

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**Análisis de la variación bimestral del perfil metabolómico de *Ternstroemia pringlei*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**ING. EN B. ALEXIS URIEL SOTO DÍAZ**

**DIRECTORES**

**DR. ALEXANDRE T. CARDOSO TAKETA**

**DRA. MARÍA LUISA VILLARREAL ORTEGA**

**CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO**

**MAYO DEL 2019**

El presente proyecto, titulado “Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de *Ternstroemia pringlei*” y realizado por el Ing. en B. Alexis Uriel Soto Díaz, fue desarrollado en el **Laboratorio de Investigación de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).**

**COMITÉ EVALUADOR Y REVISOR:**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Dra. Verónica Rodríguez López

Dra. Susana Valencia Díaz

Dr. Nahim Salgado Medrano

## RESUMEN

El interés por el estudio de *Ternstroemia pringlei* nace de su amplia distribución, uso y comercialización en el estado de Morelos y la republica mexicana. Estudios farmacológicos previos de esta especie sugieren que metabolitos como los feniletanoides glucosilados, benzoquinonas, fenilpropanoides, entre otros, están involucrados en el efecto antioxidante que presenta esta planta. *T. pringlei* posee metabolitos con propiedades benéficas, sin embargo, la distribución espacial y temporal de estos metabolitos aun se desconocía, para esto se hizo una colecta bimestral de hojas de esta especie, además, en etapa de floración se colectaron 3 estadios distintos de la flor. Esta colecta de manera bimestral combinada con un análisis en resonancia magnética nuclear de protón (RMN H<sup>1</sup>) nos permitió conocer el perfil fitoquímico de *T. pringlei*, la identificación de metabolitos de interés y la variación del contenido metabólico a través del tiempo. Además, por medio de las pruebas colorimétricas ABTS y FRAP se determino el potencial antioxidante de los extractos metanólicos/acuosos de hojas. De los extractos analizados la colecta de febrero tuvo una mejor actividad (CI<sub>50</sub>: 35.079 ± 1.31 µg/mL) en la prueba de inhibición del radical ABTS, en comparación con las demás colectas (CI<sub>50</sub>: >50 µg/mL). Por otra parte, en la prueba FRAP los que mostraron una mayor actividad fueron los meses de diciembre, febrero y abril (equivalentes mM de FeSO<sub>4</sub> >1600).

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos el hombre ha coevolucionado con las plantas. Estas forman parte de su alimentación habitual y empíricamente en ellas ha encontrado la respuesta para tratar sus enfermedades. En el principio el uso de plantas con fines medicinales era de manera instintiva debido a que no había suficiente información sobre ellas. Con el tiempo se generó experiencia con base al conocimiento adquirido; de esta manera el uso plantas medicinales gradualmente fue abandonando el marco empírico para comenzar a basarse en hechos. Tiempo después se descubrió que los efectos benéficos que las plantas proveen a sus consumidores se deben a la presencia de moléculas denominadas metabolitos.

La síntesis de metabolitos en las plantas está sujeta a las interacciones con su entorno, a reacciones bioquímicas internas o a diferencias en la expresión genética entre plantas. Dentro de los factores externos que están relacionados en la síntesis de metabolitos se encuentran: temperatura, disponibilidad hídrica, radiación ultravioleta, disponibilidad de nutrientes, altitud, contaminación atmosférica, estrés por daño mecánico, ataque de herbívoros o patógenos. Otros factores que también están relacionados son edad de la planta, etapa de desarrollo, estación y ritmo circadiano. Todos estos factores influyen en el contenido metabólico de la planta, el cual varía conforme cambian estos estímulos a los cuales la planta reacciona modulando la síntesis de metabolitos (Gobbo 2007).

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía generada a la síntesis de una amplia variedad de metabolitos. En ocasiones la síntesis de algunos está restringida a un determinado género o familia, tal es el caso del género *ternstroemia* que tiene un perfil fitoquímico conservado, donde varios de los metabolitos que produce una especie también han sido reportados en otras (Aguirre 2011). *T. pringlei* es una especie que pertenece a este género la cual ha sido objeto de estudios fitoquímicos en los que se aislaron diversos metabolitos entre ellos feniletanoides glucosilados (FeGlu) como el ternstrósido b, hidoxitirosol, tilósido A y el fenilpropanoide katsumadina (Salgado 2015). Los cuales están relacionados a efectos neuroprotectores, hepatoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios. *T. pringlei* es una fuente natural de estos compuestos, sin embargo, a la fecha se desconoce su distribución espacial y temporal en la planta.

Para conocer más acerca de la síntesis de estos compuestos se hicieron colectas bimestrales de hojas y flores de *T. pringlei* y se analizaron los extractos metanólicos-acuosos por medio de RMN H<sup>1</sup> con la finalidad de obtener los perfiles fitoquímicos de las muestras y compararlas entre sí, para entender cómo se comporta el perfil metabólico a través del tiempo, en especial la síntesis de estos metabolitos. Además, se evaluó el potencial antioxidante de los extractos para determinar si las variaciones en el contenido metabólico afectan la respuesta farmacológica.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Generalidades de la familia Theaceae

La familia es una unidad sistemática de la taxonomía que sirve para categorizar los seres vivos y tener un registro de éstos. En el caso de las plantas existen aproximadamente 620 familias alrededor del mundo debido a la gran diversidad que representan (Plant List, 2018).

A lo largo del tiempo las familias se han reclasificado en diversas ocasiones por las aportaciones de nuevos estudios y el descubrimiento de nuevas especies que hacen reconsiderar las clasificaciones previamente establecidas. La familia Theaceae es un claro ejemplo de un grupo taxonómico con problemas en su clasificación. Esta familia fue concebida originalmente por Charles Francois de Mirbel en 1813 (Keng, H. 1962) aunque el Código Internacional de Nomenclatura Botánica lista el nombre del botánico David Don (1825) como el que circunscribió esta familia.

El botánico y micólogo suizo Augustin Pyrame de Candolle (1822) fue el primero en hacer una revisión de esta familia, la cual denominó como Ternstroemiaceae y la dividió en tres tribus. En 1824 este mismo autor agregó 2 tribus más a la familia (Luna *et al.*, 2004).

Esta familia fue previamente clasificada en el orden de las Guttiferales (Bentham & Hooker, 1862; Bessey, 1915), que años más tarde se clasificó en el orden Parietales (Lawrence, 1951) y Theales (Cronquist, 1981). Las clasificaciones más actuales la posicionan en el orden Ericales (Judd *et al.*, 1999, 2002; Stevens *et al.*, 2001).

De acuerdo a un estudio filogenético realizado por Luna y colaboradores (2004) esta familia comprende 20 géneros (*Adinandra*, *Anneslea*, *Archboldiodendron*, *Balthasaria*, *Camellia*, *Cleyera*, *Eurya*, *Freziera*, *Gordonia*, *Pyrenaria*, *Schima*, *Stewartia*, *Symplocarpon*, *Ternstroemia*, *Visnea*, *Aptosperma*, *Dankia*, *Euryodendron*, *Ficalhoa* y *Sladenia*) y alrededor de 700 especies, que se distribuyen principalmente en regiones tropicales o subtropicales de ambos hemisferios, con algunos géneros distribuidos en áreas templadas del este de América del Norte y Asia. Dentro de los neotrópicos se encuentra en México, a lo largo de Centro América hasta Perú, Brasil y Bolivia (figura 1).



Figura 1. Distribución geográfica de la familia Theaceae.

## 1.2. Género *Ternstroemia*

El género *Ternstroemia* fue propuesto por primera vez en 1781 por José Celestino Mutis en el *Supplementum Plantarum*. Este género es sumamente heterogéneo y por el momento no es posible determinar una característica que defina la condición monofilética de este taxón, que desde su circunscripción ha tenido muchos nombres de acuerdo al sistema de clasificación empleado, tales como: *Taonabo* (Aublet, 1775), *Dupinia* (Scoparius, 1777), *Hoferia* (Scoparius, 1777), *Tonabea* (Jussieu, 1789), *Amphania* (Banks, 1821), *Reinwardtia* (Korthals, 1840), *Llanosia* (Blanco, 1845), *Erytrochiton* (Schlechter, 1846), *Voelckeria* (1847) y *Mokofua* (Kuntze, 1891).

*Taonabo* es el primer nombre dado a este género y fue utilizado por muchos botánicos de Norteamérica que seguían la norma de prioridad que dicta el código de nomenclatura estadounidense. Sin embargo, el congreso del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (CINB) ha adoptado el nombre de *Ternstroemia* como *Nome conservandum* y *Taonabo* como *nomina rejicienda* para evitar confusiones en su nombre correcto (E., Clarence, 1942).

*Ternstroemia* es el género más extendido de la familia Theaceae, con especies distribuidas en ambos hemisferios. Este género comprende alrededor de 243 especies de árboles y arbustos perennifolios. En zonas tropicales de América y Asia se distribuyen alrededor de 85 especies, principalmente en Centroamérica y 10 de ellas se encuentran en México: *Ternstroemia dentisepala*, *Ternstroemia hemsleyi*, *Ternstroemia huasteca*, *Ternstroemia maltbyi*, *Ternstroemia oocarpa*, *Ternstroemia pringlei*, *Ternstroemia seemannii*, *Ternstroemia sphaerocarpa*, *Ternstroemia sylvatica* y *Ternstroemia tepezapote* (CONABIO, 2018). En los estados de Michoacán y Chiapas recientemente se han encontrado dos nuevas subespecies: *T. lineata subsp. lineata* y *T. lineata subsp. chalicophila* (figura 2).



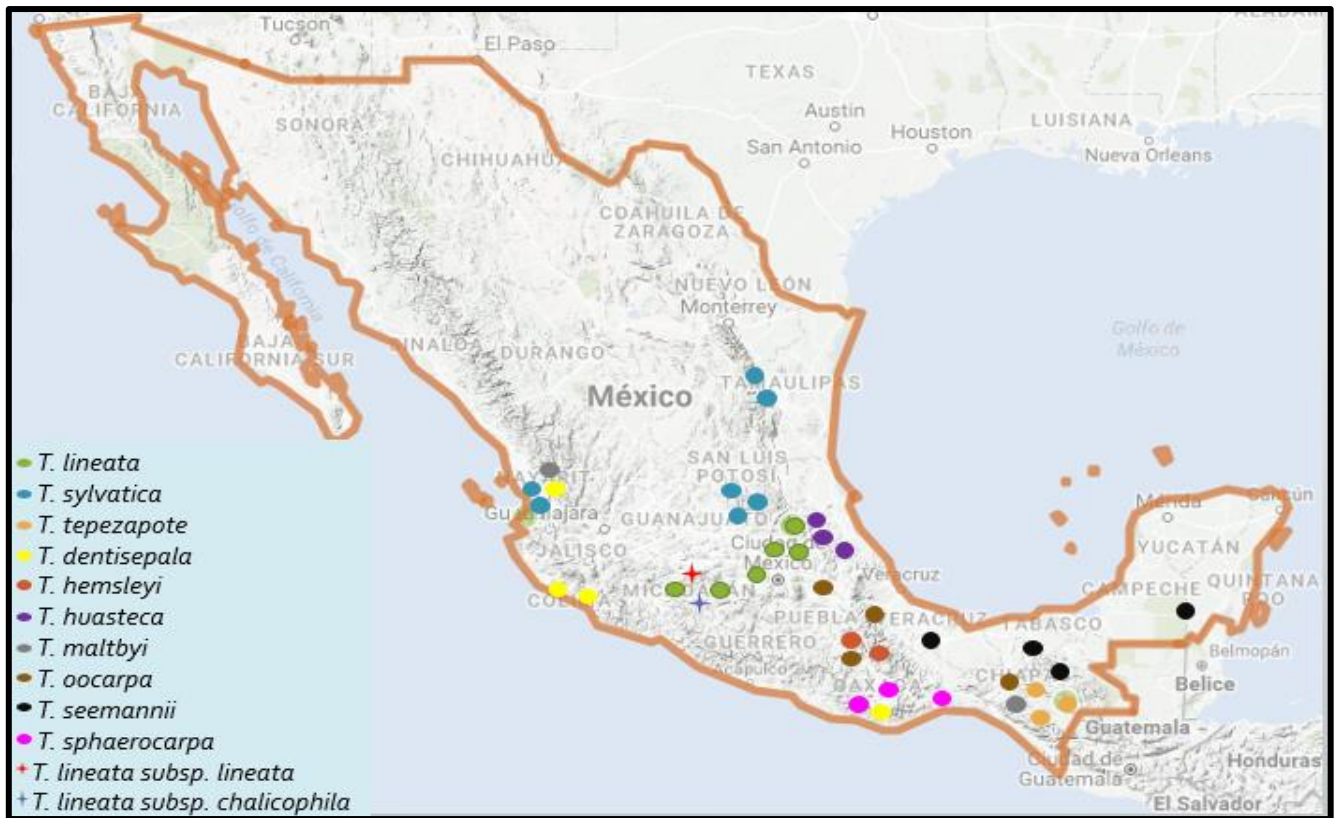


Figura 2. Principal distribución geográfica de especies del género *Ternstroemia* en México.

### 1.2.1 Usos medicinales del género *Ternstroemia*

Las especies del género *Ternstroemia* se han caracterizado por el fuerte y agradable aroma que desprenden sus flores, utilizadas comúnmente en infusiones para calmar los nervios debido sus propiedades relajantes (Guzmán 2014). Al ser combinadas con esencias aromáticas de otras plantas como el azahar y manzanilla pueden controlar el nerviosismo e irritabilidad (Ryan 1995). Las flores también son utilizadas para ayudar a disminuir el insomnio y el miedo (Fernández, 1987). Los frutos se usan tradicionalmente para aliviar problemas de ansiedad, trastornos del sueño y convulsiones.

Sus usos varían dependiendo del estado de la república. En Oaxaca, por ejemplo, es empleada para aliviar dolores de cabeza, en Michoacán para tratar problemas reumáticos y en Jalisco se recomienda contra la tos (Claudia, M. 2013) Por otra parte, las hojas frescas son utilizadas en la zona montañosa central de Veracruz en forma de cataplasmas para desinflamar golpes (Cano 1997). También se le atribuyen otros diversos efectos, como la capacidad de aliviar los dolores menstruales (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2018).

La madera, a pesar de no tener usos medicinales registrados, se suele emplear en la fabricación de algunas partes de guitarra, en la elaboración de cuentas de collar, molinillos y cucharas (Carranza 1999). En la siguiente tabla se enlistan los principales usos etnomédicos de especies del género *Ternstroemia*.

Tabla 1. Usos medicinales de algunas especies del género *Ternstroemia*

Especie	Nombre popular	Parte de la planta usada	Localización	Uso	Referencia
<i>Ternstroemia japonica</i>	Mokkoku soku	Hojas	China	Dolor de pecho Entumecimiento	Shin <i>et al.</i> , 2003
<i>Ternstroemia oocarpa</i>	Tila	Flores	Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Veracruz.	Nervios	Chino <i>et al.</i> , 1986.
<i>Ternstroemia pringlei</i>	Flor de Tila, jaboncillo, limoncillo, tila, tila estrella, tilia y trompillo.	Flores	Aguascalientes, Colima, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa.	Calmante Relajante Contra la Tos Insomnio	Cedillo <i>et al.</i> , 1990.

<i>Ternstroemia sylvatica</i>	Aretillo, capulincillo, hierba del cura, ixquefé, ministro, palo agrio, tepezapote, tila, tilia, tomillo y trompillo.	Flores	Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz.	Relajante, Ataques nerviosos, Dolores de cabeza, insomnio.	Azcarraga <i>et al.</i> , 2004.
<i>Ternstroemia tepezapote</i>	Hierba del cura, limoncillo, narajillo, palo colorado, trompillo, zapotillo, motané, tepetsápotl y tilil.	Flores	Campeche, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz.	Calmante Antiinflamatorio	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2003.  Martin <i>et al.</i> , 1996.

### 1.2.2 Composición química del género *Ternstroemia*

El género *Ternstroemia* ha sido objeto de estudio desde finales de los años 70, en el que se reportó por primera vez la presencia de cuatro metabolitos de tipo triterpeno en *T. japonica*: ácido oleanólico, primulagenina, dihidropriverogenina y A1-barrigenol (Yosioka 1978).

Estudios fitoquímicos posteriores permitieron aislar de los frutos de esta especie 6 nuevas saponinas denominadas ternstroemiósidos (A-F) de tipo monodesmosídico y bidesmosídico. Los monodesmosídicos tienen un oligosacárido unido al C-3 (o C-28); los bidesmosídicos tienen dos cadenas de carbohidratos, uno de ellos unido mediante un enlace éter al C-3 y el otro unido a través de un enlace éster al C-28 (Shin 2003). Además, se ha reportado 3 benzoquinonas (jacaranona, 3-hidroxi-2,3-dihidrojacaranona y 3-metoxi-2,3-dihidrojacaranona) un derivado del ácido oleanólico y del ácido ursólico (Jo 2005).

Este género ha sido fuente de obtención de diversos metabolitos, principalmente de triterpenos (figura 3). Un estudio fitoquímico de la especie *T. gymnanthera* permitió el aislamiento de 19 triterpenos; 15 de ellos ya conocidos y 4 nuevos que no se habían descrito en ninguna especie, además de 5 fitoesteres (Ikuta 2003).

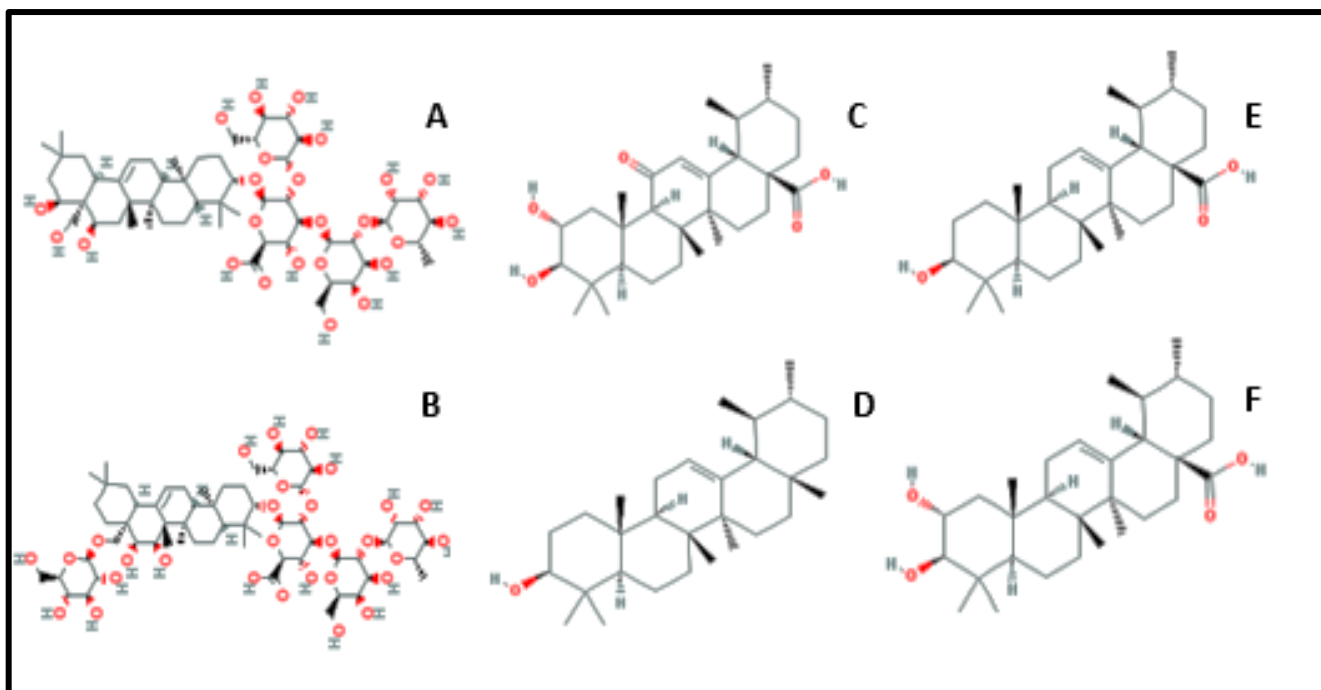


Figura 3. Principales triterpenos aislados del género *Ternstroemia*: A) ternstroemiósido A, B) ternstroemiósido C, C) ácido trenstroémico, D)  $\alpha$ -amirina, E) ácido ursólico, F) ácido corosólico.

Con respecto a estudios fitoquímicos de las hojas se han aislado una serie de metabolitos denominados feniletanoides glucosilados (FeGlus), los cuales se derivan del ácido benzoico y se caracterizan estructuralmente por contener un hidroxifeniletíl ligado a una  $\beta$ -D-glucopiranososa, que a su vez puede estar unido a otras moléculas de azúcar (glucosa, apiosa, galactosa, ramnosa o xilosa) a partir de un enlace glucosídico (Jiménez 1994). En total se aislaron 6 nuevos FeGlus de *T. japonica* (figura 4), a los que se les asignó el nombre de ternstrósidos (A-F) en alusión al género, además de un nuevo compuesto derivado del kaempferol y 15 compuestos previamente reportados en otras especies del género (Jo 2006). Posteriormente, el kaempferol fue aislado de 2 especies más de *Ternstroemia* (*tepezapote* y *pringlei*) junto con otros compuestos como rutina y quercetina (Aguirre 2011).

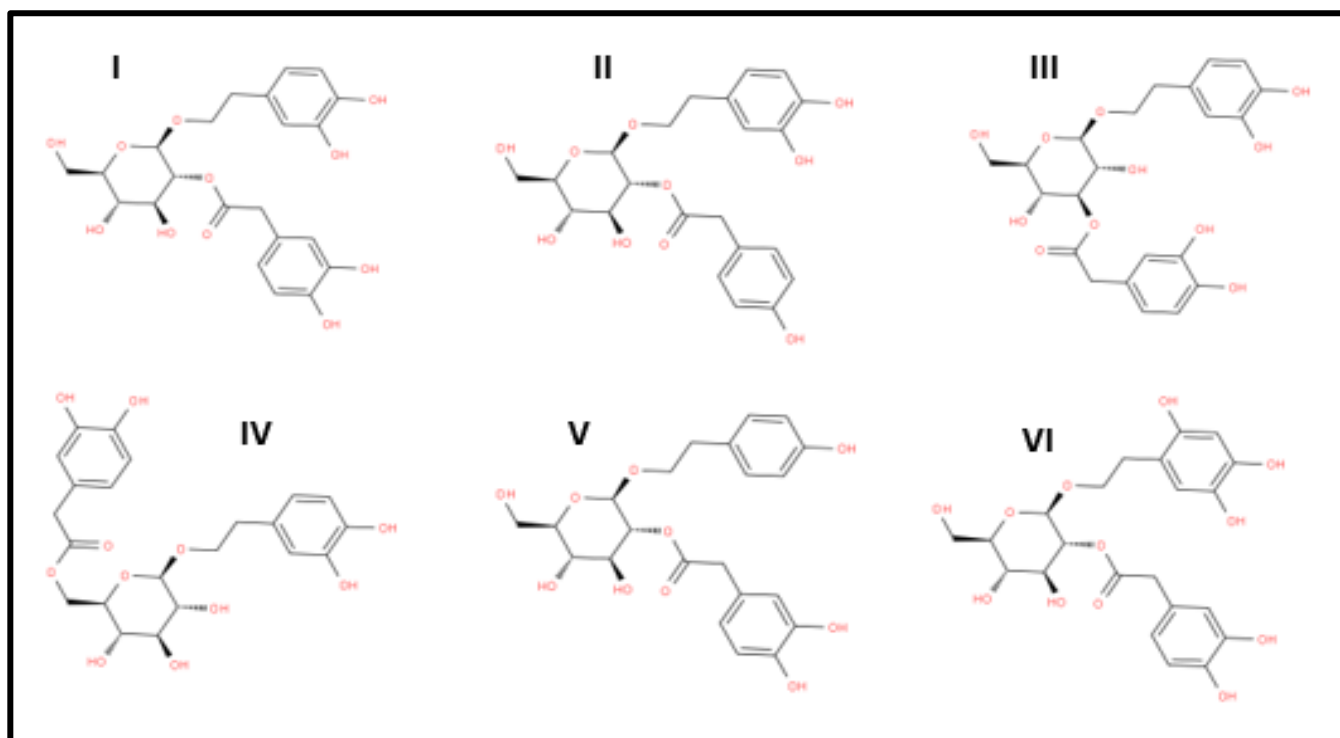


Figura 4. Principales FeGlus aislados del género *Ternstroemia*: I) ternstrósido A, II) ternstrósido B, III) ternstrósido C, IV) ternstrósido D, V) ternstrósido E, VI) ternstrósido F.

En la siguiente tabla se enlistan los principales metabolitos que han sido aislados de las especies del género *Ternstroemia*.

Tabla 2. Metabolitos aislados de especies del género *Ternstroemia*.

Especie	Tejido	Extracto	Compuesto	Peso Molecular (g/mol)	Rendimiento (µg/gps)	Referencias
<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	Callos	Metanol Acetato de etilo	1.-Lactona del ácido 3-epi-corosólico (2α, 3α-dihidroxiurs-11-en-13β,28-olide)	1.-470.68	1.-676.47	Ikuta <i>et al.</i> , 2003
				2.-486.68	2.-276.48	
				3.-486.68	3.-50	
			2.-Ácido 3-epi-ternstroémico (ácido 2α,3α-dihidroxiurs-12-en-11-on-28-oic)	4.-502.72	4.-135.3	
				5.-426.72	5.-NM	
			3.-Ácido ternstroémico (2α,3β-dihidroxiurs-12-en-11-on-28-oic)	6.-456.71	6.-NM	
				7.-486.73	7.-NM	
			4.-Ácido gymnantheraico (ácido 2α,3α-dihidroxi-11-α-metoxiurs-12-en-28-oic)	8.-488.70	8.-NM	
				9.-456.70	9.-NM	
		5.-β-amirina	10.-442.7	10.-NM		
		6.-Lactona del ácido ursólico				
		7.-Ácido robustánico				
		8.-Ácido uscáfico				
		9.-Ácido betulínico				

<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	Callos	Metanol Acetato de etilo	10.-Eritrodiol				
			11.-Ácido maslínico	11.-472.7	11.-NM		
			12.-Sitosterol				
			13.-Estigmasterol	12.-414.7	12.-NM		
			14.-Condriasterol				
			15.- Estigmasteril β-D-glucopiranosido	13.-412.6	13.-NM		
			16.-Condriasteril- β-D-glucopira-nósido		14.-NM		
17.-procianidina		15.-NM					
						16.-NM	
<i>Ternstroemia japonica</i>	Hojas	Metanol	1.-Ácido oleanólico	1.-456.7	1.-42	Yosioka et al.,1978	
			2.-Primulagenina A	2.-458.7	2.-950		
			3.-Dihidropriverogenina A.	3.-474.7	3.-266	Jo et al., 2006	
			4.-A1-barrigenol	4.-490.8	4.-1046		
			5.-Tersntrósido A	5.-466.4	5.-4.61		
			6.-Ternstrósido B	6.-450.4	6.-2		
			7.-Ternstrósido C	7.-466.4	7.-7.78		
			8.-Ternstrósido D	8.-466.4	8.-3.27		
			9.-Ternstrósido E	9.-450.4	9.-3.0		
			10.-Ternstrósido F	10.-480.5	10.-1.33		
			11.-3-O-β-D-xilopiranosil (1-2) β-D-glucopiranosil	11.-743	11.-5.44		
			12.-3-O-β-D-xilopiranosil (1-2) β-D-glucopiranosil	12.-474.7	12.-NM		
			13.-4-O-β-D-glucopiranosido	13.-1154	13.-NM		
12.CamelliageninaA							
13.-Desacilboninsaponina A							

<i>Ternstroemia Japonica</i>	Frutos	Metanol	1.-Ternstroemiósido A	1.-1121.2	1.-6.057	Shin <i>et al.</i> , 2003
			2.-Ternstroemiasido B	2.-1163.3	2.-12.10	
			3.-Ternstroemiasido C	3.-1121.3	3.-7.74	Jo <i>et al.</i> , 2005
			4.-Ternstroemiasido D	4.-1283.4	4.-43.08	
			5.-Ternstroemiasido E	5.-1309.4	5.-2.68	
			6.-Ternstroemiasido F	6.-1399.5	6.-9.25	
			7.-Primulagenina	7.-458.72	7.-21.34	
			8.-A <sub>1</sub> barrigenol	8.-490.72	8.-6.62	
			9.-Jacaranona	9.-182.17	9.-7.14	
			10.-3-hidroxi-2,3-dihidrojacaranona	10.-200	10.-0.63	
			11.-3-metoxi-2,3-dihidrojacaranona	11.-214	11.-1.46	
			12.-Ácido 3-O-acetil oleanólico	12.-498.7	12.-NM	
			13.-Ácido 3-O-acetil ursólico	13.-498.7	13.-NM	
			14.-Ácido ursólico	14.-456.7	14.-NM	
<i>Ternstroemia pringlei</i>	Flores	Metanol	1.-Jacaranona	1.-134	1.-NM	Lozada <i>et al.</i> , 2009
			2.-Tilósido A	2.-466	2.-NM	
			3.-Hidroxitirosol	3.-316	3.-NM	
	Flores	Metanol	4.-Katsumadina	4.-290	4.-NM	Salgado 2015
Hojas	Metanol	1.-ternstrósido B	1.-466.4	1.-NM	Salgado 2015	



<i>Ternstroemia Sylvatica</i>	Semillas	Agua	1.-28-O-[β-L-6-ramnopiranosil]-R1-barrigenol	1.-652	1.-35	Balderas <i>et al.</i> , 2013
<i>Ternstroemia Tepezapote</i>	Semillas	Agua	1.-Rutina	1.-610.51	1.-NM	Aguirre <i>et al.</i> , 2011
	Frutos	Agua	1.-Quercetina	1.-302.23	1.-NM	
	Flores	Agua	1.-Kaempferol	1.-286.23	1.-NM	

### 1.2.3 Relaciones quimiotaxonómicas entre especies del género *Ternstroemia*

Las relaciones entre plantas pueden expresarse de dos maneras: se dice que hay una relación fenética o formal cuando las plantas están relacionadas entre sí por un gran número de caracteres comunes o formas; y una relación filogenética cuando las plantas están relacionadas por tener antecesores comunes. Las características morfológicas sirven de base principal para la mayoría de las clasificaciones; no obstante, en estudios comparativos se realizan análisis a mayor profundidad, en el que se recurren a propiedades anatómicas, citológicas, fisiológicas y químicas.

La quimiotaxonomía estudia la composición química de las plantas e intenta clasificar e identificar organismos de acuerdo con diferencias y similitudes en sus composiciones bioquímicas. El género *ternstroemia* tiene un perfil fitoquímico conservado, donde varios de los metabolitos que produce una especie también han sido reportados en otras. Tal es el caso de los flavonoides rutina, quercetina y kaempferol que han sido identificados en las semillas y frutos de *T. pringlei* y *T. tepezapote* (Aguirre 2011).

También se han identificado en las hojas de más de una especie triterpenos como los ternstrósidos (Jo 2006, Salgado 2015), compuestos que sólo han sido aislados de especies del

género *Ternstroemia*, así como ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido corosólico,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, entre otros (Ikuta, 2003).

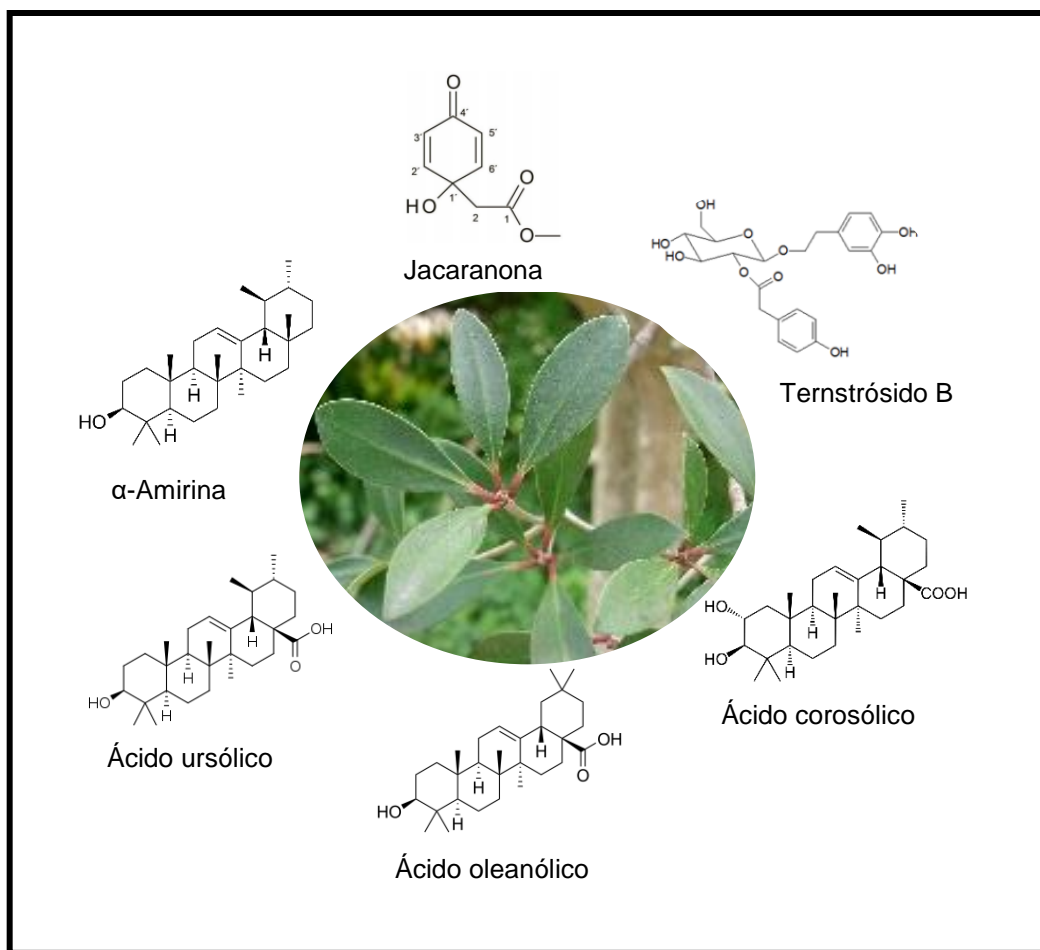


Figura 5. Metabolitos aislados de hojas de especies del género *Ternstroemia*.

Otro compuesto que ha sido identificado en más de una especie de este género es la benzoquinona denominada jacaranona. Este compuesto aislado por primera vez del alga *Delesseria sanguinea* (Yvin 1985) también se ha encontrado en flores y frutos de *T. pringlei* y *T. japonica*, además de varios derivados estructurales (Jo 2005, Lozada 2009, Salgado 2015). La bioquímica de las especies pertenecientes a este género está relacionada principalmente en la síntesis de flavonoides y triterpenos. Aunque es difícil decir que tan estrechamente están relacionadas, debido a que pocas especies cuentan con estudios fitoquímicos.

### 1.3 *Ternstroemia pringlei*

Es una especie de árboles que llegan a medir hasta 12 metros de alto (figura 7), tienen un pecíolo de 3 a 8 mm de largo, lámina oblanceolada, oblongo-obovada u oblongo-cuneada, de 4 a 10 cm de largo por 1.5 a 3 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, base cuneada, margen entero o diminutamente cerrado, nervios laterales a veces impresos en el haz y ligeramente levantado en el envés, coriáceas, haz verde oscuro, envés de color verde más pálido, glabra; flores auxiliares solitarias, pedúnculos de 1.5 a 3 cm de largo, bractéolas lanceoladas de 3 a 5 mm de largo situadas en la base del cáliz, pronto caedizas; sépalos imbricados, los extremos ovados, 9 a 8 mm de largo y de 6 a 8 mm de ancho; pétalos blancos, orbiculares o suborbiculares de 10 a 15 mm de largo, unidos en la base; alrededor de 60 estambres, ovario cónico, bilocular; fruto cónico, alargado, de 1 a 1.5 cm de largo, 1 cm de diámetro (Carranza et al., 1999).



Figura 7. Hojas, flores, frutos y semillas de la especie *Ternstroemia pringlei*.

### 1.3.1 Clasificación taxonómica

Esta especie se encuentra dentro de la familia Theaceae y del género *Ternstroemia* (figura 8). Sin embargo, a lo largo del tiempo ha existido confusión en torno a su clasificación, debido a que presenta muchas similitudes con otras especies del género en cuanto a la morfología, usos etnomédicos, distribución geográfica, usos comerciales y nombres comunes que recibe en la medicina tradicional mexicana. En especial ha existido confusión con la especie *T. sylvatica*, ya que con frecuencia se encuentran en los herbarios ejemplares de esta especie con el nombre de *T. pringlei*, con la cual mantiene muchas semejanzas morfológicas, sin embargo, se diferencian en los pedúnculos ya que en *T. pringlei* son más largos y la lámina foliar es oblanceolada a oblongo-cuneada con la parte más ancha arriba de la mitad, mientras que en *T. sylvatica* es elíptica y con la parte más ancha en la porción media (Carranza 1999).

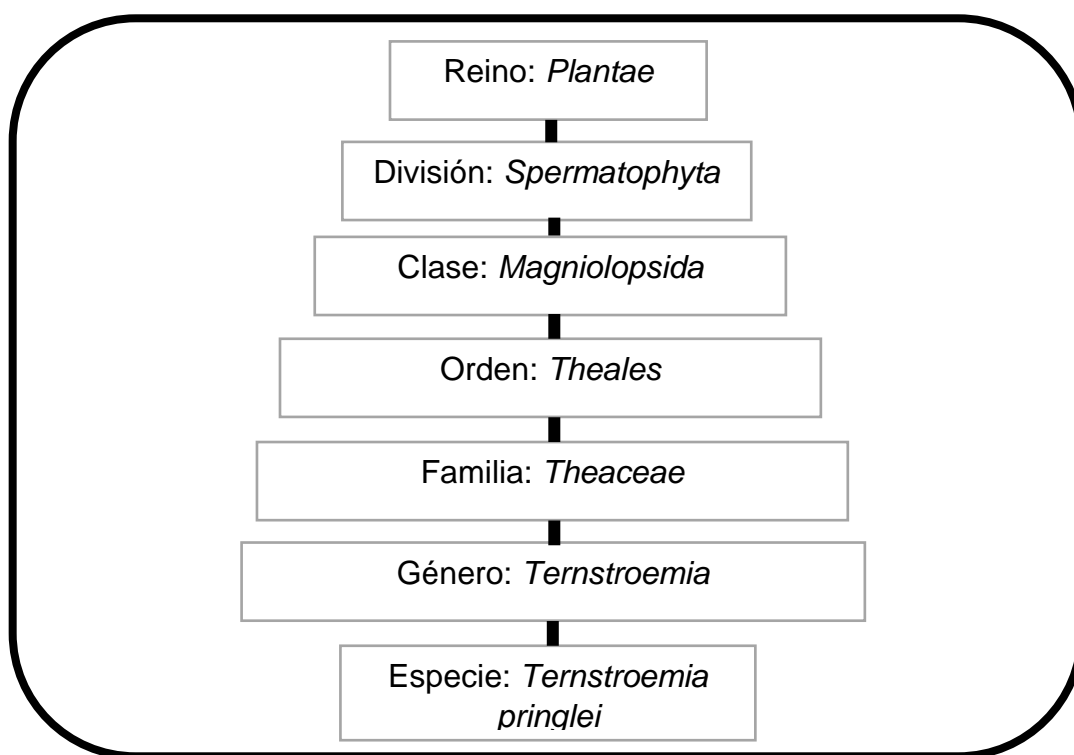


Figura 8. Clasificación taxonómica de *T. pringlei*.

En literatura existen sinónimos de *T. pringlei*, tales como: *T. lineata*, *T. chalicophila*, *T. cuneifolia*, y *Taonabo pringlei* (Enciclovida, CONABIO, 2017). En algunos estados de la república mexicana se le conoce popularmente como flor de tila, jaboncillo, limoncillo, tila estrella y trompillo por la característica forma del cáliz de la flor. En México y otros países de Centroamérica se le conoce como árbol de tila.

### 1.3.2 Distribución geográfica

*T. pringlei* habita principalmente en los bosques mesófilos de montaña, así como encinares y pinares húmedos a 2000-2800 msnm en México (figura 9). *T. pringlei* se puede encontrar distribuida en los estados de Colima en la reserva de la biósfera de la sierra de Manantlán, en Huixtlán, Chiapas y en la reserva de la biosfera santuario mariposa monarca, Michoacán, siendo este último el que tiene el mayor número de registros en el Sistema Nacional de Información Sobre la Biodiversidad (SNIB). También se puede encontrar en los estados de Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Sinaloa (Carranza *et al*, 1999).



Figura 9. Distribución geográfica de *T. pringlei*, cada círculo indica el número de registros de la especie en el SNIB.

### 1.3.3 Uso comercial

La especie *T. pringlei* es de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional mexicana. En México el mercado de plantas medicinales se extiende por toda la república.

En los últimos años el interés por las hierbas medicinales se ha incrementado, en el 2007 se importaban a México alrededor de 300 toneladas métricas de té, y en el 2016 fueron ya 1000 toneladas. Este auge se debe a que el mercado mexicano, en términos de consumo, se apega cada vez más a patrones internacionales, y existe un segmento que busca cierta sofisticación. Al igual que el vino y el café en los últimos años el consumo de té ha ido en aumento. En el 2016 el valor del mercado del té alcanzó los 339.8 millones de pesos, mientras que el mercado herbal cerró en 980 mdp. Se pronostica que para el 2021 el mercado del té alcanzará los 400 mdp (Sheila 2018).

El té de tila es ampliamente conocido en la zona centro y sur de México como un calmante natural, el aroma que desprenden las flores cuando se introducen a hervor es muy fresco, acompañado de una sensación relajante, por conocimiento propio y experiencia las poblaciones de esta zona tienen muy presente a este árbol asociado con propiedades relajantes. *T. pringlei* se comercializa a nivel local en mercados de abastecimiento municipales, se puede encontrar en la sección de hierbas y especias, Las hojas secas se venden en racimos o en bolsas, las flores se colocan en una manta en el piso, en canastas o en bolsas, regularmente estas se mezclan con frutos y semillas (figura 10).



Figura 10. Venta de hojas y flores de *T. pringlei* en un mercado municipal de Morelos.

La industria del té toma parte de conocimientos herbolarios para explotar el comercio de esta especie, es tal la confianza del consumidor en México que se puede encontrar en la mayoría de los supermercados del país (figura 11).



Figura 11. Producto elaborado a partir de flores de *T. pringlei*

Se puede encontrar en diversas presentaciones que llegan a contener hojas, debido a que entre los actores sociales que intervienen en la cadena de comercialización se encuentran los acopiadores locales que llegan a pasar hojas a la planta de procesamiento al momento de coleccionar las cuales se empacan junto con las flores o porque el producto final lleva hojas. Al igual que las flores las hojas contienen compuestos como los FeGlu's relacionados con los beneficios que aporta esta planta. Sin embargo, la distribución espacial y temporal de estos metabolitos en las hojas aún se desconoce.

## Justificación

El té de tila es uno de los productos más vendidos en los mercados herbolarios de México y también es ampliamente comercializado en las cadenas de supermercados del país. Estudios farmacológicos de *T. pringlei* han demostrado la capacidad antioxidante, sedante, antiinflamatoria y antihelmíntica que poseen los extractos de hojas, flores y frutos de esta especie. La actividad antioxidante se atribuye principalmente a la presencia de compuestos como los FeGlus. Estudios fitoquímicos previos sugieren que la presencia de estos compuestos no es constante durante el año y a la fecha el contenido y su distribución en la planta se desconoce. La síntesis de metabolitos secundarios en las plantas puede verse afectada por diversos factores como: edad de la planta, momento en el que se colecta, índice pluviométrico, radiación solar, disponibilidad de nutrientes, estrés provocado por daño mecánico o plagas, entre otros. Todos estos factores pueden impactar en la variabilidad de contenido metabólico del producto final y por ende las propiedades medicinales que aportan al consumidor. A través de la metabolómica se busca entender la síntesis de los metabolitos producidos por *T. pringlei*, lo que permitirá obtener un panorama general del perfil fitoquímico de esta especie. Al compararse los perfiles fitoquímicos de muestras colectadas bimestralmente, se pretende entender la biosíntesis de estos compuestos en *T. pringlei*, lo que aportará información para un mejor uso racional y aprovechamiento de esta especie.



## Hipótesis

El estudio metabolómico bimestral de *T. pringlei*, empleando RMN  $^1\text{H}$  y análisis de datos multivariados, permitirá conocer la distribución espacial y temporal de FeGlus en la planta.

## Objetivo general

Determinar la distribución y contenido de FeGlus en diferentes órganos de *T. pringlei* (hojas y flores) durante un año (colectas bimestrales) y comparar las diferencias en el metaboloma de la planta a través del tiempo mediante RMN  $^1\text{H}$  y análisis de datos multivariados.

## Objetivos particulares

- Determinar las diferencias entre el contenido metabólico de las colectas bimestrales de *T. pringlei*.
- Comparar los perfiles metabolómicos bimestrales de hojas y flores de *T. pringlei*.
- Determinar la actividad antioxidante de hojas de *T. pringlei* y relacionarla con su perfil metabolómico.

## CAPÍTULO 2

### Análisis de los perfiles metabolómicos de hojas y flores de *Ternstroemia pringlei* obtenidos mediante RMN <sup>1</sup>H.

#### 2.1 Metodología

##### 2.1.1 Selección de la población de estudio

La población de estudio fue seleccionada tras revisar los registros de *T. pringlei* en la base de datos del herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la UAEM. Se tomaron en cuenta como criterios de selección la homogeneidad de la población (edad y altura), del tipo de suelo, altitud aproximada de 2560 m. s. n. m. y la accesibilidad para la obtención del material vegetal bimestralmente. Además, de estar dentro de la cobertura de medición de alguna Estación Meteorológica Automática (EMA).

Esta población está conformada por 4 árboles adultos de entre 12-15 años, de aproximadamente 15 m de altura, ubicados en el municipio de Huitzilac al norte del estado de Morelos, México (19.025065, -99.273586). Un espécimen testigo fue registrado con el número en el herbario HUMO de la universidad autónoma del estado de Morelos para su debida clasificación y resguardo.

##### 2.1.2 Colecta del material vegetal

Para la obtención de los perfiles metabolómicos se colectaron bimestralmente (diciembre, febrero, abril, junio) hojas de 4 árboles de *T. pringlei*. Las colectas se realizaron a 3 alturas diferentes de la copa y solo se colectaron de ramas principales. Se colectaron hojas maduras de aproximadamente 8-10 cm de largo y 3-4 cm de ancho. Se procuró no colectar hojas jóvenes y brotes.

De las hojas colectadas se descartaron todas aquellas que presentara daño en el tejido por insectos, hongos, patógenos o daño mecánico por el clima (figura 12).



Figura 12. Ejemplo de material vegetal rechazado por daños en el tejido.

En etapa de floración además de hojas se colectaron capullos florales (diciembre), flores recién abiertas (febrero) y flores en senescencia (abril). Al igual que las hojas solo se colectaron muestras sin daño en el tejido (figura 13).



Figura 13. Capullos florales, flores recién abiertas y flores secas de *T. pringlei*.

### 2.1.3 Procesado del material vegetal

Las hojas y flores se secaron en sombra a temperatura ambiente durante un período de 2 semanas. Las hojas y flores de cada individuo fueron molidas por separado en una moledora mecánica, durante un lapso de 20 segundos, que se realizó 6 veces consecutivas con un tiempo de espera de 30 segundos entre cada molida para evitar un aumento en la temperatura de la cámara de molido para evitar alteraciones en el perfil químico del material vegetal. Después este material fue tamizado con una malla de metal de 100 micras obteniendo un polvo homogéneo.

### 2.1.4 Obtención de los perfiles de RMN $^1\text{H}$ .

Se colocaron 50 mg de cada muestra en microtubos de centrifuga (1.5 mL). Se añadieron 450  $\mu\text{L}$  de  $\text{CD}_3\text{OD}$  a cada microtubo y se vortexearon por 15 segundos, posteriormente se sonicaron durante 10 min. Después se añadieron 450  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.23 % p/p) y ácido trimetilsililpropanoico (TMSP) al 0.01% a cada tubo. Posteriormente se les dieron pulsos en el vórtex (30 s) y se volvieron a sonicar durante 10 min cada muestra. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se tomaron 600  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que fueron transferidos a tubos individuales de RMN  $^1\text{H}$  (5 mm) para el registro espectroscópico. Se registraron los siguientes parámetros de adquisición: 0.126 Hz/punto, ancho de pulso= 4.0  $\mu\text{s}$  ( $30^\circ$ ), retardo de relajación =2.0 s.

Una vez obtenidos los registros de RMN  $^1\text{H}$  se ajustaron los siguientes parámetros en cada espectro:

- Ajuste de fase
- Ajuste de línea base
- Ajuste del espectro al estándar interno
- Eliminar las señales de agua y metanol

### 2.1.5 Análisis de datos multivariado

Una vez ajustada la fase, línea base y el espectro al estándar interno se utilizó el software Spinworks (Versión 4) para integrar todas las señales presentes en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las muestras colectadas bimestralmente de hojas y flores. Cada espectro se dividió en intervalos iguales de 0.05 ppm desde 10 a -0.1 ppm, las señales dentro de este rango se integraron y se generó un archivo con sus valores. Los archivos con los datos de hojas y flores se agruparon por separado y se exportaron al programa SIMCA-P para el análisis estadístico.

### 2.1.6 Actividad antioxidante

Se midió el potencial antioxidante de los extractos de hojas mediante la inhibición de los radicales ABTS  $\bullet+$  y DPPH  $\bullet$ .

## 2.2 Resultados y discusión

### 2.2.1 Estabilidad de las muestras

Se tomó una muestra de hojas del mes de diciembre y se obtuvo su espectro de RMN  $^1\text{H}$ . La muestra se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente sin exponerse a la luz y se registró nuevamente, repitiéndose el proceso a las 48 h, lo que resultaron registros del día 1, 2 y 3, respectivamente (figura 12).

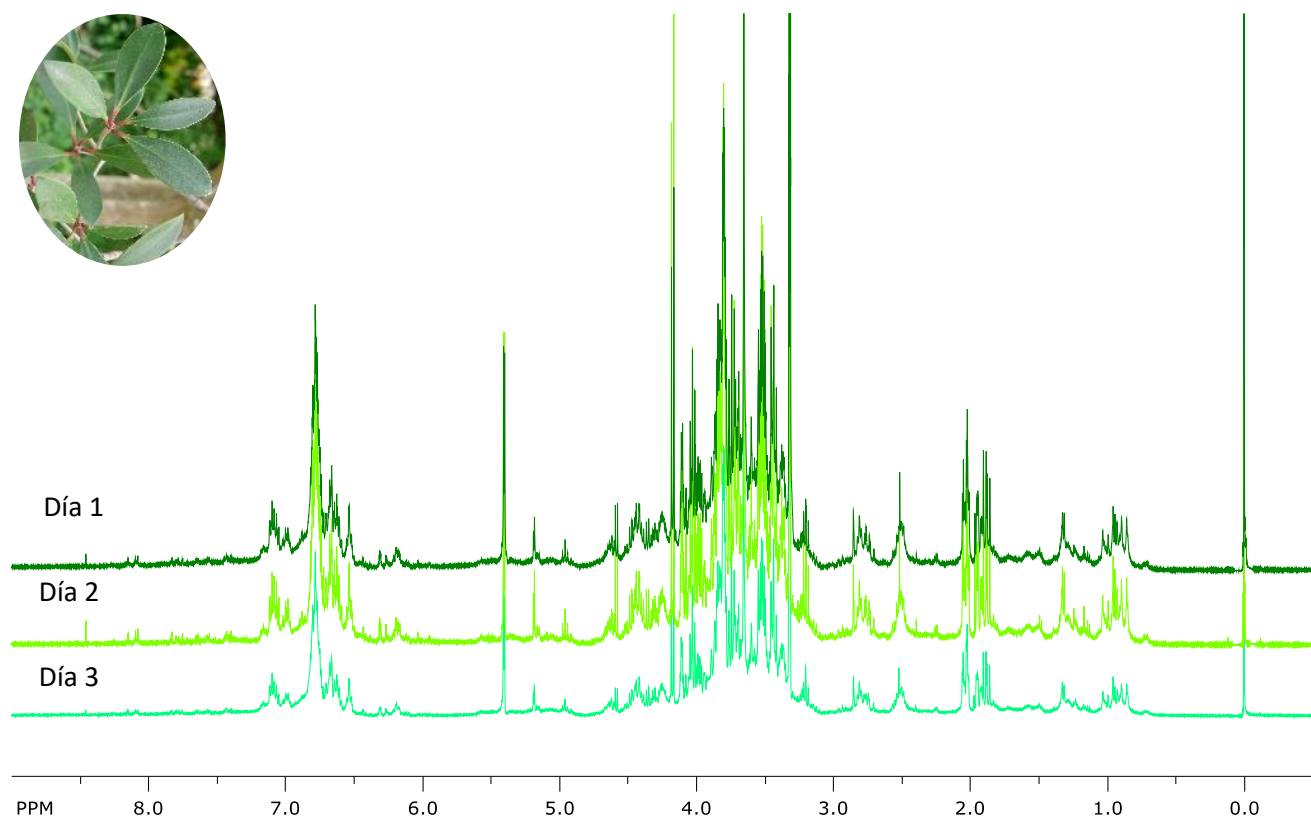


Figura 12. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Bruker, 500 MHz) obtenidos de hojas de diciembre, registradas en tres momentos, con diferencias de 24 horas entre ellas (días 1, 2 y 3).

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  brindan un panorama general del perfil fitoquímico de la planta: a campo alto (0-3 ppm) generalmente se encuentran señales de protones protegidos de grupos químicos alifáticos, principalmente de compuestos como terpenos, aminoácidos y ácidos grasos; en la región de 4-5 ppm del espectro se encuentran señales características de carbohidratos y de protones ligados a carbonos con base oxígeno; por otra parte, a campo bajo (6-8 ppm) se pueden encontrar señales de compuestos aromáticos y ácidos orgánicos.

Al ampliar y comparar los espectros en su región aromática se pueden observar la variación de los perfiles obtenidos en los días 1, 2 y 3. En la región de 6.0-7.2 ppm claramente se ve una disminución en la intensidad de estas señales conforme pasa el tiempo (figura 13), que indica la posible degradación de compuestos aromáticos.

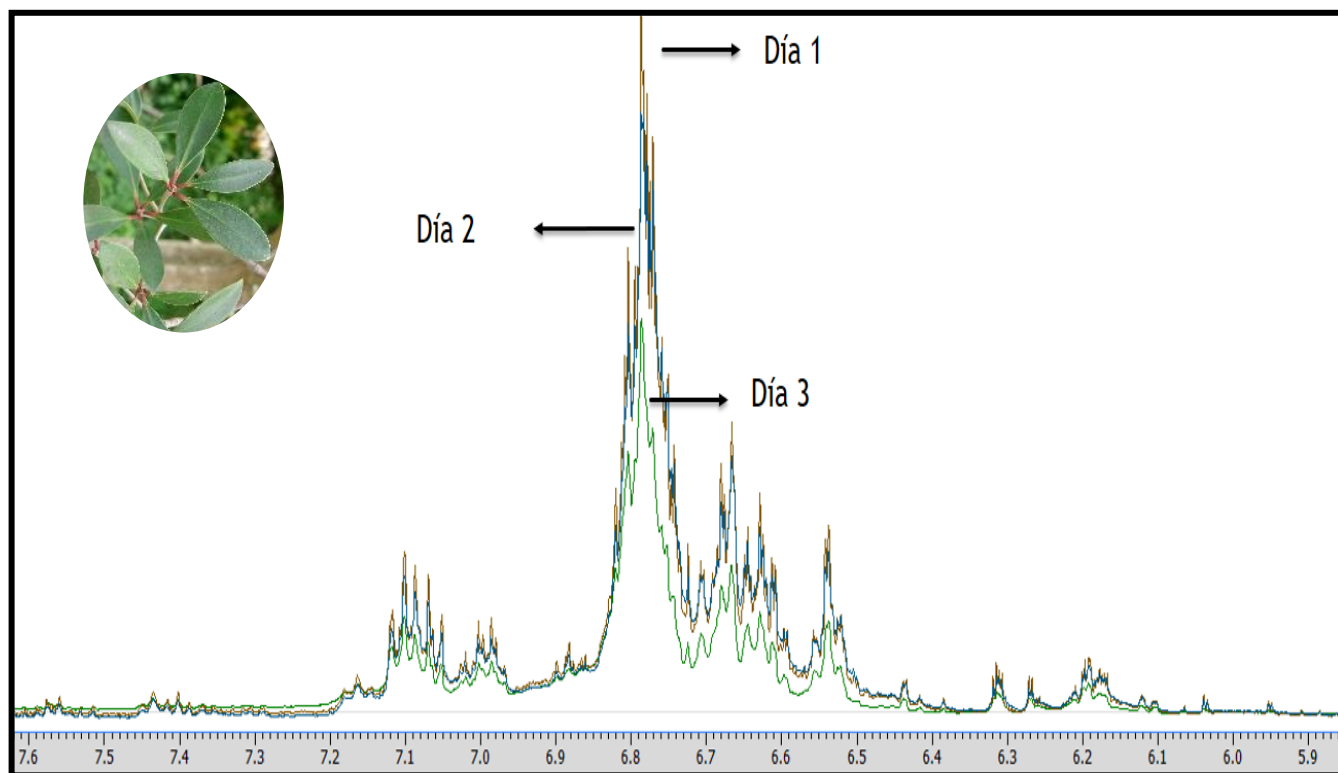


Figura 13. Comparación de los espectros obtenidos de diferentes días (1, 2 y 3) de hojas del mes de diciembre (región 5.9-7.6 ppm del espectro de RMN  $^1\text{H}$ ).

Los compuestos aromáticos son metabolitos orgánicos derivados del benceno que se caracterizan por su deslocalización electrónica en enlaces  $\pi$ , lo que resulta en el fenómeno de desprotección de sus protones. Son compuestos que pueden sufrir procesos tales como volatilización, fotooxidación u oxidaciones químicas.

Las condiciones ambientales a las que se sometió y el paso del tiempo afectaron el perfil metabólico del extracto, disminuyendo el contenido de este tipo de compuestos, que son propensos a degradarse.

Por otra parte, el contenido de carbohidratos no se ve tan afectado del primer al segundo día (figura 14). En general el perfil de carbohidratos en hojas se mantiene estable los dos primeros días en los que se registraron las muestras, con una disminución notoria en la intensidad de las señales en el tercer día. A diferencia de los compuestos aromáticos los carbohidratos son más estables si son expuestos a la luz. Sin embargo, altas temperaturas pueden inducir la degradación de estos a monómeros más simples (Maga 1989).

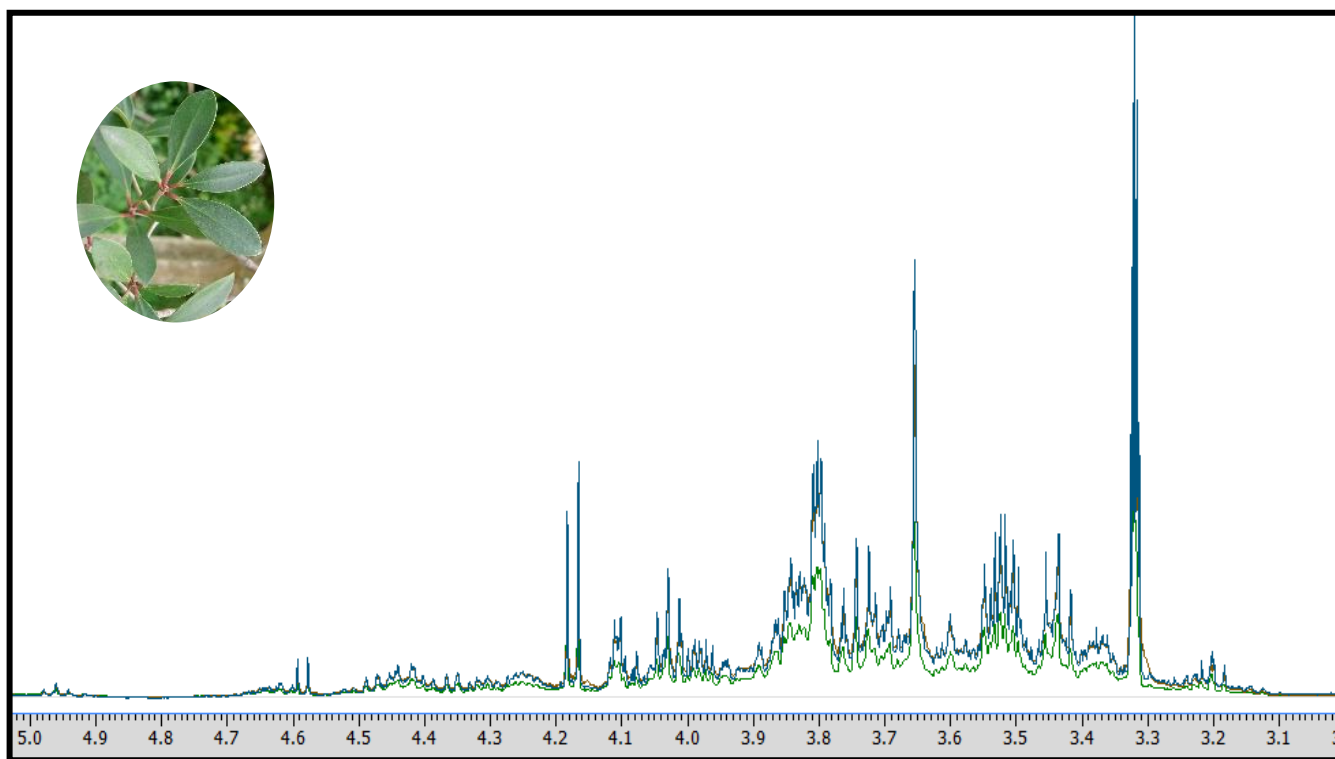


Figura 14. Comparación de los espectros obtenidos de diferentes días (1, 2 y 3) de hojas del mes de diciembre (región 3-5 ppm) línea verde (día 3).



Por otra parte, en la región de 0-3 ppm de los espectros (figura 15) se pueden encontrar una gran diversidad de señales, principalmente de grupos metilos y metilénicos, que son sustituyentes y partes del esqueleto carbonado muy comunes en diversos compuestos como: terpenos, saponinas, alcaloides, aminoácidos y ácidos grasos. En esta región el perfil metabólico se mantiene estable en los primeros dos días, sin embargo, la intensidad de algunas señales se ve afectada al tercer día. Algunos aminoácidos son sensibles a la luz, tales como la valina y la alanina que poseen grupos metilo como radicales (presentes en la región de 0-3 ppm), pueden verse afectados por procesos de fotooxidación (Igarashi et al., 2007). Por otra parte, cambios bruscos de temperatura puede llevar a una descomposición de estos compuestos disminuyendo su contenido y por lo tanto alterando el perfil en esta región (Weiss et al., 2018).

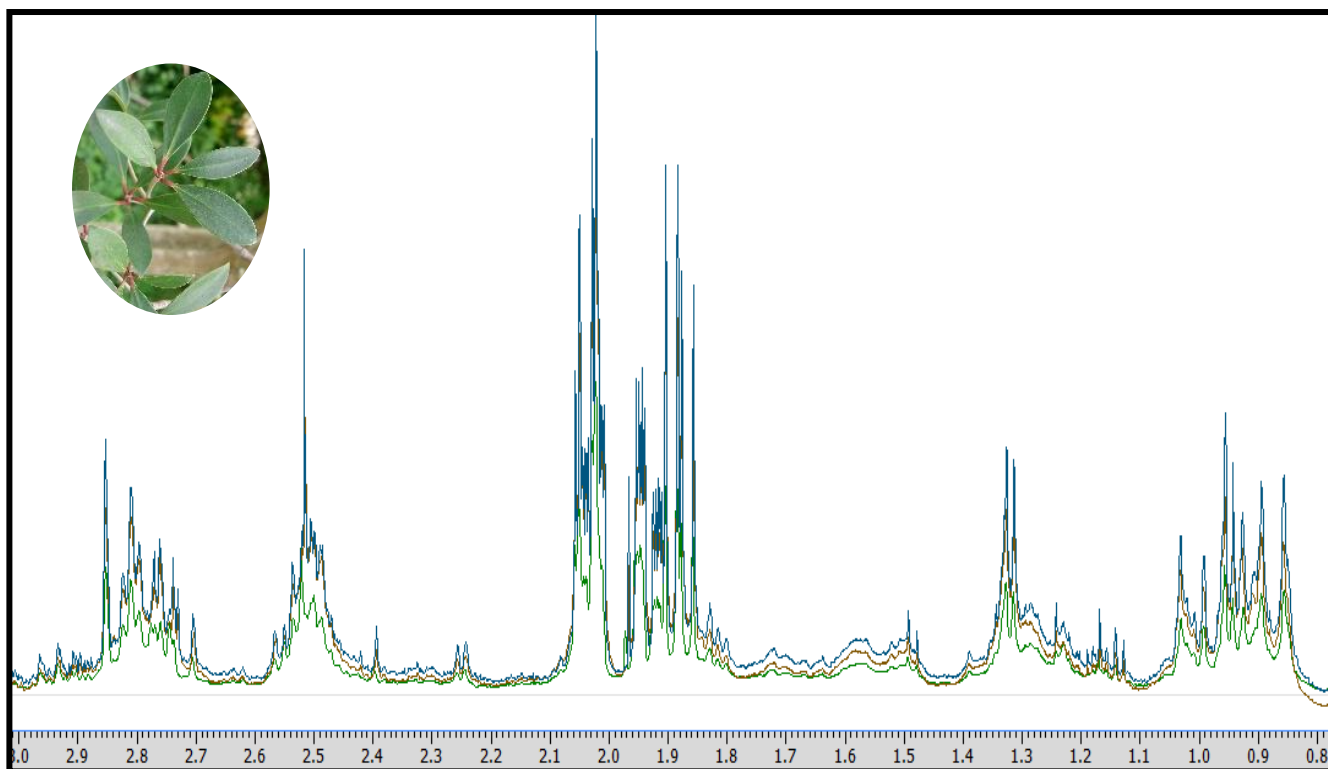


Figura 15. Comparación de los espectros obtenidos de diferentes días (1, 2 y 3) de hojas del mes de diciembre (región 0-3 ppm) línea verde (día 3).

Las señales presentes en el espectro se integraron por región para determinar que tanto se ve afectado el perfil metabólico de las hojas en términos de contenido (figura 16).

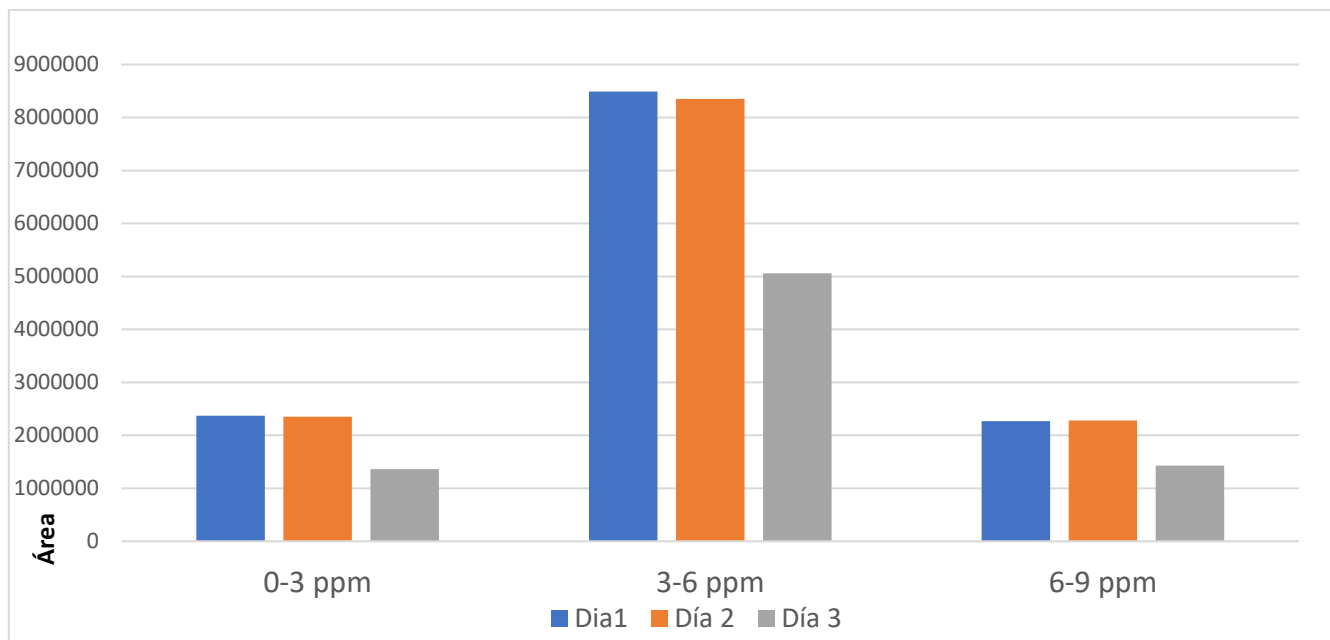


Figura 16. Variación del contenido metabólico de la misma muestra procesada en 3 días diferentes. El eje "y" representa la intensidad de las señales de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtenidos a partir de la integración de sus áreas de los espectros analizados.

La disminución en la intensidad de las señales se traduce como una pérdida o degradación de los metabolitos presentes en el extracto. La región de 0-3 ppm es la que presenta una mayor disminución (43%) en la intensidad, posiblemente por la degradación de compuestos por efecto de la temperatura, luz y el tiempo. Del día 1 al 2 el perfil metabólico se mantiene estable con menos del 5% de disminución en las señales en cada región. A partir del tercer día el perfil varió sustancialmente con una disminución mayor al 35% en cada región. Por este motivo todas las muestras analizadas se procesaron el mismo día que se preparó el extracto para evitar variaciones en el perfil metabólico.

## 2.2.2 Perfil metabolómico general de hojas

La RMN  $^1\text{H}$  es una herramienta práctica en el estudio de plantas ya que te permite observar el panorama (espacial y temporal) de los metabolitos presentes en una muestra vegetal. Una vez obtenidos los registros de RMN  $^1\text{H}$  de hojas de una población de *T. pringlei* se identificó a que metabolitos correspondían las señales presentes en los espectros de protónica (figura 17). Todas las señales identificadas en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se en listan en el anexo I.

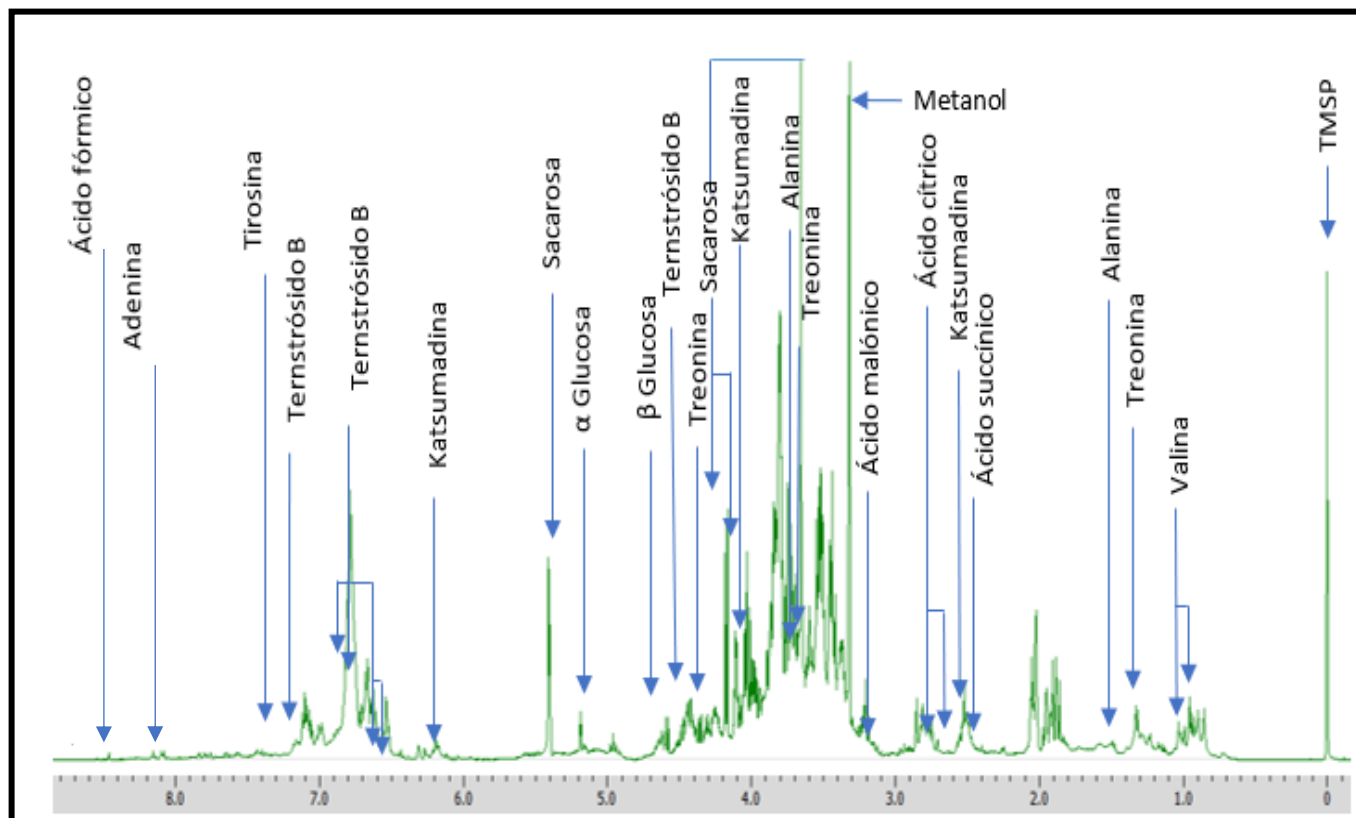


Figura 17. Compuestos identificados en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de hojas.

A través del análisis de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento se lograron identificar en los extractos de hojas señales de carbohidratos esenciales involucrados en el metabolismo central de las plantas, como la sacarosa y sus monómeros en forma libre. Se determinó la presencia de la sacarosa a partir de los 2 dobletes anoméricos característicos de esta molécula que resuenan a  $\delta$  5.41 (d,  $J=3.97$  Hz) y  $\delta$  4.18 (d,  $J=8.85$  Hz). El monosacárido de glucosa se identificó por el átomo de hidrogeno del carbón anomérico ( $\delta$  5.2, d,  $J= 3.66$  Hz) y el de fructosa por los átomos de hidrogeno unidos al C-4 ( $\delta$  3.9, d,  $J= 9.9, 3.46$  Hz) y C-6 ( $\delta$  4.02, dd,  $J=12.8, 1.0$  Hz).

La multiplicidad de las señales de estos átomos se mantiene al formar el disacárido de sacarosa, pero el desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento cambian debido a que el entorno químico de la molécula es diferente en comparación al de los monosacáridos.

También se lograron identificar ácidos orgánicos como: acético ( $\delta$  1.905, s), succínico ( $\delta$  2.39, s), cítrico ( $\delta$  2.56, d,  $J=15.87$  Hz y  $\delta$  2.73, d,  $J=15.56$  Hz), malónico ( $\delta$  3.1, s) y fórmico ( $\delta$  8.45, s). Los cuales ocupan una posición central en el metabolismo de las plantas por su estrecha relación metabólica con grasas, carbohidratos y proteínas. Además, son productos tempranos de la fotosíntesis y, como tales, sirven como precursores para la síntesis de muchos otros compuestos (Burris 1953). También surgen como productos de la degradación de entidades químicas más reducidas en la planta y están involucrados en mecanismos de defensa en contra de plagas (Sánchez et al., 2017), por lo que estos metabolitos están presentes de manera constitutiva.

A campo alto se identificó un singülete ( $\delta$  1.90) característico del ácido acético, debido a la protección que ejercen los átomos de hidrógeno esta señal aparece a campo alto. Este metabolito en hojas aumenta la resistencia contra estrés por sequía (Raseed et al., 2008) y sus derivados están involucrados en el transporte de nutrientes en tejidos meristemáticos (Booth et al., 1962).

El ácido succínico sólo presenta una señal ( $\delta$  2.39, s) en los espectros de protón al igual que el ácido acético, se debe a la equivalencia química de la molécula. Por otra parte, el ácido cítrico se identificó mediante los hidrógenos del C-2 ( $\delta$  2.56 d,  $J=15.87$  Hz) y C-4 ( $\delta$  2.73 d,  $J=15.56$  Hz)

El ácido malónico fue identificado gracias los hidrógenos metilénicos del C-2 ( $\delta$  3.1, s), siendo que estos átomos son químicamente equivalentes debido a que tienen entornos químicos idénticos, por lo que resuenan a la misma frecuencia y aparecen en el espectro como una única señal. Este ácido proviene de la oxidación del ácido málico, el cual juega un papel muy importante en el metabolismo y homeostasis de las plantas (Finkemeier et al., 2009).

A campo más bajo se logró identificar una señal ( $\delta$  8.46, s) característica de otro ácido orgánico, el ácido fórmico, que es conocido por ser el ácido carboxílico más sencillo e intermediario metabólico en plantas.

Dentro de los compuestos que se caracterizaron se encuentran cuatro aminoácidos: valina, alanina, treonina y tirosina. Los tres primeros se identificaron gracias a los dobletes correspondientes a los grupos metilo en su estructura que se presentan a campo alto debido al efecto protector que ejercen los tres átomos de hidrógeno de estos grupos. Por otra parte, tirosina se identificó mediante los átomos de hidrogeno del anillo aromático ( $\delta$  6.89, 7.18 t,  $J=$  8.54 Hz).

También se identificaron las señales ( $\delta$  2.30, t,  $J=7.32$  Hz,  $\delta$ 3.02, t,  $J=7.6$  Hz) del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Este compuesto es un aminoácido no proteico cuya síntesis en plantas aumenta en respuesta a extremas temperaturas, deshidratación, salinidad, estrés oxidativo, daños mecánicos en el tejido, acidosis, infección vírica y defensa contra herbívoros (Kinnersley et al 2000. Bouché et al. 2004).

Una vez identificados los principales metabolitos primarios en los perfiles bimestrales de hojas se utilizaron los registros de resonancia de los compuestos aislados de *T. pringlei*, en el 2015 por Salgado y colaboradores, para identificarlos en los espectros generados. El primer compuesto en ser identificado fue katsumadina (figura 18), un bifenílpropanoide presente en las flores de *T. pringlei*. Katsumadina fue identificado en flores de esta especie, sin embargo, su presencia en otros tejidos como el de hojas se puede deber a que este tipo de compuestos son componentes esenciales de polímeros estructurales, proporcionan protección contra la luz ultravioleta, herbívoros, patógenos, y median las interacciones planta-polinizador.

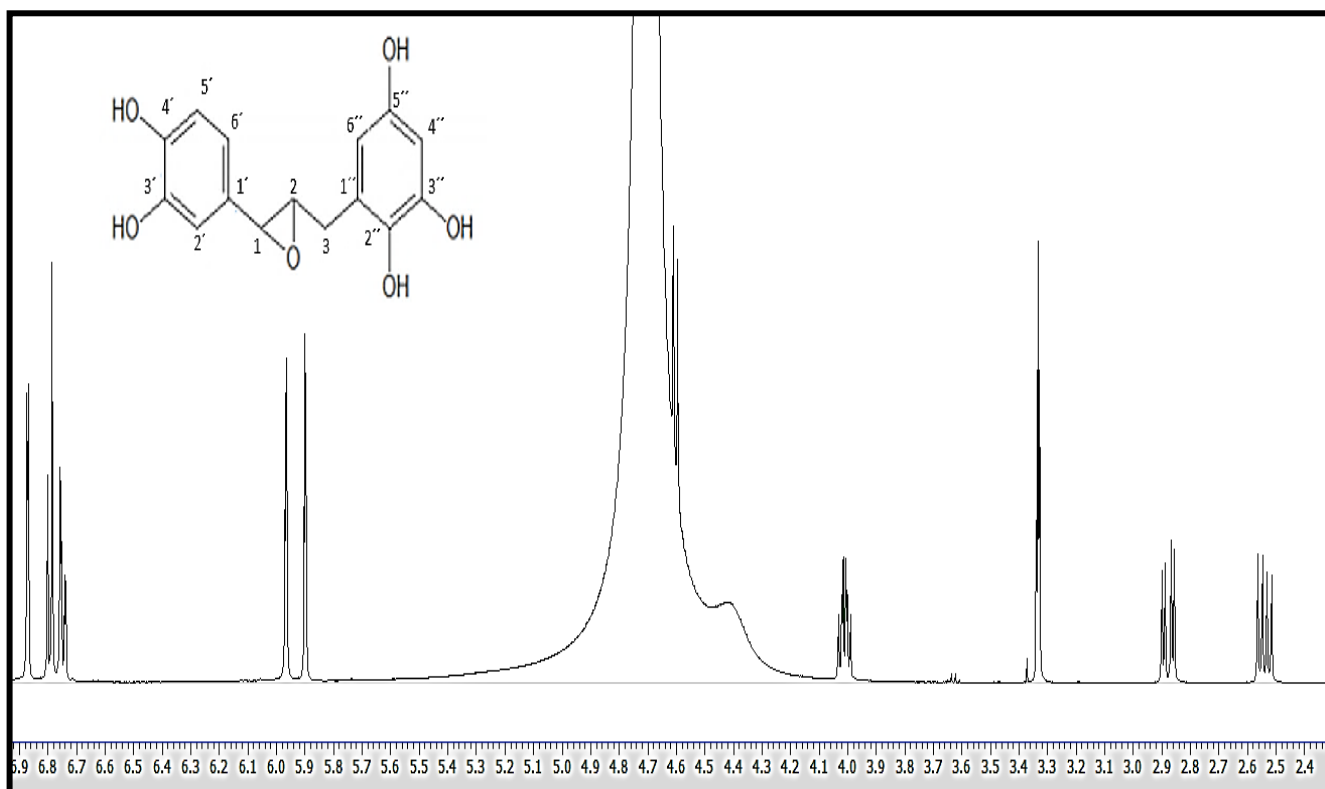


Figura 18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) del bifenílpropanoide Katsumadina.

Este bifenílpropanoide posee dos anillos aromáticos. Los hidrógenos de estos anillos generalmente resuenan a campo más bajo, por lo que estas señales aparecen a partir de 5.8 ppm. El hidrógeno del C-2' del anillo trisustituído acopla con el hidrógeno de la posición C-6'. Este acoplamiento es de tipo meta, ya que están distantes a cuatro enlaces, con constantes de acoplamiento de  $J=1.9$  Hz.

Al sólo interactuar con el hidrógeno de la posición C-6' genera un doblete (6.86 ppm y  $J=8.24$ Hz). El hidrógeno en la posición C-6' al interactuar con el hidrógeno en la posición C-

5' generaría un doblete, sin embargo, la multiplicidad de la señal de este átomo se hace más compleja, como un doble doblete, al interactuar con el hidrógeno de la posición C-2', cuyo acoplamiento entre estos hidrógenos es de tipo orto ya que la distancia entre ellos es de tres enlaces.

A diferencia de los acoplamientos tipo meta la constante de acoplamiento orto son más grandes (figura 19). Al interactuar con estos dos hidrógenos se genera un doble doblete con constantes de acoplamiento de  $J=1.9$  y  $8.2$  Hz (6.72 y 6.78 ppm). El hidrógeno en la posición C-5' al sólo interactuar con el H de la posición C-6' genera un doblete como señal con una  $J=1.9$  Hz (6.74 ppm).

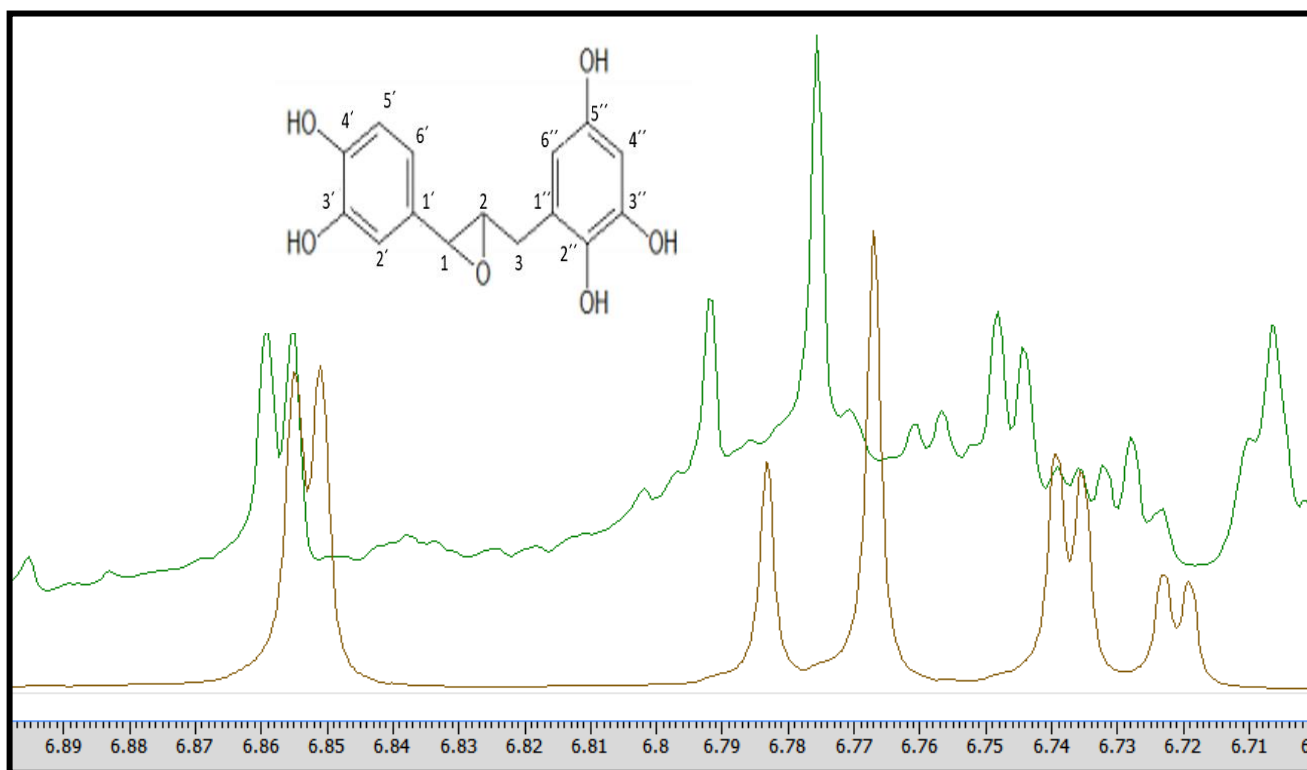


Figura 19. Identificación de las señales del anillo trisustituído de katsumadina (café) en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) de hojas (verde).

Las señales que aparecen en 5.95 y 5.88 ppm corresponden a los hidrógenos en las posiciones 4'' y 6'', respectivamente, del anillo tetrasustituído. Los hidrógenos en estas posiciones sólo acoplan entre sí por lo que generan una multiplicidad de dos dobletes (figura 20). Las constantes de acoplamiento de estas señales son pequeñas ( $J=2.3$  Hz) debido a que tienen un acoplamiento tipo meta.

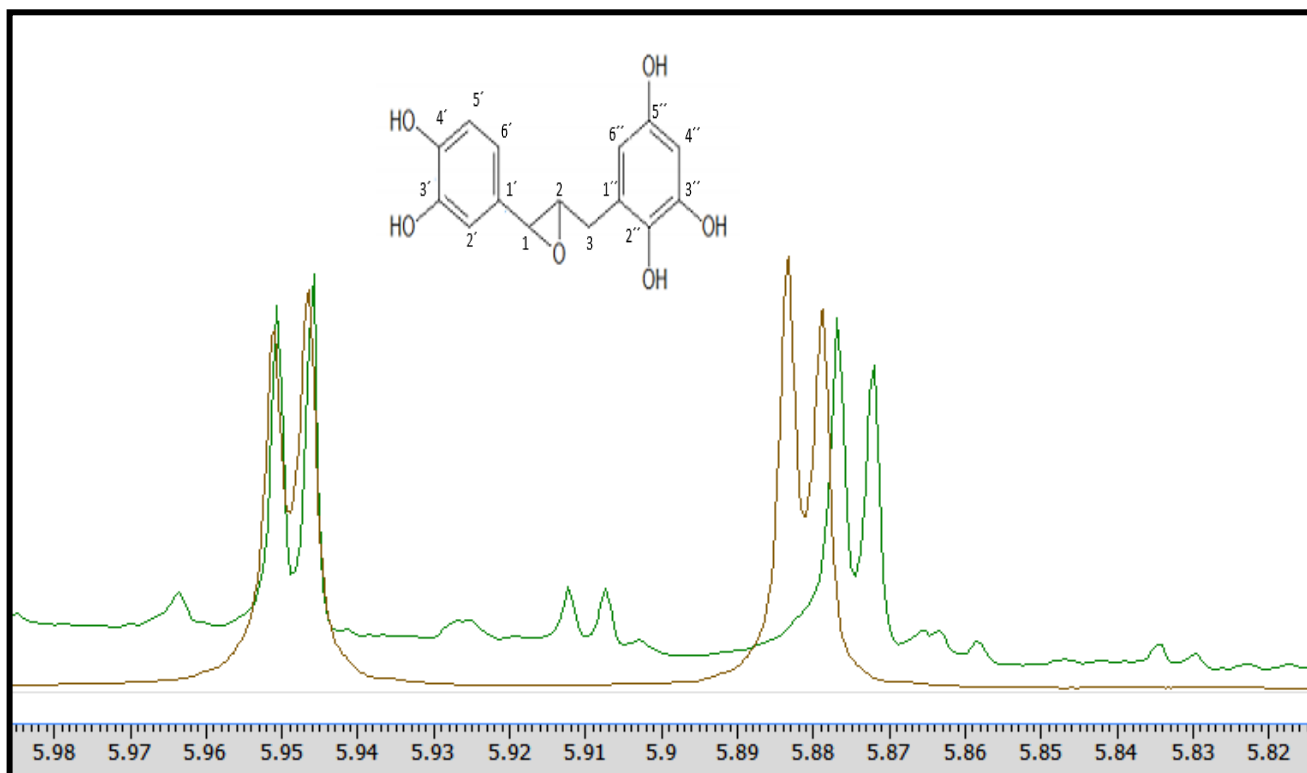


Figura 20. Identificación de las señales correspondientes a los protones del anillo tetrasustituído de katsumadina (café)  $\delta$  5.95 (d,  $J= 2.44$  Hz) y 5.88 (d,  $J= 2.44$  Hz) en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de hojas.

Las señales que aparecen a campo más alto corresponden a los átomos de hidrógeno del C-1, C-2 y C-3 del enlace propanoico. Los hidrógenos del grupo metilénico en C-3 presentan un doblete de dobles cada uno, con desplazamientos químicos de  $\delta$  2.78, dd  $J=16.0, 3.4$  Hz  $\delta$  2.44, dd,  $J= 16.0, 8.8$  (figura 21).



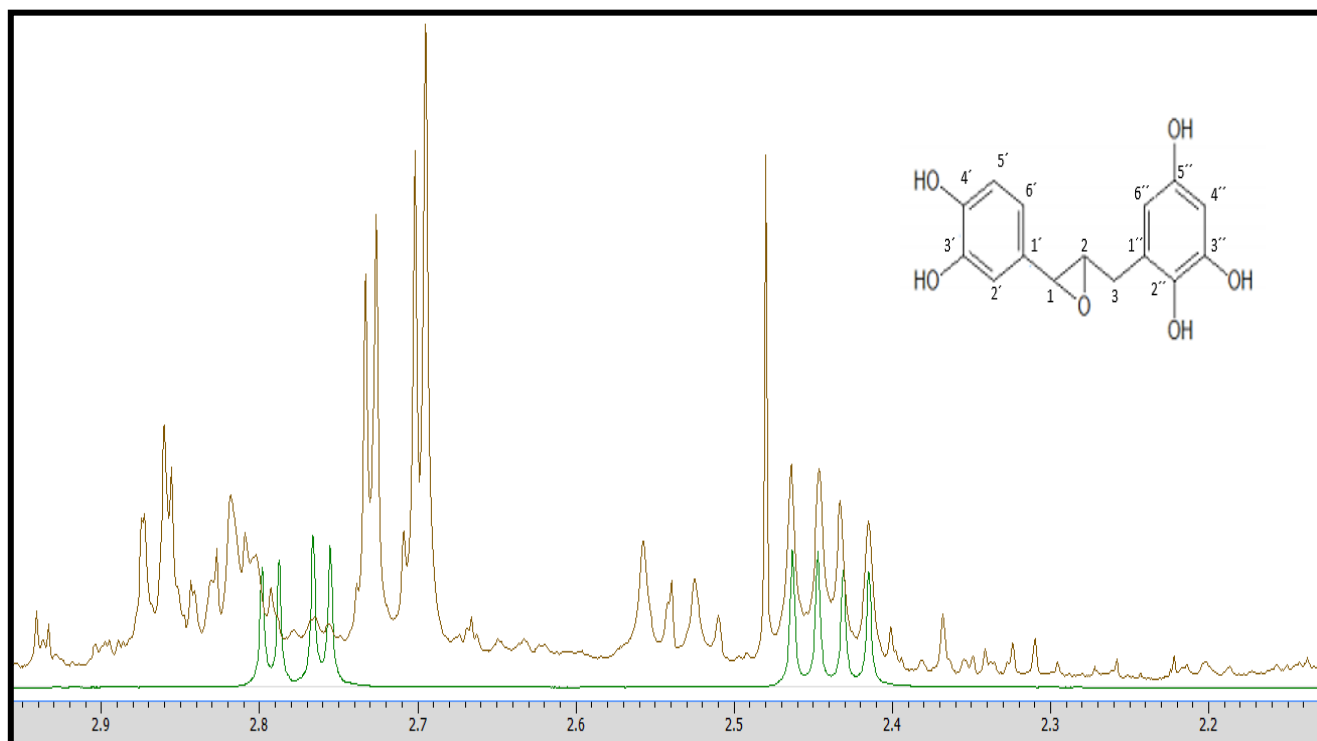


Figura 21. Identificación de señales de katsumadina (verde) correspondiente a los hidrógenos metilénicos (C-3) en  $\delta$  2.78 y  $\delta$  2.44 en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) de hojas (café).

También se compararon las señales de RMN  $^1\text{H}$  del FeGlu "Tilósido A" aislado de *T. pringlei* (Salgado *et al*, 2015) con los espectros de hojas. A pesar de que las señales de este compuesto en el espectro no se ven muy definidas, debido a su baja concentración en el extracto, se alcanza a observar la presencia de sus señales aromáticas. Es importante recordar que la intensidad de las señales depende de la concentración del compuesto en el extracto y que la RMN es un método analítico de baja sensibilidad. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del tilósido A muestra la presencia de un grupo quinol en  $\delta$  7.1 (2H, d, 10.1 Hz; H-2'' y H-6'') y  $\delta$  6.5 (2H, d, 10.1 Hz; H-3'' y H-5''), correspondiente a un sistema de espines AA'BB'' (figura 22).

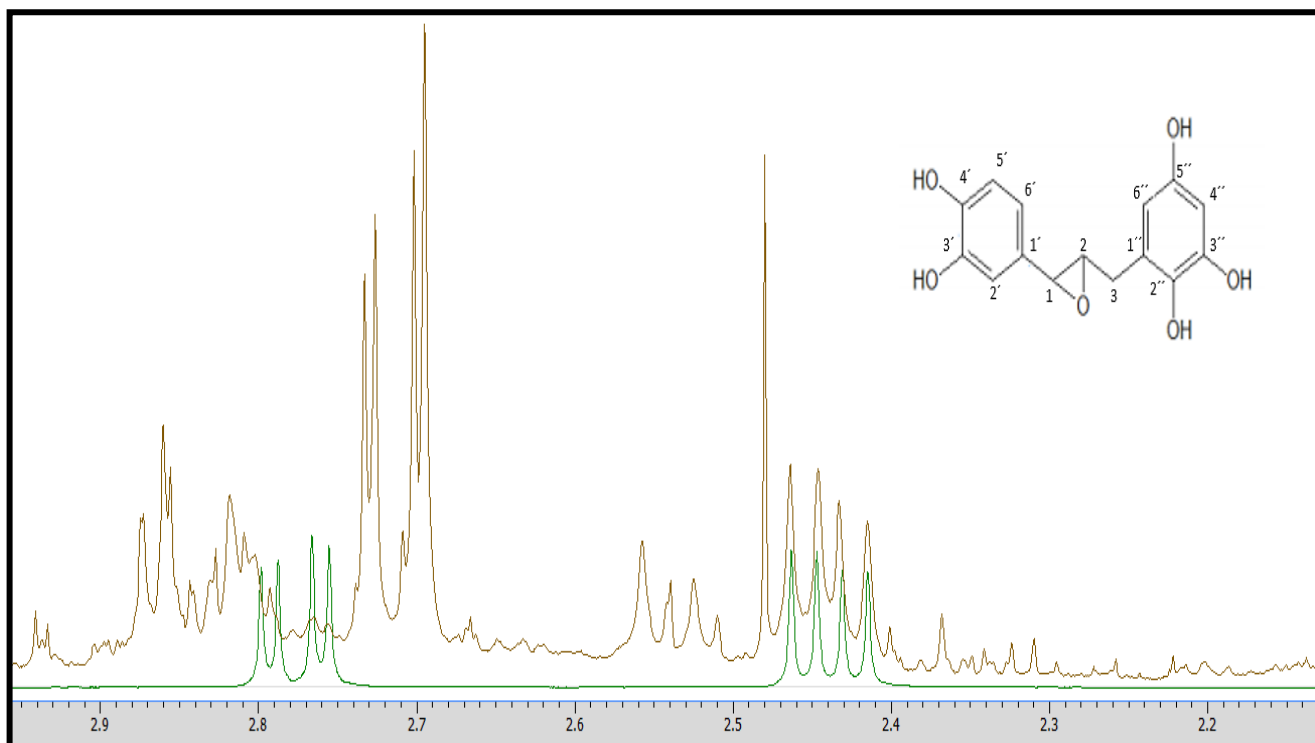


Figura 22. Identificación de las señales de los protones aromáticos de Tilósido A (verde) en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de hojas (café).

También se compararon las señales de RMN  $^1\text{H}$  del FeGlu “Tilósido A” aislado de *T. pringlei* (Salgado *et al*, 2015) con los espectros de hojas. A pesar de que las señales de este compuesto en el espectro no se ven muy definidas, debido a su baja concentración en el extracto, se alcanza a observar la presencia de sus señales aromáticas. Es importante recordar que la intensidad de las señales depende de la concentración del compuesto en el extracto y que la RMN es un método analítico de baja sensibilidad. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del tilósido A muestra la presencia de un grupo quinol en  $\delta$  7.1 (2H, d, 10.1 Hz; H-2'' y H-6'') y  $\delta$  6.5 (2H, d, 10.1 Hz; H-3'' y H-5''), correspondiente a un sistema de espines AA'BB'' (figura 23).

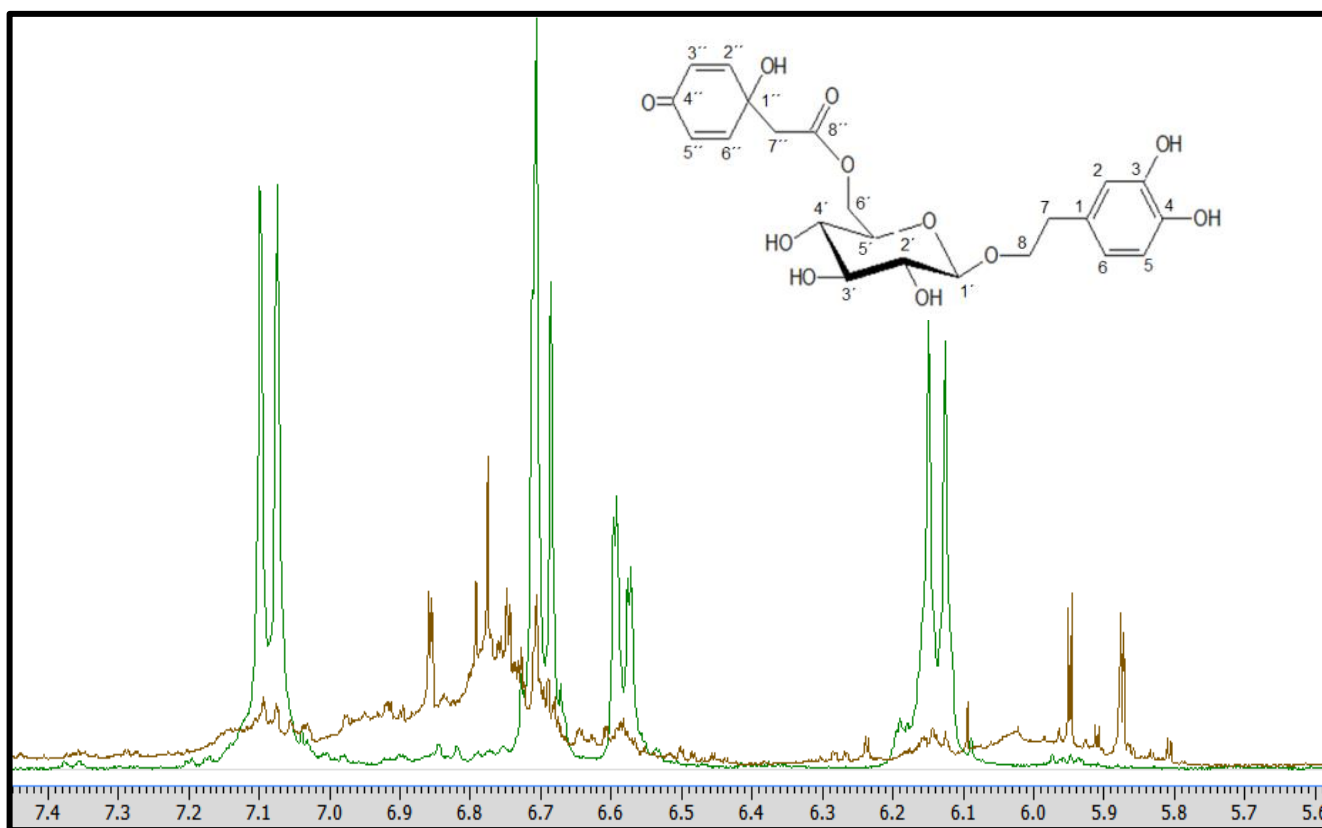


Figura 23. Identificación de las señales de los protones aromáticos de Tilósido A (verde) en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de hojas (café).

Además, el multiplete presente en  $\delta$  2.74 ppm indica la presencia de un grupo metileno en la posición H-7''. El hidrógeno anomérico del azúcar se presenta en forma de doblete en  $\delta$  4.29 con constantes de acoplamiento de 8.0 Hz.

### 2.2.3 Variaciones bimestrales en el perfil metabolómico de hojas

El perfil metabolómico de una planta varía en función de los requerimientos metabólicos, que a su vez se ven influenciados por varios factores que pueden ser tanto intrínsecos como extrínsecos. La colecta del material vegetal es uno de los factores más importantes que pueden afectar el contenido metabólico ya que involucra aspectos importantes como temperatura, índice pluviométrico, radiación UV, estadio de desarrollo, entre otros.

Al compararse los perfiles de hojas de las colectas bimestrales (dic, feb, abr, jun y ago), se pudieron visualizar diferencias en el contenido metabolómico de cada periodo, siendo que al pasar el tiempo el comportamiento del perfil cambia (figura 24).

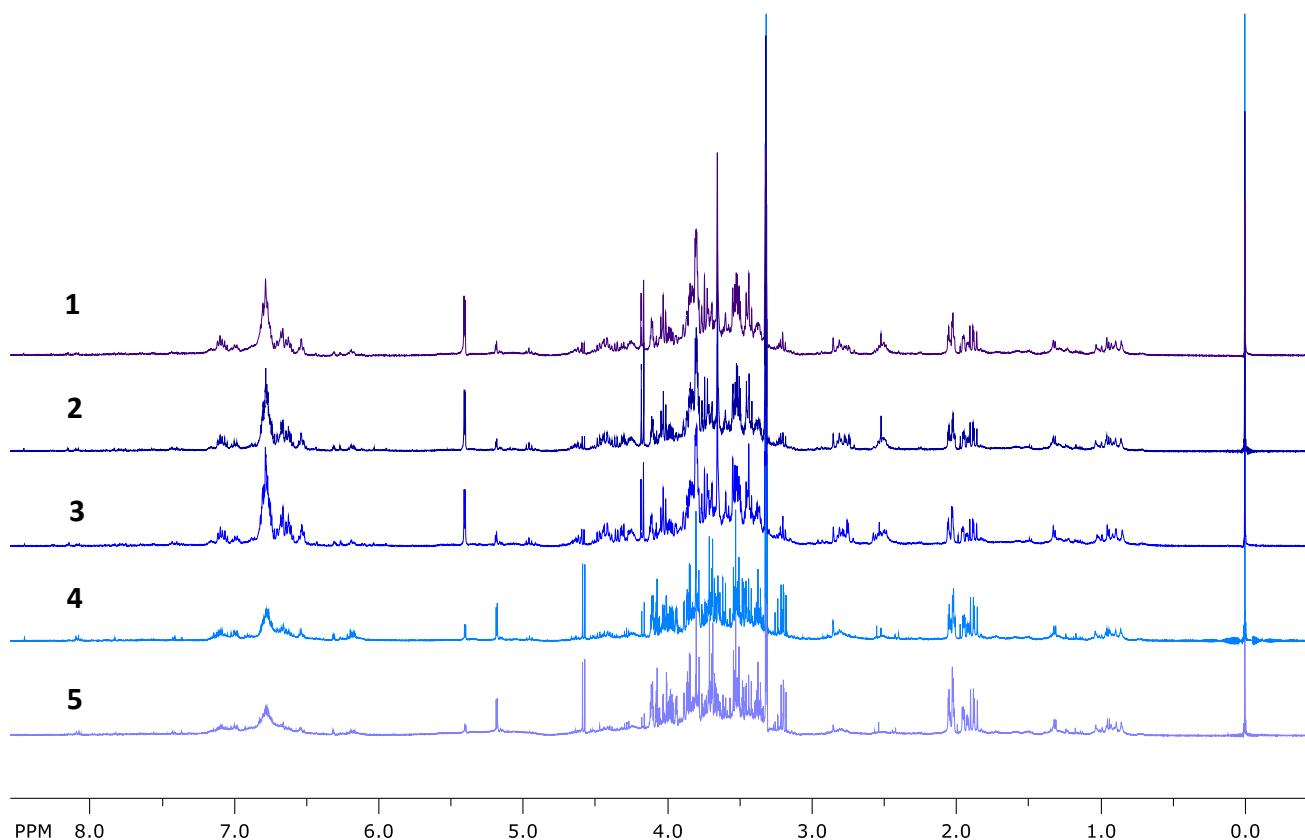


Figura 24. Comparación de los perfiles metabolómicos de hojas 1) diciembre, 2) febrero, 3) abril, 4) junio y 5) agosto.

Se integraron todas las señales presentes en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de cada bimestre para comparar la totalidad del contenido metabólico. Mediante ANOVA de una vía se determinó que no hubo diferencia estadísticamente significativa en el total del contenido metabólico bimestral ( $P>0.05$ ). Sin embargo, comparando los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se pueden observar diferencias en determinadas zonas de desplazamientos químicos, por lo que se eligieron algunos intervalos de análisis, con la integración de las señales por área (9-6, 6-3 y 3-0 ppm) para analizar la variación bimestral del metaboloma.

En el caso de la región de 9-6 ppm claramente se ve una diferencia en la disminución del contenido aromático en los meses de junio y agosto con respecto a diciembre, febrero y abril. Al integrarse esta región se pudo observar que en los meses de febrero, abril y junio el descenso en el contenido aromático aumentó al doble con respecto al bimestre anterior, hasta llegar a agosto, que no mostró una diferencia significativa con respecto a junio ( $P>0.05$ ). Es decir, de diciembre a febrero disminuye un 10%, de febrero a abril 20% y 40% de abril a junio. En total de diciembre a junio/agosto hubo una disminución del 50% en el contenido metabólico de la región de 6-9 ppm (Figura 25).

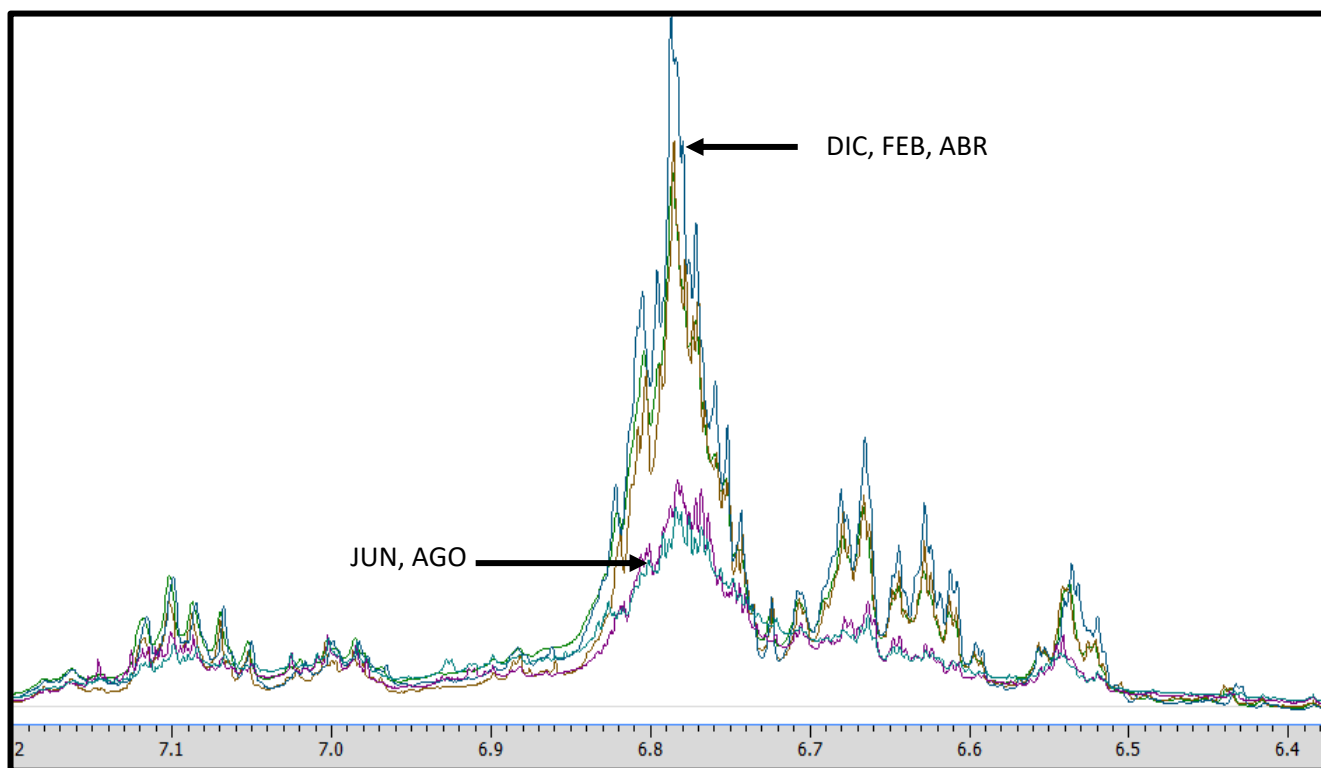


Figura 25. Comparación del contenido metabólico bimestral observado en la región aromática de 6-9 ppm (ampliación del espectro de 6.4-7.2 ppm) de los espectros de RMN $^1\text{H}$  de DIC-FEB-ABR-JUN-AGO.

Al analizar la zona de 3-6 ppm (figura 26) visualmente se ven algunas diferencias marcadas entre los perfiles. Se pueden notar cambios importantes en la intensidad de algunas señales que sólo aparecen en determinados meses. También hay variaciones en señales de carbohidratos como sacarosa ( $\delta$  5.4, 4.18) y glucosa ( $\delta$  5.19, 4.58

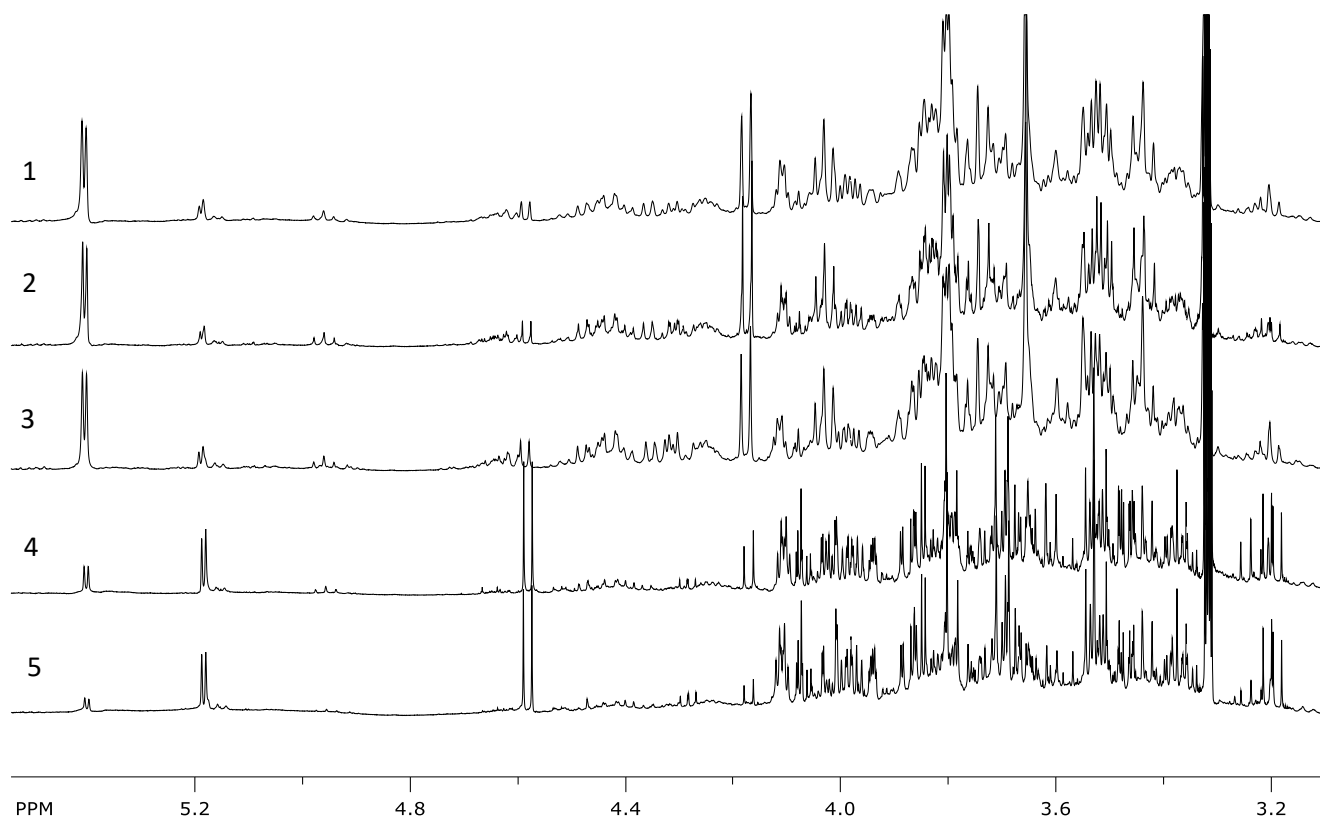


Figura 26. Comparación del contenido metabólico bimestral observado en la región de 3-6 ppm (ampliación del espectro de 3.2-5.4 ppm) en los espectros de RMN<sup>1</sup>H de 1) Diciembre, 2) Febrero, 3) Abril, 4) Junio y 5) Agosto.

La región de 0 a 3 ppm presenta un comportamiento similar a la región aromática, en la que se ve una disminución en el contenido metabólico de esta zona, sin embargo, esta disminución se centra en un área en particular (2.4-3.0 ppm) en la que se presentan señales de ácidos orgánicos como succínico y cítrico (figura 27).

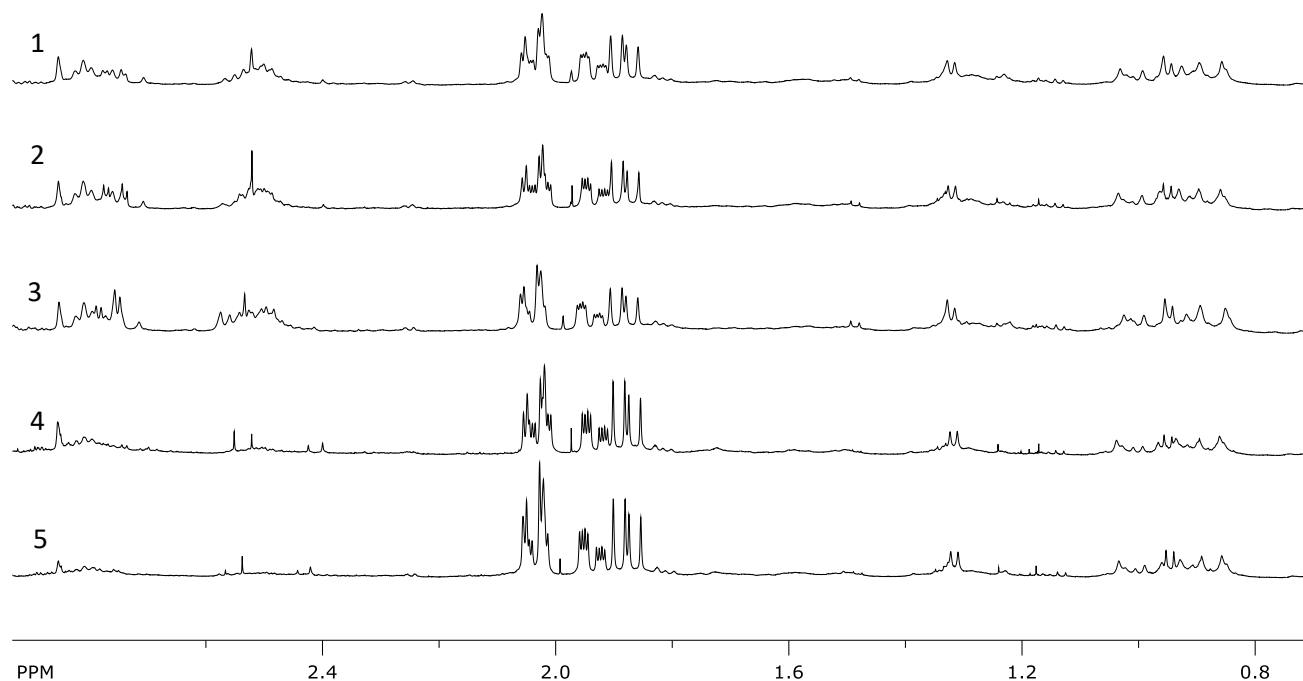


Figura 27. Comparación del contenido metabólico bimestral observado en la región de 0-3 ppm (ampliación del espectro de 0.8-2.6 ppm) en los espectros de RMN<sup>1</sup>H de 1) Diciembre, 2) Febrero, 3) Abril, 4) Junio y 5) Agosto.

En general cada región del espectro de RMN <sup>1</sup>H de las muestras analizadas sigue un patrón similar, teniendo un mayor contenido de metabolitos en el mes de diciembre (Figura 28). La región de carbohidratos es de 3-4 veces mayor que las demás regiones, que posiblemente se debe a que estos compuestos son la base para la síntesis de moléculas más complejas y sirven como fuente de esqueletos carbonados para la mayoría de los metabolitos producidos por las plantas.

La región aromática fue la que presentó una mayor disminución en su contenido (60%), seguido de la región de 0-3 ppm en la que generalmente se encuentran señales de metabolitos como aminoácidos, triterpenos y ácidos orgánicos. El comportamiento de las señales en estas regiones responde al contenido metabólico de carbohidratos, ya que al disminuir estos hay una menor disponibilidad de fuente de carbono para sintetizar este tipo de metabolitos secundarios.

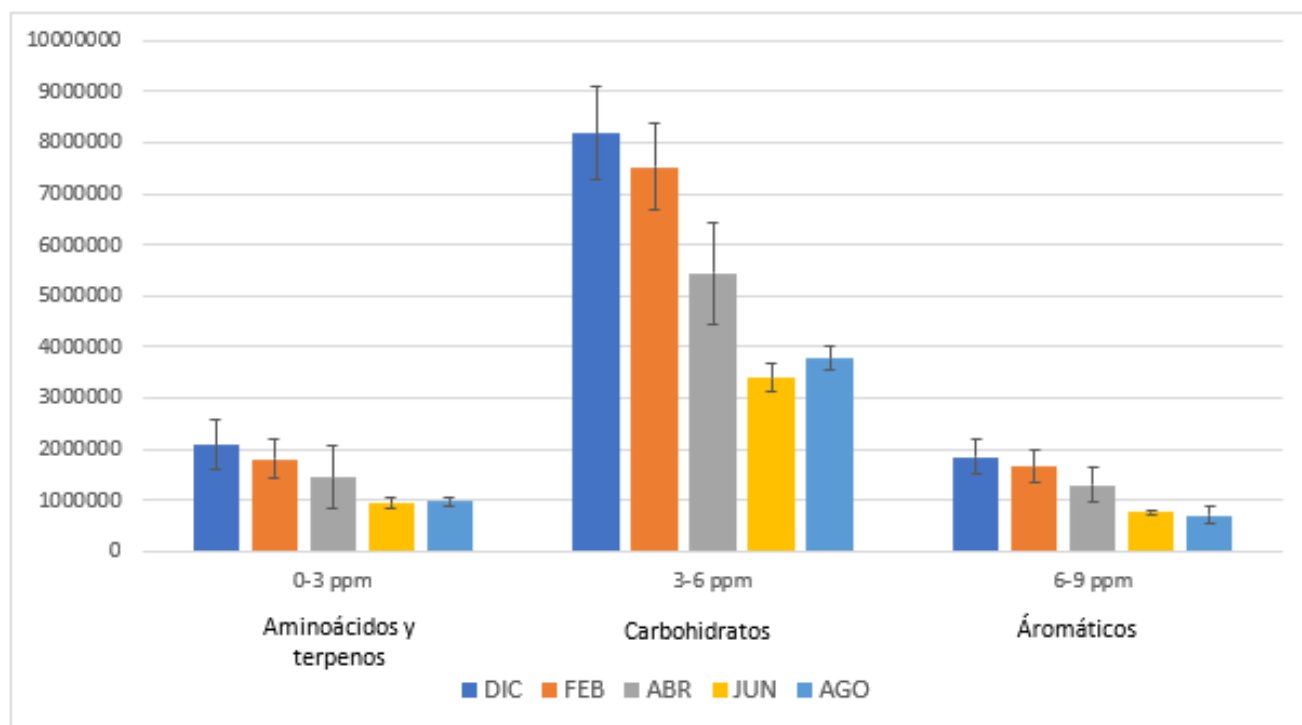


Figura 28. Comparación bimestral del contenido metabólico de cada región de espectro de RMN  $^1\text{H}$  de muestras recolectadas en diferentes épocas del año.



En los perfiles de hojas se encontraron 424 señales diferentes, de las cuales solo 196 están presentes en todos los meses y corresponden al 46.22% del total de señales que se visualizaron en los espectros obtenidos por RMN <sup>1</sup>H. Algunas de estas señales corresponden a metabolitos esenciales en la bioquímica interna de las hojas como carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa), aminoácidos (treonina, alanina, valina) y ácidos orgánicos (cítrico, acético, malónico, fórmico). Todas las señales presentes en los espectros se graficaron en un diagrama de Venn de 5 conjuntos para determinar las variaciones bimestrales en los perfiles. (figura 29).

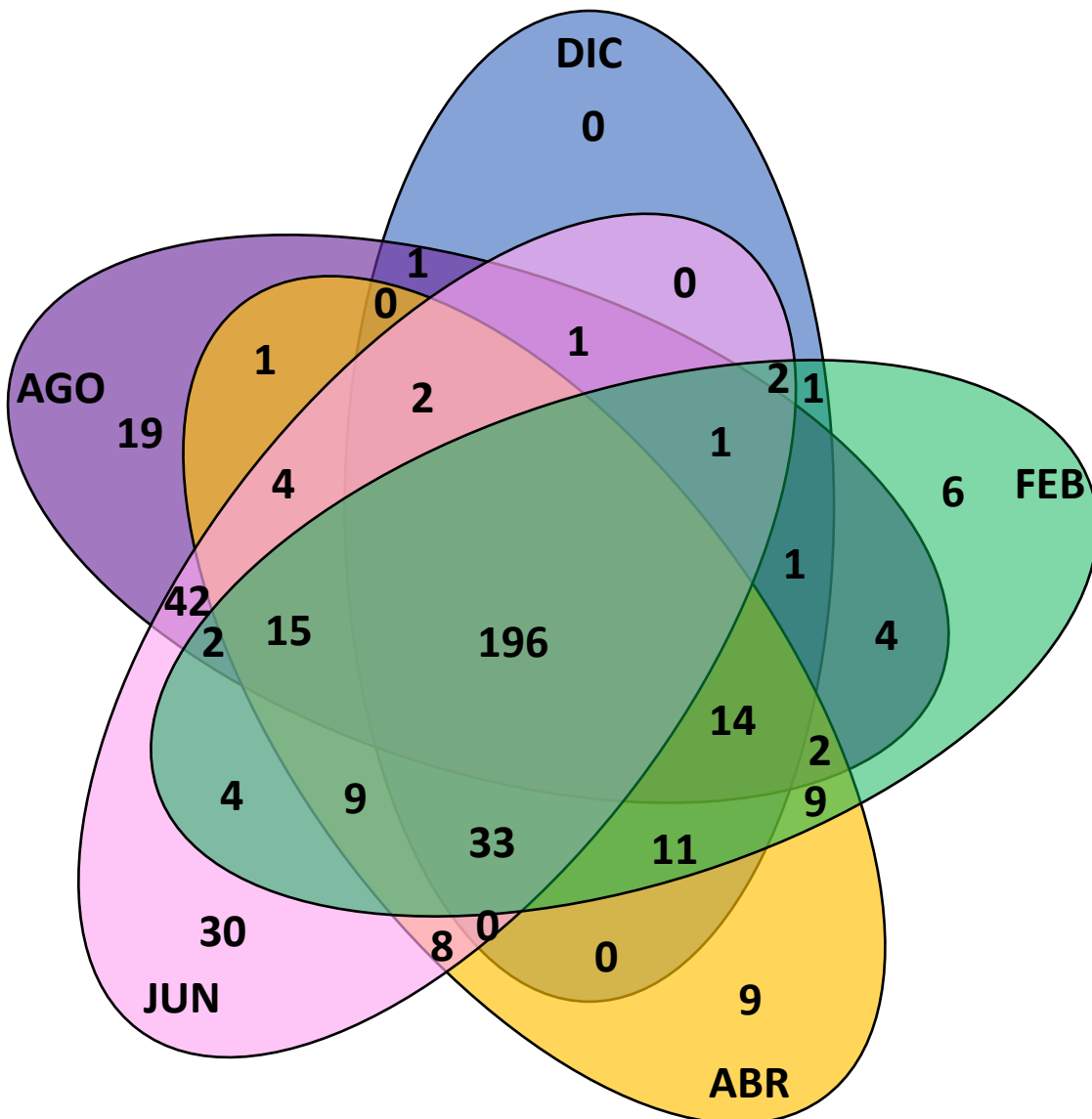


Figura 29. Relaciones entre perfiles de hojas con respecto a la presencia de señales

El mes que presentó el menor contenido de señales fue diciembre (263), siendo que junio mostró un mayor número de metabolitos (347). Estos dos meses comparten entre sí 236 señales que corresponde al 89.35 y 67.91 % del contenido de cada uno respectivamente. Además de presentar un mayor contenido junio difiere con respecto a diciembre en 112 señales, es decir un tercio de su contenido.

En el caso de los meses de febrero (310), abril (313) y agosto (304) no hubo diferencia significativa en el contenido de metabolitos ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, en cada uno de estos meses, junto con junio, se presentan señales que no se encuentran en ningún otro mes. Aunque estas señales no se han identificado a que compuestos corresponden, estos resultados sugieren que algunos metabolitos se sintetizan exclusivamente en determinados meses.

No sólo hay diferencias en la cantidad de señales que se presentan en cada perfil, sino también en la intensidad de estas. La intensidad de las señales está relacionada a la concentración de los metabolitos. Al compararse los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se puede observar que algunas señales varían conforme pasa el tiempo (figura 24), principalmente las que están relacionadas al metabolismo primario de la planta como sacarosa ( $\delta$  5.4, 4.1), glucosa ( $\delta$  5.2, 4.6) y fructosa ( $\delta$  3.89, 3.56), entre otras.

Se integraron todas las señales de RMN  $^1\text{H}$  identificadas en el perfil metabólico de hojas en *T. pringlei* y se comparó su variación bimestral (figura 30).

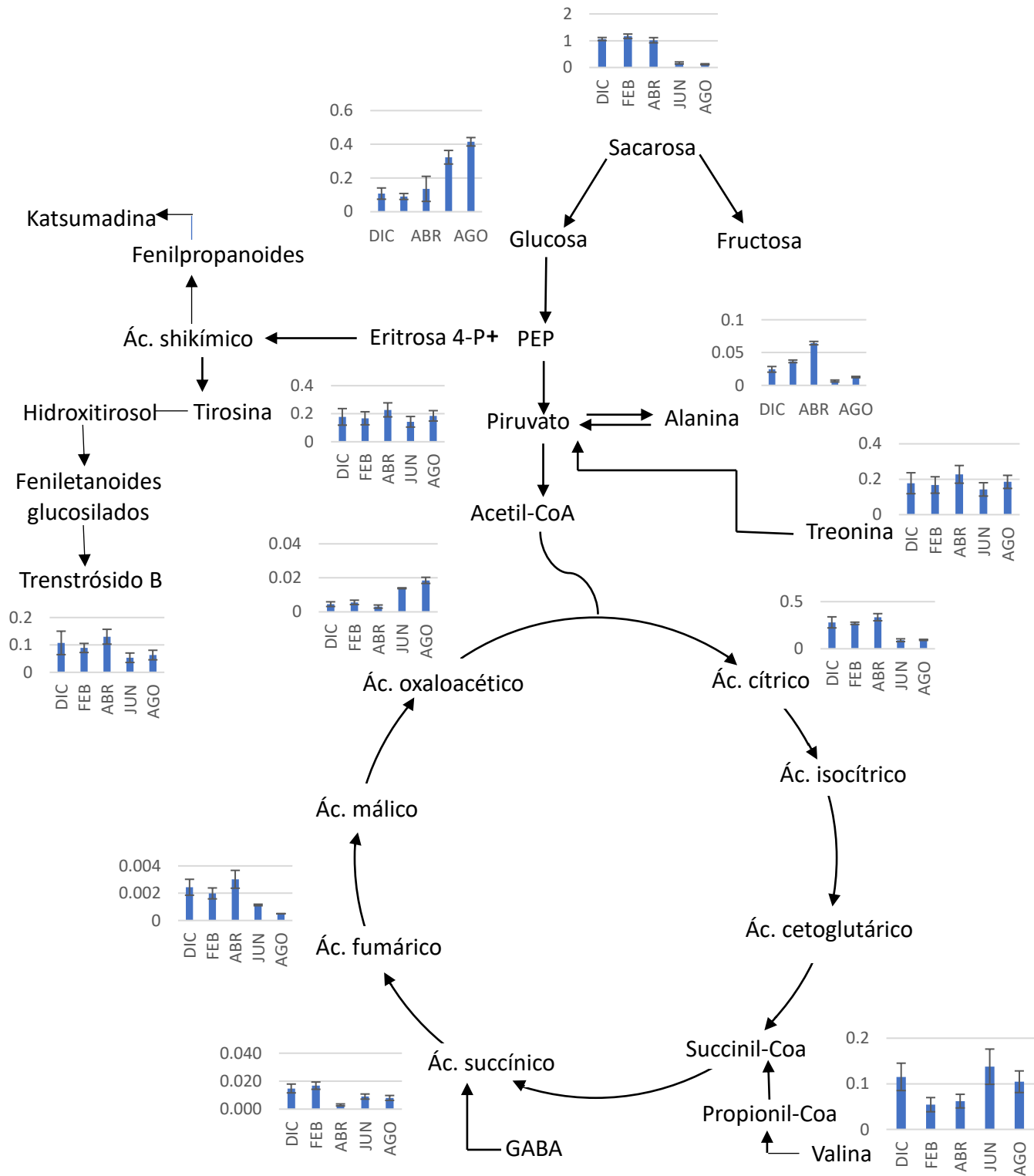


Figura 30. Variación bimestral del metabolismo primario en hojas de *T. pringlei*

## Bibliografía

- Sheila Sánchez Fermín “La industria del té comienza a ganar mercado en México” *Expansión en alianza con cw*. Enero 2018.
- Claudia, M. (2013). Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Ternstroemia sylvatica*. (Tesis de maestría). Universidad veracruzana, Xalapa, Veracruz.
- Davis, E. M. (2010). *Advances in the Enzymology of Monoterpene Cyclization Reactions. Comprehensive Natural Products II, 585–608*.
- FRANCIS, M. J. O., BANTHORPE, D. V., & LE PATOUREL, G. N. J. (1970). *Biosynthesis of Monoterpenes in Rose Flowers. Nature, 228(5275), 1005–1006*.
- Bouché N. and Fromm H. (2004). GABA in plants: just a metabolite?. *TRENDS in Plant Science. 9 (3): 110-115*.
- Weiss I. M., Muth C., Drumm. R. and Kirchner H. O. (2018). Thermal decomposition of the aminoacids glycine, cysteine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, arginine, and histidine. *BMC Biophysics. 11(1): 1-15*.
- Booth, A., Moorby, J., Davies, C. R., Jones, H. and Wareing, P. F. (1962). Effects of Indolyl-3-acetic acid on the movement of the nutrients within plants. *Nature, 194 (4824): 204-205*.
- Rasheed S., Bashir K., Kim J. M., Ando M., Tanaka M. and Seki M. (2018). The modulation of acetic acid pathway genes in *Arabidopsis* improves survival under drought stress. *Scientific reports. 8 (1): 1-15*.
- Sánchez H. and Morquecho A. (2017). Chemical plant defense against herbivores. Herbivores chapter 1.....
- Burriss R. H. (1953). Organic Acids in Plant Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology, 4 (1): 91-114*.
- Ramesh S. A., Tyerman S. D., Xu B., Bose J., Kaur S., Conn V., Domingos P., Ullah S., Wege S., Shabala S., Feijó J. A., Ryan P. R. and Gillham M. (2015). GABA signaling modulates plant growth by directing regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature communications. 6 (1) 1-9*.
- Kinnersley A. M. and Turano F. J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences. 19 (6): 479-509*.
- Igarashi N., Onoue S. and Tsuda Y. (2007). Photoreactivity of aminoacids: Tryptophan-induced photochemical events *via* reactive oxygen species generation. The Japan society for analytical chemistry. 23: 943-948.
- The Plant List (2010). Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).***

- Keng H. (1962). Comparative morphological studies in Theaceae. University of California publications in Botany 33:269-384.**
- Luna I. and Ochoterana H. (2004). Phylogenetic relationships of the genera of Theaceae based on morphology. Cladistics. 20: 223-270.**
- Bentham G. and Hooker J. D. (1862). Genera Plantarum, Vol. I. Reeve & Co., London. 177-188.**
- Bessey C. E. (1915). The phylogenetic taxonomy of flowering plants. Missouri Botanical Garden. 2: 109-164.
- Lawrence G. M. (1951). Taxonomy of Vascular Plants. Macmillan, New York.
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.
- Wood C. E. (1959). The genera of the Theaceae of the southeastern United States. Journal Arnold Arboretum. 40: 143-419.
- Carranza G. E. (1999). Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de ecología. Centro regional del bajío. Fascículo 73: 1-16.
- Smith N., Mori S. A., Henderson A., Stevenson D. W. and Heald S. V. (2004). Flowering plants of the neotropics. The New York Botanical Garden, Princeton University Press, New Jersey, USA.
- Clarence E. K. (1942). Studies in the Theaceae XII: Notes on the south American species of *Ternstroemia*.
- Guzmán S. L., Reyes R. and Bonilla H. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. Brazilian journal of pharmacognosy. 24:591-608.
- Cano A. L. (1997). Flora Medicinal de Veracruz. I. Inventario etnobotánico. 1ª Edición: 324-325.
- Chino V. and Jacques R. (1986). Contribución al conocimiento de la Flora Medicinal de Quimixtlán, Puebla. Tesis. Facultad de estudios superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cedillo P. (1990). Las plantas útiles del Municipio de Tepoztlán, Morelos, Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez M. D. (2003). Etnobotánica de huertos familiares, o solares en el poblado de Gabriel Esquinca, municipio de San Fernando, Chiapas, Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Martin G.J. (1996). Comparative ethnobotany of the Chinantec and Mixe of the Sierra Norte, Oaxaca, México. Thesis Ph. D. University of California, USA.

Ryman D. (1995). Enciclopedia de las plantas aromáticas y de sus aceites esenciales, Barcelona, Kairós.

Fernández P. (1987). Guía práctica de plantas medicinales. 4000 recetas para 600 enfermedades. Editorial Omega, S. A. Barcelona España, p. 406.

Yosioka I., Takeda R., Matsuda A. and Kitagawa A. (1971). Sapogenol constituents of seeds of *Camellia sasanqua* Thunb. and leaves of *Ternstroemia japonica* Thunb. Chem. Pharm. Bull. 20: 1237-1242.

Aguilar L. and Tortoriello J. (1996). Anticonvulsant and sedative effects of crude extracts of *Ternstroemia pringlei* and *Ruta chalepensis*. Phytotherapy research. 10:531-533.

Molina M., Contreras C. M., Tellez P. and Rodríguez F. (1999). Sedative actions of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. Phytomedicine. 6: 115-118.

Shin M. H., Wang W., Nam K. I., Jo Y., Jung J. H. and Im K. S. (2003). Triterpenoid saponins from the fruits of *Ternstroemia japonica*. Journal of Natural Products. 66: 1351-1355.

Ikuta A., Tomiyasu H., Morita Y. and Yoshimura K. (2003). Ursane and oleanane triterpenes from *Ternstroemia gymnanthera* callus tissues. Journal of Natural Products. 66: 1051-1054.

Jo Y., Suh J., Shin M., Jung J. H. and Im K. S. (2005). Jacaranone and related compounds from the fresh fruits of *Ternstroemia japonica* and their antioxidative activity. Archives of Pharmacal Research. 28:885-888.

Jo Y., Kim M., Shin M. H., Chung H. Y., Jung J. H. and Im K. S. (2006). Antioxidative phenolics from the fresh leaves of *Ternstroemia japonica*. Journal of Natural Products. 69: 1399-1403.

Jiménez C. and Riguera R. (1994). Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. Natural Product Reports. 11:591-606.

Vera Y., Ibarra F., Ramírez G. and Munguía J. (2008). *In vitro* fasciolicide activity of some extracts against newly excysted flukes. Animal biodiversity and emerging diseases. 1149: 180-182.

Bladeras J. L., Reza V., Ugalde M., Guzmán L., Serrano M. I., Aguilar A. and Navarrete A. (2008). Pharmacodynamic the interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. With six central nervous system depressant drugs in mice. Journal of ethnopharmacology. 119: 47-52.

Lozada J., Villarreal M. L., Fliniaux M. A., Bensaddek L., Mesnard F., Gutiérrez M. C. and Cardoso A. T. (2009). Isolation of jacaranona, a sedative constituent extracted from the flowers

of the Mexican tree *Ternstroemia pringlei*. Journal of ethnopharmacology. Journal of ethnopharmacology. 127: 551-554.

Aguirre E., González M. E., Pérez G., Llanos R. E. and Guevara P. (2011). TLC fingerprint profile and antioxidant and anti-inflammatory effects of aqueous extracts from species of *Cleyera* and *Ternstroemia* genera. Journal of Planar Chromatography. 5:400-405.

Balderas J. L., Alfaro A., Monroy A., López M. E., Rivero J. F. and Navarrete A. (2013). Toxic rather than neuropharmacological effect of *Ternstroemia sylvatica* fruits and identification of 28-O- $[\beta$ -l-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol as a new compound with toxic effects in mice. Pharmaceutical biology. 51:11, 1451-1458.

Salgado N., Núñez P. N., Acevedo M., Corona L., Rodríguez V., Mesnard F., Fliniaux M. A., Molinié R., Marcelo P., Villarreal M. L. and Cardoso A. T. (2015). Pak. J. Pharm. Sci. 28:2279-2284.

Venkatesan T., Park E. J., Choi Y. W., Lee J. and Kim Y. K. (2017). Anti-inflammatory activity of *Ternstroemia gymnanthera* stem bark extracts in bacterial lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 murine macrophage cells. Pharmaceutical biology 55:1, 837-846.

Moreno C. V., Sánchez A., Vázquez M., Hernández A. G. and García R. V. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.1-7.

Yvin J. C., Chevolut L., Chevolut A. M. and Cochard J. C. (1985). First isolation of jacaranona from an alga, *Delesseria sanguinea*. A metamorphosis Inducer of pecten larvae. Journal of Natural Products. 5:814-816.

Casida, J.E., Xu H. and Zhang N. (2003). Insecticides in Chinese medicinal plants: survey leading to jacaranone, a neurotoxicant and glutathione-reactive quinol. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:2544-2547.

Reuter S., Gupta S. C., Chaturvedi M. M. and Aggarwal B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radical Biology & Medicine. 49:1603-1616.



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 05 Abril 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)  
Dra. Verónica Rodríguez López  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Nahim Salgado Medrano

Tesis: Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de  
*Ternstroemia pringlei*

Alumno que lo presenta a revisión: **ALEXIS URIEL SOTO DIAZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA





Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 Mayo 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)  
Dra. Verónica Rodríguez López  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Nahim Salgado Medrano

Tesis: Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de  
*Ternstroemia pringlei*

Alumno que lo presenta a revisión: **ALEXIS URIEL SOTO DIAZ**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

**ATENTAMENTE**

**DRA. MARÍA LUISA VILLARREAL ORTEGA**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 Mayo 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)  
Dra. Verónica Rodríguez López  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Nahim Salgado Medrano

Tesis: Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de  
*Ternstroemia pringlei*

Alumno que lo presenta a revisión: **ALEXIS URIEL SOTO DIAZ**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ LÓPEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 Mayo 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)  
Dra. Verónica Rodríguez López  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Nahim Salgado Medrano

Tesis: *Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de Ternstroemia pringlei*

Alumno que la presenta a revisión: **ALEXIS URIEL SOTO DIAZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. NAHIM SALGADO MEDRANO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 9 Mayo 2019

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Tutor principal)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega (Co Tutor)  
Dra. Verónica Rodríguez López  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Nahim Salgado Medrano

Tesis: Análisis de la variación bimestral del perfil metabólico de  
*Ternstroemia pringlei*

Alumno que la presenta a revisión: **ALEXIS URIEL SOTO DIAZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. SUSANA VALENCIA DIAZ





