



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA E INDUSTRIAS
EXTRACTIVAS**

***“Estudio de la producción de bouvardina utilizando microbiota endógena de
Bouvardia ternifolia”***

TESIS

***Que para obtener el título de
INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL***

Presenta

Armando Samuel Madera Pedraza

Jesús Alejandro Ríos Romero

Directores:

Dr. Jaime García Mena

Dr. Yair Cruz Narváez

Ciudad de México, mayo 2024



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Escuela Superior de Ingeniería
Química e Industrias Extractivas
Subdirección Académica
Departamento de Evaluación y
Seguimiento Académico

Folio

T-DEySA-022-24

Asunto

Autorización de tema

100 Aniversario del CECyT "Gonzalo Vázquez Vela"
60 Aniversario del Centro Cultural "Jaime Torres Bodet"
50 Aniversario de la ESIME Unidad Culhuacán,
ESIA Unidad Tecamachalco y de la Escuela Superior de Turismo
40 Aniversario del CIEMAD, CEPROBI y del CITEDI

CDMX, 26 de marzo de 2024

Pasante

Jesús Alejandro Ríos Romero
Armando Samuel Madera Pedraza
PRESENTE

Boleta

2019320380
2019321302

Programa Académico


I.Q.I.
I.Q.I.


Mediante el presente se hace de su conocimiento que la Subdirección Académica a través de este Departamento autoriza al **Dr. Yair Cruz Narváez** y al **Dr. Jaime García Mena** sean asesores en el tema que propone usted desarrollar como prueba escrita en la opción **Tesis Colectiva**, con el título y contenido siguiente:


"Estudio de la producción de Bouvardin utilizando microbiota endógeno de Bouvardia ternifolia"

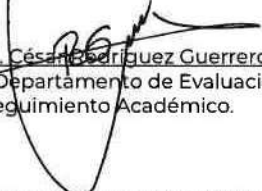
- Resumen
- Introducción
- Objetivo general
- Objetivos específicos
- I. Marco teórico
- II. Metodología
- III. Resultados
- Conclusiones
- Referencias
- Anexos


De acuerdo al artículo 28 del Reglamento de Titulación Profesional del Instituto Politécnico Nacional, el trabajo deberá ser concluido en un término no mayor de un año, a partir de esta fecha.


Ing. Juan Alejo Pérez Legorreta
Presidente de la academia de
Química Analítica


Dr. Yair Cruz Narváez
Director interno del trabajo escrito


Dr. Jaime García Mena
Director externo del trabajo escrito


M. en C. César Rodríguez Guerrero
Jefe del Departamento de Evaluación
y Seguimiento Académico.


Dra. Jahel Valdés Saucedo
Subdirectora académica

c.c.p.- Depto. de Evaluación y Seguimiento Académico.
c.c.p.- Depto. de Gestión Escolar.
CRC/micp





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional
"La Técnica al Servicio de la Patria"

**Escuela Superior de Ingeniería
Química e Industrias Extractivas
Subdirección Académica
Departamento de Evaluación y
Seguimiento Académico**

Folio

T-DEySA-022-24

Asunto

Cesión de derechos

2023. Año de Francisco Villa
30 Aniversario de la Declaración sobre
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil
40 Aniversario del CIIDIR, Unidad Oaxaca

Ciudad de México, a 17 de mayo de 2024

CARTA CESIÓN DE DERECHOS


Los que suscriben **Jesús Alejandro Ríos Romero** y **Armando Samuel Madera Pedraza** estudiantes del Programa de: **Ingeniería Química Industrial** con número de Boleta: **2019320380** y **2019321302**, manifiestan que son autores intelectuales del presente trabajo escrito, por la opción: **Tesis Colectiva**, bajo la dirección de los profesores **Dr. Yair Cruz Narváez** y el **Dr. Jaime García Mena**, ceden lo derechos del trabajo **"Estudio de la producción de Bouvardin utilizando microbiota endógeno de Bouvardia ternifolia"** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico alejandrorios.rom@gmail.com samuelpedraza.1734@gmail.com ycruzn@ipn.mx y jgmena@cinvestav.mx. Sí, el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente


Yair Cruz Narváez
Nombre y Firma
Director interno del trabajo escrito


Jaime García Mena
Nombre y Firma
Director externo del trabajo escrito


Armando Samuel Madera Pedraza
Nombre y Firma
Estudiante


Jesús Alejandro Ríos Romero
Nombre y Firma
Estudiante



2023
Año de
Francisco
VILLA
1859-1923
100 años de su nacimiento



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Escuela Superior de Ingeniería
Química e Industrias Extractivas
Subdirección Académica
Departamento de Evaluación y
Seguimiento Académico

Folio

T-DEySA-022-24

Asunto

Autorización de Impresión

2023. Año de Francisco Villa
30 Aniversario de la Declaración sobre
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil
40 Aniversario del CIIDIR, Unidad Oaxaca

Ciudad de México, a 17 de mayo de 2024

Pasante

Jesús Alejandro Ríos Romero

Armando Samuel Madera Pedraza

PRESENTE

Boleta

2019320380

2019321302

Programa Académico

I.Q.I.

I.Q.I.

Los suscritos tenemos el agrado de informar a usted, que habiendo procedido a revisar el borrador de la modalidad de titulación correspondiente denominado:

"Estudio de la producción de Bouvardin utilizando microbiota endógeno de Bouvardia ternifolia"

encontramos que el citado trabajo escrito de **Tesis Colectiva**, reúne los requisitos para autorizar el examen profesional y proceder a su impresión según el caso, debiendo tomar en consideración las indicaciones y correcciones que al respecto se le hicieron.

Atentamente

JURADO

Ing. José Javier Castro Arellano
Presidente

Dr. Yair Cruz Narváez
Secretario

Dr. Jaime García Mena
Vocal 1

Ing. Cenobio Gerardo Noriega Altamirano
Vocal 2

Ing. Enrique Rico Arzate
Vocal 3

c.c.p.- Depto. de Evaluación y Seguimiento Académico.
c.c.p.- Depto. de Gestión Escolar.
CRG/mlcp



2023
Año de
**Francisco
VILLA**

Ciudad de México, a 27 de mayo del 2024.


Dra. Wendy Noemí Téllez Salazar
Jefa del Dpto. de Servicios Estudiantiles, Biblioteca

P R E S E N T E

Por este conducto, solicito su apoyo para aplazar subir al repositorio digital del IPN la presente tesis, titulada "**Estudio de la producción de bouvardina utilizando microbiota endógena de *Bouvardia ternifolia***", ya que los procesos descritos y desarrollados son susceptibles de registro para protección intelectual.

Sin otro particular, agradezco de antemano su apoyo.

Atte.


Dr. Yair Cruz Narváez
Director Interno del trabajo escrito.

Agradecimientos Institucionales.

Este trabajo se desarrolló gracias a los proyectos apoyados por CONACYT: 302670 en la convocatoria 2019 apoyos para adquisición y mantenimiento de infraestructura en instituciones y laboratorios de investigación especializada; CONACYT FORDECYT-PRONACES/6669/2020_Programa Presupuestario F003-Ciencia de Frontera 2019, “Estudio de la vía Tracto-Digestivo-Materno ► Leche-Materna ► Tracto-digestivo-neonato. Una aproximación Ómica” y a los proyectos SIP 20230349, 20241478 y 1533-2021, y al proyecto de innovación y desarrollo de la convocatoria de proyectos de desarrollo tecnológico o innovación en el IPN 2023.

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y, en particular, a la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas (ESIQIE), por el apoyo incondicional durante la realización de nuestra tesis. La calidad educativa y la excelencia académica proporcionadas por esta prestigiosa institución han sido fundamentales para el desarrollo de nuestro proyecto de investigación. Agradecemos a todos los profesores y al personal administrativo de la ESIQIE por su dedicación y orientación, que han sido vitales en nuestro proceso de aprendizaje. Este logro es también un testimonio del ambiente colaborativo y enriquecedor que caracteriza a la comunidad del IPN. Apreciamos profundamente la oportunidad de formarnos académicamente en esta institución, y reconocemos con gratitud el papel fundamental que desempeña en nuestra formación profesional.

Hemos tenido el privilegio y el placer de interactuar con nuestros directores de Tesis y el Comité de asesores, líderes en sus diferentes campos. A todos ellos les agradecemos la deferencia de habernos dedicado tiempo, de recibir sus consejos y

haber sembrado los cimientos de sus disciplinas en este trabajo. Nuestro profundo agradecimiento a los pioneros e innovadores en el campo de la investigación, cuyas contribuciones han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Es un verdadero privilegio y placer haber podido colaborar con nuestros directores de tesis: el Dr. Yair Cruz Narváez, el Dr. Jaime García Mena, así como con el Comité de Asesores y Jurado, representado por el Dr. Enrique Rico, el Dr. Gerardo Noriega y el Dr. Javier Castro. Reconocemos y valoramos enormemente el tiempo dedicado, los consejos brindados y el legado de conocimiento transmitido durante este proceso, que ha sido vital para la culminación de este documento.

Agradecimientos familiares:

A mi madre, Mari Azucena Pedraza Montiel:

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la mujer que ha sido mi fuente inagotable de amor, apoyo y sabiduría a lo largo de esta travesía académica. Mamá, tu inquebrantable respaldo y tus palabras alentadoras han sido el motor que me impulsó a alcanzar esta meta. Sin tu presencia inspiradora, este logro no sería posible.

A mis tíos, César González y Blanca Pedraza:

A mis tíos, quienes generosamente abrieron las puertas de su hogar para acogerme durante el periodo de mis estudios, les dedico mi más profundo agradecimiento. Su apoyo constante, comprensión y cariño han sido el sostén fundamental que me permitió concentrarme en mis estudios y superar los desafíos. Esta tesis lleva impresa la huella de su generosidad y amor.

A mi buen amigo, Alejandro Ríos Romero:

A mi compañero de vida académica, Alejandro, le agradezco desde lo más profundo de mi corazón. Juntos compartimos risas, desafíos y triunfos a lo largo de toda la carrera. Tu amistad ha sido mi refugio en los momentos difíciles y mi cómplice en los éxitos. Esta tesis no solo es un testimonio de nuestro esfuerzo, sino también de nuestra inquebrantable amistad.

A Lucía Buenrostro:

A Lucía, quiero expresar mi agradecimiento por tu paciencia, comprensión y amor constante. Tu presencia ha sido mi refugio emocional, brindándome la serenidad necesaria para concentrarme en mis estudios. Esta tesis lleva impregnada la complicidad y el amor que compartimos, y cada logro es también tuyo.

Armando Samuel Madera Pedraza

A mis padres, Teresa Romero y Daniel Ríos:

No hay palabras suficientes para expresar mi profundo agradecimiento por su inquebrantable apoyo a lo largo de este arduo viaje académico. Su amor, aliento y sacrificios han sido la piedra angular que me ha permitido alcanzar este logro. Gracias por ser mi fuente constante de inspiración y por creer en mí cuando más lo necesitaba.

A mi preciada hermana, Daniela Ríos:

Gracias por siempre desearme de buen corazón el éxito y la prosperidad en mis proyectos y vida. Los momentos que hemos compartido desde niños me han hecho ser quien soy hoy en día; tus pasos siempre han sido mi guía.

A mi adorada sobrina, Nathaly Ríos:

Tu inocencia y alegría me recuerdan la importancia de perseverar y trabajar arduamente. Gracias por ser mi fuente constante de felicidad.

A mi compañera de vida, Carla Ponce:

Gracias por nunca dejar de creer en mí y por ser la inspiración detrás de cada paso adelante. Nuestro amor y proyectos juntos son mi motor para superar cualquier obstáculo. Conocerme cambió mi vida por completo, y durante nuestra etapa universitaria, tu cercanía me dio el calor de una familia. Gracias por ser mi fuerza y mi motivación constante.

A todos mis profesores:

Quiero expresar mi sincero agradecimiento por su guía experta y dedicación a la enseñanza. Sus conocimientos, consejos y paciencia han sido fundamentales para mi crecimiento académico y personal. Gracias por inspirarme a ser mejor cada día y por compartir su sabiduría conmigo.

Jesús Alejandro Ríos Romero

Índice

<i>Resumen</i>	1
<i>Introducción</i>	2
<i>Objetivo general</i>	7
<i>Objetivos específicos</i>	7
<i>Capítulo I. Marco teórico</i>	8
<i>1.1 Plantas medicinales en México</i>	8
<i>1.2 Bouvardia ternifolia</i>	16
<i>1.3 Usos medicinales de Bouvardia ternifolia</i>	20
<i>1.4 Molécula de bouvardina</i>	21
<i>1.5 Bouvardina contra el cáncer</i>	24
<i>1.6 Uso de hongos con propiedades medicinales</i>	26
<i>1.7 Hongos endógenos con propiedades medicinales</i>	31
<i>1.8 Herramientas analíticas en el estudio de moléculas con propiedades medicinales</i>	43
<i>1.9 Uso de la espectrometría de masas en el estudio de plantas medicinales</i>	45
<i>1.10 Producción sintética de bouvardina</i>	46
<i>1.11 Escalamiento para la producción en masa de hongos que sintetizan moléculas de importancia farmacéutica</i>	47
<i>Capítulo II. Metodología y Método</i>	51
<i>2.1 Introducción</i>	51
<i>2.2 Equipos y reactivos utilizados</i>	52
<i>2.3 Diseño de investigación de estudio experimental</i>	54
<i>2.4 Desarrollo de la metodología</i>	54
<i>a) Identificación de la molécula bouvardina en un extracto alcohólico de la planta mediante técnicas de espectroscopía de masas</i>	55
<i>b) Identificación de muestras microbiológicas con potencial para la producción de bouvardina a través de técnicas de cultivo y análisis molecular</i>	56
<i>c) Activación de hongos miceliales en un medio de cultivo sólido para la obtención de una cepa productora de bouvardina</i>	56
<i>d) Estudio de la producción de bouvardina por las cepas seleccionadas en medios líquidos con y sin aditivo de la planta medicinal Bouvardia Ternifolia</i>	59

<i>e) Primer análisis de la producción de bouvardina mediante la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS.....</i>	<i>61</i>
<i>f) Evaluación de un nuevo crecimiento del primer hongo endófito activado según su temperatura.....</i>	<i>66</i>
<i>g) Determinación de condiciones de control de pH adecuadas para maximizar la producción de bouvardina. ...</i>	<i>69</i>
<i>h) Evaluación de la producción de bouvardina en biorreactor a nivel laboratorio utilizando medio de cultivo económico.</i>	<i>71</i>
<i>i) Determinación de la constante de velocidad de producción de bouvardina</i>	<i>72</i>
<i>Capítulo III. Resultados y Discusión.....</i>	<i>74</i>
<i>Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones.....</i>	<i>102</i>
<i>Capítulo V. Referencias bibliográficas</i>	<i>105</i>
<i>ANEXO A. Firma isotópica aducto M+K bouvardina.</i>	<i>118</i>
<i>ANEXO B. Firma isotópica aducto M bouvardina.</i>	<i>119</i>
<i>ANEXO C. Firma isotópica aducto M+Na bouvardina.</i>	<i>120</i>
<i>ANEXO D. Crecimiento de intensidad de pico en determinación de condiciones de control de pH óptimo de producción.</i>	<i>121</i>

Índice de figuras

<i>Figura 1 Médico nahua recogiendo hierbas medicinales.</i>	9
<i>Figura 2 Algunas plantas medicinales en México</i>	11
<i>Figura 3 Venta de plantas medicinales en mercados.</i>	12
<i>Figura 4 Estados en la república mexicana con mayor presencia de Bouvardia ternifolia.</i>	17
<i>Figura 5 Planta Bouvardia ternifolia.</i>	19
<i>Figura 6 Estructura química de la molécula bouvardina</i>	22
<i>Figura 7 División de células cancerosas.</i>	25
<i>Figura 8 Ganoderma lucidum o Reishi</i>	27
<i>Figura 9 Lentinula edodes.</i>	28
<i>Figura 10 Grifola frondosa o Maitake</i>	28
<i>Figura 11 Cordyceps sinensis.</i>	29
<i>Figura 12 Hericium erinaceus o Melena de León</i>	29
<i>Figura 13 Clasificación de hongos endógenos.</i>	34
<i>Figura 14 El tejo y la molécula taxol</i>	35
<i>Figura 15 Pestalotiopsis.</i>	35
<i>Figura 16 Penicillium:</i>	36
<i>Figura 17 Fusarium</i>	36
<i>Figura 18 Hongos endógenos aspergillus</i>	37
<i>Figura 19 Xylaria.</i>	37
<i>Figura 20 Chaetomium.</i>	38
<i>Figura 21 Alternaria</i>	38
<i>Figura 22 Colletotrichum</i>	39
<i>Figura 23 Representación de serendipia en el descubrimiento de la penicilina.</i>	40
<i>Figura 24 Compuestos bioactivos de hongos endófitos y su potencial farmacéutico (Usman et al., 2024).</i>	48
<i>Figura 25 Diagrama de bloques del proceso de investigación experimental sobre la producción de bouvardina</i>	54
<i>Figura 26 Espectrómetro de masas BRUKER/ Solarix.</i>	56
<i>Figura 27 Diagrama de bloques del proceso general de la activación de cepas productoras de bouvardina.</i>	57

<i>Figura 28 Diagrama de bloques del proceso general de la prueba de crecimiento en medios de cultivo líquidos con y sin aditivo de planta estandarizado.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 29 Diagrama de bloques del proceso general del primer análisis de la producción de bouvardina utilizando FIA-ESI-FT-ICR-MS.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 30 Diagrama de bloques del proceso general de evaluación de un nuevo crecimiento del primer hongo endófito activado</i>	<i>67</i>
<i>Figura 31 Diagrama de bloques del proceso general de Determinación de condiciones de control de pH adecuadas para maximizar la producción de bouvardina</i>	<i>69</i>
<i>Figura 32 Diagrama de bloques del proceso general de evaluación de la producción de bouvardina en biorreactor a nivel laboratorio utilizando medio de cultivo económico.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 33 Producción de bouvardina en los 94 extractos con Malt Extract Broth</i>	<i>75</i>
<i>Figura 34 Espectro de masas del extracto alcohólico de Bouvardia ternifolia</i>	<i>78</i>
<i>Figura 35 Firma isotópica aducto M bouvardina</i>	<i>80</i>
<i>Figura 36 Gráfica comparativa de producción de bouvardina de cada muestra comparando área de pico contra el tiempo.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 37 Crecimiento de intensidad de pico cepa F1-2 en aducto M.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 38 Comparativa de crecimiento de los hongos endófitos de las distintas cepas a diferentes condiciones de temperatura.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 39 Espectros de masas comparativos de la abundancia de la molécula bouvardina con crecimiento de cepas en medios de cultivo sólido de las distintas cepas a diferentes condiciones de temperatura.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 40 Gráfica comparativa de producción de bouvardina de cada muestra comparando área de pico contra el tiempo a distintos pH.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 41 Espectro de masas en el rango de 772-775 m/z para identificación del aducto M.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 42 Espectros de masas en el rango de 795-800 m/z para identificación del aducto M+Na</i>	<i>90</i>
<i>Figura 43 Espectros de masas en el rango de 810-817 m/z para identificación del aducto M+K</i>	<i>91</i>
<i>Figura 44 Gráfica de producción de bouvardina de cada cepa ajustada.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 45 Gráfica de cinética para la cepa F1</i>	<i>97</i>
<i>Figura 46 Gráfica de cinética para la cepa F2</i>	<i>98</i>
<i>Figura 47 Gráfica de cinética para la cepa FP1.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 48 Gráfica de cinética para la cepa FP2.....</i>	<i>100</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1 Muertes por Cáncer en el año 2022 en México</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 2 Taxonomía de la planta Bouvardia ternifolia.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 3 Molécula bouvardina.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 4 Equipos utilizados en la investigación</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 5 Reactivos utilizados en la investigación</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 6 Asignación de códigos a muestras sembradas seleccionadas</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 7 Parámetros de inyección en el apartado de API Source del espectrómetro de Masas</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 8 Parámetros de inyección en el apartado de Ion Transfer del espectrómetro de Masas</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 9 Parámetros para la obtención del espectro de Masas</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 10 Muestras seleccionadas con mayor producción de bouvardina</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 11 Valores medidos de áreas de pico de cada muestra a lo largo del tiempo durante la experimentación prueba de producción de bouvardina en medios de cultivo líquidos con y sin presencia de estándar de planta ..</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 12 Valores medidos de áreas de pico de cada muestra a lo largo del tiempo durante la experimentación “Determinación de condiciones de control de pH adecuadas para maximizar la producción de bouvardina”</i>	<i>86</i>
<i>Tabla 13 Datos de biorreactor a nivel laboratorio.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 14 Resultados de concentraciones normalizadas (0-100%).....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 15 Cálculo de Kobs para cepa F1.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 16 Cálculo de Kobs para cepa F2.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 17 Cálculo de Kobs para cepa FP1</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 18 Cálculo de Kobs para cepa FP2</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 19 Resultados cinéticos comparativos de la producción de bouvardina de las cepas analizadas.</i>	<i>101</i>

Resumen

La investigación científica busca continuamente compuestos naturales con potencial terapéutico, especialmente contra el cáncer. Cinco países megadiversos (México, China, India, Colombia y Perú) albergan el 65-70% de la biodiversidad mundial, ofreciendo grandes oportunidades para descubrir nuevos fármacos. Este estudio propone un sistema intensivo para producir bouvardina, un compuesto con propiedades antitumorales, contribuyendo así al desarrollo de terapias más efectivas y sostenibles contra el cáncer.

La presente tesis muestra el estudio de la producción de la molécula bouvardina utilizando microbiota endógena de *Bouvardia ternifolia*, que es una planta medicinal mexicana que se le encuentra de manera silvestre en el Altiplano Mexicano en el bosque de encino y de pino. El estudio se basa en muestras de planta y hongo aisladas proporcionadas por el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), de las cuales se determinó mediante la siembra en el medio de cultivo Malt Extract Broth, dando como resultado la cepa F1 fuente de mayor producción de bouvardina. El trabajo se apoyó en espectrometría de masas mediante infusión directa con ionización por electrospray y resonancia del ion en el ciclotrón utilizando transformada de Fourier, (FIA-ESI-FTICR-MS).

Identificada la cepa que generó el mayor crecimiento, se sometió a pruebas para determinar el control pH óptimo de producción para la molécula bouvardina. También se asoció la temperatura adecuada para el crecimiento. Además, se realizaron las pruebas de un biorreactor a nivel laboratorio utilizando las condiciones óptimas encontradas y un sustrato económico fabricado en el laboratorio.

Se realizó el modelo cinético descriptor de la producción de la molécula bouvardina de la cepa con mejor producción. Este estudio puede ser utilizado para posteriores investigaciones que deseen continuar en la búsqueda de una alternativa de medicamentos para el tratamiento del cáncer.

Introducción

En el quehacer de la investigación científica, la búsqueda incesante de compuestos naturales con potencial terapéutico es la fuente para el desarrollo de innovadoras alternativas en el tratamiento de enfermedades, destacando las del ámbito oncológico. En el planeta Tierra, cinco países: México, China, India, Colombia y Perú, son los territorios megadiversos, ahí se encuentra alrededor del 65% al 70% de la biodiversidad, ese patrimonio es un abanico de posibilidades para identificar nuevos fármacos con el fin de abordar desafíos médicos contemporáneos, por ejemplo, la industria farmacéutica demanda alrededor de 250 kg de Taxol, el cual se obtiene de un árbol perenne (*Taxus brevifolia*) cuya extracción puede llevar a poner en riesgo la especie vegetal al aprovechar la corteza y raíces del árbol, que en la actualidad se carece de plantaciones forestales con este propósito, que equivale a producir unos tres mil árboles por año para proveer el volumen de Taxol comentado.

Cuando miramos hacia el futuro, entonces este trabajo de investigación científica demuestra que es factible diseñar un sistema de producción intensivo de la molécula de bouvardina, un compuesto que ha emergido con propiedades antitumorales prometedoras. Este trabajo contribuye al avance del conocimiento científico y a la búsqueda de terapias más efectivas y sostenibles en la lucha contra el cáncer. En este trabajo exponemos varios capítulos, en los cuales se le ofrece al lector una lectura fácil y sin contratiempos.

En el Capítulo I se aborda la fundamentación teórica y contextualización, este apartado es la lectura inicial, se entreteje un tapiz conceptual que proporciona las bases teóricas esenciales y contextualiza la relevancia de la molécula de bouvardina en el terreno de la oncología. México, con su rica historia etnobotánica, aporta un bagaje de conocimiento en la medicina tradicional para que la sociedad del conocimiento haga la exploración de compuestos bioactivos, así la planta medicinal *Bouvardia ternifolia*, como parte del patrimonio nacional, se revela como un tesoro para la salud humana. Este capítulo ofrece los elementos para la comprensión de la espectrometría de masas, destacando su papel en la identificación precisa de moléculas con actividad farmacológica. Este capítulo es un puente entre el conocimiento de los pueblos originarios de México y la sociedad del conocimiento, que con innovación puede crear valor al

conocimiento de la medicina tradicional mexicana al poner en el escenario del canon de la investigación la importancia de bouvardina.

La avanzada tecnología, los recursos humanos de las instituciones mexicanas y la creatividad de los jóvenes investigadores, puede auxiliar a la síntesis de bouvardina, que, en opinión de Zalacain et al., (1982). en la actualidad es un problema no resuelto en la química sintética debido a la estructura altamente compleja y a los desafíos asociados con la formación selectiva de un anillo de lactona macrocíclica. La complejidad estructural de bouvardina, representa un desafío para su síntesis química ya que, a pesar de los avances en la síntesis de esta molécula, la eficiencia sigue siendo un problema importante. La síntesis puede requerir procesos y técnicas avanzadas de síntesis orgánica, lo que a su vez aumenta el costo y la complejidad del proceso de producción.

La publicación del trabajo científico "The mode of action of the antitumor drug bouvardin, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells" de los autores Zalacain, M., Zaera, E., Vazquez, D., & Jiménez, A. (1982), ha valorado la molécula bouvardina por demostrar actividad citotóxica especialmente contra células tumorales. Esta publicación destaca que la bouvardina combate el cáncer principalmente a través de su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas en células tumorales, lo que afecta su capacidad de crecimiento y proliferación.

Ayuda a dimensionar estas fronteras tecnológicas la lectura del trabajo científico " Bouvardin and Deoxybouvardin, Antitumor Cyclic Hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae) " de Jolad et al., (1977), quienes señalan que la síntesis de bouvardina ha presentado dificultades debido a su estructura compleja y a la presencia de grupos funcionales específicos en su composición. Bouvardina es un hexapéptido cíclico con una estructura única que incluye un anillo de 14 miembros formado por el acoplamiento oxidativo de un oxígeno fenólico de una tirosina con un carbono orto al grupo hidroxilo fenólico de una tirosina adyacente. Esta característica inusual, junto con la presencia de enlaces peptídicos cis y la presencia de grupos hidroxilo y metoxilo en la molécula, hace que la síntesis de bouvardina sea un desafío.

Además, la presencia de impurezas y la oclusión de diferentes cantidades de solventes durante la cristalización también han dificultado la obtención de muestras puras para análisis elemental. Estas impurezas deben ser eliminadas mediante técnicas de purificación como la recristalización para obtener una muestra de bouvardina lo más pura posible. Lo anterior nos lleva a tomar consideraciones importantes en el desarrollo de métodos de producción más seguros y rentables. Eso ha motivado a incursionar en este regalo de la naturaleza, que es la planta medicinal *Bouvardia ternifolia* y su relación con fármacos, que es parte del presente trabajo.

Estos elementos soportan la hipótesis de que el microbioma endógeno de *Bouvardia ternifolia* puede ser una fuente de producción de bouvardina. La identificación de los microorganismos productores y su papel en la biosíntesis de bouvardina es esencial para desarrollar una estrategia eficaz para su producción.

En el capítulo II se aborda de manera detallada el estudio integral de la molécula de bouvardina, un compuesto con potenciales propiedades farmacológicas que ha despertado un gran interés en la comunidad científica. A lo largo de sus 23 páginas, se describen minuciosamente los métodos y procedimientos utilizados para identificar, caracterizar y estudiar la producción de bouvardina, desde la identificación de la molécula en un extracto alcohólico de la planta hasta la determinación de la cinética de producción a lo largo de un período de 22 días. Las técnicas de espectrometría de masas y cultivo microbiológico son exploradas en su totalidad, revelando la intrincada danza experimental necesaria para alcanzar los objetivos de la investigación. Este capítulo, con su extensión detallada, constituye la columna vertebral experimental de la investigación que originó esta tesis, también subraya la importancia singular de cada técnica en la obtención de resultados significativos.

A lo largo del capítulo, se muestra la espectrometría de masas de ultra alta resolución FIA-ESI-FTICR-MS (Flow Injection Analysis, Electrospray Ionization, Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance, Mass Spectroscopy) como una técnica analítica adecuada para encontrar y analizar la producción de bouvardina en las distintas experimentaciones. Además de la explicación de cómo llevar a cabo el riguroso proceso de esterilización del material de laboratorio y del medio de cultivo, utilizando una autoclave electrónica digital, garantizando la eliminación completa de microorganismos presentes, asegurando la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Por último, se ahonda en que se realizó el análisis de los datos obtenidos por medio del método integral con base a Floger (2008) para la obtención de la constante de velocidad de producción de bouvardina, siguiendo pautas establecidas en la literatura especializada.

En la tercera parte de este informe, que corresponde al Capítulo III se presentan los resultados y discusión de la investigación sobre la producción de bouvardina. Se inicia con la identificación de muestras microbiológicas capaces de producirla, donde se destaca el medio de Extracto de Malta como el más eficaz. Luego, se profundiza en la identificación de bouvardina en extractos alcohólicos mediante espectrometría de masas, respaldando hallazgos previos sobre su potencial anticancerígeno.

En este capítulo, también la producción de bouvardina por hongos endófitos de *Bouvardia ternifolia* se revela como un proceso independiente de la presencia de estándares de planta, subrayando la importancia de estos microorganismos en la síntesis de compuestos bioactivos. Además, se examina el impacto de factores ambientales como la temperatura y el control de pH que maximicen la producción de bouvardina.

Finalmente, se aborda la determinación de la constante de velocidad de producción de bouvardina, esencial para entender su cinética y optimizar procesos de producción a gran escala. Estos resultados resaltan el potencial de la bouvardina como agente antitumoral y la importancia de explorar recursos naturales como fuentes de fármacos innovadores.

Para terminar con la experimentación presentada se desarrolla el capítulo IV. Este último capítulo revela las conclusiones derivadas de la investigación, destacando los hallazgos más relevantes y su potencial impacto en el campo científico. Las recomendaciones para siguientes investigaciones se ofrecen con una mirada proyectada hacia el futuro, discutiendo aplicaciones prácticas de los resultados y reflexionando sobre el alcance y las limitaciones del estudio. Este capítulo, con su extensión, cierra la tesis con una mirada hacia adelante, subrayando la importancia de seguir explorando el potencial terapéutico de bouvardina y su contribución al desarrollo de terapias innovadoras en la lucha contra el cáncer.

En resumen, este trabajo presenta un estudio sobre la producción de bouvardina por el hongo endófito presente en la planta *Bouvardia ternifolia* por su actividad antitumoral, evalúa la producción que se genera en distintas condiciones (pH y T) y una prueba de creación de un biorreactor con un medio de cultivo económico para ofrecer accesibilidad a la población de adquirir el fármaco al que se planea llegar a un bajo costo. Asimismo, se presenta un modelado cinético para un entendimiento más cuantitativo del comportamiento de la producción de la molécula de interés. Todo lo anterior con el objetivo de apoyar a proporcionar una alternativa a la sociedad para el tratamiento del cáncer.

Los que han participado en este trabajo de investigación, esperamos que esta tesis contribuya a enriquecer nuestra percepción de las plantas medicinales, la medicina tradicional de los pueblos originarios de México y la aportación de la ciencia química del futuro en la salud humana.

Objetivo general

- Estudiar la producción de la molécula de bouvardina realizada por hongos endófitos aislados de la planta medicinal *Bouvardia ternifolia*.

Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de los hongos endófitos aislados para producir el compuesto bouvardina con y sin presencia de *Bouvardia ternifolia* que es su planta hospedera.
- Establecer una técnica de FIA-ESI-FTICR-MS para el análisis de la bouvardina.
- Identificar las condiciones (pH, T) que se adecuen más para maximizar la producción de bouvardina.
- Establecer una propuesta de uso de producción con un medio económico empleando un biorreactor con las mejores condiciones encontradas durante la experimentación.
- Determinar la constante de velocidad de producción de bouvardina de cepas que demostraron más producción.

Capítulo I. Marco teórico

1.1 Plantas medicinales en México

La medicina tradicional mexicana surgió en la época prehispánica, este conocimiento se conserva en los pueblos originarios de México. Los ticitl o tepatl era el nombre que se le daba a los médicos nahuas, médicos indígenas prehispánicos, o médicos tradicionales en las localidades rurales, que en la actualidad se conocen como curanderos, parteras, hueseros, hierberos, rezanderos, sobadores, graniceros, principalmente, desde la época prehispánica tenía nombres distintos, por ejemplo: al cirujano se le conocía como tetcqui o texoxotla ticitl; al sangrador como tezoc o teximani; al boticario como papiani o panamacani; a la comadrona como tlamatqui o temixintiani (Estrada, 2008). Dependiendo de la cultura tienen nombres, por ejemplo: los mayas los llaman h'men (mayas), los huicholes mara'akáme, en Chiapas los tzotziles y tzeltales los nombran h'ilol.

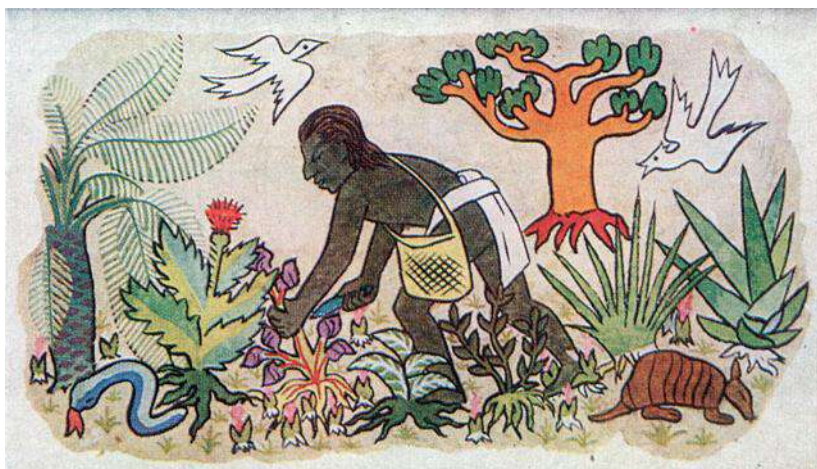
En la medicina tradicional las plantas es un recurso material, pero también se ocupan animales y minerales, hidroterapia: temazcal, baños de tina, de asiento, otros. En la herbolaria se utilizan miles de plantas vegetales: árboles, arbustos y hierbas, cuyo conocimiento se transmite de generación en generación, es parte del patrimonio cultural de los pueblos originarios. Las plantas se utilizan en diferentes tratamientos terapéuticos, esa es la oportunidad de construir opciones productivas. Este trabajo es una fusión del conocimiento de la herbolaria mexicana y el conocimiento científico, sienta las bases para un manejo sustentable donde prosperan plantas medicinales.

La herbolaria es la aplicación de la botánica a la medicina, donde se utilizan plantas medicinales que por sus propiedades mejoran la salud humana, así de una planta se extraen principios activos que son útiles para tratar enfermedades. Este estudio científico respalda el valor medicinal de la herbolaria tradicional, perfila al patrimonio cultural como elemento para el desarrollo económico de los pueblos originarios de México.

La etnobotánica sintetiza el conocimiento tradicional sobre el uso de la flora, es una disciplina que estudia la relación entre las comunidades humanas y las plantas en su entorno, incluyendo su uso para propósitos medicinales. México tiene una rica historia de uso de plantas medicinales, que se remonta a las antiguas civilizaciones que habitaron el territorio, como los mayas, aztecas y diversos grupos indígenas. Muchas de estas prácticas han perdurado hasta hoy y se integran con métodos médicos modernos, proporcionando una rica fuente de conocimientos y potenciales nuevos tratamientos médicos.

Estrada et al., (2008), señalan que Fray Bernardino de Sahagún reconocía que los médicos aztecas tenían habilidades en el reconocimiento de las hierbas o plantas medicinales, fueron los primeros médicos herbolarios, a quienes no se les reconoció la medicina indígena y fueron perseguidos como brujos. Por otra parte, los españoles mantuvieron interés en conocer la herbolaria, la medicina y la terapéutica, por ello se identifican obras como: (1) *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* del médico nahua Martín Cruz; (2) Historia general de las cosas de la Nueva España de Fray Bernardino de Sahagún; (3) Historia natural de la Nueva España de Francisco Hernández.

Figura 1 Médico nahua recogiendo hierbas medicinales.



Nota. Imagen representativa de la antigua recolección de plantas medicinales para curar distintas enfermedades. Tomado de INTERFOTO. (s.f.). <https://www.alamy.es>

El uso de plantas medicinales en México es una tradición arraigada que se extiende desde tiempos prehispánicos hasta el presente como se puede ver en la Figura 1. Esta profunda relación se manifiesta en prácticas que se han transmitido de generación en generación, y en la rica biodiversidad de plantas con propiedades curativas que se encuentran en el territorio mexicano.

La evidencia arqueológica y los manuscritos antiguos, conocido como el Códice Badiano, por la traducción al latín que realizó Juan Badiano de la obra *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* de Martín de la Cruz escrita en 1552 (Estrada et al., 2008), en sus páginas muestra las plantas medicinales dibujadas a color, revela que los aztecas tenían un conocimiento muy avanzado de la medicina herbal. Este códice, es una de las primeras obras que documenta el uso medicinal de las plantas en América del Norte y ha sido una fuente inestimable de información para etnobotánicos y antropólogos. Francisco Hernández médico de cámara de Felipe II en 1570

viajó a la Nueva España y para 1576 envió 16 volúmenes manuscritos, en su obra incluyó 3076 plantas medicinales (Estrada et al., 2008)

Durante la conquista española además de los templos se destruyeron los códices, los cuales eran contrarios a la religión católica, escaparon a esta destrucción los jardines botánicos mexicanos de Tenochtitlan, Azcapotzalco, Texcoco, Oaxtepec, entre otros. El código Badiano que fue escrito por un médico nahua es la obra más valiosa en herbolaria, si bien es cierto que no refleja toda la herbolaria y tal vez sólo refleje el conocimiento de un médico nahua, es un recetario o guía terapéutica.

Entre los mayas, el "Libro de las Hierbas Mayas" describe las propiedades de más de 700 plantas, muchas de las cuales se usan hasta hoy en día. Algunas de las plantas más destacadas incluyen la "damiana" (*Turnera diffusa*), utilizada para aumentar la libido y tratar la depresión (Roys, 1931).

El uso de la herbolaria medicinal en América Latina y el Caribe, varía significativamente según la región y la comunidad específica. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la publicación llamada "Traditional Health Systems in Latin America and the Caribbean: Base Information" en 1999, se estima que alrededor del 40% de la población en América Latina y el Caribe utiliza la medicina tradicional como parte de su atención médica primaria. Diversos grupos indígenas, como los Nahuas, Mixtecos, y Otomíes, son ejemplo del empleo actual de plantas medicinales en su vida cotidiana. Estas prácticas incluyen el uso de plantas, rituales, y oraciones que son fundamentales para la eficacia del tratamiento (Heinrich et al., 1998). Este comportamiento no solo es el resultado de limitaciones socioeconómicas, sino también de una confianza profundamente arraigada en la eficacia de estas prácticas tradicionales. Además, es notable cómo muchas comunidades indígenas han mantenido y adaptado sus prácticas herbales a lo largo de los siglos, convirtiéndolas en una parte esencial de la medicina popular en América Latina y el Caribe.

Ejemplo de ello es el uso de las siguientes plantas en la actualidad; la "*Salvia divinorum*," una planta empleada por los Mazatecos en rituales espirituales y para tratar enfermedades como la diarrea y el dolor de cabeza. Aunque todavía está en investigación, algunos estudios sugieren que podría tener propiedades antidepresivas (Siebert, 1994), la manzanilla (*Matricaria recutita*), el té

Figura 2 Algunas plantas medicinales en México.



Nota. En México han estado presentes las plantas medicinales desde la época prehispánica. Tomado de Debate Digital. (24 de 04 de 2017). Debate. Obtenido de <https://www.debate.com.mx>

de limón (*Melissa officinalis*), la ruda (*Ruta chalepensis*) y la hierbabuena (*Mentha piperita*) se pueden visualizar esta y otras plantas en la Figura 2. Estas plantas son utilizadas para tratar una amplia variedad de dolencias, desde problemas digestivos hasta dolores de cabeza y problemas respiratorios (Waksman Minsky, N. H, 2022). Destacan la ruda (*Ruta graveolens*), utilizada para tratar problemas gastrointestinales, dolor de cabeza y cólicos menstruales; la menta (*Mentha piperita*) aliviar problemas digestivos como la indigestión y los cólicos, así como dolores de cabeza; y la hierbabuena (*Mentha spicata*), utilizada para tratar dolores de cabeza, náuseas y problemas digestivos (Yadav, G., & Meena, M. 2021).

En el panorama internacional, muchos países con historias milenarias, como China e India, han integrado de manera similar las hierbas medicinales en sus sistemas de salud. La medicina tradicional china, por ejemplo, representa un tesoro de conocimiento ancestral y una fuente inagotable de beneficios terapéuticos, respaldados por una rica tradición clínica y una sólida base científica. Su integración en la medicina moderna y su reconocimiento a nivel internacional destacan su importancia en el cuidado de la salud y su potencial para seguir contribuyendo al bienestar de las personas en todo el mundo por ejemplo, el uso de plantas como *Ligusticum chuanxiong* para la angina de pecho, *Crataegus oxyacantha* para accidentes cerebrovasculares,

Angelica sinensis para hepatitis, y *Rhizoma cynanchi stauntonii* para bronquitis crónicas (López Luengo, M. T. (2003), mientras que el sistema Ayurveda de la India considera las plantas esenciales para mantener el equilibrio de los tres doshas, o energías vitales (Vikram, 2010). Aunque Europa ha adoptado un enfoque más moderno hacia la medicina, hay un interés renovado en la herbolaria, particularmente en el ámbito de la medicina complementaria, una tendencia respaldada por los hallazgos de Ekor (2014).

Carrera et al., (2023) indican que México se encuentra en el cuarto lugar mundial y el tercero en el continente americano en diversidad vegetal con 22,969 especies de plantas vasculares, las cuales 12,069 son endémicas. De esta biodiversidad se aprovechan unas 4500 especies con fines medicinales, sólo 3000 especies están registradas en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Sin embargo, solo el 5% cuenta con análisis farmacológico, la tarea es enorme.

Actualmente, diversos investigadores están explorando las propiedades medicinales de las plantas usadas en México con el fin de integrar estos conocimientos en la medicina moderna. Algunos estudios han identificado compuestos en plantas como la "árnica" (*Heterotheca inuloides*) y el "epazote" (*Dysphania ambrosioides*) con aplicaciones potenciales en la lucha contra enfermedades como el cáncer (Molina-Salinas et al., 2007).

Figura 3 Venta de plantas medicinales en mercados.



Nota. Los mercados carecen de prácticas de calidad para la venta de plantas medicinales. Tomado de Urpeque, H. (16 de noviembre de 2018). RPP Noticias. <https://rpp.pe>

A pesar de esta profunda tradición, el mercado de plantas medicinales enfrenta retos significativos. Bye y Linares (1983) discuten la importancia de las plantas en los mercados mexicanos y cómo su relevancia puede influir en estudios etnobotánicos. Mendoza-Castelán y Lugo-Pérez (2011) recalcan la diversidad de plantas medicinales presentes en los mercados

mexicanos, lo que también subraya el desafío de mantener estándares y control sobre ellas. La necesidad de una regulación más estricta de estos productos es abordada por Morales García, G (2022), quienes señalan los riesgos para la salud pública debido a la variabilidad en la calidad y autenticidad de los productos disponibles. Se puede observar en la Figura 3 un ejemplo de venta de plantas medicinales en un mercado promedio ubicado en Latinoamérica.

UNAM (2016) en su página sobre la medicina tradicional en México, enfatizan la necesidad de un enfoque que combine el conocimiento tradicional con prácticas y estándares modernos de seguridad y eficacia. Esta combinación no solo protege la salud humana, sino que también garantiza la preservación de la biodiversidad y respeta la cultura y sabiduría ancestral.

En la época contemporánea de las plantas medicinales se han obtenido compuestos bioactivos útiles para la salud humana, lo que revela la importancia de los microorganismos endófitos, destacan de estos compuestos el Taxol, ampicilina, ácido gálico, entre otros, que se utilizan en la industria farmacéutica.

En el tema de salud, el cáncer es la tercera causa de muerte en México, se encuentra por debajo de las enfermedades del corazón y la diabetes. Las estadísticas indican que en el año 2022 en México 89,303 personas fallecieron por cáncer, como se reporta en la Tabla 1.

Es frecuente en mujeres cáncer de mama, pulmón, y colorrectal; mientras que en hombres es frecuente el cáncer de próstata, pulmón, y colorrectal. La medicina moderna ofrece tratamientos mediante cirugía, radiación, quimioterapia y otros.

Tabla 1 Muertes por Cáncer en el año 2022 en México.

No.	Entidad	Muertes	Muertes por Cáncer	Porcentaje de muertes por cáncer
1	Aguascalientes	8,081	889	1.00
2	Baja California	24,693	2,647	2.96
3	Baja California Sur	4,302	575	0.64
4	Campeche	5,687	673	0.75
5	Chiapas	31,706	3,358	3.76
6	Chihuahua	28,824	2,978	3.33
7	Ciudad de México	69,455	8,864	9.93
8	Coahuila	21,209	2,269	2.54
9	Colima	5,683	580	0.65
10	Durango	11,710	1,243	1.39
11	Guanajuato	42,867	3,842	4.30
12	Guerrero	20,619	1,982	2.22
13	Hidalgo	18,575	2,124	2.38
14	Jalisco	56,388	6,178	6.92
15	México	100,734	10,709	11.99
16	Michoacán	32,822	3,385	3.79
17	Morelos	15,897	1,550	1.74
18	Nayarit	7,740	894	1.00
19	Nuevo León	38,134	4,554	5.10
20	Oaxaca	30,078	2,853	3.19
21	Puebla	44,050	3,978	4.45
22	Querétaro	13,551	1,504	1.68
23	Quintana Roo	8,691	937	1.05
24	San Luis Potosí	20,328	2,025	2.27
25	Sinaloa	17,468	2,268	2.54
26	Sonora	21,721	2,482	2.78
27	Tabasco	14,988	1,472	1.65
28	Tamaulipas	22,259	2,575	2.88
29	Tlaxcala	8,035	804	0.90
30	Veracruz	61,555	6,414	7.18
31	Yucatán	15,207	1,568	1.76
32	Zacatecas	12,376	1,129	1.26
Total		835,433	89,303	

Nota. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), Muertes de 2022.
Obtenido de (<http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/>)

El potencial de las plantas medicinales para curar la enfermedad del cáncer es conocido, así en el mercado de Sonora en la Ciudad de México, donde en una sección se identifica la comercialización de plantas propias de la medicina tradicional, como: (a) *Hyptis verticillata*, con diversos nombres comunes, por ejemplo hierba del negro, epazotillo, escoba del negro, que en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca se conoce como hierba martina, mientras que en la zona de Papantla, en el El Tajín, Veracruz como hierba negra; (b) *Calophyllum* sp, árbol con nombres comunes como: leche maría en Chiapas, Oaxaca y Nayarit; (c) *Physalis philadelphica*, es una planta herbácea, pertenece a la familia de Solanaceae, se le encuentra en la milpa, se le conoce como tomate verde, miltomate, tomate de cáscara.

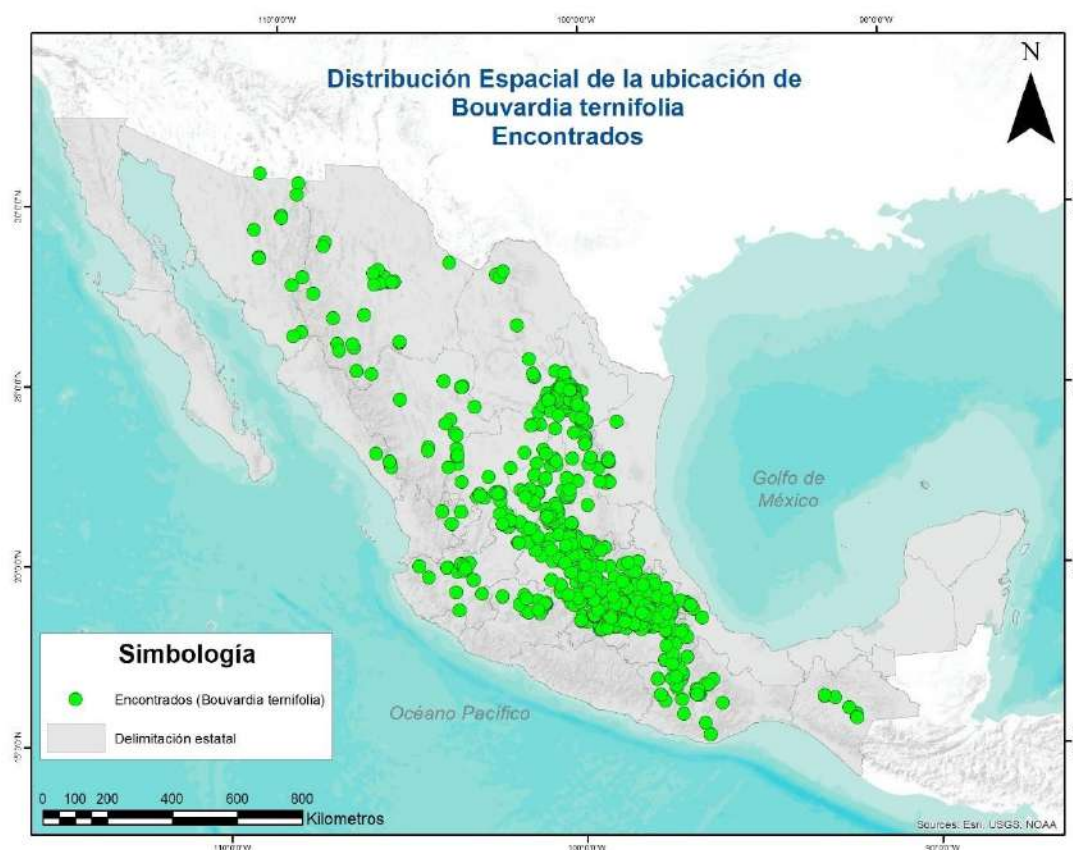
Aprovechando la riqueza de la biodiversidad mexicana, este trabajo sienta las bases de una idea: desarrollar un programa de investigación que explore el potencial farmacológico de nuestra flora y contribuir a reforzar los estudios sobre esta línea.

1.2 *Bouvardia ternifolia*

La familia botánica de la Rubiaceae, generalmente son plantas herbáceas en nuestras latitudes, aunque esta familia se caracteriza por la existencia de arbustos y árboles. De esta familia botánica destacan plantas como el cafeto (*Coffea arábica*) de cuyo grano se obtiene el aromático conocido como café; de las plantas ornamentales son muy conocidas las gardenias (*Gardenia* sp.). La familia Rubiaceae tiene alrededor de 111 géneros, 17 de ellos son endémicos de México con unas 711 especies nativas, de ellas 363 son endémicas y 13 exóticas. Los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz son los territorios donde existe el mayor endemismo de esta familia.

La *Bouvardia ternifolia* es una hierba perenne endémica de México, pertenece a la familia Rubiaceae, cuya taxonomía se detalla en la Tabla 2 (CANABIO 2006). La planta es conocida en el Altiplano Mexicano con el nombre común de trompetilla, se le conoce con nombres comunes, como: contrahierba, contrahierba colorada, hierba del indio, hierba del pasmo o mirto. La planta *Bouvardia ternifolia* se distribuye principalmente en zonas templadas y semiáridas de México como se observa en la Figura 4. La distribución de esta especie es en climas templados, en altitudes próximas a los 2000 msnm, en bosques de encinos y pino; incluye los estados de Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Morelos, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Ciudad de México, Chiapas, así como en algunas zonas de los Estados Unidos como Arizona, Nuevo México y Texas.

Figura 4 Estados en la república mexicana con mayor presencia de *Bouvardia ternifolia*.



Nota. *Bouvardia ternifolia* se distribuye principalmente en zonas templadas y semiáridas de México. Obtenido de CONABIO (<https://enciclovida.mx/especies/166971-bouvardia-ternifolia>)

Las plantas de *B. ternifolia* pueden alcanzar una altura máxima de 1 a 2 metros y tienen hojas verticiladas de 3 a 4 en cada nudo. La característica más destacable de esta planta son sus flores, las cuales tienen pedicelos de entre 2 y 14 mm de largo y una corola en forma de tubo de 5 hasta 30 mm de largo, que puede ser de color rojo, anaranjado o salmón, y cuentan con tricomas papilosos en el exterior de la flor como se puede ver en la Figura 5 (Yang L et al., 2021).

Tabla 2 Taxonomía de la planta *Bouvardia ternifolia*.

Taxonomía	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Rubiales
Familia:	Rubiaceae
Subfamilia:	Rubioideae
Tribu:	Spermacoceae
Género:	<i>Bouvardia</i>
Especie:	<i>B. ternifolia</i>

Nota. Los datos de la tabla se obtuvieron de Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2006). *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl. Ficha informativa. Malezas de México. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/bouvardiaternifolia/fichas/ficha.htm>

Figura 5 Planta *Bouvardia ternifolia*.



Nota. Saliendo hacia el norte del pueblo, como unos 5 minutos de camino., 1107 m, Huitzilan de Serdán, Puebla, México. Tomado de Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. (julio de 2017). *Bouvardia ternifolia*. Obtenido de <https://powo.science.kew.org>

1.3 Usos medicinales de *Bouvardia ternifolia*

En México desde la época prehispánica las plantas medicinales se han venido utilizando para tratar dolencias y enfermedades infecciosas; en los últimos años en la medicina alternativa se comercializan tratamientos y plantas aromáticas y herbáceas, de ahí la importancia del presente trabajo, cuyo propósito es conocer los compuestos o fármacos que contiene.

La *B. ternifolia* es una planta medicinal utilizada en México para tratar diversas dolencias. La flor de esta especie se ha empleado en la medicina tradicional para aliviar dolores y como remedio en casos de mordeduras y picaduras de diversos animales venenosos (López-Ávila et al., 2020).

Carrera et al., (2023) señalan que en México es el país más diverso de alacranes, se encuentran 294 especies de alacranes o escorpiones distribuidas en ocho familias, de ellas 21 especies son peligrosas para los humanos, pertenecen al género *Centruroides*, destaca *Centruroides noxius* por contener el veneno más letal contra los humanos. En la medicina tradicional mexicana por sus propiedades anti-veneno se utiliza *Bouvardia ternifolia*.

El proceso de elaboración del remedio consiste en la maceración de la planta entera (hojas, tallo y flores) y posteriormente hervirla en agua para obtener una infusión que se guarda en alcohol para su posterior uso en frotaciones. De las ramas de la trompetilla se han aislado compuestos peptídicos: bouvardina y los derivados deoxi y metilados; en la medicina tradicional se tiene evidencias de su actividad antitumoral.

Además de sus propiedades analgésicas, se ha reportado que la *B. ternifolia* se utiliza para tratar la disentería, dolor de estómago, tosferina y se le atribuyen propiedades sedantes (Waksman Minsky, N. H., 2022). En el siglo XVI, Bernardino de Sahagún mencionó su uso como antipirético, mientras que Francisco Hernández comentó su efectividad en el tratamiento del cansancio y en la curación de llagas antiguas debido a las propiedades astringentes de la planta (Reyes-Chilpa et al., 2017). En el siglo XX, Maximino Martínez reportó que la *B. ternifolia* es anti-disentérico, antiespasmódico, antirrábico, antitusígeno, útil en casos de calor de corazón, estimulante y en hematemesis (Martínez, 1979).

En un estudio publicado por Villalobos-Flores et al., (2020) titulado “Characterization of the Plant-Associated Bacterial Microbiota of the Mexican Medicinal Species” se encontró una gran diversidad bacteriana en las muestras de raíces y suelo, aunque también con menor cantidad se encontró en muestras de flores, hojas y tallos de la planta *Bouvardia ternifolia*. Se destaca que *Bouvardia ternifolia* es una planta medicinal que puede considerarse como una fuente potencial de compuestos terapéuticos, como la molécula antitumoral bouvardina, la cual se ha reportado que está presente en esta especie. La existencia de esta molécula sugiere el potencial de la *B. ternifolia* en la producción de compuestos con propiedades medicinales significativas, lo cual podría tener un profundo impacto en la medicina tradicional y moderna.

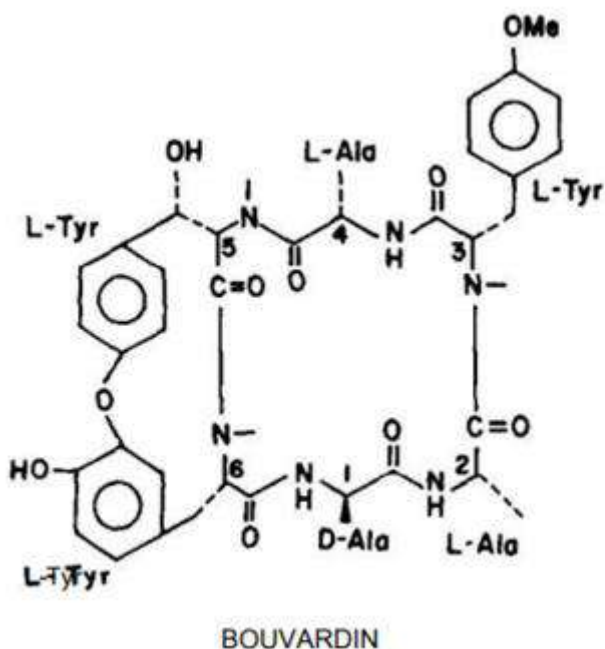
1.4 Molécula de bouvardina

Los péptidos son moléculas que se forman por la unión de diferentes aminoácidos, los cuales se unen por los enlaces peptídicos, que de acuerdo con el número de aminoácidos que integran el péptido se les llama: oligopéptido, polipéptido, hexapéptido, tripéptido. La molécula bouvardina pertenece a esta familia de dichos compuestos.

Zalacain et al., (1982) reportan que Bouvardin es un hexapéptido cíclico que ha sido aislado de la planta mexicana *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae), planta que ha sido utilizada desde la época prehispánica en la medicina tradicional, de uso frecuente en las localidades rurales para atender la disentería y otras enfermedades. En los últimos años se ha reportado que, en la trompetilla, hierba perenne que abunda en México al contener la molécula bouvardina, es capaz de ralentizar y detener el crecimiento de células cancerígenas, esta planta es prometedora para la salud.

La bouvardina es un hexapéptido bicíclico con masa molecular igual a 772.8 g/mol producido por la planta *B. ternifolia* (Ver Figura 6). Su estructura química se compone de la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Tyr-Ala-Tyr-Tyr, y ha demostrado tener efectos antitumorales al inhibir la síntesis de proteínas a través de la unión irreversible al complejo ribosomal 60S (Valadez-Vega C et al., 2023). La bouvardina ha sido objeto de numerosos estudios debido a su potencial uso como agente quimioterapéutico.

Figura 6 Estructura química de la molécula bouvardina.



Nota. Bouvardina es un hexapéptido cíclico complejo. Obtenido de Zalacain et al., 1982

Se ha demostrado que ciclos péptidos cíclicos de Rubia (RAs), como la bouvardina y sus análogos, tienen efectos antitumorales significativos. Estos compuestos han mostrado actividad antitumoral tanto in vitro como in vivo. Además, el derivado sintético SVC112, un derivado de la bouvardina es capaz de regular las células cancerosas y de inhibir su crecimiento (Chandra, H. et al., 2024) Ahí está la explicación de que en la medicina tradicional mexicana se utilice la trompetilla (*Bouvardia ternifolia*) para curar síntomas de inflamación, es una invitación para comenzar a estudiar los metabolitos presentes en las plantas medicinales.

En el marco de los avances científicos sobre agentes citotóxicos, hubo una investigación particularmente reveladora fue llevada a cabo por la Universidad de Arizona en 1977. Este estudio se centró en analizar la bouvardina, la deoxibouvardina y su composición en estado natural. Al someter estas sustancias a pruebas en cultivos celulares, se observó que todas ellas exhibían una citotoxicidad significativa. Lo que hace que estos resultados sean aún más notables es que estas sustancias son los primeros hexapéptidos cíclicos que han mostrado tener una actividad antitumoral. (Jolad et al., 1977).

La naturaleza y estructura de estos hexapéptidos cíclicos suscita una comparación intrigante con ciertos antibióticos, específicamente la linomicina. Esta última es conocida por su habilidad para transportar iones a través de membranas celulares, lo cual podría ofrecer una pista sobre el mecanismo de acción de la bouvardina y sus variantes. Dadas las potencialidades terapéuticas que estas sustancias pueden ofrecer, y con el objetivo de profundizar en su entendimiento y aplicación, se han desplegado esfuerzos investigativos centrados en descifrar las vías de síntesis y aprovechar sus propiedades en el ámbito médico. Los datos técnicos de la molécula se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3 Molécula bouvardina

Datos de la molécula	
Nombre IUPAC:	(1 S ,4 R ,7 S ,10 S ,13 S ,16 S ,17 S)-17,24-Dihidroxi-10-(4-metoxibencil)-4,7,9,13,15,29-hexametilo -22-oxa-3,6,9,12,15,29-hexaazatetraciclo [14.12.2.218,21.123,27]tritriaconta-18,20,23(31),24,26,32-hexaeno-2,5, 8,11,14,30-hexona
Número CAS:	64755-14-2
Fórmula química:	C ₄₀ H ₄₈ N ₆ O ₁₀
Masa molar:	772.8

Nota. Tomado de Bouvardina. (2023, 15 de diciembre). PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bouvardin>

1.5 Bouvardina contra el cáncer

Jia et al., (2024) señalan que el cáncer es una enfermedad que provoca la segunda causa de muerte a nivel mundial, representa un riesgo para la salud humana. Estos autores indican que para 2020 existían alrededor de 19,29 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, proyectando que para el año 2040, la sociedad tendrá pacientes con cáncer en unos 28.4 millones de habitantes. El cáncer es una de las principales causas de mortalidad humana

El cáncer es una enfermedad crónica que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales. Estas células se pueden multiplicar rápidamente y formar tumores, que pueden invadir los tejidos y órganos sanos. El cáncer puede afectar a cualquier parte del cuerpo, y puede ser mortal si no se trata. El cáncer es una enfermedad compleja que se produce por una serie de factores, entre los que se incluyen:

Factores genéticos: Algunas personas tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer debido a factores genéticos hereditarios. Estos factores pueden incluir mutaciones genéticas que se transmiten de padres a hijos, o mutaciones que se producen espontáneamente en las células.

Factores ambientales: La exposición a ciertos factores ambientales, como la radiación, las toxinas y los virus, también puede aumentar el riesgo de cáncer. La radiación puede dañar el ADN de las células, lo que puede provocar mutaciones que conducen al cáncer. Las toxinas, como el humo del tabaco, pueden dañar el ADN de las células de forma similar. Los virus pueden infectar las células y causar mutaciones que conducen al cáncer.

Factores de estilo de vida: Algunos factores de estilo de vida, como el tabaquismo, el consumo de alcohol y la obesidad, también pueden aumentar el riesgo de cáncer. El tabaquismo es la principal causa de cáncer evitable en el mundo. El consumo de alcohol puede aumentar el riesgo de cáncer de boca, garganta, esófago, hígado, colon y recto. La obesidad puede aumentar el riesgo de cáncer de mama, útero, colon y recto.

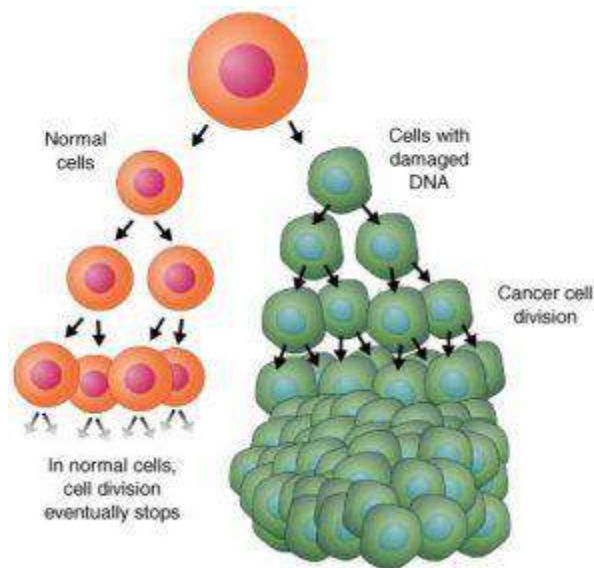
¿Cómo se produce el cáncer?

El cáncer se produce por una serie de cambios en el ADN de las células. El ADN es el material genético que contiene las instrucciones para el funcionamiento de las células. Los cambios en el ADN pueden provocar que las células se dividan y proliferen sin control.

Los cambios en el ADN pueden producirse de forma espontánea, o pueden ser causados por factores genéticos, ambientales o de estilo de vida. Cuando se producen cambios en el ADN, las células pueden perder la capacidad de controlar su crecimiento y división. Estas células pueden comenzar a multiplicarse rápidamente y formar tumores como se muestra en la Figura 7.

Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos no son cancerosos y no se propagan a otras partes del cuerpo. Los tumores malignos son cancerosos y pueden invadir los tejidos y órganos sanos.

Figura 7 División de células cancerosas



Nota. Una célula tiene un ADN defectuoso o dañado. Esto hace que se divida más rápidamente que las células sanas, dando lugar a un gran número de células cancerosas que forman un tumor. Tomado de Rise at Duke. (s.f.). Science Education Enhances Knowledge (SEEK). Obtenido de Tobacco Products in Today's Market: <https://sites.duke.edu/seektobacco/3tobacco-products-in-todays-market/>

Los mecanismos de acción de la bouvardina

La bouvardina es un alcaloide natural que se encuentra en las hojas de la planta *B. ternifolia*. Actúa inhibiendo la proliferación de las células cancerosas, puede bloquear la división celular al inhibir la actividad de las proteínas que regulan el ciclo celular.

También induce la apoptosis, o muerte celular programada, de las células cancerosas. La apoptosis es un proceso natural por el cual las células se autodestruyen, es decir, puede inducir la apoptosis de las células cancerosas al activar las proteínas que desencadenan este proceso.

Además, la bouvardina puede ayudar a reducir la inflamación y el estrés oxidativo, que son factores que contribuyen al desarrollo del cáncer. La inflamación puede dañar el ADN de las células y promover el crecimiento de las células cancerosas. El estrés oxidativo puede causar daño celular y promover la aparición de mutaciones genéticas.

1.6 Uso de hongos con propiedades medicinales

Los hongos son un grupo que incluye especies macroscópicas y microscópicas. En los hongos macroscópicos, por sus usos antropogénicos se clasifican en: (1) hongos comestibles; (2) hongos psicotrópicos, destaca la experiencia de María Sabina en Oaxaca quien los utilizó con fines recreativos y espirituales; (3) hongos tóxicos; (4) hongos medicinales, los cuales se han utilizado en la medicina tradicional y en la medicina académica para elaborar medicamentos de nueva generación, como los antibióticos. En México con su alta biodiversidad los hongos son fuente de alimento y de medicina tradicional, además así ocurre en culturas como la China, Indú, entre otras.

Del México prehispánico destaca el Huitlacoche cuyo nombre científico es *Ustilago maydis*, especie de hongo que se desarrolla en los elotes o frutos tiernos del maíz, que además de alimento, su consumo en fresco en la medicina tradicional es para aliviar cólicos, diarrea, indigestión, resaca, inflamación, dolor estomacal, entre otros.

Esta riqueza del reino fúngico ha sido una fuente constante de misterio y asombro en muchas culturas a lo largo de la historia. Los hongos han sido objeto de supersticiones y tradiciones populares y de potencial terapéutico. Hamza et al., (2024) reportan algunos hongos con propiedades medicinales, los cuales cuentan con un respaldo científico, y son de uso frecuente en la medicina tradicional mexicana, indú, china, otras, se utilizan hongos comestibles por sus propiedades antitumorales.

Hamza et al., (2024) reportan que los hongos producen metabolitos primarios y secundarios que ofrecen beneficios para la salud, destacan los polisacáridos, que tienen usos medicinales por sus propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas de los β -glucanos. Estos autores indican que los metabolitos secundarios de los hongos comprenden: ácidos fenólicos, terpenoides, polifenoles, alcaloides, lactonas, esteroides, agentes quelantes de metales, análogos de nucleótidos, vitaminas, glicoproteínas, polisacáridos y β -glucanos, los cuales auxilian a la salud humana por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y anticancerígenas, entre otras.

Estos autores comentan que los beneficios para la salud humana que se obtienen de los hongos es una práctica médica que data de la antigüedad, estimándose que los hongos y setas medicinales aportan alrededor de 130 propiedades medicinales, reseñan que en Asia entre los hongos que se utilizan para tratar el cáncer, se encuentran: *Ganoderma lucidum* (reishi), *Trametes versicolor* o *Coriolus versicolor* (cola de pavo), *Lentinus edodes* (shiitake), *Grifola frondosa* (maitake), otras especies.

Ganoderma lucidum o Reishi, conocido como "el hongo de la inmortalidad" en culturas asiáticas, ha sido reverenciado por sus propiedades que se cree contribuyen al bienestar general y la longevidad. Recientemente, estudios como los de Zhou et al. (2007) han arrojado luz sobre la base científica de tales afirmaciones. Los hallazgos sugieren que las proteínas presentes en el Reishi tienen un efecto directo sobre la inmunomodulación, ayudando a equilibrar las respuestas inmunitarias del cuerpo y posiblemente desempeñando un papel preventivo contra ciertos tipos de cáncer. El hongo se puede visualizar en la Figura 8.

Figura 8 *Ganoderma lucidum* o Reishi



Nota. Tomado de Hifas da Terra. (2023, 14 de diciembre). Reishi (*Ganoderma lucidum*). Hifas da Terra. [https://hifasdaterra.com/hongos medicinales/reishi-ganoderma-lucidum/](https://hifasdaterra.com/hongos-medicinales/reishi-ganoderma-lucidum/)

Figura 9 *Lentinula edodes*



Por otro lado, *Lentinula edodes*, es una seta comestible de color marrón y aroma intenso comúnmente conocido como Shiitake (véase Figura 9), ha sido tanto un alimento como un medicamento en Asia. Aparte de su riqueza en sabor, se ha descubierto que tiene compuestos que benefician al sistema inmunológico. En investigaciones como la de Dai et al. (2009), se determinó que los polisacáridos del Shiitake pueden potenciar la respuesta inmune, lo que podría ser

Nota. Tomado de Wikipedia. (2023, 14 de diciembre). Shiitake. Wikipedia, la enciclopedia libre.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Shiitake>

crucial para fortalecer la resistencia del cuerpo contra enfermedades.

El hongo *Grifola frondosa* o Maitake es otro hongo que ha despertado interés, particularmente en el campo de las enfermedades metabólicas. Investigaciones pioneras de Kubo & Nanba (1994) resaltaron la actividad anti-diabética del Maitake, sugiriendo una prometedora vía terapéutica en la lucha contra la diabetes, una enfermedad que afecta a millones globalmente. Es un hongo que se encuentra en todo el mundo, consta de múltiples sombrerillos de color marrón grisáceo que a menudo están enroscados o en forma de cuchara, con márgenes ondulados como se puede ver en la Figura 10.

Figura 10 *Grifola frondosa* o Maitake.



Nota. Tomado de Casapia. (2023, 8 de diciembre). Hongo maitake: propiedades y aplicaciones. Recuperado de <https://www.casapia.com/blog/plantas-medicinales/hongo-maitake-propiedades-aplicaciones.html>

Figura 11 *Cordyceps sinensis*



Nota. Conocido en la medicina tradicional tibetana y china por sus cualidades adaptogénicas. Tomado de Castejón, N. (2023). Webconsultas. Revista de Salud y Bienestar. Cordyceps, el hongo parásito: 10 beneficios para la salud: <https://www.webconsultas.com/curiosidades/cordyceps-el-hongo-parasito-10-beneficios-para-la-salud>

Cordyceps sinensis, a menudo llamado "el hongo de la oruga", es conocido en la medicina tradicional tibetana y china por sus cualidades adaptogénicas. Las investigaciones de Li et al. (2001) han indicado que este hongo particular puede ayudar al

cuerpo a adaptarse y resistir diversas formas de estrés, tanto físico como mental. Además, su potencial antioxidante lo coloca en una posición destacada en la lucha contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (véase Figura 11).

Finalmente, *Hericium erinaceus* o Melena de León, con su aspecto distintivo y casi místico, es más que solo un hongo visualmente atractivo como se ve en la Figura 12. Li IC et al. (2018) destacaron sus propiedades neuroprotectoras, abriendo puertas a investigaciones en enfermedades neurodegenerativas y cerebrovasculares.

Figura 12 *Hericium erinaceus* o Melena de León.



Nota. Se caracteriza por su particular forma de globo, cubierta por espinas largas y peludas. Tomado de Castro, D. E. (2023). Mejor con Salud. Hongos melena de león: beneficios y efectos secundarios: <https://mejorconsalud.as.com/hongos-melena-leon-beneficios-efectos-secundarios/>

La medicina tradicional ha encontrado en el reino fúngico una vasta gama de compuestos bioactivos que han beneficiado la salud humana durante siglos. Recientemente, la investigación científica ha empezado a validar y comprender el verdadero potencial de estos organismos, revelando una asombrosa diversidad de propiedades medicinales.

Los hongos medicinales representan una fuente inexplorada y prometedora de soluciones terapéuticas. Su integración en la medicina contemporánea podría revolucionar el tratamiento de diversas enfermedades, proporcionando enfoques innovadores y naturales. Sin embargo, es esencial que se realice más investigación para establecer con certeza la eficacia y seguridad de estos compuestos.

1.7 Hongos endógenos con propiedades medicinales

En el universo de las plantas se hospedan diversas comunidades microbianas: (1) en la rizosfera, que es la zona que rodea a la raíz (Madigan et al., 2009); (2) en la filosfera, que es la superficie de la hoja, que en la regiones húmedas la microbiología de la hoja es abundante (Madigan et al., 2009); y (3) la endosfera, que corresponde a la región interna de la planta aérea y subterránea, donde el tejido vegetal es el espacio para algunos microorganismos. Ahí se desarrollan asintóticamente, estableciendo relaciones beneficiosas con su planta huésped como microorganismos endófitos, la colonización que llega a ocurrir en el tejido de una o varias partes de la planta huésped, puede ser en tallos, hojas, sistemas reproductivos, frutos y raíces, esta colonización de endófitos en las plantas es una vía para que se produzcan metabolitos secundarios y fitohormonas, es una estrategia de las plantas para desarrollar tolerancia al estrés.

Los hongos endógenos, también conocidos como endofíticos, son microorganismos que viven en el interior de las plantas sin causarles daño; endófito, etimológicamente significa “dentro de la planta”. Estos hongos establecen relaciones simbióticas con sus hospedadores y pueden conferirles beneficios, como la promoción del crecimiento, la resistencia a enfermedades y la tolerancia al estrés abiótico. Los hongos endófitos toman nutrientes de la planta hospedera, son microorganismos que crecen al interior de los tejidos vegetales, producen metabolitos secundarios. Además, los hongos endógenos pueden producir diversos compuestos bioactivos con potencial aplicación en medicina, agricultura y otras áreas (Rodríguez et al., 2009). Entonces estos microorganismos endófitos forman microbiomas que colonizan sanos de la planta: raíz, tallo, flor, hojas, frutos, semillas, viven en los espacios intercelulares donde desarrollan con la planta interacciones biológicas, originando la producción de compuestos.

Existen varios grupos de hongos endógenos, como los ascomicetos, basidiomicetos y mitosporicos. Estos hongos se encuentran en una amplia variedad de plantas, desde helechos y musgos hasta plantas con flores. Algunos estudios han sugerido que prácticamente todas las plantas pueden albergar hongos endofíticos (Arnold & Lutzoni, 2007). Los microorganismos endófitos, que son los que ocupan espacios al interior de las plantas su dinámica es compleja, puede ser comensalista (neutral), mutualista (beneficiosa) e incluso parasitaria (perjudicial). En el caso de las plantas medicinales, puede decirse que se establece una relación entre el hongo y

la planta hospedadora, en este caso *Bouvardia ternifolia*, donde el produce metabolitos bioactivos, y es de suponer que le confiere a la planta algún mecanismo de defensa, toda vez que esta planta medicinal en su estado silvestre no presenta plagas y se desarrolla en condiciones de suelos pobres en fertilidad y condiciones climáticas extremas como altas temperaturas, sequía, entre otros.

Los hongos endógenos desempeñan roles ecológicos y evolutivos importantes en las interacciones planta-hongo. Por ejemplo, pueden proteger a las plantas de herbívoros mediante la producción de compuestos químicos tóxicos, lo que podría tener implicaciones en la evolución de las defensas químicas de las plantas (Faeth & Fagan, 2002).

La importancia de los hongos endófitos es la generación de metabolitos secundarios, así en los vegetales existen sustancias que producen los hongos endófitos, las cuales son las que producen el beneficio de la planta medicinal, por ejemplo tenemos el caso de la conífera *Taxomyces andreanae*, que se desarrolla en la costa del Pacífico, ahí se encuentra el hongo endófito *Taxus brevifolia*, microorganismo que produce el metabolito taxol, el cual es útil en el tratamiento de cáncer de ovario y mama.

El crecimiento de los hongos está influenciado por una serie de factores ambientales, entre los que se encuentran la temperatura, la humedad, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de inhibidores.

Uno de los factores ambientales más importantes es la temperatura que afectan al crecimiento de los hongos. La mayoría de los hongos crecen mejor en temperaturas cálidas, entre los 20 y los 30 °C.

Las temperaturas bajas pueden inhibir el crecimiento de los hongos. La mayoría de las especies de hongos dejan de crecer a temperaturas inferiores a 10 °C. Por ejemplo, un estudio realizado por Pasanen et al. (2000) encontró que el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, un hongo que causa la marchitez del *Fusarium* en el tomate se inhibía a temperaturas inferiores a 10 °C.

Las temperaturas altas también pueden inhibir el crecimiento de los hongos. La mayoría de las especies de hongos dejan de crecer a temperaturas superiores a 35 °C. Por ejemplo, un estudio

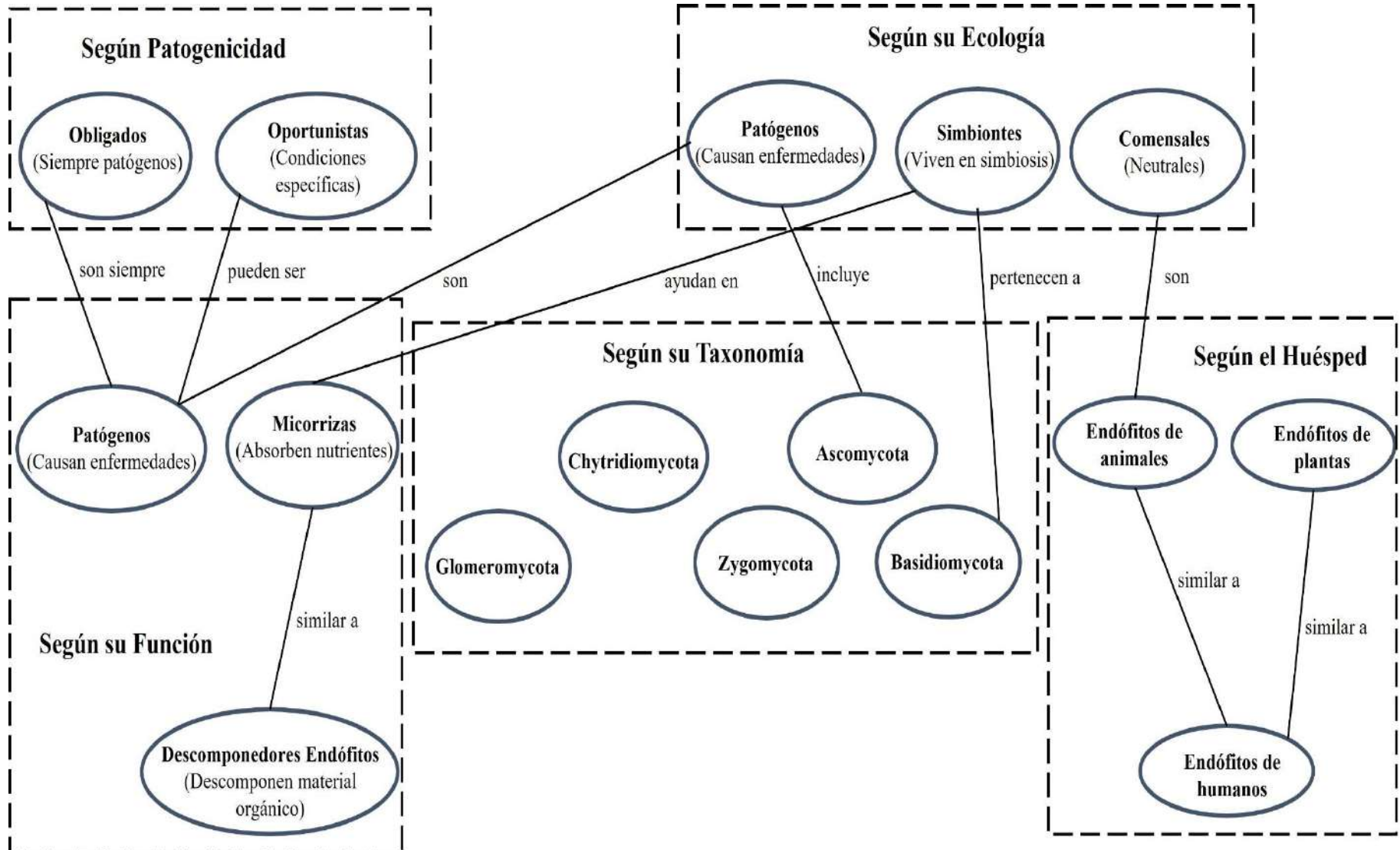
realizado por *Mishra S et al. (2015)* encontró que el crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, un hongo que causa la aspergilosis en humanos se inhibía a temperaturas superiores a 35 °C.

La germinación de las esporas de los hongos también se ve afectada por la temperatura. La mayoría de las esporas de hongos germinan a temperaturas cálidas, entre los 20 y los 30 °C. Por ejemplo, un estudio realizado por *Mishra S et al. (2015)* encontró que la germinación de las esporas de *Beauveria bassiana*, un hongo que se utiliza para el control biológico de plagas se maximizaba a temperaturas de 25 °C. Asimismo, la producción de esporas de los hongos se afecta. La mayoría de los hongos producen más esporas a temperaturas cálidas, entre los 20 y los 30 °C. Por ejemplo, un estudio realizado por *Mishra S et al. (2015)* encontró que la producción de esporas de *Aspergillus fumigatus* se maximizaba a temperaturas de 25 °C.

La temperatura óptima de crecimiento para los hongos endógenos varía según la especie y el organismo huésped. En general, los hongos endógenos que viven en plantas crecen mejor a temperaturas cálidas, entre los 20 y los 30 °C. Por ejemplo, en el mismo ejemplo antes mencionado sobre un estudio realizado por *Pasanen et al. (2000)* se encontró que el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, un hongo que causa la marchitez del Fusarium en el tomate, cultivado en plantas de tomate se maximizaba a temperaturas de 25 °C.

Existen varias formas de clasificar a los hongos endógenos: por patogenicidad, ecología, función, taxonomía y según el huésped como se puede ver en la Figura 13.

Figura 13 Clasificación de hongos endógenos.



La bioprospección de hongos endógenos ha llevado al descubrimiento de numerosos compuestos bioactivos con potencial aplicación en medicina. Estos compuestos incluyen alcaloides, terpenoides, fenoles y polipéptidos, y pueden exhibir actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes (Strobel, 2003).

A continuación, se presentan algunos hongos endógenos conocidos por sus propiedades medicinales:

Figura 14 El tejo y la molécula taxol.



Taxol: Taxol (paclitaxel) es un conocido agente anticancerígeno aislado del hongo endofítico *Taxomyces andreanae*, que se encuentra en la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). Taxol ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el de mama, ovario y pulmón (Stierle, Strobel, & Stierle, 1993) (véase Figura 14).

Nota. Sus hojas, madera, corteza y semillas son tóxicos, solo el arilo (envoltura roja que rodea la semilla) es comestible. Tomado de Soto, E. (2012). Tamtampress. El tejo y la molécula de Taxol: <https://tamtampress.es/2012/11/18/el-tejo-y-la-molecula-de-taxol/>

Figura 15 *Pestalotiopsis*.



***Pestalotiopsis*:** El género de hongos endofíticos *Pestalotiopsis* es conocido por producir compuestos con actividades antimicrobianas y antitumorales. Un estudio de 2011 mostró que los compuestos producidos por *Pestalotiopsis* spp. exhiben propiedades antibacterianas, antifúngicas y citotóxicas (Patrick et al., 2005) (véase Figura 15).

Nota. Esporas de *Pestalotiopsis microspora*. Tomado de MSchink. (2015). Mushroom Observer. Obtenido de <https://mushroomobserver.org/account/login/new>

Figura 16 *Penicillium*.



***Penicillium*:** Los hongos endofíticos del género *Penicillium* han sido identificados como productores de diversas moléculas bioactivas. Un estudio de 2016 mostró que *Penicillium chrysogenum*, un hongo endofítico aislado de una planta medicinal produce compuestos con actividad antioxidante y antitumoral (Golinska et al., 2016). (véase figura 16)

Nota. También se está estudiando para su posible aplicación en otros campos, como la agricultura, la biorremediación y la producción de biocombustibles. Tomado de Crulina 98 (2009). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillium_notatum.jpg

***Fusarium*:** El género *Fusarium* incluye hongos endofíticos que producen moléculas bioactivas, como la equisetina y la fusarubina. Estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas. Un estudio de 2014 reveló que los compuestos producidos por *Fusarium* spp. aislados de plantas medicinales tienen actividad antimicrobiana y citotóxica (Khan et al., 2014). (Véase Figura 17).

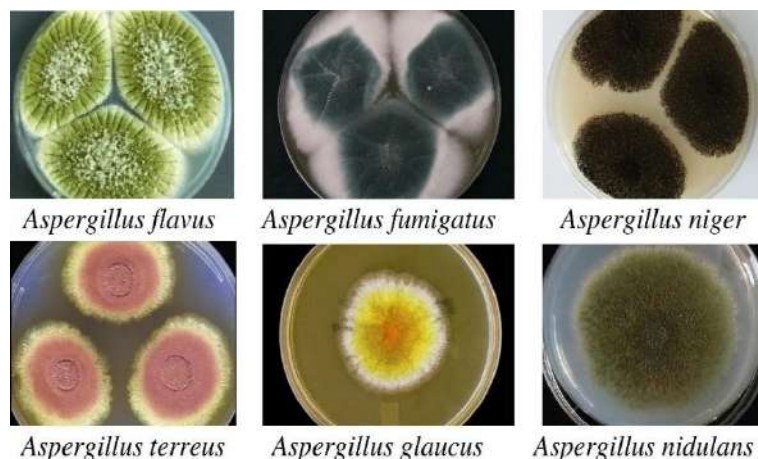
Figura 17 *Fusarium*.



Nota. Se ha encontrado *Fusarium* endógeno en el maíz en México Tomado de Villaverde, J. (2018). Plantamus. <https://plantamus.com/blog/todo-sobre-fusarium/>

Aspergillus: Los hongos del género *Aspergillus*, como *Aspergillus fumigatus*, son endofíticos que producen compuestos bioactivos, incluidos los llamados aspergillomarasmines. Estos compuestos han demostrado actividad anticancerígena y antiviral, como se observó en un estudio de 2013 (Kusari et al., 2014). (Véase Figura 18).

Figura 18 Hongos endógenos aspergillus



Nota. Puede ayudar a estimular la producción de células T, un tipo de glóbulo blanco que juega un papel importante en la respuesta inmunitaria Tomado de Baniya, S. (2023). *Aspergillus: Morphology, Clinical Features, and Lab*

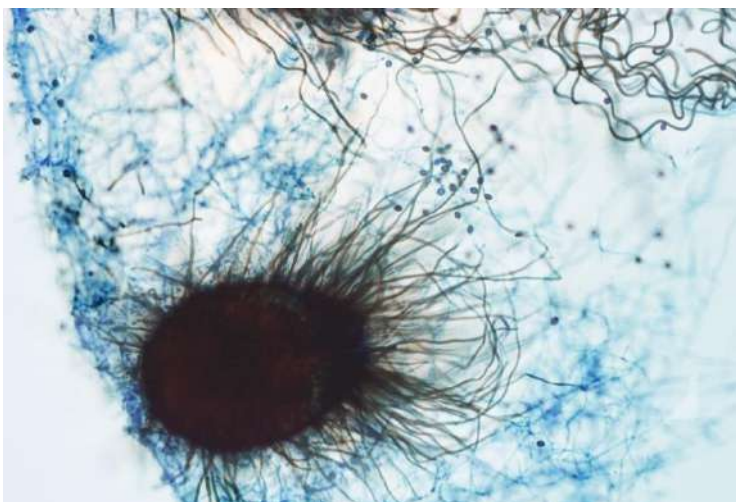
Xylaria: El género *Xylaria* incluye **Figura 19** *Xylaria*

hongos endofíticos que producen compuestos bioactivos, como la xyloketal B. Esta molécula ha demostrado propiedades antioxidantes y neuroprotectoras en modelos de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson. Un estudio de 2012 mostró que *Xylaria* spp. produce compuestos con potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas (Su J, et al., 2014). (Véase Figura 19).



Nota. Se encuentra comúnmente en los troncos de árboles muertos o en descomposición Tomado de Fischer, A. (2021). National Geographic <https://www.ngenespanol.com/naturaleza/xylaria-polymorpha-asi-son-los-hongos-en-forma-de-dedos-de-muertos/>

Figura 20 *Chaetomium*.



Nota. Tomado de Institut national de santé publique du Québec. (2023). *Chaetomium* spp. Obtenido de <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/chaetomium-spp>

***Chaetomium*:** El género *Chaetomium* incluye hongos endofíticos que producen chaetoglobosinas, un grupo de compuestos con diversas propiedades biológicas. Estas moléculas han demostrado actividad antiviral, antifúngica y anticancerígena en varios estudios. Un estudio de 2015 mostró que las chaetoglobosinas producidas por *Chaetomium globosum* presentan actividad citotóxica y antitumoral (Qi-Chang Z et al., 2015). (Véase Figura 20).

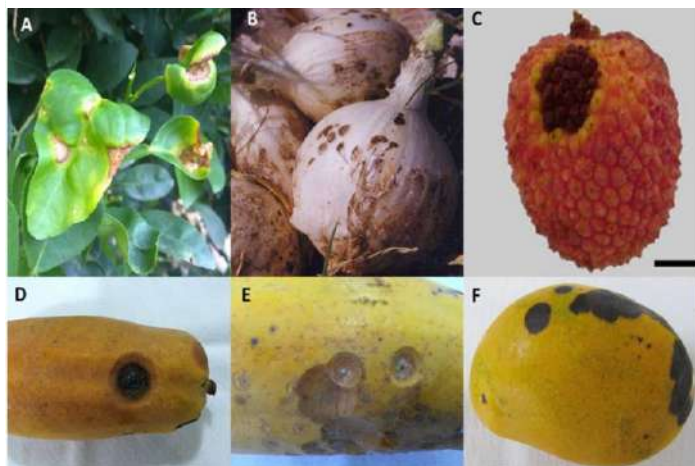
***Alternaria*:** El género *Alternaria* es conocido por hongos endofíticos que producen compuestos con actividad antimicrobiana y antitumoral. Por ejemplo, el compuesto alternatoxin, aislado de *Alternaria* spp., muestra actividad citotóxica y anticancerígena. Un estudio de 2014 investigó el potencial de *Alternaria* spp. como fuente de compuestos antitumorales (Lorenzini et al., 2014). (Véase Figura 21).

Figura 21 *Alternaria*



Nota. Son multicelulares, pigmentados y se producen en cadenas rectas o ramificadas, como las representadas aquí. El extremo del conidio más cercano al conidióforo es redondeado y se estrecha hacia el ápice, lo que le da un aspecto de pico. Tomado de Villaverde, J. (2018). Plantamus. <https://plantamus.com/blog/todo-sobre-fusarium/>

Figura 22 *Colletotrichum*.



Nota. Síntomas de antracnosis ocasionados por *Colletotrichum* spp. A) *Colletotrichum* sp. en hojas de limón mexicano; B) *C. circinans* en cebolla (Tomado de Montes-Belmont et al., 2003); C) *C. gloeosporioides* en litchi (Tomado de Martínez-Bolaños et al., 2015); D) y E) *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en papaya; F) *C. gloeosporioides* en mango. Tomado de Indira R, B. Á. (2017). Revista mexicana de fitopatología. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092017000300549

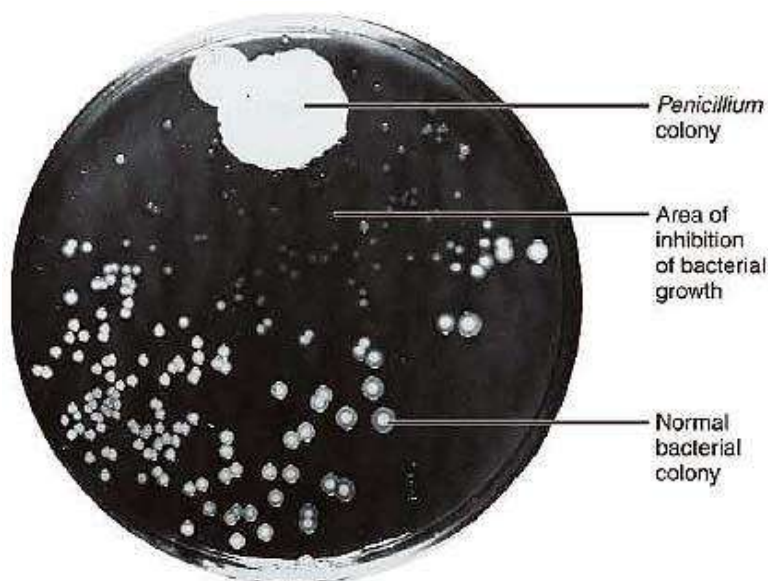
***Colletotrichum*:** Los hongos endofíticos del género *Colletotrichum* han sido identificados como productores de diversos compuestos bioactivos, como los ácidos colletotricos y colletotricosidos. Estas moléculas han demostrado actividades antimicrobianas y anticancerígenas. Un estudio de 2017 destacó el potencial de *Colletotrichum* spp. en la producción de compuestos bioactivos (Rojo et al., 2017). Véase Figura 22.

La investigación en hongos endógenos y sus compuestos bioactivos es un campo en constante crecimiento. Los ejemplos mencionados en este texto ilustran la diversidad y el potencial de estos microorganismos en la producción de moléculas con actividad medicinal. A medida que se realicen más investigaciones en esta área, es probable que se descubran más compuestos útiles para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones.

Como un gran ejemplo se tiene el descubrimiento de la penicilina, uno de los hitos más importantes en la historia de la medicina moderna. La penicilina es un antibiótico producido naturalmente por el hongo *Penicillium*, y fue descubierta por casualidad por el microbiólogo británico Alexander Fleming en 1928 (Fleming, 1929).

En ese momento, Fleming trabajaba en el St. Mary's Hospital de Londres y estaba investigando la actividad bactericida de diferentes cepas de *Staphylococcus*. Un día, observó que una de sus placas de cultivo había sido contaminada por un hongo del género *Penicillium*, y notó que alrededor de la colonia de hongo, las bacterias no habían crecido como se puede observar en la Figura 23. Fleming dedujo que el hongo estaba produciendo una sustancia antibacteriana y comenzó a investigar sus propiedades.

Figura 23 Representación de serendipia en el descubrimiento de la penicilina.



Nota. Debido a la penicilina (sustancia descubierta por error) se supo que evitaba el crecimiento bacteriano y esto revolucionó la medicina. Tomado de ST MARY'S HOSPITAL MEDICAL SCHOOL / SCIENCE PHOTO LIBRARY. (2024). Culture plate made by Alexander Fleming. Obtenido de <https://www.sciencephoto.com/media/224932/view/culture-plate-made-by-alexander-fleming>

Fleming aisló la sustancia activa del hongo y la llamó penicilina. Sin embargo, su investigación inicial fue limitada y no pudo demostrar la eficacia terapéutica de la penicilina en humanos. Fue hasta la década de 1940, cuando los científicos Howard Florey y Ernst Chain, de la Universidad de Oxford, trabajaron para purificar y producir la penicilina a gran escala, y lograron demostrar su eficacia en el tratamiento de infecciones bacterianas en animales y humanos (Chain et al., 1940).

El descubrimiento de la penicilina y su posterior producción a gran escala revolucionó medicina al proporcionar un tratamiento eficaz para infecciones bacterianas graves y salvar innumerables vidas. El descubrimiento de la penicilina también llevó al desarrollo de muchos otros antibióticos, y sentó las bases para la era de la medicina moderna.

Según (Godinez, 2015) El proceso de producción de penicilina implica una serie de etapas técnicas que se llevan a cabo en instalaciones especializadas. A continuación, se detallan los pasos técnicos involucrados en la obtención de penicilina:

Cultivo del hongo:

Se inicia con la preparación de un medio de cultivo estéril que contiene nutrientes como glucosa, sales minerales y fuentes de nitrógeno.

El hongo *Penicillium chrysogenum* se inocula en el medio de cultivo y se fermenta en tanques de fermentación a condiciones controladas de temperatura, pH y agitación para promover el crecimiento del hongo y la producción de penicilina.

Extracción de la penicilina:

Una vez que el hongo ha alcanzado la máxima producción de penicilina, se separa del medio de cultivo mediante técnicas de filtración y centrifugación para obtener un caldo que contiene la penicilina.

Purificación de la penicilina:

El caldo que contiene la penicilina se somete a un proceso de purificación que incluye la adición de solventes orgánicos para extraer la penicilina y separarla de otras impurezas presentes en el caldo.

Posteriormente, se lleva a cabo una serie de procesos de precipitación, cristalización y filtración para obtener una forma pura de penicilina.

Formulación y envasado:

La penicilina purificada se formula en diferentes presentaciones farmacéuticas, como soluciones inyectables, tabletas o suspensiones líquidas, mediante la adición de excipientes y estabilizantes según las especificaciones del producto final.

Una vez formulada, la penicilina se envasa en contenedores estériles bajo condiciones controladas para garantizar su estabilidad y calidad durante el almacenamiento y distribución.

Es importante mencionar que el proceso de producción de penicilina requiere estrictos controles de calidad, cumplimiento de normativas sanitarias y buenas prácticas de fabricación para asegurar la pureza, eficacia y seguridad del producto final.

1.8 Herramientas analíticas en el estudio de moléculas con propiedades medicinales

El estudio de moléculas con propiedades medicinales requiere el empleo de herramientas analíticas avanzadas para comprender sus características y efectos biológicos. Estas herramientas permiten identificar, cuantificar y caracterizar las moléculas presentes en las muestras, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo de nuevos fármacos y terapias. En este apartado, se explorarán algunas herramientas analíticas ampliamente utilizadas en este campo.

Una de las herramientas analíticas fundamentales en el estudio de moléculas con propiedades medicinales es la espectroscopia UV-Visible. Esta técnica tiene sus bases de acuerdo con la emisión y absorción de luz en el rango radiación electromagnética UV-Visible por parte de las moléculas. La espectroscopia UV-Visible ha demostrado su utilidad en el estudio de compuestos naturales con potencial terapéutico. La técnica UV-Visible permite obtener información valiosa sobre la estructura y las propiedades de las moléculas, lo que contribuye a la comprensión de sus efectos biológicos y su potencial terapéutico.

Algunas de sus aplicaciones han sido en la identificación y cuantificación de flavonoides, compuestos polifenólicos con propiedades medicinales. Esta técnica se ha aplicado para analizar diversas plantas medicinales como la manzanilla y el té verde, que son ricas en flavonoides y conocidas por sus beneficios para la salud, como propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. En el ámbito de la fitoterapia, la espectroscopia UV-Visible se utiliza para analizar la composición química de aceites esenciales extraídos de plantas medicinales. Ha permitido, por ejemplo, estudiar la composición del aceite esencial de lavanda, que contiene una mezcla de terpenos y aldehídos y que es utilizado en tratamientos para aliviar el estrés y la ansiedad.

Otra herramienta ampliamente utilizada en el análisis de moléculas con propiedades medicinales es la cromatografía de capa fina. Esta técnica de separación permite identificar y cuantificar los componentes presentes en una muestra. La cromatografía de capa fina ha sido aplicada en el análisis de plantas medicinales y extractos naturales, donde desempeña un papel crucial en la identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos presentes. En un estudio realizado

por (Agatonovic et al., 2014), se menciona que: "La cromatografía de capa fina se empleó para el análisis y la cuantificación de polifenoles naturales en el vino". Esta técnica proporciona información precisa sobre la composición química de las muestras y permite evaluar la presencia y concentración de compuestos con potencial terapéutico.

Por otro lado, la espectroscopia de masas mediante infusión directa con ionización por electrospray y resonancia del ion en el ciclotrón utilizando transformada de Fourier, FIA-(ESI-FT-ICR-MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que combina la facilidad y simplicidad de la infusión directa (FIA) con la alta sensibilidad y resolución de la ionización por electrospray (ESI) y la espectrometría de masas de transformada de Fourier de resonancia de iones en ciclotrón (FT-ICR-MS) (Giles et al., 2011).

En la infusión directa (FIA), una muestra líquida se introduce directamente en el sistema de espectrometría de masas, lo que permite la rápida adquisición de datos y la eliminación de etapas de separación cromatográfica. Esto facilita la adquisición de espectros de masas de alta calidad en tiempos de análisis reducidos (Smith et al., 2006).

La ionización por electrospray (ESI) es una técnica suave de ionización que genera iones en fase líquida y es ampliamente utilizada para analizar compuestos polares y termolábiles, como péptidos, proteínas y metabolitos (Fenn et al., 1989).

La espectrometría de masas de transformada de Fourier de resonancia de iones en ciclotrón (FT-ICR-MS) es una técnica de ultra alta resolución que emplea un imán superconductor y tecnología de transformada de Fourier para medir con precisión las relaciones masa/carga (m/z) de los iones. La FT-ICR-MS ofrece resoluciones extremadamente altas y exactitud en la determinación de masas, lo que la hace ideal para el análisis de mezclas complejas (Marshall et al., 1998).

1.9 Uso de la espectrometría de masas en el estudio de plantas medicinales.

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta analítica que se utiliza ampliamente en el estudio de plantas medicinales. La técnica permite identificar y cuantificar los compuestos químicos presentes en las plantas, así como evaluar su actividad biológica y sus propiedades farmacológicas. Algunas aplicaciones de la espectrometría de masas en el estudio de plantas medicinales son:

Estudio de la farmacocinética y metabolismo de compuestos de plantas medicinales: La MS se emplea para investigar la farmacocinética y el metabolismo de los compuestos de plantas medicinales en organismos vivos, lo que permite comprender su absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) (Zhang et al., 2018).

Análisis de calidad y autenticación de plantas medicinales: La MS se utiliza en el control de calidad y autenticación de plantas medicinales y sus productos, permitiendo la identificación de adulterantes y la evaluación de la pureza y la concentración de los compuestos bioactivos (Saraf et al., 2012).

Descubrimiento de nuevos medicamentos basados en plantas: La MS es una herramienta valiosa en el proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos basados en plantas medicinales, ya que facilita la identificación y caracterización de compuestos bioactivos y el estudio de sus mecanismos de acción (Cech & Kvalheim, 2013).

Estudio de interacciones entre compuestos de plantas medicinales y proteínas: La MS puede utilizarse para investigar las interacciones entre los compuestos de plantas medicinales y proteínas, lo que ayuda a comprender su mecanismo de acción y a identificar nuevos objetivos terapéuticos (Van Breemen & Li, 2005).

Análisis de productos fitoterapéuticos: La MS se utiliza en el análisis de productos fitoterapéuticos para determinar su composición y evaluar la presencia de compuestos bioactivos, impurezas y contaminantes, lo que es esencial para garantizar la calidad, seguridad y eficacia de estos productos (Sun J et al., 2016).

1.10 Producción sintética de bouvardina

La síntesis de bouvardina es un proceso complejo debido a la estructura química altamente estereoespecífica de la molécula. Hay varias rutas sintéticas conocidas para la síntesis de bouvardina, pero todas implican múltiples pasos y algunas de ellas requieren la utilización de compuestos y reactivos peligrosos.

Extracción y Formulación: Patente US4226856

La patente US4226856 (Cole, 1980) representa un hito crucial al detallar la preparación y uso de bouvardina y deoxybouvardina. Se destaca la importancia de la extracción meticulosa de estos hexapéptidos de la planta *Bouvardia ternifolia*, describiendo un proceso que incluye molienda, extracciones secuenciales con metanol, acetonitrilo y diclorometano, seguido de procesos de evaporación, disolución y precipitación. La pureza superior al 90% obtenida mediante este método es esencial para garantizar la eficacia y seguridad de los compuestos en su aplicación terapéutica.

Además, la patente ofrece información sobre las dosis recomendadas para el tratamiento de enfermedades neoplásicas en animales, abarcando condiciones como leucemia linfocítica, melanoma melanótico y adenocarcinoma. La posibilidad de utilizar diversos diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables amplía las opciones de administración y estabilización de las soluciones, destacando la versatilidad de estos compuestos.

Síntesis Orgánica Total: The Journal of Organic Chemist

Por otro lado, el artículo "Total Synthesis of Bouvardin and Deoxybouvardin" (Boger & Yohannes, 1988) ofrece una perspectiva adicional al abordar la síntesis orgánica total de bouvardina y deoxybouvardina. La síntesis se lleva a cabo a través de la preparación de segmentos peptídicos clave, destacando la importancia del segmento tetrapéptido Boc--Ala-Ala-N-Me-Tyr(OCH₃)-Ala-OCH₃ para la estructura y actividad biológica. Se profundiza en la modificación de grupos funcionales en el segmento de dipéptido cíclico de 14 miembros, subrayando la complejidad y precisión requeridas en la síntesis de estos compuestos.

Adicionalmente, el artículo aborda la actividad citotóxica de bouvardina y deoxybouvardina, señalando estudios sobre su interacción con el ribosoma eucariótico y su potencial como agentes antitumorales. La confirmación de la falta de actividad citotóxica detectable en deoxybouvardina resalta la importancia del enlace éter cíclico de dipéptido de 14 miembros para la actividad biológica de estos compuestos.

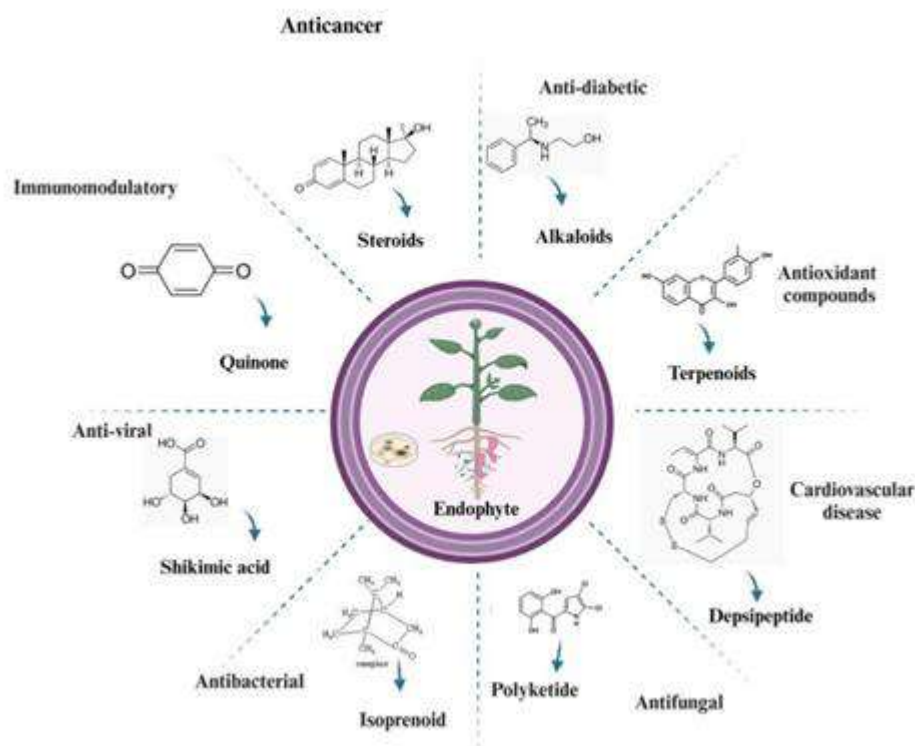
1.11 Escalamiento para la producción en masa de hongos que sintetizan moléculas de importancia farmacéutica

El cáncer es complejo, produce una rápida proliferación anormal de células tumorales en el tejido localizado o en todo el cuerpo, para suprimir ese crecimiento se ocupan compuestos que interfieran la formación de tumores malignos, se conocen como agentes antitumorales, los cuales pueden ser naturales y sintéticos.

En la actualidad existe la preocupación de disponer de agentes antitumorales de origen vegetal, a los cuales se les atribuye una cantidad menor de efectos secundarios en las otras células. Vega et al., (2006) reportan que en la medicina de Estados Unidos se dispone de medicamentos de origen natural a partir de 1958, fue vinblastina (Velban®) el primer fármaco, de ahí se han desarrollado otros, como: vincristina (Oncovin®), vinorelbina (Navelbine®), vindesina (Eldisine®), etopósido (VP-16®), tenipósido (VM-26®), paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), topotecan (Hycamtin®) e irinotecan (Campostar®). Existen marcas de medicamentos que dan fe que las plantas medicinales son una fuente importante para obtener fármacos para el tratamiento del cáncer.

La situación descrita invita a identificar en las plantas medicinales los compuestos antitumorales, de ahí la importancia de conocer si esos metabolitos secundarios con potencial anticancerígeno los producen los microorganismos endófitos en dichas plantas medicinales como los compuestos bioactivos con potencial farmacéutico que se pueden observar en la Figura 24. Este desentrañamiento permitirá construir una visión de la microbiología para fortalecer a la industria farmacéutica.

Figura 24 Compuestos bioactivos de hongos endófitos y su potencial farmacéutico (Usman et al., 2024).



Nota. Los hongos endófitos se incursionan como revolucionarios en la industria farmacéutica debido a su potencial como agentes médicos. Tomado de Usman et al., 2024.

En la actualidad es de importancia valorar a los microorganismos endófitos como productores de metabolitos secundarios para la elaboración de nuevos medicamentos. Esta estrategia permitirá el escalamiento para la producción intensiva de hongos que producen moléculas de importancia farmacéutica, ello requiere una serie de etapas, desde el aislamiento y selección de cepas hasta la optimización de las condiciones de cultivo y la purificación de los compuestos de interés. Las etapas principales del proceso de escalamiento son:

Aislamiento y selección de cepas: La primera etapa implica el aislamiento de cepas fúngicas que producen compuestos de interés farmacéutico. Esto puede incluir la selección de cepas a partir de muestras ambientales o la obtención de cepas de colecciones de microorganismos (Hawksworth & Rossman, 1997).

Cultivo en pequeña escala: Las cepas seleccionadas se cultivan en condiciones controladas en el laboratorio, utilizando medios de cultivo adecuados y condiciones de incubación para promover el crecimiento y la producción de los compuestos de interés (Dufossé et al., 2013).

Escalamiento a producción en masa: Una vez que se han optimizado las condiciones de cultivo, el proceso se escala a un nivel de producción industrial utilizando biorreactores o fermentadores. Estos sistemas permiten un control preciso de las condiciones de cultivo y un monitoreo en tiempo real de la producción de compuestos de interés (Duetz et al., 2000).

Extracción y purificación: Tras el cultivo en biorreactores o fermentadores, los compuestos de interés farmacéutico deben ser extraídos y purificados. Los métodos de extracción y purificación varían según el tipo de compuesto y pueden incluir técnicas como la extracción con solventes, la cromatografía y la filtración (Chang et al., 2001).

Control de calidad y análisis: Los compuestos purificados se someten a análisis y pruebas de control de calidad para determinar su pureza y actividad biológica. Estas pruebas pueden incluir técnicas analíticas como la espectrometría de masas, la cromatografía y la resonancia magnética nuclear (Alseekh, Aharoni, et al, 2021).

Desarrollo de formulaciones y aplicaciones: Finalmente, los compuestos purificados pueden ser formulados en productos farmacéuticos o utilizados como materias primas para la síntesis de nuevos compuestos con propiedades medicinales (Singh nee' Nigam et al., 2009).

A modo de conclusión, la planta *Bouvardia ternifolia* representa una oportunidad significativa debido a la presencia de la molécula bouvardina, que ha demostrado tener efectos antitumorales al inhibir la síntesis de proteínas en células tumorales, afectando su capacidad de crecimiento y proliferación. La estructura compleja de esta molécula hace que su síntesis sea complicada, por lo que es importante buscar alternativas para su obtención. Este estudio propone la producción de bouvardina utilizando la microbiota endógena de *Bouvardia ternifolia*. En el siguiente capítulo, se presenta la metodología para alcanzar los objetivos, que incluyen determinar si la molécula bouvardina puede producirse sin la planta hospedadora, identificar la cepa con mayor crecimiento en el medio de cultivo Malt Extract Broth (MEB), establecer las condiciones

óptimas de pH y temperatura para maximizar la producción, y evaluar la producción utilizando un medio de cultivo económico.

Capítulo II. Metodología y Método

2.1 Introducción

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Postgrado e Investigación de Operaciones Unitarias de la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN. El proyecto está liderado por la ESIQIE, además participan como colaboradores profesores-investigadores del CINVESTAV y de la Universidad Autónoma Chapingo.

En este capítulo se ofrece una descripción detallada de los métodos y procedimientos utilizados en la investigación para abordar el estudio integral de la molécula de bouvardina. La bouvardina es un compuesto con potenciales propiedades farmacológicas que ha despertado un gran interés en la comunidad científica.

En este capítulo se presentan nueve etapas clave que se llevaron a cabo para lograr los objetivos de la investigación. Estas etapas abarcan desde la identificación de la molécula de bouvardina en un extracto alcohólico de la planta, hasta la determinación de la cinética de producción a lo largo de 22 días de producción. Cada una de estas etapas se realizó utilizando una combinación de técnicas y enfoques, que permitieron un análisis completo y detallado de la producción de bouvardina.

Se inició con la identificación de la molécula de bouvardina a través de técnicas de espectrometría de masas en el extracto alcohólico de la planta, lo que permitió confirmar su presencia y establecer una base sólida para los siguientes pasos de la investigación.

Posteriormente, se llevó a cabo la identificación y caracterización de muestras microbiológicas de hongos endófitos con potencial para la producción de bouvardina. Esto se logró mediante técnicas de cultivo y análisis molecular, que permitieron evaluar la capacidad de diferentes muestras para producir el compuesto de interés.

Con el propósito de obtener una cepa productora de bouvardina, se realizó la activación de hongo endófito en un medio de cultivo sólido para una posterior siembra en medio de cultivo líquido. Esto aseguró la obtención de una cepa adecuada que presentara una alta capacidad de producción.

Se procedió entonces al estudio de la producción de bouvardina por hongos endófitos en medios líquidos, evaluando la presencia y la ausencia de la planta como fuente de nutrientes a estos microorganismos endófitos.

Para un análisis más detallado de la producción de bouvardina, se empleó la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS. Esta técnica proporcionó información valiosa sobre las características de la molécula y permitió un seguimiento preciso de su producción.

Además, se identificó la condición de pH adecuada para la producción de bouvardina a través de la caracterización de la producción de bouvardina en diferentes condiciones de pH, utilizando la técnica FIA-ESI-FT-ICR-MS para evidenciar la producción de bouvardina para cada condición de pH establecida.

Con el fin de establecer un proceso viable a gran escala, se evaluó la producción de bouvardina utilizando un medio de cultivo económico en un biorreactor a nivel laboratorio. Por último, se determinó la cinética de producción de bouvardina, mediante análisis cuantitativos y evaluación de los parámetros cinéticos clave. Esto proporcionó información esencial sobre la dinámica de producción y permitió establecer un seguimiento preciso del proceso.

El origen de las cepas de microorganismo endófitos utilizadas en esta experimentación proviene del trabajo publicado por Villalobos-Flores et al. (2022) titulado 'The Bacterial and Fungal Microbiota of the Mexican Rubiaceae Family Medicinal Plant *Bouvardia ternifolia*', publicado en la revista *Microbial Ecology*.

2.2 Equipos y reactivos utilizados.

Para llevar a cabo el presente estudio, se emplearon diversos equipos de laboratorio y reactivos que desempeñaron un papel fundamental en la realización de las diferentes etapas experimentales. Estos equipos y reactivos son de vital importancia para asegurar la precisión y confiabilidad de los resultados obtenidos.

La Tabla 4 detalla de manera exhaustiva los equipos de laboratorio y la Tabla 5 los reactivos empleados en el desarrollo de esta investigación, proporcionando información precisa sobre su

nombre, especificaciones técnicas y país de origen. Esta información permite la replicabilidad del estudio y garantiza la transparencia y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 4 Equipos utilizados en la investigación.

Equipo	Marca/Modelo	País de origen
Espectrómetro de masas	BRUKER/ Solarix	Alemania
Balanza Analítica	OHAUS / Explorer	Estados Unidos
Autoclave electrónico digital	LORMA / AV28L	México
Medidor de pH con electrodos remplazables	METROHM / 827 pH lab	Suiza
Agitador magnético	THERMO SCIENTIFIC / CIMAREC	Estados Unidos
Centrifuga clínica	VELAQUIN / CIVEQ 80-2	México
Centrifuga para laboratorio	THERMO SCIENTIFIC 4/SORVALL LEGEND	Estados Unidos

Nota. Información sobre diferentes equipos utilizados en el desarrollo de la investigación, incluyendo su marca/modelo y país de origen. Esta información es relevante para comprender la procedencia y calidad de los equipos utilizados.

Tabla 5 Reactivos utilizados en la investigación.

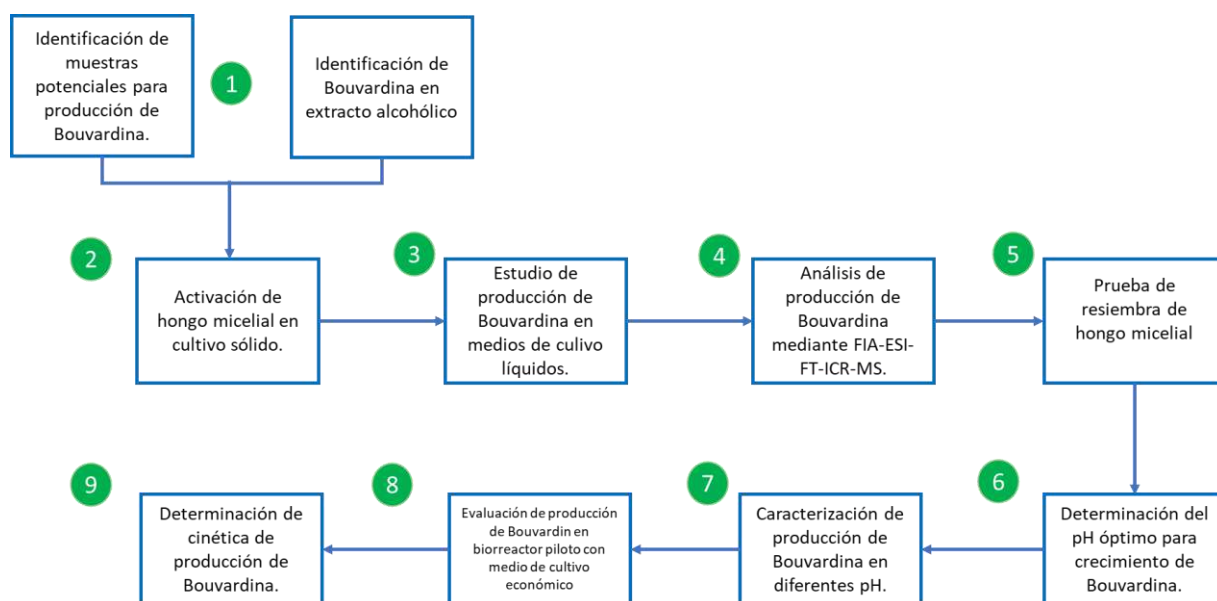
Reactivo	Pureza o Grado	Marca
Metanol	HPLC	MEYER
Malt Extract Broth	Microbiológico	Sigma-Aldrich
Agar Bacteriológico	Microbiológico	BD Bioxon
Acetonitrilo	HPLC	MEYER
Agua desionizada	Analítico	N/A
Trifluor Acetato de Sodio	Analítico	Sigma-Aldrich
Etanol	Comercial	N/A

Nota. La tabla presenta una lista de reactivos utilizados en diferentes aplicaciones científicas. Se indica el reactivo, su pureza o grado correspondiente y la marca asociada, su pureza o grado

2.3 Diseño de investigación de estudio experimental.

El diseño general de esta investigación combina elementos de un estudio experimental y un estudio de caso. A continuación, en la Figura 25, se explica el diagrama de flujo de proceso que seguirá la investigación.

Figura 25 Diagrama de bloques del proceso de investigación experimental sobre la producción de bouvardina.



2.4 Desarrollo de la metodología.

Es fundamental destacar que todo el material de laboratorio utilizado en el experimento, así como el medio de cultivo preparado, fueron sometidos a un riguroso proceso de esterilización. Para ello, se empleó una autoclave electrónica digital, específicamente el modelo LORMA/AV28L, que sometió el material y el medio de cultivo a condiciones extremas de temperatura y presión. La autoclave se programó a 121°C y 15 psi durante 15 minutos, garantizando así la eliminación completa de cualquier microorganismo presente.

a) Identificación de la molécula bouvardina en un extracto alcohólico de la planta mediante técnicas de espectroscopía de masas.

En este estudio, se llevó a cabo un análisis químico para la identificación de la molécula bouvardina en una muestra de la planta *Bouvardia ternifolia*. Se seleccionó una muestra que abarca diversas partes de la planta, como hojas, flores, tallos y raíces, con el objetivo de obtener una representación integral de los componentes presentes en ella. Para preservar la integridad de los componentes, se utilizó el proceso de liofilización, que consiste en la deshidratación mediante congelación seguida de sublimación del agua presente en la muestra.

Una vez obtenido el producto liofilizado, se procedió a la pulverización del material hasta obtener un polvo fino. Se tomó una cantidad precisa de 50 mg de este polvo para su análisis. Para extraer los compuestos de interés, se empleó metanol de grado HPLC, un disolvente adecuado para la extracción de compuestos orgánicos. La muestra de polvo se mezcló vigorosamente con el metanol utilizando un vortex, lo que permitió la transferencia eficiente de los compuestos al disolvente.

Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación para separar los sólidos del líquido. El sobrenadante, que contenía los compuestos extraídos de la planta, se filtró utilizando un filtro de jeringa para eliminar partículas y contaminantes indeseables. Este filtrado fue la muestra preparada que se utilizó para el análisis posterior.

La identificación de la molécula bouvardina en el extracto se realizó mediante espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas BRUKER/ Solarix (Ver Figura 26). La técnica de espectrometría de masas permitió determinar la masa y la composición del compuesto de interés presentes en la muestra. Se pudo analizar la presencia de bouvardina en la muestra.

Figura 26 Espectrómetro de masas BRUKER/Solarix.



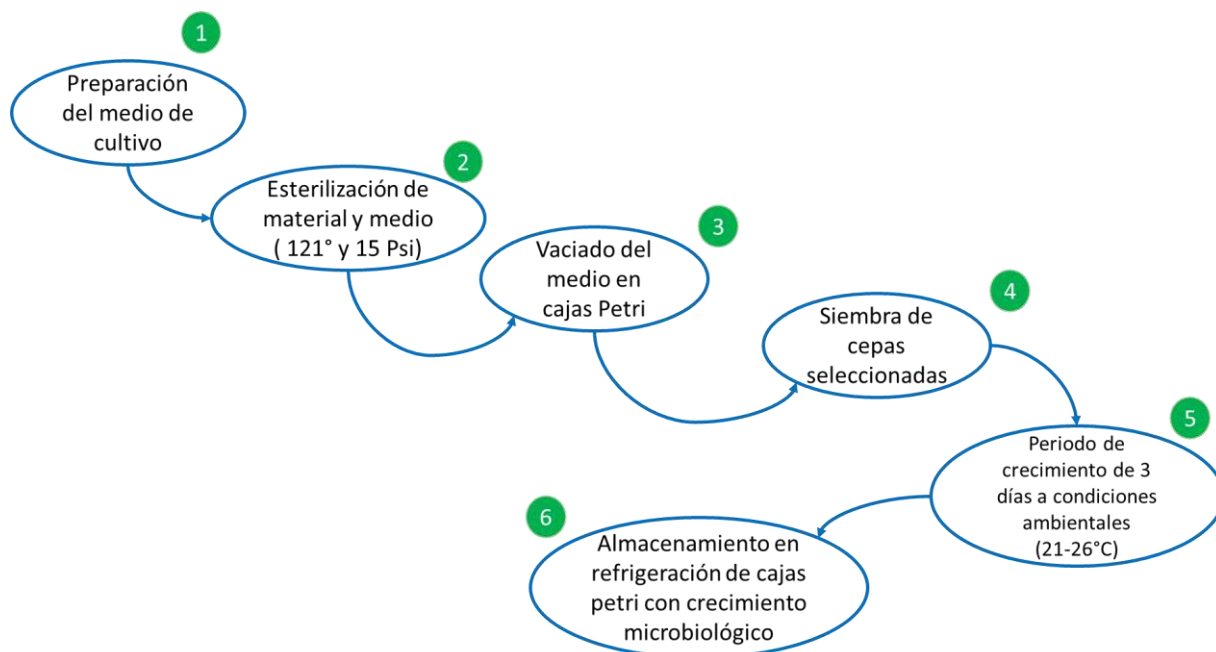
b) Identificación de muestras microbiológicas con potencial para la producción de bouvardina a través de técnicas de cultivo y análisis molecular.

De las muestras de hongos endófitos entregadas para su investigación, se identificaron las cuatro muestras de los endófitos que presentaron los niveles más destacados de producción de bouvardina, todas ellas mostraban el medio de cultivo Malt Extract Broth (MEB) que es con el que medio de cultivo utilizado durante esta experimentación.

c) Activación de hongos miceliales en un medio de cultivo sólido para la obtención de una cepa productora de bouvardina.

Se presenta a continuación un procedimiento detallado para la activación de los hongos endófitos en un medio de cultivo sólido. Esta etapa es esencial para garantizar la viabilidad y el crecimiento óptimo de las cepas seleccionadas, con el objetivo de obtener resultados precisos y consistentes en el estudio de la producción de bouvardina. El diagrama simplificado de esta etapa puede observarse en la Figura 27.

Figura 27 Diagrama de bloques del proceso general de la activación de cepas productoras de bouvardina.



A continuación, se describen detalladamente los pasos realizados:

1. Se realizaron cálculos para realizar dos preparaciones de 200 ml de medio de cultivo. Para esta cantidad, se requirieron 6 gramos de medio de cultivo MEB y un 2% de agar para solidificar el medio. El agar, un polisacárido derivado de algas marinas, se pesó en una cantidad de 4 gramos para cada preparación. Los sólidos se disolvieron en agua desionizada previamente calentada para facilitar la disolución del sólido y se completó el volumen necesario.

2. Esterilización de material de laboratorio y el medio de cultivo.

3. Una vez que el material de laboratorio y el medio de cultivo estuvieron esterilizados, se procedió al vaciado aséptico del medio de cultivo en 13 cajas Petri. Este proceso se llevó a cabo en un entorno estéril para evitar cualquier tipo de contaminación. Las cajas Petri se almacenaron en refrigeración con el fin de acelerar el proceso de solidificación del medio y prepararlas para la siguiente etapa.

4. Utilizando las cuatro muestras previamente seleccionadas, dos de ellas provenientes de la raíz, y el resto de la flor. Cada una de ellas se sembró por triplicado en diferentes áreas de las placas Petri estériles. A cada muestra se le asignó un código y un nombre específico, los cuales se detallan en la Tabla 6 adjunta en este estudio.

Tabla 6 Asignación de códigos a muestras sembradas seleccionadas

Parte de la planta de la cual proviene el hongo	Codificación de cepa	Código de repetición	Nombre
Raíz	R1	R1-1	Raíz 1-siembra 1
		R1-2	Raíz 1- siembra 2
		R1-3	Raíz 1-siembra 3
Raíz	R2	R2-1	Raíz 2-siembra 1
		R2-2	Raíz 2- siembra 2
		R2-3	Raíz 2-siembra 3
Flor	F1	F1-1	Flor 1-siembra 1
		F1-2	Flor 1- siembra 2
		F1-3	Flor 1-siembra 3
Flor	F2	F2-1	Flor 2-siembra 1
		F2-2	Flor 2- siembra 2
		F2-3	Flor 2-siembra 3

Nota. Muestra la asignación de códigos a las muestras sembradas seleccionadas. Las muestras están categorizadas según el área de la planta de la cual proviene el hongo, incluyendo raíces y flores.

5. Después de la siembra de las cepas de hongos en las cajas Petri, estas se colocaron en un ambiente controlado a una temperatura aproximada en un rango de 21-26°C durante un período de 3 días. Durante este tiempo, los hongos se desarrollaron y multiplicaron en el medio de

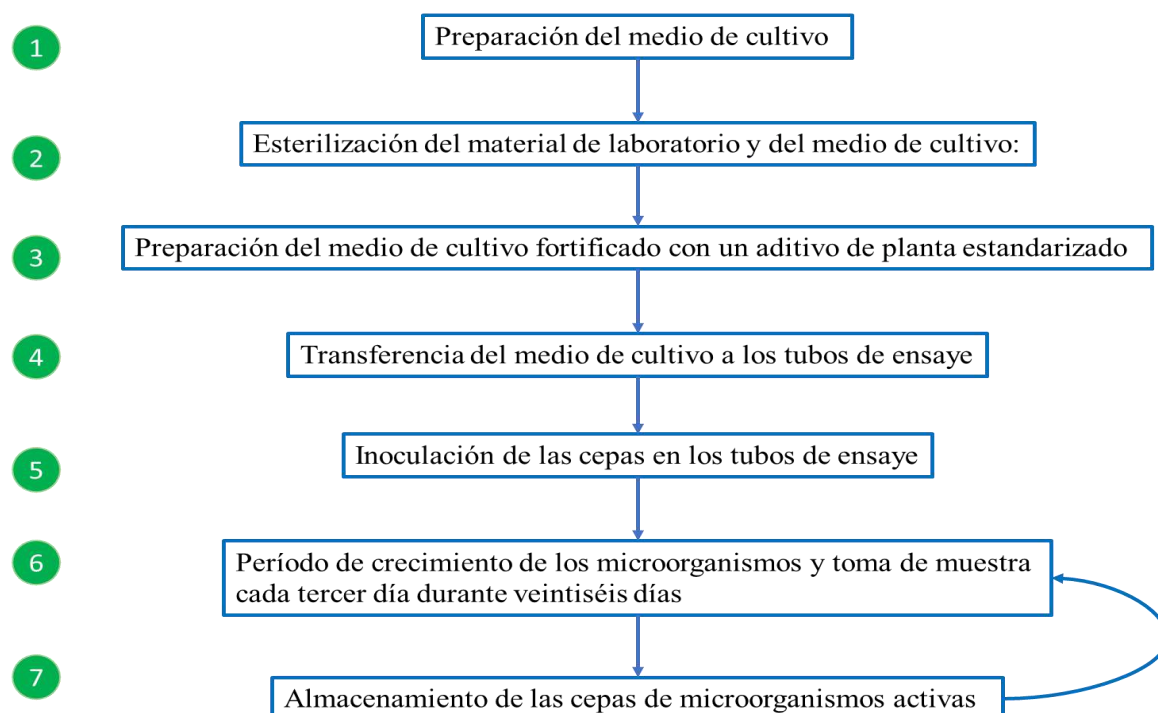
cultivo, formando colonias visibles a simple vista. Se registraron observaciones relevantes sobre el crecimiento de las colonias y cualquier fenómeno notable.

6. Una vez finalizado el período de crecimiento, las cajas Petri que contenían las cepas activas de hongos fueron cuidadosamente almacenadas en refrigeración, a una temperatura entre 2 y 4°C. Este almacenamiento en condiciones de baja temperatura garantiza la conservación de las cepas en un estado activo y viable, evitando su deterioro y asegurando su disponibilidad a lo largo del estudio y para fases posteriores.

d) Estudio de la producción de bouvardina por las cepas seleccionadas en medios líquidos con y sin aditivo de la planta medicinal *Bouvardia Ternifolia*.

Este inciso tiene como objetivo principal la evaluación de producción de bouvardina en medio de cultivos líquidos. Por otra parte, a la mitad de los medios líquidos preparados se les añadió aditivo de la planta medicinal *Bouvardia Ternifolia* para determinar si la planta juega un papel beneficioso en su producción. El diagrama simplificado de esta etapa puede observarse en la Figura 28.

Figura 28 Diagrama de bloques del proceso general de la prueba de crecimiento en medios de cultivo líquidos con y sin aditivo de planta estandarizado.



A continuación, se describen detalladamente los pasos realizados:

1. Se realizaron cálculos precisos para preparar dos lotes de 650 ml de medio de cultivo. Cada lote requirió la adición de 19.5 gramos de Medio de Extracto de Malta (MEB). Los sólidos fueron cuidadosamente disueltos en agua desionizada precalentada para facilitar su solubilidad, hasta alcanzar el volumen necesario.
2. Esterilización de material de laboratorio y el medio de cultivo.
3. Tras la esterilización de uno de los lotes de medio de cultivo, se permitió que se enfriara hasta alcanzar la temperatura ambiente (23°C aproximadamente) con el fin de evitar la degradación de moléculas termolábiles presentes en el aditivo de planta estandarizado. Se realizaron cálculos para lograr una concentración de 100 partes por millón del aditivo en el medio de cultivo. Para los 650 ml de medio de cultivo preparado, se pesaron 65 mg del aditivo de planta estandarizado utilizando una balanza analítica de alta precisión. Posteriormente, se añadió el aditivo estándar al medio de cultivo y se disolvió mediante una agitación adecuada.
4. Por otro lado, una vez que el material de laboratorio y el medio de cultivo estuvieron esterilizados y preparados, se procedió a realizar la transferencia aséptica del medio de cultivo a los tubos de ensaye. Se añadieron con precisión 30 ml del medio de cultivo fortificado con el aditivo estándar de planta a los primeros 12 tubos correspondientes, y se repitió el procedimiento con los restantes 12 tubos de ensaye para el medio de cultivo sin el aditivo estándar de planta. Esta transferencia se llevó a cabo en un entorno completamente estéril, evitando cualquier posible contaminación.
5. Se seleccionaron cuidadosamente las cepas de hongos endófitos previamente activadas, en particular las cepas correspondientes a los códigos F1-n y F2-n, debido a su alto crecimiento en los medios de cultivo sólidos. Se realizó una inoculación precisa de cada cepa en los dos tipos de medio de cultivo, fortificado y no fortificado. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles, garantizando la integridad de los cultivos. Además, se introdujo en cada tubo de ensaye un agitador magnético previamente esterilizado con alcohol etílico y se colocó en la correspondiente placa de agitación.

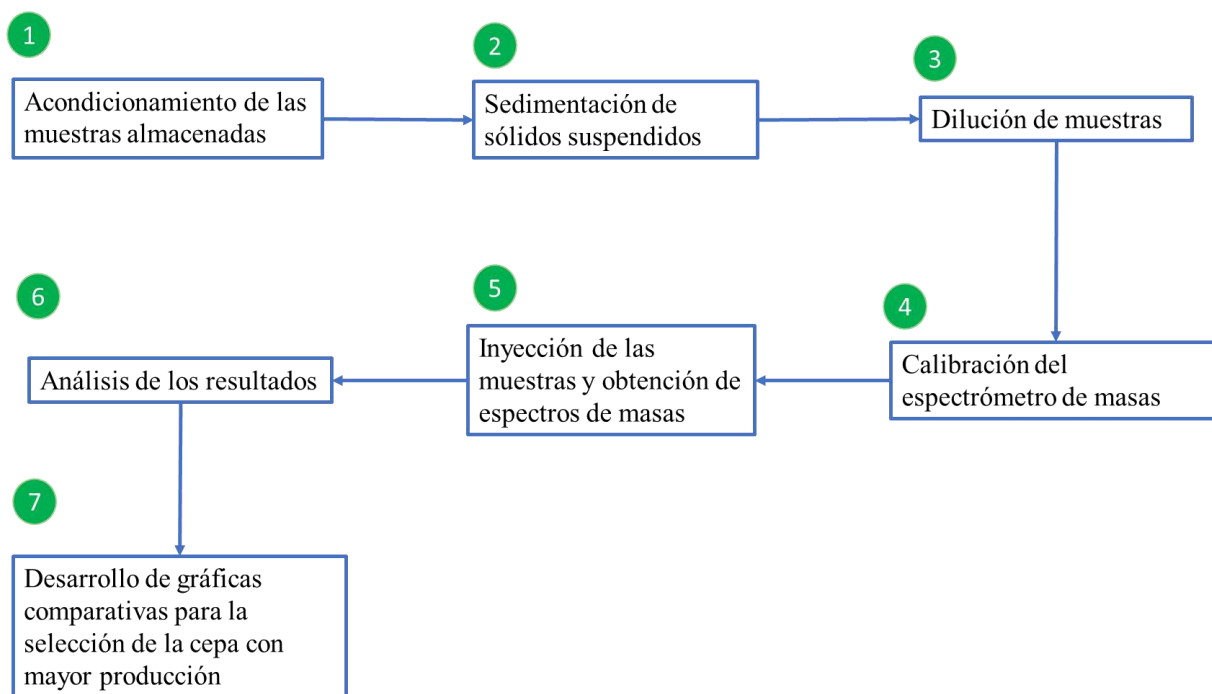
6. Tras la inoculación de las cepas de hongos endófitos en los tubos de ensaye, estos fueron ubicados en un ambiente controlado con una temperatura aproximada de 23°C durante un período de 26 días. A lo largo de este tiempo, los hongos endófitos se desarrollaron y multiplicaron en el medio de cultivo, generando colonias visibles a simple vista.

7. Durante el período de crecimiento, se tomaron muestras de 1 ml de cada tubo de ensaye cada 3 días en tubos eppendorf, incluyendo el día inicial y el día final; y se les asignó una adecuada identificación. Estas muestras fueron almacenadas en condiciones de congelación para garantizar su preservación en un estado activo y viable. Este método de almacenamiento a baja temperatura asegura la integridad de las cepas, previniendo su deterioro y asegurando su disponibilidad para ser inyectadas al espectrómetro de masas.

e) Primer análisis de la producción de bouvardina mediante la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS

Posterior al periodo de crecimiento de las cepas en medio de cultivo líquido, se llevó a cabo una un procedimiento para realizar un análisis detallado de cada muestra. Este procedimiento abarca desde el tratamiento previo de la muestra hasta el desarrollo y análisis de la producción utilizando gráficas comparativas. El objetivo de esta etapa fue obtener una comprensión precisa de la producción de la molécula bouvardina en cada cepa estudiada y compararlas. El diagrama simplificado de esta etapa se muestra en la Figura 29.

Figura 29 Diagrama de bloques del proceso general del primer análisis de la producción de bouvardina utilizando FIA-ESI-FT-ICR-MS.



A continuación, se describen en detalle los pasos realizados:

1. Las muestras tomadas cada 3 día mencionadas en d) *Estudio de la producción de bouvardina por las cepas seleccionadas en medios líquidos con y sin aditivo de la planta medicinal Bouvardia Ternifolia* que se encontraban almacenadas bajo congelación se dejaron descongelar cuidadosamente a temperatura ambiente hasta asegurar que no quedara ningún rastro de hielo. Este proceso se llevó a cabo de manera controlada para evitar posibles alteraciones en las propiedades de las muestras.

2. Para separar los sólidos suspendidos del líquido sobrenadante en cada muestra, se utilizó una centrífuga THERMO SCIENTIFIC/SORVALL LEGEND a una velocidad de 14,800 rpm durante 15 minutos. Este paso permitió obtener dos fases distintas: el líquido sobrenadante y los sólidos sedimentados en el fondo de los tubos eppendorf. La formación de un sólido firme en el fondo indicó una adecuada sedimentación de los componentes sólidos.

3. Con el fin de preparar las muestras para su posterior análisis en el espectrómetro de masas, se realizó una dilución del líquido sobrenadante. Cada muestra se diluyó en una proporción de 100 µL de muestra a 500 µL de metanol grado HPLC. Esta dilución fue necesaria para evitar la saturación del detector del espectrómetro de masas y asegurar una homogeneización efectiva de la solución. Cada muestra se agitó utilizando un equipo Vortex para garantizar una mezcla uniforme.

4. Para poder efectuar la inyección las muestras en el espectrómetro de masas, se realizó un proceso de calibración para asegurar la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos. Para ello, se utilizó el estándar trifluoracetato de sodio (NaTFA) que debe ser inyectado con un previo enjuague minucioso de la jeringa de inyección utilizando una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción 1:1. Los parámetros de inyección y calibración del instrumento se establecieron de acuerdo con los valores específicos del estándar y se registraron en las Tablas 7, 8 y 9. La calibración se llevó a cabo en ambas polaridades (positiva y negativa), y se aplicó una regresión cuadrática a los datos obtenidos del espectro de masas. Se estableció un criterio de validación de la calibración, que requería que al menos 5 puntos de la regresión cuadrática tuvieran un porcentaje de error menor al 0.1.

5. La inyección de las muestras en el espectrómetro de masas se realizó siguiendo estrictas prácticas de laboratorio. La jeringa de inyección se enjuagó con la solución de acetonitrilo y agua 1:1 después de cada muestra para evitar cualquier contaminación cruzada. Además, se realizó un enjuague adicional de la jeringa con la misma muestra antes de su inyección para asegurar que solo la muestra estuviera presente en la jeringa. Las condiciones de inyección fueron las mismas utilizadas durante la calibración, como se detalla en las Tablas 7., 8 y 9. De esta manera, se obtuvo un espectro de masas para cada una de las muestras, que proporcionó información detallada sobre la composición y las características de la molécula de interés.

Tabla 7 Parámetros de inyección en el apartado de API Source del espectrómetro de Masas.

API Source						
Srynge Pump		API Source			Source Gas Time	
Flow rate	120μL/h	Capillary	4500 V	2499.1 nA	Nebulizer	2 bar
Srynge	Hamilton 250 μL	End Plate offset	-500 V	32.217 nA	Dry gas	4 L/min
Divert Value					Dry Temp	180°C
Source (1-2)						

Nota. Muestra los parámetros de inyección utilizados y configurados en el software del espectrómetro de masas en el apartado API Source.

Tabla 8 Parámetros de inyección en el apartado de Ion Transfer del espectrómetro de Masas.

<i>Ion Transfer</i>							
<i>Source Optics</i>		<i>Octopole</i>		<i>Collision Cell</i>		<i>Transfer Optics</i>	
Capillary Exit	200 V	Frecuency	5 MHz	Collision Voltage	-1.5 V	Time of Flight	1 ms
Deflector Plate	220 V	RF Amplitude	350 Vpp	DC Extract Bias	1 V	Frecuency	4 MHz
Funnel 1	150 V	Quadrupole		RF Frequency	2 MHz	RF Amplitude	350 Vpp
Skimmer 1	15.0 V	Q1 Mass	200 m/z	Colisión RF Amplitude	1200 Vpp	Gas Control (Enable)	
Funnel RF Amplitude	150 Vpp					Flow	30%

Tabla 9 Parámetros para obtención del espectrómetro de Masas.

Size	8M
Low m/z	42.99
High m/z	3000
Avg Scans	24
Acumm (s)	0.1 s

Nota. Muestra los parámetros de la obtención del espectrómetro de masas utilizados y configurados en el software del espectrómetro de masas en el apartado de Ion Transfer de un espectrómetro de masas de API Source de un espectrómetro de masas.

6. Con el objetivo de analizar y comparar los espectros de masas obtenidos, se llevó a cabo un proceso de mapeo de la firma isotópica de la molécula en cada muestra. Este análisis permitió identificar y cuantificar la presencia de la molécula de interés. El parámetro medido para evaluar la producción de la molécula fue el área del pico correspondiente a la relación masa carga (m/z) de 772.58. Durante el análisis, se observó claramente cómo el área del pico y la intensidad de la molécula aumentaban en función del tiempo.

7. Finalizada la extracción y el análisis de los datos, se procedió a realizar una comparativa de las muestras. Se graficó el área del pico en función del tiempo en días para cada muestra, lo cual permitió visualizar y analizar la producción de la molécula a lo largo del tiempo. Este análisis gráfico fue fundamental para identificar la cepa que mostró la mayor producción de la molécula y para observar cómo variaba la producción en el transcurso del experimento, ya sea disminuyendo, aumentando o manteniéndose estable. Estas gráficas comparativas proporcionaron información clave para la selección de la cepa más prometedora y el análisis de los factores que podrían influir en la producción de la molécula.

f) Evaluación de un nuevo crecimiento del primer hongo endófito activado según su temperatura.

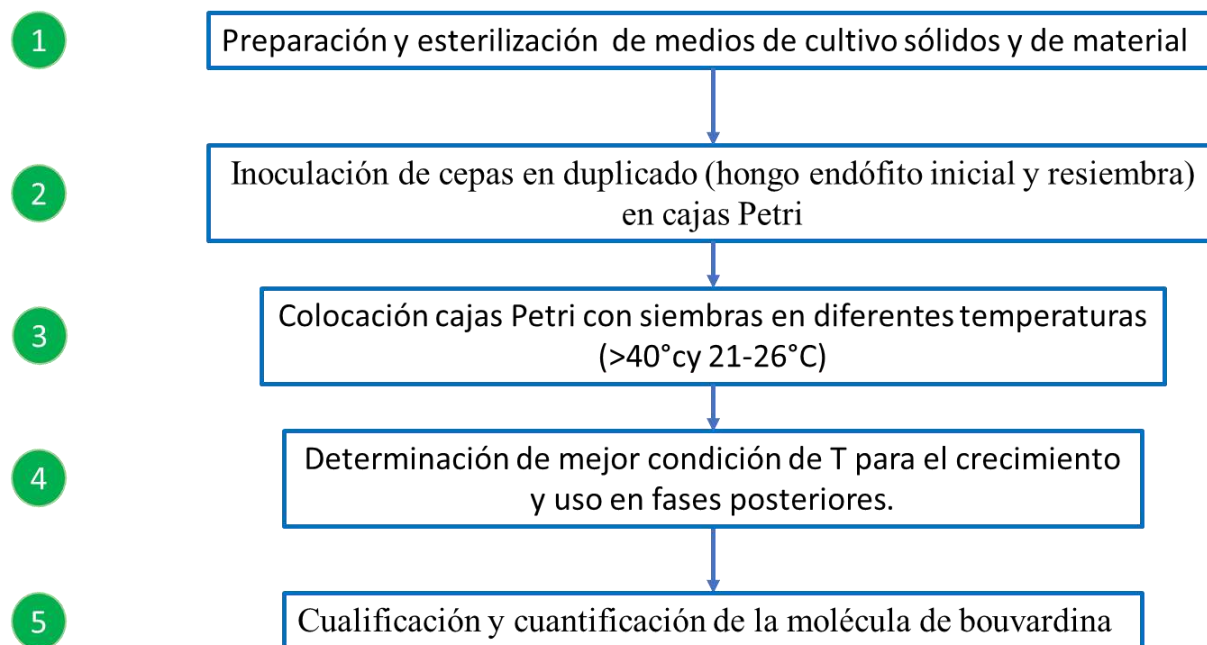
Tras la detección y cuantificación de bouvardina en distintos cultivos micológicos, se eligió la muestra con la mayor concentración de dicha molécula para asegurar una eficiencia máxima en las fases experimentales subsecuentes.

Debido a la observación de desecamiento del medio de cultivo en la placa de Petri original, almacenada en refrigeración por aproximadamente dos meses, se consideró imperativo evaluar la viabilidad del micelio fúngico para futuros subcultivos. Ante esta situación, se implementaron pruebas de resiembra del hongo en un medio de cultivo sólido fresco. Esta acción se orientó a preservar la integridad y funcionalidad biológica del micelio, garantizando la continuidad en la producción de bouvardina.

Se compararon dos fuentes de inóculo para determinar la más adecuada: una derivada de la placa de Petri original y otra tomada de las muestras iniciales conservadas en tubos de ensayo de investigaciones anteriores.

Finalmente, con el propósito de identificar las condiciones óptimas de crecimiento del hongo endófito, se realizaron ensayos comparativos en diferentes rangos de temperatura, incluyendo condiciones ambientales y temperaturas superiores. El objetivo subyacente fue discernir qué condiciones térmicas favorecen un crecimiento micelial más robusto y una producción eficiente de bouvardina. El diagrama simplificado de esta etapa se muestra en la Figura 30.

Figura 30 Diagrama de bloques del proceso general de la prueba de evaluación de un nuevo crecimiento del primer hongo endófito activado.



A continuación, se describen en detalle los pasos realizados:

1. En el marco de la preparación del medio de cultivo, se llevaron a cabo cálculos con el objetivo de obtener una cantidad de 80 ml de medio de cultivo. En cada caso, se requirió la incorporación de 2.4 gramos de Medio de Extracto de Malta (MEB) y 1.6 gramos de Agar para la solidificación del medio. Los componentes sólidos fueron meticulosamente disueltos en agua desionizada precalentada, facilitando de esta manera su solubilización hasta alcanzar el volumen necesario. Seguido se realizó la esterilización del material de laboratorio y del medio de cultivo preparado.
2. La inoculación de las cajas Petri se efectuó mediante el uso de un asa bacteriológica, tomando filamentos tanto de las cajas Petri almacenadas como del tubo de ensayo que contenía la muestra original, y dispersándolos sobre el medio de cultivo sólido. Esta siembra se realizó en cuatro medios de cultivo.

3. El período de crecimiento de los microorganismos a diferentes temperaturas consistió en colocar dos cajas de cultivo por temperatura: la primera a una temperatura de crecimiento aproximada de 40-45°C, y la segunda a temperatura ambiente, entre 21-26°C. El crecimiento fue monitoreado a lo largo de un período de 5 días.

4. Para el análisis cualitativo del crecimiento, tras el período de incubación de los microorganismos, se observaron las colonias formadas, teniendo en cuenta factores como color, tamaño y similitud con las cepas iniciales. Con base en esta observación, se determinó la cepa a sembrar en la siguiente fase.

5.- Se procedió a la preparación del medio de cultivo líquido, se realizaron meticulosas operaciones para obtener 60 ml de medio de cultivo. Se pesaron 1.8 gramos de Medio de Extracto de Malta (MEB) con una balanza analítica de alta precisión (OHAUS/Explorer), y el componente sólido se disolvió minuciosamente en agua desionizada precalentada hasta alcanzar el volumen requerido. Este medio se dividió en 2 tubos de ensayo de 25 ml cada uno, los cuales se mantuvieron en condiciones de esterilidad. La inoculación de los medios de cultivo líquidos se llevó a cabo mediante el uso de un asa bacteriológica, tomando filamentos de las cajas Petri del proceso anterior y colocándolos en el seno del líquido del medio de cultivo de cada tubo de ensayo, manteniendo un entorno estéril.

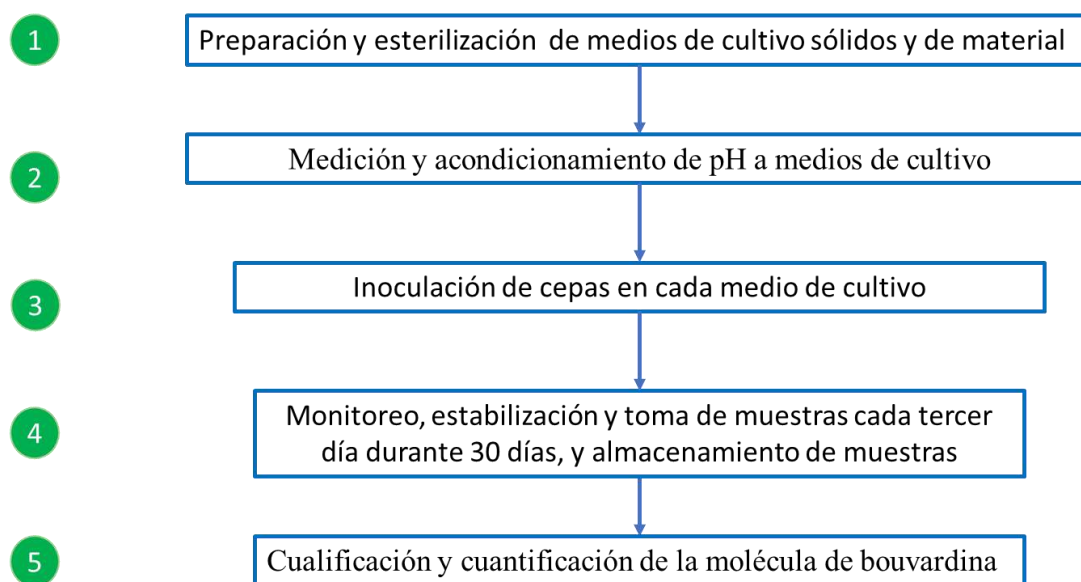
7. El período de crecimiento de los microorganismos tras la inoculación en los medios de cultivo líquidos se realizó bajo condiciones de agitación constante y temperatura ambiente, y se monitoreó durante un período de 7 días. Al concluir este período, se tomó una muestra de 1 ml de cada tubo.

8. La identificación de la producción de bouvardina se realizó siguiendo el procedimiento previamente mencionado en la sección de "e) Primer análisis de la producción de bouvardina mediante la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS"

g) Determinación de condiciones de control de pH adecuadas para maximizar la producción de bouvardina.

Posteriormente al hallar las condiciones adecuadas de temperatura, se procedió a realizar el estudio acerca de la determinación de condiciones de control de pH el hongo endófito y se produce la mayor cantidad de bouvardina. El objetivo de esta etapa fue estudiar la influencia del pH en la producción de bouvardina, el comportamiento de esta y sus posibles variaciones en el periodo del crecimiento de la cepa. El diagrama simplificado de esta etapa se muestra en la Figura 31.

Figura 31 Diagrama de bloques del proceso general de determinación de condiciones de control de pH óptimas para producción de bouvardina.



1. En relación con la preparación del medio de cultivo líquido, se llevaron a cabo operaciones con el propósito de obtener una cantidad precisa de 70 ml de medio de cultivo. Para ello, se procedió a la precisa medición de 2.1 gramos de Medio de Extracto de Malta (MEB) utilizando una balanza analítica de alta exactitud de la marca OHAUS/Explorer. Seguido se realizó la esterilización del material de laboratorio y del medio de cultivo preparado junto con los tubos de ensayo que serían utilizados como reactores a pequeña escala.

2. Posteriormente de la esterilización de los elementos necesarios, se dispusieron 20 ml de medio de cultivo en tres tubos de ensayo. En cada uno de ellos, se procedió a medir el pH utilizando un potenciómetro del modelo METROHM / 827 pH lab. A continuación, en uno de los tubos se ajustó el pH a un valor de 3 mediante la adición de ácido clorhídrico altamente diluido, mientras que, en los otros dos, uno de ellos se tomó la decisión de mantener el pH inicial del medio de cultivo durante todo el curso del experimento y el último de ellos se mantuvo sin control de pH.

3. La inoculación de los medios de cultivo líquidos se llevó a cabo mediante el empleo de un asa microbiológica, tomando filamentos de las cajas Petri utilizadas en el proceso anterior y depositándolos en el seno del líquido del medio de cultivo contenido en cada tubo de ensayo, manteniendo en todo momento un ambiente completamente estéril.

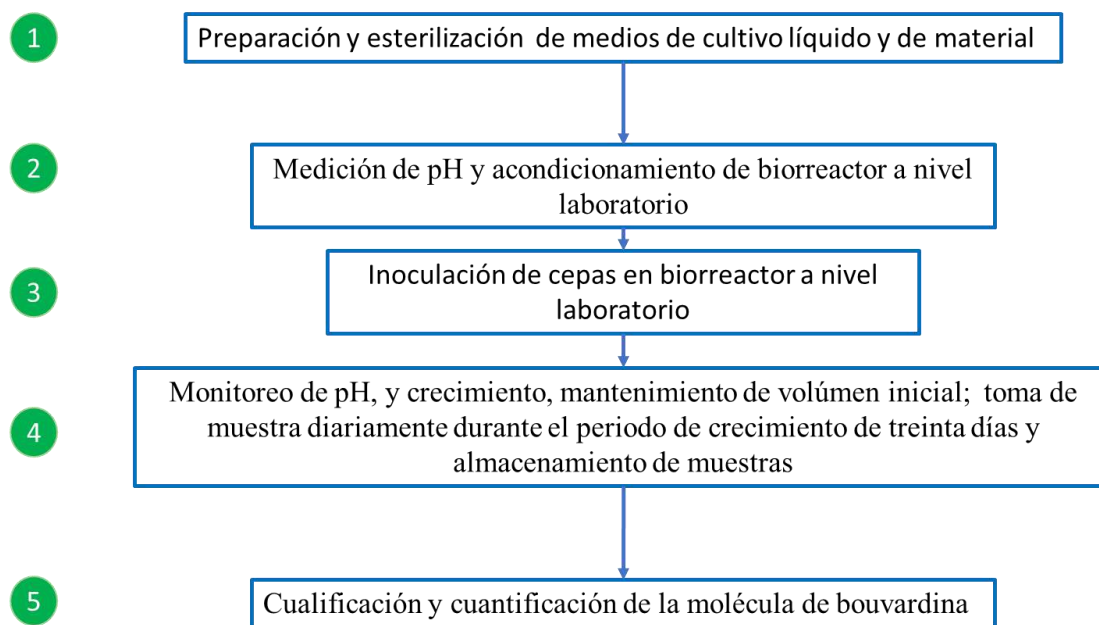
4. Se establecieron tres condiciones de control de pH. 1) Ácido, 2) pH inicial y 3) pH no controlado. El proceso de monitoreo del pH se realizó mediante mediciones diarias en cada uno de los medios inoculados, empleando el potenciómetro previamente calibrado. Si se detectaba un aumento en el pH con relación a los parámetros establecidos para cada experimento, se procedía a realizar ajustes mediante la adición de ácido clorhídrico altamente diluido. Por otro lado, si se observaba una disminución en el pH, se procedía a realizar ajustes mediante la adición de hidróxido de sodio altamente diluido, con el objetivo de mantener el pH dentro de los rangos de control establecidos inicialmente. Además, se tomaba una muestra de 1 ml de cada uno de los medios cada tercer día, y estas muestras se almacenaban en condiciones de congelación. Este procedimiento se llevó a cabo durante un período continuo de 30 días con el fin de evaluar el comportamiento de los medios de cultivo líquidos a lo largo del tiempo.

5. La identificación de la producción de bouvardina se realizó siguiendo el procedimiento previamente mencionado en la sección de "e) Primer análisis de la producción de bouvardina mediante la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS"

h) Evaluación de la producción de bouvardina en biorreactor a nivel laboratorio utilizando medio de cultivo económico.

Tras la identificación de la condición de control de pH óptima para la producción de bouvardina, se decidió evaluar la posibilidad de producir un medio de cultivo económico a partir de los compuestos principales del medio no económico (MEB). Esta decisión se tomó debido a que las materias primas esenciales para el crecimiento del hongo endófito no son económicamente favorables para la producción a gran escala en un biorreactor. El diagrama de flujo de proceso simplificado de esta etapa se muestra en la Figura 32.

Figura 32 Diagrama de bloques del proceso general de evaluación de producción de bouvardina en biorreactor a nivel laboratorio utilizando medio de cultivo económico.



1. En relación con la preparación del medio de cultivo líquido, se llevaron a cabo operaciones con el propósito de obtener una cantidad de 500 ml de medio de cultivo. Para ello a partir de la formulación del medio de cultivo previamente utilizado la cual proporcionaba información que estaba compuesta para cuando se preparaba un litro de solución el medio de cultivo resultante contenía 17g/L de extracto de malta y 3g/L de peptona micológica; se procedió a la precisa medición de 8.5 gramos de *Malta Comercial* utilizando una balanza analítica de alta exactitud de la marca OHAUS/Explorer y 1.5g de *Peptona comercial*. Los componentes sólidos fueron

disueltos en agua desionizada precalentada hasta alcanzar el volumen requerido. Posteriormente, se sometió el medio de cultivo a un proceso de esterilización, juntamente con el matraz Erlenmeyer que funcionaría como biorreactor a nivel laboratorio.

2. Se midió el pH del medio de cultivo resultante para compararlo con el pH del medio de cultivo previamente utilizado. El medio de cultivo se colocó en el biorreactor a nivel laboratorio y se ajustó la agitación y la temperatura a niveles moderados y ambientales (20-25°C), respectivamente.

3. Se inoculó el medio de cultivo con cepas del hongo micelial, tomadas tanto de los medios de cultivo sólido almacenados como de la muestra original proporcionada. Para ello, se utilizó un asa bacteriológica.

4. Se monitoreó el pH de los medios inoculados mediante mediciones diarias. Para ello, se utilizó un potenciómetro previamente calibrado. Además, se tomaron muestras de 1 ml del biorreactor a nivel laboratorio diariamente. Estas muestras se almacenaron en condiciones de congelación. Para mantener el volumen inicial del biorreactor piloto, se añadió 1 ml de medio de cultivo sin inocular para reponer el volumen de muestra tomado. Este procedimiento se llevó a cabo durante 30 días para evaluar el comportamiento del biorreactor piloto a lo largo del tiempo.

5. Se identificó la producción de bouvardina siguiendo el procedimiento previamente mencionado en la sección "e) Primer análisis de la producción de bouvardina mediante la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS".

i) Determinación de la constante de velocidad de producción de bouvardina.

Después de concluir las experimentaciones, se determinó de la constante de velocidad de producción de la molécula de interés utilizando los resultados del experimento más exitoso "Prueba de producción de bouvardina en medios de cultivo líquidos con y sin presencia de estándar de planta" que proporcionó datos apropiados para el cálculo. Para realizar dicho análisis cinético, se aplicaron los siguientes métodos matemáticos y modelos cinéticos, cuyos detalles se presentan en orden cronológico de acuerdo con los cálculos realizados.

1. A partir de la gráfica generada de la función área de pico versus días de producción de cada experimento, se llevaron a cabo la selección y eliminación cualitativa de datos que pudieran haber sido afectados por factores externos o que no fueran consistentes con valores cercanos.

2. Posteriormente debido a la ausencia de una curva de calibración se normalizaron las áreas de pico en forma de porcentaje de producción de bouvardina. Se procedió a promediar los valores próximos y construir una nueva curva de producción basada en estos datos ajustados, aplicando este procedimiento para cada uno de los procedimientos experimentales.

3. Los cálculos para la obtención de la constante de velocidad de producción de bouvardina se realizaron con base al método integral que se presenta en “*Elementos de Ingeniería de Las Reacciones Químicas*” Floger.S (2008).

Capítulo III. Resultados y Discusión

El cáncer es una enfermedad relacionada con el crecimiento anormal de las células. En el tratamiento de este padecimiento, se acude a varias vías, por ejemplo: (a) cirugía; (b) radioterapia; (c) quimioterapia; y (d) tratamiento con fármacos anticancerígenos para la cura, que como el caso del Taxol, metabolito que se extrae de árboles de unos cien años de *Taxus brevifolia*, cuya explotación está colocando a esta especie vegetal en una situación de riesgo de extinción.

La planta herbácea perenne mexicana *Bouvardia ternifolia*, se apunta como una riqueza genética mexicana por el interés farmacológico que representa al producir la molécula bouvardina en el tratamiento del cáncer. En esta sección de resultados se ofrece información sobre los hallazgos del constituyente bouvardina, molécula del metabolismo secundario, también conocidos como productos naturales.

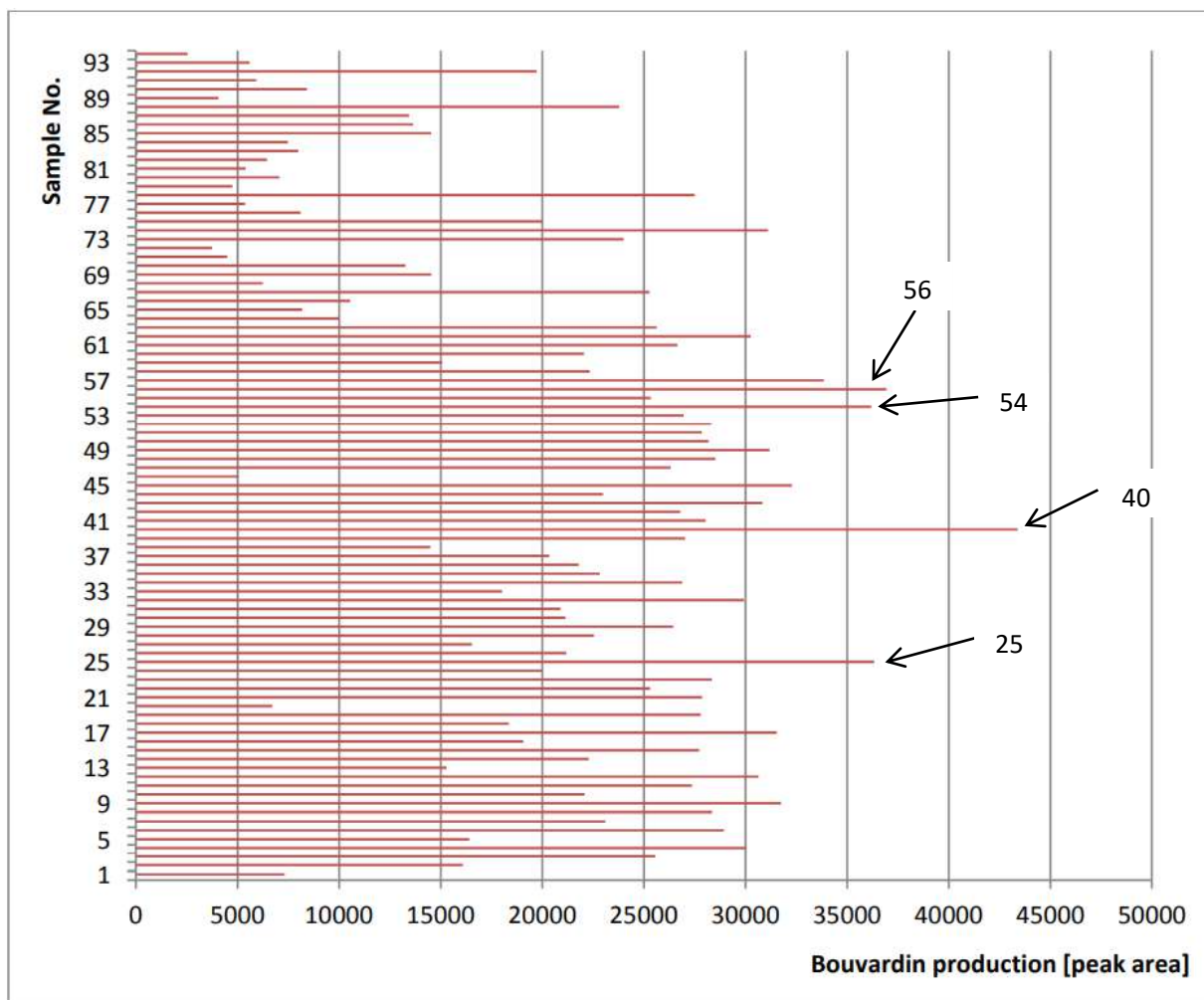
3.1 Identificación de muestras microbiológicas con potencial para la producción bouvardina a través de técnicas de cultivo y análisis molecular.

La elección del medio de cultivo y cepas utilizadas en la experimentación se debe a que durante el periodo comprendido entre noviembre de 2018 y mayo de 2019, se llevó a cabo un estudio de investigación por parte del INSTITUT FÜR CHEMIE-LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE por Mühlenweg et al., (2019) con el objetivo de analizar muestras de 94 tipos de hongos endófitos proporcionados por el Dr. Jaime García Mena, colaborador del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav en México. Este estudio tuvo como propósito principal explorar la capacidad de producción de bouvardina en dichas muestras y determinar qué medios de cultivo resultaban más efectivos para su obtención.

Para ello, se cultivaron los hongos endófitos en tres medios de producción diferentes: (1) Caldo de Papa Dextrosa (PDB) P6685; (2) Caldo de Extracto de Malta (MEB) 70146; y (3) Caldo de Dextrosa Sabouraud (SDB) S3306. Una vez finalizado el cultivo, se procedió a la extracción de los compuestos utilizando butanol como solvente, obteniendo un total de 282 extractos.

El análisis de estos extractos reveló que el Medio de Extracto de Malta (MEB) muestra una alta eficiencia en la producción de bouvardina. Todos los extractos obtenidos a partir de los medios de cultivo MEB, en las 94 muestras analizadas de hongos endófitos, evidenciaron la presencia de bouvardina. Además, se observaron diferencias significativas en los niveles de producción de esta molécula entre las distintas muestras estudiadas de los endófitos como se puede ver en la Figura 33.

Figura 33 Producción de bouvardina en los 94 extractos con Malt Extract Broth.



Nota. Esta gráfica justifica la toma de cepas para su análisis en la presente investigación. Obtenido de: Mühlenweg, A., Mösker, E., & Süßmuth, A. K. (2019). Project Description Status and Results Report. LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE.

Particularmente, se identificaron las muestras de los endófitos 25, 40, 54 y 56 como aquellas que presentaron los niveles más destacados de producción de bouvardina. Estos resultados, detallados en la Tabla 10, resaltan el potencial de estas muestras para desarrollar la producción de estos microorganismos y la obtención de altas cantidades de esta valiosa molécula.

Este estudio proporciona información relevante sobre la producción de bouvardina, y destaca la importancia de seleccionar adecuadamente los medios de cultivo en la búsqueda de una producción óptima de compuestos bioactivos.

Tabla 10 Muestras seleccionadas con mayor producción de bouvardina.

No de muestra.	Parte de la planta de la cual proviene el hongo	Área de pico utilizando medio de cultivo MEB (u.a)
25	Raíz	36332
40	Raíz	43386
54	Flor	36186
56	Flor	36948

Nota 1. Presenta las muestras seleccionadas con la mayor producción de bouvardina. Obtenido de: Mühlenweg, A., Mösker, E., & Süßmuth, A. K. (2019). Project Description Status and Results Report. LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE.

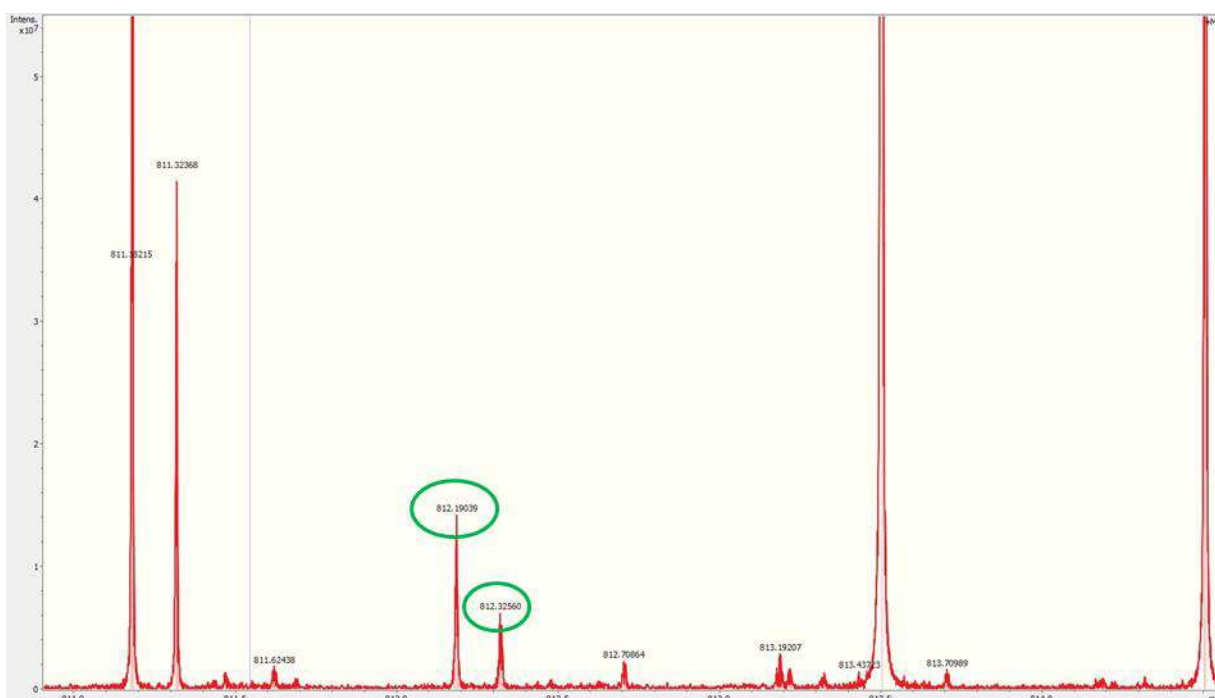
Nota 2. Área de Pico: La integración del pico sobre el eje de m/z da como resultado el área del pico. Esta área es proporcional a la cantidad de ese ion en la muestra. Cuanto mayor sea el área del pico, mayor será la cantidad del ion correspondiente.

3.2 Identificación de bouvardina en extracto alcohólico.

La aplicación de la espectrometría de masas por resonancia ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FTICR MS) fue la herramienta que realizó la identificación de la molécula bouvardina.

A partir del análisis de la firma isotópica del aducto M+K y del espectro de masas derivado del extracto alcohólico (véase la Figura 34) de la planta *Bouvardia ternifolia*, se logró la identificación inequívoca de la molécula bouvardina, cuya presencia se confirma por la relación masa/carga (m/z) de 811.32. Este resultado constituye un marcador distintivo que respalda la presencia específica de bouvardina en el mencionado extracto, siguiendo la firma isotópica que se encuentra en el Anexo A. La Figura 34 muestra la identificación de bouvardina extraído de manera inicial de la planta herbácea perenne medicinal mexicana *Bouvardia ternifolia*. Este hallazgo confirma lo reportado en el trabajo fitoquímico de Robert et al., (1976), donde se identificaron los hexapéptidos cíclicos bouvardin y deoxibouvardin, ambos con actividad antitumoral presentes en esta planta medicinal. Además, esta etapa demuestra que la planta *Bouvardia ternifolia*, utilizada tradicionalmente como remedio para la picadura de alacrán, es productora de la molécula bouvardina.

Figura 34 Espectro de masas del extracto alcohólico de *Bouvardia ternifolia*.



Nota. La firma isotópica del aducto M+K se puede notar en los picos de m/z de 812.19039 y 812.3260 confirmando la presencia de la molécula.

La bouvardina se ha reportado como un agente antitumoral, siendo valiosa para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Zalacain et al., (1982) documentaron que la planta mexicana *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae) ha sido utilizada desde la época prehispánica como medicinal tradicional para tratar enfermedades como la disentería. En años recientes, se ha confirmado que la bouvardina contenida en esta planta es capaz de ralentizar y detener el crecimiento de células cancerígenas gracias a sus propiedades antitumorales y antioxidantes. Este hallazgo es respaldado por un estudio de la Universidad de Arizona en 1977, que analizó la bouvardina y la deoxibouvardina en su estado natural, observando una citotoxicidad significativa en pruebas de cultivos celulares. Estos resultados son notables, ya que estas sustancias son los primeros hexapéptidos cíclicos en mostrar actividad antitumoral, según lo reportado por Jolad et al., (1977).

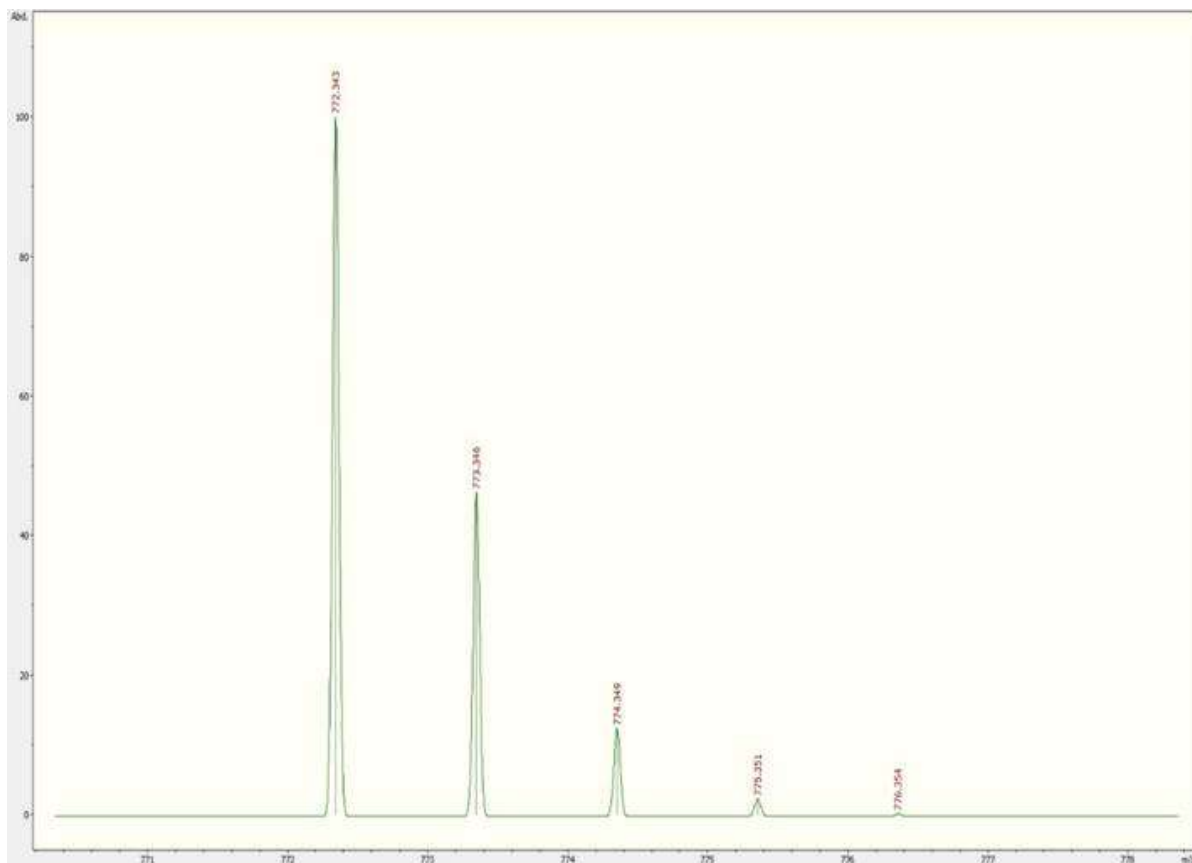
Este paso, permitió validar que el espectrómetro de masas es capaz de identificar de la molécula bouvardina.

3.3 Prueba de producción de bouvardina en medios de cultivo líquidos con y sin presencia de estándar de planta.

La identificación de este metabolito secundario en la planta medicinal conocida como trompetilla, advierte del riesgo que le puede ocurrir a esta hierba silvestre que se encuentra en el Altiplano Mexicano, la extracción desmedida de las poblaciones naturales degradará los sitios donde se reproduce. Entonces es importante conocer si la microbiología endófito de *Bouvardia ternifolia* es capaz de producir estos compuestos bioactivos como bouvardina, por ello a continuación se presentan los resultados obtenidos de bouvardina por la microbiología endófito. En la Tabla 10 la producción por los hongos endófitos de bouvardina sin presencia de estándar de planta se identifica con Fi-j, mientras que las producciones con estándar de planta se describen como FPi-j.

Con base en la firma isotópica de la molécula del aducto M (Ver Figura 35) y los espectros de masas derivados de las muestras obtenidas durante la experimentación en el periodo de tiempo especificado, se puede discernir un aumento en la concentración de bouvardina al realizar las mediciones en la relación masa/carga de 772.58. Esta observación se sustenta en los datos recopilados y analizados durante la experimentación de producción de bouvardina en medios de cultivo líquidos con y sin presencia de estándar de planta descrita en el Capítulo II (inciso d y e), y analizados, los cuales se presentan de manera detallada en la Tabla 11, la Figura 36 y 37 adjuntas, proporcionando resultados significativos que respaldan la variación en la concentración de bouvardina a lo largo del periodo experimental.

Figura 35 Firma isotópica aducto M bouvardina.

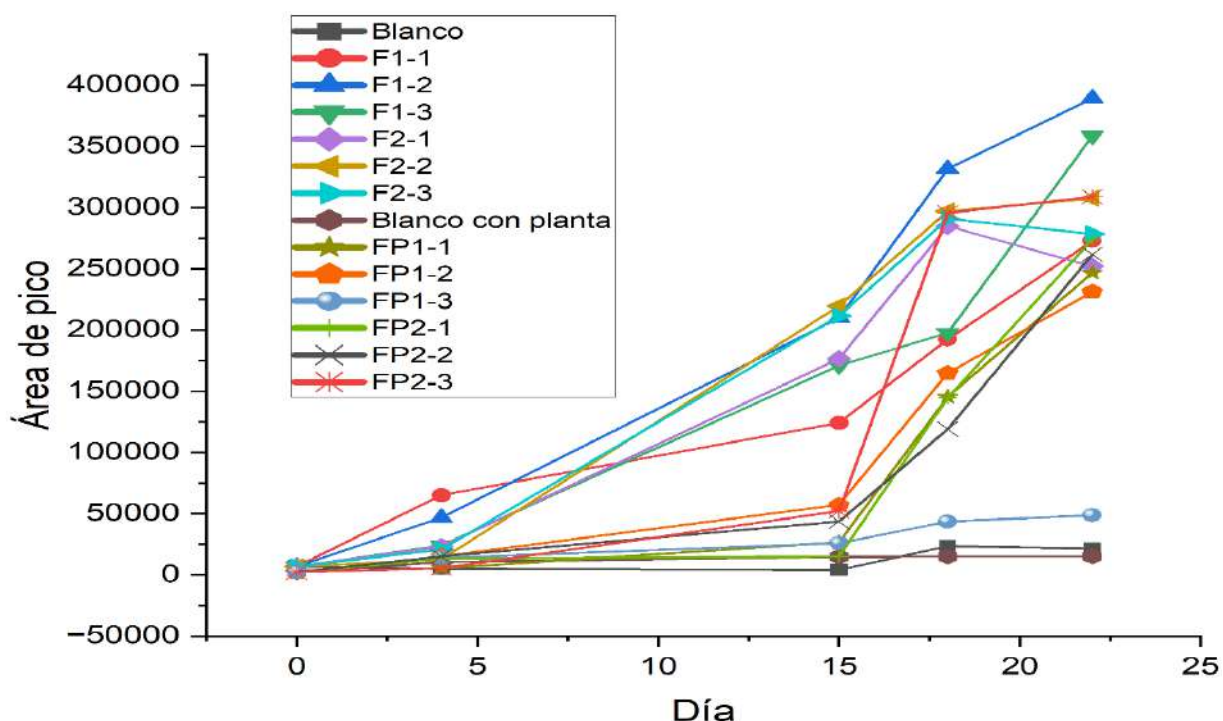


Nota. La firma isotópica del aducto M fue utilizada como base para identificar la presencia de la molécula bouvardina en los análisis realizados en el espectrómetro de masas.

Tabla 11 Valores medidos de áreas de pico de cada muestra a lo largo del tiempo durante la experimentación prueba de producción de bouvardina en medios de cultivo líquidos con y sin presencia de estándar de planta.

fecha	dia	MUESTRAS SIN ESTÁNDAR LIOFILIZADO DE LA PLANTA							MUESTRAS CON ESTÁNDAR LIOFILIZADO DE LA PLANTA						
		Blanco	F1-1	F1-2	F1-3	F2-1	F2-2	F2-3	Blanco	FP1-1	FP1-2	FP1-3	FP2-1	FP2-2	FP2-3
		ÁREA DE PICO													
29/09/22	0	6,605	6,605	6,605	6,605	6,605	6,605	6,605	2,124	2,124	2,124	2,124	2,124	2,124	2,124
10/03/2022	4	4,883	64,926	46,608	23,856	23,139	12,447	20,678	10,542	5,406	15,084	13,776	13,050	14,952	5,325
14/10/22	15	4,033	124,112	209,803	170,802	176,580	219,625	211,500	14,851	26,493	57,151	25,743	15,050	43,580	52,216
17/10/22	18	23,379	192,363	331,577	197,549	284,855	297,000	290,927	14,953	145,238	164,783	43,355	144,588	118,985	295,647
21/10/22	22	21,478	272,915	389,276	358,585	251,815	307,558	278,493	14,997	246,649	231,221	48,659	274,126	261,736	308,853

Figura 36 Gráfica comparativa de producción de bouvardina de cada muestra comparando área de pico contra el tiempo.



Nota. El área de pico es una medida de la cantidad de iones presentes en ese pico particular. Es útil para cuantificar la cantidad de un analito presente en una muestra, ya que la altura o la intensidad del pico está relacionada con la concentración del compuesto en la muestra.

Los resultados obtenidos, permiten afirmar que las cepas identificadas con la nomenclatura Fi-j, que no contienen en el medio de cultivo estándar liofilizado de planta, son capaces de producir la molécula de manera similar a aquellas que sí lo tienen, identificadas con la nomenclatura FPi-j. De esta manera, se deduce que el hongo endófito es capaz de sintetizar bouvardina, independientemente de la presencia del mencionado medio de cultivo liofilizado de planta. Los endófitos asociados a la planta medicinal *Bouvardia ternifolia* producen metabolitos secundarios, que según lo revelan los resultados, uno de ellos es la molécula bouvardina.

Según Chandra, H. et al., (2024) en el artículo “Fungal endophytes from medicinal plants acting as natural therapeutic reservoir” los hongos endófitos establecen relaciones simbióticas con las plantas huésped, residiendo dentro de los tejidos vegetales sin causarles daño. Estos hongos

desempeñan un papel crucial en la salud y los mecanismos de defensa de las plantas al producir compuestos bioactivos conocidos como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que no intervienen directamente en el crecimiento, desarrollo o reproducción del organismo, pero que a menudo tienen importantes funciones ecológicas, como la defensa frente a patógenos o competidores. La producción de metabolitos secundarios por hongos endófitos implica complejas vías bioquímicas. Estas vías están reguladas por genes específicos que codifican enzimas responsables de la síntesis de compuestos bioactivos. La síntesis de metabolitos secundarios depende de varios factores, como la composición genética de los hongos, las condiciones ambientales y las interacciones con la planta huésped.

Los intrincados procesos bioquímicos de los hongos endófitos conducen a la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios con posibles propiedades terapéuticas. Estos compuestos bioactivos pueden presentar actividades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas e inmunosupresoras, entre otras.

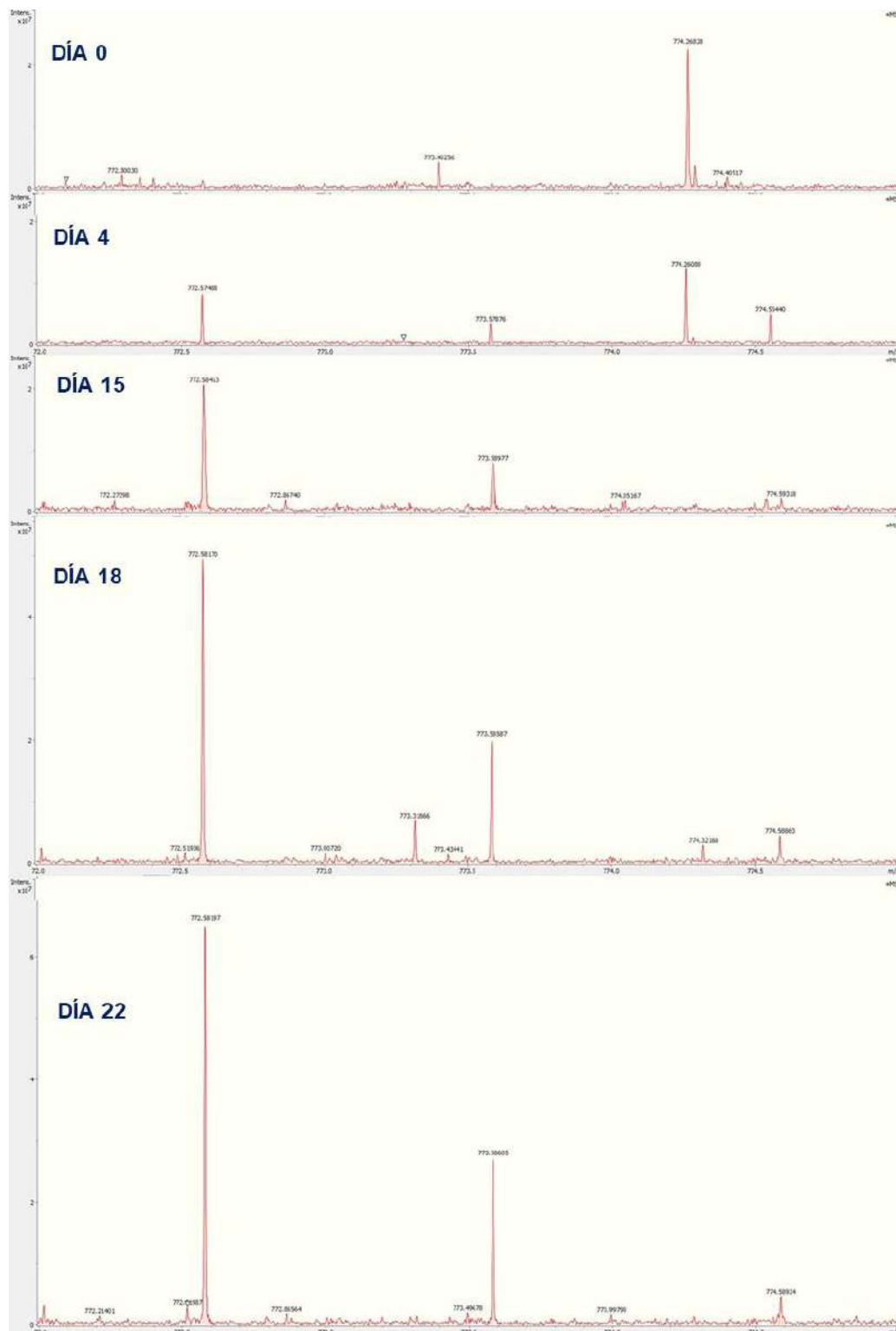
Estos resultados ponen de relieve que seguramente en el estudio de los fármacos de origen vegetal se debiera trabajar en el estudio científico de plantas medicinales conocidas que son utilizadas por los médicos tradicionales en la herbolaria mexicana, puede ser un método apropiado para descubrir la microbiología endófito y productora de fármacos potenciales.

La visualización de la producción de la molécula se lleva a cabo mediante el análisis de la intensidad de los picos en la relación masa/carga a lo largo de los 22 días de esta experimentación. Con base a los resultados obtenidos, se puede asegurar que el cultivo sin estándar liofilizado de la *Bouvardia ternifolia* beneficia a la producción de bouvardina, dado que mientras estas cepas tuvieron un promedio de área de pico igual a 309,744 u.a, las cepas con estándar contaron con un promedio igual a 228,541 u.a.

En específico el triplicado que presentó mayor área de pico fue el proveniente de la cepa F1, dado que los puntos de área más altos provinieron de las muestras F1-2 y F1-3 con 389,276 u.a y 358,585 u.a respectivamente. El análisis de la muestra F1-2 la cual obtuvo una mayor producción de bouvardina se puede ver en la Figura 37.

Este hallazgo respalda la selección de la cepa F1 para futuras inoculaciones, considerando su capacidad sobresaliente en la síntesis de la mencionada molécula.

Figura 37 Crecimiento de intensidad de pico cepa F1-2 en aducto M.

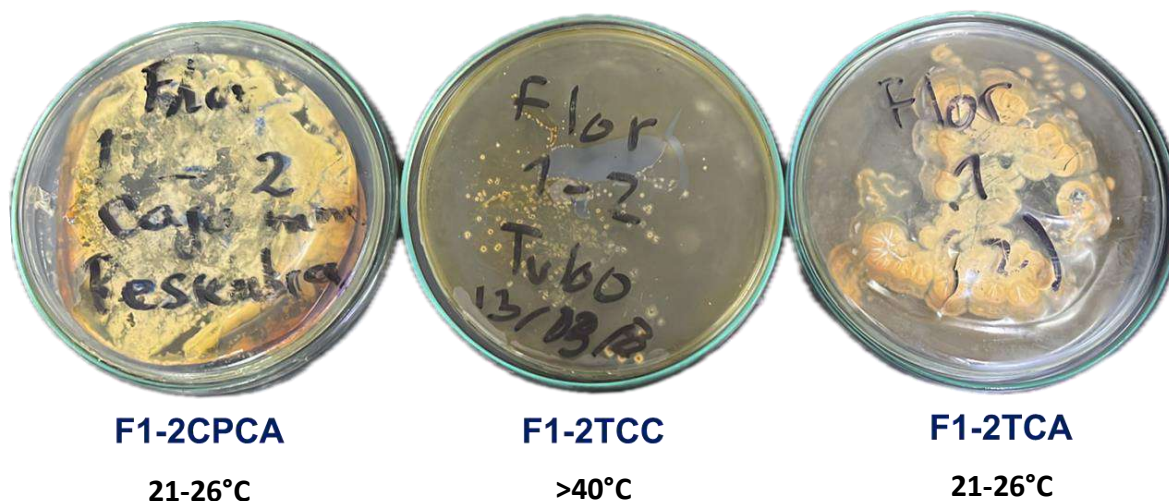


3.4 Prueba de resiembra de hongo endófito.

La producción de metabolitos secundarios a partir del aislamiento de los hongos endófitos es valiosa, por ello se debe conocer el comportamiento de la producción en función de la temperatura, eso es lo que trata esta sección de resultados.

Los resultados cualitativos indicaron que, en los medios de cultivo sometidos a condiciones de temperatura ambiente, se evidenció un incremento notable en el crecimiento de los hongos endófitos en comparación con aquellos mantenidos a temperaturas superiores a 40° C. Este fenómeno se ilustra en la Figura 38, donde se presentan las muestras F1-2CPCA y F1-2TCA, correspondientes a la prueba realizada a temperatura ambiente, contrastadas con la muestra F1-2TCC, que representa las condiciones de crecimiento a temperaturas superiores a 40° C.

Figura 38 Comparativa de crecimiento de los hongos endófitos de las distintas cepas a diferentes condiciones de temperatura.



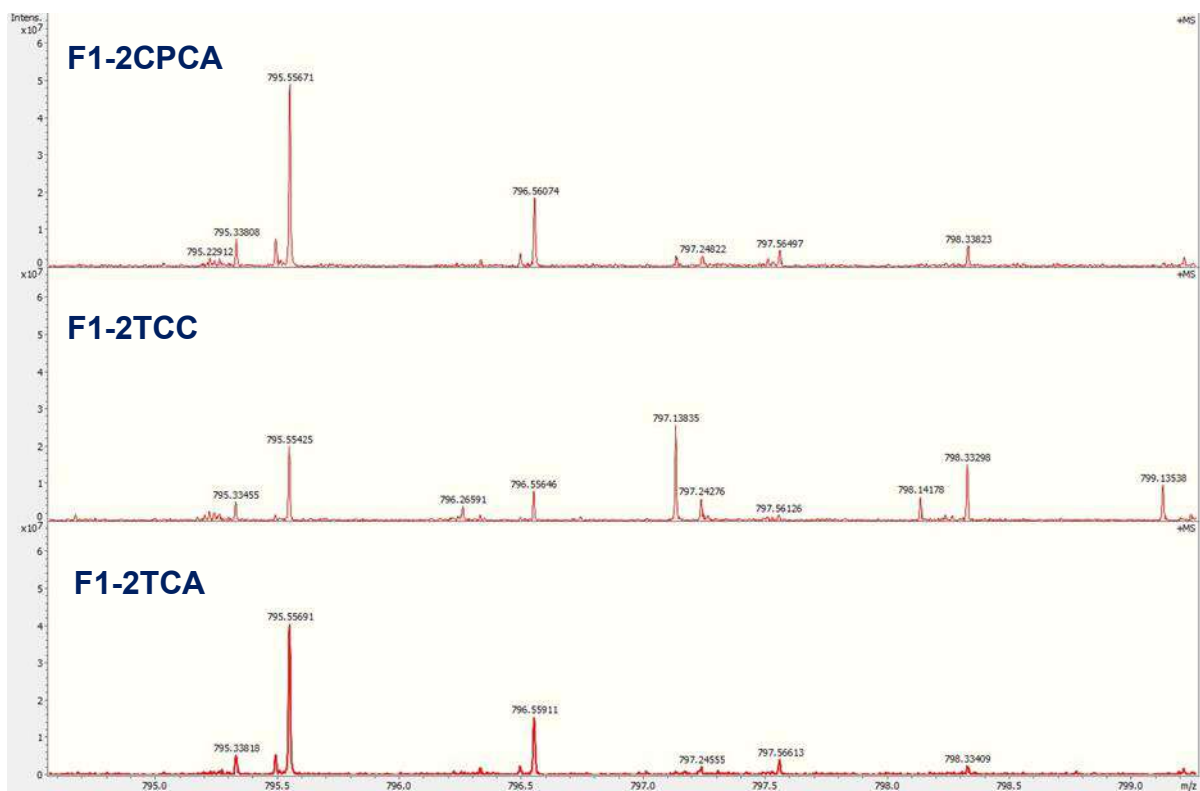
Nota. F1-2CPCA y F1-2TCA (muestras con incubación a temperatura ambiente) y F1-2TCC (muestra con incubación a temperatura superior a 40°C).

Los resultados de las mediciones de las muestras derivadas del crecimiento en medio de cultivo líquido, obtenidas posterior al tiempo de inoculación establecido según lo descrito en el Capítulo

II, f) Evaluación de un nuevo crecimiento del primer hongo endófito activado según su temperatura, fortalecen la hipótesis de que tanto el crecimiento del hongo como la producción de la molécula se manifiestan de manera más eficiente a temperaturas en un rango de 20-25°C. Este fenómeno se ilustra en la Figura 39, donde se ha llevado a cabo una comparativa utilizando el aducto M+Na de acuerdo con su firma isotópica mostrada en el Anexo C.

La figura evidencia que las muestras F1-2CPCA y F1-2TCA muestran una intensidad de pico mayor en comparación con la muestra F1-2TCC, lo que representa una mayor abundancia de la molécula bouvardina en las muestras F1-2CPCA y F1-2TCA. Esto respalda la importancia de la temperatura en el rendimiento de estas variables en el contexto del estudio.

Figura 39 Espectros de masas comparativos de la abundancia de la molécula bouvardina con crecimiento de cepas en medios de cultivo sólido de las distintas cepas a diferentes condiciones de temperatura.



3.5 Determinación de condiciones de control de pH adecuadas para maximizar la producción de bouvardina.

El pH es un factor que influye sobre el crecimiento de los microorganismos. En esta sección se describe el comportamiento encontrado.

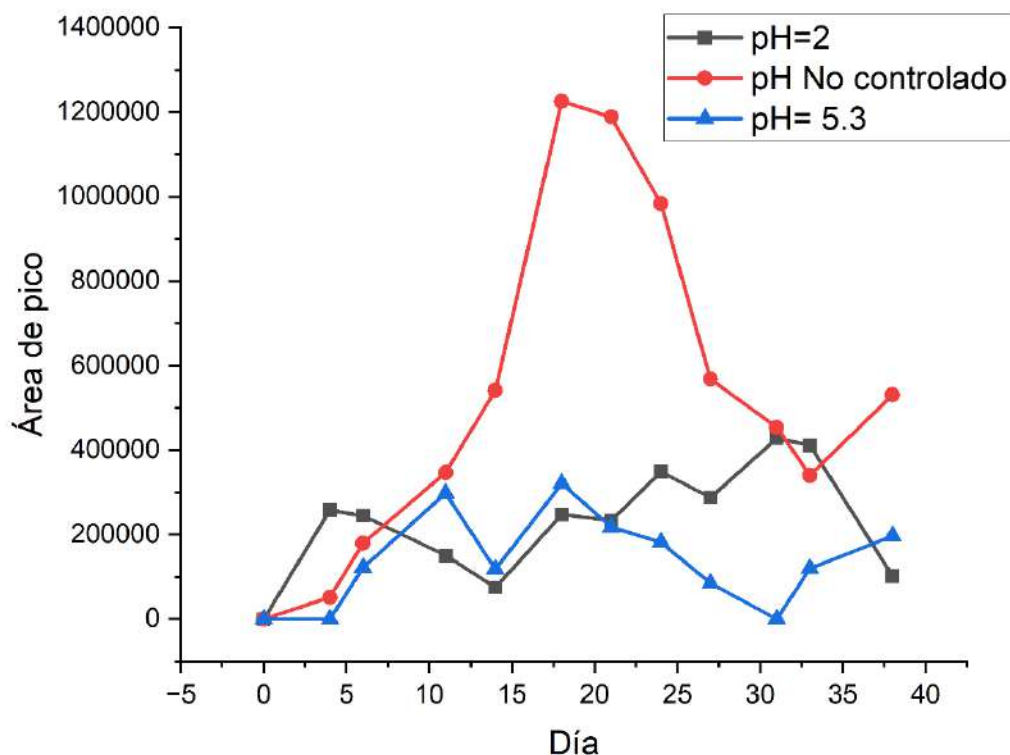
Los resultados de las mediciones de las áreas de pico en el aducto M de la molécula de interés en los espectros de masas obtenidos de esta experimentación a lo largo del tiempo de crecimiento, se muestran en el Anexo D.

Como se observa en la Figura 40, destaca que el control de pH que exhibe la mayor presencia de bouvardina corresponde al medio de cultivo en el cual no se controló el pH en ningún momento de la experimentación. En este medio, evidencia un crecimiento exponencial con una producción máxima alrededor del día 18. Los detalles de las mediciones se pueden observar en la Tabla 12. En contraste con los experimentos en los cuales se mantuvo el pH constante, ya sea a pH=2 o pH=5.3, donde se observa que la producción de la molécula es de manera irregular y sin un comportamiento característico. Esta discrepancia sugiere una influencia no significativa del control pH en la producción de la molécula de bouvardina, para maximizar la síntesis de esta.

Tabla 12 Valores medidos de áreas de pico de cada muestra a lo largo del tiempo durante la experimentación “Determinación de condiciones de control de pH adecuadas para maximizar la producción de bouvardina”.

Día	Fecha	Área de Pico (u.a)		
		pH=2	No Controlado	pH = 5.3 (inicial)
0	28-abr	0	0	0
4	02-may	257611	51427	0
6	04-may	244754	179907	122030
11	09-may	150822	346959	297779
14	12-may	74704	541297	117548
18	16-may	247779	1225387	320495
21	19-may	233186	1188424	217947
24	22-may	348731	983072	181638
27	25-may	288013	567935	84580
31	29-may	427944	453828	0
33	31-may	411512	340163	120060
38	05-jun	101559	530806	196700

Figura 40 Gráfica comparativa de producción de bouvardina de cada muestra comparando área de pico contra el tiempo a distintos pH.



El área de pico de la muestra que no tuvo un control de pH muestra un punto máximo de producción de bouvardina el día 18, posterior a ese día se observa un decremento de la presencia de la molécula de interés. Lo anterior puede deberse a diferentes factores entre ellos, la posible reacción de la molécula con otros compuestos que se desconocen presentes en el medio

3.6 Evaluación de la producción de bouvardina en biorreactor a nivel laboratorio utilizando medio de cultivo económico.

La evaluación de una alternativa de producción más económica de bouvardina es importante ya que, en el contexto en el que se planea usar esta molécula como una alternativa para el tratamiento de enfermedades, principalmente para el cáncer, es un deber humanitario buscar que la producción a gran escala permita que el fármaco sea lo más accesible posible.

Tras la conclusión del periodo de monitoreo y muestreo durante el crecimiento de 30 días, se llevó a cabo la medición de producción de bouvardina de cada una de las muestras. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los espectros de masas derivados de esta experimentación

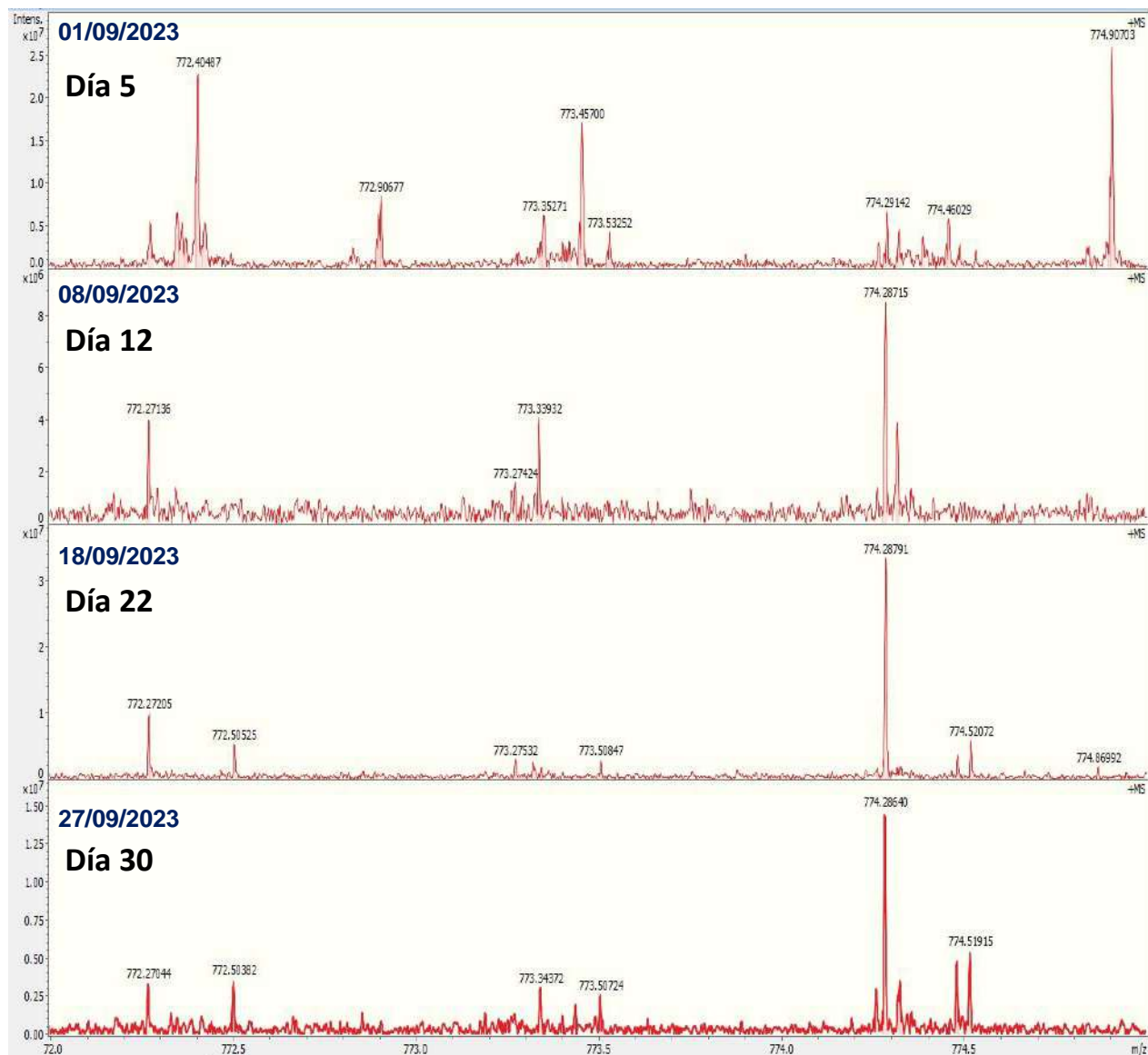
(Ver Tabla 13, Figura 41, 42 y 43) arrojaron hallazgos negativos. En ninguna de las firmas isotópicas consideradas, que incluyen las configuraciones M, M+K y M+Na se logró identificar la presencia de la molécula de interés, las condiciones de temperatura, concentración, volumen del biorreactor, y condiciones de crecimiento se pueden observar en la Tabla 13, esta información pretende ser un antecesor para intentos de una búsqueda de producción de bouvardina en un medio económico posterior.

Tabla 13 Datos de biorreactor a nivel laboratorio.

Datos Biorreactor		
Volumen	500 mL	
Tiempo de experimentación	30 días	
Temperatura	20-25 °C	
Cepa inoculada	F1	
Control de pH	no se controló el pH	

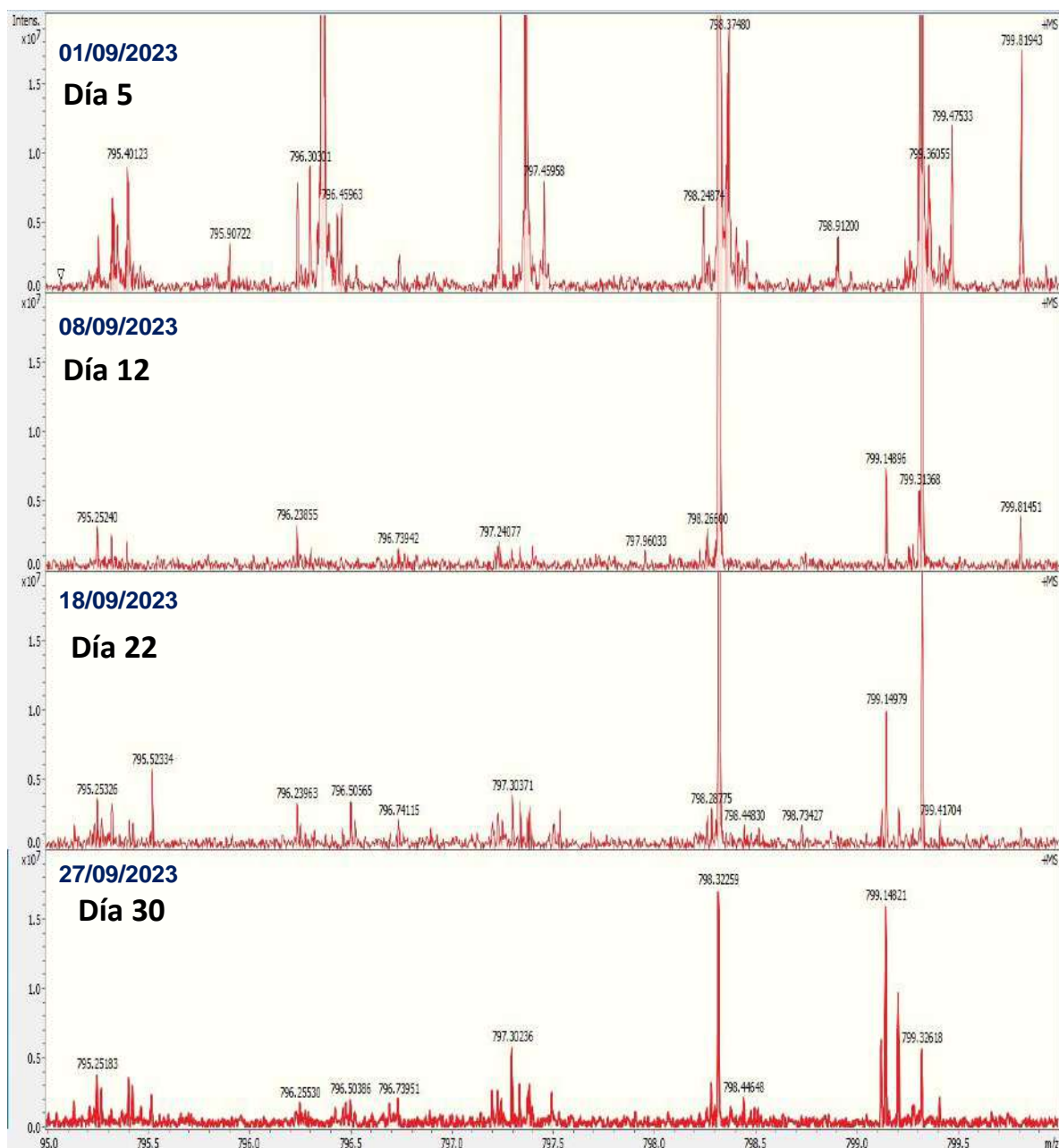
Reactivo	masa (g)	concentración (g/L)
Extracto de malta comercial	8.5	17.5
Peptona comercial	1.5	3

Figura 41 Espectro de masas en el rango de 772-775 m/z para identificación del aducto M.



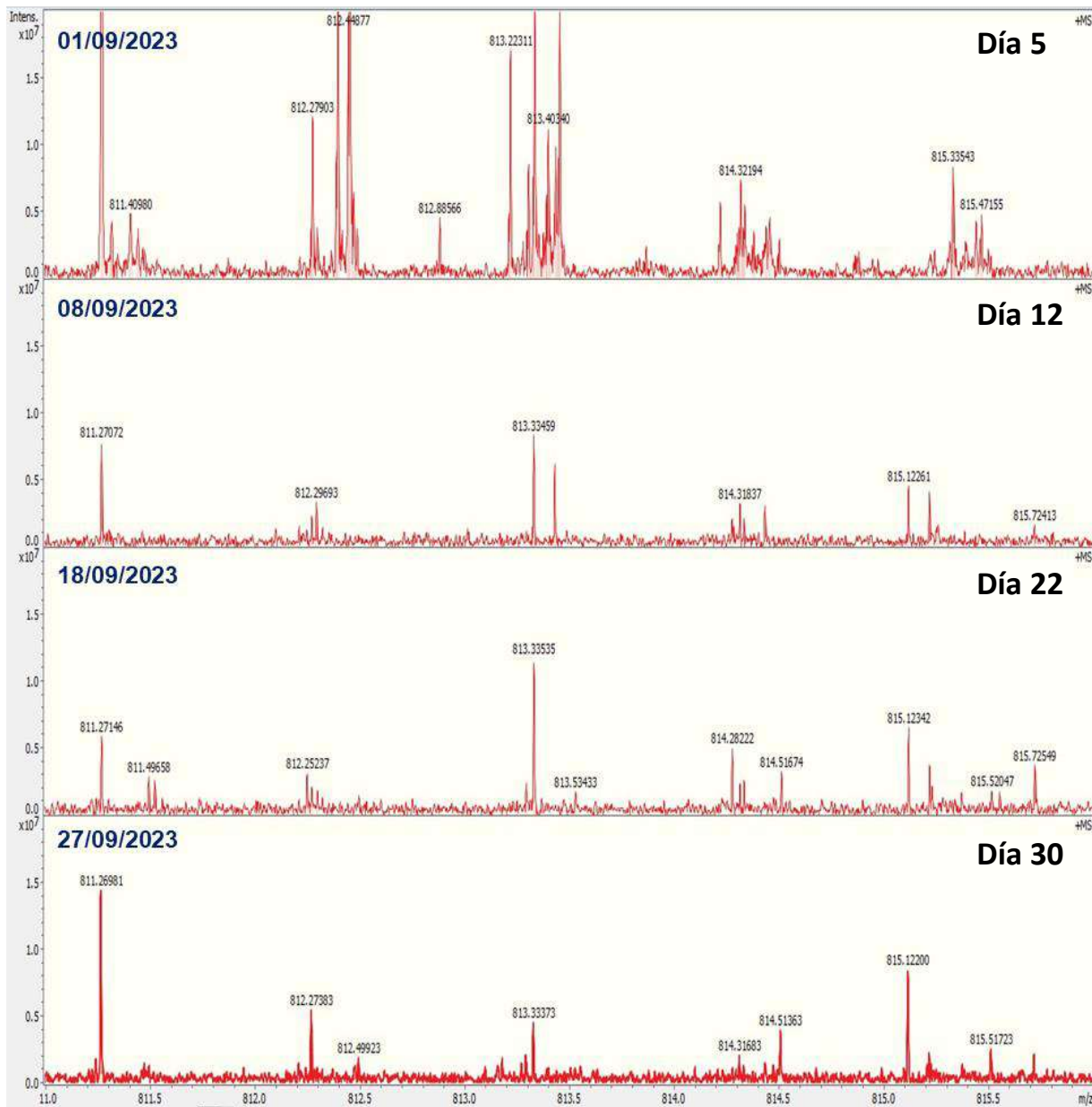
Nota. Se observa ausencia de molécula de bouvardina en evaluación de producción en medio de cultivo económico en el aducto M.

Figura 42 Espectros de masas en el rango de 795-800 m/z para identificación del aducto M+Na.



Nota. Se observa ausencia de molécula de bouvardina en evaluación de producción en medio de cultivo económico en el aducto M+Na.

Figura 43 Espectros de masas en el rango de 810-817 m/z para identificación del aducto M+K.



Nota. Se observa ausencia de molécula de bouvardina en evaluación de producción en medio de cultivo económico en el aducto M+K.

3.7 Determinación de constante de velocidad de producción de bouvardina.

Conocer la cinética de una reacción en la producción de un metabolito secundario a partir de microorganismos es crucial, ya que permite optimizar las condiciones del proceso para maximizar la producción. Al entender la velocidad y los factores que afectan la reacción, como la concentración de sustratos, temperatura y pH, se pueden diseñar bioprocesos más eficientes y económicos. Además, este conocimiento facilita el escalado industrial, asegurando que la calidad y cantidad del metabolito se mantengan constantes, lo cual es vital para aplicaciones farmacéuticas.

En el bioproceso que nos ocupa, se incorporaron reactivos como parte de los nutrientes que el hongo endófito ocupa para su crecimiento, los microorganismos necesitan una fuente de carbono, una fuente de energía, de nitrógeno, macro y micronutrientes, O₂, entre otros. El proceso biológico permitió que sucedieran reacciones bioquímicas propias del metabolismo microbiano. Esta sección da cuenta del comportamiento de la cepa del hongo endófito en relación con la producción de metabolitos secundarios.

Lo anterior llevó a la determinación de la constante de velocidad de producción de bouvardina, se emplearon los resultados derivados de la experimentación detallada en el apartado " Prueba de producción de bouvardina en medios de cultivo líquidos con y sin presencia de estándar de planta ". La secuencia de cálculos realizada se encuentra detallada en el Capítulo III, proporcionando una visión detallada del proceso analítico llevado a cabo.

En ingeniería de procesos se acude a modelos matemáticos empíricos, los cuales se construyen a partir de la experimentación y registros de las observaciones, con dichos datos experimentales y con el apoyo de las matemáticas se obtienen ecuaciones, proceso que se describe a continuación.

Con base a los datos obtenidos de la experimentación “ Estudio de la producción de bouvardina por las cepas seleccionadas en medios líquidos, con y sin aditivo de planta medicinal *Bouavardia ternifolia*” y “Primer análisis de la producción de bouvardina mediante la técnica de FIA-ESI-FT-ICR-MS” detallados en el Capítulo II se obtuvieron los valores de producción

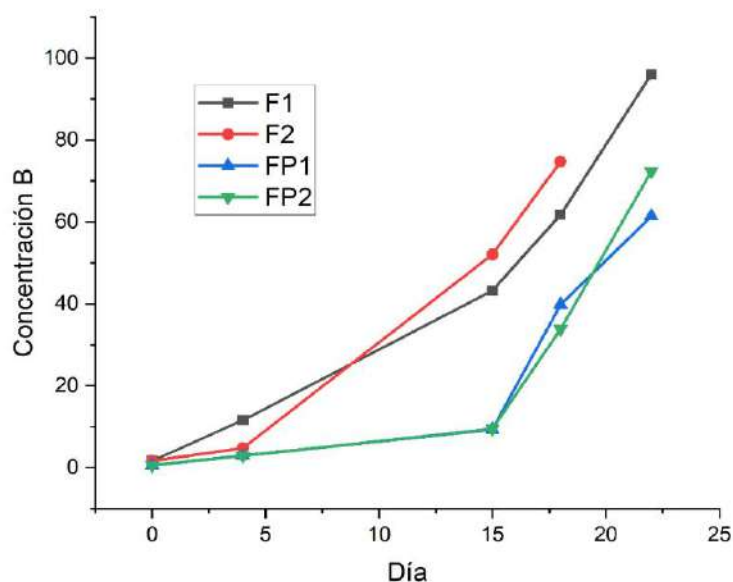
de bouvardina de acuerdo al área de pico presentada en $m/z=772.58$ de cada una de las muestras tomadas en las distintas fechas del experimento. (Véase Tabla 11).

Posteriormente se ajustaron las concentraciones en porcentaje de producción de bouvardina tomando en cuenta como el 100 por ciento el mayor valor de área de pico obtenido en la experimentación (389,276 u.a) como se puede observar en la Tabla 14. Para esto se promediaron los valores de los triplicados de cada cepa generando así una nueva curva de producción ajustada para cada una de ellas como se puede observar en la Figura 44.

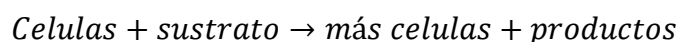
Tabla 14 Resultados de concentraciones normalizadas (0-100%).

CONCENTRACIONES NORMALIZADAS (%)																		
SIN PLANTA										CON PLANTA								
Día	Blank	F1-1	F1-2	F1-3	Prom F1	F2-1	F2-2	F2-3	Promedio F2	Blank w plant	FP1-1	FP1-2	FP1-3	Prom FP1	FP2-1	FP2-2	FP2-3	Prom FP2
0	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
4	1.25	16.68	11.97	6.13	11.59	5.94	3.20	5.31	4.82	2.71	1.39	3.87	3.54	2.93	3.35	3.84	1.37	2.85
15	1.04	31.88	53.90	43.88	43.22	45.36	56.42	54.33	52.04	3.82	6.81	14.68	6.61	9.37	3.87	11.20	13.41	9.49
18	6.01	49.42	85.18	50.75	61.78	73.18	76.30	74.74	74.74	3.84	37.31	42.33		39.82	37.14	30.57		33.85
22	5.52		100.00	92.12	96.06	64.69	79.01	71.54		3.85	63.36	59.40		61.38	70.42	67.24	79.34	72.33

Figura 44 Gráfica de producción de bouvardina de cada cepa ajustada.



De acuerdo con Floger.S. (2008) los procesos en biorreactores se llevan a cabo de la siguiente manera.



Los productos que se generan pueden hacer referencia a los metabolitos producidos por los microorganismos; que, en este caso, se trata de la bouvardina.

La expresión más utilizada para representar este tipo de fenómenos es la ecuación de Monod para el crecimiento exponencial de microorganismos, que es la siguiente:

$$r_g = \mu C_c \quad (1)$$

Donde:

r_g = velocidad de crecimiento de la célula [=] g/dm³ s

C_c = concentración de las células [=] g/dm³

μ = velocidad de crecimiento específico [=] s⁻¹

Con base a esta información se plantea ajustar la ecuación (1) en términos del producto y para efectos de esta experimentación la ecuación quedaría de la siguiente manera

$$r_B = K_{observada} C_B \quad (2)$$

Donde:

r_B = velocidad de producción de bouvardina [=] u.n/día

C_B = concentración de la bouvardina [=] u.n

$K_{observada}$ = constante de velocidad de producción de bouvardina observada [=] días⁻¹

Para determinar la constante de velocidad de producción de bouvardina. con base a la ecuación (2) se puede observar que la reacción de los procesos en los biorreactores es de orden uno (n=1)

para ello se realizan los siguientes procesos algebraicos para obtener la ecuación diferencial y resolverla con base al método integral.

$$r_B = K_{observada} C_B \quad (3)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = K_{observada} C_B \quad (4)$$

$$\frac{dC_B}{C_B} = K_{observada} dt \quad (5)$$

Resolviendo la ecuación diferencial (5) resultante desde C_{B0} hasta C_B y desde t_0 a t

$$\int_{C_{B0}}^{C_B} \frac{dC_B}{C_B} = K_{observada} \int_{t_0}^t dt \quad (6)$$

$$\ln(C_B) - \ln(C_{B0}) = K_{observada} (t - t_0) \quad (7)$$

Aplicando propiedades de los logaritmos a la ecuación (7) y como $t_0=0$ la ecuación resulta:

$$\ln\left(\frac{C_B}{C_{B0}}\right) = K_{observada} t \quad (7)$$

Despejando $K_{observada}$ de la ecuación (7) se obtiene:

$$K_{observada} = \frac{t}{\ln\left(\frac{C_B}{C_{B0}}\right)} \quad (8)$$

Con base a la ecuación (8) y los datos de la Tabla 15. Se realizan los cálculos del método diferencial para cada cepa obteniéndose los siguientes resultados.

1) Cepa F1

Para la cepa F1 se realizaron los cálculos correspondientes al método integral en donde se puede observar los resultados en la Tabla 15 y la Figura 45.

Tabla 15 Cálculo de Kobs para cepa F1.

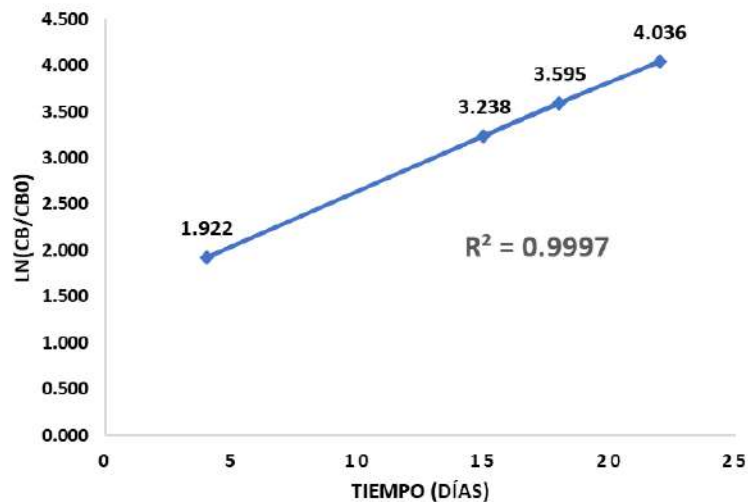
t (días)	Ln(CBf/CB0)	K observada
0	-	-
4	1.922	0.4804
15	3.238	0.2158
18	3.595	0.1997
22	4.036	0.1835

La $K_{observada\ promedio}$ da un valor para la cepa F1 siguiente:

$$K_{observada\ promedio} = 0.2669 \text{ días}^{-1}$$

Así mismo, se comprueba con el valor de $R^2=0.9997$ que los datos cinéticos se ajustan a una línea recta como se puede observar en la Figura 45 confirmando que el orden de reacción es de primer orden (n=1).

Figura 45 Gráfica de cinética para la cepa F1.



Nota. En esta gráfica se presenta un comportamiento que obedece a una reacción de primer orden.

2) Cepa F2

Para la cepa F2 se realizaron los cálculos correspondientes al método integral en donde se puede observar los resultados en la Tabla 16 y la Figura 46.

Tabla 16 Cálculo de Kobs para cepa F2.

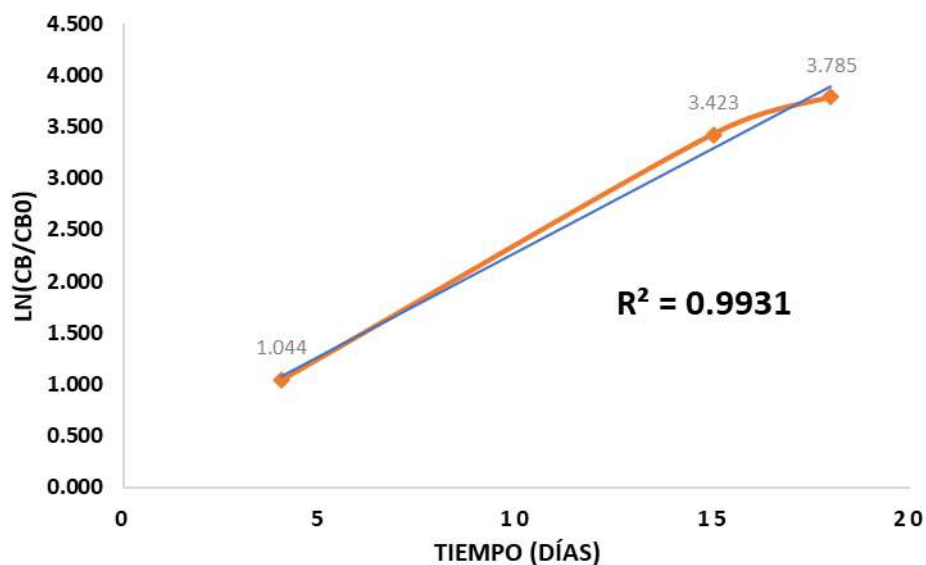
t (días)	Ln(CBf/CB0)	K observada
0	-	-
4	1.044	0.2609
15	3.423	0.2282
18	3.785	0.2103

La $K_{observada\ promedio}$ da un valor para la cepa F2 siguiente:

$$K_{observada\ promedio} = 0.2331 \text{ días}^{-1}$$

Así mismo se comprueba con el valor de $R^2=0.9931$ que los datos cinéticos se ajustan a una línea recta como se puede observar en la Figura 46 confirmando que el orden de reacción corresponde a una de primer orden ($n=1$).

Figura 46 Gráfica de cinética para la cepa F2.



Nota. En esta gráfica se presenta un comportamiento que obedece a una reacción de primer orden.

3) Cepa FP1

Para la cepa FP1 se realizaron los cálculos correspondientes al método integral en donde se puede observar los resultados en la Tabla 17 y la Figura 47.

Tabla 17 Cálculo de Kobs para cepa FP1

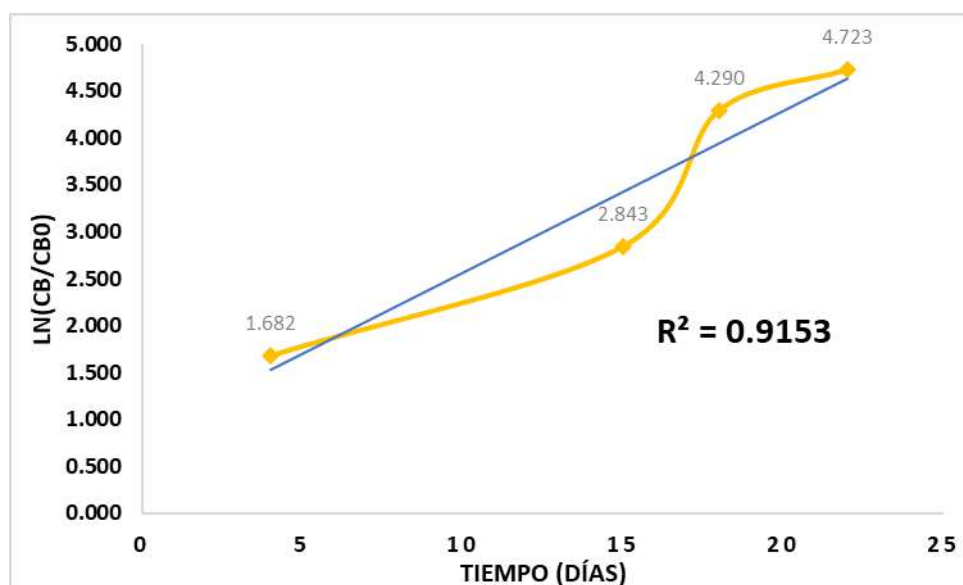
t (días)	Ln(CBf/CB0)	K observada
0	-	-
4	1.682	0.4206
15	2.843	0.1895
18	4.290	0.2383
22	4.723	0.2147

La $K_{observada\ promedio}$ da un valor para la cepa FP1 siguiente:

$$K_{observada\ promedio} = 0.2658 \text{ dias}^{-1}$$

Así mismo se comprueba con el valor de $R^2=0.9153$ que los datos cinéticos se ajustan a una línea recta como se puede observar en la Figura 47 confirmando que el orden de reacción corresponde a una de primer orden ($n=1$).

Figura 47 Gráfica de cinética para la cepa FP1.



4) Cepa FP2

Para la cepa FP2 se realizaron los cálculos correspondientes al método integral en donde se puede observar los resultados en la Tabla 18 y la Figura 48.

Tabla 18 Cálculo de Kobs para cepa FP2.

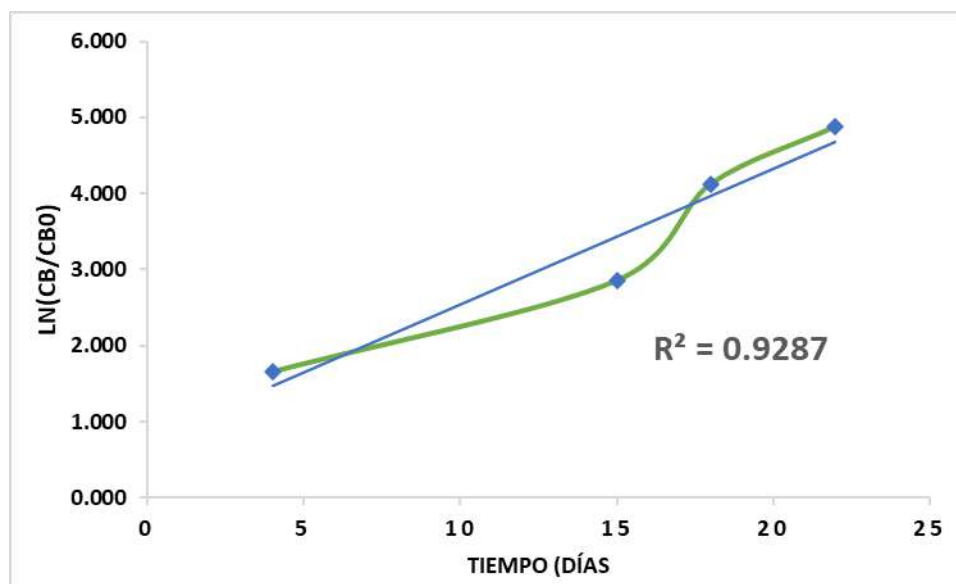
t (días)	Ln(CBf/CB0)	K observada
0	-	-
4	1.654	0.4136
15	2.856	0.1904
18	4.128	0.2293
22	4.887	0.2221

La $K_{observada\ promedio}$ da un valor para la cepa FP2 siguiente:

$$K_{observada\ promedio} = 0.2639 \text{ días}^{-1}$$

Así mismo se comprueba con el valor de $R^2=0.9287$ que los datos cinéticos se ajustan a una línea recta como se puede observar en la Figura 48 confirmando que el orden de reacción corresponde a una de primer orden (n=1).

Figura 48 Gráfica de cinética para la cepa FP2.



Los resultados obtenidos del modelo propuesto, que encapsulan la información derivada de estos cálculos, se presentan de manera tabular en la Tabla 18. Resultados cinéticos comparativos de la producción de bouvardina de las cepas analizadas.

Tabla 18 Resultados cinéticos comparativos de la producción de bouvardina de las cepas analizadas.

Característica	Cepa	K observada promedio (días ⁻¹)
En ausencia de planta	F1	0.2699
	F2	0.2331
En presencia de planta	FP1	0.2658
	FP2	0.2639

Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones

Los endófitos de las plantas medicinales mexicanas son un recurso genético que promete la síntesis de metabolitos secundarios de importancia medicinal para atender el cáncer.

Los resultados de esta investigación demuestran que la molécula bouvardina es producida por hongos endófitos aislados de la planta *Bouvardia ternifolia*, sin necesidad de estar como huésped de la planta. En los cultivos sin estándar liofilizado de planta, al finalizar la experimentación, las cepas mostraron una producción notable de bouvardina, destacando especialmente la cepa F1, con una producción promedio con base al área de pico de 340,259 u.a, superando a las cepas con estándar de planta que mostraron un promedio de 228,541 u.a. Estos resultados constituyen una valiosa aportación debido a que sugieren que los hongos endófitos pueden ser una fuente independiente de bouvardina y promete una estrategia para producir la molécula de interés mediante un sistema de producción industrial, lo cual permitirá que no se ponga en riesgo a la planta medicinal ante una recolección sin control que puede llevar a incrementar la erosión de los suelos donde ella se reproduce.

Se estableció exitosamente una técnica de Espectrometría de Masas por Resonancia en el Ciclotrón de Iones por Transformada de Fourier (FTICR-MS) para el análisis de bouvardina. La identificación de la molécula se confirmó con una relación masa/carga (m/z) de 811.32 en el aducto M+K. Este método permitió la identificación inequívoca de molécula bouvardina durante todas las experimentaciones.

Se determinó que las condiciones óptimas de producción incluyen un rango de temperatura entre 20-25°C, lo que favorece tanto el crecimiento de los hongos endófitos como la síntesis de bouvardina. En cuanto al pH, se observó que los cultivos sin control de pH mostraron una producción mayor que aquellos controlados a pH=2 y pH=5.3, donde se observa que la producción de la molécula fue de manera irregular y sin un comportamiento característico. Lo anterior sugiere que la variabilidad natural del pH puede ser beneficiosa para la producción de bouvardina.

La evaluación de producción de bouvardina en biorreactor a nivel laboratorio utilizando medio de cultivo económico, no arrojó resultados que mostraran la presencia de bouvardina, lo que

sugiere que el medio de cultivo utilizado no es adecuado para la producción de la molécula de interés. Es necesario perfeccionar el medio de cultivo ajustando concentraciones de los compuestos involucrados y/o incorporación otros a la formulación del medio de cultivo económico, ejercicio que conducirá a encontrar una formulación adecuada para la producción de la molécula sin afectar la rentabilidad de producción, para que el producto médico que se obtenga sea económicamente alcanzable para todas aquellas personas que requieran un tratamiento contra el cáncer.

Por otra parte, se calcularon las constantes de velocidad de producción de bouvardina para las cepas más productivas utilizando un modelo cinético de primer orden ya que, las gráficas cinéticas resultantes de los datos se ajustaban a un modelo lineal. La cepa F1 presentó una constante de velocidad promedio de 0.2669 días⁻¹, mientras que la cepa que obtuvo un valor mayor en presencia del estándar liofilizado de planta FP1 mostró un valor de 0.2658 días⁻¹, estos valores confirman que el hongo endófito, con y sin presencia de la planta medicinal *Bouvardia ternifolia*, genera producción de la molécula.

El presente estudio sobre la planta *Bouvardia ternifolia* y su microbiología endófito confirman científicamente la existencia del compuesto bouvardina importante por su actividad antitumoral.

El estudio demuestra que los hongos endófitos aislados de *Bouvardia ternifolia* tienen un gran potencial para la producción de bouvardina, un compuesto con actividad antitumoral. La implementación de técnicas avanzadas como FIA-ESI-FTICR-MS y la identificación de condiciones óptimas de cultivo sientan las bases para una producción eficiente y sostenible de bouvardina, reduciendo la dependencia de la planta hospedera y contribuyendo a la conservación de sus poblaciones naturales. Los resultados también destacan la importancia de continuar investigando y ajustando los parámetros de producción en biorreactores para desarrollar métodos económicos y escalables para la síntesis de este valioso metabolito secundario.

El cultivo de hongos endófitos de la planta *Bouvardia ternifolia* de la medicina tradicional mexicana, será una estrategia futura en el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Con ello se abrirán oportunidades para rescatar la cultura, crear empleos, generar opciones productivas, mejorar la salud humana y aprovechar la biodiversidad.

Recomendaciones:

Los resultados de este trabajo incitan a establecer las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

Realizar ajustes en las concentraciones de peptona y extracto de malta hasta encontrar un óptimo para el crecimiento y la producción de bouvardina utilizando un medio de cultivo económicamente viable en biorreactores de mayor escala. De otra manera, realizar un proceso de ingeniería inversa al MEB para determinar su composición y sustituir los componentes por opciones económicamente viables.

Estudiar el comportamiento cinético de la producción de bouvardina considerando todos los parámetros para ajustarse a la ecuación de Monod, de esa manera identificar cómo sucede el ciclo de vida de los hongos endófitos, cómo este influye en la producción de la molécula y cuáles son los factores que causan el detenimiento de esta.

Desarrollar un proceso de extracción y purificación eficiente para la obtención de bouvardina de alta pureza.

Realizar un estudio comparativo de producción de bouvardina, considerando factores de seguridad, ambientales, económicos y de calidad. Analizando la vía de obtención de bouvardina directamente de la planta *Bouvardia ternifolia*, a partir de extracciones y la obtención de bouvardina por producción en un biorreactor como el presentado en esta investigación.

Capítulo V. Referencias bibliográficas

- Agatonovic, S., Hettiarachchi, C. (2014). *Analysis of phenolics in wine by high performance thin-layer chromatography with gradient elution and high-resolution plate imaging*. Elsevier. doi: 10.1016/j.jpba.2014.08.031.
- Alcaraz-Meléndez, L., Delgado-Rodríguez, J., & Real-Cosío, S. (2004). *Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (Turnera diffusa)*. *Fitoterapia*, 75(7-8), 696-701. doi: 10.1016/j.fitote.2004.08.008
- Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y. et al. *Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification, and best reporting practices*. *Nat Methods* 18, 747–756 (2021). doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). *Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises*. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1829-1845.
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). *Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots?* *Ecology*, 88(3), 541-549. doi: 10.1890/05-1459
- Biswas, S. K., Chowdhury, A., Das, J., Roy, A., & Hosen, S. Z. (2011). *In vitro antibacterial activity of Tagetes erecta L. and investigation of its chemical constituents through GC-MS analysis*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(29), 5176-5180. doi: 10.5897/AJMR11.875
- Bye, R., & Linares, E. (1983). *The role of plants found in the Mexican markets and their importance in ethnobotanical studies*. *Journal of Ethnobiology*, 3(1), 1-13.

- Caballero-George, C. (2016). *Importance and challenges of traditional medicine in Latin America. Pan American Health Organization*, 40(3), 161-165.
- Carrera-Fernández, M. C., Herrera-Martínez, M., Ordaz-Hernández, A., & Arreaga-González, H. M. (2023). *Medicinal plants from Mexico used in the treatment of scorpion sting. Toxicon*, 230, 107172. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107172>
- Carrillo-Rodríguez, J. C., López-Monteon, A., & Mojica-Henshaw, M. P. (2016). *Chenopodium ambrosioides L. (Estragón Mexicano): Importancia en la medicina tradicional y su actividad biológica. Revista de Fitoterapia*, 16(1), 6-18.
- Chain, E., Florey, H. W., & Heatley, N. (1940). *Penicillin as a chemotherapeutic agent. British Journal of Experimental Pathology*, 21(3), 226-236. doi: 10.1016/S0140-6736(01)08728-1
- Chang, H. Y., Chiang, P. Y., & Lin, H. Y. (2001). *Methods for the isolation and purification of nattokinase and uses thereof. U.S. Patent No. 6,242,018. United States Patent and Trademark Office.*
- Chandra, H., Yadav, A., Prasad, R., Kalra, S. J. S., Singh, A., Bhardwaj, N., & Gupta, K. K. (2024). *Fungal endophytes from medicinal plants acting as natural therapeutic reservoir. The Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100073>
- Chen, W., Zhang, Y., Zhang, X., & Wang, Y. (2010). *Bouvardin inhibits proliferation and induces apoptosis of human cancer cells. Cancer research*, 70(22). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0605
- Cole, J. R. (1980). *Preparation and use of Bouvardin and Deoxybouvardin. United States Patent 4226856A.*

- Dale L. Boger and Daniel Yohannes. *Studies on the total synthesis of bouvardin and deoxybouvardin: cyclic hexapeptide cyclization studies and preparation of key partial structures. The Journal of Organic Chemistry*, 53(3), 491-493. doi: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo00238a005>.
- Dale L. Boger, Michael A. Patane, and Jiacheng Zhou. *Total Synthesis of Bouvardin, O-Methylbouvardin, and O-Methyl-N9-desmethylbouvardin. Journal of the American Chemical Society* 1994 116 (19), 8544-8556. doi: 10.1021/ja00098a015
- De la Cruz, Martín. (1552). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Códice Badiano).
- Duetz, W. A., Rüedi, L., Hermann, R., O'Connor, K., Büchs, J., & Witholt, B. (2000). *Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2641-2646. doi: 10.1128/AEM.66.6.2641-2646.2000
- Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A., & Sutthiwong, N. (2013). *Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. Current Opinion in Biotechnology*, 26, 56-61. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.007
- Ekor, M. (2014). *The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. Frontiers in pharmacology*, 4, 177. doi: 10.3389/fphar.2013.00177
- Estrada M., N. Pérez, J. Serra y X. Sorni. 2008. *La medicina de los antiguos aztecas*. CV Afers de Comunicació Visual S.A. México.

- Faeth, S. H., & Fagan, W. F. (2002). *Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. Integrative and Comparative Biology*, 42(2), 360-368. doi: 10.1093/icb/42.2.360
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science*, 246(4926), 64-71. doi: 10.1126/science.2675315.
- Fleming, A. (1929). *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226-236.
- Fogler, S. (2008). *Elementos de Ingeniería de Las Reacciones Químicas (4ta edición). Pearson Educación, México.*
- Foster, J. W., & McDaniel, L. E. (assignees to Merck & Co., Inc.). (1948, September 7). *Process for the production of penicillin (US Patent No. 2,448,790 A). U.S. Patent and Trademark Office.*
- Giles K, Williams JP, Campuzano I. *Enhancements in travelling wave ion mobility resolution. Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011 Jun 15;25(11):1559-66. doi: 10.1002/rcm.5013. PMID: 21594930.
- Godínez Reséndiz, R., & Schifter Aceves, L. (2015). *Inicios de la producción industrial de penicilina en México, 1944-1951. Boletín de la Sociedad Química de México*, 9(2), 1414-1420.
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., & Rai, M. (2016). *Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity. Antonie van Leeuwenhoek*, 109(8), 1021-1042. doi: 10.1007/s10482-015-0502-7

- Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V. (2012). *Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8-26
- Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). *Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 1-27. doi: 10.1016/j.jep.2008.01.025
- Hamza, A., Mylarapu, A., Krishna, K. V., & Kumarā, D. S. (2024). *An insight into the nutritional and medicinal value of edible mushrooms: A natural treasury for human health. Journal of Biotechnology*, 381, 86–99. doi: 10.1016/j.jbiotec.2023.12.014
- Hawksworth, D. L., & Rossman, A. Y. (1997). *Where are all the undescribed fungi? Phytopathology*, 87(9), 888-891. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.9.888
- Heinrich, M., Robles, M., West, J. E., Ortiz de Montellano, B. R., & Rodriguez, E. (1998). *Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 539-565. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.539
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2006). *Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 157-160. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.035>
- Jia, Z., Zhu, X., Zhou, Y., Wu, J., Cao, M., Hu, C., Yu, L., Xu, R., & Chen, Z. (2024). *Comprehensive review of polypeptides from traditional Chinese medicine for cancer management. International Journal of Biological*

Macromolecules,260,129423.

doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129423>

Jolad, S. D., Hoffman, M. M., Torrance, S. J., Smith, C. C., Bates, R. B., & Mclaughlin, J. L. (1977). Bouvardin and Deoxybouvardin, Novel Antitumor and Antiviral Cyclopeptides from *Bouvardia Ternifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/ja00466a043

Universidad Nacional Autónoma de México. (2023). *Medicina Tradicional Mexicana*. Facultad de Medicina.

Kellogg, J. J., Todd, D. A., Egan, J. M., Raja, H. A., Oberlies, N. H., Kvalheim, O. M., & Cech, N. B. (2013). Biochemometrics for Natural Products Research: Comparison of Data Analysis Approaches and Application to Identification of Bioactive Compounds. *Analytical Chemistry*, 85(10), 4573-4582. doi: doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.5b01014

Khan, A. L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Lee, I. J. (2014). Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(4), 300-310. doi: 10.3109/07388551.2013.800018

Kubo, K., & Nanba, H. (1994). Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20(8), 781-785. doi: 10.1248/bpb.17.1106

Kusari, S., Singh, S., & Jayabaskaran, C. (2014). Rethinking production of Taxol (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 31(6), 355-356. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.03.011

- Li IC, Lee LY, Tzeng TT, Chen WP, Chen YP, Shiao YJ, Chen CC. *Neurohealth Properties of Hericium erinaceus Mycelia Enriched with Erinacines*. *Behav Neurol*. (2018). doi: 10.1155/2018/5802634
- Li, S. P., Li, P., & Dong, T. T. (2001). *Anti-oxidation activity of different types of natural Cordyceps sinensis and cultured Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine*, 8(3), 207-212. doi: 10.1078/0944-7113-00030
- López-Ávila, V., Aguilar-García, J., & García-Mateos, R. (2020). *Plantas medicinales de la región de Zongolica, Veracruz, México: uso, conocimiento y conservación*. *Revista de Biología Tropical*, 68(1), 33-49
- López Luengo, M. T. (2003, febrero). *Las plantas medicinales en la medicina tradicional china. Fito terapia farmacéutica*. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-las-plantas-medicinales-en-medicina-13043107>
- Lorenzini M, Zapparoli G. *Characterization and pathogenicity of Alternaria spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering*. *Int J Food Microbiol*. 2014 Sep 1; 186:1-5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.008. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24974273.
- Madigan M.T., J. M. Martinko, P.V. Dunlap y D. P. Clark. 2009. *Brock: Biología de los microorganismos*. Pearson Addison Wesley. Madrid, España.
- Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., & Jackson, G. S. (1998). *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer*. *Mass Spectrometry Reviews*, 17(1), 1-35. doi: 10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:1<1: AID-MAS1>3.0.CO;2-K
- Mishra S, Kumar P, Malik A. (2015). *Effect of temperature and humidity on pathogenicity of native Beauveria bassiana isolate against Musca*

- domestica* L. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(4), 697-704.
doi:10.1007/s12639-013-0408-0
- Martínez, M. (1979). *Las plantas medicinales de México*. México: Ediciones Botas
- Mendoza-Castelán, G., & Lugo-Pérez, R. (2011). *Plantas medicinales en los mercados de México*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Molina-Salinas, Gloria M., et al. (2007). "Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity." *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2006.08.014
- Morales García, G. (2022). *La Regulación de Productos Herbolarios en México*. *Ciencia COFEPRIS*, 24(1), 1-10.
- Nath, A., Chattopadhyay, A. & Joshi, S.R. Biological Activity of Endophytic Fungi of *Rauwolfia serpentina* Benth: An Ethnomedicinal Plant Used in Folk Medicines in Northeast India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Science*. 85, 233–240 (2015).
doi.org/10.1007/s40011-013-0184-8
- Pasanen A., Kasanen J., Rautiala S., Ikäheimo M., Rantamäki J., Kääriäinen H., Kalliokoski P. (2000). Fungal growth and survival in building materials under fluctuating moisture and temperature conditions,
doi:10.1016/S0964-8305(00)00093-7
- Patrick, F., Sonya, M., Thomas, R., Ronald, N., Robert, D., (2005). Broth Microdilution Susceptibility Testing of *Campylobacter jejuni* and the Determination of Quality Control Ranges for Fourteen Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, doi: 10.1128/JCM.43.12.6136-6138.2005

- Potdar D, Hirwani RR, Dhulap S. *Phyto-chemical and pharmacological applications of Berberis aristata*. *Fitoterapia*. 2012 Jul;83(5):817-30. doi: 10.1016/j.fitote.2012.04.012. PMID: 22808523.
- Qi-Chang Z., Ming-Zhu K., Qin Z., Guo-Dong C., Hai-Yan T., Xiao-Xia L., Liang-Dong G., Jia L., Yi-Zhi Z., Hao G. (2014). *Chaetoglobosin Y, a new cytochalasan from Chaetomium globosum*. *Natural Product Research*, 29(15), 1399-1404. doi: 10.1016/j.fitote.2013.12.022
- Rajeshkumar, D., Banerjee, D., Dey, T., & Sen, S. (2015). *Bouvardin: A Review on Its Anticancer Properties*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 15(10), 1243-1250
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Castillón, E., Pérez-Ramos, J., & Hernández-Mendoza, J. (2017). *Plantas medicinales mexicanas en la historia*. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 15(1), 13-24.
- Robert A. Tobey, D., Orlicky, J., Larry L. Deaven, B., and Richard J. (1978). *Effects of Bouvardin (NSC 259968), a Cyclic Hexapeptide from Bouvardia ternifolia, on the Progression Capacity of Cultured Chinese Hamster Cells*. *American Association for Cancer Research.*, 38, 4415-4421
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). *Fungal endophytes: diversity and functional roles*. *New Phytologist*, 182(2), 314-330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009. 02773.x
- Rojo, I., Álvarez, B., García, R., León, J., Sañudo, A & Allende R. (2017). *Situación actual de Colletotrichums spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control*. *Revista mexicana de fitopatología*. doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9
- Roys, Ralph L. (1931). *The Ethno-Botany of the Maya*.

- Siebert, Daniel J. (1994). "Salvia divinorum and salvinorin A: new pharmacologic findings." *Journal of Ethnopharmacology*, 43(1), 53-56. doi: 10.1016/0378-8741(94)90116-3
- Singh nee' Nigam, P. (2009). *Production of Bioactive Secondary Metabolites*. In: Singh nee' Nigam, P., Pandey, A. (eds) *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer, Dordrecht. doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_7
- Sistema Nacional de Información en Salud. (2022). *Muertes de 2022*. <http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/>
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779-787. doi: 10.1021/ac051437y
- Srivastava, J. K., Shankar, E., & Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future. *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 895-901. doi: 10.3892/mmr.2010.377
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214-216. doi: 10.1126/science.8097061
- Strobel, G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5(6), 535-544. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00073-X
- Su J, Chang C, Xiang Q, Zhou ZW, Luo R, Yang L, He ZX, Yang H, Li J, Bei Y, Xu J, Zhang M, Zhang Q, Su Z, Huang Y, Pang J, Zhou SF (2014). Xyloketal B, a marine compound, acts on a network of molecular proteins and regulates the activity and expression of rat cytochrome P450 3A: a

- bioinformatic and animal study. British Journal of Pharmacology, 166(4), 1377-1389. doi: 10.2147/DDDT.S73476*
- Sun J, Zhao XE, Dang J, Sun X, Zheng L, You J, Wang X. Rapid and sensitive determination of phytosterols in functional foods and medicinal herbs by using UHPLC-MS/MS with microwave-assisted derivatization combined with dual ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. J Sep Sci. 2017 Feb;40(3):725-732. doi: 10.1002/jssc.201600711*
- Surjushe, A., Vasani, R., & Saple, D. G. (2008). Aloe vera: a short review. Indian Journal of Dermatology, 53(4), 163-166. doi: 10.4103/0019-5154.44785*
- Tsao, G.T. (1976), Principles of microbe and cell cultivation, S. John Pirt, Halsted Press, Division of John Wiley and Sons, New York, 274 pages, AIChE J., 22: 621-621. doi.org/10.1002/aic.690220342*
- Usman, M., Shah, I. H., Sabir, I. A., Malik, M. S., Rehman, A., Murtaza, G., Azam, M., Rahman, S. ur, Rehman, A., Ashraf, G. A., Riaz, M. W., Rehman, S. ur, Jeridi, M., Li, G., Song, C., & Manzoor, M. A. (2024). Synergistic partnerships of endophytic fungi for bioactive compound production and biotic stress management in medicinal plants. Plant Stress, 11, 100425. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100425>*
- Van Breemen, R. B., & Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 1(2), 175-185. doi: 10.1517/17425255.1.2.175*
- Valadez-Vega C, Lugo-Magaña O, Mendoza-Guzmán L, Villagómez-Ibarra JR, Velasco-Azorsa R, Bautista M, Betanzos-Cabrera G, Morales-González JA, Madrigal-Santillán EO. Antioxidant Activity and Anticarcinogenic Effect of*

Extracts from Bouvardia ternifolia (Cav.) Schltdl. *Life* (Basel). (2023). doi: 10;13(12):2319. doi: 10.3390/life13122319.

Villalobos-Flores, L. E., Espinosa-Torres, S. D., Hernández-Quiroz, F., Piña-Escobedo, A., Cruz-Narváez, Y., Velázquez-Escobar, F., Süßmuth, R., & García-Mena, J. (2020). Characterization of the Plant-Associated Bacterial Microbiota of the Mexican Medicinal Species *Bouvardia ternifolia*. *Proceedings*, 66, 34. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066034>

Villalobos-Flores, L. E., Espinosa-Torres, S. D., Hernández-Quiroz, F., Piña-Escobedo, A., Cruz-Narváez, Y., Velázquez-Escobar, F., Süßmuth, R., & García-Mena, J. (2022). The Bacterial and Fungal Microbiota of the Mexican Rubiaceae Family Medicinal Plant *Bouvardia ternifolia*. *Microbial ecology*, 84(2), 510–526. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01871-z>”

Waksman Minsky, N. H. (2022). *Revista Mexicana de Investigación en Productos Naturales*. Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales.

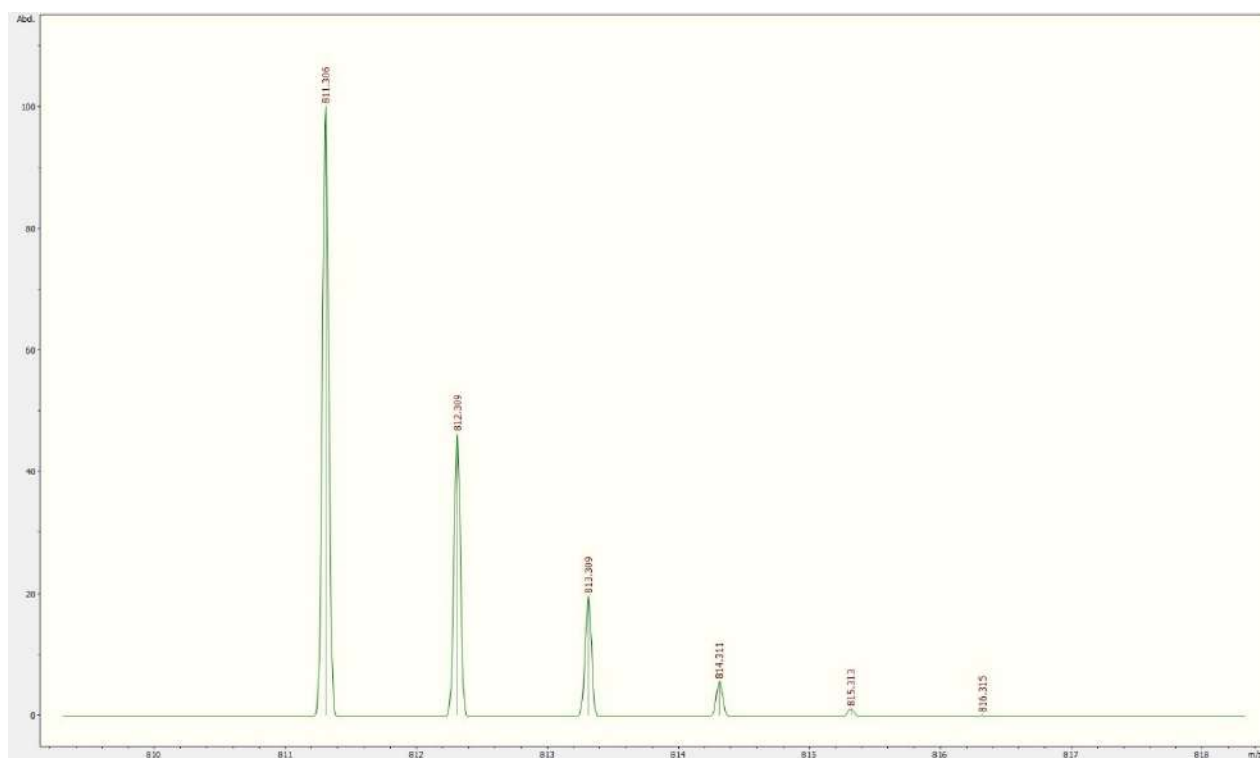
Yadav, G., & Meena, M. (2021). Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. *Biotechnology Reports*, 30, e00629. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00629>

Yang L, Wang X, Hou A, Zhang J, Wang S, Man W, Yu H, Zheng S, Wang Q, Jiang H, Kuang H. A review of the botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the Flos *Inulae*. *J Ethnopharmacol*. (2021). doi: 10.1016/j.jep.2021.114125. Epub 2021 May 4. PMID: 33961997.

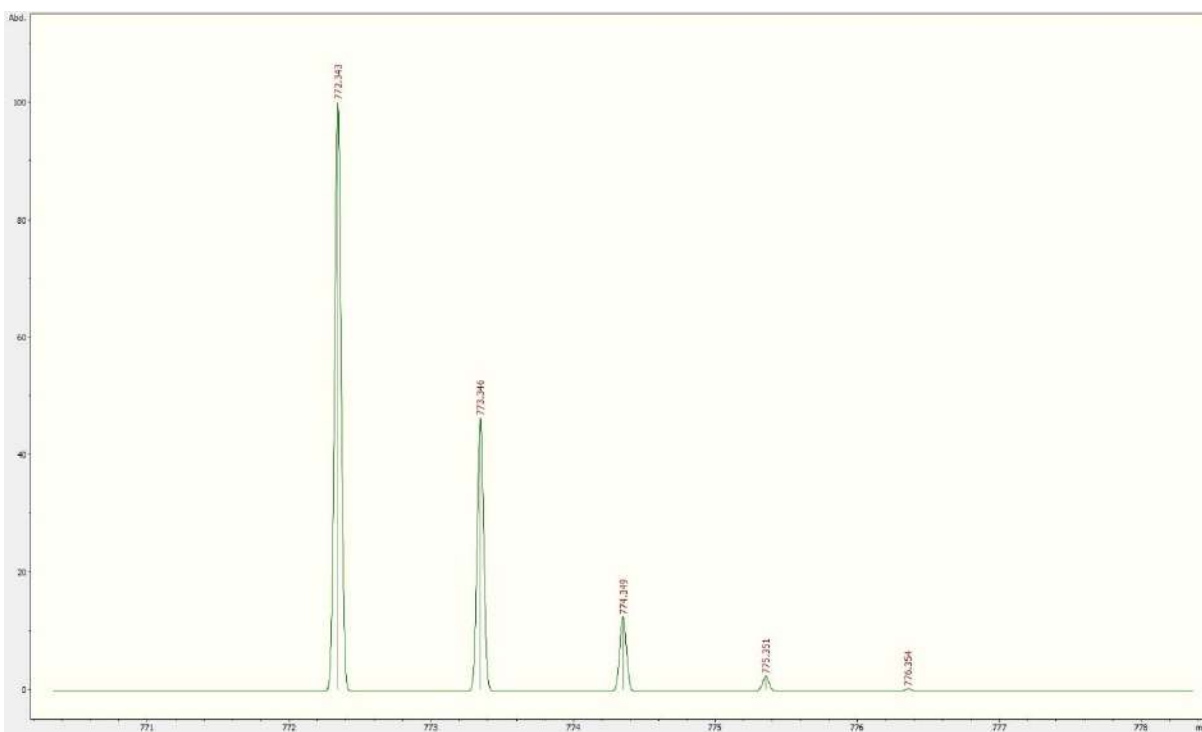
Zalacain, M., Zaera, E., Vazquez, D., & Jiménez, A. (1982). The mode of action of the antitumor drug bouvardin, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells. FEBS Letters. doi: 10.1016/0014-5793(82)81250-7

Zhang Z, Fang T, Zhou H, Yuan J, Liu Q. Characterization of the in Vitro Metabolic Profile of Evodiamine in Human Liver Microsomes and Hepatocytes by UHPLC-Q Exactive Mass Spectrometer. Front Pharmacol. 2018 feb 22; 9:130. doi: 10.3389/fphar.2018.00130

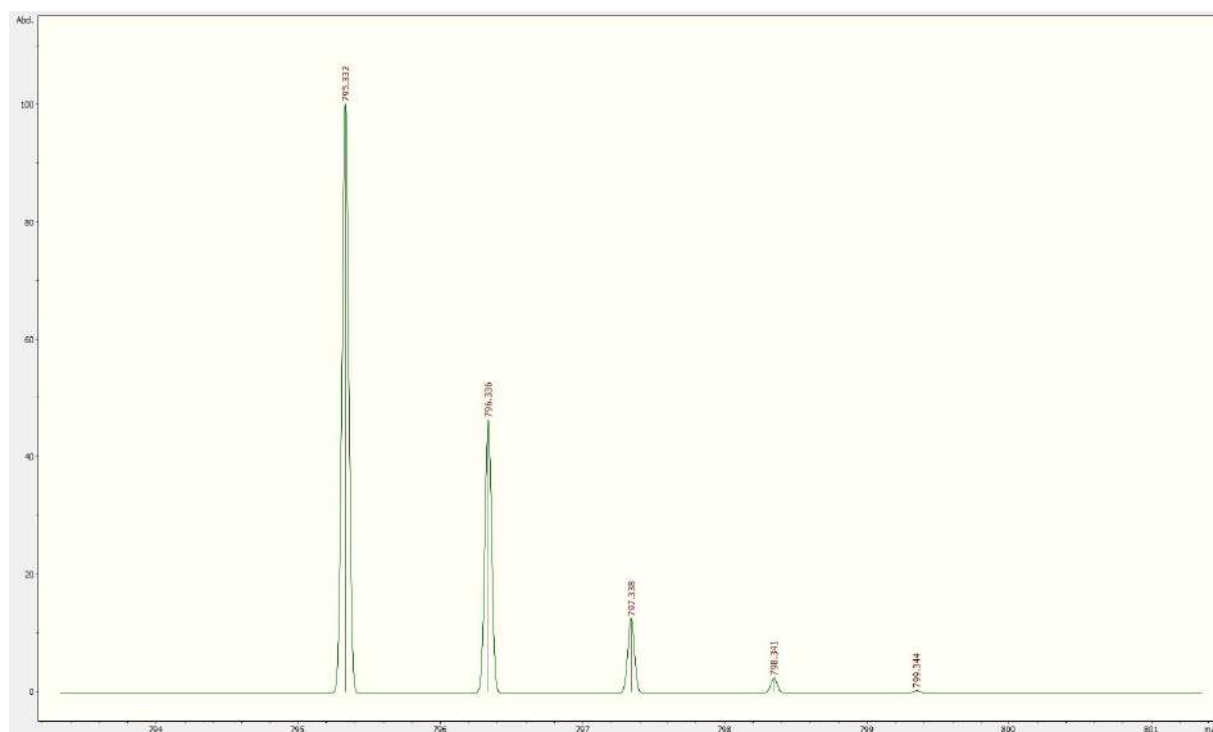
ANEXO A. Firma isotópica aducto M+K bouvardina



ANEXO B. Firma isotópica aducto M bouvardina

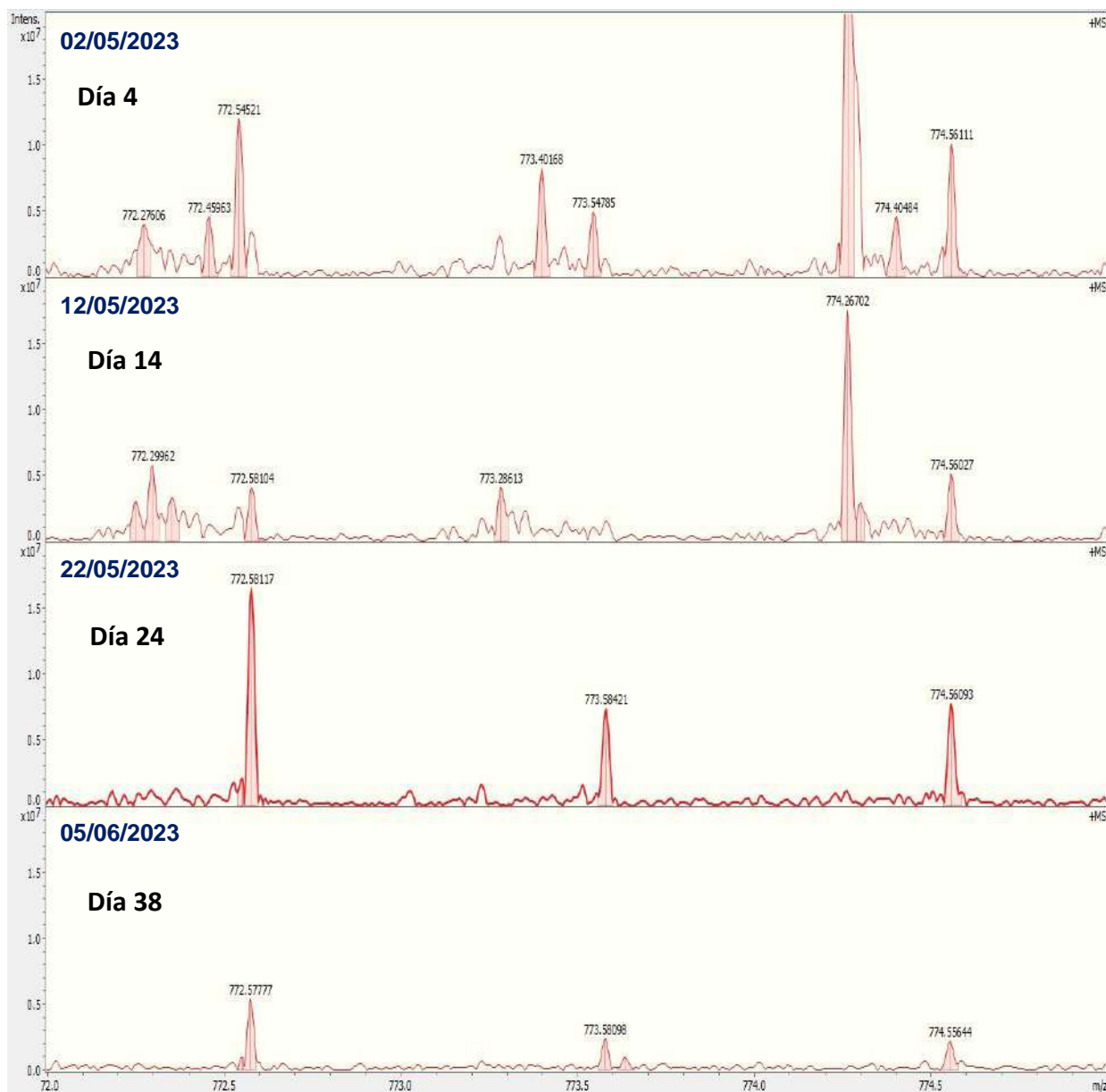


ANEXO C. Firma isotópica aducto M+Na bouvardina

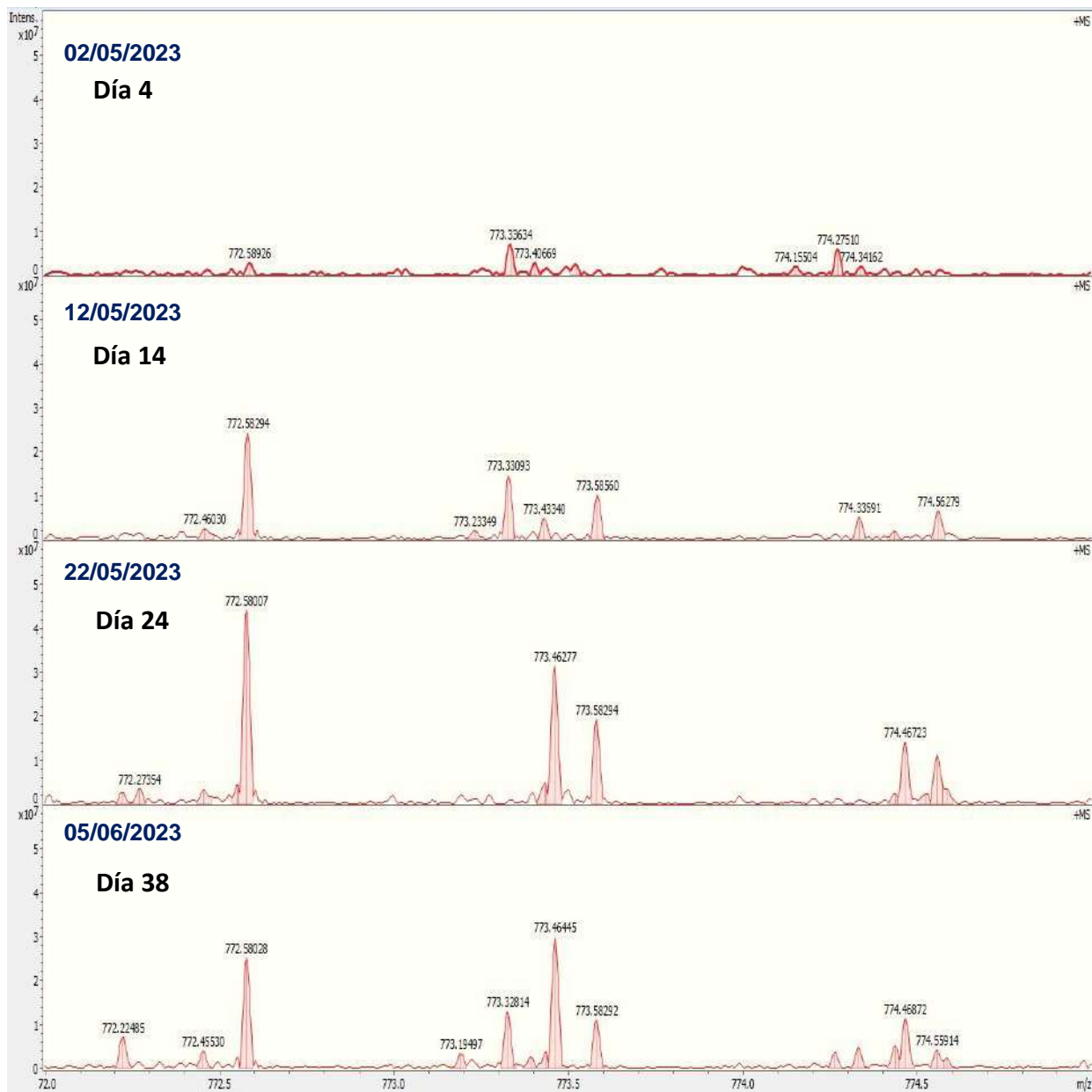


ANEXO D. Crecimiento de intensidad de pico en determinación de condiciones de control de pH óptimo de producción.

Resultados de producción de bouvardina en **pH=2** a través del tiempo de experimentación en el aducto M.



Resultados de producción de bouvardina en **pH=5.3** (pH inicial) a través del tiempo de experimentación en el aducto M.



Resultados de producción de bouvardina en **pH no controlado** a través del tiempo de experimentación en el aducto M.

