. J Ethnopharmacol. 98(1-2):191-3.
19. Calzada F, Alanís AD. 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. Phytother Res. 21(1):78-80.
20. Camacho-Morfin F. 1994. Dormición de semillas. Causas y tratamientos. Ed. Trillas. México, D.F. pp. 9-86.
21. Cannell RJP. 1998. Natural Products Isolation, Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 53-230.
22. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology 2:17.
23. Cárdenas CE, Ojeda ZE, Olivares S y Torres C. 1992. Propagación *in vitro* de *Astrophytum capricorne* (Dietrich). Ciencia Agropecuaria FAUANL. Marín, N.L. 5 (2) pp. 3-6.
24. Carew DP, Krueger RJ. 1977. *Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. Lloydia. 40(4):326-36.
25. Carvajal RI, Cerda GRC, Ramos VA. 2001. Comparative alkaloid production in plants, cells and differentiated organ cultures of *Uncaria tomentosa*. 42nd Annual

Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Oaxaca, Oaxaca, México. Julio 23.

26. Casanova E, García MJM, Calvo MI. 2008. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. Leaves. *Plant Foods Hum Nutr.* 63(3):93-7.
27. Cho JY, Park SC, Kim TW, Kim KS, Song JC, Kim SK, Lee HM, Sung HJ, Park HJ, Song YB, Yoo ES, Lee CH, Rhee MH. 2006. Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. *J Pharm Pharmacol.* 58(1):113-9.
28. Colomb M, *et al.*, 2001. Antioxidant activity of lipophilic epicuticular flavonoids from higuier plant leaves. Program and abstracts of 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Edit. Equis-o-eventos. Pp. 178.
29. Cottele N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery P, Wallet JC, Gaydou EM. 1996. Antioxidants properties of hydroxyl-flavones. *Free Radical Biol. Med.* 20:35-43.
30. Crisóstomo SM, López EAL. 2007. Evaluación de la capacidad morfogénica en explantes longitudinales de *Astrophytum ornatum*. XVIII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas, Zacatecas. México. Octubre 16-19.
31. Crisóstomo SM. 2009. Evaluación de la competencia morfogénica en explantes longitudinales de *Astrophytum ornatum* (De Candolle) (Cactaceae). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
32. De Oliveira AJ, Machado MF. 2003. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Appl Biochem Biotechnol.* 104(2):149-55.
33. Domínguez SXA, Domínguez SJrXA. 1976. Aspectos químicos de las Cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* XXI. ITESM. México. pp. 39-47.
34. Domínguez XA. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. pp. 39-44, 141-143, 211-228, 246.
35. Ferrigni NR, Nichols DE, McLaughlin JL, Bye RA. 1982. Cactus alkaloids. XLVII. N alpha-dimethylhistamine, a hypotensive component of *Echinocereus triglochidiatus*. *Journal Ethnopharmacology.* 5(3):359-64.
36. Fimbres PY, García R. 1998. Evaluación del efecto fungicida y bactericida de la mezcla de cactáceas *Pachycereus pecten-aboriginum* (cardón) y *Lophocereus schottii* (músaro). XXX Congreso Nacional de Microbiología. México. Abril 2-4.

37. Gallegos BA, Vega PJ. 2002. Regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. V Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal. Buenos Aires, Argentina, Octubre 20-22.
38. Garza P. RA. 2005. Respuesta *in vitro* y determinación de compuestos químicos de *Acanthocereus occidentalis* (Britton and Rose) y *Stenocereus gummosus* (Engelm) Gibson y Horak. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
39. Gómez SA. 2001. Enciclopedia Ilustrada de los Cactus y otras Suculentas. Impreso en España. p. 12.
40. Grout BW. 1990. Genetic preservation *in vitro*. In : H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas y J. Van Aartrijk (eds.), Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 13-22.
41. Hartman HT, Kester D, Davies F, Geneve R. 1997. Plant Propagation : principles and practices. Prentice Hall Editions : New Jersey. pp. 564-570.
42. Hurtado D y Merino M. 1987. Cultivo de tejidos Vegetales. pp.232.
43. Khalafalla MM, Abdellatef E, Mohameed AMM, Osman MG. 2007. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. Int. J. Sustain. Crop Prod. 2(4):1-8.
44. Koneman W, Allen SD, Dowell VR, Sommers M. 1989. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, Argentina. pp. 380-402.
45. Kuklinski C.2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega S.A. pp. 106-183.
46. Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Journal Agriculture Food Chemistry. 50(22):6490-6.
47. Mantell SH and Smith H. 1983. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. London. pp. 3-9.
48. Mata R, McLaughlin JL. 1980. Cactus alkaloids XLII: 3,4-dimethoxy-beta-phenethylamine and heliamine from the Mexican cereoid *Backebergia militaris*. Journal Pharm Sci. 69(1):94-5.
49. McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. 1988. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry

and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.

50. Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45:31-34.
51. Molphe BEP, Pérez RME, Villalobos AE, Meza RE, Morones RLR, Lizalde VHJ. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 34: 131-135.
52. Moo-Puc RE, Mena-Rejon GJ, Quijano L, Cedillo-Rivera R. 2007. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. *J Ethnopharmacol*. 112(2):415-6.
53. Morales RME. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *in vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
54. Morales RME. 2006. Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
55. Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:437-497.
56. Murashige T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: T.A. Thorpe (ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture*. IAPTC, Calgary. pp. 15-26.
57. Pierik RLM. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi – Prensa. España. pp. 49-83.
58. Pierik RLM. 1997. *In vitro Culture of Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 67-83.
59. Pimienta BE. 1999. El pitayo en Jalisco y especies a fines en México. Universidad de Guadalajara y Fundación Produce Jalisco, A.C: Jalisco, México. pp. 17-115.
60. Piñol MT. 1999. XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología y VI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. España. Septiembre 22-24.
61. Pummangura S, Nichols DE, McLaughlin JL. 1977. Cactus alkaloids XXXIII: beta-phenethylamines from the Guatemalan cactus *Pilosocereus maxonii*. *J Pharm Sci*. 66(10):1485-7.

62. Ranieri RL, McLaughlin JL. 1977. Cactus alkaloids. XXXI. beta-Phenethylamines and tetrahydroisoquinolines from the Mexican cactus *Dolichothele uberiformis*. *Lloydia*. 40(2):173-7.
63. Reyes J y Arias S. 1995. Cactáceas de México: conservación y producción. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 1:85-92.
64. Rico-Bobadilla AC, Gassós OLE, Félix FA. 2001. Efecto antimicrobiano del extracto liofilizado de músaro (*Lophocereus schottii*). XXXII Congreso Nacional de Microbiología. Guanajuato, Guanajuato. México. Abril 3-5.
65. Rivas MC. 1998. Diseño de un Medio de Cultivo para la Producción de Biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a Escala Piloto para la Obtención de Proteasas Caseinolíticas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
66. Rivas MC, Salinas-Carmona Mc, Galán-Wong L, Medrano –Roldán H. “Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico”. Patente IMPI MX/10892. 2007.
67. Robert ML y Loyola VM. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. en: Robert, Manuel L. y V. M. Loyola (compiladores). El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., CONACYT. pp.167.
68. Rodríguez GRG, Verde SMJ, Oranday CA, Morales RME, Rivas MC, Núñez GMA, Treviño NJF. 2008. Actividad biológica de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Fouquieria splendens* (Engelmann). En: VI Simposio Internacional sobre Flora Silvestre en Zonas Áridas. La Paz, B.C.S., Marzo 12-15.
69. Rojas-Aréchiga M, Orozco-Segovia A y Vázquez-Yanes C. 1998. Seed response to temperatura of Mexican cacti species from two life forms: an ecophysiological interpretation. *Plant Ecology* 135:207-214.
70. Rojas AM. y Vázquez YC. (2000). Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*. Vol. 44. pp 85-104.
71. Said FS, Ramos GMC, Mata CBD, Vargas VJ, Villarreal TL. 2005. In vitro antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia* 76(5):466-8.
72. Saleem M, Kim HJ, Han CK, Jin C, Lee YS. 2006. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Phytochemistry*. 67(13):1390-4.

73. Sánchez GCA. 1995. Efecto de los extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
74. Santos Díaz MDS, Méndez OR, Arredondo GA, Santos DMDL. 2003. *In Vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39 (5) 480-484.
75. Sharma P, Sharma JD. 2001. A review of plant species assessed in vitro for antiamoebic activity or both antiamoebic and antiplasmodial properties. *Phytother Res*. 15(1):1-17.
76. Silva SY. 1999. Análisis fitoquímico y efecto antimicrobiano de 2 especies de plantas tóxicas *Schinus molle* y *Nerium oleander*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
77. Silva BY. 2005. Identificación de los componentes que presentan actividad antimicrobiana y citotóxica de *Euphorbia pulcherrima*, *E. trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
78. Smith RA. 2000. *Plant Tissue Culture: Techniques and experiments*. Academic Press. USA. pp. 44-54, 186-187.
79. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica*. 59:250-252.
80. Starling R. 1985. In vitro propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cactus and Succulent Journal*. 57:3, 114-115.
81. Steinhart CE. 1992. Tissue culture of a cactus. *Science* 137:pp. 545-546.
82. Tamil SA, Joseph GS, Jayaprakasha GK. 2003. Inhibition of growth and aflatoxins production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and antioxidant activity. *Food Microbiol*. 20:455-460.
83. Treviño NJF. 2000. Estudio comparativo de los componentes químicos de callo y plántula de *Stenocereus griseus* (Hawworth) Buxabaum. Tesis de Maestría en Botánica. Universidad Autónoma de Nuevo León.
84. Treviño TR. 2001. Estudio fitoquímico de *Piper amalago*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
85. Valencia CO. 1995. *Fundamentos de fitoquímica*. Editorial Trillas. México. pp. 171-209.

86. Velázquez GCC. 1997. Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquilia canescens*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
87. Verástegui MM. 2000. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de Agaves y su acción sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
88. Villavicencio GEE, Villegas MA, Arellano OG, Vargas HJ. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. Cactáceas y Suculentas mexicanas. Tomo XLIV No. 2. pp. 49-55.
89. Vyskot B. y Jara Z. 1984. Clonal Propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. Journal Horticultural Science.59: 449-452
90. West LG, McLaughlin JL. 1977. Triterpenes from the button cactus, *Epithelantha micromeris*. Lloydia. 40(5):499-504.
91. Wink M. 2004. Phytochemical Diversity of Secondary Metabolites. In: Encyclopedia of Plant and Crop Science, Goodman Robert M. (ed). Marcel Dekker, Inc: United States of America. pp. 915-919.
92. Withers L. 1978. Freeze-preservation of cultured cells and tissues. In: T. A. Thorpe (ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. IAPTC, Calgary. pp. 297-306.
93. Wybraniec S, Nowak-Wydra B. 2007. Mammillarinin: a new malonylated betacyanin from fruits of *Mammillaria*. J Agric Food Chem. 55(20):8138-43.

Material electrónico

94. Garza PRA, Morales RME, Oranday CA, Treviño NJ. 2004. Preliminares fitoquímicos del “Bajinco” ó “Nopal Estrella” *Acanthocereus occidentalis* Britton And Rose. [internet]. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-1-2004/05.htm> [Revisado el 14 de Septiembre del 2009].
95. Morales RME, Verde SJ, Oranday CA, Rivas MC, Treviño NJF. 2004. Estudio fitoquímico de tallos y frutos de la pitaya agria de Baja California. [internet]. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-1-2004/07.htm> [Revisado el 14 de Septiembre del 2009].
96. Oranday CA, Rivas MC, Morales VMR, Mata CBD, Gutiérrez GJJ. 2004. Determinaron de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico

obtenido del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*. [internet]. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-3-2004/02.htm> [Revisado el 14 de Septiembre del 2009].

97. Treviño NJF, Oranday CA, Verde SJ, Rivas MC, Morales RME, Rodríguez GRG. 2004. Uso de extractos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocereus stramineus* y *Stenocereus pruinosus* como agentes antibacteriales. [internet]. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-1-2004/06.htm> [Revisado el 14 de Septiembre del 2009].

98. Treviño NJF, Oranday CA, Rivas MC, Verde SMJ, Núñez GMA, Morales RME. 2006. Potencial antioxidante en cactáceas. [internet]. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-14-2006/index.html> [Revisado el 14 de Septiembre del 2009].

RESUMEN CURRICULAR

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias
con acentuación en Química de Productos Naturales

Ruth Amelia Garza Padrón

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
TALLOS Y TEJIDO *IN VITRO* DE *Astrophytum myriostigma* (LEMAIRE, 1839) Y
Astrophytum capricorne (DIETRICH, 1922) FAM. CACTACEAE

Campo de Estudio: Biotecnología vegetal, Productos naturales.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León. Fecha de nacimiento: 20 de Julio de 1980.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, de la Carrera de Biólogo, fecha: abril 2005, con la tesis “Respuesta *in vitro* y determinación de compuestos químicos de *Acanthocereus occidentalis* (Britton and Rose) y *Stenocereus gummosus* (Engelm) Gibson y Horak”

Experiencia Profesional:

- Becario del laboratorio de Micropropagación (antes Biología del Desarrollo). 1998 a 2001.
- Promotor cultural en la Secretaría de Cultura del Municipio de Santa Catarina N.L. 2003 a 2006.
- Auxiliar administrativo en Área administrativa de la FCB. 2002 a 2004.
- Estancia en Veranos PROVERICYT. 2000, 2001.

PRODUCCIÓN



ESTUDIAR EL PASADO - ENFOCAR EL PRESENTE - PLANIFICAR EL FUTURO

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE ZONAS ÁRIDAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
REVISTA ZONAS ÁRIDAS

Camilo Carrillo 300A. Jesús María Lima 11 - Perú
Telef. 51-1-993108558 Email: zonasaridasperu@yahoo.com
www.lamolina.edu.pe/zonasaridas

Sr(s).

**Ruth A. Garza Padrón; María Julia Verde Star; Azucena Oranday
Cárdenas; Catalina Rivas Morales; Jaime Fco. Treviño Neávez;
Ramón G. Rodríguez Garza y Ma. Eufemia Morales Rubio**

El Director y Comité Editorial de la Revista ZONAS ÁRIDAS, Revista del Centro de Investigaciones de Zonas Áridas de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se sienten complacidos en comunicar a Ud(s). la aceptación de su artículo titulado: "CULTIVO IN VITRO DE ESPECIES DE ZONAS ÁRIDAS CON POTENCIAL DE APROVECHAMIENTO", luego de un proceso de doble arbitraje, y será publicado en la edición Número 14 de la Revista.

Agradecemos su respuesta a la convocatoria para la presentación de contribuciones para esta publicación y hacemos presente la satisfacción que significaría para nosotros contar con su participación en las siguientes ediciones.

Atentamente



Revista Zonas Áridas
Centro de Investigaciones de Zonas Áridas (CIZA)
Universidad Nacional Agraria La Molina
Lima, Perú

Cc. mmorales1132000@yahoo.com

Recibido: 21 setiembre 2009 / Aceptado: 01 abril 2010 / Publicado online 01 mayo 2010

22/03/2010

ACTA DE DICTAMEN

HOJA DE DATOS DEL MANUSCRITO

Autor(es): R. A. Garza Padrón^{a*}, M. J. Verde Star^b, M. E. Morales Rubio^a, A. Oranday Cárdenas^b, C. Rivas Morales^b, M. A. Núñez González^b y M. P. Barrón González^a.

Título: "ACTIVIDAD BIOLÓGICA COMPARATIVA DE *Astrophytum myriostigma* CULTIVADA IN VIVO E IN VITRO".

Dirección(es) de Autor(es): ^aDepartamento de Biología Celular y Genética, Lab. de Micropropagación y Lab. de Biología Celular. ^bDepartamento de Química, Lab. Fitoquímica y Lab. de Química Analítica. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Manuscrito Recibido: 17 diciembre 2009
Acuse de recibido: 12 enero 2010

No. Páginas: 13
No. de figuras: 2

✓ **Para su posible publicación es necesario tomar en cuenta observaciones de los árbitros:** ver siguientes hojas.

Atentamente,



Dr. Rafael Fernández Nava,
Editor de Polibotánica.