



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Cuantificación de compuestos bioactivos y evaluación de
la actividad antioxidante de la planta silvestre y cultivos
in vitro de *Ageratina pichichensis***

Tesis para obtener el grado de:

Doctora en Biotecnología

Presenta

M. B Elizabeth Alejandra Motolinia Alcántara

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesores: Dra. Angélica Román Guerrero

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Ciudad de México a 1 de diciembre del 2023

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de posgrados de Calidad (PNPC) de CONAHCyT con la referencia 001466.

Ciudad de México. a 1 de diciembre de 2023

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Cuantificación de compuestos bioactivos y evaluación de actividad antioxidante de la planta silvestre y cultivos *in vitro* de *Ageratina pichichensis*”

que presentó:

Elizabeth Alejandra Motolinia Alcántara

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Mario Rodríguez Monroy. Instituto Politécnico Nacional

Jurado

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero

Secretario: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Vocal: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

DEDICATORIA

A Dios, por estar siempre presente y ponerme en el lugar y momento exacto, con las personas indicadas para lograr esta meta.

A mis padres por ser uno de los pilares más importantes en mi vida, gracias por creer en mí e impulsarme en todo momento, especialmente por su apoyo y amor.

A mi hermano por su amistad y amor incondicional, gracias por ser un ejemplo de perseverancia, entrega y valor para lograr nuestros sueños.

A mi pareja Marcelo por sus consejos y observaciones para mejorar este estudio, en especial por inspirarme, apoyarme y recordarme que rendirse no es opción. Gracias por todo tu amor y por hacer de nuestro hogar mi lugar favorito.

En especial a mí, por no rendirme pese a todos los retos que se presentaron y dar la mejor versión para cumplir mi sueño de ser investigadora.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por la oportunidad, el apoyo y la confianza para formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Angélica Román Guerrero por su apoyo, dedicación y especialmente por su amistad y cariño.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros por el apoyo y confianza para llevar a cabo parte fundamental de este estudio en su grupo de investigación.

A los Drs. Angélica Román Guerrero, Ricardo Reyes Chilpa, Fernando Rivera Cabrera, Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y Francisco Cruz Sosa por la revisión de este documento.

A mis amigos por su amistad, apoyo y sobre todo por hacer más amena la experiencia realizar un Doctorado, particularmente a Carlos Flores, Ariana, Rebeca, María y Carlos Ayala

A mis amigos de toda la vida, Nancy y Mario, por estar siempre conmigo y apoyarme en todo, especialmente por quererme mucho.

CONTENIDO

CAPÍTULO I

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Introducción | 17 |
| 2. | REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 19 |
| 2.1 | Plantas medicinales | 19 |
| 2.2 | Metabolitos secundarios en plantas..... | 19 |
| 2.3 | Cultivo de tejidos vegetales (CTV)..... | 20 |
| 2.3.1 | Cultivo de callos y células en suspensión | 21 |
| 2.4 | Producción de compuestos bioactivos en plantas silvestre VS in vitro..... | 22 |
| 2.5 | Familia Asteraceae | 25 |
| 2.5.1 | <i>Ageratina pichihensis</i> | 25 |
| 2.5.2 | MSDP obtenidos de <i>A. pichichensis</i> | 26 |
| 2.5.3 | Actividad biológica de los metabolitos secundarios reportados para <i>A. pichichesis</i> | 32 |
| 2.5.4 | Metabolitos secundarios a partir del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ageratina pichinchensis</i> | 33 |
| 2.6 | Compuestos fenólicos | 36 |
| 2.7 | Actividad antioxidante | 38 |
| 2.7.1 | Antioxidantes | 38 |
| 2.7.2 | Evaluación de la capacidad antioxidante..... | 38 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN..... | 42 |
| 4. | HIPÓTESIS..... | 43 |
| 5. | OBJETIVO GENERAL | 43 |
| 5.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| 6. | ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 44 |
| 7. | MATERIALES Y MÉTODOS | 46 |
| 7.1 | Establecimiento de cultivos in vitro de <i>A. pichichensis</i> | 46 |
| 7.1.1 | Material vegetal..... | 47 |
| 7.1.2 | Planta <i>in vitro</i> | 47 |
| 7.1.3 | Inducción de callo | 47 |
| 7.1.4 | Establecimiento del cultivo de células en suspensión | 48 |
| 7.2 | Preparación de extractos..... | 50 |
| 7.3 | Caracterización de extractos..... | 50 |
| 7.3.1 | Cuantificación del contenido de fenoles totales | 50 |
| 7.3.2 | Cuantificación de Flavonoides totales..... | 51 |
| 7.3.3 | Identificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)..... | 51 |
| 7.3.4 | Identificación mediante cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS)..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 7.4 Ensayos de actividad antioxidante | 52 |
| 7.4.1 Actividad de barrido del radical DPPH• | 52 |
| 7.4.2 Actividad de barrido del radical ABTS•+ | 53 |
| 7.4.3 Ensayo TBARS | 53 |
| 7.5 Análisis estadístico..... | 54 |
| 8. RESULTADO Y DISCUSIÓN..... | 55 |
| 8.1 Establecimiento de cultivos in vitro | 55 |
| 8.1.1 Cultivo de callos..... | 55 |
| 8.1.2 Cultivo de células en suspensión..... | 57 |
| 8.2 Compuestos fenólicos | 60 |
| 8.2.1 Cuantificación de compuestos fenólicos | 60 |
| 8.2.2 Identificación de compuestos mediante HPLC | 63 |
| 8.2.3 Cuantificación de compuestos identificados mediante HPLC | 65 |
| 8.2.4 Identificación de compuestos mediante CG-MS..... | 66 |
| 8.3 Actividad antioxidante | 70 |
| 9 Conclusiones del capítulo..... | 74 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 76 |
| 2. Revisión bibliográfica | 77 |
| 2.1. Producción comercial de los compuestos bioactivos a partir de CTV..... | 77 |
| 2.2 Configuración de biorreactores utilizados para la MSDP | 79 |
| 2.3 Variables de operación y efecto sobre la obtención de MSDP. | 81 |
| 2.3.1 Temperatura | 81 |
| 2.3.2 Luz..... | 81 |
| 2.3.3 pH..... | 83 |
| 2.3.4 Mezcla | 83 |
| 2.3.5 Aireación | 84 |
| 3. Conclusiones | 88 |
| 4. Perspectivas del estudio | 89 |
| 5 BIBLIOGRAFÍA..... | 90 |
| 6 ANEXO A | 99 |
| 7 Artículos científicos..... | 109 |

INDICE DE IMAGENES

| | |
|--|----|
| <i>Imagen 1.1</i> Tipos de metabolitos secundarios derivados de las plantas (MSDP). | 20 |
| <i>Imagen 1.2.</i> Etapas generales para la obtención de cultivo de células en suspensión (CCS). Cultivo de callo (CC). Esquema modificado de [7]..... | 21 |
| <i>Imagen 1.3.</i> Planta de <i>Ageratina pichichensis</i> creciendo en condiciones naturales..... | 25 |
| <i>Imagen 1.4.</i> Mecanismo de reacción de DPPH..... | 40 |
| <i>Imagen 1.5.</i> Mecanismo de reacción de ABTS. | 40 |
| <i>Imagen 1.6.</i> Estrategia experimental seguida para cumplir los objetivos del capítulo I. | 45 |
| <i>Imagen 1.7.</i> <i>Ageratina pichichensis</i> : a) Planta silvestre (PS) colectada del sitio natural, (b) planta germinada in vitro (PI), (c) cultivo de callo (CC) y (d) cultivo de células en suspensión (CCS).... | 46 |
| <i>Imagen 1.8.</i> Explantes utilizados de las plantas in vitro de <i>A. pichinchensis</i> para la inducción de callo..... | 47 |
| <i>Imagen 1.9.</i> Respuestas morfogénicas obtenidas con explantes de segmento nodal. a) callo con planta, b) callo con raíz y c) callo. | 55 |
| <i>Imagen 1.10.</i> Establecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>A. pichichensis</i> de los callos obtenidos de T3 y T4. | 57 |
| <i>Imagen 1.11.</i> Cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>A. pichichensis</i> del T4 en medio MS líquido. • Biomasa seca (g/L), • Consumo de fuente de C, • % viabilidad y • pH... 59 | 59 |
| <i>Imagen 1.12.</i> a) Contenido total de fenoles (CTP) y b) flavonoides (CTF) en PS y cultivos in vitro de <i>A. pichichensis</i> . Los resultados son el promedio \pm la desviación estándar de dos mediciones independientes. Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). 62 | 62 |
| <i>Imagen 1.13.</i> Cromatograma de los estándares de compuestos fenólicos identificados mediante HPLC. AG ácido gálico; CAT catequina; ACf ácido cafeico; EPI epicatequina; ApC ácido p-cumárico y RUT rutina..... | 63 |
| <i>Imagen 1.14.</i> Cromatogramas de HPLC para extractos metanólicos de <i>A. pichichensis</i> . Planta silvestre (PS), planta in vitro (PI), cultivo de callos (CC-T3 y CC T4), cultivo de células en suspensión (CCS 12d y CCS 16d). Ácido gálico (AG), catequina (CAT), ácido cafeico (ACf), epicatequina (EPI), ácido p-cumarico (ApC) y rutina (RUT)..... | 64 |
| <i>Imagen 1.15.</i> Capacidad antioxidante de los extractos de <i>A. pichichensis</i> y sus cultivos celulares frente a radicales (A) ABTS, (B) DPPH y (C) peroxidación lipídica TBARS..... | 71 |
| <i>Imagen 2.1</i> Configuración de biorreactores comúnmente utilizados para el cultivo de tejidos vegetales..... | 79 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1.1. Obtención de compuestos bioactivos con relevancia farmacología obtenidos a partir de planta silvestre VS planta in vitro. Modificada de [7]..... | 23 |
| Tabla 1.2. Metabolitos secundarios obtenidos de <i>A. pichichensis</i> | 26 |
| Tabla 1.3. Metabolitos secundarios identificados a partir del cultivo in vitro de <i>Ageratina pichinchensis</i> | 34 |
| Tabla 1.4. Clasificación de compuestos fenólicos reportados en plantas..... | 37 |
| Tabla 1.5. Diseño experimental de las diferentes combinaciones de reguladores utilizadas de ANA (mg/L) y KIN (mg/L)..... | 48 |
| Tabla 1.6. Efecto de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) sobre la respuesta morfogénica de explantes de segmentos nodales de <i>A. pichichensis</i> a los 20 días de cultivo..... | 56 |
| Tabla 1.7. Análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos identificados mediante HPLC de los extractos metanólicos de <i>A. pichichensis</i> | 65 |
| Tabla 1.8. Porcentaje (%) del tipo de compuestos identificados en cada tratamiento con respecto al total de compuestos identificados en muestras sin derivatizar..... | 67 |
| Tabla 1.9. Porcentaje (%) del tipo de compuestos identificados en cada tratamiento con respecto al total de compuestos identificados en muestras derivatizadas..... | 67 |
| Tabla 1.10. Compuestos identificados en muestras sin derivatizar de los extractos metanólicos de <i>A. pichichensis</i> | 68 |
| Tabla 1.11. Compuestos fenólicos identificados en muestras derivatizadas de los extractos metanólicos de <i>A. pichichensis</i> | 69 |
| Tabla 1.12. Valores de la IC50 de cada extracto necesarios para inhibir el 50% de la concentración inicial de radical libre..... | 73 |
| Tabla 2.1. Metabolitos secundarios derivados de plantas de uso comercial obtenidos a partir de CCS..... | 78 |
| Tabla 2.2. Estudios reportados bajo diferentes condiciones de luz. Luz continua, fotoperiodos y oscuridad..... | 82 |
| Tabla 2.3. Condiciones utilizadas en los biorreactores y su efecto en el crecimiento y producción de MSDP..... | 86 |
| Tabla 3. Compuestos identificados mediante CG-MS de extractos metanólicos de la planta creciendo en condiciones naturales y cultivos in vitro de <i>A. pichihneis</i> sin derivatizar..... | 100 |
| Tabla 4. Compuestos identificados en los extractos metanólicos de la planta creciendo en condiciones naturales y cultivos in vitro de <i>A. pichichensis</i> muestras derivatizadas..... | 105 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| PS | Planta silvestres |
| PI | Planta in vitro |
| CC | Cultivo de callos |
| CCS | Cultivo de células en suspensión |
| CTV | Cultivo de tejidos vegetales |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| KIN | N6-furfurilaminopurina |
| MSDP | Metabolitos secundarios derivados de plantas |
| DPPH• | 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo |
| ABTS ^{•+} | 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio |
| TBARS | Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| GC/MS | Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas |
| AG | Ácido gálico |
| ACf | Ácido cafeico |
| ApC | Ácido p-cumárico |
| CAT | Catequina |
| RUT | Rutina |
| EPI | Epicatequina |

| | |
|------------------|-----------------------------------|
| CTP | Contenido total de fenoles |
| CTF | Contenido total de flavonoides |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico |
| QCT | Equivalentes de quercetina |
| BS | Biomasa seca |
| ES | Extracto seco |
| IC ₅₀ | Concentración media de inhibición |

Resumen

Las plantas han sido utilizadas desde tiempos prehistóricos hasta la actualidad para tratar y curar diversas afecciones y enfermedades, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha denominado como “Sistema de Medicina Tradicional”, dicho potencial es gracias a la producción de compuestos bioactivos conocidos como metabolitos secundarios derivados de las plantas (MSDP). Los MSDP han sido clasificados según su estructura química en compuestos nitrogenados, terpenos, compuestos azufrados y compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son uno de los MSDP más abundantes en las plantas, han sido reportados con diversas actividades biológicas como agentes antioxidantes, antimicrobianos y antiinflamatorios. Además de su uso como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades como la obesidad, el cáncer y la diabetes.

La producción de los MSDP a partir de plantas silvestres, es decir, plantas que crecen bajo condiciones naturales y sin la intervención de cultivo controlado, representa un reto importante para asegurar la disponibilidad y producción sustentable y sostenible de estos compuestos bioactivos, debido a inconvenientes como el requerimiento de tiempos de cultivo largos para alcanzar el estado de madurez de la planta adecuado que permita maximizar la síntesis de dichos compuestos, aunado a la falta de control de las condiciones ambientales que permitan la viabilidad de las plantas y los bajos rendimientos de extracción alcanzados a partir de los distintos tejidos de la planta. La práctica de estos tipos de procesos no controlados puede requerir de grandes cantidades de material vegetal para sostener una producción constante que satisfaga la necesidad de dichos compuestos bioactivos, conduciendo a la sobreexplotación y extinción de especies. Una de las alternativas a estos problemas resulta en el aprovechamiento de tecnologías biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales (CTV), el cual ofrece ventajas significativas como la producción continua de MSDP bajo condiciones ambientales controladas, con requerimientos mínimos de agua y sin necesidad de utilizar pesticidas y herbicidas, logrando una mejor calidad en el producto deseado.

Existen diversos tipos de CTV, los cuales incluyen la producción de embriones, raíces, brotes, callos y cultivo de células en suspensión. El cultivo de callos (CC) es uno de los más

utilizados para regenerar plantas o bien para producir compuestos bioactivos a través de la implementación de cultivos de células en suspensión (CCS). El CCS ofrece diversas ventajas para la producción de compuestos bioactivos, entre las que destacan la capacidad de establecer un proceso de producción continua con altos rendimientos, además de ser un proceso biológico simple y rentable para la síntesis a gran escala en biorreactores.

Ageratina pichichensis comúnmente conocida como “Axihuitl” es una de las especies más utilizadas en la medicina tradicional mexicana para tratar infecciones cutáneas, heridas, indigestión y gastritis, usos que han sido avalados mediante diversos estudios científicos que han demostrado que posee propiedades antimicrobianas antifúngicas, antiinflamatorias, antiulcerosas y cicatrizante. Debido a estas actividades farmacológicas se han realizado ensayos clínicos que han demostrado su eficiencia en el tratamiento de onicomosis, úlceras crónicas en piernas, úlceras del pie diabético y candidiasis vulvovaginal.

Teniendo como motivación principal, la producción de compuestos bioactivos a partir de cultivo de tejidos vegetales como CC y CCS, el presente trabajo se divide en 2 capítulos. El primer capítulo consta de la fase experimental en la cual se presenta la producción de compuestos fenólicos en la planta silvestre (PS) vs cultivos *in vitro*; planta *in vitro* (PI), CC y CCS de *A. pichichensis*, la identificación, cuantificación y evaluación de su actividad antioxidante, enfatizando las ventajas que éstos ofrecen respecto a la producción en plantas silvestres. En el segundo capítulo se presenta un resumen de la revisión bibliográfica, que engloba, las consideraciones de ingeniería para la producción de compuestos bioactivos a partir de cultivos en suspensión de células vegetales en biorreactores.

ABSTRACT

Plants have been used from prehistoric times to the present day to treat and cure various conditions and diseases. The World Health Organization (WHO) has called them a "Traditional Medicine System", thanks to the production of bioactive compounds known as plant-derived secondary metabolites (PDSM). PDSM have been classified according to their chemical structure into nitrogen compounds, terpenes, sulphur containing compounds and phenolic compounds.

Phenolic compounds are one of the most abundant PDSM in plants and have been reported to have diverse biological activities such as antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory agents. In addition to their use as adjuvants in the treatment of diseases such as obesity, cancer, and diabetes.

The production of PDSM from wild plants, i.e. plants growing under natural conditions and without the intervention of controlled cultivation, represents a major challenge to ensure the availability and sustainable production of these bioactive compounds due to drawbacks such as the requirement long cultivation times to reach the appropriate stage of plant maturity to maximize the synthesis of these compounds, coupled with the lack of control over the environmental conditions that allow the viability of the plants and the low extraction yields obtained from the different tissues of the plant. The practice of such uncontrolled processes may require large quantities of plant material to maintain a continuous production to meet the demand for such bioactive compounds, leading to overexploitation and species extinction. One of the alternatives to these problems is the use of biotechnological technologies such as plant tissue culture (PTC), which offers significant advantages such as the continuous production of MSDP under controlled environmental conditions, with minimal water requirements and without the need to use pesticides and herbicides, achieving a better quality of the desired product.

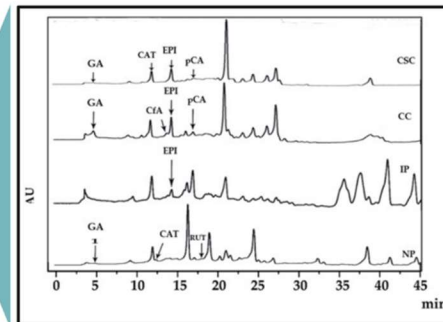
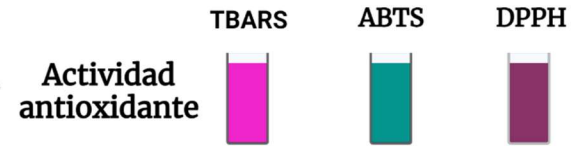
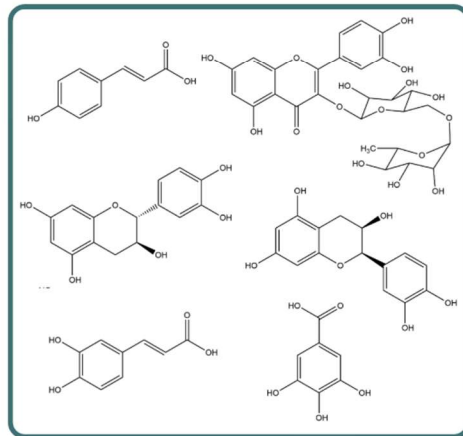
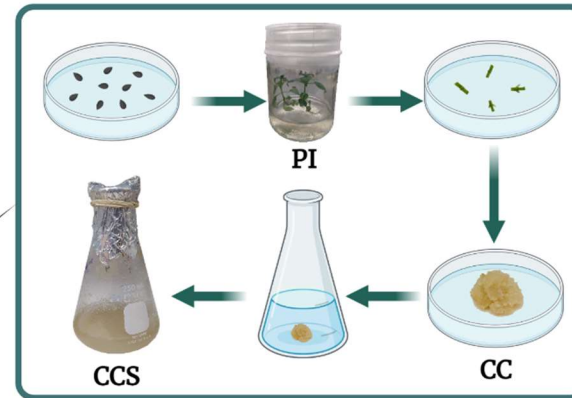
There are several types of PTC, including the production of embryos, roots, shoots, callus, and suspension cell culture. Callus culture (CC) is one of the most widely used to regenerate plants or to produce bioactive compounds through the implementation of cell suspension culture (CSC). CCS offers several advantages to produce bioactive compounds, including

the ability to establish a continuous production process with high yields, as well as being a simple and cost-effective biological process for large-scale synthesis in bioreactors.

Ageratina pichichensis, commonly known as "Axihuitl", is one of the most widely used species in traditional Mexican medicine for the treatment of skin infections, wounds, indigestion, and gastritis, uses that have been supported by several scientific studies that have shown that it has antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, anti-ulcer, and healing properties. As a result of these pharmacological activities, clinical trials have demonstrated its efficacy in the treatment of onychomycosis, chronic leg ulcers, diabetic foot ulcers and vulvovaginal candidiasis.

Having as main motivation the production of bioactive compounds from plant tissue culture as CC and CSC, the present work is divided into 2 chapters. The first chapter consists of the experimental phase in which the production of phenolic compounds in wild plant (WP) vs. *in vitro* cultures; *in vitro* plant (IP), CC and CSC of *A. pichichensis*, the identification, quantification and evaluation of their antioxidant activity are presented, emphasizing the advantages that these represent compared to the production in wild plants. The second chapter presents a summary of the literature review, including engineering considerations to produce bioactive compounds from plant cell suspension cultures in bioreactors.

CAPÍTULO I



Identificación
HPLC
CG-MS

1. Introducción

La obtención de MSDP a través de las plantas silvestres presenta diversas desventajas como tiempos de cultivo largos, condiciones ambientales no controladas y rendimientos bajos (<1% peso seco) que llevan a utilizar grandes cantidades de material vegetal, resultando en la sobreexplotación y extinción de especies [1,2]. Como solución a dicha problemática, surge el cultivo de tejidos vegetales (CTV), técnica que consiste en aislar plantas enteras, órganos, tejidos o células, a las cuales se suministra los nutrientes necesarios para su crecimiento y son cultivados bajo condiciones asépticas y condiciones ambientales artificiales. El CTV permite la producción continua bajo condiciones controladas, es decir, bajo condiciones constantes sin depender de la temporalidad o estacionalidad, contrario a lo que ocurre en la producción de plantas silvestres, además de requerir una cantidad menor de insumos para su crecimiento, incluyendo el consumo de agua de riego, eliminando la necesidad de utilizar pesticidas y herbicidas, logrando una mejor calidad, homogeneidad y rendimiento del producto deseado. Existen diversos tipos de CTV, el cultivo de callos (CC) es uno de los más utilizados cuya principal función se centra en la regeneración de plantas a través de su micropropagación, o bien para la obtención de MSDP a través del establecimiento de cultivo de células en suspensión (CCS). El CCS ha sido reportado como el CTV más rentable para la producción continua de MSDP, ya que ofrece altos rendimientos y un gran potencial para la producción de compuestos bioactivos a gran escala [3–5].

Entre los MSDP más abundantes en las plantas se encuentran los compuestos fenólicos reportados con diversas actividades biológicas como agentes antimicrobianos, anticancerígenos, antiinflamatorios y antioxidantes. Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son las más buscadas y destacadas, debido a su capacidad para estabilizar a los radicales libres, impidiendo su acción en el desarrollo de múltiples trastornos agudos y crónicos como la diátesis, aterosclerosis, envejecimiento, inmunosupresión y neurodegeneración [6,7].

La familia Asteraceae constituye el grupo vegetal más diverso de las plantas vasculares y comprende más de 1600 géneros que incluyen entre 24 000 y 30 000 especies distribuidas por todo el mundo [8]. Entre los géneros más estudiados de la familia Asteraceae se encuentra *Ageratina ps. Ageratina pichichensis* mejor conocida como *Axihuilt*, es una planta nativa de

México y endémica de América, utilizada especialmente en la medicina tradicional mexicana para tratar diversas infecciones cutáneas, heridas, indigestión, gastritis, entre otros padecimientos. Debido a esto, diversos grupos de investigación se han enfocado en su estudio fitoquímico y clínico, demostrando la producción de diversos MSDP con diversas actividades biológicas. Por otro lado, se han obtenido cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* capaces de producir compuestos con actividad antiinflamatoria. Cabe mencionar que la mayoría de los reportes de cultivos *in vitro* de esta planta se asocian al uso de fases no polares para la extracción de los compuestos bioactivos, sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la producción de compuestos fenólicos y la evaluación de su actividad antioxidante [9,10].

Por lo que, en este capítulo se presenta el establecimiento de cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* como planta *in vitro* (PI), CC y CCS obtenidos a partir de ejemplares de planta silvestre (PS), con el objetivo de potenciar la producción de compuesto fenólicos y la evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 *Plantas medicinales*

De acuerdo con una lista realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a finales de los años setenta, el registro de plantas medicinales contaba con 21, 000 especies; en la actualidad del total de especies de plantas que hay en la Tierra (422,000-500,000) cerca de 80,000 especies son utilizadas con fines medicinales y se estima que entre 70 % y 85% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria. Pese a la importancia de las plantas medicinales sólo entre 1 y 10 % del total han sido estudiadas química y farmacológicamente [11–13].

2.2 *Metabolitos secundarios en plantas.*

El potencial medicinal de las plantas es atribuido a la producción de compuestos bioactivos denominados como metabolitos secundarios derivados de plantas (MSDP). Los MSDP son compuestos orgánicos cuya acción no es fundamental en las rutas fisiológicas primarias de crecimiento y desarrollo, es decir, no influyen en aspectos como la respiración, asimilación y transporte [14]. Se sintetizan en pequeñas cantidades a partir del metabolismo primario y juegan un papel importante en la defensa a estrés biótico y abiótico. Pueden actuar de diferentes formas, por ejemplo, como agentes atrayentes o repelentes de animales e insectos, proporcionando a la planta sabores amargos o lechosos, haciéndolas indigestas o venenosas [15,16].

Se estima que en la actualidad se conocen entre 200,000 y 1 millón de MSDP producidos por diversas plantas, los cuales se han clasificado principalmente en compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, terpenos y compuestos que contienen azufre (Imagen 1.1). La gran variedad estructural de los MSDP se debe a reacciones químicas clave tales como la glicosilación, acilación, metilación, epoxidación, hidroxilación, esterificación y prenilación [16,17]. De acuerdo con diversos estudios científicos, los MSDP pueden presentar diversas actividades biológicas al actuar como analgésicos, antitusígenos, antihipertensivos, cardiotónicos, antineoplásicos, antimaláricos, antioxidantes, antisépticos, diuréticos, estimulantes del sistema nervioso, sedante, expectorante, digestivo, etc. [12]. Debido a lo anterior, en la actualidad casi el 25% de los medicamentos modernos como la aspirina,

atropina, camptotecina, codeína, digoxina, diospirina, morfina, paclitaxel, pilocarpina, podofilotoxina, reserpina, topotecán, vinblastina y vincristina se obtienen o derivan de fuentes naturales.

METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

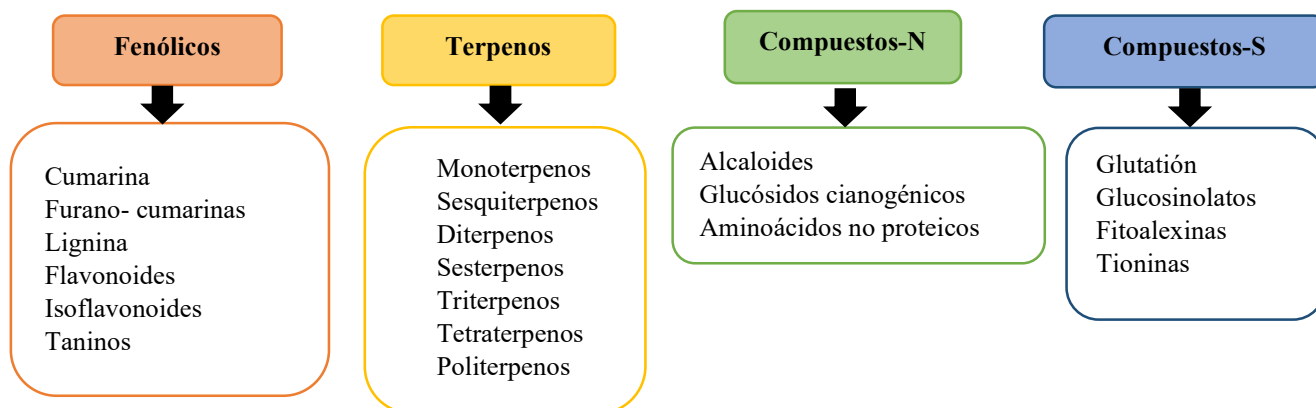


Imagen 1.1 Tipos de metabolitos secundarios derivados de las plantas (MSDP).

2.3 Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

El CTV se define como el proceso mediante el cual se aíslan plantas enteras, órganos, tejidos o células, suministrando los nutrientes necesarios para su crecimiento, siendo cultivadas bajo condiciones asépticas y condiciones ambientales controladas. El establecimiento de diferentes tipos de CTV tiene como objetivo la regeneración de órganos o embriones somáticos para la propagación de plantas, eliminación de virus, manipulación genética, almacenamiento de germoplasma y la producción de MSDP. La producción de MSDP mediante CTV presenta diversas ventajas, como la producción continua sin la dependencia de la temporalidad y estacionalidad, no requiere el uso de pesticidas y herbicidas, dando como resultado una mejor calidad en el producto deseado [7,18]. Existen diversos tipos de CTV, los cuales incluyen la obtención de embriones, raíces, brotes, callos y cultivo de células en suspensión [19]

2.3.1 Cultivo de callos y células en suspensión

El CCS es uno de los CTV más utilizados para la producción de MSDP. La obtención de CCS se constituye de una serie de pasos que se muestran en la imagen 1.2, el éxito depende de la inducción y obtención de callo friable (etapa 3). Para la obtención de CC se parte de explantes extraídos de los diferentes órganos de la planta mediante la exposición a reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico) principalmente auxinas y citoquininas que, de acuerdo con diversos estudios, la combinación de estas favorece la producción de una masa amorfa de células desdiferenciadas normalmente en forma de aglomerados [18–21], las cuales pueden ser utilizadas para el establecimiento del CCS (etapa 4), proceso que comprende la disgregación y mantenimiento en medio líquido [7,22]. Aunque existen diversos estudios en los cuales se obtienen compuestos bioactivos a partir de cultivo de tejidos diferenciados y callos, en la mayoría de los casos se prefiere el CCS, ya que permite la producción continua con homogeneidad en rendimientos y calidad, además de ser un método rentable para la producción a gran escala en biorreactores.

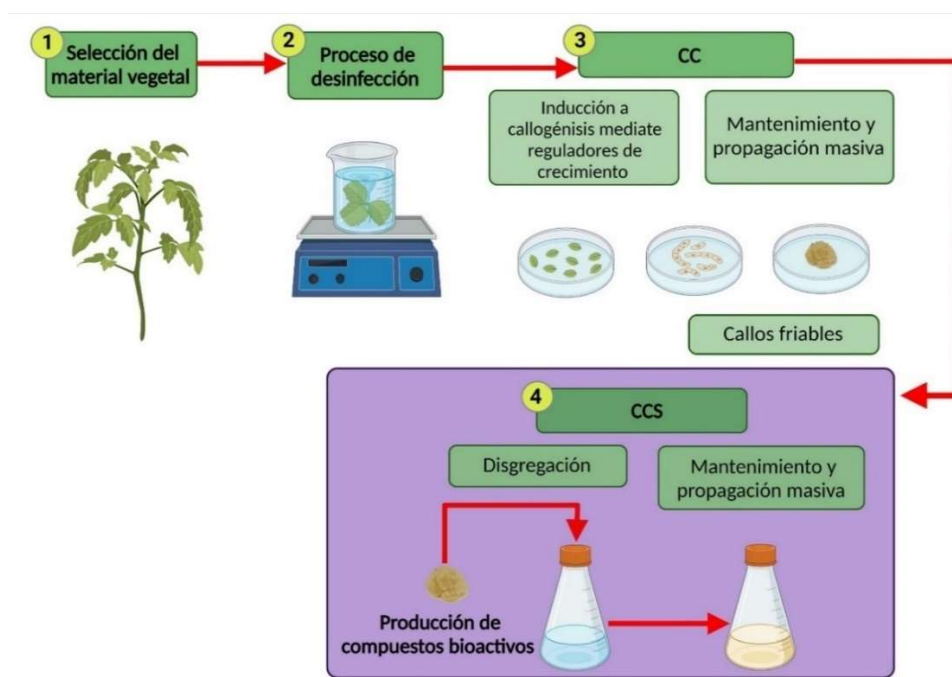


Imagen 1.2. Etapas generales para la obtención de cultivo de células en suspensión (CCS). Cultivo de callo (CC). Esquema modificado de [7].

2.4 Producción de compuestos bioactivos en plantas silvestre VS in vitro

El CCS ha demostrado ser una herramienta que ha permitido obtener compuestos bioactivos de alto valor agregado como el paclitaxel (Taxol®), resveratrol y ginsenósidos. En la Tabla 1.1, se muestran ejemplos de la obtención de compuestos bioactivos con relevancia farmacología obtenidos a partir de CC y CCS.

Tabla 1.1. Obtención de compuestos bioactivos con relevancia farmacología obtenidos a partir de planta silvestre VS planta in vitro. Modificada de [7].

| Compuesto | Especies de plantas | Actividad biológica/uso farmacéutico | Rendimiento de extracción | | Tipo de cultivo |
|-------------------|--|--|---------------------------|-------------------------|-----------------|
| | | | Planta silvestre | Cultivo <i>in vitro</i> | |
| Shikonina | <i>Lithospermum erythrorhizon</i> <i>Alkanna tinctoria</i> <i>Tausch</i> | Anticancer, antibacterial, anti-inflamatorio, atenuador de la esteatosis hepática, antitumor y antioxidantes | 10-20 mg/g | 150-200 mg/g | CCS |
| Anthraquinonas | <i>Rubia cordifolia</i> | Antimicrobial, antifúngica, funciones hipotensoras, analgésicas, antipalúdicas, gastroprotectoras, antioxidantes, hepatoprotectoras y antileucémicas y mutagénicas | 3 mg/g | 100-200 mg/g | CC |
| | <i>Senna obtusifolia</i> | | | | CCS |
| Ácido rosmarínico | <i>Ocimum basilicum</i> | Antioxidante, anti-inflamatoria, antivirales | 8.78 mg/g | 15.73 mg/g-21.28 mg/g | CCS |
| | <i>Origanum vulgare</i> | | 9.4 mg/g | 12.32 mg/g | CCS |
| | <i>Satureja khuzistanica</i> | | 23.53 mg/g | 31.25 mg/g | CCS |
| | <i>Coleus blumei</i> | | 12 mg/g | 38 mg/g | CCS |
| | <i>Salvia officinalis</i> | | 30 mg/g | 270 mg/g | CCS |
| Berberina | <i>Thalictrum minus</i> | Efectos antitumorales, anticancerígenos, hipolipemiantes, hipoglucemiantes, antiosteoporosis, antiartrosis, antibióticos y anti-inflamatorios. | 0.1 mg/g | 0.8 g/L | CCS |
| | <i>Coptis japonica</i> | | 20-40 mg/g | 132 mg/g | CCS |
| | <i>Cosciniun fenestratum</i> | | 1 mg/g | 17.8 | CCS |
| Ginsenósidos | <i>Panax ginseng</i> | Antitumoral, inmunológico, anti-inflamatorio, anticancerígeno, antidiabético y protector cardiovascular. | 0.015- 8 mg/g | 3.4-28.9 mg/g | CCS |
| | <i>Panax japonicus</i> | | | 20-50 mg/g | CCS |
| | <i>Panax notoginseng</i> | | | 60 mg/g | CCS |
| | | | | 40 mg/g | CCS |

Tabla 1.1. Continuación

| Compuesto | Especies de plantas | Actividad biológica/uso farmacéutico | Rendimiento de extracción | | Tipo de cultivo |
|---|----------------------------|--|---------------------------|-------------------------|-----------------|
| | | | Planta silvestre | Cultivo <i>in vitro</i> | |
| Diosgenin | <i>Dioscorea deltoidea</i> | Anticancerígeno, antidiabético, anticoagulante, antitrombótico, anti-inflamatorio, antivírico, antienvjecimiento | 0.4 -3 mg/g | 72 mg/g | CCS |
| | <i>Dioscorea bulbifera</i> | | | 3.5-16 mg/g | CC |
| | <i>Helicteres isora L.</i> | | 12 mg/g | CC | |
| | | | 8.64 mg/L | CCS | |
| Ajmalicina | <i>Catharanthus roseus</i> | Antihipertensivos, tratamiento de enfermedades circulatorias obstructivas | 3 mg/g | 23 mg/g | CC |
| | | | | 63 mg/L | CC |
| | | | | 10 mg/g | CCS |
| Paclitaxel | <i>Taxus chinensis</i> | Anticancerígeno | 0.02 mg/g | 1.5 mg/g | CCS |
| Podophyllotoxin | <i>Linum narbonense</i> | Gran actividad antimitótica, antivírica y anticancerígena | 0.025 mg/g | 0.5 mg/g | CC |
| | <i>Juniperus chinensi</i> | | | 189.91 mg/g | CCS |
| | <i>Linum flavum</i> | | | 2 mg/g | CCS |
| Artemisina | <i>Artemisia annua L</i> | Tratar las cepas de paludismo falciparum multirresistentes | 1-15 mg/g | 9.33- 110.2 mg/L | CCS |
| Ácidos fenólicos (Rosmarínico, Clorogénico y ferúlico) | <i>Verbena officinalis</i> | Agente antimicrobiano, secretolítico, expectorante y diurético | 136.59 mg/g | 126.55 mg/g | CC |
| | | | | 189.91 mg/g | CCS |

2.5 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae constituye el grupo vegetal más diverso de las plantas vasculares y comprende más de 1600 géneros que incluyen entre 24 000 y 30 000 especies distribuidas por todo el mundo. La mayoría de sus miembros tienen aplicaciones terapéuticas y cuentan con una larga historia en la medicina tradicional [8].

Entre los géneros más estudiados de la familia Asteraceae se encuentra *Ageratina*, comprende cerca de 1200 especies distribuidas en regiones templadas y subtropicales de América, Europa, África y Asia, en el caso particular de México se cuenta con el registro de 417 géneros y 3,113 especies de Asteraceae, de las cuales 3,050 son especies nativas y 1,988 son endémicas del territorio nacional [23].

2.5.1 *Ageratina pichihensis*

Ageratina pichinchensis es una especie perteneciente a la familia Asteraceae, endémica de América y originaria de México. Se describe como un arbusto de hasta 1.5 metros de altura, tallo erguido muy ramificado, cilíndrico, café amarillento, a veces rojizo (Imagen 1.3) [9]. Esta planta ha sido utilizada especialmente en la medicina tradicional mexicana para tratar infecciones cutáneas, heridas, indigestión y gastritis, lo que ha llamado la atención de diversos investigadores que se han enfocado a su estudio fitoquímico y clínico, demostrando la producción de MeSec (metabolitos secundarios) con diversas actividades biológicas [10].



Imagen 1.3. Planta de Ageratina pichichensis creciendo en condiciones naturales.

2.5.2 MSDP obtenidos de *A. pichichensis*

Entre los metabolitos secundarios identificados en extractos de las partes aéreas de *A. pichichensis*, se encuentran principalmente benzocromenos, benzofuranos, terpenos y compuestos fenólicos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Metabolitos secundarios obtenidos de *A. pichichensis*.

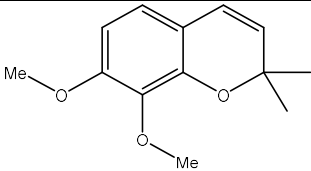
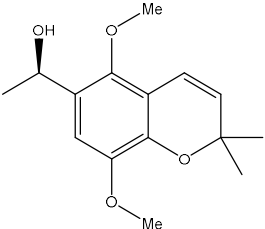
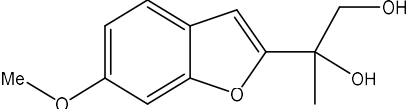
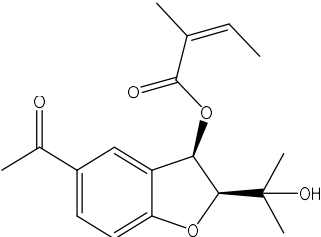
| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|---------------|-------------|--|---|------------|
| Cromeno | 1 | Eupatoriocromeno A |  B | [24] |
| | 2 | Eupatoriocromeno B |  C | |
| Dibenzofurano | 3 | Dibenzofurano |  | [25] |
| | 4 | 5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisipropil)-2,3-dihidrobenzofurano |  | |

Tabla 1.2. Continuación

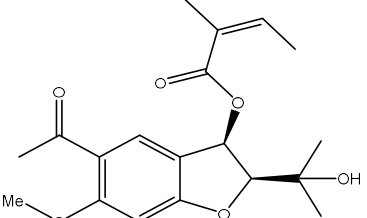
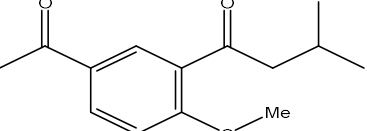
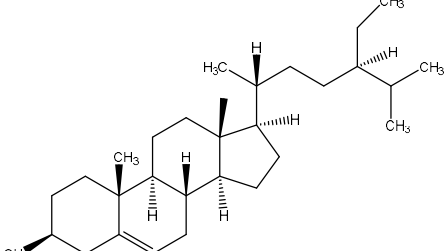
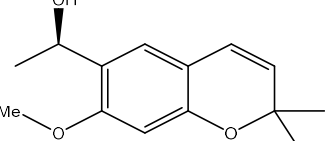
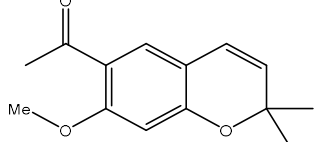
| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|-----------------------|-------------|---|---|------------|
| Dibenzofurano | 5 | 5-acetil-3 β -angeloiloxi-2 β (hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3- dihidrobenzofurano |  | [25,26] |
| Precursor de cromenos | 6 | Espeletona |  | |
| Esterol | 7 | β -Sitosterol |  | [25] |
| Cromeno | 8 | Encecalinol |  | [25,27] |
| | 9 | Encecalina |  | [26,27] |

Tabla 1.2. Continuación

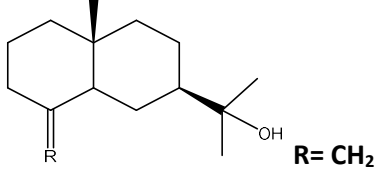
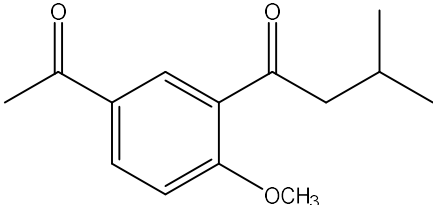
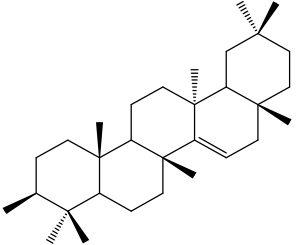
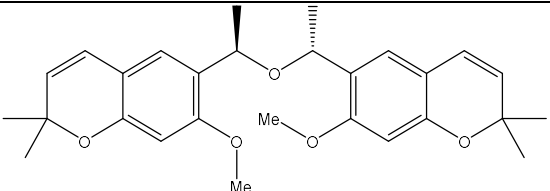
| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|----------------|-------------|-----------------------------|---|------------|
| Sesquiterpenos | 10 | (+)- β -eudesmol |  <p>R = CH₂</p> | [26,27] |
| | 9 | Dos derivados del compuesto | <p>R = C₄-C₁₅ epóxido R = O</p> | |
| Triterpeno | 11 | Espeletona |  | [27,28] |
| | 12 | Taraxerol |  | |
| Cromeno | 13 | Encecanescina |  | |

Tabla 1.2. Continuación

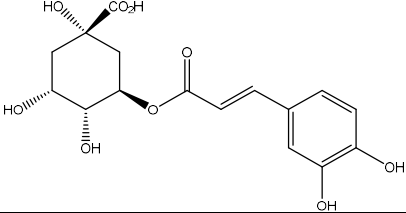
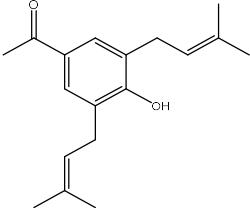
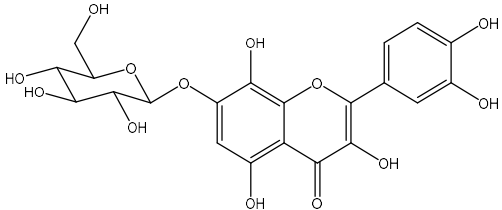
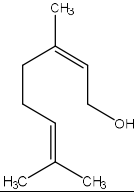
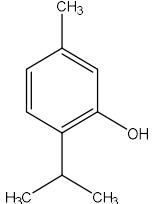
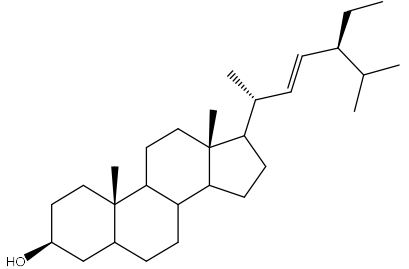
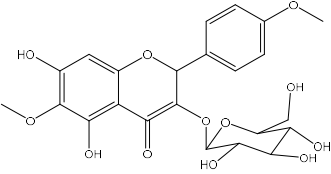
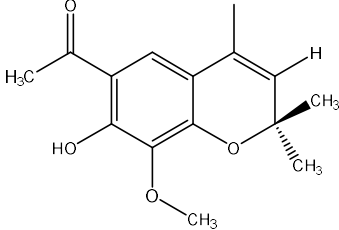
| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|------------------------|-------------|------------------------------------|---|------------|
| Fenol | 14 | Ácido clorogénico |  | [29] |
| Acetofenona | 15 | 3, 5-diprenil-4-hidroxiacetofenona |  | [26,30] |
| Flavonoide glucosilado | 16 | 7-O-(β-D-glucopiranosil)-galactina |  | [29] |
| Terpenos | 17 | Nerol |  | [31] |
| Fenol/terpeno | 18 | Timol |  | |

Tabla 1.2. Continuación

| | Nº de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|-----------------------|-------------|-----------------------|------------|------------|
| Cromenos | 19 | O-metilencecalinol | | [26][32] |
| | 20 | 7-hidroxiencalinalina | | |
| | 21 | 8-hidroxiencalinalina | | |
| Precursor de cromenos | 22 | Dehidroespeletona | | |

Tabla 1.2. Continuación

| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|---------------|-------------|--|--|------------|
| Esterol | 23 | Estigmasterol |  | [25,26] |
| Flavonoide | 24 | 3-β-D-Glucopiranosil-5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavonol |  | [33] |
| Cromeno | 25 | 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetil-8-metoxi-2H-1-cromeno |  | |

2.5.3 Actividad biológica de los metabolitos secundarios reportados para *A. pichichensis*

Las actividades biológicas de los metabolitos secundarios reportados para *A. pichichensis*, son diversas [34] reportaron actividad antifúngica contra dermatofitos (*Trychophyton mentagrophytes* y *Trychophyton rubrum*) y no dermatofitos (*Aspergillus niger*) de los extractos obtenidos de partes aéreas de *A. pichinchensis* mediante extracción secuencial con n-hexano-metanol, a la par Ríos *et al.*, [25], identificaron y aislaron los compuestos 4-8 (sección 1.3) en extracto hexánico y reportaron la inhibición de dermatofitos *T. mentagrophytes* en concentraciones de 200 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL y de *T. rubrum* en concentraciones de 100 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL de los compuestos 4, 5 y 6 respectivamente, el compuesto 8 fue capaz de inhibir ambos dermatofitos en una concentración de 12.5 µg/mL además de presentar actividad contra *Candida albicans* (100 µg/mL) y *A. niger* (200 µg/mL).

Debido a las propiedades antifúngicas mencionadas anteriormente, Romero-Cerecero *et al.*, [35], llevaron a cabo un estudio para evaluar el efecto clínico y micológico del extracto hexánico (estandarizado al 10%) de las partes aéreas, como fármaco control utilizaron ketoconazol (2%), el extracto aplicado de manera tópica en forma de crema fue capaz de reducir considerablemente (80.3 % de efectividad) la micosis generada por el pie de atleta superando al control (76 % de efectividad). El compuesto mayoritario en el extracto fue enecalinol (8). En el 2008 el mismo grupo de trabajo [36] llevo a cabo un estudio clínico con una formulación fitofarmacéutica que contenía el extracto de *A. pichinchensis* en laca, utilizando como control una formulación con el farmaco ciclopirox, formulaciones que se probaron en pacientes diagnosticados con onicomiosis ligera a moderada, los resultados mostraron efectividad y tolerabilidad tópica del 71.1% y 80.9% del extracto y control, respectivamente. Aguilar-Guadarrama *et al.*, [27], reportaron a los compuestos 9, 10 y 12 responsables de la inhibición de hongos dermatofitos (*T. mentagrophytes* y *T. rubrum*) y no dermatofitos (*C. albicans* y *A. niger*).

Por otro lado, el uso para la gastritis que se le ha dado a *A. pichichensis*, también ha sido demostrado en extracto hexánico de las partes aéreas, Sánchez-Mendoza *et al.*, [28], llevaron a cabo un modelo experimental de úlcera gástrica inducida por etanol en ratas, el extracto

hexánico presento una actividad protectora del $85.6 \pm 4.76 \%$, el compuesto 13 fue el responsable de dicho efecto a nivel extracto. En el mismo grupo de investigación [30], identificaron el compuesto 15 y demostraron su efecto gastroprotector, la inhibición alcanzada de dicho compuesto fue de 75.56% , además presento efecto anti-inflamatorio y inhibición del dolor neuropático del 72.6% y 57.1% , respectivamente.

Finalmente la actividad cicatrizante ha sido evaluada por Romero-Cerecero *et al.*, [37], mediante extracto acuoso de las partes aéreas de *A. pichinchensis*, en un modelo *in vivo* en ratas, obteniendo una eficiencia significativa en acelerar la cicatrización de las heridas sin presentar efectos irritantes en la piel, además de promover la proliferación celular en la línea de cáncer MRC-5, un año mas tarde [38] realizaron un estudio clínico en pacientes con úlceras crónicas en piernas, teniendo como control alginato de popilenglicol, el extracto mostro efectividad terapéutica en el 100% de los pacientes mientras que el tratamiento control el 81.8% , sin presentar efectos irritantes en comparación con el control (7%). En la búsqueda de aislar y identificar los compuestos activos responsables de promover la proliferación celular y acelerar la cicatrización, Romero- Cerecero *et al.*, [29], realizaron un estudio en un modelo *in vivo* en ratas, identificando al compuesto 16 (7-O-(β -D-glucopiranosil)-galactina) como el responsable de dicha actividad. Años mas tarde, el mismo grupo de trabajo [39] realizó un estudio clínico con extracto estandarizado con enecalina (9) en pacientes con candidiasis vulvovaginal, obteniendo el 100% de efectividad.

2.5.4 Metabolitos secundarios a partir del cultivo *in vitro* de *Ageratina pichinchensis*.

Como se mencionó anteriormente, el CTV es una alternativa amigable con el medioambiente para la obtención de metabolitos secundarios con actividad biológica. [26,32], establecieron el primer cultivo *in vitro* CC y CCS a partir de explantes de hoja de *A. pichinchensis*. En este estudio, se identificaron 9 compuestos en ambos cultivos que la planta silvestre no produce (Tabla 1.3) de los cuales el compuesto 28 y 30 (uno de tipo benzofurano y un triterpeno) presentaron importante efecto anti-inflamatorio, además el benzofurano (28) presentó efecto cicatrizante.

Tabla 1.3. Metabolitos secundarios identificados a partir del cultivo in vitro de *Ageratina pichinchensis*.

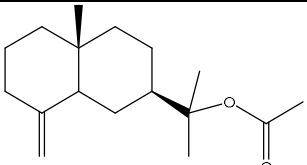
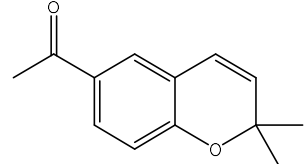
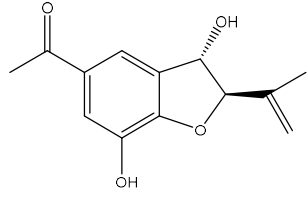
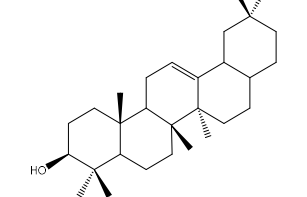
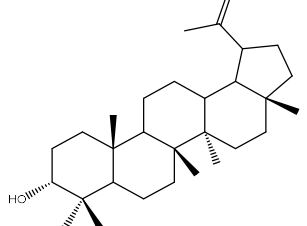
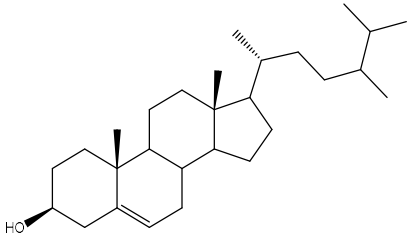
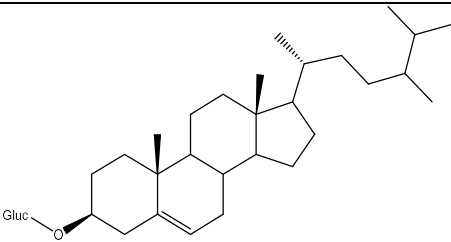
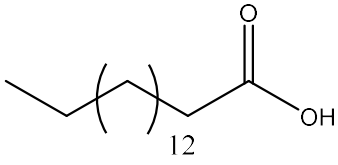
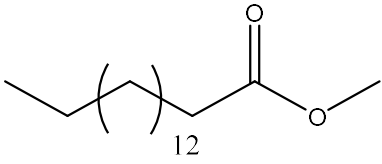
| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|---------------|-------------|--|---|------------|
| Sesquiterpeno | 26 | Acetato de β -eudesmol |  | [26,32] |
| Cromeno | 27 | Desmetoxiencecalina |  | |
| Benzofurano | 28 | 5-acetil-7,3 α -dihidroxi-2 β -(1-isopren)-2,3-dihidrobenzofurano |  | |
| Triterpenos | 29 | β -amyrin |  | |
| | 30 | 3-epilupeol |  | |

Tabla 1.3. Continuación

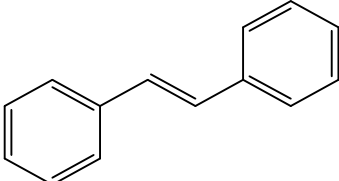
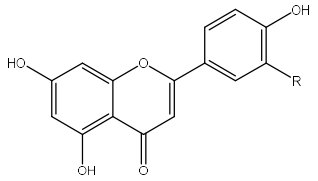
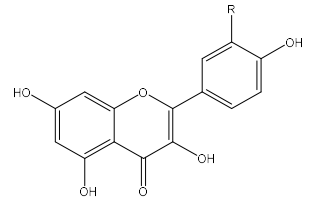
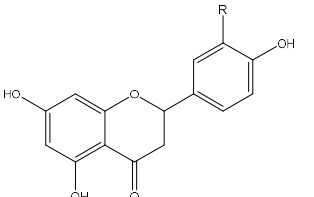
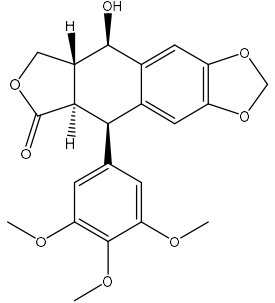
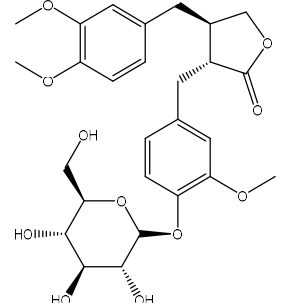
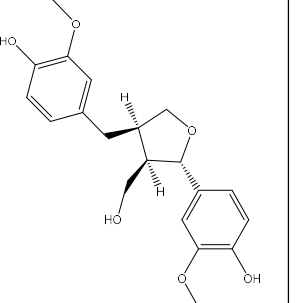
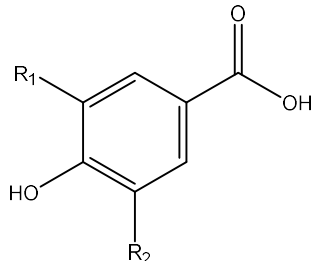
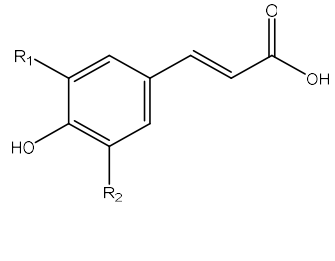
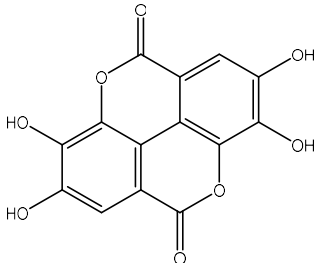
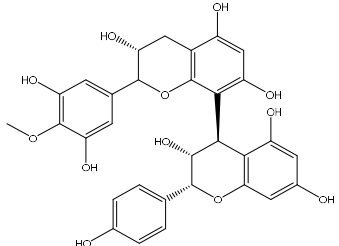
| Tipo de MeSec | N° de MeSec | MeSec | Estructura | Referencia |
|---------------|-------------|---------------------------------|---|------------|
| Esteroles | 31 | Campesterol |  | [32] |
| | 31 | Glucósido de Estigmasterol |  | |
| Ácidos grasos | 33 | n-hexadecanoic acid |  | |
| | 34 | hexadecanoic acid, methyl ester |  | |

2.6 Compuestos fenólicos

Uno de los grupos fitoquímicos más abundantes en las plantas, son los fenoles, MSDP que desempeñan papeles importantes en diversos procesos fisiológicos como atracción de polinizadores, la coloración, el sabor, funciones estructurales, protección contra la radiación ultravioleta (UV) y la defensa contra la invasión microbiana y los herbívoros. La estructura química de estos compuestos se caracteriza por tener un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, pueden dividirse en varias clases, cómo; flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, lignanos, antroquinonas y ácidos hidroxicinámicos [6,10,40]. En las plantas, cerca de 8,000 moléculas han sido identificadas, según su estructura se clasifican principalmente en flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanos y estilbenos (Tabla 1.4).

Los compuestos fenólicos se han convertido en el foco de atención de los científicos debido a que presentan diversas actividades biológicas cómo; antioxidantes, antimicrobianos y anti-inflamatorios naturales, así como en el tratamiento de enfermedades como la obesidad, el cáncer y la diabetes. La actividad antioxidante es una de las actividades que destacan de estos compuestos.

Tabla 1.4. Clasificación de compuestos fenólicos reportados en plantas.

| ESTILBENOS | | | FLAVONOIDES | | |
|---|--|--|---|---|--|
|  | | | Flavonas  | Flavonoles  | Flavononas  |
| LIGNANOS | | | ÁCIDOS FENÓLICOS | | |
|  <p>Podofiloxina</p> |  <p>Arctina</p> |  <p>Lariciresinol</p> | Ácidos hidroxibenzoicos  | Ácidos hidroxicinámicos  | |
| TANINOS | | | | | |
| Taninos hidrolizables  | | | Taninos condensados  | | |

2.7 Actividad antioxidante

2.7.1 Antioxidantes

Las células se encuentran continuamente amenazadas por los daños causados por especies reactivas de oxígeno (EROs), producidas durante el metabolismo fisiológico del O₂. En concentraciones bajas y moderadas, son moléculas de señalización que intervienen en la respuesta mitogénica o en la defensa frente a agentes infecciosos. Los EROs son el grupo de radicales libres (átomos, moléculas o iones con electrones no apareados, muy inestables) más abundantes en los tejidos humanos, sin embargo, no son los únicos, el segundo grupo más abundante son las especies reactivas de nitrógeno (ERN) [41]. El cuerpo humano posee un complejo sistema de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas que contrarrestan los efectos nocivos de los radicales libres y otros oxidantes, sin embargo, la producción excesiva de radicales libres o su eliminación ineficaz conducen al estrés oxidativo, el cual desempeña, un papel definitivo en una amplia variedad de manifestaciones patológicas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neuronales, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Parkinson, enfermedad hepática inducida por el alcohol, envejecimiento y aterosclerosis [42,43]. La protección contra los radicales libres puede mejorarse a través del consumo de antioxidantes, moléculas capaces de inhibir la oxidación de otras moléculas, mediante la inhibición o eliminación de radicales libres. En las últimas décadas, ha crecido el interés por el estudio de antioxidantes en la protección de organismos o tejidos, o de sistemas no vivos contra el estrés oxidativo. Esta afirmación está respaldada por estudios realizados en diversas áreas, incluyendo fisiología, farmacología, nutrición e incluso procesamiento de alimentos [44].

2.7.2 Evaluación de la capacidad antioxidante

La eficiencia de los antioxidantes depende de una serie de factores, como sus características estructurales, concentración, tipo de sustrato de oxidación, así como la presencia de prooxidantes y sinergistas. Se han introducido diferentes métodos *in vitro* (ensayos químicos) e *in vivo* (involucra organismos vivos) para medir e investigar la propiedad y la capacidad antioxidante de diversas muestras comerciales, (extractos de plantas, alimentos,

medicamentos, antioxidantes comerciales y muestras biológicas) [42,43,45,46]. Los métodos *in vitro* son fáciles de realizar, se obtienen resultados rápidos y se conocen bien los mecanismos implicados, mientras que, los métodos *in vivo* suelen ser complejos, tardados y no económicos, además de que presenta gran variación arrojando resultados difíciles de interpretar. Sin embargo, dan información sobre la actividad de un compuesto o extracto en un organismo vivo, pegándose más a la realidad. Pese a lo anterior, los métodos *in vitro* suelen utilizarse como primera instancia para la evaluación de la capacidad antioxidante. En general métodos *in vitro* basados en la eliminación de radicales libres, como DPPH- y ABTS, se encuentran entre los métodos espectrofotométricos más populares para determinar la capacidad antioxidante, por ser sencillos, rápidos y baratos en comparación con otros modelos de ensayo [43,45,47].

2.7.2.1 Ensayo de eliminación de DPPH

El ensayo de eliminación de radicales 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]) es uno de los métodos más utilizados ya que es fácil de realizar, económico, rápido, eficaz y ofrece la primera aproximación para evaluar la actividad antioxidante, además de que se encuentra disponible comercialmente. El radical DPPH se caracteriza por ser estable debido a la deslocalización del electrón sobrante sobre el conjunto de la molécula de modo que este no se dimeriza como ocurriría con la mayoría de los radicales, la solución recién preparada, presenta un color violeta intenso, con una absorbancia máxima a 517 nm. Cuando la solución del radical DPPH se mezcla con una molécula antioxidante, que puede donar un átomo de hidrógeno, los radicales son eliminados y la absorbancia se reduce dando lugar a la correspondiente hidracina amarillo pálido (DPPH-H) la forma reducida con la pérdida de este color violeta (Imagen 1.4) [45,48].

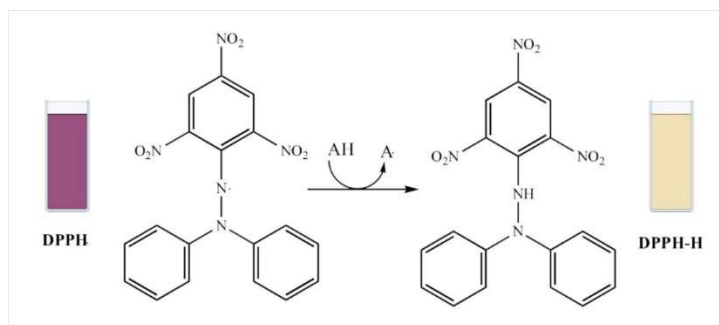


Imagen 1.4. Mecanismo de reacción de DPPH.

2.7.2.2 Ensayo de eliminación de $ABTS^{\bullet+}$

En este ensayo, el radical $ABTS^{\bullet+}$ es obtenido mediante la oxidación con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (Imagen 1.5 A), reacción que generalmente requiere 16 hrs. La solución obtenida presenta un color verde azulado intenso y tiene máximos de absorción en medios acuosos (414, 734 y 815 nm) y en medio etanólico (414, 730 y 873) [49]. Cuando la solución del radical $ABTS^{\bullet+}$ se mezcla con una molécula antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno o donador electrones, los radicales son eliminados y la absorbancia se reduce, esto puede visualizarse mediante la disminución del color (Imagen 1.5 B) [42]. Los tiempos de reacción oscilan entre 1 y 30 min Este método espectrofotométrico se ha empleado para medir la actividad antioxidante total de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas, tiene la ventaja que puede ser evaluado a un amplio intervalo de pH.

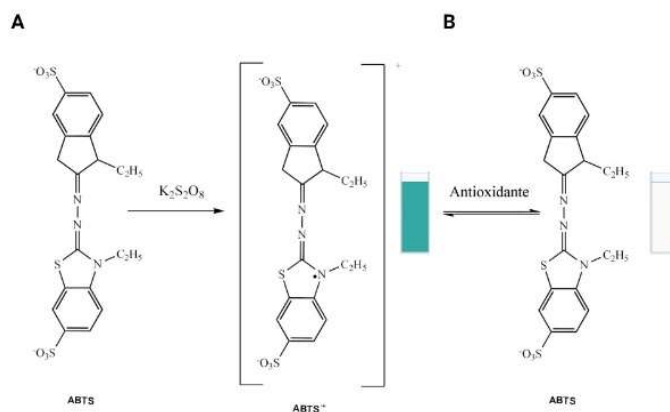


Imagen 1.5. Mecanismo de reacción de ABTS.

2.7.2.3 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS

El método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se ha empleado habitualmente para detectar y controlar la peroxidación lipídica, por su facilidad de aplicación y su bajo costo. En este ensayo, el malondialdehído (MDA) generado durante la degradación de lípidos insaturados reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en condiciones ácidas y temperaturas altas (100°C) para dar un producto cromogénico característico [MDA-(TBA)₂] de color rosa que se mide espectrofotométricamente a 532 nm, otros aldehídos generados simultáneamente durante la degradación de lípidos, también pueden reaccionar con TBA, por lo que se refiere a estos productos como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, las cuales se reducen en presencia de un antioxidante [42,43,47].

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos prehistóricos para el tratamiento de diversas enfermedades, éxito que ha sido gracias a la capacidad que presentan para producir compuestos bioactivos, mejor conocidos como metabolitos secundarios derivados de plantas (MSDP). Los compuestos fenólicos son uno de los MSDP más abundantes en las plantas los cuales se han convertido en el foco de atención de los científicos debido a que presentan diversas actividades biológicas entre las que destaca la actividad antioxidante implicada en una amplia variedad de manifestaciones patológicas. Obtener compuestos bioactivos a partir de las plantas creciendo bajo condiciones naturales, representa un reto, debido a los tiempos de cultivo largos, condiciones ambientales no controladas y rendimientos inferiores al 1% en peso seco de la planta, requiriéndose grandes cantidades de material vegetal, que con el tiempo conduce a la sobreexplotación y extinción de especies. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una alternativa biotecnológica para la obtención de compuestos bioactivos bajo condiciones controladas y de manera continua, dentro de estos los más utilizados son; CC y CCS, siendo este último preferible ya que además de permitir la producción continua, ha resultado ser un método rentable para la producción a gran escala en biorreactores.

Con base en lo anterior y partiendo del conocimiento que *A. pichichensis* es una planta medicinal que produce diversos MSDP entre los que destacan benzocromenos, benzofuranos y terpenos responsables de actividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatorias y cicatrizantes. Este estudio se enfocó al establecimiento de cultivos *in vitro* a partir de la planta silvestre con el objetivo de potenciar la producción de compuestos fenólicos y evaluar su posible actividad antioxidante, MSDP y actividad biológica que hasta el momento no ha sido reportada para esta especie.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* son capaces de producir compuestos fenólicos con actividad antioxidante en proporciones iguales o mayores a la planta silvestre.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de compuestos fenólicos en planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* y su actividad antioxidante.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* como planta (PI), cultivo de callos (CC) y cultivo de células en suspensión (CCS).
- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides en planta silvestre (PS) y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*
- Identificar compuestos fenólicos mediante métodos cromatográficos (*HPLC* y *CG-MS*)
- Determinar la actividad antioxidante mediante ensayos de *ABTS*, *DPPH* y *TBARS*
- Comparar la producción de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en planta silvestre (PS) y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, la estrategia experimental se dividió en tres etapas (Imagen 1.6):

Etapa 1. Obtención de cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*. A partir de semillas de la planta silvestre se obtuvieron plantas *in vitro* de las cuales, se extrajeron diferentes explantes para la inducción de callo mediante reguladores de crecimiento. Los callos obtenidos fueron disgregados en medio líquido para obtener el cultivo de células en suspensión.

Etapa 2. Cuantificación e identificación de compuestos bioactivos: con la finalidad de cuantificar mediante técnicas colorimétricas el contenido total de fenoles y flavonoides, se obtuvieron extractos metanólicos de la planta silvestre y de los cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*. Posterior a la cuantificación, se llevó a cabo la identificación de los compuestos bioactivos mediante HPLC y GS-MS. Finalmente se realizó un análisis cualitativo de los compuestos identificados mediante HPLC.

Etapa 3. Evaluación de actividades biológicas: con la finalidad de evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de la planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* mediante tres ensayos; DPPH, ABTS y TBARS.

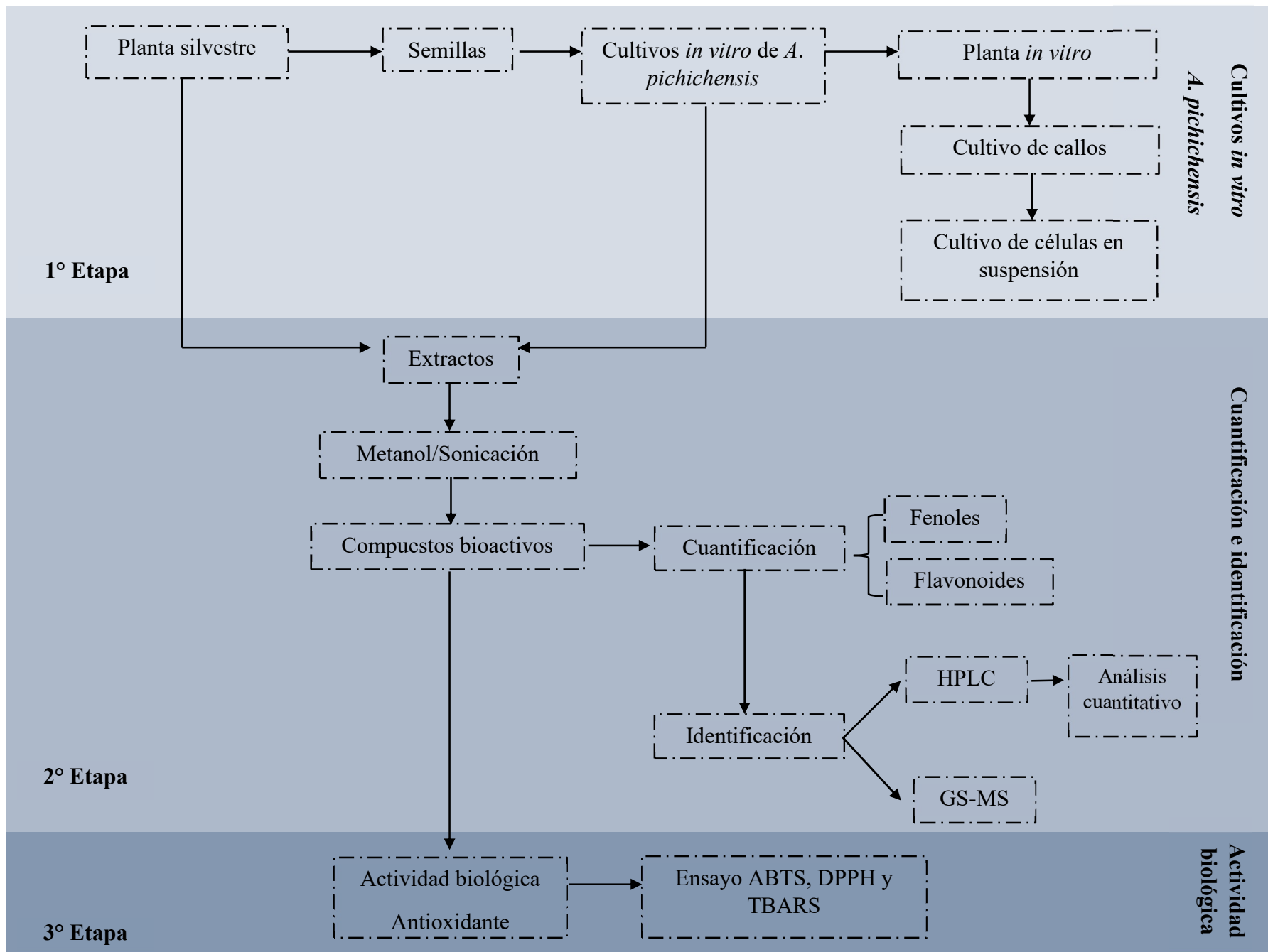


Imagen 1.6. Estrategia experimental seguida para cumplir los objetivos del capítulo I.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Establecimiento de cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*

Los cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* fueron establecidos a partir de la germinación de semillas obtenidas de la planta silvestre (Imagen 1.7 a). Las plantas *in vitro* resultantes de dos meses de edad (Imagen 1.7 b) se utilizaron para obtener cultivo de callos (CC) a partir de explantes de hoja, peciolo y segmento nodal, bajo la combinación de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, auxina (NAA; -ácido naftalenacético) y citoquinina (KIN; kinetina). Los CC obtenidos con aspecto friable se disgregaron en medio líquido para obtener el cultivo de células en suspensión de *A. pichichensis* (Imagen 1.7 d).

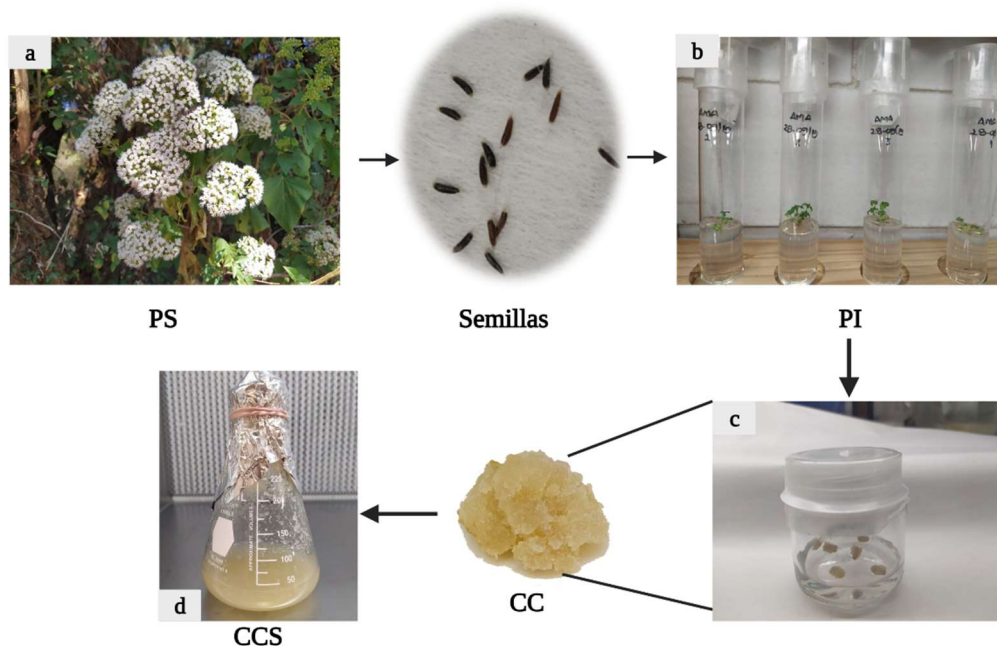


Imagen 1.7. *Ageratina pichichensis*: a) Planta silvestre (PS) colectada del sitio natural, (b) planta germinada *in vitro* (PI), (c) cultivo de callo (CC) y (d) cultivo de células en suspensión (CCS).

7.1.1 Material vegetal

Especímenes de la planta silvestre (PS) y semillas de *A. pichichensis* fueron colectados en Tepoztlán Morelos, México, identificados por el Biol. Gabriel Flores Franco y depositados en el Herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), con el número de vale 33913.

7.1.2 Planta *in vitro*

Se utilizaron semillas de *A. pichinchensis* las cuales se desinfectaron de la siguiente manera: se lavaron con una solución de detergente durante 10 min, posteriormente se sumergieron en una solución al 10% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (5.4 %) durante 15 min, después se sumergieron en etanol al 10 % (v/v) durante 30 seg y por último se realizaron tres lavados con agua destilada durante 5 min. Una vez desinfectadas las semillas se sembraron en cajas petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 30 g/L de sacarosa, se incubaron a 25 ± 2 °C en fotoperiodos de 16 h luz/ 8 h oscuridad; al cumplir dos meses de incubación, las plántulas obtenidas se utilizaron para la inducción a callo.

7.1.3 Inducción de callo

Para inducir a callo se utilizaron diferentes explantes de las plantas *in vitro* obtenidas en condiciones asépticas (apartado 6.1.2), los explantes utilizados fueron; hoja, peciolo y segmento nodal (Imagen 1.8).



Imagen 1.8. Explantes utilizados de las plantas in vitro de A. pichinchensis para la inducción de callo.

Se cortaron los diferentes explantes (5 mm) en condiciones asépticas y se colocaron en frascos de vidrio que contenían 25 mL de medio MS suplementado con sacarosa (3%) y reguladores de crecimiento, se fijó el pH (5.8), se utilizó fitagel para solidificar el medio y se esterilizó a (121 °C, 15 psi) durante 15 min.

Los frascos de vidrio con los diferentes explantes se incubaron a 25 ± 2 °C en fotoperiodos de 16 h luz/ 8 h oscuridad durante 30 d, al final se observó la formación de callo y se reportó como % de callogénesis, los tratamientos que formaron callo y que mostraron apariencia friable se seleccionaron para subcultivarse cada 30 d en medio fresco y obtener el cultivo de células en suspensión.

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron: ácido naftalenacético (ANA) como auxina y kinetina (KIN) como citoquinina. Se evaluaron 12 tratamientos con diferentes combinaciones de ANA y KIN (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. *Diseño experimental de las diferentes combinaciones de reguladores utilizadas de ANA (mg/L) y KIN (mg/L).*

| KIN (mg/L) | ANA (mg/L) | | | |
|------------|------------|-----|----|-----|
| | 0.1 | 0.5 | 1 | 1.5 |
| 0.1 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0.3 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 0.5 | 9 | 10 | 11 | 12 |

7.1.4 Establecimiento del cultivo de células en suspensión

Para establecer el cultivo de células en suspensión, se utilizaron callos de 20 días de edad. Los callos frescos (5.71 ± 0.71 g) se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo líquido MS y reguladores de crecimiento como en los cultivos de callos. Los CCS se mantuvieron en agitación (110 rpm) y se incubaron a 25 ± 2 °C en fotoperíodos de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Se subcultivaron cada 12 d utilizando filtro de papel Whatman n.º 1 con la finalidad de obtener cultivos celulares disgregados de manera homogénea.

7.1.4.1 Cinética de crecimiento

Una vez obtenido el CCS, se realizó una cinética de crecimiento en matraces de 250 mL que contenía 50 mL de medio MS líquido, reguladores de crecimiento y un inóculo de 2 g biomasa fresca. Los matraces se mantuvieron en agitación constante (110 rpm) a 25 ± 2 °C y en fotoperíodos de 16 h de luz / 8 h de oscuridad durante 21 d. Se tomaron muestras en diferentes tiempos (0, 4, 7, 12, 14, 16, 18, 21 d) por triplicado con matraces independientes. En cada tiempo se evaluó: biomasa seca (BS), consumo de la fuente de carbono, viabilidad celular y pH. La velocidad específica del crecimiento celular (μ) se obtuvo utilizando un método gráfico, donde los valores de biomasa de la fase exponencial de crecimiento fueron analizados para determinar el valor de μ y a partir de este dato se calculó el tiempo de duplicación (td).

7.1.4.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó empleando la tinción con azul de Evans (0.25%)[50], la cual consiste en que las células muertas se tiñen de azul en contraste con las células viables, que al tener la membrana íntegra, no se se tiñen. Entonces, una muestra de 1 mL del cultivo celular de *A. pichichensis* se mezcló con 2 mL del colorante, se dejó reposar durante 5 min y se contaron al menos 500 células a 10X. El porcentaje (%) de viabilidad celular de cada muestra se determinó con base en el número de células no teñidas (viables) dividido entre el número total de células presentes en la muestra.

7.1.4.2 Consumo de fuente de C

El consumo de la fuente de carbono se realizó mediante la determinación de carbohidratos totales utilizando el método fenol-sulfúrico [51]. A 1.0 mL de muestra se adicionaron 0.5 mL de una solución de fenol al 5.0% (p/v). Se homogeneizó y se agregaron 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado. Se homogeneizó cuidadosamente y se dejó en reposo durante 15 min. Por último, se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro (Genesys 2, Spectronics, Waltham, MA, USA). La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración de 7 puntos (5- 60 mg/L) utilizando sacarosa (SIGMA-ALDRICH, 99.97%) como patrón de referencia.

7.1.4.3 Producción de biomasa

La producción de biomasa se determinó en cada uno de los tiempos especificados en el apartado (6.1.4.1), El cultivo celular de cada matraz se filtró con papel Whatman N°1 de peso seco conocido, la biomasa retenida se lavó con agua destilada y se secó en estufa hasta alcanzar un peso seco constante (40°C durante 48 h) y se registraron los datos de biomasa en peso seco (BS) para realizar la curva de crecimiento del cultivo celular.

7.2 Preparación de extractos

Biomasa fresca de las partes aéreas de PS y PI, además de CC y CCS de *A. pichichensis*, se secaron en una estufa a 40 °C durante 48 h. Se utilizaron muestras (1 g) para obtener los extractos por sonicación (BRANSON-IC, CPX1800H, Danbury, EE.UU.) a 40 kHz de frecuencia con 10 mL de metanol a temperatura ambiente (25 °C) durante 15 min. A continuación, los extractos se centrifugaron a 6000 x g durante 15 min. Se recuperó la fase sobrenadante y el pellet se utilizó para una segunda y tercera extracción bajo las mismas condiciones. Por último, se mezclaron los sobrenadantes y se evaporó el disolvente a presión reducida. Los extractos resultantes se almacenaron a -70 °C en viales ámbar hasta su posterior análisis.

7.3 Caracterización de extractos

Para la caracterización de los extractos metanólicos de la PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* se llevó a cabo la cuantificación e identificación de compuestos fenólicos a los 12 y 16 días de cultivo.

7.3.1 Cuantificación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (CTP) se determinó según el método colorimétrico descrito por Andi Giordano *et al.*, y Singleton *et al.*, [52,53], con algunas modificaciones. Brevemente, una alícuota de 200 µL de cada extracto metanólico se mezcló con 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v), después de 1 min, 0.8 mL de Na₂CO₃ 7.5 % (p/v) se mezclaron durante 30 seg y se mantuvieron durante 60 min en la oscuridad a temperatura ambiente, después del tiempo de reacción se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Genesys 2, Spectronics, Waltham, MA, USA), el ácido gálico se utilizó para construir una curva estándar (0-100 µg/mL), los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (AG_E)/g de BS de cada tratamiento de *A. pichichensis* evaluado.

7.3.2 Cuantificación de Flavonoides totales

El contenido total de flavonoides (CTF) se determinó por el método colorimétrico descrito por Barreira *et al.* [54]. Se mezcló una alícuota de 250 μL de cada extracto con 1250 μL de agua destilada y 75 μL de NaNO_2 5% (p/v), después de 5 min se agregaron 150 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5% (p/v), se incubó por 6 min a temperatura ambiente, a continuación se agregaron 500 μL de NaOH (1 M) y 275 μL de agua destilada, se mezcló la solución y se midió la absorbancia a 510 nm. Se utilizó quercetina para construir una curva estándar (0-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina (QCT) /g BS.

7.3.3 Identificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La identificación de los compuestos se realizó a soluciones preparadas a partir de extractos vegetales y cultivos *in vitro* a 1000 ppm y compuestos estándar a 20 ppm. El análisis por HPLC se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ramírez-López *et al.* [55] con las siguientes modificaciones. Se utilizó un equipo de HPLC (Shimadzu SPD-10A, SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Canadá) con una columna Zorbax Eclipse XDB C 18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μm). Las fases móviles A y B se emplearon como sigue: la fase móvil A contenía ácido fórmico al 0.1% en agua MilliQ y la fase B contenía ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (grado HPLC). La adquisición de datos se aplicó durante 45 min con un tiempo total de 60 min. El gradiente de elución fue el siguiente 92% A/8% B, t 0 min; 85% A/15% B a los 5 min; 40% A/60% B a los 45 min; 40% A/60% B a los 55 min; y vuelta a las condiciones iniciales 92% A/8% B a los 60 min a un caudal de 1 mL/min. Los extractos se monitorearon a una longitud de onda de 280 y 370 nm. Se utilizaron como compuestos estándar el ácido gálico (GA), ácido cafeico (ACf), ácido p-cumárico (ApC), catequina (CAT), rutina (RUT) y epicatequina (EC). Una vez identificados los compuestos fenólicos en los extractos de la PS y cultivos *in vitro*, se realizó el análisis cuantitativo mediante curvas patrón de los diferentes estándares. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g}/\text{g}$ BS.

7.3.4 Identificación mediante cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS)

La identificación mediante CG-MS de los extractos metanólicos de la PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* se llevó a cabo sin derivatizar y derivatizando. La preparación de las muestras derivatizadas, se llevo acabo de la siguiente manera: 100 μL de extracto fue secado mediante un corriente de N_2 , para después sililar los compuestos utilizando BSTFA (50 μL)

+ 150 uL de diclorometano grado HPLC, a temperatura ambiente. Se mantuvieron en agitación constante por media hora. El análisis cromatográfico se realizó siguiendo la metodología descrita Dias *et al.*, [56], con algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7890B (Agilent Technologies), columna capilar HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 m film thickness, J&W). Helio fue usado como gas acarreador y 1 µL de la muestra fue inyectado en modo splitless, la temperatura del inyector fue de 250°C. La temperatura inicial de la columna se mantuvo a 40°C durante 1 min antes de aumentar 8°C/min hasta 310°C. El flujo del gas acarreador fue 1 mL/min. Se utilizó un espectrómetro de masas Agilent 5977A (Agilent Technologies), acoplado a un analizador de masas cuadrupolo. Se empleó ionización de impacto electrónico a 70 eV, al vacío, la temperatura de la cámara de ionización fue de 230 °C y del analizador de 150 °C. El rango de masas en el que se escaneo fue de 30-600 m/z. La biblioteca con la que se hicieron las comparaciones de los espectros de masas fue NIST 14 con el software de adquisición MassHunter.

7.4 Ensayos de actividad antioxidante

7.4.1 Actividad de barrido del radical DPPH•

La capacidad de barrido del radical DPPH, se determinó según [57]. Se añadieron 50 µL de extracto a diferentes concentraciones a una solución etanólica de DPPH (100 µM, 150 µL) en microplacas de 96 pocillos. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas Synergy HT™ (BioTek Instruments, Winooski, EE.UU.). Se utilizó Trolox como estándar. El porcentaje de inhibición de DPPH (%) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

donde A_0 es la absorbancia de la muestra en blanco (sin antioxidante) y A_1 es la absorbancia de la muestra que contiene el extracto. Los valores de la concentración media de inhibición (IC_{50}) se calcularon a partir del gráfico de la actividad de barrido porcentual frente a la concentración de los extractos y denotan la concentración de antioxidante necesaria para inhibir el 50% del radical (IC_{50}) y se expresan como µg de extracto seco (ES)/mL.

7.4.2 Actividad de barrido del radical ABTS^{•+}

La capacidad de barrido del radical ABTS se determinó según [58]. La solución madre de ABTS se preparó añadiendo 90.3 mg de sal de ABTS y 16,1 mg de K₂S₂O₈ en 25 mL de agua destilada. La solución madre se almacenó en la oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente antes de su uso. La solución de radicales ABTS⁺ se diluyó con agua destilada hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.70 ± 0.05 a 734 nm. A continuación, se mezclaron 1000 μ L de solución diluida de radical ABTS⁺ con 10 μ L de diferentes concentraciones de extractos. Se dejó reaccionar la mezcla durante 10 min, a 30 °C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de microplacas Synergy HT™ (BioTek Instruments, Winooski, EE.UU.); se utilizó Trolox como estándar. El porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ (%) se calculó de acuerdo con la ecuación 1.

7.4.3 Ensayo TBARS

7.4.3.1 Animales

La rata Wistar macho adulta (200-250 g) fue proporcionada por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los procedimientos y el cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de los Animales (NOM-062-ZOO-1999). Se mantuvieron a 23 ± 2 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h con libre acceso a alimento y agua.

7.4.3.2 Preparación de homogeneizado de cerebro de rata

La eutanasia de los animales se realizó evitando el dolor innecesario con CO₂. El tejido cerebral (cerebro entero) se disecó rápidamente y se homogeneizó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (0.2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl y 2.16 g de NaHPO₄ -7 H₂O/L, pH ajustado a 7.4) según [57,59], para producir un homogeneizado 1/10 (p/v). El homogeneizado se centrifugó durante 10 min a 800 x g. El contenido proteico del sobrenadante se midió utilizando el reactivo de fenol de Folin y Ciocalteu Lowry [60] y se ajustó con PBS a 2.66 mg de proteína/mL.

7.4.3.3 Inducción de la peroxidación lipídica y cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de peroxidación lipídica, se midieron los niveles de TBARS utilizando homogeneizados de cerebro de rata según el método descrito por [61], con algunas modificaciones. Se añadió 375 μL de sobrenadante con 50 μL de EDTA 20 μM y 25 μL de cada concentración de extracto disuelto en metanol (25 μL de metanol para el grupo control) y se incubó a 37 °C durante 30 min. La peroxidación lipídica se inició añadiendo 50 μL de solución fresca de FeSO_4 100 μM y se incubó a 37 °C durante 1 h. El contenido de TBARS se determinó según lo descrito por [62], con 500 μL de reactivo TBA (0.5% de ácido 2-tiobarbitúrico en 0.05 N NaOH y 30% de ácido tricloroacético, en proporción 1:1) se añadió a cada tubo y se enfrió en hielo durante 10 min, se centrifugó a 13,400 x g durante 5 min y se calentó a 80 °C en un baño de agua durante 30 min. Tras enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de 200 μl de sobrenadante a 540 nm en lector de microplacas Synergy HT™ (BioTek Instruments, Winooski, EE.UU.), se utilizó Trolox como estándar. La concentración de TBARS se calculó por interpolación en una curva estándar de tetrametoxipropano (TMP) como precursor del malondialdehído (MDA) [63]. Los resultados se expresaron como nmoles de TBARS por mg de proteína. El porcentaje de inhibición (IR%) se calculó de acuerdo con la ecuación 1.

7.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm DS. El TPC, TFC, cuantificación de compuestos fenólicos identificados mediante HPLC y la actividad antioxidante (DPPH, ABTS y TBARS) se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico se analizó con el software SigmaPlot (Systat Software Inc, 2011).

8. RESULTADO Y DISCUSIÓN

8.1 Establecimiento de cultivos *in vitro*

8.1.1 Cultivo de callos

De los diferentes explantes evaluados, solo el de segmento nodal dio respuesta a callogénesis, explantes de hoja y tallo se oxidaron a partir de los 10 día de cultivo. El efecto de la concentración de reguladores de crecimiento vegetal en los explantes de segmento nodal sobre la respuesta morfogénica se muestra en la Tabla 1.6. Se observaron tres respuestas morfogénicas; callos, callos con raíz y callos con plantas (Imagen 1.9). De los 12 tratamientos ensayados, 6 mostraron producción de callo, respuesta que fue evidente a los 20 días de cultivo. Porcentajes de callo superiores al 50 % fueron obtenidos en los tratamientos 3, 4 y 7. El mayor porcentaje de callogénesis se obtuvo cuando las concentraciones ANA y KIN, fueron 1-1.5 y 0.1 mg/L en T3 y T4, respectivamente. En ambos casos, los callos formados desarrollaron un aspecto friable y un color entre amarillo claro y beige (Imagen 1.9). Resultados similares fueron obtenidos por [32], para el establecimiento de CC a partir de explantes de hoja de *A. pichichensis* con una concentración de 1 mg/L y 0.1 mg/L de ANA y KIN respectivamente, corroborando que la combinación de esta auxina y citoquinina favorecen la inducción a callogénesis en dos explantes diferentes (hoja y segmento nodal) para este especie. Por otro lado, el tratamiento T7 también mostró la producción simultánea de callo con raíces, mientras que T3 y T4 mostraron la producción de callo con planta. Es bien sabido que los reguladores de crecimiento vegetal son muy importantes para la inducción y diferenciación de callos, especialmente las auxinas y citoquininas que de acuerdo con diversos estudios la combinación de estas favorece la producción de callos [21,64,65].

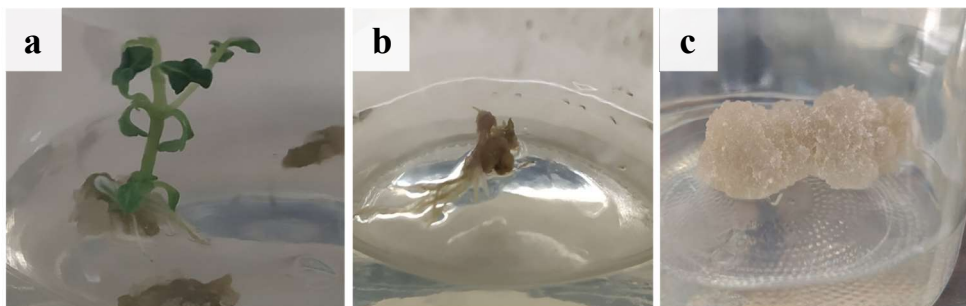


Imagen 1.9. Respuestas morfogénicas obtenidas con explantes de segmento nodal. a) callo con planta, b) callo con raíz y c) callo.

Tabla 1.6. Efecto de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) sobre la respuesta morfológica de explantes de segmentos nodales de *A. pichichensis* a los 20 días de cultivo.

| Tratamiento | RCV (mg/mL) | | Respuesta Inducción callo (%) | Respuesta Inducción callo con raíz (%) | Respuesta Inducción callo con planta (%) |
|-------------|----------------|-----|-------------------------------------|--|--|
| | ANA | KIN | | | |
| | Control | 0.0 | 0.0 | ND | ND |
| T1 | 0.1 | 0.1 | ND | ND | ND |
| T2 | 0.5 | 0.1 | ND | ND | ND |
| T3 | 1.0 | 0.1 | 93.75 ± 13 ^a | ND | 37.5 ± 25 |
| T4 | 1.5 | 0.1 | 81.25 ± 13 ^a | ND | 16.66 ± 14.43 |
| T5 | 0.1 | 0.3 | 37.5 ± 14 ^b | ND | ND |
| T6 | 0.5 | 0.3 | 12.5 ± 14 ^c | ND | ND |
| T7 | 1.0 | 0.3 | 68.75 ± 13 ^b | 18.75 ± 12.5 | ND |
| T8 | 1.5 | 0.3 | ND | ND | ND |
| T9 | 0.1 | 0.5 | ND | ND | ND |
| T10 | 0.5 | 0.5 | 45.83 ± 29 ^b | ND | ND |
| T11 | 1.0 | 0.5 | ND | ND | ND |
| T12 | 1.5 | 0.5 | ND | ND | ND |

8.1.2 Cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión (CCS) de *A. pichichensis*, fue obtenido mediante la disgregación de los callos T3 y T4 en medio líquido MS usando la misma concentración de reguladores de crecimiento que en medio sólido (Tabla 1.6). La disgregación del callo fue crucial, ya que las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados que van desde 2 a 1,000 células, formando poblaciones heterogéneas que crean microambientes que limitan las tasas de transferencia de sustrato y oxígeno, causando bajas tasas de crecimiento y producción de compuestos bioactivos [7,66]. El CC T4, mostró una mejor disgregación que T3 a los 7 días de cultivo (Imagen 1.10), tanto de manera macro como microscópica se observaron aglomerados en ambos tratamientos, la viabilidad celular fue $86.84 \pm 7.25\%$ y $56.10 \pm 11.28\%$ respectivamente. La disgregación se monitoreo hasta los 16 días de cultivo (Imagen 1.10). En el T3 los agregados mantuvieron su tamaño, mientras que en T4, el tamaño de los aglomerados disminuyó, alcanzando una viabilidad de $50.14 \pm 6.15\%$ y $80.14 \pm 7.87\%$, respectivamente. Debido a lo anterior, el T4 fue seleccionado para el establecimiento del CCS, considerando la realización de una cinética de crecimiento y la cual determinación de los parámetros cinéticos.

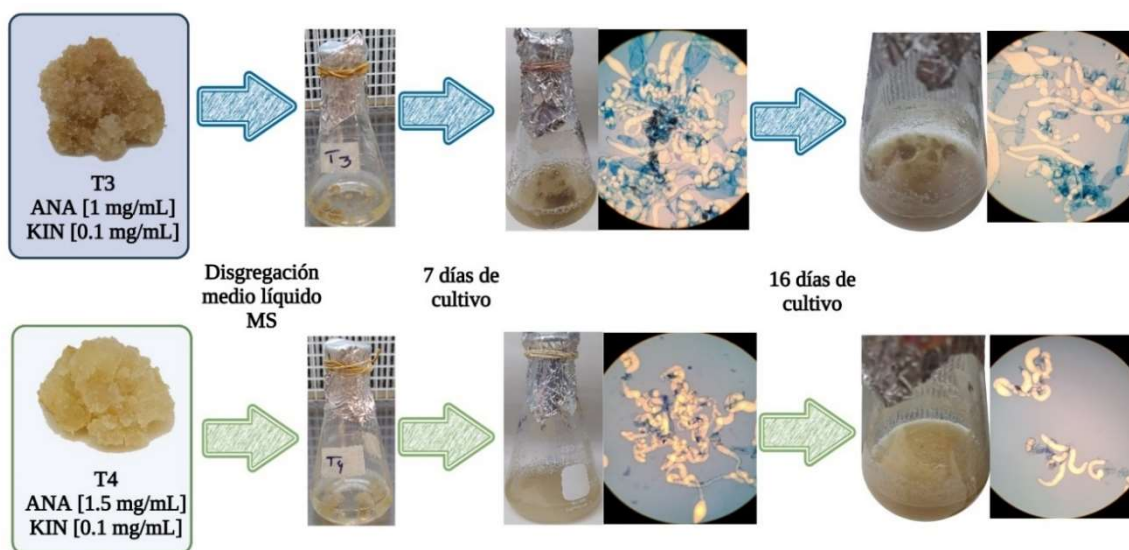


Imagen 1.10. Establecimiento del cultivo de células en suspensión de *A. pichichensis* de los callos obtenidos de T3 y T4.

De acuerdo con la cinética de crecimiento para CCS T4 de *A. pichichensis* (Imagen 1.11), la biomasa máxima fue 8.32 ± 0.22 g/L a los 16 días, con una velocidad de crecimiento (μ) de 0.1576 días⁻¹ y un tiempo de duplicación (td) de 4.39 días⁻¹. Resultados similares fueron reportados por [26] en CCS de *A. pichichensis* obtenidos a partir de explantes foliares, en el cual se alcanzó una biomasa máxima de 13.28 g/L a los 16 días, una μ 0.20 días⁻¹, un td de 3.01 días⁻¹ y la producción máxima de compuestos bioactivos (3-epilupeol y 2, 3-dihidrobenzofurano) se obtuvo a los 8 y 16 días de cultivo. De acuerdo con estos resultados lo CCS de *A. pichichensis* mostraron una tendencia similar de crecimiento y producción de compuestos bioactivos, independientemente de los explantes utilizados y condiciones de concentración de los reguladores de crecimiento ANA y KIN.

Estudios sobre la producción de compuestos fenólicos en CCS de *Salvia leriifolia* reportaron una producción máxima de biomasa y compuestos fenólicos a los 15 días de cultivo [67], resultados similares a lo reportado por [68], en cultivos de células en suspensión de *Fagopyrum tataricum* la producción máxima de biomasa y compuestos fenólicos se obtuvo en 15 días, con una tasa de crecimiento $\mu = 0.318$ días⁻¹ y un tiempo de duplicación de 2.2 días [69]. Arias *et al.*, [70] reporta la producción máxima de biomasa y compuestos fenólicos en CCS de *Thevetia peruviana* los 28 días de cultivo con una tasa de crecimiento $\mu = 0.25$ días⁻¹ y un tiempo de duplicación de 2.7 días. Tomando como base los estudios antes mencionados, la caracterización fitoquímica se realizó a los 12 y 16 días de cultivo.

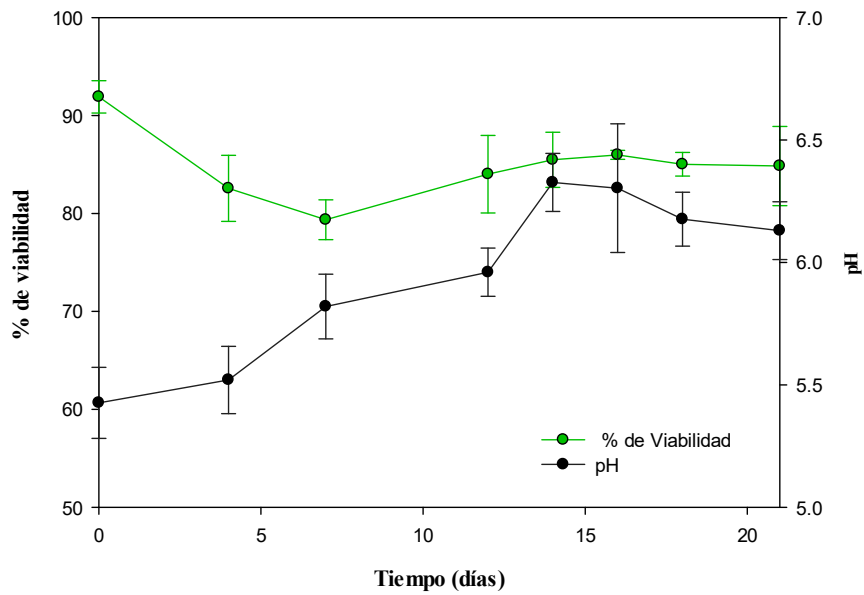
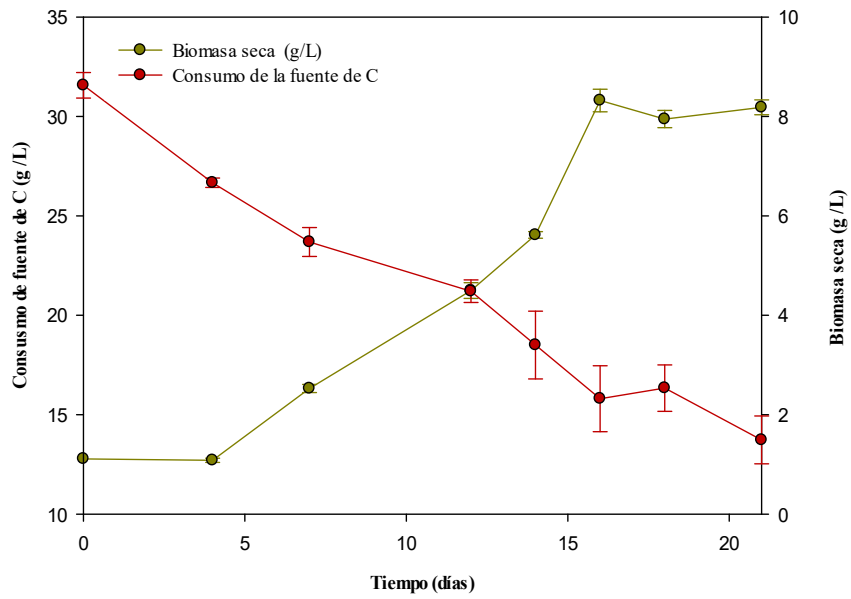


Imagen 1.11. Cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *A. pichichensis* del T4 en medio MS líquido. ● Biomasa seca (g/L), ● Consumo de fuente de C, ● % viabilidad y ● pH.

8.2 Compuestos fenólicos

Existen diversos métodos para la cuantificación e identificación de compuestos fenólicos. Los ensayos espectrofotométricos son una de las técnicas relativamente sencillas para la cuantificación de compuestos fenólicos en plantas. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (CG), o sus combinaciones son los dos métodos más utilizados para estos fines [71,72].

8.2.1 Cuantificación de compuestos fenólicos

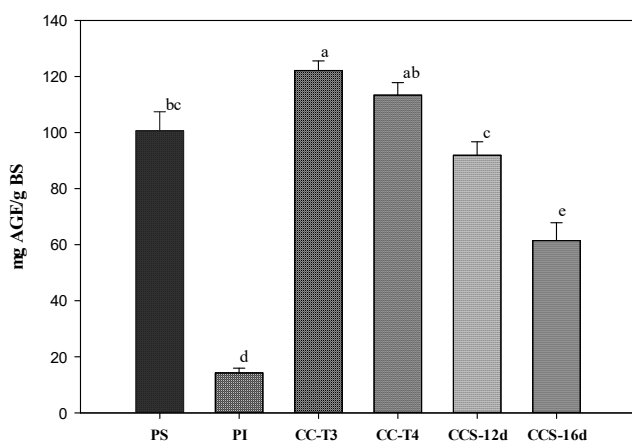
Diversos estudios sobre el análisis fitoquímico de especies pertenecientes a la familia Asteraceae han reportado la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y compuestos terpenoides [73–75]. Los compuestos fenólicos, son un tipo de MSDP, considerados de gran relevancia por sus diversos beneficios para la salud humana [76,77]. En este estudio se llevó a cabo la cuantificación de compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides) en extractos metanólicos de las partes aéreas de la PS, PI (2 meses de edad), CC (20 días de edad) y CCS (12 y 16 días de edad). El contenido total de fenoles (CTP) (Imagen 1.12 a), en los diferentes extractos de *A. pichichensis*, arrojaron valores en un rango de 14.24 a 122.12 mg_{AGE}/g_{BBS}, donde el CC de los tratamientos T3 y T4 mostraron significativamente ($p < 0,05$) mayor CTP seguidos de PS, CCS de 12 días de cultivo y el CCS de 16 días de cultivo, siendo la PI el extracto con menor contenido. Las diferencias entre los tratamientos indican que probablemente el cultivo de CC durante 20 días puede inducir un mayor estrés al cultivo celular debido al consumo y agotamiento del sustrato, estimulando una mayor síntesis de metabolitos secundarios, aproximándose a la encontrada en los extractos de la planta silvestre. Para el CCS, el tiempo de cultivo influyó en el rendimiento de CTP, sufriendo una reducción cuando el cultivo pasó de 12 a 16 días. En el caso de PI cultivado durante 2 meses, el extracto exhibió el menor rendimiento de CTP, esto podría estar asociado al requerimiento de la planta para alcanzar su estado adulto (alrededor de 41-100 días para algunas plantas de la familia *Asteraceae*) [78–80], además de que al ser cultivada en condiciones adecuadas y asépticas, la planta está creciendo en un proceso dirigido hacia su metabolismo primario para la producción preferencial de biomasa, sobre la producción de metabolitos secundarios.

Por otro lado, el contenido total de flavonoides (CTF) en los diferentes extractos de *A. pichichensis*, arrojaron valores que oscilaron entre 29.72 y 209.93 mg_{QCT}/g_{BS}, el comportamiento fue similar que en el CTP. El CC de T3 y CCS de 12 días de cultivo, mostraron una producción significativamente mayor, seguidos del CC de T4>CCS de 16 días de cultivo y PS>PI. Una vez más, la PI mostro la menor producción de CTF. A pesar de que la PS y la PI están estrechamente relacionadas con la planta de origen, las diferencias observadas en la producción de fenoles y flavonoides están asociadas a las diferencias en las condiciones de estrés biótico y abiótico a las que están expuestas las plantas. Estas diferencias en el entorno promueven la activación del metabolismo secundario como respuesta adaptativa para garantizar la supervivencia de la planta en condiciones de estrés [80,81]. Resultados similares han sido obtenidos en la producción de compuestos fenólicos en plantas creciendo bajo condiciones naturales versus plantas creciendo en condiciones *in vitro* de *Baccharis antioquiensis* (Asteraceae) [82], *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) [80], (*Thalictrum foliolosum* (Ranunculaceae) [83], *Argylia radiata* (Bignoniaceae) [81] y *Passiflora alata Curtis* (Passifloraceae) [84].

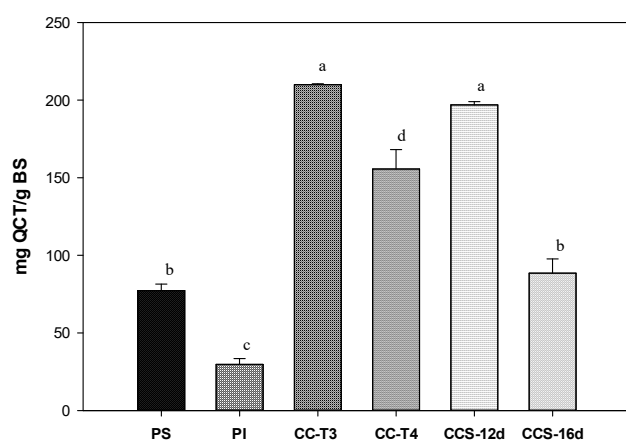
Los cultivos *in vitro* de células vegetales se han empleado como estrategia para aumentar la producción de compuestos bioactivos, asegurando su producción continua, especialmente el CCS el cual es considerado un método sencillo y rentable que ofrece la posibilidad de obtenerlos a gran escala [3,4,7,85]. En este estudio el CC mostró un CTP y CTF significativamente mayor ($p < 0,05$) que la PS y PI, coincidiendo con diversos estudios reportador por [3] , en *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae), [86] en *Pyrostegia venustaa* (Bignoniaceae) y [87] en *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) quienes reportaron una mayor producción de compuestos fenólicos en CC *in vitro*.

Por otro lado, el CCS produjo 2.0-2.7 veces más CTF que PS, mientras que PI produjo sólo el 38,8% del CTF de la obtenida en PS. Una mayor producción de compuestos fenólicos en CCS también ha sido reportada por [87], en cultivo de *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae), donde la producción de TPC fue 10-20% mayor que en extractos obtenidos de la planta creciendo en condiciones naturales [4]. Dary Mendoza *et al.*, [4], reportaron que la producción de CTP y CTF en cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) fue mayor en comparación con los explantes obtenidos de la planta creciendo

en condiciones naturales y en cultivo de callos *in vitro*. El alto contenido de compuestos fenólicos en cultivos *in vitro* puede deberse a la presencia de reguladores de crecimiento, que han sido utilizados como eficaces elicitores para estimular la producción de MSDP a través de la multiplicación y división celular [17,88,89]. Principalmente auxinas que son asociadas con el crecimiento celular y formación de raíces y citoquininas que se encargan de la división celular y crecimiento de raíces, en combinación resultan en una interacción sinérgica, y aditiva que favorecen la proliferación de células no diferenciadas y la producción de MSDP. Diversos estudios realizados a un gran número de especies confirman el aumento en la producción de compuestos fenólicos en presencia de auxinas y citoquininas [3,17,86,90]. Estos resultados indican que las técnicas *in vitro* favorecen y aumentan la producción de compuestos fenólicos en *A. pichichensis*.



a



b

Imagen 1.12. a) Contenido total de fenoles (CTP) y b) flavonoides (CTF) en PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*. Los resultados son el promedio \pm la desviación estándar de dos mediciones independientes. Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

8.2.2 Identificación de compuestos mediante HPLC

Los extractos metanólicos obtenidos de PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*, se analizaron mediante HPLC. La elucidación de los compuestos fenólicos se basó en el uso de diferentes compuestos estándar, de los cuales solo seis fueron identificados (Imagen 1.13): ácido gálico (AG), ácido cafeico (ACf), ácido p-cumárico (ApC), catequina (CAT), rutina (RUT) y epicatequina (EPI).

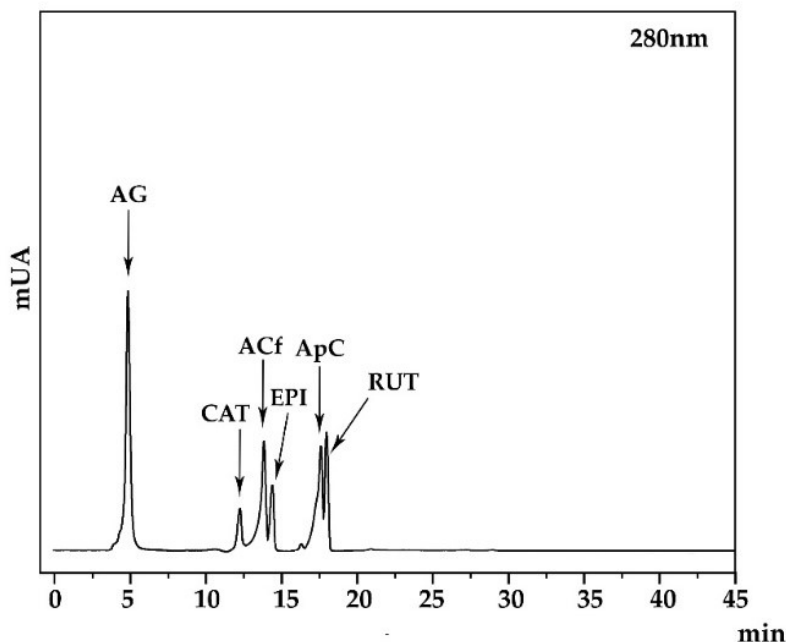


Imagen 1.13. Cromatograma de los estándares de compuestos fenólicos identificados mediante HPLC. AG ácido gálico; CAT catequina; ACf ácido cafeico; EPI epicatequina; ApC ácido p-cumárico y RUT rutina.

Entre los compuestos identificados en cada extracto (Imagen 1.14), el ácido fenólico AG (tiempo de retención, $tr = 4,908$ min) y los flavonoides CAT ($tr = 12,375$ min) y RUT ($tr = 17,33$ min) se encontraron en los extractos de PS, mientras que sólo el flavonoide EPI ($tr = 14,255$ min) se identificó para los extractos de PI. En el caso de los extractos obtenidos a partir de CC-T3 y CC-T4 fueron similares en los perfiles de elución, diferenciándose en la altura de algunas señales, siendo mayor para CC-T4. En estos extractos se identificaron tres ácidos fenólicos: AG, ACf ($tr = 13,858$ min) y ApC ($tr = 17,741$ min) y el flavonoide EPI. Finalmente, el CCS cultivado durante 12 y 16 días, muestra patrones cromatográficos similares al CC, diferenciándose en la ausencia de ACf en CSC-T4 12d. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las diferentes rutas metabólicas y etapas de crecimiento del cultivo *in vitro*, que llevan a potenciar o limitar la producción de metabolitos específicos en

respuesta a diferentes factores de estrés. La producción de ácidos fenólicos y flavonoides en cultivos *in vitro* se ha descrito con frecuencia [67,87,91–95].

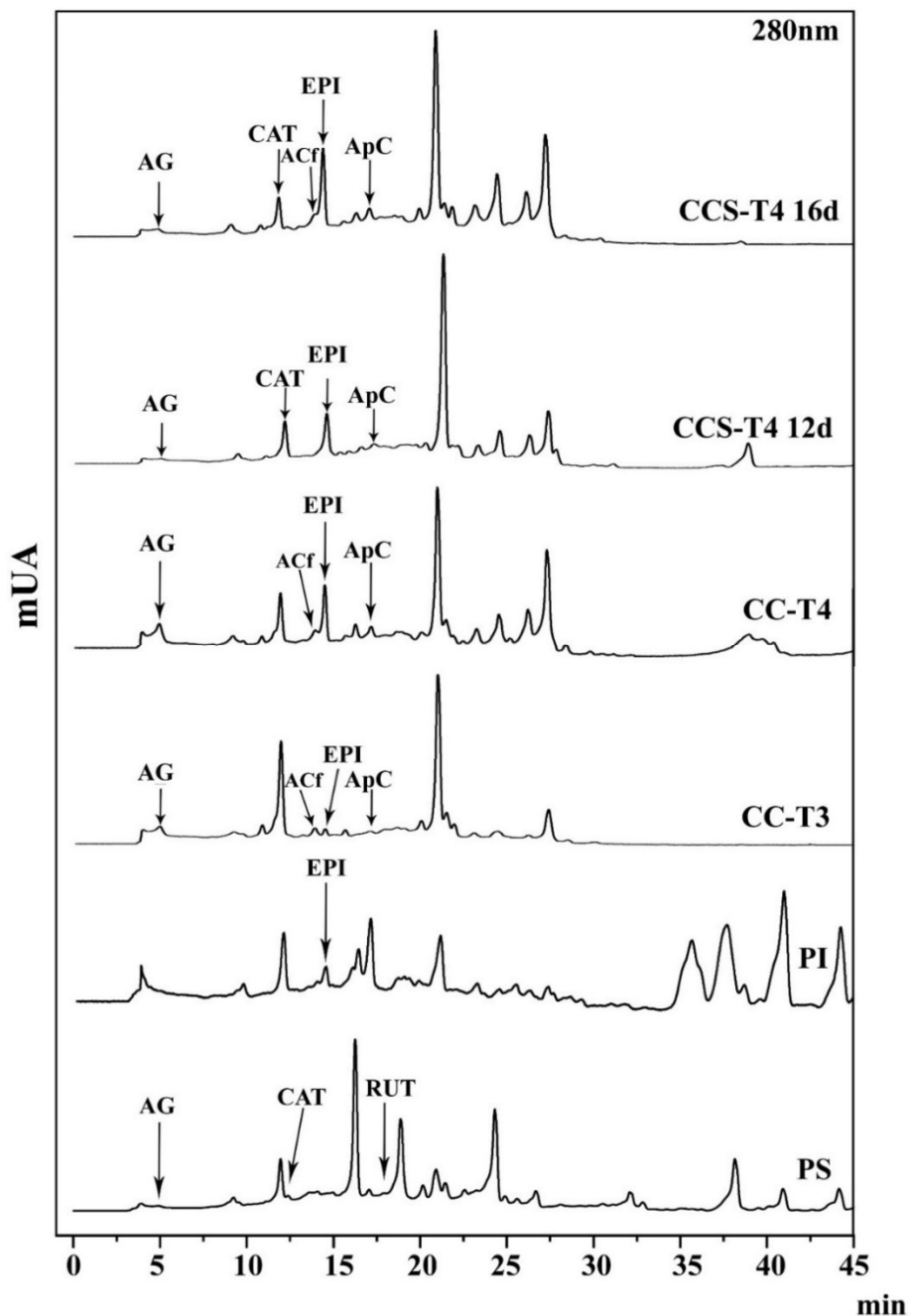


Imagen 1.14. Cromatogramas de HPLC para extractos metanólicos de *A.pichichensis*. Planta silvestre (PS), planta *in vitro* (PI), cultivo de callos (CC-T3 y CC T4), cultivo de células en suspensión (CCS 12d y CCS 16d). Ácido gálico (AG), catequina (CAT), ácido cafeico (ACf), epicatequina (EPI), ácido p-cumarico (ApC) y rutina (RUT).

8.2.3 Cuantificación de compuestos identificados mediante HPLC

De acuerdo con el análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos identificados en los extractos (Tabla 1.7), existen diferencias significativas entre la concentración de cada compuesto en los distintos tratamientos, excepto el flavonoide EPI en CC-T3 y CC-T4. El compuesto más abundante fue EPI (CCS-T4 16d > CCS-12d > CC-T4 = CC-T3 > PI) y el menos abundante fue el AG (CC-T4 > CC-T3 > PS > CCS-16d > CCS-12d). De acuerdo con los resultados antes mencionados, los cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* no sólo fueron capaces de producir compuestos que la PS no produjo, sino que además los CCS produjeron más de ellos (AG y CAT). Por último, es de destacar que los CCS producen una mayor concentración de compuestos como: CAT, ACf, EPI y ApC en contraste con los CC. Resultados similares fueron obtenidos por [96] en CC y CSC de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) y por [67], en cultivos de *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae).

Los compuestos identificados en este estudio han sido investigados por sus propiedades medicinales y biológicas como agentes antiinflamatorios [97], antimicrobianos, anticancerígenos [98] y antioxidantes [99,100]. A pesar de que se encontraron los compuestos antes mencionados, se deben realizar más caracterizaciones para dilucidar el panorama completo de los compuestos bioactivos sintetizados en los tratamientos de cultivos celulares, identificando los compuestos principales y sus actividades biológicas.

Tabla 1.7. Análisis cuantitativo de los compuestos fenólicos identificados mediante HPLC de los extractos metanólicos de A. pichichensis.

| Tratamiento | Cuantificación de compuestos fenólicos | | | | | |
|-------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | µg GAE / gps | µg CAT / gps | µg CfA / gps | µg EPI / gps | µg pCA / gps | µg RUT / gps |
| PS | 1.75 ±0.06 | 2.58±0.08 | Ni | Ni | Ni | 3.36±2.20 |
| PI | Ni | Ni | Ni | 34.24±6.18 | Ni | Ni |
| CC-T3 | 2.46±0.04 | Ni | 7.14±0.28 | 97.91±8.73 | 3.53±0.02 | Ni |
| CC-T4 | 3.92±0.09 | Ni | 8.11±0.03 | 91.17±4.99 | 1.53±0.14 | Ni |
| CCS-T4 12D | 0.57±0.04 | 9.97±1.33 | Ni | 145.10±3.36 | 2.45±0.07 | Ni |
| CCS-T4 16D | 1.17±0.04 | 6.56±1.16 | 14.73±0.51 | 195.87±3.77 | 5.06±0.31 | Ni |

Ni: no identificado

8.2.4 Identificación de compuestos mediante CG-MS

La cromatografía de gases-espectrometría de masas permite ampliar el rango de los compuestos identificados gracias a las muestras estándar disponibles y a la posibilidad de utilizar bibliotecas de espectrometría de masas en combinación con parámetros de retención [101]. Debido a que algunos compuestos fenólicos que componen los extractos vegetales no son volátiles y a que los ácidos fenólicos se descomponen a temperaturas superiores a 200°C, se recurre a una derivatización preliminar con acilantes, alquilantes o sililantes [102]. En este estudio se realizó la identificación de compuestos mediante CG-MS de los extractos metanólicos de la PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* de muestras sin derivatizar y derivatizadas, utilizando BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida).

En la Tabla 1.8 y 1.9 se muestran los porcentajes de los diferentes grupos de compuestos identificados en cada tratamiento para muestras sin derivatizar y derivatizadas, respectivamente. En las muestras sin derivatizar se identificaron un total de 32 compuestos (Tabla A1), que corresponden principalmente a fenoles, terpenos, cromenos, ácidos grasos, furanos, ésteres y piranonas. En PS, los compuestos fenólicos representan el 2.95%, mientras que en la PI y CC-T3 no se identificaron compuestos pertenecientes a este grupo. En cuanto a los cultivos *in vitro* CC-T4, CCS-12d y CCS-16d el porcentaje de compuestos fenólicos fue del 3.41, 9.09 y 12.67 % respectivamente. Por otro lado, en las muestras derivatizadas se identificaron un total de 23 compuestos (Tabla A1), que corresponden a fenoles, ácidos orgánicos, alcoholes y glucósidos. Los compuestos fenólicos se identificaron en todos los tratamientos (Tabla 1.9), con excepción de la PI con los siguientes porcentajes; 57.94, 30.27, 27.04, 14.68 y 9.36 % para CCS-12d, CCS-16d, CC-T4, CC-T3 y PS, respectivamente. La derivatización de las muestras permitió la elucidación de compuestos diferentes a los identificados en las muestras sin derivatizar, como; ácidos orgánicos, alcoholes y glucósidos, diferencia que radica en la capacidad del mecanismo de sililación del BSTFA, para sustituir grupos -OH, -COOH, -NH, -NH₂ por el grupo trimetilsililo -Si (CH₃)₃ aumentando la sensibilidad de detección permitiendo la elucidación de dichos compuestos [101,103,104].

Tabla 1.8. Porcentaje (%) del tipo de compuestos identificados en cada tratamiento con respecto al total de compuestos identificados en muestras sin derivatizar.

| Tratamiento | Compuestos identificados (%) | | | | | | | | |
|-------------|------------------------------|--------------|---------|---------|------------|--------|-------|----------|---------|
| | Fenoles | H. aromático | Terpeno | Cromeno | Ac. grasos | Furano | Ester | Piranona | Azuleno |
| PS | 2.95 | 5.41 | 14.98 | 27.05 | 34.50 | Ni | 11.99 | Ni | 3.12 |
| PI | Ni | Ni | 17.54 | Ni | 19.80 | 47.06 | Ni | 15.60 | Ni |
| CC-T3 | Ni | Ni | 9.68 | 35.42 | 36.45 | Ni | 18.46 | Ni | Ni |
| CC-T4 | 3.41 | Ni | 9.41 | Ni | 16.48 | 67.97 | 1.36 | 1.36 | Ni |
| CCS-12d | 9.09 | Ni | 18.62 | Ni | 24.87 | 31.45 | 4.29 | 11.68 | Ni |
| CCS-16d | 12.67 | Ni | 25.54 | Ni | 47.51 | 3.42 | 7.45 | 3.41 | Ni |

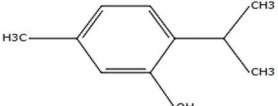
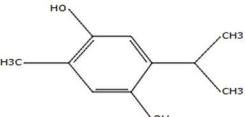
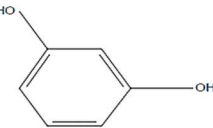
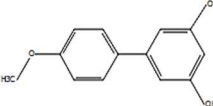
Tabla 1.9. Porcentaje (%) del tipo de compuestos identificados en cada tratamiento con respecto al total de compuestos identificados en muestras derivatizadas.

| Tratamiento | Compuestos identificados (%) | | | | |
|-------------|------------------------------|---------------|-----------|------------|--------|
| | Fenoles | Ac. orgánicos | Alcoholes | Glucósidos | Furano |
| PS | 9.36 | 60.03 | 30.35 | Ni | Ni |
| PI | Ni | 49.39 | Ni | 50.61 | Ni |
| CC-T3 | 14.68 | 17.15 | 2.91 | 65.26 | Ni |
| CC-T4 | 27.04 | 31.13 | 10.52 | 31.30 | Ni |
| CCS-12d | 57.94 | 16.35 | 12.79 | 12.92 | Ni |
| CCS-16d | 30.27 | 47.21 | 6.63 | 11.35 | 4.54 |

Por otro lado, en la Tabla 1.10, se muestran los compuestos fenólicos identificados en las muestras sin derivatizar, con sus tiempos de retención y el % de contenido de cada compuesto con respecto al total de compuestos identificados en cada tratamiento. En la PS se identificaron tres compuestos fenólicos que corresponden a: 1) timol, 2) timoquinol y 3) resorcinol, de acuerdo con el % de contenido de cada uno con respecto al total de compuestos identificados en este tratamiento, la abundancia fue 3>2>1, mientras que en los cultivos *in vitro* CC-T4, CCS-12d y CCS-16d solo fue identificado uno, el cual corresponde a 4'-metoxi-3,5-bifenildiol. En las muestras derivatizadas (Tabla 1.11), se identificaron dos compuestos fenólicos diferentes que en las muestras sin derivatizar; (1) ácido cafeico, derivado 3TMS y 2) ácido clorogénico (6TMS)). La PS y los cultivos *in vitro* de *A.pichichensis* (CC-T3, CC-T4, CCS-12d y CCS-16d) producen ambos compuestos, mientras que en la PI ninguno de estos fue identificado. De acuerdo con el % de contenido de cada compuesto con respecto al

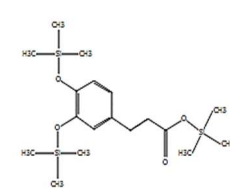
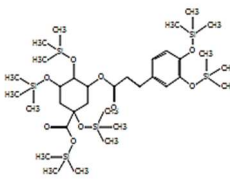
total de compuestos identificados en PS, CC-T3 la abundancia de los dos compuestos fenólicos fue 1>2 mientras que en CC-T4, CCS-12d y CCS-16d fue 2>1. La identificación del ácido cafeico corrobora lo obtenido en la identificación por HPLC. A pesar de que se lograron identificar diversos compuestos, es necesario realizar más caracterizaciones para dilucidar el panorama completo de los compuestos bioactivos sintetizados en los tratamientos de cultivos celulares, identificando los compuestos principales y sus actividades biológicas.

Tabla 1.10. Compuestos identificados en muestras sin derivatizar de los extractos metanólicos de A. pichichensis.

| Tipo de compuesto | Nº de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|--|-------------|-------------------------|
| | 1 | Timol | 13.13 |  | PS | 2.08 |
| | 2 | Timoquinol | 17.33 |  | PS | 2.12 |
| FENOLES | | | | | | |
| | 3 | Resorcinol | 11.51 |  | PS | 2.95 |
| | 4 | 4'-metoxi-3,5-bifenildioli | 23.86 |  | CC-T4 | 3.41 |
| 23.82 | | | CCS-12d | | 9.09 | |
| 23.82 | | | CCS-16d | | 12.67 | |

% de contenido con respecto al total de compuestos identificados en cada muestra

Tabla 1.11. Compuestos fenólicos identificados en muestras derivatizadas de los extractos metanólicos de *A. pichichensis*.

| Tipo de compuesto | Nº de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % de contenido |
|-------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|--|-------------|----------------|
| | | | 25.06 | | PS | 7.50 |
| | 1 | Ácido cafeico, derivado (3TMS) | 25.05 |  | CC-T3 | 11.16 |
| | | | 25.05 | | CC-T4 | 11.32 |
| | | | 25.05 | | CCS-12d | 23.08 |
| | | | 25.05 | | CCS-16d | 15.67 |
| | | | 25.05 | | | |
| FENOLES | | | | | | |
| | | | 33.59 | | PS | 2.13 |
| | 2 | Ácido clorogénico (6TMS) | 33.59 |  | CC-T3 | 3.52 |
| | | | 34.56 | | CC-T4 | 15.72 |
| | | | 34.56 | | CCS-12d | 34.86 |
| | | | 34.56 | | CCS-16d | 14.61 |
| | | | 34.56 | | | |

% de contenido con respecto al total de compuestos identificados en cada muestra

8.3 Actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos son benéficos para la salud humana, actualmente son de interés debido a sus importantes propiedades biológicas, especialmente actividades antiinflamatorias anticancerígenas y antioxidantes [72]. La ventaja de utilizar cultivo de tejidos vegetales se justifica principalmente por la mejora de la producción de moléculas bioactivas en tiempos más cortos. Con la finalidad de evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis*, se realizaron ensayos de DPPH, ABTS y TBARS. La imagen 1.15, muestra la capacidad antioxidante de los distintos extractos frente a diferentes radicales libres cuando exponen a concentraciones entre 10 y 1,000 µg de extracto seco (ES)/mL. Se utilizó Trolox como control.

En la inhibición del radical ABTS, el extracto de PS requirió una menor concentración para inhibirlo, alcanzando una meseta alrededor de 178 µg ES/mL, pero superior a Trolox. Para el resto de los tratamientos, cuando la concentración de antioxidante fue inferior a 100 µg ES/mL, la mejor capacidad antioxidante fue obtenida por PI, seguido de CC-T3 y el resto de los tratamientos, pero por encima de esta concentración, la inhibición de ABTS fue modificada sustancialmente por los tratamientos CC y CCS, con una reducción significativa de la capacidad antioxidante en los extractos de PI. En cuanto a la inhibición del radical DPPH, Trolox y el extracto de PS, mostraron la misma tendencia observada para ABTS, pero para este radical, el CCS-T4 12 d, CCS-T4 16 d y CC-T3 se agruparon con mejor capacidad antioxidante que los extractos de CC-T4 y PI. En el caso de TBARS, Trolox y el extracto de PS requirieron concentraciones más bajas para la inhibición de la peroxidación lipídica, seguidos de los extractos de CCS-12d, CC-T3, CCS-16d y PI con menor capacidad antioxidante. Para todos los tratamientos, el porcentaje de inhibición sobre los radicales de DPPH y ABTS se incrementó con el aumento de la concentración de extractos de *A. pichichensis*, donde el porcentaje de inhibición del radical DPPH, se obtuvo en una concentración de 1000 µgES/mL, con porcentajes de 94.32 ± 0.66 , 90.14 ± 1.58 , 93.14 ± 0.39 y 94.16 ± 0.19 % para los extractos PS, PI, CC y CCS, respectivamente. En el caso de Trolox, el mayor porcentaje de inhibición se alcanzó a una concentración de 56.25 µgES/mL.

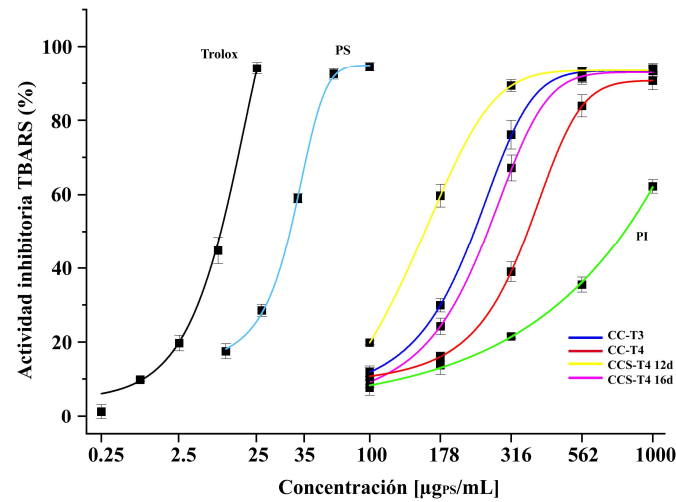
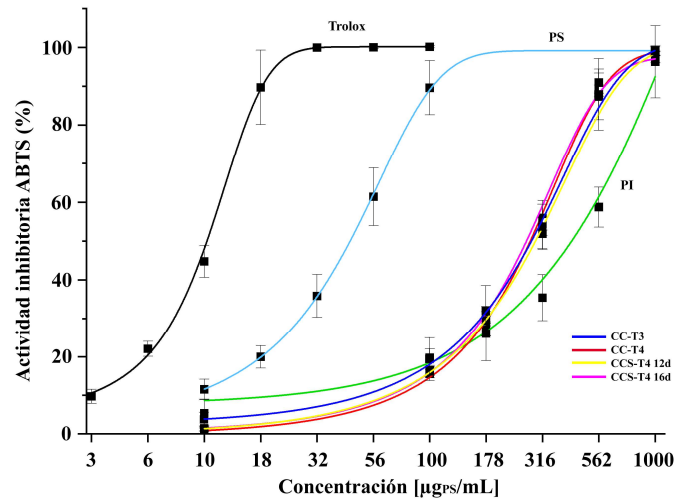
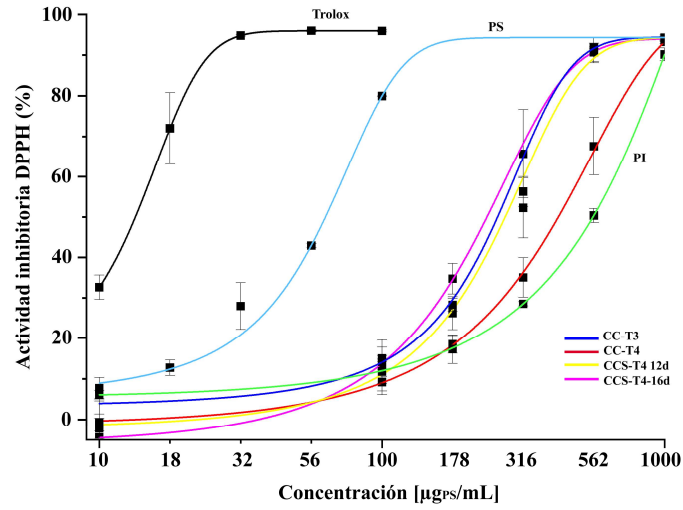


Imagen 1.15. Capacidad antioxidante de los extractos de *A. pichichensis* y sus cultivos celulares frente a radicales (A) ABTS, (B) DPPH y (C) peroxidación lipídica TBARS.

Se sabe que los radicales libres desempeñan un papel definitivo en una amplia variedad de manifestaciones patológicas. Los antioxidantes luchan contra los radicales libres y nos protegen de diversas enfermedades. Actúan eliminando las especies reactivas del oxígeno o protegiendo los mecanismos de defensa antioxidante [105]. Los diferentes extractos de *A. pichichensis* mostraron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante, de acuerdo con los valores de IC_{50} de la Tabla 1.12, el potencial de barrido de radicales DPPH fue el siguiente: PS > CCS > CC > PI. Resultados similares fueron obtenidos en el ensayo ABTS, en donde el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo a una concentración de 1000 μ gES/mL con $99,16 \pm 1,19$, $96,29 \pm 9,27$, $98,47 \pm 0,56$ y $94,47 \pm 0,56\%$ para los extractos PS, PI, CC y CCS, respectivamente. El potencial de barrido de radicales ABTS fue el siguiente: PS > CCS = CC > PI, coincidiendo con IC_{50} (Tabla 1.12). Resultados similares fueron reportados por [106], al evaluar la actividad antioxidante de extractos de la planta creciendo en condiciones naturales y cultivos *in vitro* de *Trifolium pratense* L. (planta y callo), el potencial antioxidante reportado fue el siguiente: PS > CC > PI. Las diferencias observadas entre los dos ensayos (DPPH y ABTS) podrían estar relacionadas con la naturaleza química de las sustancias bioactivas contenidas en cada extracto y con la naturaleza del radical utilizado para medir esta propiedad. En el caso del catión radical ABTS (ABTS⁺), es reactivo frente a la mayoría de los antioxidantes y es soluble tanto en disolventes acuosos como orgánicos, lo que permite su aplicación en un amplio rango de pH y/o fuerza iónica [107], mientras que en el ensayo de DPPH se basa principalmente en la reacción de transferencia de electrones y las interacciones entre los antioxidantes-radicales DPPH• están determinadas por la conformación estructural de los antioxidantes. Debido a lo anterior, algunos compuestos reaccionan rápidamente con el DPPH, reduciendo el número de moléculas de DPPH en correspondencia con el número de grupos hidroxilo disponibles en el compuesto antioxidante. No obstante, este mecanismo parece ser más complejo y las reacciones observadas son más lentas en la mayoría de los antioxidante [108]. Por lo tanto, los extractos metanólicos de *A. pichichensis* contienen diversos tipos de compuestos fenólicos con diferentes polaridades y afinidades a los disolventes, lo que afecta a la capacidad de barrido de los extractos crudos, además de . La actividad antioxidante de los extractos de *A. pichichensis*, evaluada mediante el ensayo TBARS (Figura 1.15), también

mostró que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo a una concentración de 1000 $\mu\text{gES/mL}$, alcanzando 94.48 ± 2.17 , 62.25 ± 3.08 , 90.65 ± 4.17 y $94.04 \pm 2.45\%$ para los extractos PS, PI, CC y CCS, respectivamente. Según el IC_{50} (Tabla 1.12), la actividad de los extractos fue la siguiente PS >CCS>CC>PI. En general, los mejores resultados de actividad antioxidante se dieron en los extractos de PS seguidos de los cultivos in vitro de *A. pichichensis* (CC y CCS) en los tres ensayos evaluados (DPPH, ABTS Y TBARS), especialmente en la inhibición de la peroxidación lipídica, evaluada por la producción de TBARS. Cabe destacar que, aunque el extracto CC-T3 mostró mejor actividad antioxidante, su capacidad de disgregación para dar lugar a CCS fue significativamente menor que CC-T4, por lo que este cultivo puede considerarse como una alternativa para la buena producción de compuestos antioxidantes cuando no se requiere el establecimiento de CSC. En cuanto el CCS, no se obtuvieron diferencias significativas cuando se cultivaron a los 12 y 16 días para los ensayos de DPPH y ABTS, en el caso de TBARS la actividad fue significativamente mejor para CCS-12d. Resultados similares fueron reportados por [109], en extractos agua/metanol de *Lavandula viridis* L'Hér creciendo en condiciones naturales y en cultivo de callos, los cuales fueron eficientes en la inhibición de la peroxidación lipídica. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los extractos de *A. pichichensis* contienen compuestos bioactivos capaces de donar hidrógeno a un radical libre para eliminar el daño potencial.

Tabla 1.12. Valores de la IC_{50} de cada extracto necesarios para inhibir el 50% de la concentración inicial de radical libre.

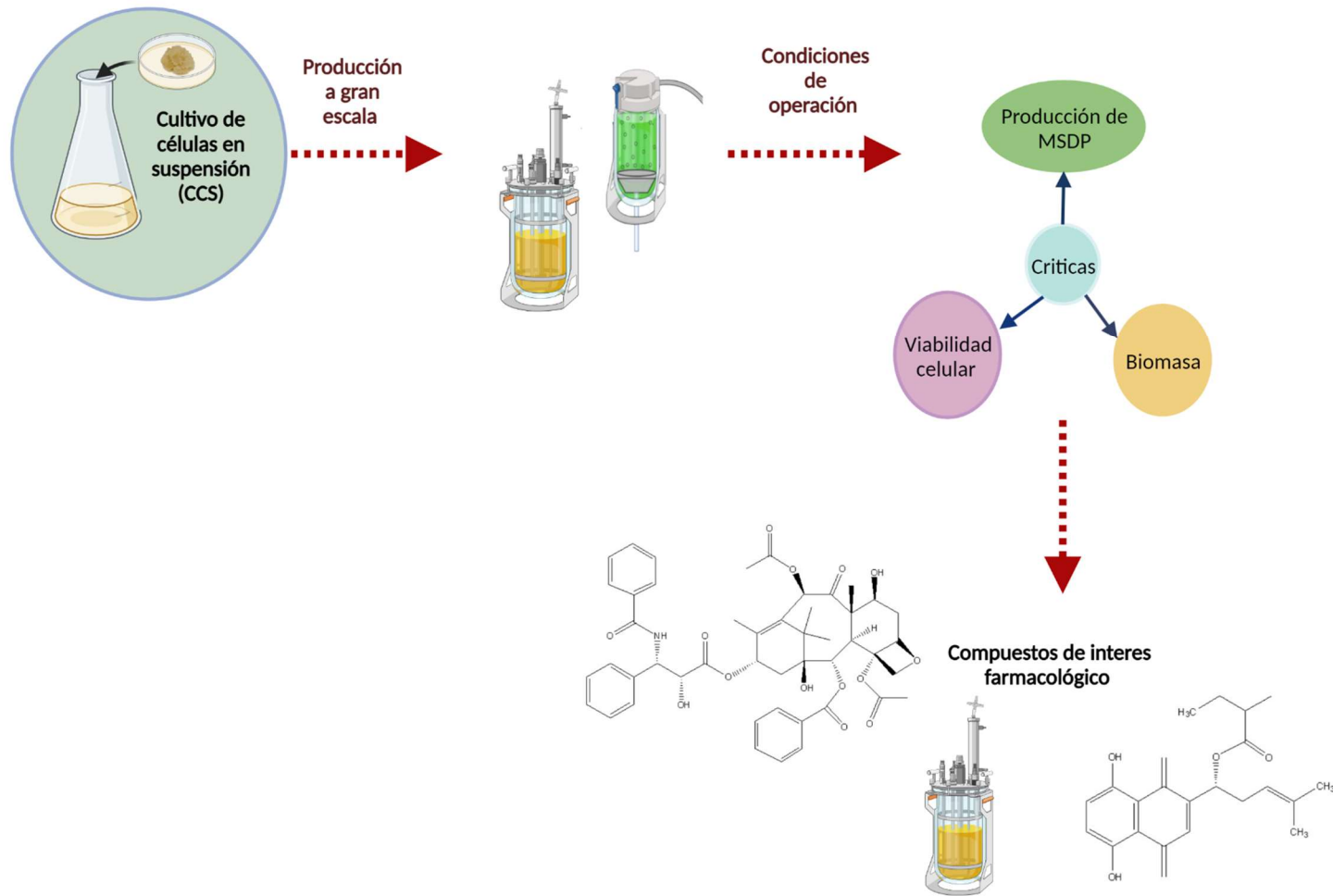
| Tratamiento | ABTS | DPPH | TBARS |
|-------------|--|----------------------|----------------------|
| | IC_{50} ($\mu\text{g extracto/mL}$) | | |
| PS | 45.09 ± 6.29^a | 60.24 ± 2.66^a | 27.85 ± 0.29^a |
| PI | 459.68 ± 59.32^c | 557.29 ± 16.49^d | 783.99 ± 28.06^e |
| CC-T3 | 284.77 ± 24.52^b | 242.58 ± 23.24^b | 260.49 ± 9.48^c |
| CC-T4 | 282.81 ± 9.01^b | 422.67 ± 49.48^c | 362.72 ± 12.22^d |
| CCS-12d | 282.2 ± 3.28^b | 229.96 ± 30.81^b | 157.01 ± 5.27^b |
| CCS-16d | 285.04 ± 45.12^b | 276 ± 15.53^b | 234.31 ± 6.52^c |

9 Conclusiones del capítulo

Se obtuvieron cultivo de callos (CC) de *A. pichichensis* a partir de explantes de segmento nodal de plantas *in vitro* (PI) bajo la combinación de ANA (1 y 1.5 mg/mL) y KIN (0.1 mg/mL) en medio MS. La concentración de reguladores que favoreció la disgregación del CC en medio líquido fue de 1 mg/mL y 0.1 mg/mL de ANA y KIN respectivamente.

La producción de compuestos fenólicos en cultivo *in vitro* CC y CCS fue mejorada o mantenida con respecto al rendimiento alcanzado en PS, aunado a la producción de compuestos como ácido cafeico (CfA), epicatequina (EPI), ácido p-cumárico (pCA) y 4'-metoxi-3,5-bifenildiol, los cuales no fueron encontrados en los extractos de PS. Con base en lo anterior, los cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* son una alternativa para la producción de compuestos fenólicos de forma continua y en menor tiempo que las plantas creciendo en condiciones naturales. Sin embargo, pese a que los cultivos *in vitro* fueron capaces de producir mayor número de compuesto fenólicos, la actividad antioxidante obtenida fue significativamente menor a lo obtenido para la PS, diferencia que puede estar relacionada con la afinidad de los compuestos extraídos por los diferentes radicales evaluados, por lo que es necesaria una caracterización más robusta de los compuestos mayoritarios y su contribución en dicha actividad biológica.

CAPÍTULO II



1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el mundo de la academia y la industria dirigen sus investigaciones hacia la obtención MSDP a gran escala mediante el uso de CTV [2,110,111]. El cultivo de células en suspensión (CCS), presenta excelentes atributos de escalado para la producción de compuestos bioactivos derivados de plantas. Sin embargo, aunque el uso de CCS es una técnica atractiva para la producción a gran escala en biorreactores, el escalamiento de matraz a biorreactor es un desafío que comienza con el diseño del biorreactor y la elección de las variables de operación que tienen un efecto directo sobre el crecimiento del cultivo y por ende en la producción de compuestos bioactivos [7,85,112]. Debido a que los cultivo *in vitro* de *A. pichichensis* mostraron capacidad para producir MSDP con actividad antioxidante, en este capítulo se describen algunas consideraciones importantes para el establecimiento de CCS en biorreactores desde un punto de vista teórico. El capítulo se divide en 3 partes. La primera parte presentan los MSDP de uso comercial que se han logrado obtener a través de CCS. La segunda parte, expone las diferentes configuraciones de los biorreactores más utilizados para la producción comercial y a gran escala y finalmente se describe las variables de operación y su efecto en el rendimiento del cultivo celular durante la producción MSDP.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Producción comercial de los compuestos bioactivos a partir de CTV.

El CTV ha permitido la obtención de diversos fármacos comerciales, en especial del CCS, gracias a las diversas ventajas que estos presentan como; control en la calidad del producto deseado, menores tiempos de producción, facilidad para el escalamiento a biorreactores [7]. En la tabla 2.1 se presentan los productos comerciales que se han obtenido con éxito a partir de CTV. El primer informe sobre la fabricación industrial de compuestos bioactivos derivados de CCS se encontró para la Shikonina obtenida de *L. erythrorhizon* por Mitsui Petrochemical Ind., ahora Mitsui Chemicals, Inc. (Tokio, Japón). En la actualidad paclitaxel (Taxol®), fabricado por Chitón Biotech, Inc. (Delta, BC, Canadá), y Genexol, el nombre comercial del compuesto paclitaxel de Samyang Genex, representan los fármacos contra el cáncer con mayor demanda en el mercado, con ventas anuales que alcanzan hasta 200-300 kg al año [113].

Tabla 2.1. Metabolitos secundarios derivados de plantas de uso comercial obtenidos a partir de CCS.

| Producto | Especie | Uso farmacéutico | Fabricante, nombre comercial y escala de producción | Tipo de cultivo |
|-------------------|-----------------------------------|---|---|-----------------|
| Ácido rosmarínico | <i>Coleus blumei</i> | Antiinflamatorio | ANattermann & Cie. Gmbh, | CCS |
| Berberinas | <i>Thalictrum minun</i> | Anticáncer; antibiótico; anti-inflamatorio | Mitsui Chemicals, Inc., [75,000 L _{br}] | CCS |
| Podofilotoxina | <i>Podophyllum spp.</i> | Anticancer | Nippon Oil Company, Ltd. | CCS |
| Docetaxel | <i>Taxus baccata</i> | Tratamiento del cáncer de ovario | Phyton Biotech, Inc., Taxotere [150 kg/year] https://phytonbiotech.com/ | CCS |
| Paclitaxel | <i>Taxus spp.</i> | Anticáncer: aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de ovario, mama y pulmón | Phyton Biotech, Inc., Taxol® [1,000 kg/year] https://phytonbiotech.com/ Samyang Genex Corporation., Genexol [32,000 L br] https://samyangbiopharm.com/eng/ProductIntroduce/injectio | CCS |
| Shikonina | <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | anti-VIH, antitumoral, anti-inflamatorio | Xi'an NEO Biotech, Shikonin 95% http://www.extractneo.com/ABOUT | CCS |

CCS: cultivo de células en suspensión. Modificada de [7].

2.2 Configuración de biorreactores utilizados para la MSDP

Los biorreactores se definen como recipientes cerrados que proporcionan un entorno controlado para transferir nutrientes y oxígeno a los cultivos celulares en concentraciones adecuadas que permitan a la célula mantener su actividad metabólica. La producción de MSDP a gran escala, representa un reto que comienza con la elección de la configuración del biorreactor. Existen diversas configuraciones de biorreactores, las más utilizadas para la producción comercial y a gran escala son el biorreactor de tanque agitado (BTA), biorreactor de columna de burbujas (BCB) y el biorreactor de airlift (BA) (Figura 2.1). La elección de dicha configuración suele realizarse en función de las condiciones que permitan el rendimiento óptimo de la actividad metabólica y cinética de los cultivos celulares, además de que el funcionamiento resulte flexible en relación con el mantenimiento de los cultivos mediante el control de las condiciones operativas, como la temperatura, el pH, la asepsia, la mezcla, la aireación y la escalabilidad, sin dejar un lado los costes económicos que esto representa [7,114].

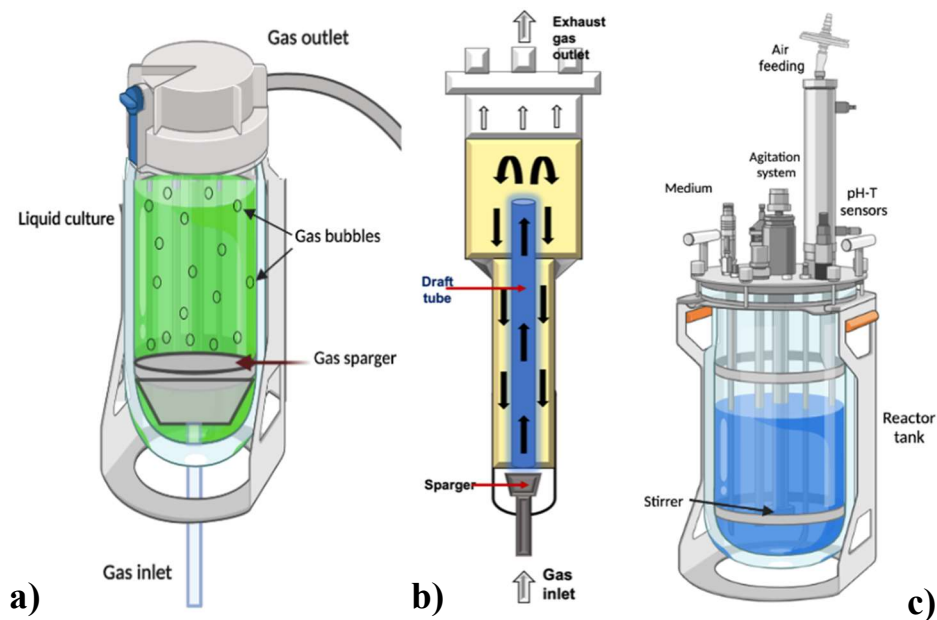


Imagen 2.1. Configuración de biorreactores comúnmente utilizados para el cultivo de tejido vegetales.

a) Biorreactor columna de burbujas

El BCB, como su nombre lo indica, es construido de columnas cilíndricas en donde la entrada de gas es la única entrada de energía al sistema, son clasificados como biorreactores neumáticos ya que funcionan con el burbujeo del gas que fluye desde abajo hacia arriba a través de boquillas, permitiendo la aireación y el mezclado, sin necesidad de accesorios mecánicos (Figura 2.1 a), lo cual les confiere una estructura sencilla que permite un mantenimiento fácil y reduce el riesgo de contaminación, además de reducir el estrés por efecto de cizallamiento. Sin embargo, también presentan diversas desventajas como; elevada formación de espuma, baja capacidad de transferencia de oxígeno y mezclado deficiente en fluidos muy viscosos [115,116].

b) Biorreactor Airlift

Los biorreactores airlift, también son clasificados como tipo neumático ya que el mezclado se logra con una corriente de gas que se comprime e inyecta por la parte inferior de un tubo (Figura 2.1 b)), logrando que el gas se expanda dando lugar a la formación de burbujas que ascienden a la parte superior. Son biorreactores de fácil mantenimiento y al igual que los BCB, reducen el riesgo de contaminación debido a la ausencia de accesorios mecánicos, pero a comparación de estos, presentan una mayor transferencia de nutrientes y oxígeno, pese a las ventajas que presentan, la mezcla es deficiente cuando se trabaja con fluidos muy viscosos y al igual que los BCB pueden presentar altos niveles de formación de burbujas [117,118].

c) Biorreactor de tanque agitado

Los BTA son clasificados de tipo mecánico ya que su configuración consiste en un mezclador de tipo turbina o hélice el cual es instalado dentro del tanque y una corriente de gas, que, en conjunto, logran la homogenización del sistema (Figura 2.1 c). Debido a que este tipo de biorreactores cuentan con piezas mecánicas, el riesgo de contaminación aumenta en comparación con los biorreactores neumáticos aunado al aumento en los costos de mantenimiento, limpieza y puesta en marcha [119,120].

2.3 Variables de operación y efecto sobre la obtención de MSDP.

Las variables de operación de los biorreactores influyen directamente en el crecimiento y mantenimiento de los CTV, favoreciendo o repercutiendo en la producción de MSDP. En este sentido, las variables de operación pueden influir desde el suministro de nutrientes hasta la implementación de trabajos mecánicos y neumáticos para mantener el proceso operando en condiciones óptimas. A continuación, se presentan dichas variables y su efecto en el rendimiento del cultivo celular [7].

2.3.1 Temperatura

La temperatura es una de las variables que se deben mantener bajo control, ya que un aumento produce pérdida de la viabilidad celular y por lo tanto disminución en la producción de MSDP, o bien podría actuar como un elicitador abiótico favoreciendo dicha producción. La temperatura óptima para CTV en biorreactores, oscila de 23 y 30 ° C [121]. Los sistemas de control de temperatura para biorreactores consisten en sondas de temperatura y jackets o bobinas como sistema de transferencia de calor [114].

2.3.2 Luz

Los CTV varían su respuesta fisiológica en la presencia de luz influyendo en la producción de MSDP. Es una de las variables más importantes que pueden afectar el crecimiento y morfogénesis de los cultivos celulares tanto en condiciones *in vivo* como en *in vitro*. Las condiciones más frecuentes para CTV, es el uso de fotoperiodos luz/oscuridad de 8/16 horas. Sin embargo, diversos estudios han reportado que condiciones de oscuridad total y exposición continua de luz se favorece la producción de MSDP (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Estudios reportados bajo diferentes condiciones de luz. Luz continua, fotoperiodos y oscuridad.

| Especie | PDSM | Condiciones de Luz | Tipo de cultivo | Referencia |
|----------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-------------------|
| <i>Vitis vinifera</i> | Fenólicos | Luz continua | CCS | [122] |
| <i>Clinacanthus nutans</i> | Polifenoles | Luz continua | CCS | [123] |
| <i>Theobroma cacao</i> | Fenólicos | Luz continua | CCS | [124] |
| <i>B. cordata</i> | Fenólicos | Fotoperiodos | CCS | [125] |
| <i>V. officinalis</i> | Fenólicos | Fotoperiodos | CC y CCS | [126] |
| <i>R. tinctorum</i> | Alcaloides | Oscuridad | CCS | [127] |
| <i>Arnebia sp.</i> | Fenólicos | Oscuridad | CCS | [128] |
| <i>T. minus</i> | Alcaloides | Oscuridad | CCS | [129] |

CCS cultivo de células en suspensión; CC cultivo de callo

2.3.3 pH

El pH proporciona el equilibrio adecuado de acidez/alcalinidad en el cultivo para evitar la lisis celular, por lo tanto, es una de las variables que influyen en el crecimiento y la producción de MSDP. El pH inicial de los cultivos vegetales suele oscilar entre 5.5 y 6.0, modificaciones repentinas pueden provocar cambios o pérdida de la absorción de nutrientes. Uno de los desafíos más relevantes durante el funcionamiento del biorreactor es la implementación exitosa de un sistema de control de pH eficiente [130,131].

2.3.4 Mezcla

La producción de biomasa y MSDP en los cultivos celulares, depende en gran medida de la conversión de sustratos en productos y la velocidad de reacción, las cuales son mediadas y controladas por mecanismos de transporte hacia y desde el lugar donde se produce la conversión [7]. El mezclado es la variable de operación encargada de optimizar dicho transporte, influyendo en el rendimiento de cultivo celular, de manera que cuando se controla adecuadamente, se minimizan las resistencias al transporte consiguiendo una distribución homogénea de los componentes o condiciones en el medio de cultivo [132]. El transporte de nutrientes y oxígeno en los CCS, se ve influenciado por la formación de aglomerados que se tienden a formar cuando las células hijas no se separan completamente de las células madre tras la división celular; dichos aglomerados están constituidos por varios centenares de células, que forman tamaños en torno a 0,5 cm de diámetro, estas estructuras conducen a la formación de poblaciones heterogéneas que crean microambientes que limitan las tasas de transferencia, provocando una disminución en el crecimiento y producción de MSDP [133].

Diversos estudios han demostrado que la producción de MSDP depende de la formación de aglomerados y su tamaño. En CCS de *Taxus*, la formación de pequeños aglomerados (~400 μm) produjeron cuatro veces más paclitaxel que agregados más grandes (~1100 μm) [134]. Khandy *et al*, [133], reportaron que la producción de MSDP en cultivos celulares de *Phlojodicarpus sibiricus* estaban directamente correlacionadas con el nivel de agregación celular, siendo más favorables en agregados de 10-30 células que en agregados de >50 células. Por otro lado, a pesar de las limitaciones de transferencia en los agregados, se ha reportado que la formación de grandes aglomerados puede favorecer la producción de MSDP, como es el caso de los cultivos en suspensión celular de *Psoralea corylifolia*, el tamaño de

agregado de 1200 ~ 2000 μm favoreció la producción de fitoestrógenos en comparación con los tamaños de 800 ~ 1200 μm [135]. Una forma sencilla de disminuir o romper los aglomerados es mediante el aumento en la velocidad de agitación, facilitando la absorción de los nutrientes y el oxígeno, resultando en el aumento de la tasa de crecimiento, y la conversión en los productos deseados [133,136]. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las células vegetales son sensibles al cizallamiento y superar el umbral de resistencia al estrés hidrodinámico puede inducir la ruptura de su pared celular, provocando la pérdida de productos valiosos [137].

2.3.5 Aireación

La aireación es otra de las variables de operación más importantes que actúa junto con el mezclado para mantener las condiciones aeróbicas superando las resistencias a la transferencia de oxígeno, contribuyendo a la síntesis de MSDP y teniendo un efecto beneficioso sobre el consumo de energía [138,139]. En la mayoría de las configuraciones de biorreactores la aireación se da mediante dispersores porosos en forma de difusores de bulbo, filtros sinterizados o placas perforadas, donde se generan burbujas de gas en el fondo del recipiente que ascienden por el medio de cultivo, produciendo una mezcla neumática. La transferencia de masa dependerá del tipo de dispersor y del caudal de gas [140]. En el caso de las células vegetales en los CCS los tiempos de duplicación son de 2 a 5 días, lo cual conduce a una baja demanda de oxígeno directamente relacionada con la concentración celular. Entre los parámetros importantes para establecer las condiciones de aireación se encuentra la tasa de absorción de oxígeno (TEAO) que en CCS es utilizada para monitorear la fisiología y demanda de oxígeno, este parámetro dependerá de la línea de cultivo, las condiciones de cultivo y de la tasa de crecimiento. Los valores típicos de TEAO para CCS van de 5 a 10 mmolO_2/Lh [141]. La tasa de transferencia de oxígeno (TTO) es otro parámetro importante que debe proporcionar la concentración de oxígeno necesario para satisfacer las demandas respiratorias de las células, favoreciendo el crecimiento y la producción de compuestos deseados, dicha concentración de oxígeno disuelto debe mantenerse por encima del nivel crítico del consumo de oxígeno que es del 15-20% de contenido de saturación de oxígeno en agua pura (1,3 a 1,6 g/m^3) [129]. La concentración de oxígeno disuelto no puede utilizarse como criterio de escalamiento, en su lugar, se utiliza el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (kLa) y el caudal de aire (vvm). El kLa es función tanto de la agitación

como de la aireación y se ve afectado por diversos factores como; las características geométricas y operativas del reactor (velocidad de agitación, tasa de aireación, hidrodinámica del fluido, composición del medio, tipo de células, morfología y concentración), que deben tomarse en cuenta al diseñar el biorreactor. De acuerdo con la literatura [118], para alcanzar un TEAO alrededor de 5 a 10 mmol O₂/L h en CCS de planta, se requiere un valor típico de kLa entre 10 y 50 h⁻¹.

Finalmente debido al efecto que tienen las variables de operación sobre el crecimiento y la producción de MSDP, diversos estudios se centran en evaluar diferentes condiciones de dichas variables (tabla 2.3)

Tabla 2.3. Condiciones utilizadas en los biorreactores y su efecto en el crecimiento y producción de MSDP.

| Especies | Compuestos | Bioreactor | Condiciones de operación | Variables de operación | Efecto de la variable de operación |
|----------------------|---------------|-----------------------------------|---|---|--|
| <i>B. cordata</i> | Fenólicos | BTA de 2 L y 3 L | 26 ± 2 °C, fotoperiodos de 16 h luz/8 h oscuridad, 0.1 vvm | Velocidad de agitación (120 y 400 rpm) | En ambos biorreactores, se observó un mayor estrés por cizallamiento a velocidades de 400 rpm, lo cual las fases y parámetros de crecimiento, dando lugar a la disminución de MSDP |
| <i>R. cordifolia</i> | Antraquinonas | BTA de 8 L | 25 ± 0.1 °C, la velocidad de agitación fue de 60 rpm y el volumen de trabajo fue de 5 L | Tipo de impulsor (cinta helicoidal y turbina Rushton) | El impulsor de cinta helicoidal proporcionó una mezcla homogénea y un menor esfuerzo de cizallamiento en comparación con la turbina Rushton. |
| <i>R. tinctorum</i> | Antraquinonas | BTA de 1.5 L, impulsor de turbina | 25 ± 2 °C, volumen de trabajo de 1.0 L, 1 vvm | Esfuerzo cortante (450 rpm) | La velocidad de agitación afectó a la viabilidad celular; sin embargo, favoreció la producción de MSDP |
| <i>Arnebia sp.</i> | Shikonina | Airlift de 2 L | 25 ± 2 °C, oxígeno disuelto (2 L min^{-1}) | Tipo de bioreactor | No se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento y la producción de MSDP en ambos biorreactores. |
| | | BTA de 2 L, impulsor de turbina | 25 ± 2 °C, 100 rpm, oxígeno disuelto (2 L min^{-1}) | | |

Tabla 2.3. Continuación.

| Especies | Compuestos | Bioreactor | Condiciones de operación | Variables de operación | Efecto de las variables de operación |
|---------------------|------------------------|-----------------------------|--|---|--|
| <i>T. minus</i> | Berberina | BTA de 2 L, turbina Rushton | 25°C en oscuridad, volumen de trabajo (1.75 L), 0.1 vvm | Velocidad de agitación (100–900 rpm) | La velocidad de 250 rpm favoreció el crecimiento celular y la producción de MSDP |
| | | | 25°C en oscuridad, volumen de trabajo (1.75 L), 0.1 vvm y 250 rpm | Fluctuaciones de oxígeno disuelto (25, 35 y 50 %) | Se observaron reducciones en la producción de berberina el oxígeno disuelto descendió por debajo del 35% de saturación de aire |
| <i>D. deltoidea</i> | Glucósidos esteroideos | BCB de 20 y 630 L | 26 ± 0.5 °C en oscuridad, volumen de trabajo de 15 L y 550 L. 1.0 vvm, oxígeno disuelto fue mantenido a 10–40% del volumen de saturación | Volumen de bioreactor | No se obtuvo ningún efecto significativo del volumen del bioreactor sobre el crecimiento celular y la producción de MSDP. |

BTA: biorreactor de tanque agitado; BCB: biorreactor de columna de burbuja; vvm: caudal volumétrico de gas por unidad volumen de medio de cultivo; MSDP: metabolitos secundarios derivados de plantas. Tabla modificada de [7].

3. Conclusiones

El CCS es una tecnología eficiente y amigable con el medio ambiente que destaca por sus excelentes atributos de escalamiento para la obtención de MSDP en biorreactores. La selección y diseño del biorreactor es una tarea compleja que depende de las propiedades del cultivo celular las cuales varían en función de la especie estudiada y de los fenómenos de transporte relacionados con la configuración del biorreactor.

El mezclado y la aireación son variables de operación críticas ya que de estas depende la transferencia de nutrientes y oxígeno necesarios para el crecimiento y la producción de MSDP.

La optimización de las condiciones de operación en los biorreactores mediante la elucidación de su efecto sobre las propiedades celulares es esencial para obtener mejores rendimientos de MSDP.

A pesar de la ardua investigación en este campo, pocos PDSM se comercializan a nivel industrial. Para ello, son necesarios más estudios centrados en correlacionar las variables operativas con los fenómenos cinéticos y de transporte para comprender el comportamiento de las células vegetales, proporcionando más bases para un crecimiento óptimo y una producción máxima de PDSM en biorreactores

4. PRESPECTIVAS DEL ESTUDIO

- Aislar e identificar los compuestos mayoritarios en los extractos metanólicos de la PS y cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* y evaluar su actividad antioxidante.
- Incrementar el rendimiento de los compuestos fenólicos identificados producidos por el CCS mediante el uso de elicitores.
- Evaluar la producción de los compuestos fenólicos identificados con actividad antioxidante del CCS de *A. pichichensis* mediante cinéticas en matraz Erlenmeyer.
- Evaluar la producción de compuestos fenólicos en biorreactor con el objetivo de optimizar su producción.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Georgiev, M.I.; Eibl, R.; Zhong, J.J. Hosting the plant cells *in vitro*: recent trends in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 3787–3800, doi:10.1007/s00253-013-4817-x.
2. Bhaskar, R.; Xavier, L.S.E.; Udayakumaran, G.; Kumar, D.S.; Venkatesh, R.; Nagella, P. Biotic elicitors: a boon for the *in vitro* production of plant secondary metabolites. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **2021**, doi:10.1007/s11240-021-02131-1.
3. Castro, A.H.F.; Braga, K. de Q.; de Sousa, F.M.; Coimbra, M.C.; Chagas, R.C.R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpigiaceae). *Rev. Cienc. Agron.* **2016**, *47*, 143–151, doi:10.5935/1806-6690.20160017.
4. Mendoza, D.; Arias, J.P.; Cuaspid, O.; Arias, M. Phytochemical screening of callus and cell suspensions cultures of *Thevetia peruviana*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2020**, *63*, doi:10.1590/1678-4324-2020180735.
5. Ruffoni, B.; Pistelli, L.; Bertoli, A.; Pistelli, L. Plant cell cultures: Bioreactors for industrial production. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *698*, 203–221, doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_15.
6. Zhang, Y.; Cai, P.; Cheng, G.; Zhang, Y. A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. *Nat. Prod. Commun.* **2022**, *17*, doi:10.1177/1934578X211069721.
7. Motolinia-Alcántara, A.E.; Castillo-Araiza, C.O.; Rodríguez-Monroy, M.; Román-Guerrero, A.; Cruz-Sosa, F. Engineering considerations to produce bioactive compounds from plant cell suspension culture in bioreactors. *Plants* **2022**, *10*, 1–26, doi:doi.org/10.3390/plants10122762.
8. Rolnik, A.; Olas, B. The plants of the asteraceae family as agents in the protection of human health. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–10, doi:10.3390/ijms22063009.
9. Sánchez-Ramos, M.; Marquina-Bahena, S.; Alvarez, L.; Román-Guerrero, A.; Bernabé-Antonio, A.; Cruz-Sosa, F. Phytochemical, pharmacological, and biotechnological study of *Ageratina pichinchensis*: a native species of Mexico. *Plants* **2021**, *10*, 1–17, doi:10.3390/plants10102225.
10. Motolinia-Alcántara, E.A.; Franco-Vásquez, A.M.; Nieto-Camacho, A.; Arreguín-Espinosa, R.; Rodríguez-Monroy, M.; Cruz-Sosa, F.; Román-Guerrero, A. Phenolic compounds from wild plant and *in vitro* cultures of *Ageratina pichichensis* and evaluation of their antioxidant activity. *Plants* **2023**, *12*, doi:10.3390/plants12051107.
11. Steingroewer, J.; Bley, T.; Georgiev, V.; Ivanov, I.; Lenk, F.; Marchev, A.; Pavlov, A. Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sci.* **2013**, *13*, 26–38, doi:10.1002/elsc.201100226.
12. Alamgir, A.N.M. *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts*; 2017; Vol. 73; ISBN 9783319638621.
13. Dogara Abdulrahman, M.; Manaf Ali, A.; Moneruzzaman Khandaker, M.; Fatihah Nur, H.N.; Nashriyah, M. Review on traditional knowledge and utilisation of medicinal plants. *Biosci. Res.* **2019**, *16*, 3298–3313.
14. Robles-García, M.A.; Aguilar, A.J.; Melesio, G.-L.; Rodrpiguez-Félix, F.; Morales-Del-Río, J.A.; Javier, G.-M.P.; Madrigal-Pulido, J.A.; Del-Toro-Sánchez, C.L. Qualitative identification of secondary metabolites and cytotoxicity determination of tempisque extracts (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Rev. Ciencias Biológicas y la Salud* **2016**, *XVIII*, 3–8.
15. Zaynab, M.; Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M.H.; Bahadar, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 198–202, doi:10.1016/j.micpath.2018.08.034.

16. Wang, S.; Alseekh, S.; Fernie, A.R.; Luo, J. The structure and function of major plant metabolite modifications. *Mol. Plant* **2019**, *12*, 899–919, doi:10.1016/j.molp.2019.06.001.
17. Jamwal, K.; Bhattacharya, S.; Puri, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2018**, *9*, 26–38, doi:10.1016/j.jarmap.2017.12.003.
18. Espinosa-Leal, C.A.; Puente-Garza, C.A.; Silverio, G.-L. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* **2018**, doi: 10.1007/s00425-018-2910-1
19. Phillips, G.C.; Garda, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* **2019**, *55*, 242–257, doi:10.1007/s11627-019-09983-5.
20. Pandey, H.; Pandey, P.; Singh, S.; Gupta, R.; Banerjee, S. Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma* **2015**, *252*, 647–655, doi:10.1007/s00709-014-0711-3.
21. Patel, S.R.; Joshi, A.G.; Pathak, A.R.; Shrivastava, N.; Sharma, S. Somatic embryogenesis in *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight and Arn along with assessment of shoot and callus cultures for HPTLC fingerprint and quantification of p-coumaric acid. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2021**, *145*, 173–189, doi:10.1007/s11240-020-02000-3.
22. Gonçalves, S.; Romano, A. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. *Second. Metab. - Sources Appl.* **2018**, doi:10.5772/intechopen.76414.
23. Villaseñor, J.L. Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Bot. Sci.* **2018**, *96*, 332–358, doi:10.17129/botsci.1872.
24. Gómez, F.; Quijano, L.; Calderón, J.S.; Perales, A.; Ríos, T. 2,2-Dimethylchromenes from *Eupatorium aschenbornianum*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2095–2097, doi:10.1016/0031-9422(82)83051-3.
25. Rios, M.Y.; Aguilar-Guadarrama, A.B.; Navarro, V. Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity. *Planta Med.* **2003**, *69*, 967–970, doi:10.1055/s-2003-45113.
26. Sánchez-Ramos, M.; Alvarez, L.; Romero-Estrada, A.; Bernabé-Antonio, A.; Marquina-Bahena, S.; Cruz-Sosa, F. Establishment of a cell suspension culture of *Ageratina pichinchensis* (Kunth) for the improved production of anti-inflammatory compounds. *Plants* **2020**, *9*, 1–19, doi:10.3390/plants9101398.
27. Aguilar-Guadarrama, B.; Navarro, V.; León-Rivera, I.; Rios, M.Y. Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 1559–1565, doi:10.1080/14786410902843301.
28. Sánchez-Mendoza, M.E.; Reyes-Trejo, B.; Sánchez-Gómez, P.; Rodríguez-Silverio, J.; Castillo-Henkel, C.; Cervantes-Cuevas, H.; Arrieta, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 66–71, doi:10.1016/j.fitote.2009.07.009.
29. Romero-Cerecero, O.; Zamilpa, A.; González-Cortazar, M.; Alonso-Cortés, D.; Jiménez-Ferrer, E.; Nicasio-Torres, P.; Aguilar-Santamaría, L.; Tortoriello, J. Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*. *Planta Med.* **2013**, *79*, 622–627, doi:10.1055/s-0032-1328462
30. Sánchez-Mendoza, M.E.; Rodríguez-Silverio, J.; Rivero-Cruz, J.F.; Rocha-González, H.I.; Pineda-Farías, J.B.; Arrieta, J. Antinociceptive effect and gastroprotective mechanisms of 3,5-diprenyl-4-hydroxyacetophenone from *Ageratina pichinchensis*. *Fitoterapia* **2013**, *87*, 11–19, doi:10.1016/j.fitote.2013.03.015.
31. Torres-Barajas, L.; Rojas-Vera, J.; Morales-Méndez, A.; Rojas-Fermín, L.; Lucena, M.; Buitrago, A. Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Ageratina jahnii* and

Ageratina pichinchensis collected in Mérida, Venezuela. *Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat.* **2013**, *12*, 92–98.

32. Mariana, S.R.; Bahena, S.M.; Antonio, R.E.; Antonio, B.A.; Francisco, C.S.; Judith, G.C.; Juan, J.A.F.; Irene, P.A.; Alvarez, L. Establishment and phytochemical analysis of a callus culture from *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) and its anti-inflammatory activity. *Molecules* **2018**, *23*, 1–14, doi:10.3390/molecules23061258.
33. Torres-Barajas, L.; Rojas Vera, J.; Buitrago Díaz, A.; Morales Méndez, A. Productos naturales y derivados semisintéticos de *Ageratina jah-nii* y *Ageratina pichinchensis*. *Cienc. e Ing.* **2018**, *40*, 77–86.
34. Navarro García, V.M.; Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Rios, M.Y.; Zepeda, G.; Rojas, M.G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *87*, 85–88, doi:10.1016/S0378-8741(03)00114-4.
35. Romero-cerecero, O.; Herrera-arellano, A.; Zamilpa-, A. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* on patients with tinea pedis : an explorative pilot study controlled with ketoconazole. **2006**, doi:10.1055/s-2006-951694.
36. Romero-Cerecero, O.; Zamilpa, A.; Jiménez-Ferrer, J.E.; Rojas-Bribiesca, G.; Román-Ramos, R.; Tortoriello, J. Double-blind clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of *Ageratina pichinchensis* extract on patients with mild to moderate onychomycosis. A comparative study with ciclopirox. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1430–1435, doi:10.1055/s-2008-1081338.
37. Romero-Cerecero, O.; Zamilpa-Álvarez, A.; Ramos-Mora, A.; Alonso-Cortés, D.; Jiménez-Ferrer, J.E.; Huerta-Reyes, M.E.; Tortoriello, J. Effect on the wound healing process and *in vitro* cell proliferation by the medicinal mexican plant *Ageratina pichinchensis*. *Planta Med.* **2011**, *77*, 979–983, doi:10.1055/s-0030-1250743.
38. Romero-Cerecero, O.; Zamilpa-Álvarez, A.; Jiménez-Ferrer, E.; Tortoriello, J. Exploratory study on the effectiveness of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* in patients with chronic venous leg ulcers. *Planta Med.* **2012**, *78*, 304–310, doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04110.x.
39. Romero-Cerecero, O.; Islas-Garduño, A.L.; Zamilpa, A.; Tortoriello, J. Effectiveness of *Ageratina pichinchensis* extract in patients with vulvovaginal candidiasis. A randomized, double-blind, and controlled pilot study. *Phyther. Res.* **2017**, *31*, 885–890, doi:10.1002/ptr.5802.
40. Ávila-Román, J.; Soliz-Rueda, J.R.; Bravo, F.I.; Aragonès, G.; Suárez, M.; Arola-Arnal, A.; Mulero, M.; Salvadó, M.J.; Arola, L.; Torres-Fuentes, C.; et al. Phenolic compounds and biological rhythms: Who takes the lead? *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *113*, 77–85, doi:10.1016/j.tifs.2021.04.050.
41. Piechota-Polanczyk, A.; Fichna, J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2014**, *387*, 605–620, doi:10.1007/s00210-014-0985-1.
42. Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 757–781, doi:10.1016/j.jff.2015.01.047.
43. Gulcin, İ. *Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview*; 2020; Vol. 94; ISBN 0123456789.
44. V. Eberhardt, M.; Yong Lee, C.; Hai Liu, R. Whale songs lengthen in response to sonar. *Nature* **2000**, *405*, 903, doi:10.1038/35016148.
45. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 143–152, doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002.
46. Shi, L.; Zhao, W.; Yang, Z.; Subbiah, V.; Suleria, H.A.R. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 81112–81129, doi:10.1007/s11356-022-23337-6.

47. GÜLÇİN, İ.; Daştan, A. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2007**, 685–695. doi: 10.1080/14756360601164903
48. Marsden, S.B. Antioxidant Determinations by the Use a Stable Free Radical. *Nat. Publ.* **1958**, 17, 1437.
49. Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Evans, C.A. Antioxidant Properties of Carotenes and Xanthophylls. *FEBS Lett.* **1996**, 384, 240–242.
50. J, S.; Kanazawa, I.; Sun, K.; T, M.; Yokayama, K.. Color coding the cell death status of plant suspension cells. *Biotechniques* **1999**, 26, 1060–1062, doi:10.2144/99266bm12.
51. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, 350–356, doi:10.1021/ac60111a017.
52. Andi, S.A.; Gholami, M.; Ford, C.M.; Maskani, F. Impact of light irradiance on the biosynthesis of ABA-elicited phenolic compounds in suspension-cultured *Vitis vinifera* L. cells. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2021**, 146, 387–400, doi:10.1007/s11240-021-02077-4.
53. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu. *Methods Enzymol. Oxid. Antioxidants Part A* **1999**, 299, 152–178, doi:10.1016/j.scienta.2016.11.004.
54. Barreira, J.C.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Oliveira, M.B.P.P.; Pereira, J.A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem.* **2008**, 107, 1106–1113, doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.030.
55. Ramirez-Lopez, L.M.; DeWitt, C.A.M. Analysis of phenolic compounds in commercial dried grape pomace by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Food Sci. Nutr.* **2014**, 2, 470–477, doi:10.1002/fsn3.136.
56. Dias, A.P.; Grotewold, E. Manipulating the accumulation of phenolics in maize cultured cells using transcription factors. *Biochem. Eng. J.* **2003**, 14, 207–216, doi:10.1016/S1369-703X(02)00225-5.
57. Domínguez, M.; Nieto, A.; Marin, J.C.; Keck, A.S.; Jeffery, E.; Céspedes, C.L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 5889–5895, doi:10.1021/jf0504972.
58. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231–1237.
59. Rossato, J.I.; Ketzer, L.A.; Centurião, F.B.; Silva, S.J.N.; Lüdtkke, D.S.; Zeni, G.; Braga, A.L.; Rubin, M.A.; Da Rocha, J.B.T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem. Res.* **2002**, 27, 297–303, doi:10.1023/A:1014907228580.
60. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275, doi:10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
61. Ng, T.B.; Liu, F.; Wang, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* **2000**, 66, 709–723, doi:10.1016/S0024-3205(99)00642-6.
62. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, 95, 351–358, doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
63. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 407–421, doi:10.1016/0076-6879(90)86134-H.
64. Pasternak, T.P.; Prinsen, E.; Ayaydin, F.; Miskolczi, P.; Potters, G.; Asard, H.; Van Onckelen, H.A.; Dudits, D.; Fehér, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in

leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 1807–1819, doi:10.1104/pp.000810.

65. Pathak, A.R.; Joshi, A.G.; Shrivastava, N.; Sharma, P. Regeneration and chemical profiling in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. *South African J. Bot.* **2017**, *113*, 413–420, doi:10.1016/j.sajb.2017.09.022.
66. Kolewe, M.E.; Roberts, S.C.; Henson, M.A. A population balance equation model of aggregation dynamics in *Taxus* suspension cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 472–482, doi:10.1002/bit.23321.
67. Modarres, M.; Esmailzadeh Bahabadi, S.; Taghavizadeh Yazdi, M.E. Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. *Cytotechnology* **2018**, *70*, 741–750, doi:10.1007/s10616-017-0178-0.
68. Gumerova, E.A.; Akulov, A.N.; Rumyantseva, N.I. Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. *Russ. J. Plant Physiol.* **2015**, *62*, 195–203, doi:10.1134/S1021443715020077.
69. Santos-Gomes, P.C.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Fernandes-Ferreira, M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* **2003**, *160*, 1025–1032, doi:10.1078/0176-1617-00831.
70. Arias, J.P.; Zapata, K.; Rojano, B.; Arias, M. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *163*, 87–91, doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014.
71. Vermeris, W.; Nicholson, R. *Phenolic compound biochemistry*; 2006; ISBN 9781402051630.
72. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268–3295, doi:10.1002/jssc.200700261.
73. Pereira, C.; Barros, L.; Ferreira, I.C. Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1068–1084, doi:10.1002/jsfa.7446.
74. Ozkan, E.; Karakas, F.P.; Yildirim, A.B.; Tas, I.; Eker, I.; Yavuz, M.Z.; Turker, A.U. Promising medicinal plant *Inula viscosa* L.: Antiproliferative, antioxidant, antibacterial and phenolic profiles. *Prog. Nutr.* **2019**, *21*, 652–661, doi:10.23751/pn.v21i3.7186.
75. Harouak, H.; Ibjibjen, J.; Nassiri, L. Phytochemical profile and best aqueous extraction method between two species from Asteraceae family that are very effective against oral diseases. *Chem. Africa* **2022**, *5*, 543–555, doi:10.1007/s42250-022-00333-4.
76. Prakash, G.; Srivastava, A.K. Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. **2007**, *42*, 93–97, doi:10.1016/j.procbio.2006.06.020.
77. Patle, T.K.; Shrivastava, K.; Kurrey, R.; Upadhyay, S.; Jangde, R.; Chauhan, R. Phytochemical screening and determination of phenolics and flavonoids in *Dillenia pentagyna* using UV–vis and FTIR spectroscopy. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *242*, 118717, doi:10.1016/j.saa.2020.118717.
78. Cicevan, R.; Sestras, A.F.; Plazas, M.; Boscaiu, M.; Vilanova, S.; Gramazio, P.; Vicente, O.; Prohens, J.; Sestras, R.E. Biological traits and genetic relationships amongst cultivars of three species of tagetes (Asteraceae). *Plants* **2022**, *11*, doi:10.3390/plants11060760.
79. Elger, A.; Lemoine, D.G.; Fenner, M.; Hanley, M.E. Plant ontogeny and chemical defence: Older seedlings are better defended. *Oikos* **2009**, *118*, 767–773, doi:10.1111/j.1600-0706.2009.17206.x.
80. Nieto-Trujillo, A.; Buendía-González, L.; García-Morales, C.; Román-Guerrero, A.; Cruz-Sosa, F.; Estrada-Zúñiga, M.E. Phenolic compounds and parthenolide production from *in vitro* cultures of *Tanacetum parthenium*. *Rev. Mex. Ing. Química* **2017**, *16*, 371–383,

doi:<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio709>.

81. Giordano, A.; Morales-Tapia, P.; Moncada-Basualto, M.; Pozo-Martínez, J.; Olea-Azar, C.; Nestic, A.; Cabrera-Barjas, G. Polyphenolic composition and antioxidant activity (ORAC, EPR and cellular) of different extracts of *Argylia radiata* *in vitro* plants and natural roots. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27030610.
82. Naranjo-Gómez, E.J.; Puertas-Mejía, M.A.; Mejía-Giraldo, J.C.; Amaya-Nieto, A.Z.; Atehortúa, L. Micropropagation of *Baccharis antioquiensis* (Asteraceae) and photoinduction of polyphenols by UV radiation. *Rev. Biol. Trop.* **2018**, *66*, 754–764, doi:10.15517/rbt.v66i2.33406.
83. Mishra, M.K.; Pandey, S.; Niranjana, A.; Misra, P. Comparative analysis of phenolic compounds from wild and *in vitro* propagated plant *Thalictrum foliolosum* and antioxidant activity of various crude extracts. *Chem. Pap.* **2021**, *75*, 4873–4885, doi:10.1007/s11696-021-01708-6.
84. Lugato, D.; Simão, M.J.; Garcia, R.; Mansur, E.; Pacheco, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2014**, *118*, 339–346, doi:10.1007/s11240-014-0486-4.
85. Gauchan, D.P.; Bhuju, S.; Lamichhane, J.; Shakya, R.; García-Gil, M.R. Establishment of regenerative callus, cell suspension system, and molecular characterization of *Taxus wallichiana* zucc. for the *in vitro* production of Taxol. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2021**, *11*, 022–034, doi:10.7324/JAPS.2021.110603.
86. Coimbra, M.C.; Chagas, R.C.R.; Vilela, M.S.P.; Castro, A.H.F. Growth, morphology and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* calli. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *18*, doi:10.1016/j.bcab.2019.101036.
87. Arciniega-Carreón, I.Y.; Ramírez-Sotelo, M.G.; Ramos-Valdivia, A.C.; Salas, C.E.; Ortega, A.; Oliver-Salvador, C. Metabolites in cultured cells of *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene display increased hypoglycemic activity compared to that seen in plant roots. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **2020**, *61*, 1039–1049, doi:10.1007/s13580-020-00281-3.
88. Coimbra, M.C.; Chagas, R.C.R.; Duarte-Almeida, J.M.; Castro, A.H.F. Influence of plant growth regulators and light on callus induction and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae). *Indian J. Exp. Biol.* **2017**, *55*, 584–590.
89. Isah, T.; Umar, S.; Mujib, A.; Sharma, M.P.; Rajasekharan, P.E.; Zafar, N.; Fruk, A. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2018**, *132*, 239–265, doi:10.1007/s11240-017-1332-2.
90. Szopa, A.; Ekiert, H. *In vitro* cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) - A potential biotechnological rich source of therapeutically important phenolic acids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 1941–1948, doi:10.1007/s12010-012-9622-y.
91. Mendoza, D.; Cuaspid, O.; Arias, J.P.; Ruiz, O.; Arias, M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnol. Reports* **2018**, *19*, e00273, doi:10.1016/j.btre.2018.e00273.
92. Szopa, A.; Kubica, P.; Snoch, A.; Ekiert, H. High production of bioactive depsides in shoot and callus cultures of *Aronia arbutifolia* and *aronia* × *prunifolia*. *Acta Physiol. Plant.* **2018**, *40*, 1–11, doi:10.1007/s11738-018-2623-x.
93. Ramezannezhad, R.; Aghdasi, M.; Fatemi, M. Enhanced production of cichoric acid in cell suspension culture of *Echinacea purpurea* by silver nanoparticle elicitation. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2019**, *139*, 261–273, doi:10.1007/s11240-019-01678-4.
94. Taghizadeh, M.; Nasibi, F.; Kalantari, K.M.; Benakashani, F. Callus establishment and cell suspension culture establishment of *Dracocephalum polychaetum* Bornm. and *Dracocephalum kotschyi* Boiss.: an *in vitro* approach for secondary metabolite production. *South African J. Bot.* **2020**, *132*, 79–

86, doi:10.1016/j.sajb.2020.04.015.

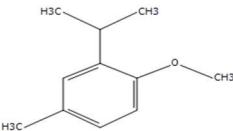
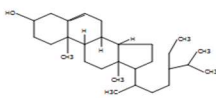
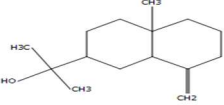
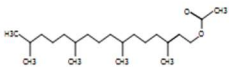
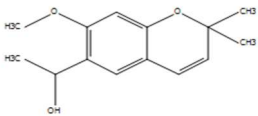
95. Kikowska, M.; Thiem, B.; Szopa, A.; Ekiert, H. Accumulation of valuable secondary metabolites: phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* systems of shoot cultures of the endangered plant species—*Eryngium alpinum* L. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2020**, *141*, 381–391, doi:10.1007/s11240-020-01795-5.
96. Ali, M.; Abbasi, B.H.; Ihsan-ul-haq Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 400–406, doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.033.
97. Liu, Y.L.; Hsu, C.C.; Huang, H.J.; Chang, C.J.; Sun, S.H.; Lin, A.M.Y. Gallic acid attenuated LPS-induced neuroinflammation: protein aggregation and necroptosis. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 96–104, doi:10.1007/s12035-019-01759-7.
98. Zeng, N.; Hongbo, T.; Xu, Y.; Wu, M.; Wu, Y. Anticancer activity of caffeic acid n-butyl ester against A431 skin carcinoma cell line occurs via induction of apoptosis and inhibition of the mTOR/PI3K/AKT signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 5652–5657, doi:10.3892/mmr.2018.8599.
99. Urbaniak, A.; Kujawski, J.; Czaja, K.; Szelag, M. Antioxidant properties of several caffeic acid derivatives: a theoretical study. *Comptes Rendus Chim.* **2017**, *20*, 1072–1082, doi:10.1016/j.crci.2017.08.003.
100. Mlcek, J.; Jurikova, T.; Skrovankova, S.; Sochor, J. Quercetin and its anti-allergic immune response. *Molecules* **2016**, *21*, 1–15, doi:10.3390/molecules21050623.
101. Temerdashev, Z.A.; Vinitskaya, E.A.; Korobkova, V. V. Determination of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. aqueous extracts by gas chromatography–mass spectrometry using solid-phase analytical derivatization. *J. Anal. Chem.* **2022**, *77*, 1463–1473, doi:10.1134/S1061934822110120.
102. Fiamegos, Y.C.; Nanos, C.G.; Vervoort, J.; Stalikas, C.D. Analytical procedure for the *in-vial* derivatization - Extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1041*, 11–18, doi:10.1016/j.chroma.2004.04.041.
103. Atapattu, S.N.; Rosenfeld, J.M. Solid phase analytical derivatization of anthropogenic and natural phenolic estrogen mimics with pentafluoropyridine for gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 9135–9141, doi:10.1016/j.chroma.2011.10.060.
104. Gutch, P.K. *Application of Gas Chromatography in Monitoring of Organic and Decontamination Reactions*; **2012**; ISBN 9789535102984.
105. Saeed, N.; Khan, M.R.; Shabbir, M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, doi:10.1186/1472-6882-12-221.
106. Esmacili, A.K.; Taha, R.M.; Mohajer, S.; Banisalam, B. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from *in vivo* and *in vitro* grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/643285.
107. Martysiak-Żurowska, D.; Wenta, W. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **2012**, *1*, 83–89.
108. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
109. Costa, P.; Gonçalves, S.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Romano, A. Accumulation of phenolic compounds *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *57*, 69–74, doi:10.1016/j.fct.2013.03.006.

110. Georgiev, M.I.; Eibl, R.; Zhong, J.J. Hosting the plant cells *in vitro*: Recent trends in bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 3787–3800, doi:10.1007/s00253-013-4817-x.
111. Alamgir *Cultivation of Herbal Drugs , Biotechnology , and In Vitro Production of Secondary Metabolites , High-Value Medicinal Plants , Herbal Wealth , and Herbal Trade Á Genetic erosion Á Habitat destruction Á*; **2017**; Vol. 1; ISBN 9783319638621.
112. Gonçalves, S.; Romano, A. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. *Second. Metab. - Sources Appl.* **2018**, doi:10.5772/intechopen.76414.
113. Frense, D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1233–1240, doi:10.1007/s00253-006-0711-0.
114. Singh, J.; Kaushik, N.; Biswas, S. Bioreactors – technology & design analysis. *The Scitech Journal.* **2014**.
115. Valdiani, A.; Hansen, O.K.; Nielsen, U.B.; Johannsen, V.K.; Shariat, M.; Georgiev, M.I.; Omidvar, V.; Ebrahimi, M.; Tavakoli Dinanai, E.; Abiri, R. Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, *39*, 20–34, doi:10.1080/07388551.2018.1489778.
116. Esperança, M.N.; Mendes, C.E.; Rodriguez, G.Y.; Cerri, M.O.; Béttega, R.; Badino, A.C. Sparger design as key parameter to define shear conditions in pneumatic bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **2020**, *157*, 107529, doi:10.1016/j.bej.2020.107529.
117. Prado Barragán, L.A.; Figueroa, J.J.B.; Rodríguez Durán, L.V.; Aguilar González, C.N.; Hennigs, C. *Fermentative Production Methods*; Elsevier Inc., **2016**; ISBN 9780128036488.
118. Werner, S.; Maschke, R.W.; Eibl, D.; Eibl, R. Bioreactor technology for sustainable production of plant cell-derived products. *Ref. Ser. Phytochem.* **2018**, 413–432, doi:10.1007/978-3-319-54600-1_6.
119. Tervasmäki, P.; Latva-Kokko, M.; Taskila, S.; Tanskanen, J. Effect of oxygen transfer on yeast growth — Growth kinetic and reactor model to estimate scale-up effects in bioreactors. *Food Bioprod. Process.* **2018**, *111*, 129–140, doi:10.1016/j.fbp.2018.08.004.
120. Fitzpatrick, J.J.; Gloanec, F.; Process, E.M. Insights from mathematical modelling into energy requirement and process design of continuous and batch stirred tank aerobic bioreactors. *ChemEngineering* **2019**, *3*, 1–19, doi:10.3390/chemengineering3030065.
121. Nartop, P. Engineering of biomass accumulation and secondary metabolite production in plant cell and tissue cultures. *Plant Metab. Regul. under Environ. Stress* **2018**, 169–194, doi:10.1016/B978-0-12-812689-9.00009-1.
122. Ali, M.; Abbasi, B.H. Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *140*, 223–227, doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.08.008.
123. Bong, F.J.; Subramaniam, S.; Chew, B.L. Effects of light illumination and subculture frequency on biomass production in cell suspension cultures of *Clinacanthus nutans*. *Malaysian Appl. Biol.* **2021**, *50*, 197–204.
124. Gallego, A.M.; Rojas, L.F.; Valencia, W.G.; Atehortúa, L.; Urrea, A.I.; Fister, A.S.; Guiltinan, M.J.; Maximova, S.N.; Pabón-Mora, N. Transcriptomic analyses of cacao flavonoids produced in photobioreactors. *BMC Genomics* **2021**, *22*, 1–18, doi:10.1186/s12864-021-07871-0.
125. Vazquez-Marquez, A.M.; Zepeda-Gómez, C.; Burrola-Aguilar, C.; Bernabé-Antonio, A.; Nieto-Trujillo, A.; Cruz-Sosa, F.; Rodríguez-Monroy, M.; Estrada-Zúñiga, M.E. Effect of stirring speed on the production of phenolic secondary metabolites and growth of *Buddleja cordata* cells cultured in mechanically agitated bioreactor. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2019**, *139*, 155–166, doi:10.1007/s11240-019-01673-9.

126. Kubica, P.; Szopa, A.; Kokotkiewicz, A.; Miceli, N.; Gniewosz, M.; Elansary, H.O.; Mahmoud, E.A.; El-ansary, D.O. Production of verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids in callus, suspension and bioreactor cultures of *Verbena officinalis* and biological properties of biomass extracts. **2020**.
127. Busto, V.D.; Calabró-López, A.; Rodríguez-Talou, J.; Giuliatti, A.M.; Merchuk, J.C. Anthraquinones production in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures: down scale of shear effects. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *77*, 119–128, doi:10.1016/j.bej.2013.05.013.
128. Gupta, K.; Garg, S.; Singh, J.; Kumar, M. Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia* sp. and its up-scaling through bioreactor. *3 Biotech* **2014**, *4*, 263–273, doi:10.1007/s13205-013-0149-x.
129. Cheung, C.K.L.; Leksawasdi, N.; Doran, P.M. Bioreactor scale-down studies of suspended plant cell cultures. *AIChE J.* **2018**, *64*, 4281–4288, doi:10.1002/aic.16415.
130. Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61*, 0–21, doi:10.1080/16546628.2017.1361779.
131. Zhong, J.J. *Bioreactor Engineering*; Second Edi.; Elsevier B.V., **2011**; Vol. 2; ISBN 9780080885049.
132. Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Santos, V.E. Fluid dynamic conditions and oxygen availability effects on microbial cultures in STBR: an overview. *Biochem. Eng. J.* **2020**, *164*, 107803, doi:10.1016/j.bej.2020.107803.
133. Khandy, M.T.; Kochkin, D. V.; Tomilova, S. V.; Klyushin, A.G.; Galishev, B.A.; Nosov, A.M. Growth and biosynthetic characteristics of *Phlojodicarpus sibiricus* cell suspension cultures. *Russ. J. Plant Physiol.* **2021**, *68*, 569–578, doi:10.1134/S1021443721020060.
134. Kolewe, M.E.; Henson, M.A.; Roberts, S.C. Analysis of aggregate size as a process variable affecting paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures. *Biotechnol. Prog.* **2011**, *27*, 1365–1372, doi:10.1002/btpr.655.
135. Satdive, R.; Shinde, A.N.; Singh, S.; Kamble, S.; Singh, S.; Malpathak, N.; Fulzele, D.P. Aggregate cell suspension cultures of *Psoralea corylifolia* improved phytoestrogens production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2015**, *20*, 373–379, doi:10.1007/s12257-014-0536-0.
136. Wilson, S.A.; Cummings, E.M.; Roberts, S.C. Multi-scale engineering of plant cell cultures for promotion of specialized metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29*, 163–170, doi:10.1016/j.copbio.2014.07.001.
137. Titova, M. V.; Popova, E. V.; Konstantinova, S. V.; Kochkin, D. V.; Ivanov, I.M.; Klyushin, A.G.; Titova, E.G.; Nebera, E.A.; Vasilevskaya, E.R.; Tolmacheva, G.S.; et al. Suspension cell culture of *Dioscorea deltoidea*—a renewable source of biomass and furostanol glycosides for food and pharmaceutical industry. *Agronomy* **2021**, *11*, 394, doi:10.3390/agronomy11020394.
138. Maischberger, T. Optimized process and bioreactor characterization. *Chemie-Ingenieur-Technik* **2019**, *91*, 1719–1723, doi:10.1002/cite.201900134.
139. Süntar, I.; Çetinkaya, S.; Haydaroglu, Ü.S.; Habtemariam, S. Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: biotechnological aspects. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *50*, doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107768.
140. Yasin, M.; Jang, N.; Lee, M.; Kang, H.; Aslam, M.; Bazmi, A.A.; Chang, I.S. Bioreactors, gas delivery systems and supporting technologies for microbial synthesis gas conversion process. *Bioresour. Technol. Reports* **2019**, *7*, 100207, doi:10.1016/j.biteb.2019.100207.
141. Eibl, R.; Meier, P.; Stutz, I.; Schildberger, D.; Hühn, T.; Eibl, D. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 8661–8675, doi:10.1007/s00253-018-9279-8.

ANEXO A

Tabla 3. Compuestos identificados mediante CG-MS de extractos metanólicos de la planta creciendo en condiciones naturales y cultivos *in vitro* de *A. pichihcneis* sin derivatizar.

| Tipo de compuesto | Nº de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|------------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------|---|-------------|---|
| Hidrocarburo aromático | 5 | 2-Isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno | 12.17 |  | PS | 5.41 |
| | | | 36.01 |  | PI | 17.54 |
| 36.01 | CC-T4 | 9.41 | | | | |
| 35.48 | CCS-12d | 18.62 | | | | |
| 36.01 | CCS-16d | 25.54 | | | | |
| Terpenos | 7 | beta-Eudesmol | 18.96 |  | PS | 10.78 |
| | | | 8 | Acetato de fitol | 21.32 |  |
| Cromenos | 9 | Encecalol | 21.05 |  | PS | 27.05 |
| | | | 21.05 | | CC-T3 | 35.42 |

PS planta silvestre, PI planta *in vitro*, CC cultivo de callos, CCS cultivo de células en suspensión

Tabla 3. Continuación.

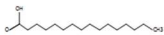
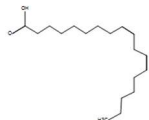
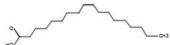
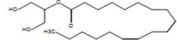
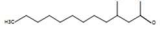

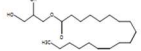
| Tipo de compuesto | N° de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|---|---|-------------|-------------------------|
| Ac. grasos | 10 | Ácido palmítico | 22.82 |  | PS | 14.73 |
| | | | 22.81 | | PI | 4.42 |
| | | | 22.81 | | CC-T3 | 36.45 |
| | | | 22.81 | | CC-T4 | 3.94 |
| | | | 22.81 | | CCS-12d | 6.36 |
| | | | 22.81 | | CCS-16d | 17.44 |
| | 11 | Ácido linoleico | 24.85 |  | PS | 5.32 |
| | | | 24.84 | | PI | 3.87 |
| | | | 24.84 | | CC-T4 | 3.42 |
| | | | 24.84 | | CCS-12d | 5.63 |
| | | | 24.86 | | CCS-16d | 18.99 |
| | 12 | Ácido oleico | 24.91 |  | PS | 7.67 |
| | | | 24.9 | | PI | 1.38 |
| | | | 21.91 | | CC-T4 | 1.80 |
| | 13 | 2-Linoleoilglicerol | 30.53 |  | PS | 6.78 |
| | 14 | Ácido 3-hidroxi-decanoico | 18.68 |  | CCS-12d | 1.90 |
| 15 | 2-Palmitoilglicerol | 28.8 |  | PI | 4.45 | |
| | | 28.8 | | CC-T4 | 3.11 | |
| | | 28.8 | | CCS-12d | 5.41 | |
| | | 28.8 | | CCS-16d | 8.85 | |
| 16 | Monolinoleato de glicerilo | 30.5 |  | PI | 5.68 | |
| | | 30.5 | | CC-T4 | 4.21 | |
| | | 30.5 | | CCS-12d | 5.57 | |
| | | 30.5 | | CCS-16d | 2.23 | |

Tabla 3. Continuación.


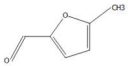
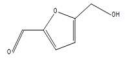
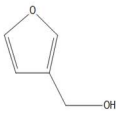
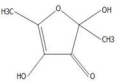
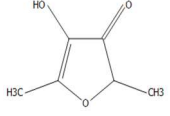
| Tipo de compuesto | N° de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|-----------------|--|---|--|-------------|-------------------------|
| Furano | 17 | Furfural | 4.65 |  | PI | 2.40 |
| | | | 4.62 | | CC-T4 | 3.65 |
| | 18 | 5-Metilfurfural | 7.07 |  | PI | 1.35 |
| | | | 7.07 | | CC-T4 | 1.28 |
| | 19 | 5-hidroximetilfurfural | 12.16 |  | PI | 41.56 |
| | | | 12.24 | | CC-T4 | 52.22 |
| | | | 12.11 | | CCS-12d | 21.61 |
| | | | 12.05 | | CCS-16d | 3.42 |
| | 20 | 3-Furanmetanol | 5.02 |  | CC-T4 | 3.13 |
| | 21 | 2,4-Dihidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona | 7.36 |  | PI | 1.74 |
| | | | 7.36 | | CC-T4 | 3.58 |
| | | | 7.37 | | CCS-12d | 2.34 |
| 22 | Furaneol | 8.94 |  | CC-T4 | 1.98 | |
| | | 8.88 | | CCS-12d | 1.90 | |

Tabla 3. Continuación.

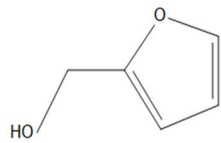
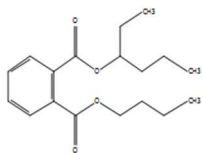
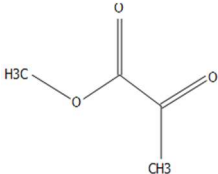
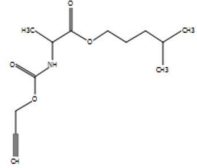
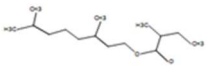
| Tipo de compuesto | N° de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|-----------------|---|---------------------------|---|-------------|-------------------------|
| Furano | 24 | 2-Furanmetanol | 5.02 |  | CCS-12d | 5.60 |
| Ester | 25 | Ácido ftálico, éster butílico hex-3-ílico | 22.92 |  | CC-T3 | 18.46 |
| | | | 22.92 | | CCS-12d | 2.45 |
| | 26 | Piruvato de metilo | 3.94 |  | CC-T4 | 1.36 |
| | | | 3.95 | | CCS-12d | 1.84 |
| | 27 | D-Alanine, N-propargyloxycarbonyl-, isohexyl ester | 9.27 |  | CCS-16d | 7.45 |
| | 28 | Ácido butanoico, 2-metil-, 3,7-dimetil-2,6-octadienil éster, (E)- | 17.73 |  | PS | 11.99 |

Tabla 3. Continuación.

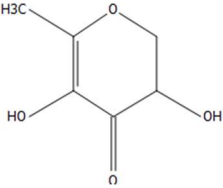
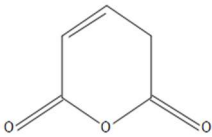
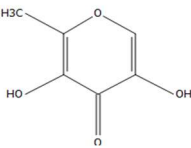
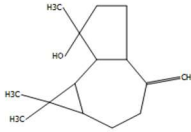
| Tipo de compuesto | Nº de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|-----------------|--|---------------------------|---|-------------|-------------------------|
| | 29 | 4H-Piran-4-uno, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil- | 10.57 |  | PI | 11.75 |
| 10.63 | | | CC-T4 | | 1.36 | |
| 10.57 | | | CCS-12d | | 11.68 | |
| 1.53 | | | CCS-16d | | 3.41 | |
| Piranona | 30 | 2H-Piran-2,6(3H)-diona | 7.64 |  | PI | 1.32 |
| | 31 | 4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl- | 11.3 |  | PI | 2.53 |
| Azuleno | 32 | 1H-cicloprop[e]azulen-7-ol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-, [1ar (1a.alfa.,4a.alfa.,7.beta.,7a.beta.,7b.alfa.)]. | 17.9 |  | PS | 3.12 |

Tabla 4. Compuestos identificados en los extractos metanólicos de la planta creciendo en condiciones naturales y cultivos in vitro de *A.pichichensis* muestras derivatizadas.

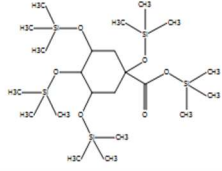
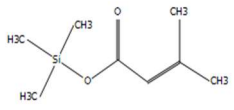
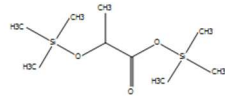
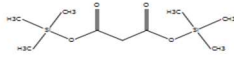
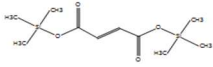
| Tipo de compuesto | N° de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % de contenido |
|-------------------|-----------------|--|---------------------------|---|-------------|----------------|
| Ácidos orgánicos | 3 | Ácido quinínico (5TMS) | 22.04 |  | PS | 33.17 |
| | | | 22.02 | | PI | 14.34 |
| | | | 22.01 | | CCS-16d | 12.24 |
| | 4 | Ácido 3,3-dimetilacrílico, derivado TMS | 7.28 |  | PS | 1.86 |
| | 5 | Ácido láctico, derivado 2TMS | 9.1 |  | PS | 0.96 |
| | | | 9.1 | | PI | 9.64 |
| | | | 9.08 | | CCS-12d | 10.69 |
| | | | 9.08 | | CCS-16d | 3.86 |
| | 6 | Ácido propanodioico, derivado 2TMS | 11.77 |  | PS | 1.66 |
| | | | 11.77 | | CC-T3 | 1.54 |
| | 7 | Ácido 2-butenedioico, (E)-, derivado 2TMS/Fumaric Acid | 14.21 |  | PS | 10.64 |
| | | | 14.2 | | PI | 9.29 |
| | | | 14.2 | | CC-T3 | 3.33 |
| | | | 14.2 | | CC-T4 | 5.48 |

Tabla 4. Continuación.

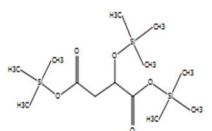
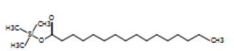
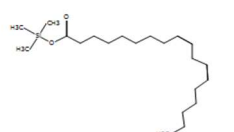
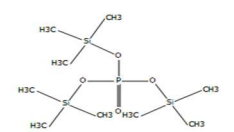
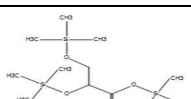
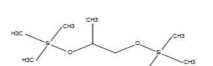
| Tipo de compuesto | Nº de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|------------------------------------|--------------------------------|---|---|--|-------------|-------------------------|
| Ácido carboxílico/Ácidos orgánicos | 8 | Ácido málico, derivado 3TMS | 16.62 |  | PS | 1.82 |
| | | | 16.61 | | CC-T3 | 3.11 |
| | | | 16.61 | | CC-T4 | 4.99 |
| | | | 16.61 | | CCS-16d | 2.90 |
| | 9 | Ácido palmítico, derivado TMS | 23.88 |  | PS | 5.18 |
| | | | 23.87 | | PI | 16.12 |
| | | | 23.88 | | CC-T3 | 5.08 |
| | | | 23.88 | | CC-T4 | 12.84 |
| | | | 23.88 | | CCS-16d | 11.5 |
| | 10 | Ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z)-, derivado TMS/ Acido linoleico | 25.76 |  | PS | 3.71 |
| | | | 25.76 | | CCS-16d | 13.36 |
| | 12 | Ácido butanodioico, derivado 2TMS/acido succinico | 13.66 |  | CC-T3 | 4.08 |
| | | | 13.66 | | CC-T4 | 7.83 |
| | | | 13.66 | | CCS-12d | 5.66 |
| | | | 13.66 | | CCS-16d | 3.27 |
| 14 | Ácido glicérico, derivado 3TMS | 14.07 |  | PS | 0.53% | |
| 15 | Propilenglicol, derivado 2TMS | 7.93 |  | PS | 0.50% | |

Tabla 4. Continuación.

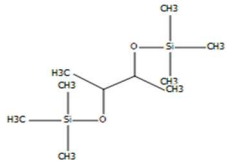
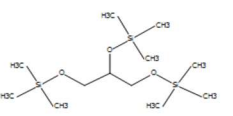
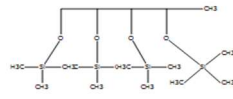
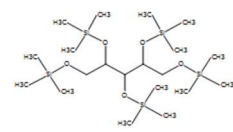
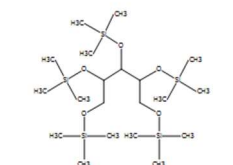
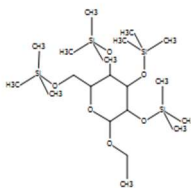
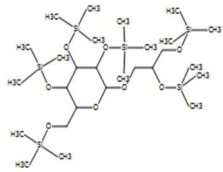
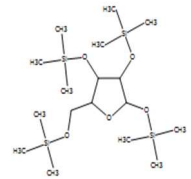



| Tipo de compuesto | N° de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|---|-------------|-------------------------|
| | 16 | 2,3-Butanodiol, derivado 2TMS | 8.73 |  | PS | 0.90 |
| | 17 | Glycerol, 3TMS derivado | 13.11 |  | PS | 24.17 |
| Alcoholes | 18 | 1-Deoxipentitol, derivado 4TMS | 17.51 |  | PS | 1.04 |
| | | | 17.5 | | CC-T3 | 2.91 |
| | | | 17.5 | | CC-T4 | 10.52 |
| | | | 17.5 | | CCS-12d | 12.79 |
| | | | 17.5 | | CCS-16d | 6.63 |
| | 19 | L-(-)-Arabitol, derivado 5TMS | 20.03 |  | PS | 1.62 |
| | 20 | Xilitol, derivado 5TMS | 20.15 |  | PS | 2.62 |

Tabla 4. Continuación.

| Tipo de compuesto | N° de compuesto | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Estructura molecular | Tratamiento | % contenido tratamiento |
|-------------------|-----------------|---|---------------------------|---|-------------|-------------------------|
| Glucosidos | 21 | Etil .alfa.-D-glucopiranosido, derivado 4TMS | 22.96 |  | PI | 27.19 |
| | | | 22.96 | | CC-T3 | 65.26 |
| | | | 22.95 | | CC-T4 | 31.30 |
| | | | 22.95 | | CCS-12d | 12.92 |
| | | | 22.95 | | CCS-16d | 11.35 |
| Glucosidos | 22 | Gliceril-glucósido Éter TMS | 27.32 |  | PI | 23.42 |
| | | | | | | |
| Furano | 23 | 3-Aminodihidro-2(3H)-furanona, derivado TBDMS | 6.72 |  | CCS-16d | 4.54 |

Article

Phenolic Compounds from Wild Plant and *In Vitro* Cultures of *Ageratina pichichensis* and Evaluation of Their Antioxidant Activity

Elizabeth Alejandra Motolinia-Alcántara ¹, Adrián Marcelo Franco-Vásquez ², Antonio Nieto-Camacho ³, Roberto Arreguin-Espinosa ² , Mario Rodríguez-Monroy ⁴, Francisco Cruz-Sosa ^{1,*}  and Angelica Román-Guerrero ^{1,*} 

- ¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril de San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1a. Sección, Alcaldía Iztapalapa, Ciudad de México 09310, Mexico
- ² Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico
- ³ Laboratorio de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico
- ⁴ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Departamento de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Yauatepec 62731, Mexico
- * Correspondence: culhp@xanum.uam.mx (F.C.-S.); arogue@xanum.uam.mx (A.R.-G.); Tel.: +52-55-5804-4600 (ext. 2847) (A.R.-G.)



Citation: Motolinia-Alcántara, E.A.; Franco-Vásquez, A.M.; Nieto-Camacho, A.; Arreguin-Espinosa, R.; Rodríguez-Monroy, M.; Cruz-Sosa, F.; Román-Guerrero, A. Phenolic Compounds from Wild Plant and *In Vitro* Cultures of *Ageratina pichichensis* and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Plants* 2023, 12, 1107. <https://doi.org/10.3390/plants12051107>

Academic Editor: Iyyakkannu Sivanesan

Abstract: *Ageratina pichichensis*, is commonly used in traditional Mexican medicine. *In vitro* cultures were established from wild plant (WP) seeds, obtaining *in vitro* plant (IP), callus culture (CC), and cell suspension culture (CSC) with the objective to determine total phenol content (TPC) and flavonoids (TFC), as well as their antioxidant activity by DPPH, ABTS and TBARS assays, added to the compound's identification and quantification by HPLC, from methanol extracts obtained by sonication. CC showed significantly higher TPC and TFC than WP and IP, while CSC produced 2.0–2.7 times more TPC than WP, and IP produced only 14.16% TPC and 38.8% TFC compared with WP. There were identified compounds such as epicatechin (EPI), caffeic acid (CfA), and p-coumaric acid (pCA) in *in vitro* cultures that were not found in WP. The quantitative analysis shows gallic acid (GA) as the least abundant compound in samples, whereas CSC produced significantly more EPI and CfA than CC. Despite these results, *in vitro* cultures show lower antioxidant activity than WP, for DPPH and TBARS WP > CSC > CC > IP and ABTS WP > CSC = CC > IP. Overall, *A. pichichensis* WP and *in vitro* cultures produce phenolic compounds with antioxidant activity, especially CC and CSC, which are shown to be a biotechnological alternative for obtaining bioactive compounds.

Keywords: *Ageratina pichichensis*; antioxidant activity; callus culture; cell suspension culture; phenolic compounds

DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12051107>

Review

Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors

Elizabeth Alejandra Motolinia-Alcántara ¹, Carlos Omar Castillo-Araiza ², Mario Rodríguez-Monroy ³,
Angélica Román-Guerrero ^{1,*} and Francisco Cruz-Sosa ^{1,*}

- ¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril de San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México 09310, Mexico; eama@xanum.uam.mx
 - ² Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril de San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México 09310, Mexico; coca@xanum.uam.mx
 - ³ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Departamento de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Yauhtepec 62731, Mexico; mrmmonroy@ipn.mx
- * Correspondence: aroque@xanum.uam.mx (A.R.-G.); culp@xanum.uam.mx (F.C.-S.);
Tel.: +52-55-5804-4600 (ext. 2847) (A.R.-G.)



Citation: Motolinia-Alcántara, E.A.; Castillo-Araiza, C.O.; Rodríguez-Monroy, M.; Román-Guerrero, A.; Cruz-Sosa, F. Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. *Plants* 2021, 10, 2762. <https://doi.org/10.3390/plants10122762>

Academic Editors: Milan S. Stankovic, Paula Baptista and Petronia Carrillo

Received: 9 November 2021
Accepted: 6 December 2021
Published: 14 December 2021

Abstract The large-scale production of plant-derived secondary metabolites (PDSM) in bioreactors to meet the increasing demand for bioactive compounds for the treatment and prevention of degenerative diseases is nowadays considered an engineering challenge due to the large number of operational factors that need to be considered during their design and scale-up. The plant cell suspension culture (CSC) has presented numerous benefits over other technologies, such as the conventional whole-plant extraction, not only for avoiding the overexploitation of plant species, but also for achieving better yields and having excellent scaling-up attributes. The selection of the bioreactor configuration depends on intrinsic cell culture properties and engineering considerations related to the effect of operating conditions on thermodynamics, kinetics, and transport phenomena, which together are essential for accomplishing the large-scale production of PDSM. To this end, this review, firstly, provides a comprehensive appraisal of PDSM, essentially those with demonstrated importance and utilization in pharmaceutical industries. Then, special attention is given to PDSM obtained out of CSC. Finally, engineering aspects related to the bioreactor configuration for CSC stating the effect of the operating conditions on kinetics and transport phenomena and, hence, on the cell viability and production of PDSM are presented accordingly. The engineering analysis of the reviewed bioreactor configurations for CSC will pave the way for future research focused on their scaling up, to produce high value-added PDSM.

Keywords: medicinal plant; bioactive compounds; plant-derived secondary metabolites (PDSM); cell suspension culture (CSC); bioreactor engineering

DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10122762>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00281

Matrícula: 2163803283

Cuantificación de compuestos bioactivos y evaluación de la actividad antioxidante de la planta silvestre y cultivos in vitro de *Ageratina pichichensis*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 1 del mes de diciembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. RICARDO REYES CHILPA
DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA



ELIZABETH ALEJANDRA MOTOLINIA ALCANTARA
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: ELIZABETH ALEJANDRA MOTOLINIA ALCANTARA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. RICARDO REYES CHILPA

VOCAL

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

SECRETARIO

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA