

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

INGENIERIA EN BIOCIENCIAS

TESIS DE LICENCIATURA

**INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE PRODUCTOS DE GLICACIÓN
AVANZADA (AGES) MEDIANTE EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS DE CULTIVO DE
*GRAPHOSTROMA SP***

Para obtener el título de
Licenciado en Ingeniería en Biociencias

P R E S E N T A

Ajelet Sahar Pérez Olguín

361918

Director de tesis:

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Chimalpa, Apan, Hgo., 18 noviembre 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAP-029/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis

Ajelet Sahar Pérez Olguín

P.D.L.I.B.C.

PRESENTE

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Ajelet Sahar Pérez Olguín** (361918), a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **"Inhibición de la formación de productos de glicación avanzada (AGES) mediante extractos semipurificados de cultivo de *Graphostroma* sp"**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Alberto Navarrete Peón

SECRETARIO: Dr. Aldo Christiaan Jardínez Vera

PRIMER VOCAL: Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

SEGUNDO VOCAL: Dr. Pablo Antonio López Pérez

TERCER VOCAL: Dra. Zoila Rosa Flores Bustamante

SUPLENTE: Ing. Ma. Rafaela Mohedano Juárez

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

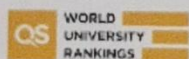
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 18 de noviembre de 2025

Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinadora de Ingeniería en Biociencias



"Amor, Orden y Progreso"

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901
esap@uaeh.edu.mx



2025



uaeh.edu.mx

1 Dedicatoria

Le doy las gracias a Dios por darme la vida, la salud y la sabiduría para realizar esta tesis. Le pido que me siga guiando y dando sabiduría en mi camino profesional y personal.

A mi familia y a aquellos que han sido mi apoyo, esta tesis es el resultado de sus esfuerzos y dedicación durante mis estudios.

A mi asesor y al jurado, les expreso mi reconocimiento y respeto por su labor académica y profesional. Les agradezco por sus valiosas observaciones, sugerencias y comentarios que han enriquecido mi trabajo. Les presento esta tesis como un producto de mi aprendizaje y crecimiento.

2 Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme la fuerza y sabiduría para completar mi tesis. Tu guía y apoyo han sido fundamentales en mi camino académico. Agradezco también a las personas que has puesto en mi vida y buscaré utilizar mis conocimientos de manera responsable en honor a tu voluntad.

A mi familia por su contribución económica y moral; en especial a mis padres Antonia y Juan, mis tíos Maribel e Isaías, mi hermano Yael, y mi abuela Felicitas; lo que me ha permitido concluir esta etapa. Espero que este logro sea de su agrado y satisfacción.

Agradezco que este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Luis Bernardo Flores Cotera y de la Dra. Zoila Rosa Flores Bustamante y con el financiamiento del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

Al Dr. Pablo Antonio López Pérez le agradezco su confianza depositada en mí, su apoyo, paciencia, enseñanzas, observaciones y comentarios para mejorar este proyecto.

Al Ing. Roberto Flores, por su apoyo continuado a lo largo de mi travesía, por su financiamiento y la confianza dada.

A los integrantes del Laboratorio 48 del departamento de Biotecnología, en especial al Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, la Dra. Zoila Rosa Flores Bustamante, la Dra.

Lory S. Rochín Hernández y a el Químico Fernando Maldonado García por su apoyo, paciencia y ayuda durante la realización de este proyecto.

A la IBt. Lorena Ramírez Reyes de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica (UGPM) del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) CINVESTAV por su apoyo técnico, asesoría y colaboración indispensable para poder realizar este proyecto.

Al Ing. Heber Isaí Waldo Gómez, por el apoyo brindado en cada etapa de mi vida desde que nos conocimos, por enseñarme a seguir el camino correcto y mostrarme lo grande que puede ser la fe.

A los amigos hechos durante la carrera, Jonathan Rueda López, Josué Mendoza Sánchez, y en especial, a Alejandra Sánchez Licona por la amistad brindada, el apoyo y el tiempo dado desde nuestro ingreso a la universidad y a todos los amigos y nuevos conocidos del CINVESTAV (Oscar, Gustavo, Bety, personal que labora, etc.) que hicieron que esta experiencia fuera amena, inolvidable y divertida.

Les agradezco a todos.

3 Resumen

El objetivo del presente trabajo es purificar por cromatografía un extracto de cultivo del hongo endófito *Graphostroma sp.* SGSGf22 y obtener al menos una fracción semipurificada, capaz de inhibir, in vitro, la formación de productos de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés), utilizando los ensayos BSA (albúmina sérica bovina)-ribosa, BSA-glucosa y ensayos de NBT (Cloruro de nitroazul tetrazolio), con la intención de contribuir con información sobre una nueva actividad biológica de dicho hongo. Además, se realizó una aproximación a la identificación de los posibles compuestos responsables de la actividad antiglicante observada. Mediante análisis por HPLC fue posible evaluar la pureza de las fracciones semipurificadas seleccionadas y obtener información preliminar sobre los compuestos presentes en ella. Estos hallazgos proporcionan una base para investigaciones futuras orientadas al aislamiento y caracterización de metabolitos bioactivos, con el fin de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades no transmisibles (ENT).

La cepa *Graphostroma sp.* SGSGf22, conservado en el laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). se cultivó durante un periodo de 11 a 21 días (dependiendo del lote), posteriormente se preparó un extracto crudo de cultivo usando hexano y acetato de etilo como solventes principales. Después de remover el solvente, el extracto crudo fue separado en fracciones mediante cromatografía en columna y, cada fracción semipurificada obtenida se sometió a un ensayo inhibición de la formación de AGEs (Advanced Glycation End Products o productos de la glicación avanzada) usando los ensayos BSA-ribosa, BSA-glucosa y ensayos NBT. Inicialmente se realizaron pruebas BSA-ribosa en fracciones seleccionadas considerando la cantidad de muestra existente, Las fracciones que inhibieron la formación de AGEs en más de 50% fueron seleccionadas para estudios subsecuentes. Las fracciones semipurificadas seleccionadas fueron analizadas mediante HPLC con el propósito de evaluar su pureza y obtener información preliminar sobre los compuestos presentes. Posteriormente, se sometieron al ensayo BSA-glucosa para determinar su actividad inhibidora de la formación de AGEs en la fase tardía, evaluada tras 15 días de incubación. Asimismo, se realizaron ensayos NBT con el

fin de caracterizar su efecto en la fase temprana de la glicación. Finalmente, se llevó a cabo una revisión bibliográfica para proponer los posibles compuestos presentes en las fracciones semipurificadas que mostraron porcentajes de inhibición (%IFA) cercanos o superiores al 50%.

4 ÍNDICE

1	Dedicatoria.....	2
2	Agradecimientos	2
3	Resumen.....	4
4	ÍNDICE	6
1.	INTRODUCCIÓN.....	8
2.	ANTECEDENTES	10
2.1	Enfermedades no Transmisibles (ENT).....	10
2.2	ENT relacionadas con la glicación de proteínas	10
2.3	Formación de AGEs.....	11
2.4	Glicación de proteínas	13
2.5	Reacción de Maillard	15
2.6	Actividad antiglicación	15
2.7	Ensayos NBT	16
2.8	Ensayo BSA-ribosa.....	17
2.9	Ensayo BSA-glucosa.....	18
2.10	Compuestos que inhiben la formación de AGEs	19
2.11	Hongos endófitos como fuentes potenciales de compuestos bioactivos	21
2.11.1	<i>Taxus Globosa</i>	21
2.11.2	<i>Graphostroma sp.</i>	22
2.12	Compuestos bioactivos reportados en <i>Graphostroma sp.</i>	24
2.13	Técnicas de separación usadas para búsqueda de compuestos	25
3.	JUSTIFICACIÓN	26
4.	HIPÓTESIS.....	27
5.	OBJETIVOS	27
5.1	Objetivo general.....	27
5.2	Objetivos específicos	27
6.	METODOLOGÍA.....	27
6.2	Obtención de las fracciones semipurificadas	28
6.3	Selección de las fracciones semipurificadas	29
6.4	Alicuotación de las fracciones secundarias	32

6.5	Ensayos BSA-ribosa.....	32
6.8	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	35
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1	Selección de fracciones semipurificadas por cantidad disponible.....	36
7.2	Selección de fracciones semipurificadas por actividad antiglicación en ensayo BSA-ribosa.....	36
7.3	Selección de fracciones semipurificadas por actividad antiglicación en ensayo BSA-glucosa y pruebas NBT	39
7.3.1	Actividad antiglicación en ensayo BSA-glucosa.....	39
7.4	Selección de fracciones semipurificadas disponibles a partir de la cantidad de reserva existente para análisis posteriores.	42
7.5	Análisis de HPLC.....	43
7.6.	Análisis de varianza de los resultados de actividad antiglicación para las muestras seleccionadas	50
7.6.2.	Análisis de varianza para actividad antiglicación en ensayo BSA-glucosa ...	51
7.6.3.	Análisis de varianza para actividad antiglicación en Ensayos NBT	52
7.7.	Búsqueda de posibles compuestos	52
8.	CONCLUSIONES	54
9.	REFERENCIAS	55
	Lista de figuras	59
	Lista de tablas	63
	Glosario de abreviaturas	65
	Glosario de términos y siglas	66
	Anexo A. Cálculos para las alicuotaciones de las 23 fracciones secundarias restantes de los lotes 1, 2, 3 y 4.	67
	Anexo B. Cálculos para realizar el análisis de BSA-ribosa.....	98
	Anexo C. Cálculos para realizar el análisis de BSA-glucosa.....	100
	Anexo D. Cálculos para realizar el análisis NBT	103
	Anexo E. Resumen de Resultados de todas las pruebas realizadas.....	104
	Anexo F. Análisis de varianza de las fracciones seleccionadas (1.2.6, 2.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.13 (S), 2.2.2 y 4.2.3.....	105
	Anexo G. Compilación de Resultados de todas las placas Constar® realizadas	111
	Anexo H. Cromatogramas HPLC	114

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT) han adquirido mayor relevancia debido a los cambios en los patrones demográficos y epidemiológicos de la población. Las ENT son incurables, poseen características complejas, pueden ser prevenidas y controladas dependiendo de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales de personas, pero su progresión causa complicaciones en la salud (Vega-Angarita, 2020).

De acuerdo con Berumen-Rodríguez et al. (2020), en México las ENT fueron la causa de muerte del 77% de las mujeres con registros elevados de sobrepeso, obesidad y diabetes mellitus tipo 2 en 2013 y fueron la causa de 41 millones de muertes, cerca del 71% de las defunciones registradas a nivel mundial en 2016.

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de ENT se encuentran tener una dieta no saludable, sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo. La incidencia de cáncer, diabetes, enfermedades respiratorias y cardiovasculares crecieron significativamente durante la pandemia de COVID-19. Todas estas enfermedades se han asociado con la acumulación o formación de AGEs en células, o con la interacción de AGEs con su receptor (RAGE). Por ello, existe la necesidad de desarrollar estrategias para limitar la acumulación de AGEs y así inhibir el desarrollo de las complicaciones asociadas con al menos alguna ENT (Rochín-Hernández et al., 2022).

Los AGEs pertenecen a un grupo de compuestos complejos heterogéneos que se forman ya sea de forma exógena o endógena por diferentes mecanismos y a partir de una variedad de precursores (Twarda-Cłapa et al., 2022).

La glicación es una reacción no enzimática que sucede entre un monosacárido reductor y un grupo amino en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, formando una base de Schiff inestable, la cual se reordena a una forma estable, producto de Amadori, esto conduce frecuentemente a la formación irreversible de AGEs. Por ello, resulta fundamental identificar alternativas capaces de inhibir alguna de las etapas de la

glicación, ya sea retrasando la formación de productos de Amadori o evitando la generación final de AGEs (Mridula et al., 2021).

Sánchez Rangel et al. (2022) señala que los endófitos son microorganismos que habitan en el interior de la planta sin generar síntomas aparentes de enfermedad, pueden promover el crecimiento vegetativo, ayudar a la planta a responder a varios tipos de estrés y como un mecanismo de defensa; aunado a esto, representan una fuente abundante de metabolitos secundarios que han mostrado actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena.

El Laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV-IPN aisló hongos endófitos del tejo mexicano (*Taxus globosa*). El hongo *Graphostroma sp. SGSGf22*, es un endófito aislado del follaje de un ejemplar sano de *Taxus Globosa*, ubicado en la Sierra Gorda del estado de Querétaro. En trabajos anteriores se determinó que extractos de cultivos del hongo presentan actividad antiproliferativa en células HeLa de cáncer cervicouterino (Soca-Chafre et al., 2011). Por otra parte, algunas fracciones semipurificadas, obtenidas por cromatografía a partir del extracto son capaces de inhibir la glicación de proteínas, in vitro, en un ensayo BSA-ribosa (López Betancourt, 2023). No obstante, no hay estudios enfocados en la actividad anti AGEs, en un ensayo BSA-glucosa ni pruebas NBT que evalúen dichas actividades en extractos crudos o fracciones semipurificadas. Tampoco se han intentado identificar los tipos de compuestos responsables de estas actividades en *Graphostroma sp. SGSGf22*. La identificación de los compuestos responsables de inhibir la glicación de proteínas podría conducir al descubrimiento de nuevos compuestos que podrían servir de base para definir estrategias terapéuticas para el tratamiento de algunas ENT.

Es por esto que, en el presente trabajo, se estudió la capacidad de fracciones semipurificadas de *Graphostroma sp. SGSGf22* para inhibir la formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs) usando un ensayo BSA-glucosa y ensayos NBT. El objetivo es obtener al menos una fracción de este hongo, capaz de inhibir la formación de AGEs en alguna de sus etapas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades no Transmisibles (ENT)

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) las enfermedades no transmisibles (ENT) hacen referencia a un grupo de enfermedades que abarcan cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades pulmonares crónicas y enfermedades neurodegenerativas, las cuales no son causadas por infecciones agudas. Se caracterizan porque tienen efectos a largo plazo en la salud y, a menudo, requieren tratamiento y atención a largo plazo.

2.2 ENT relacionadas con la glicación de proteínas

La acumulación excesiva de AGEs se ha vinculado con diversas enfermedades crónicas y degenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer, así como con trastornos articulares. En personas con diabetes mellitus, la hiperglucemia crónica promueve la acumulación de AGEs, contribuyendo al desarrollo de complicaciones secundarias como aterosclerosis, nefropatías y cataratas, entre otras. Este fenómeno se debe principalmente a la incapacidad de síntesis o utilización eficiente de insulina, lo que altera el metabolismo de la glucosa y favorece la glicación enzimática de proteínas y subsecuentemente la formación de AGEs (Séro et al., 2013).

Twarda-Ćłapa et al. (2022) señalan que la acumulación excesiva de AGEs, que se deriva de la acumulación de elevadas concentraciones de compuestos azucarados, y la reacción no enzimática de estos con aminoácidos, péptidos y proteínas humanas, constituye una de las principales causas que explican el origen del daño celular y los trastornos tisulares graves asociados a diversas enfermedades crónicas y degenerativas.

El trabajo de Brownlee et al. (1986) ha reportado aumentos asociados en el entrecruzamiento del colágeno y la acumulación de AGEs asociados con la edad, los cuales son acelerados por la diabetes. A pesar de que el entrecruzamiento de proteínas de larga duración aumenta con la edad, su investigación generó evidencia directa de que mecanismos no enzimáticos aumentan el entrecruzamiento del colágeno en personas con diabetes.

Los trastornos neurodegenerativos que abarcan enfermedades como Alzheimer, Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica son trastornos debilitantes e incurables por el momento, en donde el plegamiento incorrecto, agregación y precipitación de proteínas parecen estar directamente relacionados con la neurotoxicidad. Además, la mayor prevalencia de estas enfermedades en personas diabéticas aunado con la aparición de AGEs en agregados de proteínas sugiere que la glicación es un factor importante en su desarrollo (Salazar Osorio, 2019).

Entre los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas incluyen una dieta no saludable, el sedentarismo, el consumo del tabaco y la ingesta de alcohol. Diversos estudios han mostrado que el desarrollo de al menos algunas ENT se han asociado a la excesiva acumulación o formación de AGEs o la interacción de AGEs a su receptor (RAGE). En este contexto, el diseño de estrategias dirigidas a reducir la acumulación de AGEs representa una posible vía terapéutica para prevenir o retardar la manifestación de complicaciones en ENT (Rochín-Hernández et al., 2022).

2.3 Formación de AGEs

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son un grupo heterogéneo de moléculas cuya formación suele involucrar reacciones no enzimáticas de azúcares con proteínas por medio de la reacción de Maillard. La formación de AGEs endógenos comienza con la reacción del grupo carbonilo de un azúcar reductor con un grupo amino de proteínas (sobre todo aquellas con lisina o arginina) para formar bases de Schiff, el reordenamiento de estas bases conduce a la formación de cetoaminas más estables conocidas como productos Amadori (Rochín-Hernández et al., 2022).

En la Figura 1 se muestra la secuencia no enzimática de reacción que conduce al entrecruzamiento de proteínas, en donde la glucosa reacciona con grupos amino de una proteína para formar un aducto de base de Schiff químicamente reversible, que se reordena para convertirse en compuestos más estables, productos Amadori. Esta vía trae una serie de reacciones con grupos amino de otras proteínas para formar derivados de glucosa intermolecularmente entrecruzados (Brownlee et al., 1986).

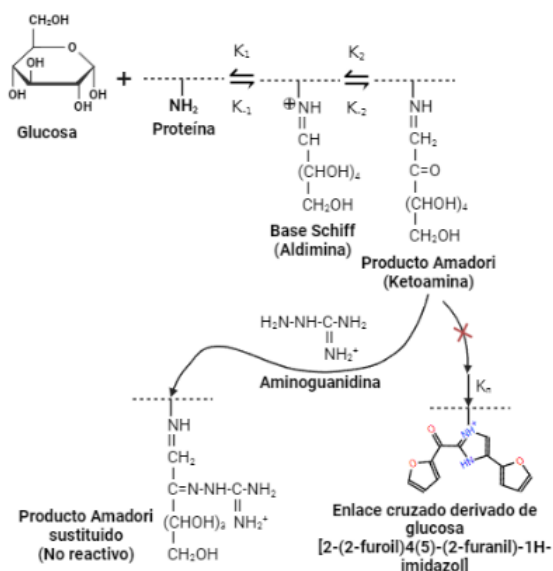


Figura 1. Representación del proceso no enzimático de glicación: la glucosa reacciona con grupos amino de proteínas formando una base de Schiff, que posteriormente se convierte en un producto de Amadori. Este puede progresar hacia la formación de AGEs y promover enlaces cruzados entre proteínas. Se ilustra también la inhibición temprana de la glicación mediante aminoguanidina, que evita la formación de AGEs. Modificado de Brownlee et al. (1986).

Los AGEs tienen la capacidad de entrecruzarse de forma irreversible para formar proteínas agregadas heterogéneas e insolubles, lo cual tiene profundos efectos en la estructura y función de proteínas. Estas proteínas agregadas conducen al desarrollo de numerosas complicaciones asociadas con la diabetes (Gutiérrez-García et al., 2017).

Zeng et al. (2019) plantean que los AGEs son de gran interés debido a los efectos en los seres humanos, ya que contribuyen a deteriorar la salud a través de la disrupción de las funciones hormonales en el cuerpo humano y participando en las enfermedades relacionadas con la edad, envejecimiento, ENT y crónico inflamatorias. La acumulación de AGEs se

encuentra asociada al desarrollo de diferentes enfermedades humanas.

La formación de AGEs endógenos (Figura 3) se da generalmente en tres fases; la fase temprana, involucra la reacción de Maillard entre azúcares y proteínas que termina con la formación de productos Amadori; fase de propagación genera compuestos α -dicarbonilo (metilglioxal, glioxal y 3-desoxiglucosona); en la fase final, emergen una gran variedad de AGEs (Rochín-Hernández et al., 2022).

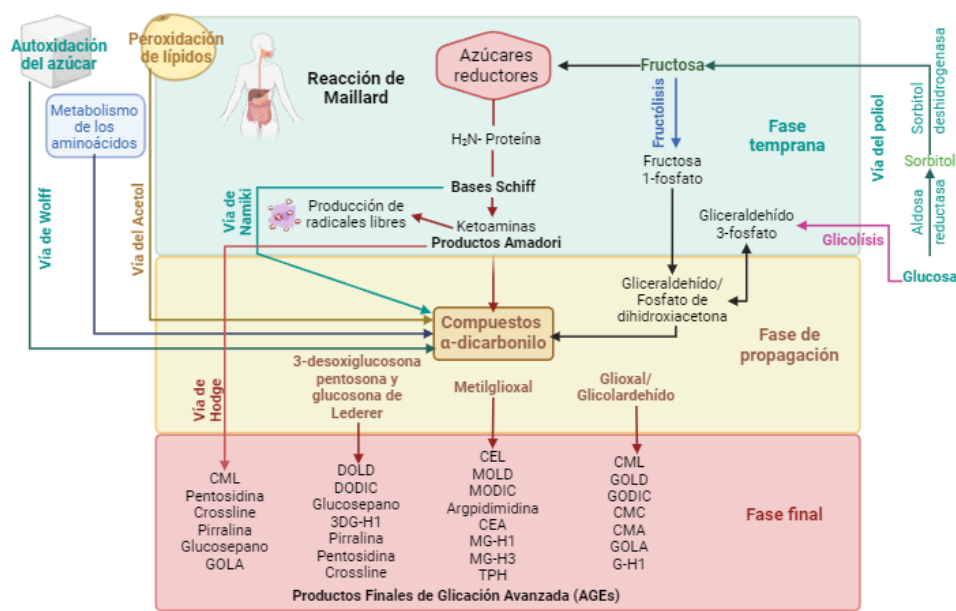


Figura 2. Esquema de la formación endógena de AGEs en el organismo. La glicación inicia con la reacción de azúcares reductores con proteínas para formar una base de Schiff, que progresa al producto de Amadori (fase temprana). Posteriormente se generan compuestos dicarbonilos que participan en reacciones de glicoxidación durante la fase de propagación. Finalmente, estos intermediarios originan AGEs estables, como N-carboximetil lisina (CML), N-[2-[(5-amino-5-carboxipentil) amino]-2-oxoetil]-lisina (GOLA), dímeros de lisina derivado de 3-desoxiglucosona (DOLD), enlace cruzado de imidazolio derivado de 3-desoxiglucosona (DODIC), hidroimidazolona 1 derivada de 3-desoxiglucosona (3DG-H1), N-carboxietil-lisina (CEL), dímeros de lisina derivado de metilglioxal (MOLD), N-carboxietil-arginina (CEA), hidroimidazolona 1 derivada de metilglioxal (MG-H1), hidroimidazolona 3 derivada de metilglioxal (MG-H3), tetrahidropirimidina (THP), dímeros de lisina derivado de glioxal (GOLD), enlaces cruzados de imidazolio derivados de glioxal (GODIC), carboximetil-cisteína (CMC), N-carboximetil-arginina (CMA) e hidroimidazolona 1 derivada de glioxal (G-H1). Modificado de Rochín-Hernández et al. (2022).

2.4 Glicación de proteínas

La glicación de biomacromoléculas es una reacción no enzimática entre azúcares reductores, como glucosa, y grupos amino presentes en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Este proceso constituye una de las principales modificaciones postraduccionales de relevancia fisiopatológica, especialmente bajo condiciones de hiperglucemia o estrés oxidativo. Además, las proteínas y el ADN modificados pueden oxidarse o condensarse, no enzimáticamente, para generar AGEs en condiciones fisiológicas y patológicas (Zeng et al., 2019).

Los AGEs son compuestos heterogéneos capaces de alterar la estructura y función de las biomoléculas mediante la formación de enlaces cruzados intermoleculares y la generación de estrés oxidativo. Las proteínas glicadas presentan una mayor tendencia a formar estos enlaces cruzados, lo que afecta su estabilidad, funcionalidad y vida media celular. Todo esto trae como consecuencia la acumulación de AGEs en distintos tejidos. Esta formación de AGEs implica reacciones de deshidratación, condensación cíclica, enlaces cruzados intermoleculares y oxidación de radicales libres de oxígeno (Salazar Osorio, 2019).

Entender las diferencias entre glicación exógena y endógena es esencial para comprender cómo los AGEs contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas. La Figura 3 muestra las características distintivas de ambos procesos y su relación con el daño celular y tisular,

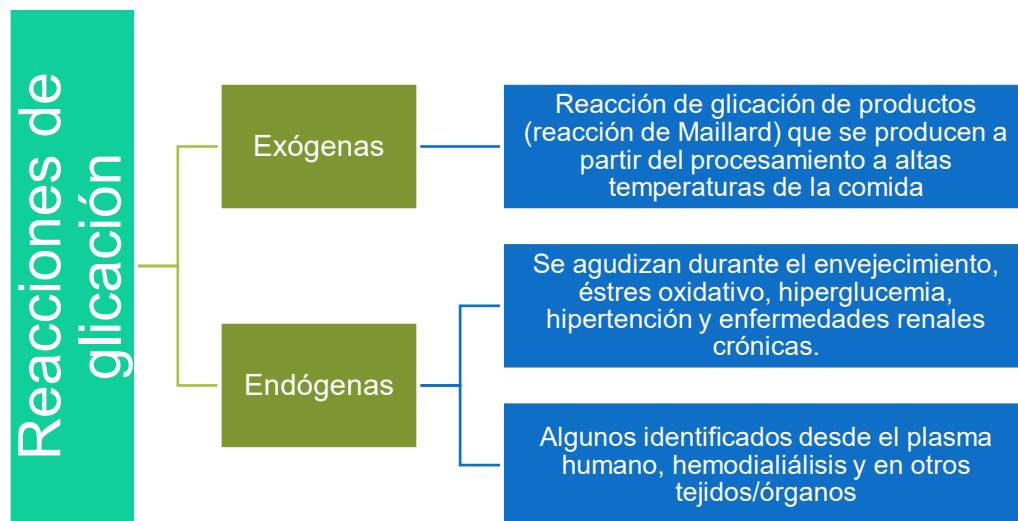


Figura 3. Diferencias entre glicación exógena y endógena y su impacto en la generación de AGEs. Las fuentes exógenas provienen principalmente de alimentos procesados térmicamente, mientras que las fuentes endógenas derivan de reacciones no enzimáticas en tejidos y fluidos corporales. Basada en Zeng et al. (2019).

2.5 Reacción de Maillard

La reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático, debido a su capacidad para modificar la coloración, fue descrita por primera vez por Louis Maillard en 1912, al estudiar la síntesis de proteínas, observó que ciertas aminos y azúcares reductores reaccionaban entre sí produciendo una coloración marrón. La presencia de un grupo aldehído o cetona en una molécula de carbohidrato (monosacáridos, algunos disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos) lo convierte en un azúcar reductor (Gómez Vázquez, 2020).

La reacción de Maillard es compleja y sucede entre los azúcares reductores, de forma particular entre el grupo carbonilo del azúcar y un grupo amino de aminoácidos presentes en las proteínas durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos. La reacción entre azúcares y proteínas da lugar a la formación de bases de Schiff, que a posteriori se reordenan en productos Amadori, esto conlleva a la formación de AGEs (Gómez Vázquez, 2020).

Esta reacción se divide en dos fases: en la etapa temprana, el reordenamiento de los productos Amadori es vía 1,2-eminal después de la formación de la base Schiff entre un grupo amino de la proteína y un grupo aldehído del azúcar reductor. La fase tardía involucra los procesos de reacción de oxidación, deshidrogenación y condensación, seguida por la formación de proteínas fluorescentes que contienen AGEs y proteínas entrecruzadas intra/intermolecularmente (Matsuura et al., 2002).

2.6 Actividad antiglicación

Los radicales libres son sustancias químicas que contienen uno o más electrones desapareados, lo que les confiere una alta reactividad e inestabilidad. Su formación puede incrementarse por la exposición a contaminantes ambientales, radiación, humo de tabaco y diversos solventes industriales. El exceso de radicales libres contribuye al estrés oxidativo, un proceso asociado con el desarrollo de múltiples enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Leandro Felipe, 2019).

Las estrategias antiglicación, tienen el objetivo de intervenir en distintos puntos del proceso de formación de AGEs. Entre estas estrategias se incluyen:

- **Inhibidores de AGEs:** Compuestos capaces de bloquear la formación de AGEs o neutralizar los precursores dicarbonilos altamente reactivos.
- **Rompedores de entrecruzamientos:** Moléculas diseñadas para escindir los enlaces cruzados formados entre proteínas glicadas, restaurando parcialmente su estructura y función.
- **Antagonistas del RAGE:** Sustancias que interfieren con la unión de los AGEs a su receptor (RAGE) y reduciendo la señalización proinflamatoria asociada a enfermedades crónicas (Zeng et al. 2019).
- **Agentes antioxidantes:** Medicamentos o compuestos que reducen el estrés oxidativo, un proceso que favorece la glicoxidación y acelera la producción de AGEs.

Existen diversas formas para evaluar la inhibición de AGEs en sus diferentes etapas, entre ellas los ensayos de NBT (Cloruro de nitroazul tetrazolio) propuesto por Johnson et al. (1983) evalúa la inhibición de la formación de fructosamina que se genera en la etapa inicial de la glicación; el ensayo de BSA-ribosa Séro et al. (2013) y BSA-glucosa (Brownlee et al., 1986) que evalúan la inhibición de la formación de AGEs fluorescentes en la etapa final.

2.7 Ensayos NBT

Este método fue desarrollado por Johnson et al. (1983) con el fin de medir la glicosilproteína sérica como índice de control de la diabetes. Esta prueba se basa en la capacidad de las cetoaminas, también conocidas como fructosaminas, para comportarse como agentes reductores en una solución alcalina.

En este procedimiento colorimétrico, la mezcla de reacción contiene albúmina purificada (BSA a 10 mg/mL), solución de glucosa (500 mM) y el extracto a evaluar (1 mg/mL). La mezcla se incuba a 37°C durante 7 días para determinar la formación de los productos de Amadori. Transcurridos los 7 días se realiza el ensayo conocido como NBT a una concentración de 0.5 mM, solución amortiguadora de carbonato sódico 0.1 M a pH 10.35, el cual se deja reaccionar durante 15 minutos y se mide su absorbancia a 530 nm (Johnson et al., 1983).

La cuantificación del porcentaje (%) de inhibición de reducción de NBT se realiza utilizando una ecuación que mantiene el mismo principio de cálculo que la Ecuación (1), ver abajo.

2.8 Ensayo BSA-ribosa

Se llevó a cabo como lo describe en la propuesta de Séro et al. (2013). Albumina sérica bovina a 10 mg/mL se hace reaccionar con ribosa a 0.5M en solución salina amortiguadora con fosfato (PBS) con azida de sodio al 0.02% a pH 7.4 durante 24 horas a una temperatura de 37°C a 120 revoluciones por minuto (rpm). La fluorescencia se determina a 370nm de excitación y 440 nm de emisión para evaluar AGEs tipo vesperlisinas (o AGEs generales) y a 335nm de excitación y 385 nm de emisión para AGEs tipo pentosidinas. El porcentaje de inhibición de la formación de AGEs (%IFA) se calcula con la Ecuación (1), considerando las lecturas de fluorescencia.

$$\%IFA = \frac{(C_n - B) - (X - X_b)}{C_n - B} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

Cn: Control negativo, representa el 100% de formación de AGEs. Contiene: BSA en PBS, Ribosa, PBS y DMSO como solvente. Su fluorescencia corresponde al máximo nivel de glicación sin inhibidor.

B: Blanco de la BSA, contiene únicamente BSA en PBS y el solvente en DMSO. Su fluorescencia se resta del Cn con el fin de cuantificar la señal atribuible a la glicación producida por ribosa.

X: Muestra con extracto, mezcla de reacción que contiene el extracto en DMSO, BSA, Ribosa, PBS. Representa la muestra en presencia del posible inhibidor.

Xb: Blanco del extracto, contiene el extracto en DMSO, BSA y PBS, pero sin ribosa. Su valor se resta de X para eliminar cualquier señal fluorescente del extracto y evaluar la inhibición de la glicación.

Aunado a esto, se incluyen controles del extracto, considerados únicamente con fines informativos, ya que no se emplean en los cálculos (Séro et al., 2013):

- **X_r**: Control del extracto con ribosa (extracto en DMSO más ribosa en PBS). Permite identificar si algún compuesto del extracto reacciona directamente con la ribosa e interferir en la lectura.
- **X_x**: Control del extracto en DMSO (extracto en DMSO y PBS). Se utiliza para evaluar la presencia de compuestos fluorescentes en el extracto que pudieran interferir en las lecturas.
- **C+**: Control positivo, contiene a 10mM de aminoguanidina en DMSO, BSA en PBS y ribosa en PBS. Se utiliza como referencia de inhibición conocida para evaluar el ensayo.

Esta prueba rápida es eficaz para determinar si el extracto producido por plantas y hongos contiene compuestos que inhiben la formación de AGEs. Mediante dos lecturas de fluorescencia, se pueden determinar AGEs tipo vesperlisina y AGEs tipo pentosidina, respectivamente, esperando que la actividad en ambos tipos de AGEs arrojen un porcentaje similar de inhibición, ya que ambos tipos se originan a partir de intermediarios y rutas de glicación comunes, por lo que un mismo compuesto inhibidor suele afectar de forma equivalente su formación (Séro et al., 2013).

2.9 Ensayo BSA-glucosa

Es una prueba para poder caracterizar la actividad de antiglicación en compuestos identificados previamente, llamado ensayo de glucosa en albúmina sérica bovina (BSA) la cual mide la formación de AGEs (Gutiérrez-García et al., 2017).

En el trabajo de Gómez Vázquez (2020) se describe que los AGEs resultan tóxicos para el páncreas, lo que da lugar a defectos progresivos en la secreción de insulina. Es posible comparar los niveles de insulina en un ensayo control respecto a un ensayo provisto de AGEs.

La prueba propuesta se llevó a cabo de acuerdo a Brownlee et al. (1986). Brevemente, albumina (BSA a 10 mg/mL) se incubaba en presencia de glucosa (500 mM) en PBS y el extracto a evaluar (1 mg/mL) disuelto en DMSO a un pH de 7.4 a 37°C durante un periodo de 15 días. Para determinar %IFA se usa la ecuación 1.

2.10 Compuestos que inhiben la formación de AGEs

La aminoguanidina es un compuesto hidrolizado nucleofílico identificado por Brownlee et al. en 1986 como un inhibidor de la formación de AGEs. El compuesto inhibe la producción de AGEs fluorescentes y la formación de la glucosa derivada en el entrecruzamiento de colágeno *in vitro*, además previene la formación de varios péptidos modificados en un rango de peso molecular de 30 a 50 kb.

El diacetilfloroglucinol (DAPG), una biomolécula producida por bacterias del género *Pseudomonas*, constituye un compuesto de interés farmacológico debido a sus propiedades bioactivas. Los floroglucinos y los ácidos cinámicos, ambos metabolitos fenólicos de origen natural, han demostrado que son capaces de inhibir la formación de AGEs. Por su capacidad para prevenir procesos de glicación asociados a diversas enfermedades crónicas, estos compuestos representan una alternativa prometedora para el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a reducir el impacto fisiopatológico de los AGEs (Gutiérrez-García et al., 2017).

Gutiérrez-García et al. (2017) reportaron que extractos de *Piper auritum* tienen una notable capacidad para inhibir la formación de AGEs (ver Tabla 1). Esta actividad se ha asociado con un efecto inhibitorio significativo sobre la glicación de proteínas *in vitro*, lo cual contribuye a la reducción tanto de la formación de AGEs como de los niveles de hemoglobina glicosilada en modelos de ratas diabéticas. Asimismo, los autores aislaron DNA genómico de nueve endófitos con actividad antiglicante, correspondientes a seis cepas de *Pseudomonas protegens* y tres de *Pseudomonas fulva*.

Tabla 1. Fracciones obtenidas de *Pseudomonas* endófitas con actividad antiglicante y sus características relevantes de acuerdo con Gutiérrez-García et al. (2017).

Fracciones	Descripción y características relevantes.
Extractos crudos de <i>P. protegens</i> de las cepas PA12 (7.4 g) y PA26 (5.3 g)	Mostraron mayor actividad antiglicación que el control positivo (aminoguanidina).
Fracciones de PA12-2.2.2.2.1 y PA26-2.2.2.2.1	Obtenidos después del quinto fraccionamiento mostraron una actividad de antiglicación similar.

Después de la tercera fracción extractos de PA12 indicaron la presencia del ácido 5-hidroxiferulico, una estructura isomérica del DAPG.

Demostó tener una actividad inhibidora similar al control positivo.

PA12-2.2.2.2.2

Consiste en la mezcla de cuatro ácidos grasos: ácido cis-9-hexadecenoico, ácido n-hexadecanoico, ácido cis-vacénico y ácido cis-10-heptadecenoico

Zeng et al., (2019) recopilaron ensayos clínicos aleatorios enfocados en modular el eje AGE-RAGE mediante diferentes intervenciones farmacológicas y nutraceuticas. Estos estudios evaluaron la capacidad de diversos compuestos para inhibir la formación de AGEs, bloquear su interacción con RAGE o reducir los efectos fisiopatológicos asociados a esta vía (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayos clínicos aleatorios dirigidos modular el eje AGE-RAGE mediante inhibidores de AGEs o compuestos con mecanismos de acción relacionados. La tabla resume las distintas intervenciones clínicas, detallando duración del tratamiento, el diseño experimental, la fase del ensayo, las características de los sujetos principales, el mecanismo de acción propuesto para cada intervención y los resultados primarios obtenidos (Zeng et al., 2019)

Intervenciones	Duración del tratamiento	Diseño de estudio	Fase de ensayo clínico	Características del sujeto	Mecanismo de acción	Resultados primarios
Dosis inicial de atorvastatina: 40 miligramos; dosis de mantenimiento: 10 mg/día	30 días	RCT	II	Infarto agudo de miocardio (n = 190)	Inhibidor de AGEs	La atorvastatina redujo ANGPTL2 y AGEs, y puede tener efectos cardioprotectores
Epicatequina (100 mg/día), quercetina 3-glucósido (160 mg/día)	4 semanas	RCT doble ciego	I	Aparentemente adultos sanos (pre) hipertensos (n = 37)	Inhibidor de AGEs	La quercetina, pero no la epicatequina, redujo el metilglioxal sérico.
Hidroxitirosol (7,5 mg/día) y vitamina E (10 mg/día)	4 meses	RCT doble ciego	I	Niños con EHGA comprobada por biopsia (n = 80)	Inhibidor de AGEs, efectos antioxidantes	Hidroxitirosol y vitamina E redujo AGEs, proteínas carboniladas y proteínas S-nitrosiladas

Leandro Felipe (2019) obtuvo un extracto de metanol de las semillas de *Cucurbita argyrosperma* con propiedades antioxidantes y capacidad antiglicante sobre la proteína BSA, alcanzando porcentajes de inhibición del 33.33% al 55.05%. posteriormente, se identificó y caracterizó un polisacárido (PLS) presente en dichas semillas, concluyendo que las semillas son una fuente natural de antioxidantes y con potencial para contribuir al manejo de diversos padecimientos asociados al estrés oxidativo y la glicación.

2.11 Hongos endófitos como fuentes potenciales de compuestos bioactivos

De acuerdo con Rochín-Hernández et al. (2022), los organismos endófitos abarcan principalmente hongos y bacterias, aunque también pueden incluir arqueas y protistas que habitan en los tejidos y órganos internos de las plantas (hojas, tallos, flores, frutos, semillas o raíces) sin causar síntomas evidentes de enfermedad en sus plantas hospederas. Generalmente, estos microorganismos mantienen una relación benéfica o neutra con su huésped, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, algunos podrían convertirse en patógenos oportunistas, dependiendo de: la planta, genotipo microbiano, detección de quórum, microbiota asociada y condiciones ambientales.

En particular, los hongos endófitos constituyen un apoyo relevante debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal y mejorar la tolerancia de las plantas frente a varios tipos de estrés (sequía, salinidad, altas temperaturas, toxicidad por metales pesados y estrés oxidativo). Aunado a esto, pueden ser antagonistas contra insectos plaga, hongos fitopatógenos y nematodos. Adicionalmente, los estos microorganismos representan una fuente abundante de metabolitos secundarios con eventual aplicación como antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antiparásitos, antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos (Sánchez Rangel et al., 2022).

2.11.1 *Taxus Globosa*

Taxus Globosa también conocido como tejo mexicano, es una conífera perteneciente a la familia *Taxaceae*. Su distribución se localiza ocasionalmente en los estados mexicanos de Nuevo León y Tamaulipas, a lo largo de la cuenca del Golfo de México, extendiéndose hacia el eje Neovolcánico y alcanzando regiones de Honduras. Esta especie ha sido registrada en una de las áreas naturales protegidas más importantes

de México, la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda (RSGB), y se considera amenazada, siendo protegido por la legislación ambiental mexicana (Soca-Chafre et al., 2011).

El tejo mexicano, incluido en la NOM-059-SEMARNAT-2010, es un árbol de porte pequeño y crecimiento lento, suele medir entre 6 y 10 metros de altura y con diámetros que pueden variar desde 40 cm, hasta más de un metro en individuos maduros. Esta especie produce taxol, una sustancia que ha demostrado utilidad en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de cuello uterino y de mama (Giraldo et al., 2019).

2.11.2 *Graphostroma* sp.

2.11.2.1 *Graphostroma* sp. SGSGf22

La cepa SGSGf22 de *Graphostroma* sp., fue aislada a partir de muestras de follaje de un ejemplar sano de *Taxus globosa*, ubicado en la Sierra Gorda del estado de Querétaro. En trabajos anteriores se determinó que algunos hongos endófitos de *T. Globosa* presentaban actividad antiproliferativa en células HeLa de cáncer cervicouterino, siendo el hongo *Graphostroma* sp. SGSGf22 uno de ellos (Soca-Chafre et al., 2011). Además, se ha encontrado que algunas fracciones, obtenidas por cromatografía, del extracto crudo del cultivo de *Graphostroma* sp. SGSGf22, inhiben la glicación de proteínas cuando se usa el ensayo BSA-ribosa (López Betancourt, 2023).

2.11.2.2 *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421

Graphostroma sp. MCCC 3A00421 es un hongo recuperado de aguas profundas en un depósito hidrotermal sulfuroso del océano Atlántico a 2721 m de profundidad (Niu et al., 2019). Estos autores, prepararon un extracto obtenido con acetato de etilo (AcOET) a partir de los cultivos del hongo y obtuvieron 24 sesquiterpenoides y 28 policétidos aromáticos. De forma subsecuente, se realizó una separación cromatográfica a los componentes menores, trayendo consigo el aislamiento de 11 nuevos policétidos encadenados como se muestra en la Figura 4.

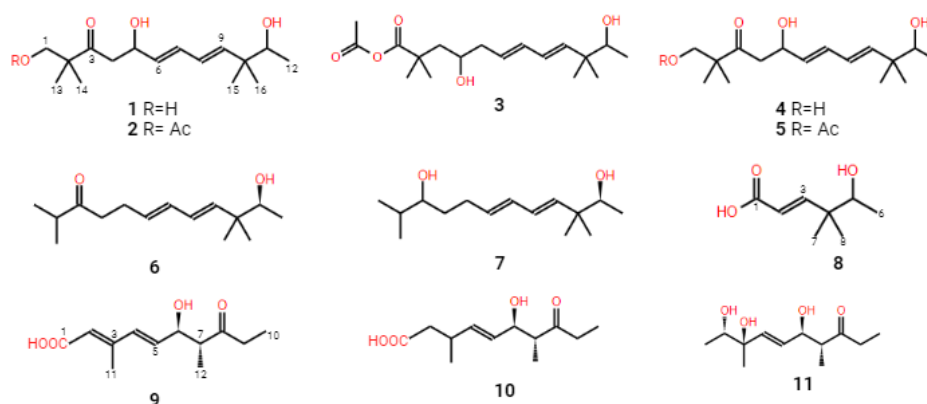


Figura 4. Estructuras químicas de la 1-11 aisladas de *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421. **1.** (10R)-xilariterpenoide B, **2.** (10S)-xilariterpenoide A, **3.** xilariterpenoide E, **4.** xilariterpenoide F, **5.** xilariterpenoide G, **6.** khusinol B, **7.** khusinol C, **8.** khusinol D, **9.** khusinol E, **10.** graphostromabisabol A y **11.** graphostromabisabol B. Modificado de Niu et al. (2019).

Niu et al. (2017) explican que *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421, al ser un hongo derivado de aguas profundas, es un microorganismo que ha crecido con niveles altos de salinidad y presión, con bajos niveles de oxígeno y ausencia de luz. Este hongo ha desarrollado vías metabólicas esenciales para su supervivencia, produciendo metabolitos secundarios únicos, los cuáles se potencialmente farmacológicos, entre ellos, Kushinol B (6) mostró actividades antiinflamatorias (IC_{50} = 150 μ M) y antialérgicas (IC_{50} = 17 μ M), con respecto al control, aminoguanidina (IC_{50} = 23 μ M).

Por otro lado, Niu et al. (2018) demostraron que los metabolitos producidos por *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421 inhiben la producción de óxido nítrico (NO) inducida por lipopolisacárido (LPS) en macrófagos RAW 264.7. Entre los compuestos evaluados, el graphostromane F (6) destacó por su notable actividad inhibidora, con IC_{50} 14.2 μ M, superior al observado para la aminoguanidina, con IC_{50} 23.4 μ M.

De manera complementaria, Niu Liu et al. (2018) aislaron nueve nuevos policétidos y diecinueve previamente descritos en especies del mismo género, los cuales mostraron una elevada actividad antialérgica en células RBL-2H3. Entre ellos, el graphostrin A (1) fue identificado como un policétido clorado con una oxidación inusual, mientras que reticuol (10) exhibió un efecto significativamente superior en alergias alimentarias, con IC_{50} 13.5 μ M, en comparación con el control positivo loratadina (IC_{50} = 91.6 μ M).

2.12 Compuestos bioactivos reportados en *Graphostroma sp.*

Como se ha mencionado anteriormente, *Graphostroma sp.* MCCC 3A00421 ha demostrado ser un productor prolifero de metabolitos secundarios, algunos conocidos como graphostrin A– I, graphostrolmols A–K, estos compuestos han mostrado efectos contra la alergia alimentaria y antiinflamatoria (Wilson & Brimble, 2021).

Tabla 3. Algunos compuestos producidos por *Graphostroma sp.* MCCC 3A00421 (Wilson & Brimble, 2021).

Compuesto	Descripción y características relevantes.
Graphostrin A	Policétido clorado
Esqueleto de 2,2,10,10-tetrametildodecano	Primera vez que este esqueleto fue aislado de la naturaleza. Evaluada su citotoxicidad frente a líneas celulares HeLa (Cáncer Cervicouterino), Eca-109 (Cáncer de Esófago), Biu-87 (Cáncer de Vejiga), Bel-7402 (Cáncer de Hígado) y PANC-1 (Cáncer de páncreas), sin citotoxicidad observada.
(10S)-xilariterpenoide A, 10S	Actividad antialérgica alimentaria y antiinflamatoria
(10R)-xilariterpenoide B, 10R	Aislados previamente xilariterpenoides A y B
Xilariterpenoides E-D	Identificados xilariterpenoides E-G
Khusinol B-E	Cuatro metabolitos secundarios con una estructura similar. khusinol B demostró una actividad antialérgica débil ($IC_{50}=150 \mu M$) y una potente actividad antiinflamatoria ($IC_{50}=17 \mu M$) khusinol C solo difiere de B por un grupo hidroxilo mostró una actividad antiinflamatoria baja ($IC_{50}=140 \mu M$)
Graphostromabisabols A y B	Dos nuevos compuestos identificados
Graphostromanes A–I	Aislados nueve nuevos guaianes (esqueleto de biciclo [5.3.0] decano), junto con otros cuatro guaianes conocidos. Es el primer reporte de guaianes de un microorganismo marino. Graphostromanes D ($IC_{50}=72.9 \mu M$) e I ($IC_{50}=79.1 \mu M$) mostraron una actividad antiinflamatoria baja, graphostromane F demostró una actividad antiinflamatoria prometedora ($IC_{50}=14.2 \mu M$)

2.13 Técnicas de separación usadas para búsqueda de compuestos

Leandro Felipe (2019) describe que el botánico ruso Milkhail Tswett invento la cromatografía haciendo uso de esta técnica para la separación de algunos pigmentos de plantas clorofilas y xantofilas. Esta técnica se caracteriza por poseer dos fases una fase estacionaria, la cual se encuentra fija en una columna o superficie plana; y una fase móvil, dicha fase se desplaza a través de la fase estacionaria, acarreando uno o varios analitos de una mezcla.

La cromatografía en columna es un método en el que se emplea un eluyente para llevar a cabo la separación de los componentes de una mezcla, dependiendo de la polaridad de los compuestos y del efluente. La columna, ya sea de vidrio o plástico, se empaca con sílica gel, conocida también como fase estacionaria, mientras que la fase móvil ocupa los espacios entre las partículas del empaque. Al principio, la muestra es depositada por la parte superior de la columna, a posteriori, por medio de adiciones repetidas de solvente, los componentes de la mezcla son forzados a pasar por la columna (Leandro Felipe, 2019).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés High-Performance Liquid Chromatography) se usa comúnmente para separar los componentes de una mezcla en función de diferentes tipos de interacciones químicas entre el analito y la fase estacionaria mediante el bombeo de la fase móvil a través de la columna. El tiempo de retención de cada componente de la muestra varía dependiendo de su naturaleza, composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo de retención se considerada una propiedad característica de cada compuesto bajo determinadas condiciones (Guzmán Villanueva, 2022).

En contraste con la cromatografía en columna de vidrio, la cromatografía líquida de alta resolución es una técnica analítica ampliamente empleada para la cuantificación de compuestos en diversas matrices. Este método se basa en la separación cromatográfica de los analitos mediante un sistema de fase líquida acoplado a un detector. La técnica se distingue por su elevada sensibilidad, excelente linealidad,

precisión, reproducibilidad y versatilidad, lo que permite su aplicación en la identificación y cuantificación de múltiples compuestos (Araya et al., 2024).

3. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de enfermedades no transmisibles, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, se han incrementado y se estima que siga aumentando de forma significativa en las últimas décadas, representando una carga considerable para la salud pública. Se ha encontrado que muchas de estas enfermedades están relacionadas con la glicación anormal de proteínas, lo que, a su vez, conduce a la acumulación excesiva de AGEs. En este contexto, la identificación de agentes con actividad antiglicante resulta fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces.

Los hongos endófitos son una rica fuente potencial de compuestos de interés farmacéutico. Sin embargo, la gran mayoría ellos han sido poco estudiados. Por otro lado se sabe que algunos hongos del género *Graphostroma sp.* Son capaces de sintetizar compuestos con potencial uso para el tratamiento de diversas enfermedades. Particularmente, en estudios preliminares, se ha observado que los extractos semipurificados obtenidos de cultivos de *Graphostroma sp.* SGSgF22, endófito de *Taxus globosa*, inhiben la formación de AGEs, lo que los convierte en un sujeto de estudio prometedor como fuente de compuestos con uso potencial en el tratamiento de enfermedades no transmisibles (López Betancourt, 2023).

Aunado a esto, la búsqueda de compuestos con actividad antiglicante producidos por hongos, como los del género *Graphostroma sp.*, adquiere relevancia biotecnológica debido a su potencial aplicación en distintos ámbitos. El aislamiento y caracterización de metabolitos bioactivos a partir de estos microorganismos podrían permitir, en futuro, su producción a gran escala mediante procesos fermentativos controlados, facilitando su eventual comercialización e incorporación en estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la formación de AGEs. Esto representa una oportunidad significativa para el desarrollo de nuevas terapias y productos innovadores en los campos de la medicina, la salud y la biotecnología.

En el presente trabajo, fracciones semipurificadas obtenidas por cromatografía a partir de extractos de *Graphostroma sp.*, se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir la glicación de proteínas en la etapa inicial (ensayo NBT) y en la etapa final (BSA-ribosa y BSA-glucosa). Además, se realizó una revisión bibliográfica con el fin de proponer posibles compuestos responsables de la inhibición de AGEs.

4. HIPÓTESIS

Algunas fracciones semipurificadas del extracto crudo del cultivo de *Graphostroma sp.* SGSgf22 inhiben la formación de AGEs tanto en su fase inicial como final.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener una fracción semipurificada del extracto crudo del cultivo de *Graphostroma sp.* SGSgf22, que inhiba la reacción de la formación de AGEs.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar 55 fracciones semipurificadas respecto a su capacidad para inhibir la formación de AGEs fluorescentes usando los ensayos BSA-ribosa y BSA-glucosa.
- Evaluar las 55 fracciones semipurificadas respecto a su capacidad para inhibir la formación de fructosamina utilizando el ensayo de NBT.
- Comparar la capacidad anti AGEs de las diferentes fracciones semipurificadas.
- Verificar la pureza de las fracciones semipurificadas con actividad anti AGEs empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6. METODOLOGÍA

6.1 Metodología para el análisis de la actividad antiglicación de las 55 fracciones semipurificadas, derivadas del extracto crudo del hongo *Graphostroma sp.* SGSgf22

La metodología empleada en este estudio comprendió una serie de etapas secuenciales diseñadas para identificar las fracciones semipurificadas con capacidad de inhibir AGEs a partir del extracto crudo de *Graphostroma sp.* SGSgf22. Este proceso integró la selección inicial de fracciones, la evaluación de su actividad inhibidora mediante

ensayos BSA-ribosa, BSA-glucosa y NBT, así como el análisis de pureza por HPLC y la revisión bibliográfica para la posible identificación de compuestos bioactivos. La Figura 5 resume de manera esquemática el flujo de trabajo empleado para el análisis de las 55 fracciones semipurificadas obtenidas.

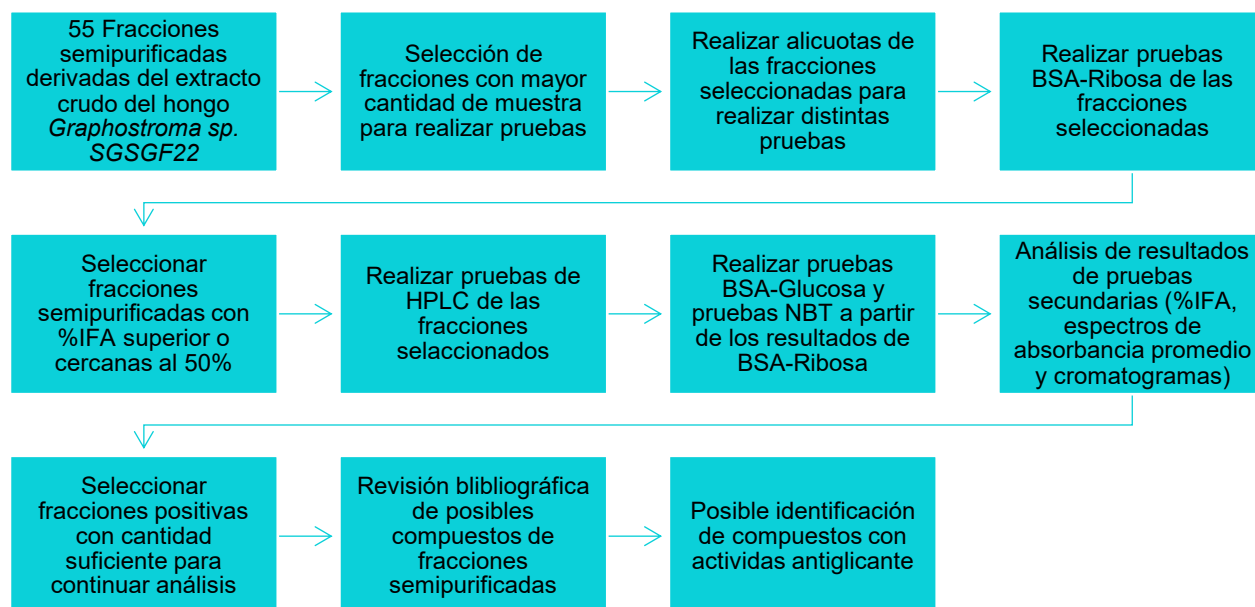


Figura 5. Esquema general de la metodología utilizada para el análisis de las 55 fracciones semipurificadas derivadas del extracto del hongo *Graphostroma sp.* SGSf22.

6.2 Obtención de las fracciones semipurificadas

Las fracciones semipurificadas fueron obtenidas previamente por López Betancourt (2023), quién reactivó de un vial de conservación de la cepa *Graphostroma sp.* SGSf22, la cultivó en medio PDA y CZAPECK-DOX BROTH, preparó un extracto crudo y, por cromatografía, obtuvo las fracciones. En la Figura 6 se resume el proceso y condiciones para obtener dichas fracciones.

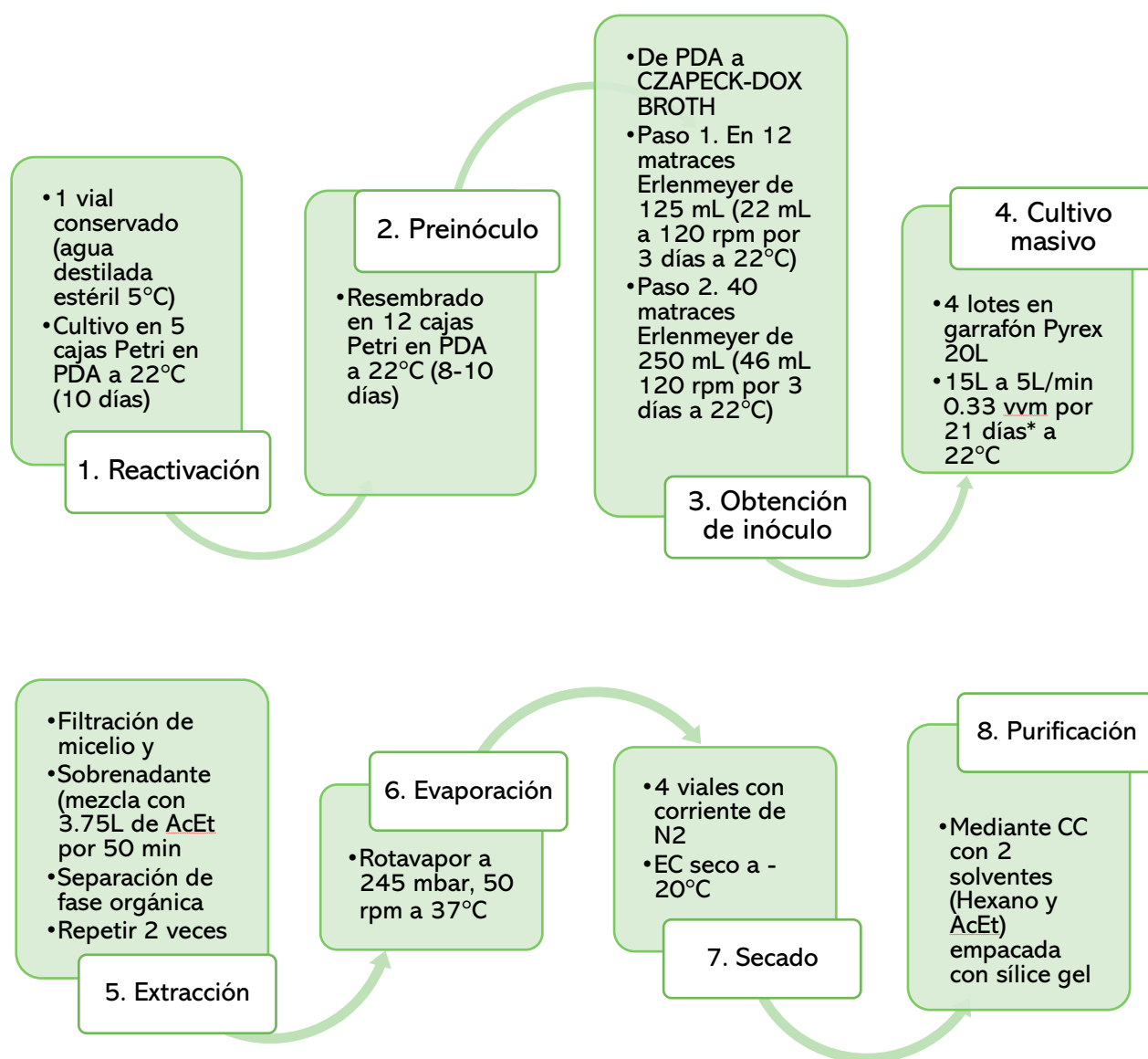


Figura 6. Procedimiento para obtener las fracciones semipurificadas. Realizado por López Betancourt (2023).

6.3 Selección de las fracciones semipurificadas

Se utilizaron 55 fracciones semipurificadas obtenidas por López Betancourt (2023) mediante columna en cromatográfica (CC). Estas fracciones derivaron del extracto crudo producido a partir de 4 lotes de cultivo masivo del hongo. Las condiciones específicas de cada lote y número de fracciones semipurificadas obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de los 4 lotes de cultivo (masivo) del hongo *Graphostroma* sp. SGSGf22, y resultados obtenidos (rendimiento, número de fracciones obtenidas por CC. Datos tomados del trabajo de López Betancourt (2023)

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Temperatura (°C)	22	22	22	22
Agitación	Estático	Estático	Estático	Estático
Flujo de aire	5 L/min	5 L/min	5 L/min	0 L/min
Tiempo (días)	11	21	14	20
Peso de extracto crudo (g)	4.121	3.607	1.971	0.487
Rendimiento de extracto crudo(g/L)	0.27	0.24	0.13	0.03
Fracciones purificadas primarias	33	32	36	33
Fracciones purificadas secundarias	14	14	14	13

Las fracciones semipurificadas se nombraron de manera que se ejemplifique el origen de la misma. Ver ejemplo de la Figura 7.

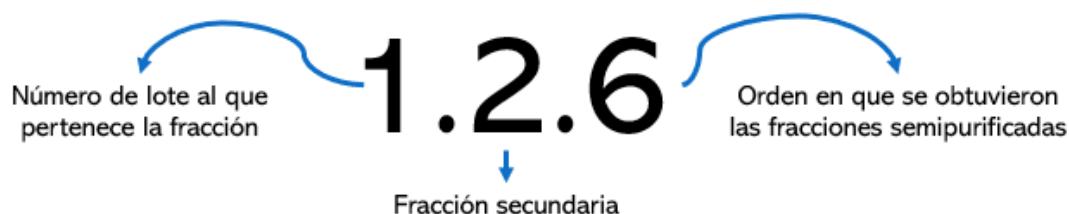


Figura 7. Ejemplo de la forma en la que se nombraron las fracciones semipurificadas. El No. 2 significa que es una fracción secundaria, también llamada fracción semipurificada. El No. 6 es el orden en el que se obtuvieron las fracciones semipurificadas.

Originalmente, no se tenían datos del peso exacto de las fracciones semipurificadas 1.2.13 y 2.2.13, ya que de acuerdo con López Betancourt (2023), estas fracciones se precipitaron y no se registraron los datos de peso, quedando de cada fracción un precipitado (P) y un sobrenadante (S). Para poder estimar el peso de las fracciones 1.2.13 y 2.2.13, cada una por separado se disolvió en una solución con 50% de metanol/ 50% de acetato de etilo. Las soluciones obtenidas se vaciaron a viales

previamente pesados y se sometieron a secado en una corriente de nitrógeno gaseoso. Una vez secos, los viales se pesaron nuevamente para calcular el peso de cada muestra (Tabla 5). Posteriormente, los viales se sellaron con cinta teflón manteniendo un ambiente de nitrógeno, las fracciones semipurificadas secas 1.2.13 y 2.2.13, se conservaron a -20°C.

De las 55 fracciones semipurificadas se seleccionaron las muestras a analizar, tomándose en cuenta la cantidad existente de cada fracción (Tabla 5) .

Tabla 5. Pesos de las fracciones semipurificadas de los Lotes 1, 2, 3 y 4, con los datos actualizados de las fracciones 1.2.13 y 2.2.13, ordenados de menor a mayor

# Fracción	Fracciones primarias unidas	Peso extracto (mg)	# Fracción	Fracciones primarias unidas	Peso extracto (mg)	# Fracción	Fracciones primarias unidas	Peso extracto (mg)	# Fracción	Fracciones primarias unidas	Peso extracto (mg)
1.2.11	24, 25	9	2.2.13 (P)	28, 29, 30	10	3.2.8	17	1	4.2.1	1	7
1.2.8	16	10	2.2.12	26, 27	11	3.2.13	34	1	4.2.8	14, 15	4
1.2.13 (P)	29, 30	16	2.2.9	18	12	3.2.14	35, 36	1	4.2.9	16, 17, 18	4
1.2.9	17, 18, 19	23	2.2.4	6	17	3.2.7	15, 16	2	4.2.10	19, 20, 21, 22	4
1.2.12	26, 27, 28	24	2.2.10	19, 20	18	3.2.6	13, 14	3	4.2.5	6, 7	5
1.2.3	4	32	2.2.11	21, 22, 23, 24, 25	29	3.2.10	23, 24	3	4.2.2	2	7
1.2.10	20, 21, 22, 23	39	2.2.8	16, 17	46	3.2.11	25, 26, 27, 28	3	4.2.11	23, 24, 25, 26	7
1.2.5	7.29, 8	51	2.2.13 (S)	28, 29, 30	61	3.2.9	18, 19, 20, 21, 22	4	4.2.4	4, 5	12
1.2.4	5, 6, 7	104	2.2.14	31, 32	63	3.2.5	10, 11, 12	6	4.2.7	12, 13	14
1.2.7	12, 13, 14, 15	115	2.2.7	14, 15	64	3.2.3	4, 5	28	4.2.6	8, 9, 10, 11	26
1.2.1	1, 2	129	2.2.3	4, 5	67	3.2.1	1, 2	31	4.2.12	27, 28, 29	47
1.2.13 (S)	29, 30	137	2.2.1	1, 2	69	3.2.12	29, 30, 31, 32, 33	37	4.2.13	30, 31, 32, 33	91
1.2.14	31, 32, 33	171	2.2.5	7, 8, 9	95	3.2.4	6, 7, 8, 9	41	4.2.3	3	199
1.2.6	9, 10, 11	183	2.2.6	10, 11, 12, 13	127	3.2.2	3	848			
1.2.2	3	2653	2.2.2	3	1238						

De las 55 fracciones semipurificadas disponibles, se seleccionaron 29 considerando principalmente la cantidad de muestra disponible, eligiéndose aquellas con un peso igual o superior de 26 mg para garantizar la realización de distintas pruebas experimentales (Tabla 5). Las fracciones seleccionadas fueron las siguientes: 10 fracciones del lote 1 (1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5, 1.2.6, 1.2.7, 1.2.10, 1.2.13 (S) y 1.2.14), 10 fracciones del lote 2 (2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8, 2.2.11, 2.2.13 (S) y 2.2.14), 5 fracciones del lote 3 (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 y 3.2.12) y 4 fracciones del lote 4 (4.2.3, 4.2.6, 4.2.12 y 4.2.13).

6.4 Alicuotación de las fracciones secundarias

Las fracciones semipurificadas 1.2.2, 1.2.6, 2.2.2, 2.2.6 3.2.2 y 4.2.3 ya habían sido alicuotadas previamente por López Betancourt (2023). Para las 23 fracciones restantes se realizaron los cálculos necesarios para su alicuotamiento (ver Anexo A).

Cada una de las 23 fracciones semipurificadas seleccionadas se disolvieron lentamente en acetona marca Honeywell ® grado HPLC y se aforaron en un matraz volumétrico de 100 mL (Figura 8), procurando mantener en hielo a una temperatura baja el matraz aforado con la solución para evitar la evaporación del solvente. Las muestras se alicuotaron acorde al volumen necesario para cada prueba por realizar, priorizando alícuotas para las pruebas de inhibición de AGEs (BSA-ribosa y BSA-glucosa) y pruebas para el análisis por HPLC.



Figura 8. Fracción semipurificada 1.2.13 (S) disuelta en acetona y aforada a 100 mL en el matraz volumétrico, con los viales etiquetados para realizar cada tipo de prueba.

Adicionalmente, viales con muestras sobrantes de las fracciones se usaron, cuando fue posible, para realizar pruebas adicionales como antiproliferación en células HeLa de cáncer cérvico uterino, antibióticas y viales con reserva para otros usos posteriores.

6.5 Ensayos BSA-ribosa

El ensayo BSA-ribosa se realizó a las 29 fracciones seleccionadas, con la finalidad de detectar su capacidad para inhibir la formación de AGEs. Posteriormente, se seleccionaron aquellas cuyo %IFA fue cercano o superior al 50% para analizarlas subsecuentemente en ensayos BSA-glucosa y de NBT.

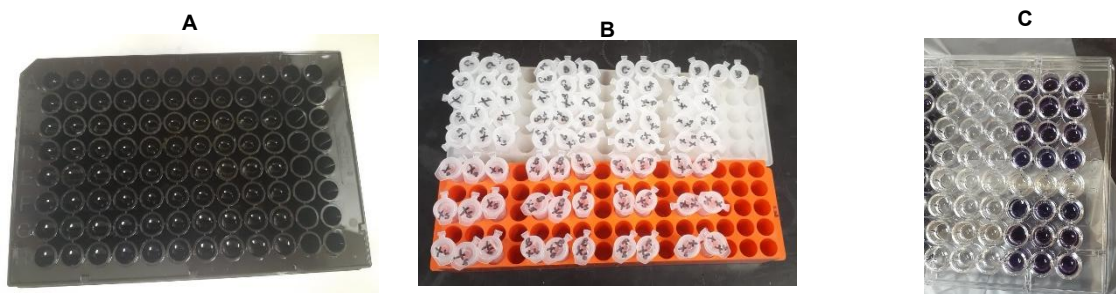


Figura 9. Placas para realizar las pruebas de inhibición de AGEs. **A.** Placa Constar[®] de 96 pozos negra para realizar análisis BSA-ribosa y BSA-glucosa, **B.** Muestras incubadas en tubos Eppendorf etiquetados para pruebas BSA-glucosa, **C.** Placa Constar 96 pozos transparente para realizar análisis NBT.

Los ensayos BSA-ribosa prueba se realizaron en 5 placas Costar[®] de 96 pozos negras de fondo plano (Figura 9 A). El volumen final de reacción fue de 200 μ L, con una concentración final de 10 mg/mL de BSA, 500 mM de ribosa, 0.02% NaN₃ y 10 mM de aminoguanidina o 1 mg/mL de cada fracción semipurificada (ver Anexo B).

Las soluciones de BSA, ribosa, NaN₃ en PBS y el PBS se esterizaron por filtración antes de ser adicionados a la placa. La aminoguanidina se disolvió en DMSO sin filtrar. Las fracciones también se disolvieron de DMSO, sin embargo, no se filtraron debido a la poca cantidad de cada fracción. Cada placa se incubó a 37 °C, 120 rpm y 70% de humedad. Se utilizaron 2 matraces Kitasato de 500 mL con agua y aire, para humidificar el ensayo por 24 horas y minimizar la evaporación de las muestras.

Pasado ese tiempo se hicieron las lecturas de fluorescencia en equipo CLARIOstar. Para AGEs tipo vesperlisinas, las lecturas se realizaron a longitud de excitación 370 nm y 440 nm de emisión. Para AGEs tipo pentosidinas a una longitud de excitación a 335 nm y 385 de emisión, además de realizar un espectro de fluorescencia, utilizando un rango de longitudes de excitación de 370 a 700 nm y leyendo la fluorescencia a una longitud de emisión de 440 nm (para AGEs tipo vesperlisinas).

6.6 Pruebas de BSA-glucosa

Las fracciones semipurificadas seleccionadas por tener un %IFA cerca o superior al 50% en el ensayo BSA-ribosa, se sometieron a análisis de antiglicación lenta (BSA-glucosa) y NBT.

Para poder realizar la prueba BSA-glucosa, se realizaron todos los cálculos para preparar las soluciones (ver Anexo C). El volumen de reacción final fue de 600 μ L en cada

tubo Eppendorf. El volumen de cada una de las soluciones de los extractos, aminoguanidina o extracto, BSA, glucosa, NaN_3 en PBS y PBS fue de 150 μL , según se requiriera, para lograr un volumen final de reacción de 600 μL en cada tubo Eppendorf. Se utilizaron 2 placas Costar ® de 96 pozos negros de fondo plano para leer la fluorescencia (como en la Figura 9 A).

Para realizar cada prueba de BSA-glucosa se requirieron 82 tubos Eppendorf etiquetados y distribuidos en tres gradillas para tubos Eppendorf previamente esterilizados (Figura 9 B).

Una vez que cada tubo Eppendorf tenía su respectiva solución, las gradillas se incubaron a 37 °C, 120 rpm y humedad de 70% por 15 días.

Pasado ese tiempo se tomaron alícuotas de 200 μL de cada tubo y se colocaron en su respectivo pozo de la placa negra y se hicieron lecturas de fluorescencia, en el equipo CLARIOstar, para AGEs tipo vesperlisinas a longitud de excitación 370 nm y 440 nm de emisión, para AGEs tipo pentosidinas a una longitud de excitación de 335 nm y 385 nm de emisión. También se realizó un espectro de fluorescencia, utilizando un rango de longitudes de excitación de 396 a 700 nm y leyendo la fluorescencia a una longitud de emisión de 440 nm para AGEs tipo vesperlisinas.

Además, se volvieron a realizar otras dos pruebas de BSA-ribosa a modo de un duplicado para poder corroborar la información obtenida previamente. Se prepararon dos placas negras para BSA-ribosa. Los extractos utilizados para realizar las 2 pruebas (BSA-ribosa y BSA-glucosa) fueron los mismos.

Se tomó lectura de fluorescencia de las dos placas utilizadas para BSA-ribosa a las 24 horas de incubación, manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente.

6.7 Análisis de antiglicación NBT

Las pruebas NBT proporcionan información sobre la inhibición de la formación de fructosamina en la etapa temprana de la glicación de proteínas.

Se prepararon 200 mL de una solución amortiguadora de carbonato de sodio al 0.1 M con pH 10.35 y 9 mL de NBT en solución amortiguadora de carbonato de sodio de

sodio. Se pesaron 2.76 mg de NBT y se disolvieron en 9 mL de la solución amortiguadora. Ver Anexo D para mayor información de los cálculos realizados.

Para esta prueba se tomaron alícuotas de 40 μ L de las pruebas de BSA-glucosa a los 7 días de incubación, las cuales se colocan en una placa transparente Costar [®] (Figura 9 C), ordenadas como se indica en el Anexo D

Con una pipeta multicanal se colocaron 160 μ L del Solución amortiguadora de carbonato a los pozos de los blancos y luego se agregaron otros 160 μ L de la solución de NBT a las muestras, se dejó incubar a 37°C por 15 minutos y se llevaron a cabo lecturas de absorbancia, en el equipo CLARIOstar, a 530 nm.

6.8 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las muestras semipurificadas 1.2.2, 1.2.5, 1.2.6, 1.2.10, 1.2.13 (S), 2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8, 2.2.13 (S), 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.12, 4.2.3, 4.2.6 y 4.2.12, las cuales tienen un %IFA cercano o superior al 50% en las pruebas de BSA-ribosa se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución, para conocer su pureza y posible composición.



Figura 10. Preparación de los extractos semipurificados para análisis HPLC.

El análisis de HPLC de las muestras (Figura 10) se realizó por medio de cromatografía de líquidos, con detector de arreglo de diodos (LC-DAD), utilizando un equipo LC 3000 MLtimate, Thermo Scientific, con una columna Jupiter 3 μ m C18 250 x 4.6 mm, a un flujo de 0.6 ml/min, a una temperatura de 25°C y un volumen de inyección de 25 μ L. El cuyo rango de detección analizado fue de 190-800 nm.

Los solventes utilizados para la fase móvil fueron (A) 0.1% ácido fórmico grado HPLC en agua y (B) Acetonitrilo grado HPLC. El gradiente fue: 0-10 min 50% B, 11-24 min 60% B, 25-30 min 70% B, 31-33 min 100% B, 34-35 min 50% B, 35-37 min 50%B. La absorbancia se leyó en un rango de longitud de onda de 190 a 800 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Selección de fracciones semipurificadas por cantidad disponible

La primera selección de fracciones semipurificadas se tomó principalmente en base a la cantidad de extracto existente (mínimo 26 mg) de cada muestra para realizar las diferentes pruebas de antiglicación, HPLC, antibióticas y antiproliferativas.

De esta primera selección de 55 fracciones semipurificadas solo se tomaron 29 fracciones, para análisis posteriores:

- Lote 1: diez fracciones (1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5, 1.2.6, 1.2.7, 1.2.10, 1.2.13 (S) y 1.2.14).
- Lote 2: diez fracciones (2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8, 2.2.11, 2.2.13 (S) y 2.2.14).
- Lote 3: cinco fracciones (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 y 3.2.12)
- Lote 4: cuatro fracciones (4.2.3, 4.2.6, 4.2.12 y 4.2.13).

7.2 Selección de fracciones semipurificadas por actividad antiglicación en ensayo BSA-ribosa

Para la segunda selección de las fracciones semipurificadas se tomó en cuenta el porcentaje de Inhibición de Formación de AGEs tipo vesperlisinas en un ensayo BSA-ribosa, utilizándose 7 placas Costar ® de 96 pozos. Los AGEs tipo vesperlisinas se conocen también como AGEs generales debido a que se forman de manera generalizada en el cuerpo humano y se pueden encontrar en diferentes tejidos y órganos. Las fracciones semipurificadas , con un porcentaje cercano o mayor al 50% se seleccionaron como se muestra en la Figura 11. Ver anexo E para resultados más detallados.

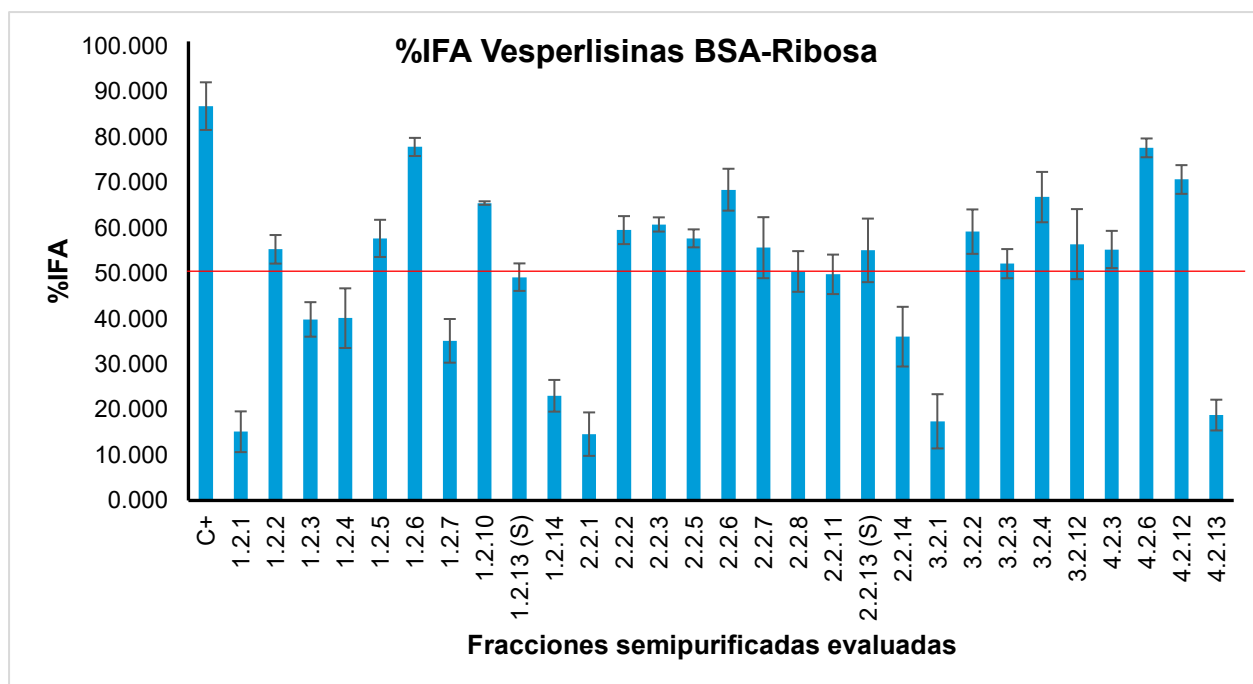


Figura 11. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo vesperlisinas (generales) en ensayo BSA-ribosa, resaltando con una línea roja las fracciones que se encuentran cerca o son superiores al 50% de %IFA.

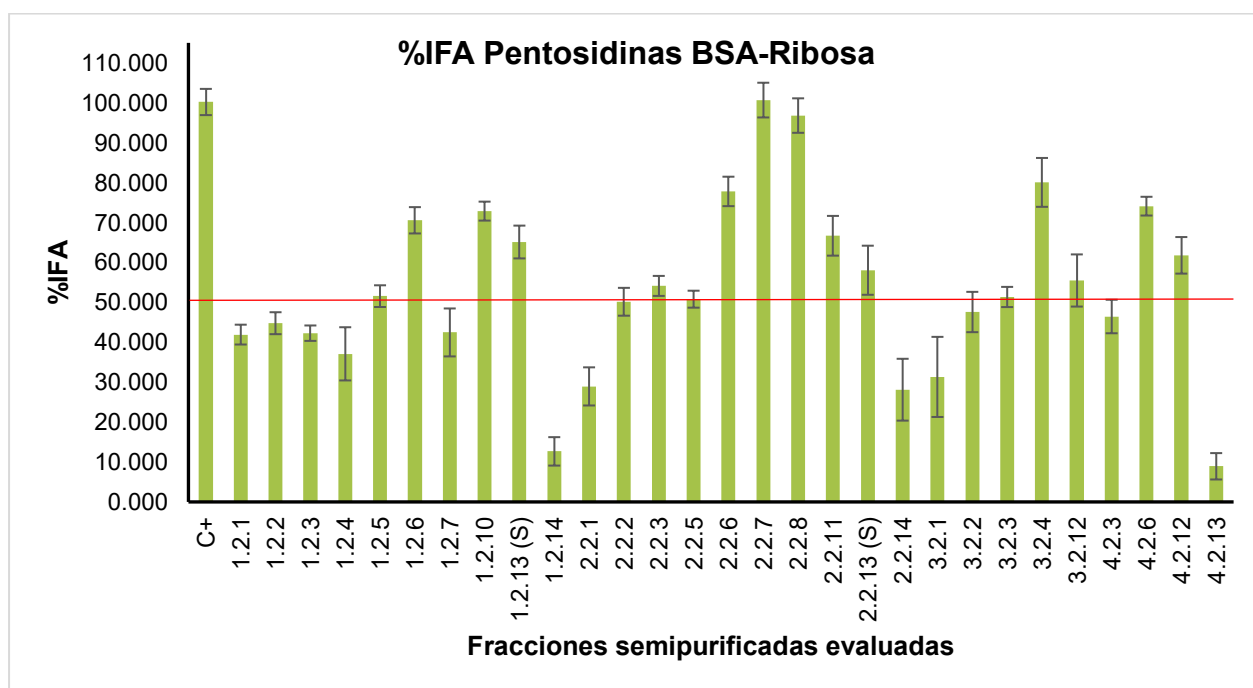


Figura 12. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo pentosidinas en ensayo BSA-ribosa, resaltando con una línea roja las fracciones que se encuentran cerca o son superiores al 50.

En los gráficos de la Figuras 11 y 12 se aprecian las fracciones semipurificadas con un porcentaje promedio cerca o superior al 50% IFA en AGEs tipo vesperlisinás y tipo pentosidinas, los cuales fueron:

En el Lote 1 la fracción 1.2.2 con un 55.26% en AGEs tipo vesperlisinás y 44.77% en AGEs tipo pentosidinas; la fracción 1.2.5 con un 57.66% y 51.55%; la fracción 1.2.6 con un 77.78% y 70.55%, la fracción 1.2.10 con un 65.44% y 72.85%; y la fracción 1.2.13 (S) con un 49.13% y 65.11%.

En el Lote 2 se observa que la fracción 2.2.2 presenta un %IFA de 59.48% para AGEs generales y un 50.14% para AGEs tipo pentosidinas; la fracción 2.2.3 un 60.72% y 54.12%; la fracción 2.2.5 un 57.67% y 50.79%; la fracción 2.2.6 un 68.37% y 77.78%; la fracción 2.2.7 un 55.62% y 100.66%; en la fracción 2.2.8 un 50.38% y un 96.79%; por último, la fracción 2.2.13 (S) tuvo resultados del 55.02% para AGEs generales y 58.04% para AGEs tipo pentosidinas.

El Lote 3 tuvo los siguientes resultados en %IFA para AGEs generales y tipo pentosidinas: la fracción 3.2.2 un 59.15% y 47.58%; la fracción 3.2.3 un 52.10% y 51.34%; la fracción 3.2.4 un 66.75% y 55.47%; y la fracción 3.2.12 un 56.40% y 55.47%.

Finalmente, en el Lote 4, las fracciones más prometedoras fueron la fracción 4.2.3 con un %IFA del 55.22% para AGEs tipo vesperlisinás y 46.45% para AGEs tipo pentosidinas; la fracción 4.2.6 un 77.58% y 74.09% respectivamente; para terminar la fracción 4.2.12 mostró porcentajes de 70.62% para AGEs generales y 61.78% para AGEs tipo pentosidinas.

De esta segunda selección se seleccionaron 20 fracciones de las 29 previamente seleccionadas, quedando 5 fracciones del Lote 1 (1.2.2, 1.2.5, 1.2.6, 1.2.10 & 1.2.13 (S)), 8 fracciones pertenecientes al Lote 2 (2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8, 2.2.11 & 2.2.13 (S)), 4 fracciones del Lote 3 (3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 & 3.2.12) y 3 fracciones del Lote 4 (4.2.3, 4.2.6 & 4.2.12). Ver anexo E para ver todos los resultados resumidos de cada prueba.

Los lotes 2 y 4 mostraron ser de los lotes más activos en cuanto actividad antiglicante se refiere, además de destacarse las fracciones cercanas a una proporción de 60% hexano y 40% acetato de etilo, y las fracciones que se encuentran disueltas en

50% acetato de etilo y 50% en metanol, como las fracciones 1.2.5, 1.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.6, 2.2.13 (S), 3.2.4 y 4.2.6, muestran porcentajes de antiglicación favorables.

7.3 Selección de fracciones semipurificadas por actividad antiglicación en ensayo BSA-glucosa y pruebas NBT

7.3.1 Actividad antiglicación en ensayo BSA-glucosa

Se realizó la prueba BSA-glucosa a 12 fracciones semipurificadas. Las fracciones seleccionadas anteriormente por López Betancourt (2023), es decir las fracciones 1.2.2, 1.2.6, 2.2.2, 2.2.6, 3.2.2 y 4.2.3, además de las fracciones 1.2.13 (S), 2.2.3, 2.2.13 (S), 3.2.4, 4.2.6 y 4.2.12, seleccionadas en este trabajo, de acuerdo a los resultados del análisis de BSA-ribosa. La lectura de las muestras se llevó a cabo después de 15 días de incubación en 2 placas negras Costar ® de 96 pozos de fondo plano.

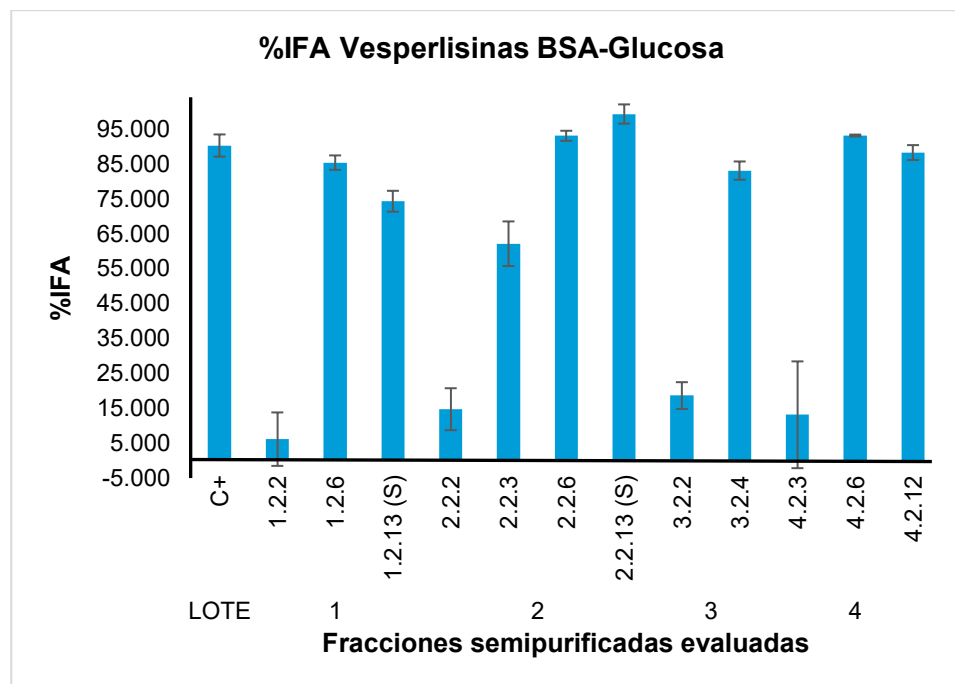


Figura 13. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo vesperlisinas en ensayo BSA-glucosa

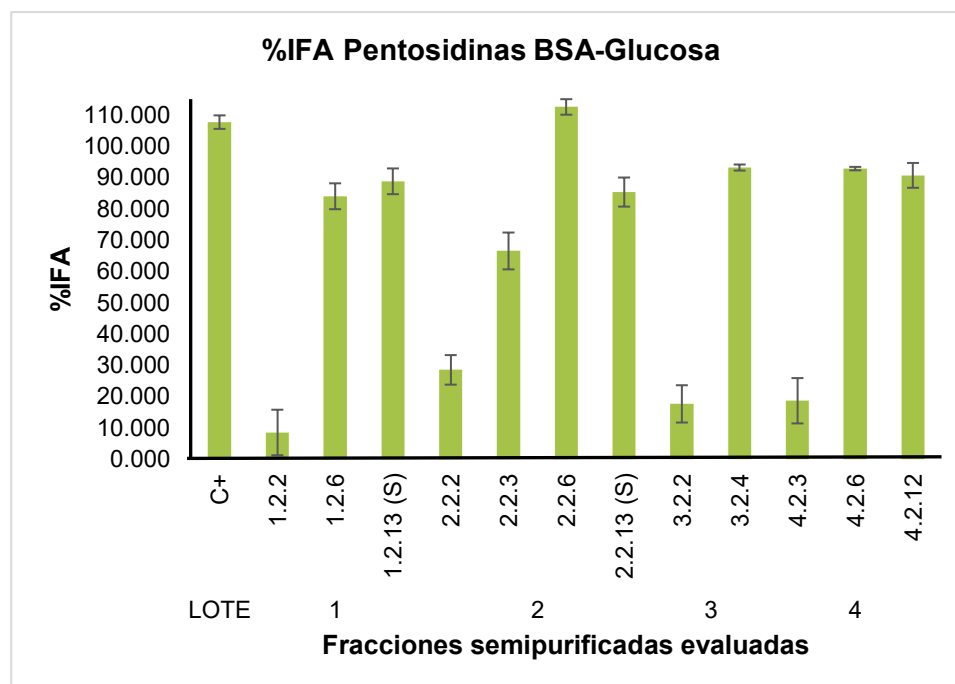


Figura 14. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo pentosidinas en ensayo BSA-glucosa.

Los gráficos de las figuras 13 y 14 mostraron un interesante cambio, la actividad antiglicante demostró que en algunas fracciones la actividad se mantuvo y en otras la actividad disminuyó drásticamente, comparadas con los resultados obtenidos en el Ensayo BSA-ribosa.

Para el Lote 1 las fracciones con un mayor porcentaje fueron la fracción 1.2.6 con un 85.29% de inhibición en AGEs generales y 83.98% en AGEs tipo pentosidinas; y la fracción 1.2.13 (S) con un 74.24% y un 88.75% respectivamente.

En el lote 2 se destacan las fracciones 2.2.3 con un %IFA del 62.08% en AGEs tipo vesperlisinas y 66.50% en AGEs tipo pentosidinas; la fracción 2.2.6 mostró un 92.97% y un 112.51% en el orden dado; para finalizar la fracción 2.2.13 (S) tuvo un 99.27% y un 85.31% respectivamente.

Para el Lote 3 solo se destaca la fracción 3.2.4, teniendo un 83.01% en AGEs generales y un 93.15% en AGEs tipo pentosidinas.

Los resultados del Lote 4 fueron para la fracción 4.2.6 un 74.09% para AGEs tipo vesperlisinas y un 93.05% para AGEs tipo pentosidinas; del mismo modo, la fracción 4.2.12 mostró un 88.17% y un 90.65% respectivamente.

Los resultados muestran que algunas de las fracciones semipurificadas derivadas del hongo *Graphostroma sp.* SGSgf22 poseen una actividad antiglicante alta, en otras palabras, mayor al 50% IFA, en etapas finales de la glicación avanzada después de 15 días de su aplicación.

Además, se sigue mostrando que las fracciones semipurificadas obtenidas en la columna de cromatografía a una proporción de 60% hexano y 40% acetato de etilo (fracciones 1.2.6, 2.2.3, 2.2.6, 3.2.4 y 4.2.6), y las fracciones que eluyeron con 50% acetato de etilo y 50% de metanol (fracciones 1.2.13 (S), 2.2.13 (S) y 4.2.12), muestran porcentajes de antiglicación favorables. Es de notar que las fracciones semipurificadas 1.2.6, 2.2.6, 3.2.4, 4.2.6, 1.2.13 (S) y 2.2.13 (S), continúan mostrando porcentajes de antiglicación favorables, tanto en el ensayo BSA-ribosa como el ensayo BSA-glucosa.

7.3.2 Actividad antiglicación prueba NBT

Los resultados para la inhibición de fructosamina para estas fracciones tuvo resultados poco favorables, a comparación de los resultados mostrados en los ensayos BSA-ribosa y BSA-glucosa, las muestras evaluadas fueron las mismas que las fracciones de BSA-glucosa (1.2.2, 1.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.2, 2.2.3, 2.2.6, 2.2.13 (S), 3.2.2, 3.2.4, 4.2.3, 4.2.6 y 4.2.12). La lectura de resultados se llevó a cabo en una placa Costar ® de 96 pozos transparente, la placa sirvió para hacer dos lecturas diferentes.

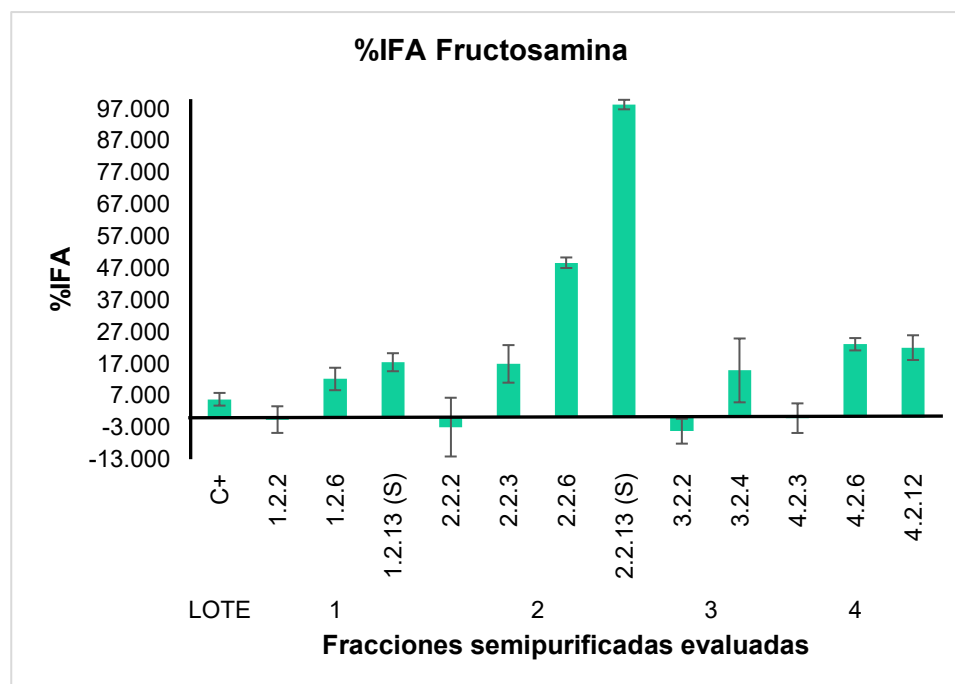


Figura 15. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de fructosamina en NBT.

Las fracciones con una mayor inhibición de fructosamina son la fracción 2.2.13 (S) con 98.29% de inhibición de fructosamina; la fracción 2.2.6 con un 48.66%; la fracción 4.2.6 con 23.08%; la fracción 4.2.12 con 22.02%; y la fracción 1.2.13 (S) con un 17.43% de inhibición.

Las fracciones con mayor actividad de inhibición de fructosamina continúan siendo las fracciones que eluyeron en la CC a una proporción de 60% hexano y 40% acetato de etilo (2.2.6 y 4.2.6), y a una proporción de 50% acetato de etilo y 50% de metanol (1.2.13 (S), 2.2.13 y 4.2.12). Los lotes más activos son el 2 (2.2.6 y 2.2.12(S)) y el 4 (4.2.6 y 4.2.12).

7.4 Selección de fracciones semipurificadas disponibles a partir de la cantidad de reserva existente para análisis posteriores.

Después de evaluar los resultados proporcionados por las pruebas de BSA-ribosa, BSA-glucosa y NBT (Ver Anexo E para ver el resumen de resultados de las fracciones evaluadas), se seleccionaron nuevamente las fracciones que permitirían continuar con análisis posteriores a partir de la cantidad de reserva existente.

Tabla 6. Reserva en mg existente para continuar con análisis posteriores.

De las 20 fracciones seleccionadas inicialmente para realizar las pruebas de antiglicación, se descartaron aquellas que no poseían la cantidad suficiente, como se observa en la Tabla 5, dejando un total de 13 fracciones:

- Lote 1: 4 fracciones (1.2.2, 1.2.5, 1.2.6 & 1.2.13 (S))
- Lote 2: 7 fracciones (2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8 & 2.2.13 (S))
- Lote 3: 1 fracción (3.2.2)
- Lote 4: 1 fracción (4.2.3)

A pesar de que hubo fracciones con actividad antiglicante significativas como las fracciones 3.2.4 y 4.2.6, tuvieron que ser descartadas debido a la poca cantidad para realizar una posible evaluación de compuestos y realizar otro tipo de pruebas.

7.5 Análisis de HPLC

De las 20 fracciones seleccionadas, 19 fueron sometidas a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el fin de analizar la composición y acercarse a la identificación de los compuestos responsables de la actividad antiglicante (ver Anexo H). Las fracciones llevadas a HPLC fueron:

- Lote 1: 5 fracciones (1.2.2, 1.2.5, 1.2.6, 1.2.10, 1.2.13 (S))
- Lote 2: 7 fracciones (2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8 & 2.2.13 (S))
- Lote 3: 4 fracciones (3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 & 3.2.12)
- Lote 4: 3 fracciones (4.2.3, 4.2.6 & 4.2.12)

Tabla 7. Información resumida de cada cromatograma HPLC realizado.

Lote	Fracción	Longitud de onda (nm)	Número de picos	Minuto de cada pico	Rango de absorbancia (nm)
------	----------	-----------------------	-----------------	---------------------	---------------------------

Lote	Fracción	Reserva (mg)
1	1.2.2	1589.4
	1.2.5	21.6
	1.2.6	146.3
	1.2.10	2.8
	1.2.13 (S)	102.2
2	2.2.2	874.7
	2.2.3	32.1
	2.2.5	60.3
	2.2.6	90.3
	2.2.7	29.8
	2.2.8	9.7
	2.2.11	5.5
3	2.2.13	24.3
	3.2.2	384.8
	3.2.3	2.3
	3.2.4	5.4
4	3.2.12	1.2
	4.2.3	162.3
	4.2.6	1.3
	4.2.12	10.8

1	1.2.2	200	3	6, 17, 30.5	190-275
	1.2.5	200	8	5, 6.5, 7, 7.5, 8, 10.5, 23, 23.5	190-320
	1.2.6	210	5	6, 7.5, 8, 9.5, 10.5	190-320
	1.2.10	270	7	5.5, 6, 7, 8, 10.5, 12.5, 13.5	190-310
	1.2.13(S)	190	8	4.5, 6, 7, 8, 14.5, 17.5, 18, 20	190-310
2	2.2.2	200	3	6, 17, 30.5	190-250
	2.2.3	190	18	4.5, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5, 11.5, 13.5, 14, 17, 19, 20.5, 23, 23.5, 31, 32.5, 33.5, 35.5, 36.5	190-300
	2.2.5	200	9	6, 6.5, 7, 8, 9.5, 10.5, 11, 14, 17	190-350
	2.2.6	190	3	6, 8, 11	190-300
	2.2.7	190	8	5.5, 6, 6.5, 7, 8, 12.5, 15, 17	190-300
	2.2.8	190	11	4.5, 6, 6.5, 7, 8, 10, 10.5, 11, 12.5, 15, 17	190-310
	2.2.13 (S)	200	21	4.5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 10.5, 11, 12, 14.5, 15, 15.5, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 22.5, 24	190-300
3	3.2.2	200	5	4.5, 5, 6, 17, 30.5	190-250
	3.2.3	190	19	4.5, 5, 6.5, 7, 8, 9, 10, 11.5, 12.5, 14, 17, 19, 20.5, 30.5, 31, 32, 33, 35.5, 37	190-300
	3.2.4	190	12	6, 7, 8, 9.5, 10.5, 11, 12, 17, 18.5, 20, 21, 33.5	190-300
	3.2.12	190	22	4.5, 5, 5.5, 6, 7, 10.5, 11, 12, 14, 14.5, 15, 17, 18, 19, 19.5, 21, 22, 22.5, 23, 24, 30.5, 33	190-290
4	4.2.3	200	3	5.5, 17, 30.5	190-275
	4.2.6	210	6	6, 7, 7.5, 8, 12, 17	190-300
	4.2.12	190	25	4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 11, 12, 14.5, 15, 15.5, 17.5, 18, 18.5, 19, 20, 21, 22, 22.5, 24, 30.5, 33	190-300

La Longitud de onda (nm) indica la absorbancia tomada para realizar los cromatogramas (Anexo H). El rango de absorbancia (nm) indica la zona donde se encuentra la mayor absorbancia de cada fracción. Los minutos marcados con “**negritas**” indican que son los picos más altos o con mayor relevancia.

Se puede observar en la tabla 7 que la mayoría de los compuestos con propiedades antiglicantes tienen picos más activos cerca de los minutos 6 y 8. Las

fracciones 1.2.5, 1.2.6, 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8., 1.2.13 (S) y 1.2.13 (S) presentan menor cantidad de picos. Las fracciones restantes, presentaron una gran cantidad de picos, por lo que se optó por no seguir trabajando con ellas. Ver el Anexo H para ver con mayor detalle los cromatogramas de HPLC.

Al analizarse los cromatogramas obtenidos por HPLC se decidió hacer gráficas con absorbancias promedio de 190 a 300 nm debido a que el mayor rango de absorción se encontraba en esta zona; lo que permitió realizar comparaciones de las fracciones analizadas.

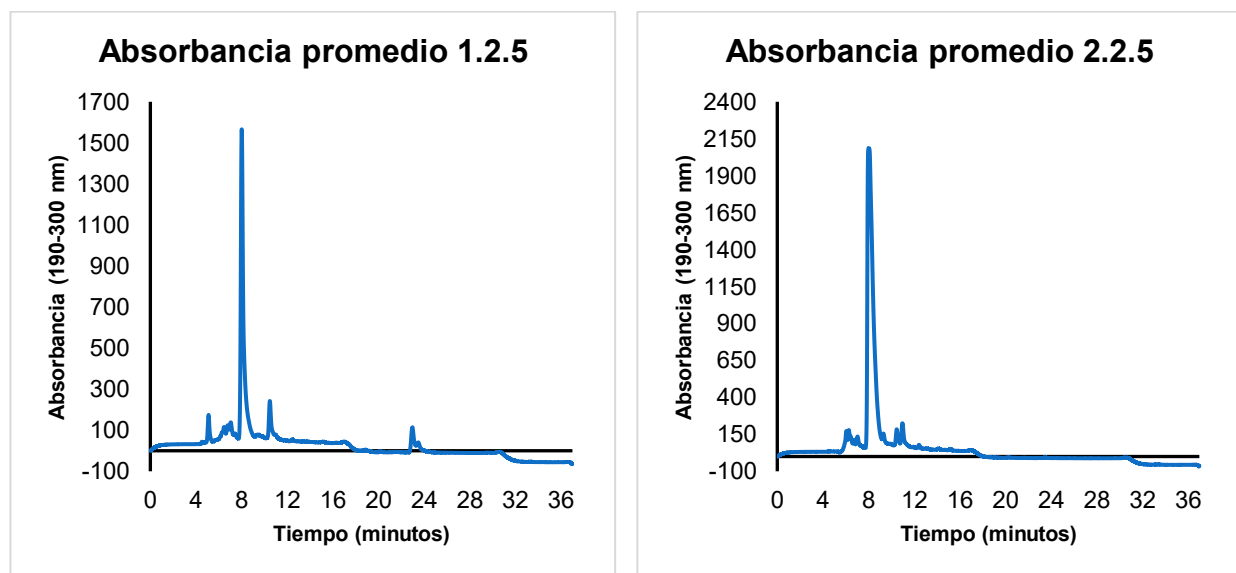


Figura 16. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 1.2.5 y 2.2.5

Las fracciones 1.2.5 y 2.2.5 de la figura 16 muestran un pico claramente definido al minuto 8, por lo que puede decirse que es el componente responsable de la actividad antiglicante.

Los picos en el minuto 8 tienen una absorbancia promedio cerca de los 1600 para la fracción 1.2.5 y una absorbancia de 2000 para la fracción 2.2.5. El resto de los picos más pequeños se encuentran en un rango de absorbancia entre los 200-250.

Los picos más altos indican que existen compuestos polares en estas fracciones debido a que eluyeron dentro de los primeros 10 minutos, con la mezcla de solventes Agua con 0.1% ácido fórmico-acetonitrilo al 50:50.

Las fracciones 1.2.5 y 2.2.5 solo fueron evaluadas en ensayo BSA-ribosa con %IFA similares entre ellas, del 55.66% y 55.67% respectivamente para AGEs generales y; un

51.55% y 50.79% para AGEs tipo pentosidinas, por lo que pueden ser fracciones con resultados favorables para las pruebas en BSA-glucosa y pruebas NBT.

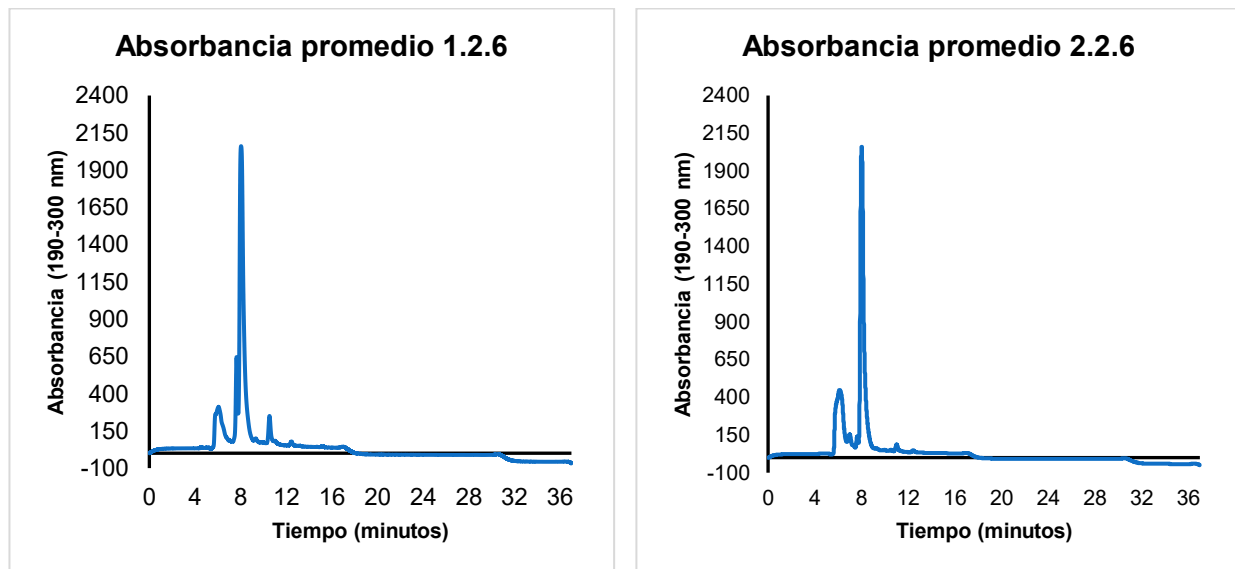


Figura 17. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 1.2.6 y 2.2.6

La absorbancia promedio de las fracciones 1.2.6 y 2.2.6 (Figura 17) muestran dos principales picos definidos a los 6 y 8 minutos, siendo el del minuto 8 el más alto.

Los picos de los 6 minutos muestran una absorbancia alrededor de los 250 para la fracción 1.2.6 y cerca de 500 de absorbancia para la fracción 2.2.6. Los picos en el minuto 8 tienen una absorbancia superior a los 2000.

Los picos indican la existencia de compuestos polares en estas fracciones ya que todos los picos eluyeron dentro de los primeros 10 minutos, con la mezcla de solventes Agua con 0.1% ácido fórmico-acetonitrilo al 50:50.

La actividad de inhibición mostrada por estas fracciones en ensayo BSA-ribosa fue la siguiente, para AGEs tipo vesperlisinas fue del 77.78% para la fracción 1.2.6 y 68.37% para la fracción 2.2.6; mientras que, para AGEs tipo pentosidinas fue del 70.55% y 77.78% respectivamente.

Para la actividad antiglicante en ensayo BSA-glucosa se puede apreciar un ligero aumento en el porcentaje de inhibición, con un porcentaje del 85.29% de la fracción 1.2.6 y 92.97% de la fracción 2.2.6 en AGEs generales; para AGEs tipo pentosidinas la fracción 1.2.6 obtuvo un 83.98% y la fracción 2.2.6 tuvo un 112.51%.

Los ensayos de NBT mostraron una inhibición en fructosamina del 12.18% para la fracción 1.2.6 y 48.66% para la fracción 2.2.6, siendo esta última fracción la más activa de las dos.

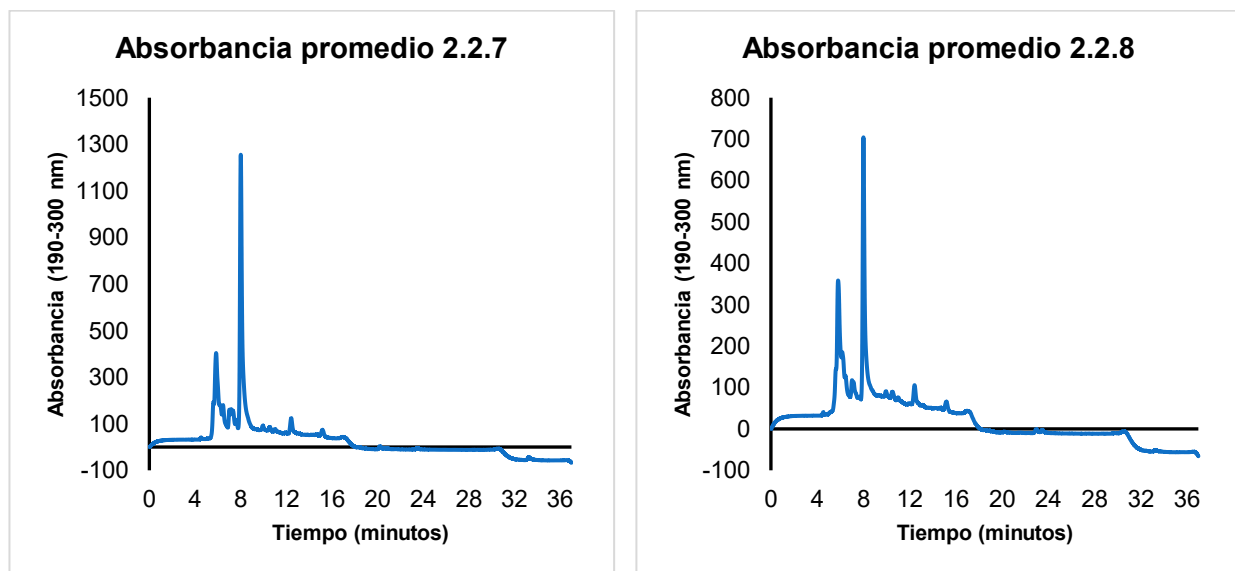


Figura 18. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 2.2.7 y 2.2.8

Estas fracciones del lote 2 (Figura 18) son similares entre sí, poseen diferentes picos, dos de los cuales se encuentran en el minuto 6 y 8, este último pico es el más definido, las dos fracciones eluyeron en la CC en una proporción cercana a 50-60-70% hexano y 50-40-30% acetato de etilo.

Los picos a los 6 minutos muestran una absorbancia cercana a los 400. Los picos al minuto 8 tienen una absorbancia superior a los 1200 para la fracción 2.2.7 y una absorbancia de 700 para la fracción 2.2.8.

Los picos más prominentes demostraron que existen compuestos polares en estas fracciones, eluyéndose en los primeros 10 minutos, con la mezcla de solventes Agua con 0.1% ácido fórmico-acetonitrilo al 50:50. Los picos más pequeños son menos polares se muestran pasados los 11 minutos al 60% de acetonitrilo; los picos pasando el minuto 31 indican que son compuestos no polares.

El %IFA en ensayo BSA-ribosa indican un 55.12% para la fracción 2.2.7 y 50.39% para la fracción 2.2.8 en AGEs generales; un 100.66% y 96.79% para AGEs tipo pentosidinas. Estas fracciones solo fueron evaluadas en este ensayo.

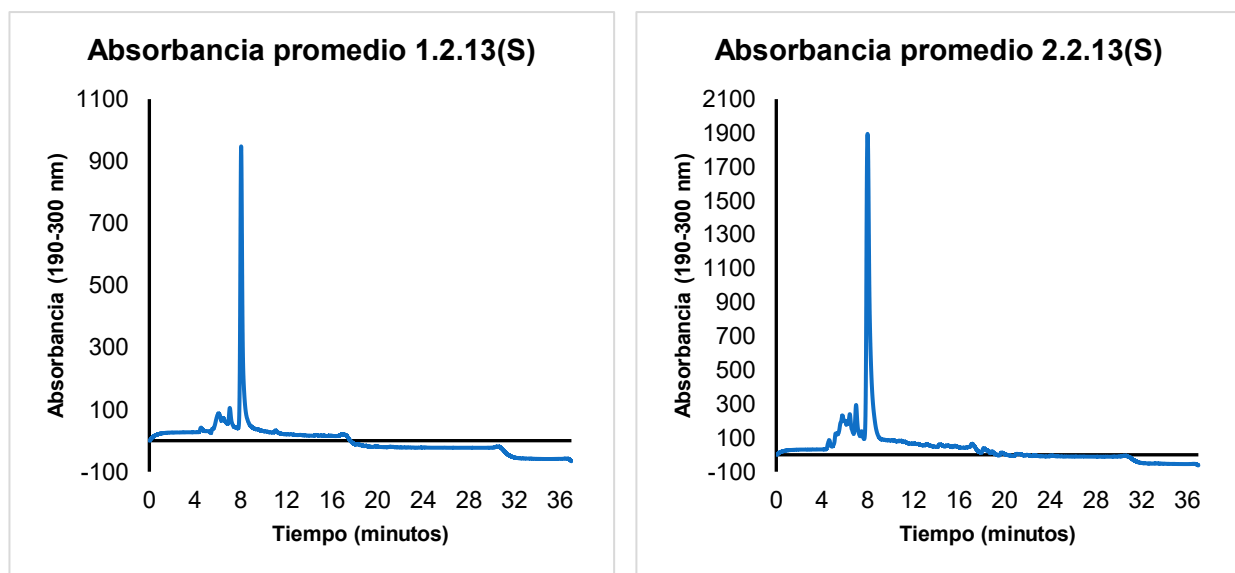


Figura 19. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 1.2.13 (S) y 2.2.13 (S)

Las fracciones sobrenadantes 1.2.13 (S) y 2.2.13 (S) se eluyeron en la CC a una proporción 50% acetato de etilo y 50% metanol, a pesar que se muestran varios picos pequeños cerca del minuto 6, se muestra un pico claramente definido a los 8 minutos (Figura 19). Mostrando los siguientes resultados:

- %IFA en BSA-ribosa: para AGEs generales 49.13% (1.2.13 (S)) y 55.02% (2.2.13 (S)) y para AGEs tipo pentosidinas 65.11% (1.2.13 (S)) y 58.04% (2.2.13 (S))
- %IFA en ensayo BSA-glucosa: para AGEs generales 74.24% (1.2.13 (S)) y 99.21% (2.2.13 (S)) y para AGEs tipo pentosidinas 88.75% (1.2.13 (S)) y 85.31% (2.2.13 (S))
- Inhibición de fructosamina en NBT: un 17.43% 1.2.13 (S) y un 98.29% 2.2.13 (S)

Los picos de ambas fracciones que se encuentran cerca de los 6 minutos muestran una absorbancia cercana a los 100 para la fracción 1.2.13 (S) y una absorbancia cerca de los 300 para la fracción 1.2.13 (S). Los picos en el minuto 8 tienen una absorbancia cercana a los 1000 para la fracción 1.2.13 (S) y una absorbancia de 2000 para la fracción 2.2.13 (S).

Los picos más prominentes evidenciaron compuestos polares en estas fracciones, eluyéndose en los primeros 10 minutos, con una mezcla de solventes Agua con 0.1% ácido fórmico-acetonitrilo al 50:50. Los picos más pequeños sobre todo los de la fracción 2.2.13 (S) son menos polares se muestran pasados los 11 minutos al 60% de acetonitrilo.

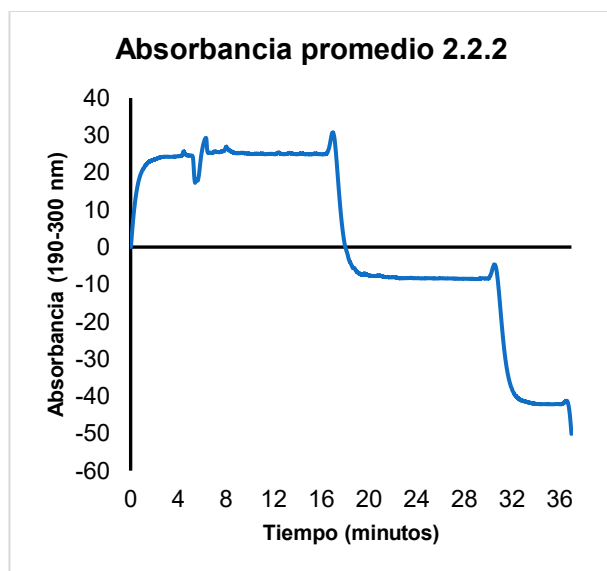


Figura 20. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 2.2.2

En la Figura 20 se muestra la absorbancia promedio de la fracción 2.2.2. Se aprecian 3 picos cerca del minuto 6, 17 y 30.5. Esta fracción se obtuvo de CC con una mezcla de 20% de acetato de etilo y 80% de hexano.

En el cromatograma se aprecian al menos tres picos principales; el primero se representa a los 6 minutos con una absorbancia de 30, indicando que es un compuesto polar; el segundo pico se aprecia al minuto 17 con una absorbancia ligeramente superior a 30, mostrando que es un compuesto menos polar; finalmente, el tercer pico se encuentra en el minuto 30.5 con absorbancia de -5, mostrando ser un compuesto no polar.

La fracción 2.2.2 es la más abundante del Lote 2 obtenida de la CC con in %IFA en AGEs generales del 59.48% en ensayo BSA-ribosa y 14.71% en ensayo BSA-glucosa; mientras que, para %IFA para AGEs tipo pentosidinas obtuvo un 50.14% en BSA-ribosa y 28.53% en BSA-glucosa; indicando que la actividad antiglicante no se sostiene después de 15 días. Por último, posee una inhibición de fructosamina de -2.93%, por lo que esta fracción no es recomendable para inhibir la formación de AGEs a etapas tempranas.

En la fracción 4.2.3 (Figura 21), los tres picos principales se muestran alrededor del minuto 5.5 con absorbancia cercana a 140, al eluir a una concentración de acetonitrilo del 50% en los primeros 10 minutos indica que es un compuesto polar; el segundo pico se encuentra al minuto 17, es menos polar y se encuentra en una absorbancia cercana a 10; el tercer pico se encuentra cerca del minuto 30.5, es el compuesto menos polar con una absorbancia cercana a -20.

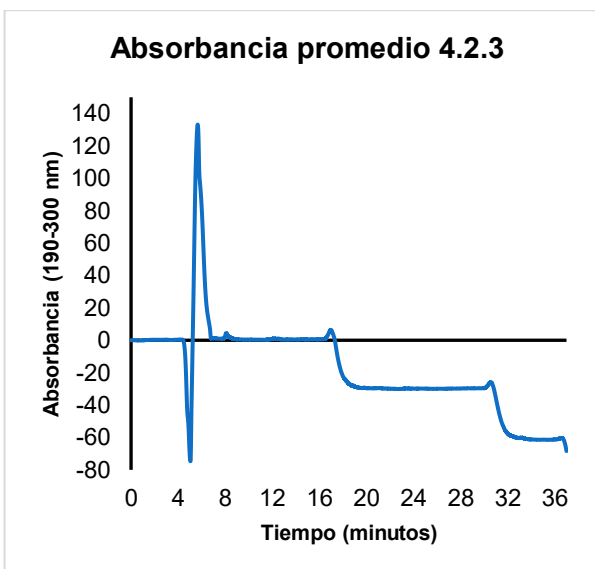


Figura 21. Absorbancia promedio (190-300nm) de la fracción 4.2.3

Esta fracción también es la más abundante del lote 4 y cuenta con los resultados siguientes:

BSA-ribosa: 55.22% para AGEs generales y 46.45% para AGEs tipo pentosidas.

BSA-glucosa: 13.12% para AGEs generales y 18.66% para AGEs tipo pentosidas. Indicando que la actividad antiglicante disminuye significativamente después de 15 días.

NBT: Con resultados de -0.12%, mostrando que no es un compuesto inhibidor de fructosamina.

7.6. Análisis de varianza de los resultados de actividad antiglicación para las muestras seleccionadas

Se realizó un análisis de varianza para comparar las medias de los valores de %IFA de las fracciones semipurificadas seleccionadas previamente y determinar si estas son significativamente diferentes entre ellas. Ver anexo F para mayor información.

7.6.1. Análisis de varianza para actividad antiglicación en ensayo BSA-ribosa

Tabla 8. Resumen de análisis de varianza para antiglicación en ensayo BSA-ribosa para AGES tipo vesperlisinas y pentosidas.

Fracción	Vesperlisinas			Pentosidas		
	Suma	Promedio	Varianza	Suma	Promedio	Varianza

1.2.6	466.6861	77.78101	3.982413	423.2999	70.54998	10.86705
2.2.6	410.2403	68.37338	21.24613	466.6905	77.78175	13.59336
1.2.13(S)	294.7794	49.12991	7.336215	390.6688	65.11147	13.5174
2.2.13(S)	330.1498	55.02496	48.8497	348.2403	58.04005	37.8335
2.2.2	356.884	59.48067	9.488249	300.8422	50.14037	12.1424
4.2.3	331.3349	55.22248	13.39801	278.7	46.45	14.0974
F (Valor crítico) 2.53355454 F 37.835616 F (Valor crítico) 2.533554 F 51.32101						

En ambos análisis de varianza se descartó la hipótesis nula, es decir, existen diferencias en los porcentajes de inhibición tanto en vesperlisinas como en pentosidinas de las fracciones 1.2.6, 2.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.13 (S), 2.2.2 & 4.2.3.

Utilizando el método Tukey se determinó que en AGEs tipo vesperlisinas, no hay diferencias estadísticas significativas entre las fracciones 1.2.13 (S), 2.2.13 (S) & 4.2.3; tampoco existen diferencias entre las fracciones 2.2.13 (S), 2.2.2 & 4.2.3.

Con respecto a AGEs tipo pentosidinas no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las fracciones 1.2.6, 2.2.6 & 1.2.13 (S); entre las fracciones 1.2.13 (S) & 2.2.13 (S); y, las fracciones 2.2.2 & 4.2.3.

7.6.2. Análisis de varianza para actividad antiglicación en ensayo BSA-glucosa

Tabla 9. Resumen de análisis de varianza para antiglicación en ensayo BSA-glucosa para AGEs tipo vesperlisinas y pentosidinas.

Fracción	Vesperlisinas			Pentosidinas		
	Suma	Promedio	Varianza	Suma	Promedio	Varianza
1.2.6	255.8803	85.29342	4.253811	251.93418	83.978061	17.114074
2.2.6	278.911	92.97035	2.085947	337.51573	112.50524	6.1260967
1.2.13(S)	222.7152	74.23841	8.941238	266.26016	88.753388	16.933395
2.2.13(S)	297.622	99.20734	7.571806	255.93496	85.311653	21.572433
2.2.2	79.51745	26.50582	17.96434	85.581545	28.527182	11.150579
4.2.3	72.11793	24.03931	116.7643	72.282626	24.094209	26.21625
F (Valor crítico) 3.105875 F 127.57296 F (Valor crítico) 3.105875 F 232.9665 23						

Los análisis de varianza para los porcentajes de inhibición AGEs en ensayo BSA-glucosa se descartó la hipótesis nula, por lo que existen diferencias entre los valores de

%AGEs de las fracciones 1.2.6, 2.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.13 (S), 2.2.2 & 4.2.3, tanto en vesperlisinas como en pentosidas.

Por medio de método Tukey se demostró que no existen diferencias estadísticas significativas entre los %IFA en AGEs generales de las fracciones 1.2.6 & 2.2.6; las fracciones 2.2.6 & 2.2.13 (S); y, las fracciones 2.2.2 & 4.2.3.

7.6.3. Análisis de varianza para actividad antiglicación en Ensayos NBT

Tabla 10. Tabla 10. Resumen de análisis de varianza para antiglicación en ensayos NBT

Fracción	Suma	Promedio	Varianza
1.2.6	36.534058	12.178019	12.402486
2.2.6	145.96451	48.654837	2.7449133
1.2.13 (S)	52.300354	17.433451	7.9955961
2.2.13 (S)	294.87613	98.292045	2.2139356
2.2.2	-8.8008014	-2.9336005	85.003845
4.2.3	-0.3649113	-0.1216371	10.785979
F (Valor crítico)		3.105875239	F 222.045556

El análisis de varianza mostró que existen diferencias en los porcentajes de inhibición de fructosamina de las fracciones 1.2.6, 2.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.13 (S), 2.2.2 & 4.2.3, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Con respecto al método Tukey, los porcentajes de inhibición de fructosamina de las fracciones 1.2.6 & 1.2.13 (S); y, las fracciones 2.2.2 & 4.2.3, no mostraron diferencias estadísticas significativas.

Los datos recabados de cada prueba para cada fracción muestran que no hay diferencias estadísticas significativas, la mayoría de las fracciones muestran una desviación estándar menor al 10% en cada una de las pruebas realizadas. Ver Anexos E, F y H.

7.7. Búsqueda de posibles compuestos

Se realizó una búsqueda de los compuestos reportados en el género *Graphostroma* y de su familia, Graphostromataceae, debido a que solo se reportan 47 compuestos en la base de datos “The Natural Products Atlas” (Van Santen et al., 2021).

De los 47 compuestos reportados únicamente se seleccionaron 13 de ellos por su posible actividad anti AGEs, los cuales se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Compuestos reportados de la familia *Graphostromataceae* con posible actividad anti AGEs

Género	Nombre	Fórmula molecular	Tipo de compuesto	Actividades reportadas	Referencia
Biscogniauxia	(3S)-5-hydroxy-8-O-methylmellein	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	Isocumarinas	Antimicrobiano, antitumoral, antioxidante, antiinflamatorio	Cheng et al. (2011) Revegla et al. (2020)
Biscogniauxia	Biscogniauxone	C ₁₂ H ₇ NO ₄	Antraquinonas y antronas	Actividad inhibidora de la enzima GSK-3β	Wu et al. (2016)
Biscogniauxia	Biscogniacid A	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	Ácidos fenólicos simples	Inmunomodulador, antiinflamatoria, antioxidante	Zhao et al. (2016)
Graphostroma	Graphostromol B	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	Policétidos	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu et al. (2019)
Graphostroma	Graphostromol E	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	Policétidos	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu et al. (2019)
Graphostroma	Graphostrin A	C ₁₂ H ₁₂ CIN O ₄	Alcaloides de tirosina	Anti alergia alimentaria	Niu, Liu, et al. (2018)
Graphostroma	Graphostrin B	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	Policétidos	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu, Liu, et al. (2018)
Graphostroma	Graphostrin C	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	Ácidos fenólicos simples	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu, Liu, et al. (2018)
Graphostroma	Graphostrin D	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	Ácidos fenólicos simples	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu, Liu, et al. (2018)
Graphostroma	Graphostrin E	C ₁₄ H ₁₆ O ₆	Shikimatos y fenil propanoides	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu, Liu, et al. (2018)
Graphostroma	Graphostrin F	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	Ácidos fenólicos simples	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu, Liu, et al. (2018)
Graphostroma	Graphostrin G	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	Isocumarinas	Anti alergia alimentaria, antiinflamatoria	Niu, Liu, et al. (2018)
Biscogniauxia	Sansalvamide A amide	C ₃₂ H ₅₁ N ₅ O ₅	Péptidos cíclicos	Efectos citotóxicos en líneas celulares de cáncer	Wu et al. (2016)

La mayoría de los compuestos reportados de la familia *Graphostromataceae* con posible actividad anti AGEs muestran otras propiedades antialérgicas, antiinflamatorias,

antioxidantes, antitumorales y anticancerígenas, dichas propiedades pueden verse reflejadas en *Graphostroma sp. SGSGf22*, representando una gran área de oportunidad para el estudio de este hongo.

La investigación sobre la evaluación de los extractos del cultivo de *Graphostroma sp. SGSGf22* con actividad antiglicación para el tratamiento de enfermedades no transmisibles representa una oportunidad valiosa para contribuir a la ciencia y la salud pública. Los hallazgos obtenidos podrían ser un punto de partida para futuros estudios y abrir nuevas perspectivas en el desarrollo de tratamientos más eficaces y seguros, ya que se ha demostrado que los compuestos obtenidos por este hongo tienen actividad antiglicante.

8. CONCLUSIONES

Veinte fracciones semipurificadas de las veintinueve evaluadas tuvieron actividad anti AGEs para tipo vesperlisinas (mayor a 49%) y para tipo pentosidinas (mayor a 44%) en ensayo BSA-ribosa.

Las 20 fracciones con actividad anti AGEs tipo vesperlisinas con un %IFA mayor a 49% ordenadas de mayor a menor, fueron las siguientes: 1.2.6 con 77.78%, 4.2.6 con 77.58%, 4.2.12 con 70.61%, 2.2.6 con 68.37%, 3.2.4 con 66.75%, 1.2.10 con 65.43%, 2.2.3 con 60.72%, 2.2.2 con 59.48%, 3.2.2 con 59.15%, 2.2.5 con 57.67%, 1.2.5 con 57.66%, 3.2.12 con 56.40%, 2.2.7 con 55.62%, 1.2.2 con 55.26%, 4.2.3 con 55.22%, 2.2.13 (S) con 55.06%, 3.2.3 con 52.10%, 2.2.8 con 50.38%, 2.2.11 con 49.75% y 1.2.13 (S) con 49.13%.

Las 20 fracciones semipurificadas con actividad anti AGEs tipo pentosidinas en ensayo BSA-ribosa, con un %IFA mayor a 44%, ordenadas de mayor a menor %IFA fueron las siguientes: 2.2.7 con 100.66%, 2.2.8 con 96.79%, 3.2.4 con 80.04%, 2.2.6 con 77.78%, 4.2.6 con 74.09%, 1.2.10 con 72.85%, 1.2.6 con 70.55%, 2.2.11 con 66.67%, 1.2.13 (S) con 65.11%, 4.2.12 con 61.77%, 2.2.13 (S) 58.04%, 3.2.12 con 55.47%, 2.2.3 con 54.12%, 1.2.5 con 51.55%, 3.2.3 con 51.34%, 2.2.5 con 50.79%, 2.2.2 con 50.14%, 3.2.2 con 47.58%, 4.2.3 con 46.45% y 1.2.2 con 44.77%.

Ocho de las veinte fracciones con actividad anti AGEs en ensayo BSA-ribosa tuvieron un %IFA mayor al 60% tanto en AGEs tipo vesperlisinas como en tipo pentosidinas en ensayo BSA-glucosa.

Las 8 fracciones semipurificadas evaluadas en ensayos BSA-glucosa que mostraron un %IFA superior al 60%, ordenados de mayor a menor, en actividad anti AGEs tipo vesperlisinas fueron las siguientes: 2.2.13 (S) con 99.21%, 4.2.6 con 93.05%, 2.2.6 con 92.97%, 4.2.12 con 88.17%, 1.2.6 con 85.29%, 3.2.4 con 83.01%, 1.2.13 (S) con 74.24% y 2.2.3 con 62.08%.

Las 8 fracciones semipurificadas con un %IFA superior al 60%, ordenados de mayor a menor, en actividad anti AGEs tipo pentosidinas en ensayo BSA-glucosa fueron las siguientes: 2.2.6 con 112.51%, 3.2.4 con 93.15%, 4.2.6 con 92.81%, 4.2.12 con 90.65%, 1.2.13 (S) con 88.75%, 2.2.13 (S) con 85.31%, 1.2.6 con 83.98% y 2.2.3 con 66.50%.

Cuatro de las veinte fracciones semipurificadas con actividad anti AGEs en ensayo BSA-ribosa tuvieron un porcentaje superior al 20% en inhibición de fructosamina en ensayos de NBT, ordenadas de mayor a menor, fueron las siguientes: 2.2.13 (S) con 98.29%, 2.2.6 con 48.65%, 4.2.6 con 23.08% y 4.2.12 con 22.02%.

Las cinco fracciones 1.2.6, 2.2.6, (1.2.13 (S)+2.2.13 (S)), 2.2.2 y 4.2.3 tuvieron actividad anti AGEs en los ensayos BSA-ribosa, BSA-glucosa y ensayos de NBT; además se observaron menos de 3 picos mayoritarios en el análisis de HPLC y poseían una cantidad de reserva existente mayor a 90 mg, lo que permite que estas fracciones sean utilizadas en trabajos futuros.

Se obtuvieron cinco fracciones semipurificadas con inhibición de la formación de AGEs en su fase final y 2 de ellas además en su fase temprana.

9. REFERENCIAS

Araya, M. A., Brenes, J. P. S., Fallas, R. S., Mora-Barrantes, J. C., Solís, R. A., Borbón-Alpízar, H., & González, J. V. (2024). Validación de un método de cromatografía líquida (HPLC-UV/Vis) para la cuantificación de aldehídos en agua de lluvia y aire. *Uniciencia*, 38(1), 1-15. <https://doi.org/10.15359/ru.38-1.27>

- Berumen-Rodríguez, A. A., González-Mares, M. O., Nieto-Caraveo, L. M., Domínguez-Cortinas, G., Portales-Pérez, D. P., Ilizaliturri-Hernández, C. A., & Cubillas-Tejeda, A. C. (2020, 14 diciembre). Implementación de intervenciones educativas enfocadas en la prevención de enfermedades no transmisibles, para mejorar la salud ambiental de zonas urbanas marginadas de San Luis Potosí, México. Recuperado 7 de febrero de 2024, de <https://www.ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/1067>
- Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ullrich, P., & Cerami, A. (1986). Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. *SCIENCE*, 232, 1629-1632.
- Cheng, M., Wu, M., Hsieh, S., Chen, I., & Yuan, G. (2011). Secondary metabolites isolated from the fungus *Biscogniauxia cylindrospora* BCRC 33717. *Chemistry Of Natural Compounds*, 47(4), 527-530. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9988-z>
- Giraldo, L., Sanchez, S. A., & García, M. A. (2019). Revisión sobre la distribución y conservación de *Taxus globosa* Schtdl. (Taxaceae) en México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56), 65-84. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.479>
- Gómez Vázquez, Á. H. (2020). *La reacción de Maillard y su impacto en la salud* [Trabajo Fin de Grado en Farmacia]. Universidad de Sevilla.
- Gutiérrez-García, K., Neira-González, A., Pérez-Gutiérrez, R. M., Granados-Ramírez, G., Zarraga, R., Wrobel, K., Barona-Gómez, F., & Flores-Cotera, L. B. (2017). Phylogenomics of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* and Novel Antiglycation Endophytes from *Piper auritum*. *Journal Of Natural Products*, 80(7), 1955-1963. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00823>
- Guzmán Villanueva, M. (2022, 4 agosto). *Identificación y cuantificación de sustancias por HPLC - FQ*. Facultad de Química. Recuperado 26 de junio de 2023, de <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/identificacion-y-cuantificacion-de-sustancias-por-hplc/%7D>
- Johnson, R. N., Metcalf, P., & Baker, J. (1983). Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. an index of diabetic control. *Clinica Chimica Acta*, 127(1), 87-95. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(83\)90078-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90078-5)

- Leandro Felipe, J. A. (2019). *Caracterización de un polisacárido con actividad antioxidante y anti-glicación aislado de las semillas de calabaza Cucurbita argyrosperma* [Tesis (Ingeniería Química Industrial)]. Instituto Politécnico Nacional.
- López Betancourt, O. (2023). Purificación de compuestos del cultivo de *Graphostroma sp.*, con actividad antiglicación en ensayo BSA-ribosa [Proyecto Terminal para obtener el Título de Ingeniero en Biotecnología]. Universidad Abierta y a Distancia de México.
- Matsuura, N., Aradate, T., Sasaki, C., Kojima, H., Ohara, M., Hasegawa, J., & Ubukata, M. (2002). Screening System for the Maillard Reaction Inhibitor from Natural Product Extracts. *Journal of Health Science*, 48(6), 520-526.
- Mridula, S., Masroor, W. S., Xavier, M., Hui, T. W., Chan, H. K., Chirara, K., & Nwabueze, O. P. (2021). Antioxidant and anti-advanced glycation end products formation properties of palmatine. *Journal Of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 9(3), 366-378. <http://jppres.com/jppres>
- Niu, S., Liu, Q., Xia, J., Xie, C., Luo, Z., Shao, Z., Liu, G., & Yang, X. (2018). Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Graphostroma sp.* MCCC 3A00421 Showed Potent Antifood Allergic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(6), 1369-1376. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04383>
- Niu, S., Xie, C., Xia, J., Luo, Z., Shao, Z., & Yang, X. (2018). New anti-inflammatory guaianes from the Atlantic hydrotherm-derived fungus *Graphostroma sp.* MCCC 3A00421. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18841-6>
- Niu, S., Xie, C., Xia, J., Zhong, T., Luo, Z., Shao, Z., & Yang, X. (2019). Graphostromols A–K, Eleven New Chained Polyketides from the Deep-Sea-Derived *Graphostroma sp.* *Chemistry & Biodiversity*, 16, e1900326. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900326>
- Niu, S., Xie, C., Zhong, T., Xu, W., Luo, Z., Shao, Z., & Yang, X. (2017). Sesquiterpenes from a deep-sea-derived fungus *Graphostroma sp.* MCCC 3A00421. *Tetrahedron*, 73(52), 7267-7273. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.11.013>

- Organización Panamericana de la Salud. (s. f.). *Enfermedades no transmisibles*. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. Recuperado 20 de junio de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-no-transmisibles>
- Reveglia, P., Masi, M., & Evidente, A. (2020). Melleins—Intriguing natural compounds. *Biomolecules*, 10(5), 772. <https://doi.org/10.3390/biom10050772>
- Rochín-Hernández, L. S., Rochín-Hernández, L. J., & Flores-Cotera, L. B. (2022). Endophytes, a Potential Source of Bioactive Compounds to Curtail the Formation—Accumulation of Advanced Glycation End Products: A Review. *Molecules*, 27(14), 4469. <https://doi.org/10.3390/molecules27144469>
- Salazar Osorio, M. (2019). *Glicación y estrés oxidativo en el plegamiento y desplegamiento de proteínas: aplicación a Trp-Cage*. [Trabajo de Fin de Máster en Ciencia y Tecnología Química]. Universitat de les illes Balears.
- Sánchez Rangel, J. C., Cuevas Morán, F. F., López Márquez, R., Berlanga Padilla, A. M., & Ayala Zermeño, M. A. (2022). Riqueza foliar de hongos endófitos cultivables aislados de plantas de banano (*Musa* spp.) con manejo orgánico. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 7(1). <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/article/view/1394>
- Séro, L., Sanguinet, L., Blanchard, P. C., Dang, B. T., Morel, S., Richomme, P., Séraphin, D., & Derbré, S. (2013). Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Plant Extracts. *Molecules*, 18(11), 14320-14339. <https://doi.org/10.3390/molecules181114320>
- Soca-Chafre, G., Rivera-Orduña, F. N., Hidalgo-Lara, M. E., Hernández-Rodríguez, C., Marsch, R., & Flores-Cotera, L. B. (2011). Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fungal Biology*, 115(2), 143-156. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.11.004>
- Twarda-Ćłapa, A., Olczak, A., Białkowska, A., & Koziółkiewicz, M. (2022). Advanced Glycation End-Products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells*, 11(8), 1312. <https://doi.org/10.3390/cells11081312>

- Van Santen, J. A., Poynton, E. F., Iskakova, D., McMann, E. J., Alsup, T. A., Clark, T. N., Fergusson, C. H., Fewer, D. P., Hughes, A. H., McCadden, C. A., Parra, J., Soldatou, S., Rudolf, J. D., Janssen, E. M., Duncan, K. R., & Linington, R. G. (2021). The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1317-D1323. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab941>
- Vega-Angarita, O. M. (2020). Adopción de estilos de vida como estrategia en la prevención y control de las enfermedades no transmisibles. *Revista Ciencia y Cuidado*, 1(1), 5-7. <https://revistas.ufps.edu.co/index.php/cienciaycuidado/article/view/1941>
- Wilson, Z. A., & Brimble, M. A. (2021). Molecule's derived from the extremes of life: a decade later. *Natural Product Reports*, 38(1), 24-82. <https://doi.org/10.1039/d0np00021c>
- Wu, B., Wiese, J., Schmaljohann, R., & Imhoff, J. F. (2016). Biscogniauxone, a New Isopyrrolonaphthoquinone Compound from the Fungus *Biscogniauxia mediterranea* Isolated from Deep-Sea Sediments. *Marine Drugs*, 14(11), 204. <https://doi.org/10.3390/md14110204>
- Zeng, C., Li, Y., Ma, J., Niu, L. N., & Tay, F. R. (2019). Clinical/Translational Aspects of Advanced Glycation End-Products. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 30(12), 959-973. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.005>
- Zhao, H., Chen, G., Zou, J., He, R., Qin, S., Hu, D., Li, G., Guo, L., Yao, X., & Gao, H. (2016). Dimericbiscognienyne A: A Meroterpenoid Dimer from *Biscogniauxia* sp. with New Skeleton and Its Activity. *Organic Letters*, 19(1), 38-41. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b03264>

Lista de figuras

Figura 1. Representación del proceso no enzimático de glicación: la glucosa reacciona con grupos amino de proteínas formando una base de Schiff, que posteriormente se convierte en un producto de Amadori. Este puede progresar hacia la formación de AGEs y promover enlaces cruzados entre proteínas. Se ilustra también la

inhibición temprana de la glicación mediante aminoguanidina, que evita la formación de AGEs. Modificado de Brownlee et al. (1986).12

Figura 2. Esquema de la formación endógena de AGEs en el organismo. La glicación inicia con la reacción de azúcares reductores con proteínas para formar una base de Schiff, que progresa al producto de Amadori (fase temprana). Posteriormente se generan compuestos dicarbonilos que participan en reacciones de glicoxidación durante la fase de propagación. Finalmente, estos intermediarios originan AGEs estables, como N-carboximetilisina (CML), N-[2-[(5-amino-5-carboxipentil) amino]-2-oxoetil]-lisina (GOLA), dímeros de lisina derivado de 3-desoxiglucosona (DOLD), enlace cruzado de imidazolio derivado de 3-desoxiglucosona (DODIC), hidroimidazolona 1 derivada de 3-desoxiglucosona (3DG-H1), N-carboxietil-lisina (CEL), dímeros de lisina derivado de metilglioxal (MOLD), N-carboxietil-arginina (CEA), hidroimidazolona 1 derivada de metilglioxal (MG-H1), hidroimidazolona 3 derivada de metilglioxal (MG-H3), tetrahidropirimidina (THP), dímeros de lisina derivado de glioxal (GOLD), enlaces cruzados de imidazolio derivados de glioxal (GODIC), carboximetil-cisteína (CMC), N-carboximetil-arginina (CMA) e hidroimidazolona 1 derivada de glioxal (G-H1). Modificado de Rochín-Hernández et al. (2022).13

Figura 3. Diferencias entre glicación exógena y endógena y su impacto en la generación de AGEs. Las fuentes exógenas provienen principalmente de alimentos procesados térmicamente, mientras que las fuentes endógenas derivan de reacciones no enzimáticas en tejidos y fluidos corporales. Basada en Zeng et al. (2019).14

Figura 4. Estructuras químicas de la 1-11 aisladas de *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421. **1.** (10R)-xilariterpenoide B, **2.** (10S)-xilariterpenoide A, **3.** xilariterpenoide E, **4.** xilariterpenoide F, **5.** xilariterpenoide G, **6.** khusinol B, **7.** khusinol C, **8.** khusinol D, **9.** khusinol E, **10.** graphostromabisabol A y **11.** graphostromabisabol B. Modificado de Niu et al. (2019).23

Figura 5. Esquema general de la metodología utilizada para el análisis de las 55 fracciones semipurificadas derivadas del extracto del hongo *Graphostroma* sp. SGSGf22.28

Figura 6. Procedimiento para obtener las fracciones semipurificadas. Realizado por López Betancourt (2023).29

Figura 7. Ejemplo de la forma en la que se nombraron las fracciones semipurificadas. El No. 2 significa que es una fracción secundaria, también llamada fracción semipurificada. El No. 6 es el orden en el que se obtuvieron las fracciones semipurificadas.	30
Figura 8. Fracción semipurificada 1.2.13 (S) disuelta en acetona y aforada a 100 mL en el matraz volumétrico, con los viales etiquetados para realizar cada tipo de prueba.	32
Figura 9. Placas para realizar las pruebas de inhibición de AGEs. A. Placa Constar® de 96 pozos negra para realizar análisis BSA-ribosa y BSA-glucosa, B. Muestras incubadas en tubos Eppendorf etiquetados para pruebas BSA-glucosa, C. Placa Constar 96 pozos transparente para realizar análisis NBT.	33
Figura 10. Preparación de los extractos semipurificados para análisis HPLC. ...	35
Figura 11. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo vesperlisinas (generales) en ensayo BSA-ribosa, resaltando con una línea roja las fracciones que se encuentran cerca o son superiores al 50% de %IFA.	37
Figura 12. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo pentosidinas en ensayo BSA-ribosa, resaltando con una línea roja las fracciones que se encuentran cerca o son superiores al 50.	37
Figura 13. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo vesperlisinas en ensayo BSA-glucosa	39
Figura 14. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de AGEs tipo pentosidinas en ensayo BSA-glucosa.	40
Figura 15. Porcentaje, con sus respectivas desviaciones estándar, de Inhibición de fructosamina en NBT.	42
Figura 16. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 1.2.5 y 2.2.5 .	45
Figura 17. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 1.2.6 y 2.2.6 .	46
Figura 18. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 2.2.7 y 2.2.8 .	47
Figura 19. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 1.2.13 (S) y 2.2.13 (S)	48
Figura 20. Absorbancia promedio (190-300nm) de las fracciones 2.2.2	49
Figura 21. Absorbancia promedio (190-300nm) de la fracción 4.2.3.	50

Figura 22. Diseño de la placa para realizar el análisis de BSA-ribosa. **C-** es el control negativo (100% de AGEs), **B** es el blanco de la BSA, **X** es la mezcla de reacción con el extracto a probar, **X_B** es el control del extracto con la BSA, **X_r** es el control del inhibidor con la ribosa, **X_x** es el control del extracto en DMSO y **C+** es el control positivo (10mM de aminoguanidina en DMSO).98

Figura 23. Cuadro guía en el que se indica que soluciones lleva cada muestra. Las ✓ equivalen a 50 µL, cada pozo de la placa en la cual se realiza el análisis debe de contener 200 µL.99

Figura 24. Diseño de la placa para realizar el análisis de BSA-glucosa. Este diseño es similar a la placa para el análisis BSA-ribosa, con la diferencia que se toman alícuotas de 200 µL de cada tubo Eppendorf. 100

Figura 25. Cuadro guía en el que se indica que soluciones lleva cada muestra. Las ✓ equivalen a 150 µL, cada tubo Eppendorf de la gradilla en la cual se realiza el análisis debe de contener 600 µL..... 101

Figura 26. Diseño de la placa para el análisis NBT. Cada placa transparente puede leerse como “2 placas” diferentes. Los pozos marcados con color azul son los “Blancos” alícuotas de 40 µL de la muestra glicadas con 160 µL de Solución amortiguadora de carbonato; los pozos marcados en color rojo son las pruebas con NBT, alícuotas de 40 µL de muestra glicadas con 160 µL de NBT en Solución amortiguadora de carbonato. 103

Figura 27. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.2..... 115

Figura 28. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.5..... 115

Figura 29. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.6..... 115

Figura 30. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.10..... 115

Figura 31. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.13 (S) 116

Figura 32. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.2..... 116

Figura 33. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.3..... 116

Figura 34. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.5..... 117

Figura 35. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.6..... 117

Figura 36. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.7 117

Figura 37. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.8..... 117

Figura 38. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.13 (S)	118
Figura 39. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.2.....	118
Figura 40. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.3.....	118
Figura 41. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.4.....	119
Figura 42. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.12.....	119
Figura 43. Cromatograma HPLC de fracción 4.2.3.....	119
Figura 44. Cromatograma HPLC de fracción 4.2.6.....	119
Figura 45. Cromatograma HPLC de fracción 4.2.12.....	120

Lista de tablas

Tabla 1. Fracciones obtenidas de <i>Pseudomonas</i> endófitas con actividad antiglicante y sus características relevantes de acuerdo con Gutiérrez-García et al. (2017).....	19
---	----

Tabla 2. Ensayos clínicos aleatorios dirigidos modular el eje AGE-RAGE mediante inhibidores de AGEs o compuestos con mecanismos de acción relacionados. La tabla resume las distintas intervenciones clínicas, detallando duración del tratamiento, el diseño experimental, la fase del ensayo, las características de los sujetos principales, el mecanismo de acción propuesto para cada intervención y los resultados primarios obtenidos (Zeng et al., 2019).....	20
--	----

Tabla 3. Algunos compuestos producidos por <i>Graphostroma</i> sp. MCCC 3A00421 (Wilson & Brimble, 2021).....	24
--	----

Tabla 4. Condiciones de los 4 lotes de cultivo (masivo) del hongo <i>Graphostroma</i> sp. SGSGf22, y resultados obtenidos (rendimiento, número de fracciones obtenidas por CC. Datos tomados del trabajo de López Betancourt (2023).....	30
---	----

Tabla 5. Pesos de las fracciones semipurificadas de los Lotes 1, 2, 3 y 4, con los datos actualizados de las fracciones 1.2.13 y 2.2.13, ordenados de menor a mayor	31
---	----

Tabla 6. Reserva en mg existente para continuar con análisis posteriores.	43
---	----

Tabla 7. Información resumida de cada cromatograma HPLC realizado.....	43
---	----

Tabla 8. Resumen de análisis de varianza para antiglicación en ensayo BSA-ribosa para AGES tipo vesperlisininas y pentosidinas.	50
---	----

Tabla 9. Resumen de análisis de varianza para antiglicación en ensayo BSA-glucosa para AGES tipo vesperlisininas y pentosidinas.	51
--	----

Tabla 10. Tabla 10. Resumen de análisis de varianza para antiglicación en ensayos NBT.....	52
Tabla 11. Compuestos reportados de la familia Graphostromataceae con posible actividad anti AGEs	53
Tabla 12. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.1	68
Tabla 13. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.3	69
Tabla 14. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.4	70
Tabla 15. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.5	72
Tabla 16. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.7	73
Tabla 17. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.10	74
Tabla 18. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.13 (S)	76
Tabla 19. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.14	77
Tabla 20. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.1	79
Tabla 21. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.3	80
Tabla 22. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.5	82
Tabla 23. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.7	83
Tabla 24. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.8	85
Tabla 25. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.11	86
Tabla 26. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.13 (S)	87
Tabla 27. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.14	89
Tabla 28. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.1	90
Tabla 29. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.3	91
Tabla 30. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.4	92
Tabla 31. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.12	93
Tabla 32. Cálculos para la alicuotación de la fracción 4.2.6	94
Tabla 33. Cálculos para la alicuotación de la fracción 4.2.12	95
Tabla 34. Cálculos para la alicuotación de la fracción 4.2.13	97
Tabla 35. Resumen de resultados de todas las pruebas realizadas (BSA-ribosa, BSA-glucosa y NBT) en las 29 fracciones semipurificadas seleccionadas.	104
Tabla 36. Resumen de análisis de varianza de %IFA vesperlisinas en BSA-ribosa	106

Tabla 37. Resumen de método Tukey en %IFA vesperlisinas en BSA-ribosa, con un $T\alpha = 7.32$	106
Tabla 38. Resumen de análisis de varianza de %IFA pentosidinas en BSA-ribosa.	107
Tabla 39. Resumen de método Tukey en %IFA pentosidinas en BSA-ribosa, con un $T\alpha = 7.24$	107
Tabla 40. Resumen de análisis de varianza de %IFA vesperlisinas en BSA-glucosa.....	108
Tabla 41. Resumen de método Tukey en %IFA vesperlisinas en BSA-glucosa, con un $T\alpha = 10.86$	108
Tabla 42. Resumen de análisis de varianza de %IFA pentosidinas en BSA-glucosa.	108
Tabla 43. Resumen de método Tukey en %IFA pentosidinas en BSA-glucosa, con un $T\alpha = 8.61$	109
Tabla 44. Resumen de análisis de varianza de %IFA en Ensayos NBT.	109
Tabla 45. Resumen de método Tukey en %IFA en Ensayos NBT, con un $T\alpha = 9.52$	110
Tabla 46. Compilación de Resultados de todas las lecturas realizadas en placas Constar ®.....	111

Glosario de abreviaturas

AGEs: Advanced Glycation End Products o productos de la glicación avanzada
acumulación productos finales de glicación avanzada.

ENT: Enfermedades no transmisibles

RAGE: Receptor de AGEs.

BSA: Seroalbúmina bovina

PBS: Solución amortiguadora de Fosfatos

NBT: Cloruro de Nitroazul Tetrazolio

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

CC: Columna Cromatografía

DMSO: Dimetilsulfóxido

%IFA: Porcentaje de Inhibición de Formación de AGEs

Glosario de términos y siglas

Postraducciones fisiopatológicas: Alteraciones que sufren algunas proteínas después de su síntesis, que afectan su estructura, función o localización, y se relacionan con diferentes procesos o enfermedades. Estas modificaciones pueden regular la actividad, la interacción, el transporte o la degradación de las proteínas, y pueden estar implicadas en el desarrollo, la diferenciación, la señalización, y otras condiciones patológicas.

Reacción enzimática: Reacción bioquímica que se lleva a cabo con la ayuda de una enzima, la cual actúa como un catalizador biológico. Su función principal es acelerar la velocidad de una reacción química específica dentro de los seres vivos, haciendo posible el metabolismo y las funciones celulares.

Aducto: Producto químico formado por la unión directa de dos o más moléculas diferentes. Se forma por adición y la estructura o disposición atómica de las moléculas originales se mantiene sin que se produzcan cambios estructurales en ellas. Los aductos pueden tener diferentes funciones biológicas o químicas.

Glicosilación: Proceso químico en el que se une un carbohidrato a otra molécula (aceptor). La molécula aceptora puede ser de tipo proteico o lipídico.

Glicoxidación: Proceso bioquímico complejo y dañino que ocurre en el organismo, especialmente bajo condiciones de alto nivel de azúcar en sangre (hiperglucemia), como en la diabetes mellitus, y durante el envejecimiento.

Estrés oxidativo: Desequilibrio celular que ocurre ante exceso de radicales libres en el organismo, ocasionando la inadecuada neutralización con el sistema de defensa antioxidante. Este desequilibrio conduce al daño de las macromoléculas esenciales como el ADN, las proteínas y los lípidos, lo que puede contribuir al envejecimiento y al desarrollo de numerosas enfermedades.

Aterosclerosis: Enfermedad crónica y progresiva que se produce cuando el colesterol, grasa, células sanguíneas y otras sustancias de la sangre se acumulan en

forma de placa; causando una disminución del diámetro de las arterias y una reducción del flujo de sangre rica en oxígeno a los tejidos de los órganos esenciales del cuerpo.

Nefropatía: Término médico utilizado para describir cualquier enfermedad, daño o patología que afecta al riñón.

Base de schiff: Compuesto intermedio de vida media muy breve, que se origina durante algunas reacciones químicas por reacción de un grupo amino con un grupo carbonilo.

Radicales libres: Tipo de molécula inestable que se forma durante el metabolismo normal de las células. Los radicales libres a veces se concentran en las células y dañan otras moléculas, como el ADN, lípidos y proteínas.

Cetoaminas: También llamadas fructosaminas, compuestos orgánicos que corresponden a un grupo heterogéneo de proteínas glicadas, sirven como indicador del control metabólico de los pacientes con diabetes mellitus.

Aminoguanidina: Compuesto químico orgánico estudiado por su potencia terapéutico, principalmente por su capacidad para inhibidor de AGEs.

Sesquiterpenoides: Terpenoides de 15 carbonos (terpenoides de un monoterpenoide y medio).

Policétidos: Productos naturales producidos por organismos vivos (principalmente bacterias, hongos y plantas) que presentan actividades biológicas, entre ellas a antibióticos, inmunosupresores, anticancerígenos y antiparasitarios.

Eluente: Disolvente orgánico o combinación de disolventes. Componente de la fase móvil en una técnica de separación cromatográfica, arrastra y transporta los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria.

Anexos

Anexo A. Cálculos para las alicuotaciones de las 23 fracciones secundarias restantes de los lotes 1, 2, 3 y 4.

Lote 1

Fracción 1.2.1

Tabla 12. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.1

Graphostroma sp SGSgf22 Fracción 1.2.1						
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.1	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.209	5.338	0.129	129000	100000	1.29

Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	19.4	20.0	25.8	5.2
C2	35.0	175.0	525.0	135.7	136.0	175.4	35.1
C3	70.0	350.0	1050.0	271.3	272.0	350.9	70.2
C4	105.0	525.0	1575.0	407.0	407.0	525.0	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	542.6	543.0	700.5	140.1
			5325.0	1376.0	1378.0	1777.6	355.5

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	31007.8	31008.0	40000.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			31.0	31.0	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	4961.2	4962.0	6401.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			5.0	5.0	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	1860.5	1861.0	2400.7
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)

			1.9	1.9	2.4
12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (1 vial)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	9302.3	9303.0	12000.9
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			9.3	9.3	12.0
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	775.2	776.0	1001.0
Reserva (1 vial con 46.0 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	77519.4	77520.0	100000.8
40.0	40000.0	120000.0	31007.8	31008.0	40000.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			77.519	77.5	100.0
			31.008	31.0	40.0

Fracción 1.2.3

Tabla 13. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.3

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.3

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.3	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.248	5.28	0.032	32000	100000	0.32

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	20000.0	20000.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			20.0	20.0	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	7500.0	7500.0	2400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			7.5	7.5	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	3125.0	3125.0	1000.0

Reserva (1 vial con 1.6 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	312500.0	312500.0	100000.0
50.0	50000.0	150000.0	156250.0	156250.0	50000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			312.500	312.5	100.0
			156.250	156.3	50.0

Fracción 1.2.4

Tabla 14. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.4

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.4

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.4	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.36	5.464	0.104	104000	100000	1.04

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	24.0	24.0	25.0	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	168.3	169.0	175.8	35.2
C3	70.0	350.0	1050.0	336.5	337.0	350.5	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	504.8	505.0	525.2	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	673.1	673.0	699.9	140.0
			5325.0	1706.7	1708.0	1776.3	355.3

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	38461.5	38462.0	40000.5
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			38.5	38.5	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	6153.8	6154.0	6400.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			6.2	6.2	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	2307.7	2308.0	2400.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			2.3	2.3	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	11538.5	11539.0	12000.6
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			11.5	11.5	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	961.5	962.0	1000.5

Reserva (1 vial con 4.88 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	96153.8	96154.0	100000.2
15.0	15000.0	45000.0	14423.1	14423.0	14999.9

mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
96.154	96.2	100.0
14.423	14.4	15.0

Fracción 1.2.5

Tabla 15. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.5

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.5

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.5	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.252	5.303	0.051	51000	100000	0.51

20 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
20.0	20000.0	60000.0	39215.7	39216.0	20000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			39.2	39.2	20.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	12549.0	12549.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			12.5	12.5	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	4705.9	4706.0	2400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			4.7	4.7	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1960.8	1961.0	1000.1

Reserva (1 vial con 1.6 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	196078.4	196079.0	100000.3
2.0	2000.0	6000.0	3921.6	3922.0	2000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			196.078	196.1	100.0
			3.922	3.9	2.0

Fracción 1.2.7

Tabla 16. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.7

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.7						
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.7	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.356	5.471	0.115	115000	100000	1.15

Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	21.7	22.0	25.3	5.1
C2	35.0	175.0	525.0	152.2	152.0	174.8	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	304.3	304.0	349.6	69.9
C4	105.0	525.0	1575.0	456.5	457.0	525.6	105.1
C5	140.0	700.0	2100.0	608.7	609.0	700.4	140.1
			5325.0	1543.5	1544.0	1775.6	355.1

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	34782.6	34783.0	40000.5
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			34.8	34.8	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	5565.2	5565.0	6399.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			5.6	5.6	6.4
2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	2087.0	2087.0	2400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			2.1	2.1	2.4
12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (1 vial)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	10434.8	10435.0	12000.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			10.4	10.4	12.0
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	869.6	870.0	1000.5
Reserva (1 vial con 29.1 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	86956.5	86957.0	100000.6
26.0	26000.0	78000.0	22608.7	22610.0	26001.5
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			86.957	87.0	100.0
			22.609	22.6	26.0

Fracción 1.2.10

Tabla 17. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.10

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.10

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.10	[g] 5.378	[g] 5.417	[g] 0.039	[µg] 39000	[µL] 100000	[µg/µL] 0.39

Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	64.1	64.0	25.0	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	448.7	449.0	175.1	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	897.4	898.0	350.2	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	1346.2	1347.0	525.3	105.1
C5	140.0	700.0	2100.0	1794.9	1795.0	700.0	140.0
			5325.0	4551.3	4553.0	1775.7	355.1

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	16410.3	16411.0	6400.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			16.4	16.4	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	6153.8	6154.0	2400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			6.2	6.2	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	2564.1	2564.0	1000.0

Reserva (1 vial con 2.8 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	256410.3	256411.0	100000.3

25.0	25000.0	75000.0	64102.6	64103.0	25000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			256.410	256.4	100.0
			64.103	64.1	25.0

Fracción 1.2.13 (S)

Tabla 18. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.13 (S)

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.13 (S)

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
1.2.13 (S)	13.211	13.348	0.137	137000	100000	1.37

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	18.2	18.0	24.7	4.9
C2	35.0	175.0	525.0	127.7	128.0	175.4	35.1
C3	70.0	350.0	1050.0	255.5	256.0	350.7	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	383.2	383.0	524.7	104.9
C5	140.0	700.0	2100.0	510.9	511.0	700.1	140.0
			5325.0	1295.6	1296.0	1775.5	355.1

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	29197.1	29197.0	39999.9
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			29.2	29.2	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	4671.5	4672.0	6400.6
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			4.7	4.7	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	1751.8	1752.0	2400.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			1.8	1.8	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	8759.1	8759.0	11999.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			8.8	8.8	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	729.9	730.0	1000.1

Reserva (1 vial con 38.2 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	72992.7	72993.0	100000.4
25.0	25000.0	75000.0	18248.2	18248.0	24999.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			72.993	73.0	100.0
			18.248	18.2	25.0

Fracción 1.2.14

Tabla 19. Cálculos para la alicuotación de la fracción 1.2.14

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 1.2.14

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
1.2.14	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.41	5.581	0.171	171000	100000	1.71
Ensayo MTT						

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[μL/5 pozos] teórica	[μL/5 pozos] practica	μg / 5 Pozo_ MTT practico	μg / Pozo_ MTT practico
	[μg/mL o /pozo]	[μg/5 pozos]	[μg]	[μL/5 pozos]	[μL/5 pozos]	[μg/5 pozos]	[μg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	14.6	15.0	25.7	5.1
C2	35.0	175.0	525.0	102.3	103.0	176.1	35.2
C3	70.0	350.0	1050.0	204.7	205.0	350.6	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	307.0	307.0	525.0	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	409.4	410.0	701.1	140.2
			5325.0	1038.0	1040.0	1778.4	355.7

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).

mg (cada vial)	μg (cada vial)	TRIPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	23391.8	23392.0	40000.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			23.4	23.4	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	μg (cada vial)	TRIPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	3742.7	3743.0	6400.5
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			3.7	3.7	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	μg (cada vial)	TRIPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	1403.5	1404.0	2400.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			1.4	1.4	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)

mg (cada vial)	μg (cada vial)	QUINTUPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	7017.5	7018.0	12000.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			7.0	7.0	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	584.8	585.0	1000.4

Reserva (1 vial con 66.35 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	58479.5	58480.0	100000.8
25.0	25000.0	75000.0	29239.8	29240.0	50000.4
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			58.480	58.5	100.0
			29.240	29.2	50.0

LOTE 2

Fracción 2.2.1

Tabla 20. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.1

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.1

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.1	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.391	5.460	0.069	69000	100000	0.69

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	36.2	36.0	24.8	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	253.6	254.0	175.3	35.1
C3	70.0	350.0	1050.0	507.2	507.0	349.8	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	760.9	761.0	525.1	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	1014.5	1015.0	700.4	140.1
			5325.0	2572.5	2573.0	1775.4	355.1

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	9275.4	9276.0	6400.4

			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			9.3	9.3	6.4
2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	3478.3	3479.0	2400.5
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			3.5	3.5	2.4
12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	17391.3	17391.0	11999.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			17.4	17.4	12.0
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1449.3	1450.0	1000.5
Reserva (1 vial con 9.3 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	144927.5	144928.0	100000.3
5.0	5000.0	15000.0	7246.4	7246.0	50000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			144.928	144.9	100.0
			7.246	72.5	50.0

Fracción 2.2.3

Tabla 21. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.3

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.3						
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.3	[g] 5.433	[g] 5.500	[g] 0.067	[µg] 67000	[µL] 100000	[µg/µL] 0.67

Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[μ L/5 pozos] teórica	[μ L/5 pozos] practica	μ g / 5 Pozo_ MTT practico	μ g / Pozo_ MTT practico
	[μ g/mL o /pozo]	[μ g/5 pozos]	[μ g]	[μ L/5 pozos]	[μ L/5 pozos]	[μ g/5 pozos]	[μ g/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	37.3	38.0	25.5	5.1
C2	35.0	175.0	525.0	261.2	261.0	174.9	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	522.4	523.0	350.4	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	783.6	783.0	524.6	104.9
C5	140.0	700.0	2100.0	1044.8	1045.0	700.2	140.0
			5325.0	2649.3	2650.0	1775.5	355.1

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.					
mg (cada vial)	μ g (cada vial)	TRIPLICADO μ g	μ L teóricos (cada vial)	μ L prácticos (cada vial)	μ g prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	9552.2	9552.0	6399.8
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			9.6	9.6	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	μ g (cada vial)	TRIPLICADO μ g	μ L teóricos (cada vial)	μ L prácticos (cada vial)	μ g prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	3582.1	3582.0	2399.9
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			3.6	3.6	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)					
mg (cada vial)	μ g (cada vial)	QUINTUPLICADO μ g	μ L teóricos (cada vial)	μ L prácticos (cada vial)	μ g prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	17910.4	17911.0	12000.4
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			17.9	17.9	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	μ g (cada vial)	QUINTUPLICADO μ g	μ L teóricos (cada vial)	μ L prácticos (cada vial)	μ g prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1492.5	1493.0	1000.3

Reserva (1 vial con 8.1 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	149253.7	105263.0	70526.2
5.0	5000.0	15000.0	74626.9	52632.0	35263.4
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			149.254	105.3	70.5
			74.627	52.6	35.3

Fracción 2.2.5

Tabla 22. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.5

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.5						
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
2.2.5	5.253	5.348	0.095	95000	100000	0.95

Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg/Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	26.3	27.0	25.6	5.1
C2	35.0	175.0	525.0	184.2	184.0	174.8	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	368.4	369.0	350.5	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	552.6	553.0	525.3	105.1
C5	140.0	700.0	2100.0	736.8	737.0	700.1	140.0
			5325.0	1868.4	1870.0	1776.5	355.3

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	42105.3	42106.0	40000.7
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			42.1	42.1	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.					
---	--	--	--	--	--

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	6736.8	6737.0	6400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			6.7	6.7	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	2526.3	2527.0	2400.6
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			2.5	2.5	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (1 vial)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	12631.6	12632.0	12000.4
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			12.6	12.6	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1052.6	1053.0	1000.4

Reserva (1 vial con 8.3 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	105263.2	105263.0	99999.8
50.0	50000.0	150000.0	52631.6	52632.0	50000.4
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			105.263	105.3	100.0
			52.632	52.6	50.0

Fracción 2.2.7

Tabla 23. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.7

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.7

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.7	[g] 5.34	[g] 5.404	[g] 0.064	[µg] 64000	[µL] 100000	[µg/µL] 0.64

Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg/Pozo_ MT T practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	39.1	39.0	25.0	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	273.4	274.0	175.4	35.1
C3	70.0	350.0	1050.0	546.9	547.0	350.1	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	820.3	821.0	525.4	105.1
C5	140.0	700.0	2100.0	1093.8	1094.0	700.2	140.0
			5325.0	2773.4	2775.0	1776.0	355.2

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	10000.0	10000.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			10.0	10.0	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	3750.0	3750.0	2400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			3.8	3.8	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	18750.0	18750.0	12000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			18.8	18.8	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1562.5	1563.0	1000.3

Reserva (1 vial con 5.8 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	156250.0	156250.0	100000.0
38.0	38000.0	114000.0	59375.0	59375.0	38000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			156.250	156.3	100.0
			59.375	59.4	38.0

Fracción 2.2.8

Tabla 24. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.8

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.8

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.8	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.343	5.389	0.046	46000	100000	0.46

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	54.3	55.0	25.3	5.1
C2	35.0	175.0	525.0	380.4	381.0	175.3	35.1
C3	70.0	350.0	1050.0	760.9	761.0	350.1	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	1141.3	1142.0	525.3	105.1
C5	140.0	700.0	2100.0	1521.7	1522.0	700.1	140.0
			5325.0	3858.7	3861.0	1776.1	355.2

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	13913.0	13913.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			13.9	13.9	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	5217.4	5218.0	2400.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			5.2	5.2	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	2173.9	2174.0	1000.0

Reserva (1 vial con 9.7 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	217391.3	217392.0	100000.3
38.0	38000.0	114000.0	82608.7	82609.0	38000.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			217.391	217.4	100.0
			82.609	82.6	38.0

Fracción 2.2.11

Tabla 25. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.11

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.11

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.11	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.237	5.266	0.029	29000	100000	0.29

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	22069.0	22069.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			22.1	22.1	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	8275.9	8276.0	2400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			8.3	8.3	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	3448.3	3449.0	1000.2

Reserva (1 vial con 5.5 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	344827.6	344828.0	100000.1
38.0	38000.0	114000.0	131034.5	131035.0	38000.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			344.828	344.8	100.0
			131.034	131.0	38.0

Fracción 2.2.13 (S)

Tabla 26. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.13 (S)

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.13 (S)

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.13 (S)	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	8.065	8.126	0.061	61000	100000	0.61

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	41.0	41.0	25.0	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	286.9	287.0	175.1	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	573.8	574.0	350.1	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	860.7	861.0	525.2	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	1147.5	1148.0	700.3	140.1
			5325.0	2909.8	2911.0	1775.7	355.1

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	10491.8	10492.0	6400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			10.5	10.5	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	3934.4	3935.0	2400.4
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			3.9	3.9	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	19672.1	19672.0	11999.9
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			19.7	19.7	12.0

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1639.3	1640.0	1000.4

Reserva (1 vial con 0.3 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	163934.4	163935.0	100000.4
38.0	38000.0	114000.0	62295.1	62295.0	38000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			163.934	163.9	100.0
			62.295	62.3	38.0

Fracción 2.2.14

Tabla 27. Cálculos para la alicuotación de la fracción 2.2.14

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 2.2.14

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
2.2.14	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.272	5.335	0.063	63000	100000	0.63

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	39.7	40.0	25.2	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	277.8	278.0	175.1	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	555.6	556.0	350.3	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	833.3	834.0	525.4	105.1
C5	140.0	700.0	2100.0	1111.1	1111.0	699.9	140.0
			5325.0	2817.5	2819.0	1776.0	355.2

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	10158.7	10159.0	6400.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			10.2	10.2	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	3809.5	3810.0	2400.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			3.8	3.8	2.4

12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (2 viales)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	19047.6	19048.0	12000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)

			19.0	19.0	12.0
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1587.3	1588.0	1000.4
Reserva (1 vial con 2.7 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	158730.2	158730.0	99999.9
50.0	50000.0	150000.0	79365.1	79365.0	49999.9
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			158.730	158.7	100.0
			79.365	79.4	50.0

Fracción 3.2.1

Tabla 28. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.1

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 3.2.1						
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
3.2.1	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.381	5.412	0.031	31000	100000	0.31
6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.						
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)	
6.4	6400.0	19200.0	20645.2	20645.0	6399.9	
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)	
			20.6	20.6	6.4	
2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa						
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)	
2.4	2400.0	7200.0	7741.9	7742.0	2400.0	
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)	
			7.7	7.7	2.4	
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra (4 viales)						

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	3225.8	3226.0	1000.1

Reserva (1 vial con 0.7 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	322580.6	322581.0	100000.1
50.0	50000.0	150000.0	161290.3	161290.0	49999.9
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			322.581	322.6	100.0
			161.290	161.3	50.0

Fracción 3.2.3

Tabla 29. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.3

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 3.2.3

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
3.2.3	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.358	5.386	0.028	28000	100000	0.28

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa (2 viales)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	22857.1	22857.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			22.9	22.9	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	8571.4	8572.0	2400.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			8.6	8.6	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
----------------	----------------	------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------

1.0	1000.0	5000.0	3571.4	3572.0	1000.2
Reserva (1 vial con 2.3 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	357142.9	357143.0	100000.0
50.0	50000.0	150000.0	178571.4	178572.0	50000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			357.143	357.1	100.0
			178.571	178.6	50.0

Fracción 3.2.4

Tabla 30. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.4

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 3.2.4							
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total	
3.2.4	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]	
	5.41	5.451	0.041	41000	100000	0.41	
Ensayo MTT							
	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	61.0	61.0	25.0	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	426.8	427.0	175.1	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	853.7	854.0	350.1	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	1280.5	1281.0	525.2	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	1707.3	1703.0	698.2	139.6
			5325.0	4329.3	4326.0	1773.7	354.7

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	15609.8	15610.0	6400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			15.6	15.6	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	5853.7	5854.0	2400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			5.9	5.9	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	2439.0	2439.0	1000.0

Reserva (1 vial con 5.4 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	243902.4	243903.0	100000.2
3.0	3000.0	9000.0	7317.1	7317.0	3000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			243.902	243.9	100.0
			7.317	7.3	3.0

Fracción 3.2.12

Tabla 31. Cálculos para la alicuotación de la fracción 3.2.12

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 3.2.12

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
3.2.12	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.258	5.295	0.037	37000	100000	0.37

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	67.6	68.0	25.2	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	473.0	473.0	175.0	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	945.9	946.0	350.0	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	1418.9	1419.0	525.0	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	1891.9	1892.0	700.0	140.0
			5325.0	4797.3	4798.0	1775.3	355.1

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	17297.3	17298.0	6400.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			17.3	17.3	6.4
2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	6486.5	6487.0	2400.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			6.5	6.5	2.4
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	2702.7	2703.0	1000.1
Reserva (1 vial con 1.2 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	270270.3	270270.0	99999.9
3.0	3000.0	9000.0	8108.1	8108.0	3000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			270.270	270.3	100.0
			8.108	8.1	3.0

Fracción 4.2.6

Tabla 32. Cálculos para la alicuotación de la fracción 4.2.6

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 4.2.6						
# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
4.2.6	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	5.279	5.305	0.026	26000	100000	0.26
6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa (2 viales)						

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	24615.4	24616.0	6400.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			24.6	24.6	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	9230.8	9231.0	2400.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			9.2	9.2	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	3846.2	3846.0	1000.0

Reserva (1 vial con 1.3 mg)

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	384615.4	384616.0	100000.2
50.0	50000.0	150000.0	192307.7	192308.0	50000.1
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			384.615	384.6	100.0
			192.308	192.3	50.0

Fracción 4.2.12

Tabla 33. Cálculos para la alicuotación de la fracción 4.2.12

Graphostroma sp SGSGf22 Fracción 4.2.12

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
4.2.12	[g] 25.228	[g] 25.275	[g] 0.047	[µg] 47000	[µL] 100000	[µg/µL] 0.47

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[μL/5 pozos] teórica	[μL/5 pozos] practica	μg / 5 Pozo_ MTT practico	μg / Pozo_ MTT practico
	[μg/mL o /pozo]	[μg/5 pozos]	[μg]	[μL/5 pozos]	[μL/5 pozos]	[μg/5 pozos]	[μg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	53.2	53.0	24.9	5.0
C2	35.0	175.0	525.0	372.3	372.0	174.8	35.0
C3	70.0	350.0	1050.0	744.7	745.0	350.1	70.0
C4	105.0	525.0	1575.0	1117.0	1117.0	525.0	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	1489.4	1490.0	700.3	140.1
			5325.0	3776.6	3777.0	1775.2	355.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	μg (cada vial)	TRIPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	13617.0	13617.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			13.6	13.6	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	μg (cada vial)	TRIPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	5106.4	5107.0	2400.3
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			5.1	5.1	2.4

Para HPLC se necesita 1 mg de muestra

mg (cada vial)	μg (cada vial)	QUINTUPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	2127.7	2128.0	1000.2

Reserva (1 vial con 10.8 mg)

mg (cada vial)	μg (cada vial)	TRIPLICADO μg	μL teóricos (cada vial)	μL prácticos (cada vial)	μg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	212766.0	212766.0	100000.0
10.0	10000.0	30000.0	21276.6	21277.0	10000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			212.766	212.8	100.0
			21.277	21.3	10.0

Fracción 4.2.13

Tabla 34. Cálculos para la alicuotación de la fracción 4.2.13

Graphostroma sp SGSf22 Fracción 4.2.13

# de fracción	Peso Vial	Peso vial con extracto	Peso extracto	Peso extracto	Volumen solvente total	Concentración; Peso del extracto / Volumen solvente total
4.2.13	[g]	[g]	[g]	[µg]	[µL]	[µg/µL]
	25.205	25.296	0.091	91000	100000	0.91

Ensayo MTT

	M/V Pozo_ MTT	M/V 5 Pozo_ MTT	TRIPLICADO	[µL/5 pozos] teórica	[µL/5 pozos] practica	µg / 5 Pozo_ MTT practico	µg / Pozo_ MTT practico
	[µg/mL o /pozo]	[µg/5 pozos]	[µg]	[µL/5 pozos]	[µL/5 pozos]	[µg/5 pozos]	[µg/pozo]
C1	5.0	25.0	75.0	27.5	28.0	25.5	5.1
C2	35.0	175.0	525.0	192.3	193.0	175.6	35.1
C3	70.0	350.0	1050.0	384.6	385.0	350.4	70.1
C4	105.0	525.0	1575.0	576.9	577.0	525.1	105.0
C5	140.0	700.0	2100.0	769.2	770.0	700.7	140.1
			5325.0	1950.5	1953.0	1777.2	355.4

40 mg de muestra para hacer los análisis de antiproliferación (1 vial).

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
40.0	40000.0	120000.0	43956.0	43956.0	40000.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			44.0	44.0	40.0

6.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-glucosa.

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
6.4	6400.0	19200.0	7033.0	7033.0	6400.0
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			7.0	7.0	6.4

2.4 mg de muestra para hacer la prueba BSA-ribosa

mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
2.4	2400.0	7200.0	2637.4	2638.0	2400.6

			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			2.6	2.6	2.4
12 mg de muestra para hacer la prueba antibiótica (1 vial)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
12.0	12000.0	60000.0	13186.8	13187.0	12000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			13.2	13.2	12.0
Para HPLC se necesita 1 mg de muestra					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	QUINTUPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
1.0	1000.0	5000.0	1098.9	1099.0	1000.1
Reserva (1 vial con 2.9 mg)					
mg (cada vial)	µg (cada vial)	TRIPLICADO µg	µL teóricos (cada vial)	µL prácticos (cada vial)	µg prácticos (cada vial)
100.0	100000.0	300000.0	109890.1	109890.0	99999.9
2.0	2000.0	6000.0	2197.8	2198.0	2000.2
			mL teóricos (cada vial)	mL prácticos (cada vial)	mg prácticos (cada vial)
			109.890	109.9	100.0
			2.198	2.2	2.0

Anexo B. Cálculos para realizar el análisis de BSA-ribosa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	C-	C-	B	B	B	C-	C-	C-	B	B	B
B	C+	C+	C+	C+B	C+B	C+B	C+R	C+R	C+X	C+X		
C	X1	X1	X1	X1B	X1B	X1B	X1R	X1R	X1X	X1X		
D	X2	X2	X2	X2B	X2B	X2B	X2R	X2R	X2X	X2X		
E	X3	X3	X3	X3B	X3B	X3B	X3R	X3R	X3X	X3X		
F	X4	X4	X4	X4B	X4B	X4B	X4R	X4R	X4X	X4X		
G	X5	X5	X5	X5B	X5B	X5B	X5R	X5R	X5X	X5X		
H	X6	X6	X6	X6B	X6B	X6B	X6R	X6R	X6X	X6X		

Figura 22. Diseño de la placa para realizar el análisis de BSA-ribosa. **C-** es el control negativo (100% de AGEs), **B** es el blanco de la BSA, **X** es la mezcla de reacción con el extracto a probar, **X_B** es el control del extracto con la BSA, **X_r** es el control del inhibidor con la ribosa, **X_x** es el control del extracto en DMSO y **C+** es el control positivo (10mM de aminoguanidina en DMSO).

	C-	B	C+	C+B	C+R	C+X	X1	X1B	X1R	X1X
BSA	✓	✓	✓	✓			✓	✓		
RIBOSA	✓		✓		✓		✓		✓	
PBS+NAN3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PBS		✓		✓	✓	✓✓		✓	✓	✓✓
AMINOGUANIDINA			✓	✓	✓	✓				
EXTRACTO							✓	✓	✓	✓
DMSO	✓	✓								

Figura 23. Cuadro guía en el que se indica que soluciones lleva cada muestra. Las ✓ equivalen a 50 µL, cada pozo de la placa en la cual se realiza el análisis debe de contener 200 µL.

La cantidad requerida de las soluciones en mL para realizar una placa en ensayos BSA-ribosa, al cálculo final teórico se añade aproximadamente 1 mL con el fin de tener soluciones de reserva en caso de tener algún error.

$$PBS + NAN_3 = 96 \text{ pozos} \times 50 \mu L = 4800 \mu L \rightarrow \mathbf{5.5 mL}$$

$$PBS = 7[\text{pozos del B al H}] \times 9[\text{pozos del 4 al 10}] \times 50 \mu L \\ + (50 \mu L \times 6[\text{pozos 4A} - 6A \text{ y } 10A - 12A]) = 3450 \mu L \rightarrow \mathbf{4 mL}$$

$$BSA = 6[\text{pozos del 1 al 6}] \times 8[\text{pozos del A al H}] \times 50 \mu L + (50 \mu L \times 6[\text{pozos 7A al 12A}]) \\ = 2700 \mu L \rightarrow \mathbf{3.5 mL}$$

$$Ribosa = 5[\text{pozos del 1, 2, 3, 7 y 8}] \times 8[\text{pozos del A al H}] \times 50 \mu L \\ + (50 \mu L \times 3[\text{pozos 7A al 9A}]) = 2150 \mu L \rightarrow \mathbf{3 mL}$$

$$Extracto = 10[\text{pozos del 1 al 10}] \times 50 \mu L = 500 \mu L \rightarrow \mathbf{0.6 mL}$$

Una vez obtenido el volumen de cada una de las soluciones se tiene que calcular la cantidad a pesar para cada solución.

El PBS para realizar todas las soluciones a preparar debe de tener un pH de 7.9

Para obtener la cantidad a pesar se emplea la siguiente fórmula: $C_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{V_1}$

$$BSA \rightarrow C_2 = 10 \frac{mg}{mL} \quad C_1 = \frac{10 \frac{mg}{mL} \cdot 200 \mu L}{50 \mu L} = 40 \frac{mg}{mL} \\ V_1 = 50 \mu L \quad 40 \frac{mg}{mL} (3.5 mL) = \mathbf{140 mg} \\ V_2 = 200 \mu L$$

Se deben de disolver **140 mg** de **BSA** en **3.5 mL** de **PBS**

$$Ribosa \rightarrow C_2 = 500 mM \quad C_1 = \frac{500 mM \cdot 200 \mu L}{50 \mu L} = 2000 mM \\ V_1 = 50 \mu L$$

$$V_2 = 200 \mu L$$

$$PM = 150.13 \frac{g}{mol}$$

$$2000 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{L} (3 \cdot 10^{-3} L) \left(150.13 \frac{g}{mol} \right) = 0.90078 g$$

Se deben de disolver **0.90078 g** de **Ribosa** en **3 mL** de **PBS**

$$PBS + NaN_3 \rightarrow C_2 = 0.02\%$$

$$V_1 = 50 \mu L$$

$$V_2 = 200 \mu L$$

$$C_1 = \frac{0.02\% \cdot 200 \mu L}{50 \mu L} = 0.08\%$$

$$\frac{0.08 g NaN_3}{100 mL} (5.5 mL) = 4.4 mg$$

Se deben de disolver **4.4 mg** de **NaN₃** en **5.5 mL** de **PBS**

$$Aminoguanidina \rightarrow$$

$$C_2 = 10 mM$$

$$V_1 = 50 \mu L$$

$$V_2 = 200 \mu L$$

$$PM = 110.55 \frac{g}{mol}$$

$$C_1 = \frac{10 mM \cdot 200 \mu L}{50 \mu L} = 40 mM$$

$$40 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{L} (2 \cdot 10^{-3} L) \left(110.55 \frac{g}{mol} \right) = 8.84 mg$$

Se deben de disolver **8.84 mg** de **Aminoguanidina** en **2 mL** de **DMSO**

$$Extracto \rightarrow C_2 = 1 \frac{mg}{mL}$$

$$V_1 = 50 \mu L$$

$$V_2 = 200 \mu L$$

$$C_1 = \frac{1 \frac{mg}{mL} \cdot 200 \mu L}{50 \mu L} = 4 \frac{mg}{mL}$$

$$4 \frac{mg}{mL} (0.6 mL) = 2.4 mg$$

Se deben de disolver **2.4 mg** del **Extracto** en **600 μL** de **DMSO**

Anexo C. Cálculos para realizar el análisis de BSA-glucosa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	C-	C-	B	B	B	C-	C-	C-	B	B	B
B	C+	C+	C+	C+B	C+B	C+B	C+R	C+R	C+X	C+X		
C	X1	X1	X1	X1B	X1B	X1B	X1R	X1R	X1X	X1X		
D	X2	X2	X2	X2B	X2B	X2B	X2R	X2R	X2X	X2X		
E	X3	X3	X3	X3B	X3B	X3B	X3R	X3R	X3X	X3X		
F	X4	X4	X4	X4B	X4B	X4B	X4R	X4R	X4X	X4X		
G	X5	X5	X5	X5B	X5B	X5B	X5R	X5R	X5X	X5X		
H	X6	X6	X6	X6B	X6B	X6B	X6R	X6R	X6X	X6X		

Figura 24. Diseño de la placa para realizar el análisis de BSA-glucosa. Este diseño es similar a la placa para el análisis BSA-ribosa, con la diferencia que se toman alícuotas de 200 μL de cada tubo Eppendorf.

	C-	B	C+	C+B	C+R	C+X	X1	X1B	X1R	X1X
BSA	✓	✓	✓	✓			✓	✓		
GLUCOSA	✓		✓		✓		✓		✓	
PBS+NAN3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PBS		✓		✓	✓	✓✓		✓	✓	✓✓
AMINOGUANIDINA			✓	✓	✓	✓				
EXTRACTO							✓	✓	✓	✓
DMSO	✓	✓								

Figura 25. Cuadro guía en el que se indica que soluciones lleva cada muestra. Las ✓ equivalen a 150 µL, cada tubo Eppendorf de la gradilla en la cual se realiza el análisis debe de contener 600 µL.

La prueba BSA-glucosa es similar a la prueba BSA-ribosa, a diferencia de la duración de cada prueba, 15 días y 1 día respectivamente, además de un aumento de concentraciones para poder realizar la prueba lenta, lo que permite ver cómo se mantiene esta prueba antiglicante por un tiempo más prolongado

Para poder ahorrar una mayor cantidad de tiempo y reactivos se suele realizar ambas pruebas BSA-ribosa y BSA-glucosa el mismo día, esto permite volver a hacer un duplicado de las pruebas de BSA-ribosa y corroborar la información proporcionada.

$$PBS + NAN_3 = (96 \text{ tubos} \times 150 \mu L) + (96 \text{ pozos} \times 50 \mu L) = 19200 \mu L \rightarrow \mathbf{20 \text{ mL}}$$

$$\begin{aligned}
 PBS &= 7[\text{tubos del B al H}] \times 9[\text{tubos del 4 al 10}] \times 150 \mu L \\
 &+ (150 \mu L \times 6[\text{tubos 4A} - 6A \text{ y } 10A - 12A]) \\
 &+ 4 \text{ mL (de prueba BSA - Ribosa)} = 14350 \mu L \rightarrow \mathbf{15 \text{ mL}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 BSA &= 6[\text{tubos del 1 al 6}] \times 8[\text{tubos del A al H}] \times 150 \mu L \\
 &+ (150 \mu L \times 6[\text{tubos 7A al 12A}]) + 3.5 \text{ mL (de prueba BSA - Ribosa)} \\
 &= 11600 \mu L \rightarrow \mathbf{13 \text{ mL}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Ribosa &= 5[\text{pozos del 1, 2, 3, 7 y 8}] \times 8[\text{pozos del A al H}] \times 50 \mu L \\
 &+ (50 \mu L \times 3[\text{pozos 7A al 9A}]) = 2150 \mu L \rightarrow \mathbf{3 \text{ mL}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Glucosa &= 5[\text{tubos del 1, 2, 3, 7 y 8}] \times 8[\text{tubos del A al H}] \times 150 \mu L \\
 &+ (150 \mu L \times 3[\text{tubos 7A al 9A}]) = 6450 \mu L \rightarrow \mathbf{7.5 \text{ mL}}
 \end{aligned}$$

$$Extracto = 10[\text{tubos del 1 al 10}] \times 150 \mu L = 1500 \mu L \rightarrow \mathbf{1.6 \text{ mL}}$$

Con el volumen obtenido de cada una de las soluciones se tiene que calcular la cantidad a pesar para cada solución.

El PBS para realizar todas las soluciones a preparar debe de tener un pH de 7.9

Para obtener la cantidad a pesar se emplea la siguiente fórmula: $C_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{V_1}$

$$\begin{aligned} \text{BSA} \rightarrow C_2 &= 10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \\ V_1 &= 150 \mu\text{L} \\ V_2 &= 600 \mu\text{L} \end{aligned} \quad \begin{aligned} C_1 &= \frac{10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 600 \mu\text{L}}{150 \mu\text{L}} = 40 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \\ 40 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} (13 \text{ mL}) &= \mathbf{520 \text{ mg}} \end{aligned}$$

Se deben de disolver **520 mg** de **BSA** en **13 mL** de **PBS**

$$\begin{aligned} \text{Ribosa} \rightarrow C_2 &= 500 \text{ mM} \\ V_1 &= 50 \mu\text{L} \\ V_2 &= 200 \mu\text{L} \\ PM &= 150.13 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \end{aligned} \quad \begin{aligned} C_1 &= \frac{500 \text{ mM} \cdot 200 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L}} = 2000 \text{ mM} \\ 2000 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} (3 \cdot 10^{-3} \text{ L}) \left(150.13 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) &= \mathbf{0.90078 \text{ g}} \end{aligned}$$

Se deben de disolver **0.90078 g** de **Ribosa** en **3 mL** de **PBS**

$$\begin{aligned} \text{Glucosa} \rightarrow C_2 &= 500 \text{ mM} \\ V_1 &= 150 \mu\text{L} \\ V_2 &= 600 \mu\text{L} \\ PM &= 180.66 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \end{aligned} \quad \begin{aligned} C_1 &= \frac{500 \text{ mM} \cdot 600 \mu\text{L}}{150 \mu\text{L}} = 2000 \text{ mM} \\ 2000 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} (7.5 \cdot 10^{-3} \text{ L}) \left(180.66 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) &= \mathbf{2.7099 \text{ g}} \end{aligned}$$

Se deben de disolver **2.7099 g** de **Ribosa** en **7.5 mL** de **PBS**

$$\begin{aligned} \text{PBS} + \text{NaN}_3 \rightarrow C_2 &= 0.02\% \\ V_1 &= 150 \mu\text{L} \\ V_2 &= 600 \mu\text{L} \end{aligned} \quad \begin{aligned} C_1 &= \frac{0.02\% \cdot 600 \mu\text{L}}{150 \mu\text{L}} = 0.08\% \\ \frac{0.08 \text{ g NaN}_3}{100 \text{ mL}} (20 \text{ mL}) &= \mathbf{0.016 \text{ g}} \end{aligned}$$

Se deben de disolver **0.16 g** de **NAN₃** en **20 mL** de **PBS**

$$\begin{aligned} \text{Aminoguanidina} \rightarrow \\ C_2 &= 10 \text{ mM} \\ V_1 &= 150 \mu\text{L} \\ V_2 &= 600 \mu\text{L} \\ PM &= 110.55 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \end{aligned} \quad \begin{aligned} C_1 &= \frac{10 \text{ mM} \cdot 600 \mu\text{L}}{150 \mu\text{L}} = 40 \text{ mM} \\ 40 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} (2 \cdot 10^{-3} \text{ L}) \left(110.55 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) &= \mathbf{8.84 \text{ mg}} \end{aligned}$$

Se deben de disolver **8.84 mg** de **Aminoguanidina** en **2 mL** de **DMSO**

$$\begin{aligned} \text{Extracto} \rightarrow C_2 &= 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \\ V_1 &= 150 \mu\text{L} \end{aligned} \quad C_1 = \frac{1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 600 \mu\text{L}}{150 \mu\text{L}} = 4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

$$V_2 = 600 \mu\text{L}$$

$$4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} (1.6 \text{ mL}) = 6.4 \text{ mg}$$

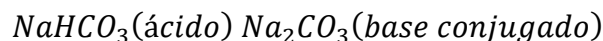
Se deben de disolver **6.4 mg** del **Extracto** en **1.6 mL** de **DMSO**

Anexo D. Cálculos para realizar el análisis NBT

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
B	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+	C+
C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X7	X7	X7	X7	X7	X7
D	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X8	X8	X8	X8	X8	X8
E	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X9	X9	X9	X9	X9	X9
F	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X10	X10	X10	X10	X10	X10
G	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X11	X11	X11	X11	X11	X11
H	X6	X6	X6	X6	X6	X6	X12	X12	X12	X12	X12	X12

Figura 26. Diseño de la placa para el análisis NBT. Cada placa transparente puede leerse como “2 placas” diferentes. Los pozos marcados con color azul son los “Blancos” alícuotas de 40 μL de la muestra glicadas con 160 μL de Solución amortiguadora de carbonato; los pozos marcados en color rojo son las pruebas con NBT, alícuotas de 40 μL de muestra glicadas con 160 μL de NBT en Solución amortiguadora de carbonato.

Se necesita preparar un Solución amortiguadora de carbonato de Sodio a 0.1 M con un pH de 10.35.



$$\text{pH} = \text{pka} + \log \frac{[\text{base conjugado}]}{[\text{ácido}]} = 10.25_{\text{HCO}} + \log \frac{[bc]}{[a]}$$

$$10.35 - 10.25 = 0.1 - \log \frac{[bc]}{[a]} \rightarrow 10^{0.1} = \frac{[bc]}{[a]} = 1.25893$$

$$\text{Cantidad analítica} = [bc] + [a] = 0.1\text{M}$$

$$[bc] = 1.25893[a] \therefore 1.25893[a] + [a] = 0.1\text{M}$$

$$2.25893[a] = 0.1\text{M} \quad [a] = \frac{0.1\text{M}}{2.25893} = 0.0443$$

$$[bc] = 1.25893[0.0443] = 0.0557\text{M}$$

Preparar Na_2CO_3 a 0.0557M

$$\left(\frac{0.0557\text{M}}{\text{L}} \right) (0.2\text{L}) \left(105.988 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) = 1.181\text{g}$$

$$PM = 105.988 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Se deben pesar **1.181 g** del **Na_2CO_3** .

Preparar NaHCO_3 a 0.0443M

$$\left(\frac{0.0443\text{M}}{\text{L}} \right) (0.2\text{L}) \left(84.007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) = 0.744\text{g}$$

$$PM = 84.007 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Se deben pesar **0.744 g** del **NaHCO₃**.

Agregar ambos compuestos y ajustar el volumen a 200 mL a un pH de 10.35

$$NBT = 6 \text{ pozos} [\text{del 4 al 6 y del 10 al 12}] \times 8 \text{ pozos} [\text{del A al H}] \times 160 \mu\text{L} = 7680 \mu\text{L}$$

→ **9mL**

Preparar NBT a 0.375mM

$$PM = 817.64 \frac{g}{mol}$$

$$\left(\frac{0.375 \text{mM}}{L} \right) (9 \times 10^{-3} \text{L}) \left(817.64 \frac{g}{mol} \right) = 2.7595 \times 10^{-3} g$$

Se deben disolver **2.76 mg** en **Solución amortiguadora de Carbonato**.

Anexo E. Resumen de Resultados de todas las pruebas realizadas

Tabla 35. Resumen de resultados de todas las pruebas realizadas (BSA-ribosa, BSA-glucosa y NBT) en las 29 fracciones semipurificadas seleccionadas.

		RESMLTADOS									
		BSA-ribosa				BSA-glucosa				FUCTOSAMINA	
		GENERAL		PENTOS		GENERAL		PENTOS		%	S
		%	S	%	S	%	S	%	S		
LOTE 1	C+	86.759	5.24	100.183	3.28	90.190	3.18	107.656	2.16	5.809	2.00
	1.2.1	15.122	4.48	41.917	2.48						
	1.2.2	55.256	3.14	44.773	2.75	6.135	7.66	8.534	7.27	-0.572	4.177
	1.2.3	39.834	3.80	42.272	1.93						
	1.2.4	40.113	6.56	37.100	6.66						
	1.2.5	57.661	4.09	51.549	2.72						
	1.2.6	77.781	2.00	70.550	3.30	85.293	2.06	83.978	4.14	12.178	3.522
	1.2.7	35.122	4.81	42.460	6.00						
	1.2.10	65.435	0.39	72.850	2.37						
	1.2.13 (S)	49.130	3.03	65.111	4.11	74.238	2.99	88.753	4.12	17.433	2.828
	1.2.14	23.034	3.49	12.665	3.56						
LOTE 2	2.2.1	14.593	4.78	28.938	4.78						
	2.2.2	59.481	3.08	50.140	3.48	14.713	5.99	28.527	4.72	-2.934	9.220
	2.2.3	60.724	1.56	54.116	2.51	62.081	6.38	66.504	5.89	16.910	5.896
	2.2.5	57.669	1.98	50.791	2.12						
	2.2.6	68.373	4.61	77.782	3.69	92.970	1.44	112.505	2.48	48.655	1.657
	2.2.7	55.616	6.71	100.662	4.35						
	2.2.8	50.384	4.47	96.787	4.32						
	2.2.11	49.753	4.34	66.673	4.97						
	2.2.13 (S)	55.025	6.99	58.040	6.15	99.207	2.75	85.312	4.64	98.292	1.488
	2.2.14	36.040	6.57	28.112	7.74						
LOTE 3	3.2.1	17.418	5.97	31.317	10.03						

	3.2.2	59.147	4.89	47.576	5.05	18.612	3.83	17.664	5.96	-4.222	3.892
	3.2.3	52.102	3.21	51.341	2.53						
	3.2.4	66.750	5.54	80.043	6.12	83.008	2.62	93.154	0.97	14.864	10.017
	3.2.12	56.399	7.71	55.472	6.54						
4	4.2.3	55.222	4.09	46.450	4.20	13.117	15.28	18.664	7.24	-0.122	4.645
	4.2.6	77.576	2.07	74.090	2.35	93.051	0.27	92.808	0.55	23.080	1.937
	4.2.12	70.617	3.16	61.774	4.58	88.173	2.13	90.650	3.97	22.019	3.879
	4.2.13	18.788	3.38	8.928	3.30						
Total		29									

El % hace referencia al porcentaje de Inhibición de Formación de AGEs (%IFA) para cada una de las pruebas realizadas, mientras que la S hace referencia a la desviación estándar de cada una de las muestras realizadas.

RESMLTADOS											
		BSA-ribosa				BSA-glucosa				FUCTOSAMINA	
		GENERAL		PENTOS		GENERAL		PENTOS		%	S
		%	S	%	S	%	S	%	S		
LOTE	C+	86.759	5.24	100.183	3.28	90.190	3.18	107.656	2.16	5.809	2.00
	1.2.5	57.661	4.09	51.549	2.72						
1	1.2.6	77.781	2.00	70.550	3.30	85.293	2.06	83.978	4.14	12.178	3.522
	1.2.13 (S)	49.130	3.03	65.111	4.11	74.238	2.99	88.753	4.12	17.433	2.828
2	2.2.2	59.481	3.08	50.140	3.48	14.713	5.99	28.527	4.72	-2.934	9.220
	2.2.6	68.373	4.61	77.782	3.69	92.970	1.44	112.505	2.48	48.655	1.657
	2.2.7	55.616	6.71	100.662	4.35						
	2.2.13 (S)	55.025	6.99	58.040	6.15	99.207	2.75	85.312	4.64	98.292	1.488
4	4.2.3	55.222	4.09	46.450	4.20	13.117	15.28	18.664	7.24	-0.122	4.645
Total		8									

Anexo F. Análisis de varianza de las fracciones seleccionadas (1.2.6, 2.2.6, 1.2.13 (S), 2.2.13 (S), 2.2.2 y 4.2.3

Para poder realizar el análisis de varianza se emplearon las ecuaciones simplificadas (Ecuación 2, 3 y 4), para poder calcular la suma de cuadrados entre las muestras, dentro de las muestras y el total, los grados de libertad, los cuadrados medios del error y el valor F.

$$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k \frac{1}{n_i} x_i^2 - \frac{x^2}{N}; \quad K - 1; \quad CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{K - 1}; \quad F = \frac{CM_{Trat}}{CM_{Error}} \quad (2)$$

$$SC_{Error} = SC_T - SC_{Trat}; \quad N - k; \quad CM_{Error} = \frac{SC_{Error}}{N - k} \quad (3)$$

$$SC_{Total} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{x^2}{N} ; \quad N - 1 \quad (4)$$

El siguiente método empleado (método Tukey) se utilizó con el fin de conocer si existen diferencias significativas entre las medias de las fracciones a evaluar. Se necesita calcular T_α con la Ecuación (5):

$$T_\alpha = q_\alpha(k, N - k) \times \sqrt{CM_E/n_i} \quad (5)$$

Análisis de varianza %IFA BSA-ribosa

AGEs tipo vesperlisininas

Tabla 36. Resumen de análisis de varianza de %IFA vesperlisininas en BSA-ribosa

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
1.2.6	6	466.68608	77.781013	3.9824134			
2.2.6	6	410.24026	68.373376	21.24613			
1.2.13 (S)	6	294.77944	49.129907	7.3362149			
2.2.13 (S)	6	330.14978	55.024963	48.8497			
2.2.2	6	356.88405	59.480675	9.4882493			
4.2.3	6	331.33491	55.222485	13.398011			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	3288.5683	5	657.71366	37.835617	4.44556E-12	2.5335545	
Dentro de los grupos	521.50359	30	17.383453				
Total	3810.0719	35					

Método de Tukey, $T_\alpha = 7.32$

Tabla 37. Resumen de método Tukey en %IFA vesperlisininas en BSA-ribosa, con un $T_\alpha = 7.32$

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión	Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.6}$	9.41	Significativa	$\mu_{2.2.6} - \mu_{4.2.3}$	13.15	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{1.2.13 (S)}$	28.65	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.13 (S)}$	5.90	No significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	22.76	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	10.35	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.2}$	18.30	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	6.09	No significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{4.2.3}$	22.56	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	4.46	No significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{1.2.13 (S)}$	19.24	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	0.20	No significativa

$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.13} (S)$	13.35	Significativa	$\mu_{2.2.2} - \mu_{4.2.3}$	4.26	No significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.2}$	8.89	Significativa			

AGEs tipo pentosidinas

Tabla 38. Resumen de análisis de varianza de %IFA pentosidinas en BSA-ribosa.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1.2.6	6	423.29986	70.549977	10.867053
2.2.6	6	466.69048	77.781746	13.593361
1.2.13 (S)	6	390.66881	65.111468	13.517396
2.2.13 (S)	6	348.24032	58.040054	37.833495
2.2.2	6	300.84224	50.140373	12.142399
4.2.3	6	278.69998	46.449997	14.097399

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4364.4717	5	872.89434	51.321014	8.37141E-14	2.5335545
Dentro de los grupos	510.25551	30	17.008517			
Total	4874.7272	35				

Método de Tukey, $T_{\alpha} = 7.24$

Tabla 39. Resumen de método Tukey en %IFA pentosidinas en BSA-ribosa, con un $T_{\alpha} = 7.24$

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión	Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.6}$	7.23	No significativa	$\mu_{2.2.6} - \mu_{4.2.3}$	31.33	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{1.2.13} (S)$	5.44	No significativa	$\mu_{1.2.13} (S) - \mu_{2.2.13} (S)$	7.07	No significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.13} (S)$	12.51	Significativa	$\mu_{1.2.13} (S) - \mu_{2.2.2}$	14.97	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.2}$	20.41	Significativa	$\mu_{1.2.13} (S) - \mu_{4.2.3}$	18.66	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{4.2.3}$	24.10	Significativa	$\mu_{2.2.13} (S) - \mu_{2.2.2}$	7.90	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{1.2.3} (S)$	12.67	Significativa	$\mu_{2.2.13} (S) - \mu_{4.2.3}$	11.59	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.13} (S)$	19.74	Significativa	$\mu_{2.2.2} - \mu_{4.2.3}$	3.69	No significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.2}$	27.64	Significativa			

Análisis de varianza %IFA BSA-glucosa

AGEs tipo vesperlisin

Tabla 40. Resumen de análisis de varianza de %IFA vesperlisinas en BSA-glucosa.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1.2.6	3	255.88027	85.293422	4.2538111
2.2.6	3	278.91104	92.970346	2.0859466
1.2.13 (S)	3	222.71524	74.238414	8.9412377
2.2.13 (S)	3	297.62201	99.207336	7.571806
2.2.2	3	79.51745	26.505817	17.964342
4.2.3	3	72.117928	24.039309	116.76433

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	16752.613	5	3350.5226	127.57296	5.67522E-10	3.1058752
Dentro de los grupos	315.16295	12	26.263579			
Total	17067.776	17				

Método de Tukey, $T_{\alpha} = 10.86$

Tabla 41. Resumen de método Tukey en %IFA vesperlisinas en BSA-glucosa, con un $T_{\alpha} = 10.86$

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión	Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.6}$	7.68	No significativa	$\mu_{2.2.6} - \mu_{4.2.3}$	68.93	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{1.2.13 (S)}$	11.06	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.13 (S)}$	24.97	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	13.91	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	47.73	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.2}$	58.79	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	50.20	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{4.2.3}$	61.25	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	72.70	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{1.2.13 (S)}$	18.73	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	75.17	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	6.24	No significativa	$\mu_{2.2.2} - \mu_{4.2.3}$	2.47	No significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.2}$	66.46	Significativa			

AGEs tipo pentosidinas

Tabla 42. Resumen de análisis de varianza de %IFA pentosidinas en BSA-glucosa.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1.2.6	3	251.93418	83.978061	17.114074
2.2.6	3	337.51573	112.50524	6.1260967
1.2.13 (S)	3	266.26016	88.753388	16.933395

2.2.13 (S)	3	255.93496	85.311653	21.572433
2.2.2	3	85.581545	28.527182	11.150579
4.2.3	3	72.282626	24.094209	26.21625

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	19241.64	5	3848.3279	232.96649	1.6267E-11	3.1058752
Dentro de los grupos	198.22565	12	16.518805			
Total	19439.865	17				

Método de Tukey, $T_\alpha = 8.61$

Tabla 43. Resumen de método Tukey en %IFA pentosidinas en BSA-glucosa, con un $T_\alpha = 8.61$

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión	Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.6}$	28.53	Significativa	$\mu_{2.2.6} - \mu_{4.2.3}$	88.41	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{1.2.13 (S)}$	4.78	No significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.13 (S)}$	3.44	No significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	1.33	No significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	60.23	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.2}$	55.45	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	64.66	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{4.2.3}$	59.88	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	56.78	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{1.2.3 (S)}$	23.75	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	61.22	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	27.19	Significativa	$\mu_{2.2.2} - \mu_{4.2.3}$	4.43	No significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.2}$	83.98	Significativa			

Análisis de varianza %IFA Ensayos NBT

Tabla 44. Resumen de análisis de varianza de %IFA en Ensayos NBT.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1.2.6	3	36.534058	12.178019	12.402486
2.2.6	3	145.96451	48.654837	2.7449133
1.2.13 (S)	3	52.300354	17.433451	7.9955961
2.2.13 (S)	3	294.87613	98.292045	2.2139356
2.2.2	3	-8.8008014	-2.9336005	85.003845
4.2.3	3	-0.3649113	-0.1216371	10.785979

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
---------------------------	-------------------	--------------------	---------------------------	---	--------------	----------------------

Entre grupos	22416.743	5	4483.348	222.0455	2.16187E-11	3.105875
Dentro de los grupos	242.29351	12	20.19112			
Total	22659.036	17				

Método de Tukey, $T_\alpha = 9.52$

Tabla 45. Resumen de método Tukey en %IFA en Ensayos NBT, con un $T_\alpha = 9.52$

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión	Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.6}$	36.48	Significativa	$\mu_{2.2.6} - \mu_{4.2.3}$	48.78	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{1.2.13 (S)}$	5.26	No significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.13 (S)}$	80.86	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	86.11	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	20.37	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{2.2.2}$	15.11	Significativa	$\mu_{1.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	17.56	Significativa
$\mu_{1.2.6} - \mu_{4.2.3}$	12.30	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{2.2.2}$	101.23	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{1.2.3 (S)}$	31.22	Significativa	$\mu_{2.2.13 (S)} - \mu_{4.2.3}$	98.41	Significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.13 (S)}$	49.64	Significativa	$\mu_{2.2.2} - \mu_{4.2.3}$	2.81	No significativa
$\mu_{2.2.6} - \mu_{2.2.2}$	51.59	Significativa			

Anexo G. Compilación de Resultados de todas las placas Constar® realizadas

Tabla 46. Compilación de Resultados de todas las lecturas realizadas en placas Constar®.

		P1 BSA-RIB 22-08-23				P2 BSA-RIB 22-08-23 (ERROR)*				P1 BSA-RIB 07-09-23				P2 BSA-RIB 07-09-23			
		C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S
		90.616	1.33	103.660	0.65	150.483	0.64	117.526	0.22	90.199	1.30	102.057	0.55	87.016	1.46	100.452	0.85
LOTE	FRACCIÓN	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S
1	1.2.1									15.122	4.48	41.917	2.48				
	1.2.2									53.437	3.27	43.882	3.01				
	1.2.3									39.834	3.80	42.272	1.93				
	1.2.4									40.113	6.56	37.100	6.66				
	1.2.5	57.661	4.09	51.549	2.72												
	1.2.6	78.934	0.79	73.298	5.53												
	1.2.7									35.122	4.81	42.460	6.00				
	1.2.10									65.435	0.39	72.850	2.37				
	1.2.13 (S)													82.787*	1.99*	91.861*	2.78*
	1.2.14	23.034	3.49	12.665	3.56												
2	2.2.1													14.593	4.78	28.938	4.78
	2.2.2													59.599	4.18	51.294	4.21
	2.2.3													61.155	1.03	55.450	1.78
	2.2.5	57.669	1.98	50.791	2.12												
	2.2.6	72.297	2.61	77.027	5.53												
	2.2.7													59.926	3.62	101.419	3.96
	2.2.8													50.384	4.47	96.787	4.32
	2.2.11																
	2.2.13 (S)																
	2.2.14	36.040	6.57	28.112	7.74												
3	3.2.1																
	3.2.2					50.460	5.52	44.905	4.60								

	3.2.3																
	3.2.4					59.529	7.00		82.556	4.53							
	3.2.12																
	4.2.3					47.011	6.17		42.267	4.55							
4	4.2.6					77.744	9.05		77.767	5.22							
	4.2.12																
	4.2.13					-6.662	6.45		-4.283	0.59							
		P3 BSA-RIB 08-09-23				P4 BSA-RIB 08-09-23*				P1 BSA-RIB 14-09-23				P2 BSA-RIB 14-09-23			
		C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S
		77.378	7.01	92.434	3.33	23.527	1.02	35.725	2.15	88.704	0.97	101.241	0.63	86.641	0.31	99.419	0.29
LOTE	FRACCIÓN	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S
	1.2.1																
	1.2.2									57.075	2.02		45.664	2.73			
	1.2.3																
	1.2.4																
1	1.2.5																
	1.2.6									76.628	2.31	67.802	1.94				
	1.2.7																
	1.2.10																
	1.2.13 (S)									49.130	3.03	65.111	4.11				
	1.2.14																
	2.2.1																
	2.2.2									59.363	2.49	48.987	2.94				
	2.2.3													60.292	2.11	52.781	2.68
2	2.2.5																
	2.2.6									64.450	0.35	78.536	1.31				
	2.2.7													51.307	6.62	99.905	5.46
	2.2.8																
	2.2.11	49.753	4.34	66.673	4.97												

	2.2.13 (S)	59.088	6.99	59.138	6.78						50.962	4.87	56.942	6.71
	2.2.14													
	3.2.1	17.418	5.97	31.317	10.03									
	3.2.2	62.339	2.09	50.380	1.90			55.956	4.98	44.772	6.05			
3	3.2.3	52.102	3.21	51.341	2.53									
	3.2.4	70.782	2.43	84.731	2.31							62.718	4.70	75.356
	3.2.12					56.399	7.71	55.472		6.54				4.74
	4.2.3					55.222	4.09	46.450	4.20					
4	4.2.6					77.369	2.86	75.632	2.39			77.784	1.56	72.549
	4.2.12					72.074	3.10	65.225	3.23			69.161	3.00	58.324
	4.2.13					18.788	3.38	8.928	3.30					2.49

		P1 BSA-GLU 28-09-23				P2 BSA-GLU 28-09-23				FUCTOSAMINA 20-09-23			
		C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S	C+	S
		90.190	3.56	106.511	2.05	92.829	4.51	108.802	1.88	5.724	2.04	5.893	2.40
LOTE	FRACCIÓN	%GRAL	S	%PENTOS	S	%GRAL	S	%PENTOS	S	%PLACA I	S	%PLACA II	S
	1.2.1												
	1.2.2	6.135	7.66	8.534	7.27					-0.572	4.18		
	1.2.3												
	1.2.4												
1	1.2.5												
	1.2.6	85.293	2.06	83.978	4.14					12.178	3.52		
	1.2.7												
	1.2.10												
	1.2.13 (S)					74.238	2.99	88.753	4.12			17.433	2.83
	1.2.14												
	2.2.1												
2	2.2.2	14.713	5.99	28.527	4.72					-2.934	9.22		
	2.2.3					62.081	6.38	66.504	5.89			16.910	5.90
	2.2.5												

	2.2.6	92.970	1.44	112.505	2.48			48.655	1.66	
	2.2.7									
	2.2.8									
	2.2.11									
	2.2.13 (S)					99.207	2.75	85.312	4.64	98.292 1.49
	2.2.14									
3	3.2.1									
	3.2.2	18.612	3.83	17.664	5.96			-4.222	3.89	
	3.2.3									
	3.2.4					83.008	2.62	93.154	0.97	14.864 10.02
	3.2.12									
4	4.2.3	13.117	15.28	18.664	7.24			-0.122	4.64	
	4.2.6					93.051	0.27	92.808	0.55	23.080 1.94
	4.2.12					88.173	2.13	90.650	3.97	22.019 3.88
	4.2.13									

*La placa P2 BSA-RIB 22-08-23 (ERROR) no se tomó en cuenta para realizar cálculos de algún tipo debido a que se utilizó DMSO en lugar de PBS al realizar una solución solución amortiguadora, alterando significativamente los resultados.

En la placa P2 BSA-RIB 07-09-23, la concentración de la fracción 1.2.13 (S) es de 2.7 mg/mL, por lo que no se tomó en cuenta para la realización de los cálculos. Finalmente, para la placa P4 BSA-RIB 08-09-23, la aminoguanidina no de disolvió completamente en DMSO, por lo que no fue considerada en los cálculos.

Anexo H. Cromatogramas HPLC

LOTE 1

Fracción 1.2.2

Fracción 1.2.5

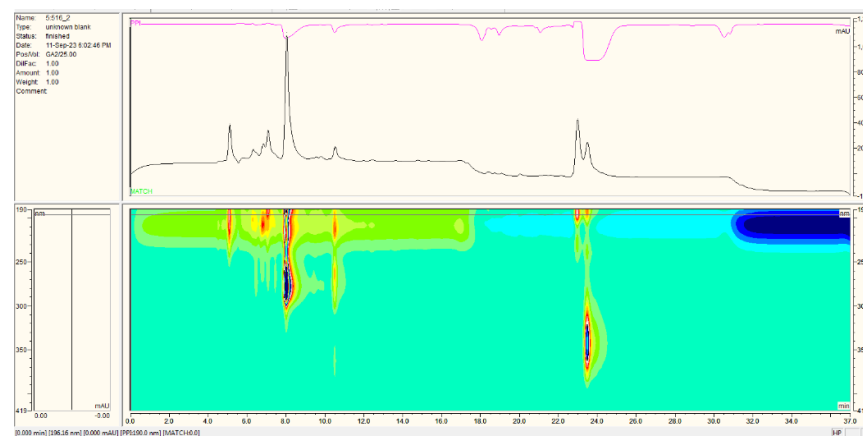
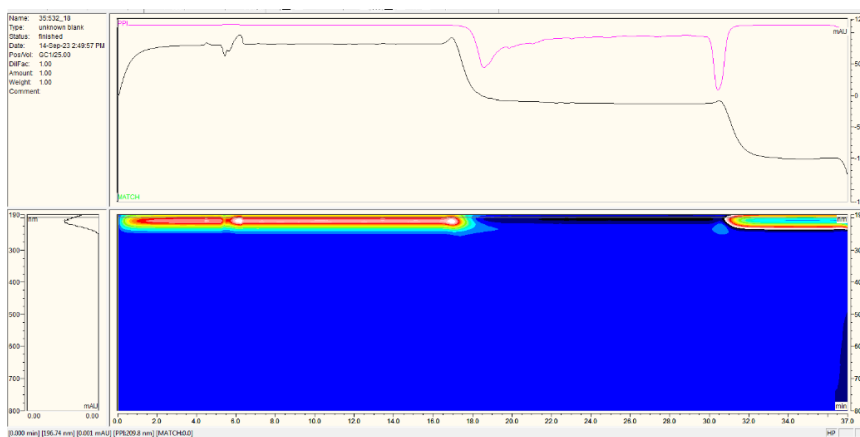


Figura 27. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.2

Fracción 1.2.6

Figura 28. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.5

Fracción 1.2.10

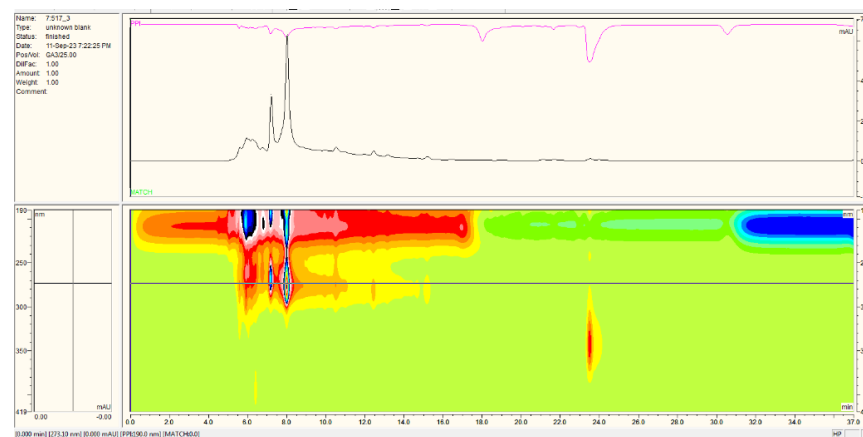
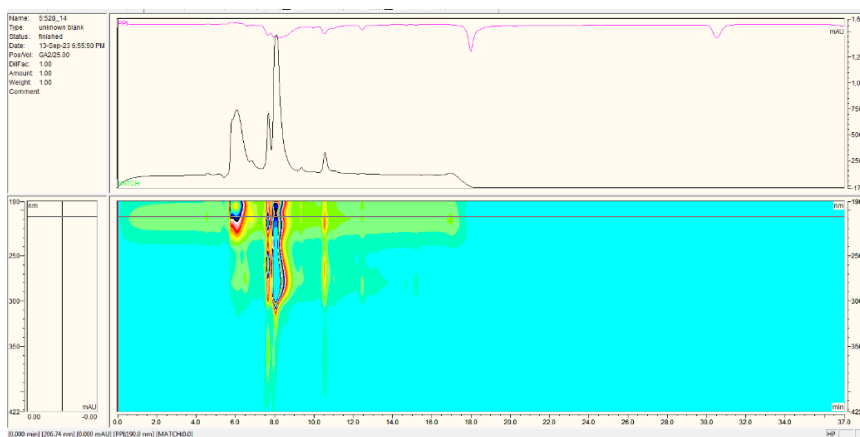


Figura 29. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.6

Figura 30. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.10

Fracción 1.2.13 (S)

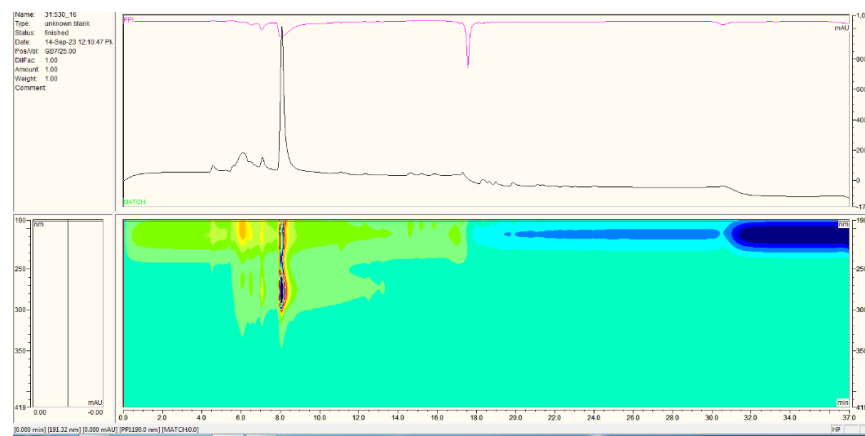


Figura 31. Cromatograma HPLC de fracción 1.2.13 (S)

LOTE 2

Fracción 2.2.2

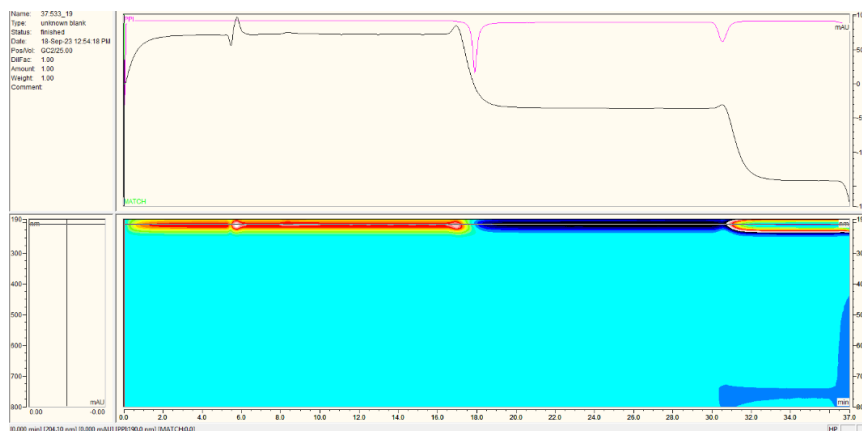


Figura 32. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.2

Fracción 2.2.3

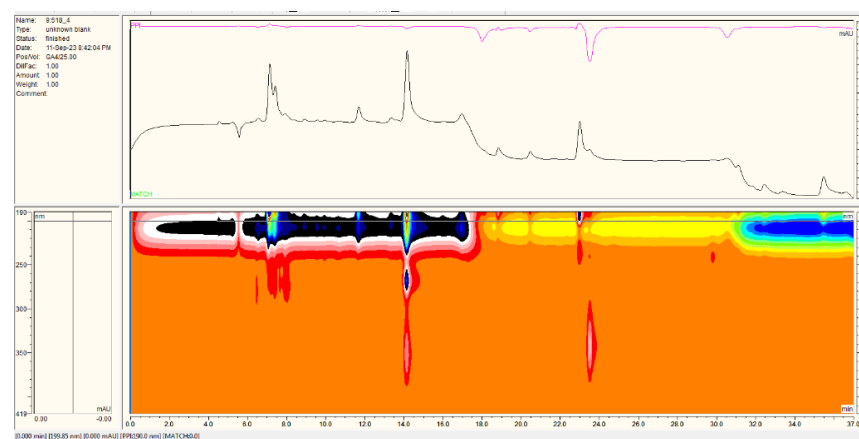


Figura 33. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.3

Fracción 2.2.5

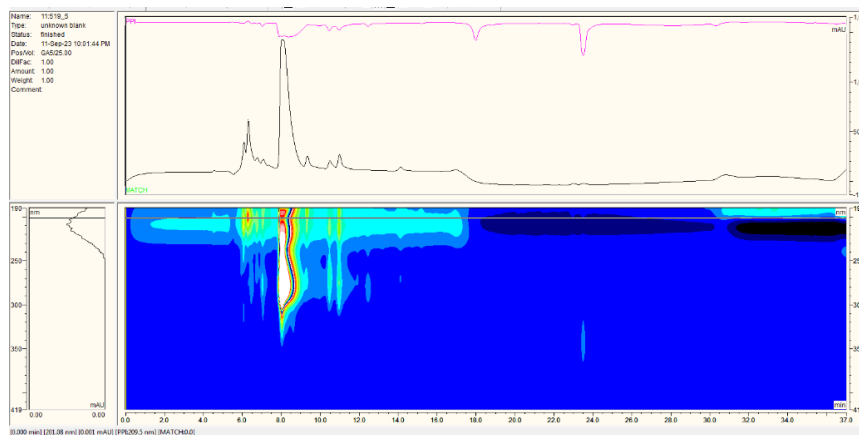


Figura 34. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.5

Fracción 2.2.6

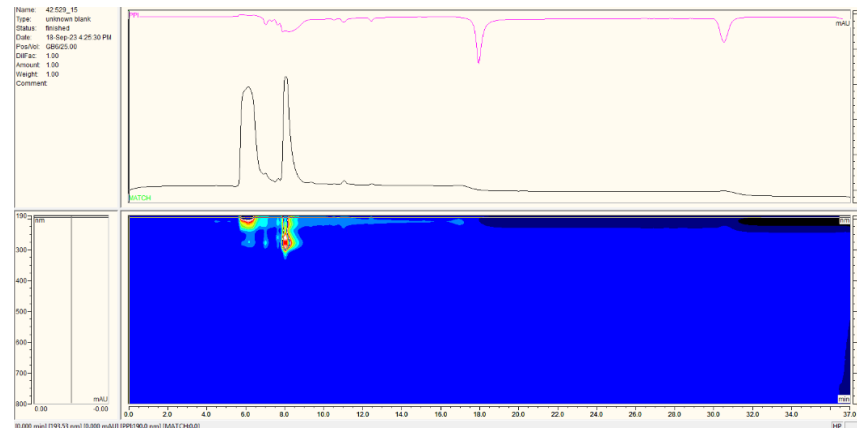


Figura 35. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.6

Fracción 2.2.7

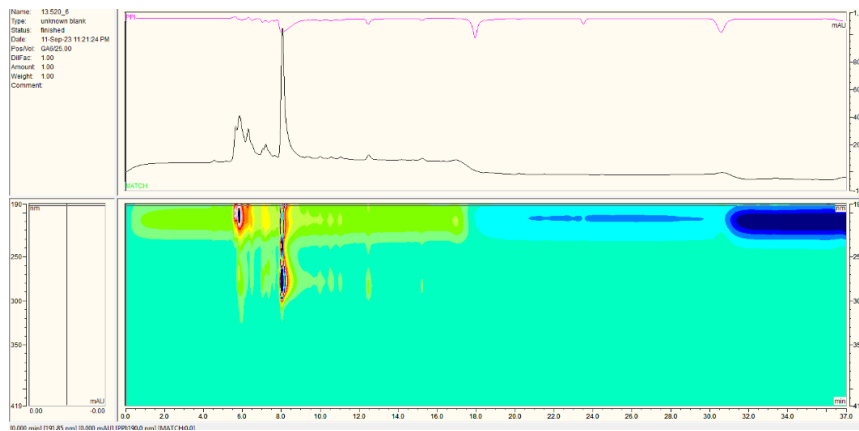


Figura 36. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.7

Fracción 2.2.8

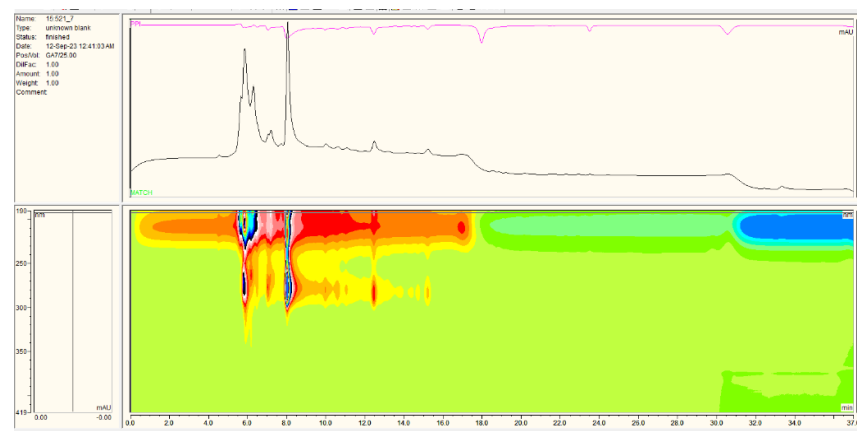


Figura 37. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.8

Fracción 2.2.13 (S)

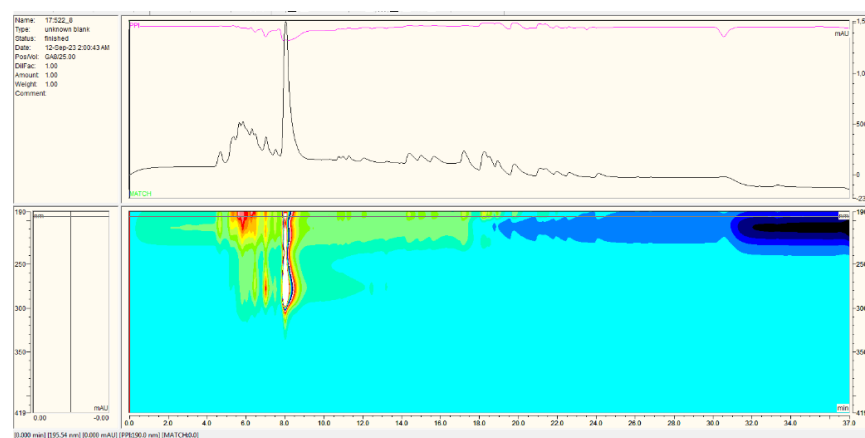


Figura 38. Cromatograma HPLC de fracción 2.2.13 (S)

LOTE 3

Fracción 3.2.2

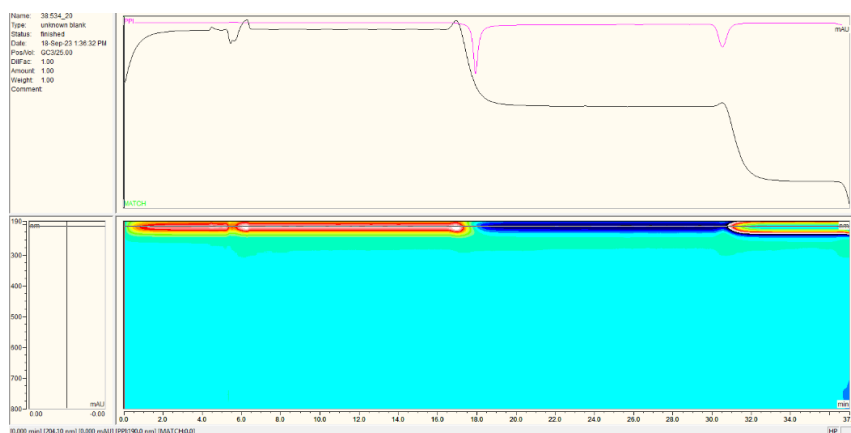


Figura 39. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.2

Fracción 3.2.3

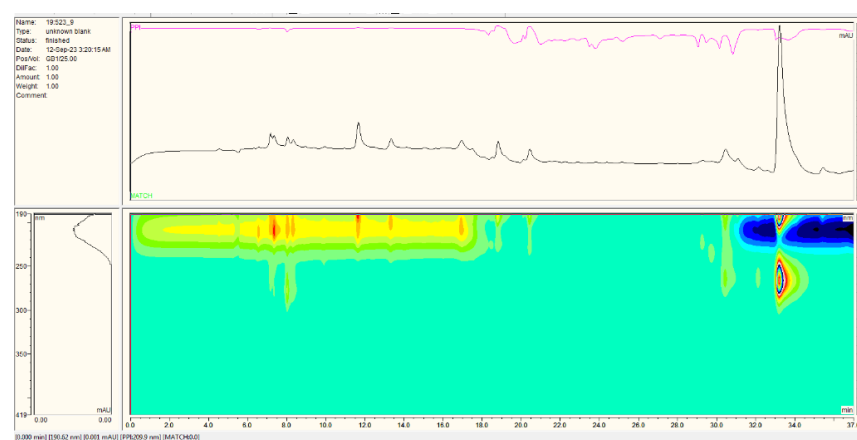


Figura 40. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.3

Fracción 3.2.4

Fracción 3.2.12

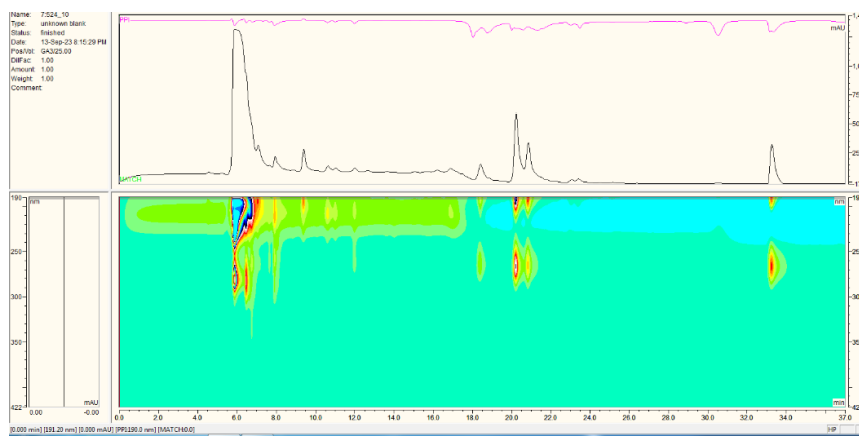


Figura 41. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.4

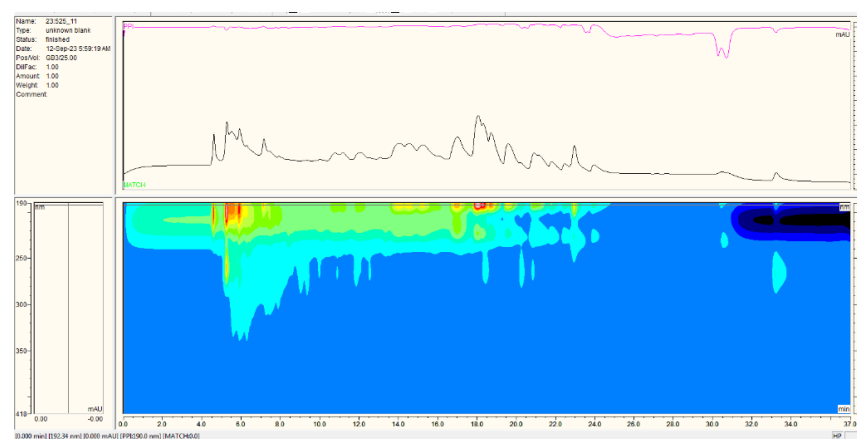


Figura 42. Cromatograma HPLC de fracción 3.2.12

LOTE 4

Fracción 4.2.3



Figura 43. Cromatograma HPLC de fracción 4.2.3

Fracción 4.2.6

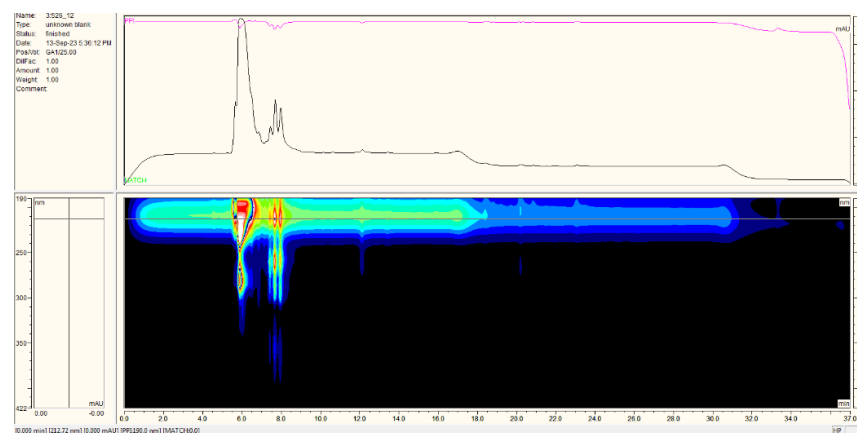


Figura 44. Cromatograma HPLC de fracción 4.2.6

Fracción 4.2.12

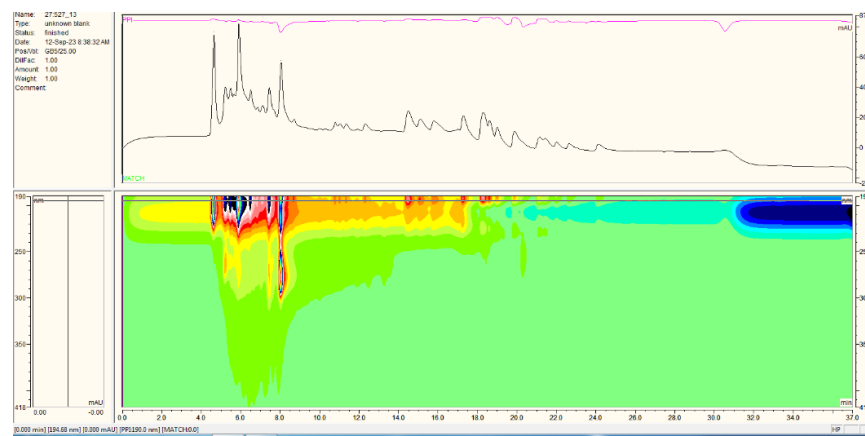


Figura 45. Cromatograma HPLC de fracción 4.2.12

Anexo I. Constancias y áreas de desarrollo



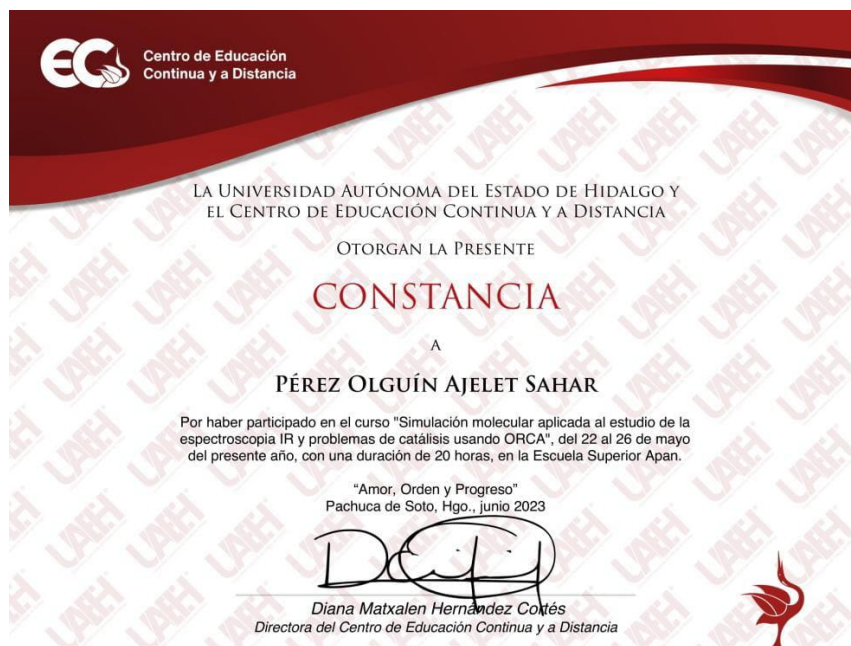
Constancia por participación en Primer Simposio de
Sistemas Energéticos y Materiales Avanzados (Noviembre
2021).



Constancia por participación como asistente al Taller Experimental de Biociencias (Junio 2022).



Constancia por asistencia en el Taller teórico-práctico "Programación e instrumentación de sensores industriales para Biorreactores" (Mayo 2023).



Constancia por participación en curso "Simulación molecular aplicada al estudio de la espectroscopia IR y problemas de catálisis usando ORCA" Mayo 2023).



Constancia por asistencia al evento Toximpósio "La toxicología frente a nuevos retos" (JμLio 2023).

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Ajelet S. Pérez Olguín, Pablo A. López Pérez, Mónica I. Sánchez Contreras, Dulce J. Hernández-Melchor

Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ALTO VALOR AGREGADO
UTILIZANDO CULTIVOS MICROBIANOS FOTOSINTÉTICOS

Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023

DR. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024

DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO

DR. BEATRIZ RUIZ VILLAFAN
SECRETARIA MDN 2022-2024

Constancia por participación en la sesión de carteles con el trabajo "Análisis de la producción de compuestos bioactivos de alto valor agregado utilizando cultivos microbianos fotosintéticos" (Septiembre 2023).



EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV)



OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A:

Ajalet Sahar Perez Olguin

Por su asistencia al 1er simposio de:

"Cultivos tridimensionales e ingeniería de tejidos biomédicos como herramientas de investigación de frontera en México"

Celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2023 en el Cinvestav.



DR. MARTHA ESPINOSA CANTELLANO
INVESTIGADORA TITULAR DEL DEPTO. DE INFECTOMÍA Y
PATOGENESIS MOLECULAR, CINVESTAV

DR. KARLA BERENICE ACOSTA VIRGEN
INVESTIGADORA POSTDOCTORAL CONAHCYT-CINVESTAV

CIUDAD DE MÉXICO A 27 DE SEPTIEMBRE DE 2023

Constancia por asistencia al 1er simposio de: "Cultivos tridimensionales e ingeniería de tejidos biomédicos como herramientas de investigación de frontera en México" (Septiembre 2023).