

“In Calli Ixcahuicopa”



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**"Producción de betalainas en cultivos
in vitro de Amaranthaceas"**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en B. E. BERENICE GUADARRAMA FLORES

Director de Tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa
Co-Director de Tesis: Dr. Mario Rodríguez Monroy
Asesor: Dr. Fernando Gandía Herrero

México, D.F.

Julio 2015

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

La firmante de esta Tesis ha disfrutado de una “Beca de Doctorado otorgada por el CONACYT, con número de becario 13587 (septiembre 2011-julio 2015). Durante su estancia en el Centro de Productos Bióticos-IPN (Yautepec, Morelos), se le otorgó la beca de Movilidad Nacional Santander (agosto-diciembre 2012). Para realizar la estancia en la Universidad de Murcia (España), contó con beca Mixta de Movilidad CONACYT, apoyo de la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrados (AUIP: España) (enero-noviembre 2014) y beca Santander Iberoamérica (enero-junio 2015).

LUGAR DE REALIZACIÓN:

Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 México, D.F., México.

Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales. Departamento de Biotecnología. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi). Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro. C.P. 62731. Yautepec, Morelos, México.

Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología Enzimática. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, E-30100 Espinardo, Murcia., España.



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Biotecnología

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

México, D.F. a 17 de Julio del 2015

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

"Producción de betalainas en cultivos *in vitro* de Amaranthaceas"

Que presentó

M. en B. E. Berenice Guadarrama Flores

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Co-Director: Dr. Mario Rodríguez Monroy

Centro de Productos Bióticos-IPN

Asesor: Dr. Fernando Gandía Herrero

Universidad de Murcia

Jurado:

Presidente:

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Dr. José Ramón Verde Calvo

Secretario:

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal:

Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS

Dra. María del Pilar Nicasio Torres

Vocal:

Universidad Autónoma del Estado de México

Dra. María Elena Estrada Zúñiga

En memoria de:

*Mauricio Gustavo
Gíl Gutiérrez*

Roberto Flores Colín

Gustavo Gíl Mathieu



*Tres grandes maestros de vida,
quienes día a día siguen compartiéndome su LUZ*

Lo esencial es invisible a los ojos...

“El principito”. Antoine De Saint-Exupery

En el jardín de la vida he visto muchos caminos y colores. Cada camino me ha llevado a un color y cada color me ha llevado a un camino. Así fue, como siguiendo el color verde, en 2001, llegue a la **UAM-I** y me albergue “*en el agua de las lajas*”: **Iztapalapa**. Entre los pasillos blancos y sinfónicos prados de la Universidad, fui encontrando veredas internas que me llevaron a descubrir otros tantos parajes; como el “*lugar alrededor de los tules*”: **Tulyehualco**, pueblo ancestral a quien le agradezco haberme compartido sus alegres y coloridos cultivares de amaranto; que a su vez me llevaron a redescubrir el escondido R-003 de la UAM-I, donde en 2010 conocí al **Dr. Francisco Cruz Sosa**, a quien nunca se lo he contado, pero desde los primeros trimestres de mi llegada a la UAM-I, encontré este sitio y para mis adentros dije - algún día trabajaré allí en “Fitoquímica”, como se llamaba antiguamente este laboratorio. Así nueve años después de mi llegada a la UAM-I conocí al Dr. Cruz Sosa, a quien le agradezco enormemente haberme brindado su confianza y la total libertad de movimiento y acción, dando soporte y apoyo a cada elección de los caminos que fui tocando a través de estos ya casi cinco años de conocernos. Agradezco también a todo su equipo de trabajo, por mostrarme el fascinante mundo *in vitro* y haberme impulsado a emprender otros tantos viajes. Gracias a todos los que alguna vez formaron o siguen siendo parte de ese equipo: Dra. Leticia Buendía, Dra. Ma. Elena Estrada, Dr. Juan Orozco, Dra. Amalia Maldonado, Maestro Lechuga, Dr. Antonio Bernabé, Alex, Rayn, Lilia, Mireya, May, Alexa, Hypatia, Epon, Aurelio...

La Dra. Micaela de la O Olán del INIFAP, fue quien me proporcionó con la alegría que la caracteriza y de manera desinteresada las semillas y los ejemplares de amaranto, mil gracias doctora por confiar en un proyecto que apenas iniciaba y de cuya existencia usted no tenía conocimiento. Fue en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UAM-I, donde sobre una solución compleja y nutritiva, planté esas semillas de amaranto, de las cuales comenzó a surgir la radícula que se fue ramificando por diferentes rincones del mundo; su color amarillento me llevo a conocer y a vivir “*en el cerro del pericón*”: **Yautepec**, donde entre cañaverales verdes, mariposas blancas, buganvillas violetas, cuijas ocres, arroyos grisáceos y árboles de cuaguayote; oculto entre la Barranca Honda, encontré en 2012 el **CeProBi**. En CeProBi, me abrazo con cariño el grupo de Investigación de Biotecnología Vegetal del **Dr. Mario Rodríguez Monroy** y de su esposa **Gabriela Sepúlveda Jiménez**, a quienes les agradezco infinitamente su tiempo, su confianza, su amistad, su solidaridad y todos sus conocimientos compartidos. En ese clima tan cálido aprendí el valor de los amigos, de las palabras, las sonrisas, el tiempo compartido y de no olvidar incluir el postre en la vida. Gracias de todo corazón a mis amigas y hermanas Leticia Pavón Reyes y Jaqueline Téllez Vargas por acompañar mi crecimiento en todo este tiempo. Gracias a Jorge Cantor, Humberto Reyes, Rafael Garibay, Roberto Sibaja, Laura Chiquiza, la maestra “Toñita”, la maestra Sandra, el Sr. Homero, Paul, Sandra...

Así paso a paso, en ese ir y venir de vida, cruce el océano. La misteriosa “mancha amarilla” proveniente del cultivo de amaranto, me llevo a mirar como amanece y anochece en el “*lugar donde crecen los mirtos*”: **Murcia**. En la Huerta de Europa que viste su aire de naranjas y rosas, un

día nublado y ventoso de enero del 2014, conocí a mi “profesor” el **Dr. Fernando Gandía Herrero**, investigador y amigo, quien sin saberlo me devolvió la creencia de que las cosas grandes pueden lograrse con trabajo y mucha fe; día a día me compartió la fascinación de abrirme al conocimiento soltando los miedos y los prejuicios, disfrutando cada instante del presente - “en todo proceso de purificación siempre existen pérdidas”- me decía mientras eluíamos el pigmento amarillo en una C-18. “Profesor” mil gracias por cada palabra y cada vivencia, las cuales como semillas de celosía lograron germinar en mí, desdiferenciarse, crecer y adquirir las tinturas de la abundancia y la riqueza: el color amarillo y el color rojo. Estoy infinitamente agradecida con cada uno de los integrantes del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, de la **UM**. Gracias a las nutritivas clases en el pasillo o frente a la cámara de cultivo del **Dr. Francisco García Carmona**, que siempre me ayudaron a ver lo que aún no se materializaba. Gracias a las sonrisas y el apoyo de las Dras. Juana Cabanes, Josefa Escribano, Mercedes Jiménez, Manuela Pérez y María Inmaculada García. Gracias a la amabilidad de los Dres. Álvaro Ferrer y José Manuel López. Mi más sincero agradecimiento a Liliana Castro, quien me abrió las puertas de su casa a mi llegada a Murcia. A Ana Belén Martínez Moñino, le agradezco profundamente su sonrisa cálida, su confianza, su alegría y su apoyo en todo momento, gracias guapa!! Agradezco también la camaradería de Rubén Zapata, Antonio, Samanta, Adrián, José Eduardo y claro mi amigo y paisano Luis Eduardo Contreras “Lalo”. Agradezco infinitamente a la Dra. Miguela Iniesta Moreno y a su esposo el Dr. Francisco Balibrea Gallego, por integrarme a sus vidas de manera tan familiar y franca, por brindarme un lugar cálido y acogedor en su piso, gracias por cada uno de sus detalles. Gracias a todos por ayudarme a construir el matiz de cada instante, en tierras levantinas. MIL GRACIAS!!

Mi total reconocimiento al jurado de esta Tesis Doctoral, por todo su tiempo y dedicación para ofrecerme sus aportaciones, comentarios y sugerencias, las cuales enriquecieron la calidad del documento. Deseo agradecer también al Dr. Francisco Fernández Perrino y al Dr. Héctor Escalona Buendía ambos en tiempos distintos, coordinadores del Posgrado en Biotecnología y a la Lic. Violeta Luna Caballero, gracias a todos por su amabilidad y por facilitarme cada trámite requerido por la UAM-I y CONACYT; instituciones a quienes les agradezco profundamente la oportunidad que me han dado de alcanzar objetivos académicos y de vida.

Agradezco a todas las personas y las vivencias de mi pasado, especialmente a Mauricio Gustavo Gil Gutiérrez quien me ayudo a recorrer, descubrir y construir por más de una década una parte sustancial de mi paisaje interno. Gracias a la familia Gil Gutiérrez por la luz que me brindaron, a Don Gustavo Gil Mathieu por regalarme la oportunidad de ver con más claridad el mundo. Sin este pasado los soles y las lunas de mi presente simplemente no brillarían.

Agradezco a todos los arcanos que día a día han ido apareciendo en mi vida, pues a través de su reflejo me han ayudado a edificar mi conciencia. Gracias a Jaqueline Moreno Cabrera por estos casi 14 años de vivencias y desarrollo en conjunto. Gracias a Verónica Murillo, Martha Juárez Ciriaco, Leticia Rodríguez, mi amigo Juan, David, “El joven”; a todos ellos por revelarme a través de su valentía mi propia valentía. Gracias a María del Carmen Díaz Maroto por mostrarme el “para qué” de las emociones. Gracias a mi “Caco Fatimí”, a Laura Marroquín y a todo el “Tablao Flamenco Solera San Miguel” por manifestar la simpleza y el arte del vivir. Gracias a Lourdes Casales y a todos los “Regaladores de palabras” del Museo Universitario del Chopo, UNAM, por permitirme

compartir a través de la voz y la mímica, los cuentos que fueron renovando y avivando el interior de mi templo. Gracias a Javi Soto y a todos mis compañeros del Taller “Impro-vivencia: Murcia”, por mostrarme la fuerza y la voluntad del “acepta y sigue” del constante cambio. Gracias a todos los integrantes del taller de Radio de Fundación Cattell, por ayudarme a cumplir un sueño de infancia: ir a la radio y transmitir a través del espectro electromagnético. Gracias a Juan Pedro Barquero y a los poetas que conocí en Murcia, por creer en la poesía, ponerla en acción y permitirme ser parte de esta acción.

A través de este tiempo he comprendido que “lo que el árbol tiene de florido, vive de lo que tiene sepultado”* por ello quiero agradecer a las raíces que me dan forma. Mis abuelos y abuelas que transitaron y aún recorren su tiempo a tiempo. A mis padres fruto de ese tiempo y alquimistas de mi vida. A mi madre **Juana** quien sembró en mí, las innumerables semillas que dan flores y frutos de acuerdo a cada estación. A mi padre **Teo** quien abona mi tierra y pone escaleras para alcanzar sueños. A mis hermanos poseedores de la voluntad que cristaliza visiones. A mi hermana **Anayantzi** cuyo significado de su nombre "la llave de la felicidad" encierra lo que sólo ella nos hace descubrir al tocar nuestros instantes. A mi hermano **Héctor Lenin**, guerrero de luz y a su esposa **Ruth**, ambos poseedores de una clara mirada del universo. A mi **tío Beto**, quien en vida nos expresó que para sembrar se necesita alegría y ya habiendo partido nos revela que para cosechar se necesita amor y gentileza por el suelo labrado. A la niña de mi infancia, quien aún juega gustosa en el jardín de casa, a extraer el color del tiempo guardado en los pétalos de flores y las nervaduras de las hojas; es ella quien ha mantenido la alegría y la fuerza en mi interior, quien posee las cerraduras para abrir cada puerta que se obstruye, llenando los bolsillos de tardes, nubes y preguntas.

Todos somos viajeros lo sepamos o no. Caminamos la vida encontrando universos peregrinos. En esta danza mística la luz me envió un maestro, seguramente un compañero de vida quien con su música, sabe encontrar en mí la calma y como caracol modela el murmullo de las cosas –“sólo escucha la vida”- me dice, – “toma mi mano y caminemos”-. Gracias por tanta luz **Francisco “Paco”**, mi **Paco Mares**.

Finalmente agradezco la bondad y la sabiduría de **la naturaleza** con todo su misterio y abundancia, sus plantas, sus ramas, sus ríos y sus cielos, envueltos de unidad y armonía; pues es en la naturaleza en donde vivimos nuestro presente y todo lo que en ella habita “aquí y ahora”. Ha sido mirando la naturaleza donde he comprendido que la vida es una extensión de mi misma, que los Ciclopes que se levanten ante mí, serán tan poderosos y astutos como sólo mi mente pueda fabricarlos, y me ha hecho entender que sólo yo tengo el poder para desarmarlos y deshacerlos. Porque yo soy lo que “creo” que soy. Cada día desde el ahora, sujeto con fuerza mis pasos, siendo dueña de mi tiempo y construcción de mis sueños...

*Fragmento del poema “sólo Dios basta” de Santa Teresa de Ávila.



PRÓLOGO

En el presente trabajo, Tesis Doctoral titulada "Producción de betalaínas en cultivos *in vitro* de Amaranthaceas", se abordó el estudio y análisis de dos especies vegetales: *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol y *Celosia argentea* variedad plumosa.

La tesis está dividida en diez capítulos. El primero, introduce al lector al documento. El segundo es una revisión crítica de la bibliografía escrita sobre el tema. En el tercero se expone la justificación del trabajo. El capítulo 4 engloba los materiales y métodos empleados para el estudio de las dos especies vegetales, ya que en la mayoría de los casos los procedimientos metodológicos empleados fueron los mismos.

El capítulo 5 está dedicado exclusivamente a *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, cuenta con una tabla de contenido gráfico, que ilustra de manera visual lo alcanzado para esta especie y complementa el resumen y el abstract de este capítulo. Se presenta la hipótesis y los objetivos específicos planteados para el estudio de esta planta en concreto, mostrándose los resultados conseguidos, la discusión de los mismos y finalmente las conclusiones. El capítulo 6 está designado concretamente a *Celosia argentea* variedad plumosa, de igual manera que en el caso anterior, este capítulo cuenta con tabla de contenido gráfico, resumen, abstract, hipótesis, objetivos, resultados, discusión y conclusiones; siendo abordados todos estos apartados de forma delimitada para esta especie.

La conclusión general del trabajo se despliega en el capítulo 7, la cual mediante una figura integra todos los compuestos producidos en las líneas celulares de *A. hypochondriacus* variedad nutrisol y de *C. argentea* variedad plumosa. En el capítulo 8 se exponen las perspectivas de investigación futura que podrían abordarse a partir de los resultados derivados de esta tesis. La bibliografía consultada para el sustento de este documento se encuentra contenida en el capítulo 9. Finalmente en el capítulo 10, se presenta la publicación emanada de este trabajo de tesis doctoral, la cual corresponde a los resultados obtenidos para *C. argentea*, expuestos previamente en el capítulo 6. Actualmente se trabaja en la elaboración del artículo que englobará los resultados obtenidos para *A. hypochondriacus* expuestos en el capítulo 5.

RESUMEN GENERAL

El color y la apariencia son las primeras características que el consumidor evalúa al adquirir un producto. Actualmente se observa una creciente restricción en el uso de colorantes sintéticos para el consumo humano, por problemas de toxicidad, reacciones alérgicas y de intolerancia. Esto ha favorecido la incorporación de tinturas naturales en el mercado global de colorantes. Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles de color violeta (betacianinas) y amarillo (betaxantinas), estables a pH ácido; con actividad antioxidante, antiinflamatoria, anti-carcinogénica y neuroprotectora; considerándose sustancias nutracéuticas. *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol y *Celosia argentea* variedad plumosa biosintetizan betalaínas. El presente trabajo es el primer informe sobre el establecimiento de líneas celulares de callo y suspensión de ambas amarantáceas, obtenidas en medio Murashige y Skoog suplementado con BAP 6.66 μ M y 2,4-D 6.79 μ M. Las líneas celulares de estas dos especies produjeron betalaínas; en amaranto para tal efecto los cultivos fueron sometidos a envejecimiento, elicitación y biotransformación. Las células en suspensión de ambas plantas mostraron mayor producción de betalaínas con respecto a las de callo, caracterizándose betacianinas como betanina, betanidina, amarantina; y betaxantinas como glutamina-betaxantina, dopa-betaxantina, dopamina-betaxantina, triptófano betaxantina; y ácido betalámico. En celosía se obtuvieron altas concentraciones de dopamina, lográndose la encapsulación preliminar de todos los compuestos con maltodextrina, mediante secado por pulverización. De esta manera se evidencia la capacidad celular de estos cultivos para convertirse en fuentes de colorantes bioactivos y valiosos fitoquímicos con alto potencial de aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

GENERAL ABSTRACT

The color and appearance are the first features that the consumer evaluates to purchase a product. There is a growing increase in restricting the use of dyes for human consumption, due to problems of toxicity, allergic reactions and intolerance. This has favored the incorporation of natural pigments in the global market of dyes. Betalains are water soluble pigments of red-purple color (betacyanins) and yellow color (betaxanthins), stable at acid pH, that have antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic and neuroprotective activities, regarded as nutraceuticals. *Amaranthus hypochondriacus* var. nutrisol and *Celosia argentea* var. plumosa synthesized betalains. This work presents the first report on the establishment of cell lines callus and *in vitro* suspension cultures of both Amaranthaceae in Murashige and Skoog medium supplemented with BAP 6.66 μ M and 2,4-D 6.79 μ M. Cell lines of these two species produced betalains; to that effect in the cultures of amaranth were subjected to aging, elicitation and biotransformation. In both cell suspension cultures for both plant species, the betalain production was higher than the callus, characterized betacyanins as betanin, betanidin, isobetanidin, amaranthin, isoamaranthin; and betaxanthins as glutamine-betaxanthin, dopa-betaxanthin, dopamine-betaxanthin, tryptophan betaxanthin and betalamic acid. In the case of celosia high concentrations of dopamine were also achieved and the preliminary encapsulation of all compounds was obtained with maltodextrin by spray drying. This evidenced the capacity of these cell cultures to become sources of dyes and valuable bioactive phytochemicals with high potential for application in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ANA	ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
B5	medio Gamborg
CFR	código de regulaciones federales
COX-2	ciclooxigenasa 2
CTV	cultivo de tejidos vegetales
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
DODA	4,5-DOPA-extradiol-dioxigenasa
EFSA	agencia de seguridad alimentaria de la unión europea
EGCG	galato de epigallocatequina
ESI-MS	análisis de espectrometría de masas con ionización por electrospray
FDA	administración de alimentos y medicamentos
FRAP	poder antioxidante reductor del hierro
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-DAD	cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de diodos
INIFAP	instituto nacional de investigaciones forestales y agropecuarias
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
λ_m	longitud de onda máxima
LOX-1	lipooxigenasa 1

μ	tasa de crecimiento
MeJA	metiljasmonato
$[M + H]^+$	valores de masa para los iones moleculares protonados
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	medio Murashige & Skoog
MS/MS	espectrometría de masas / masas
MYB	factor de transcripción de antocianinas
m / z	relación carga masa
nm	nanómetros
pH	potencial de Hidrogeno
RCV	reguladores de crecimiento vegetal
RMN	resonancia magnética nuclear
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
SA	ácido salicílico
SNPs	polimorfismos de un sólo nucleótido de vinculación
TEAC	capacidad antioxidante equivalente de Trolox
TFA	ácido trifluoroacético
T_r	tiempo de retención

ÍNDICE GENERAL

PRÓLOGO	I
RESUMEN GENERAL	III
GENERAL ABSTRACT	IV
ABREVIATURAS	V
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	2
Capítulo 2: ANTECEDENTES	5
I. Pigmentos de las Caryophyllales	5
II. Características generales de las betalaínas	9
1. Estructura química	9
A. Isómeros estructurales	11
2. Propiedades ópticas	12
3. Actividad biológica	17
III. Biosíntesis de las betalaínas	19
1. Enzimas clave	20
2. Formación de ácido betalámico	21
3. Formación de betalaínas	23

4. Reacciones en betacianinas	25
5. Formación de betalaínas descarboxiladas	27
IV. Betalaínas: colorantes naturales nutraceuticos	28
1. Colorantes	30
2. Aplicaciones industriales	31
3. Estabilidad	34
V. Producción de betalaínas en cultivos <i>in vitro</i> de plantas	36
1. Composición del medio de cultivo	36
2. Precursores y elicitores	37
3. Influencia de la luz	38
4. Sistemas de cultivo establecidos	38
VI. Betalaínas en la familia Amaranthaceae	43
1. <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	47
2. <i>Celosia argentea</i>	49
Capítulo 3: JUSTIFICACIÓN	53
Capítulo 4: MATERIAL Y METODOS	56
I. Reactivos	56
II. Material vegetal	56
III. Desinfección y germinación de semillas	56
IV. Inducción de callo	57
V. Establecimiento de suspensiones celulares	58

VI. Cultivo de suspensiones celulares de <i>A. hypochondriacus</i> en biorreactor de 3L	59
VII. Cinéticas de crecimiento	60
VIII. Viabilidad celular	60
IX. Envejecimiento de líneas celulares de <i>A. hypochondriacus</i>	61
X. Adición de precursores y elicitores en líneas celulares de <i>A. hypochondriacus</i>	61
XI. Extracción y purificación del pigmento amarillo de <i>A. hypochondriacus</i>	62
XII. Extracción de betalainas	63
XIII. Estándares de betalainas	63
XIV. Cromatografía de intercambio aniónico	64
XV. Extracción de betalainas en fase sólida con cartuchos C-18	64
XVI. Análisis por HPLC-DAD	65
XVII. Espectrometría de masas con ionización por electropray	66
XVIII. Espectrometría de fluorescencia del pigmento amarillo de <i>A. hypochondriacus</i>	66
XIX. Espectroscopía UV-Vis	67
XX. Microscopía	67
XXI. Encapsulación de betalainas y dopamina en cultivos <i>in vitro</i> de <i>C. argentea</i>	67
XXII. Análisis estadístico	68

Capítulo 5: PRODUCCIÓN DE BETALAINAS EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	69
I. TABLA DE CONTENIDO GRÁFICO	70
II. RESUMEN	71
III. ABSTRACT	72
IV. HIPÓTESIS	73
V. OBJETIVOS	74
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
1. Establecimiento de cultivo aséptico	76
2. Obtención de líneas celulares de callo de <i>A. hypochondriacus</i>	76
3. Cultivos en suspensión a nivel de matraz y biorreactor de 3L	80
4. Caracterización parcial del pigmento amarillo	83
5. Inducción de la biosíntesis de betalainas en líneas <i>in vitro</i>	86
A. Envejecimiento del cultivo	87
B. Adición de elicitores	89
C. Adición de precursores	93
D. Influencia general de la respuesta al estrés abiótico y adición de precursores	97
VII. CONCLUSIONES	100

Capítulo 6: PRODUCCIÓN DE BETALAINAS EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE <i>Celosia argentea</i>	101
I. TABLA DE CONTENIDO GRÁFICO	102
II. RESUMEN	103
III. ABSTRACT	104
IV. HIPÓTESIS	105
V. OBJETIVOS	106
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
1. Obtención de líneas celulares de callo de <i>Celosia argentea</i>	107
2. Identificación del pigmento en líneas celulares amarillas y rojas	110
3. Cultivos en suspensión de <i>C. argentea</i>	117
4. Producción de betalaínas y dopamina en cultivos en suspensión de <i>C. argentea</i>	118
5. Encapsulación preliminar de betalaínas y dopamina	122
VII. CONCLUSIONES	125
Capítulo 7: CONCLUSIÓN GENERAL	127
Capítulo 8: PERSPECTIVAS	130
Capítulo 9: BIBLIOGRAFÍA	133
Capítulo 10: ARTÍCULO	148

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 1. Betaxantinas de origen natural identificadas estructuralmente en las plantas	11
Tabla 2. Principales especies vegetales productoras de betalaínas	33
Tabla 3. Producción de betalaínas en cultivos in vitro de plantas	41
Tabla 4. Estructura química y betacianinas del tipo amarantina identificadas en Amaranthaceae	45
Tabla 5. Estructura química y betacianinas del tipo gomfrenina, betanina y betaxantinas identificadas en Amaranthaceae	46

Capítulo 5

I. TABLA DE CONTENIDO GRÁFICO <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	70
Tabla 6. Porcentaje de contaminación obtenido durante la desinfección de semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> var. nutrisol	78
Tabla 7. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), sobre la inducción de callos a partir de explantes de hoja de <i>A. hypochondriacus</i> var. nutrisol, después de 30 días de cultivo	79
Tabla 8. Producción de betalaínas y ácido betalámico en células de la línea de callo de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , sometida a estrés abiótico por envejecimiento del cultivo	89
Tabla 9. Producción de betalaínas y ácido betalámico en células de la línea de callo y en cultivos en suspensión de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , sometidas a estrés abiótico por elicitación con 100 μ M de MeJA y 10 mM de SA	92

Tabla 10. Producción de betalaínas y ácido betalámico en células de la línea de callo y en cultivos en suspensión de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , al añadir 1.5 mM de tirosina y L-DOPA	95
---	-----------

Capítulo 6

I. TABLA DE CONTENIDO GRÁFICO <i>Celosia argentea</i>	102
--	------------

Tabla 11. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), sobre la inducción de callos a partir de explantes de hipocótilos de <i>Celosia argentea</i> var. plumosa, después de 30 días de cultivo	109
---	------------

Tabla 12. Producción de betalaínas, dopamina y ácido betalámico en células de las líneas de callo amarilla y roja y en cultivos en suspensión de <i>C. argentea</i>	113
--	------------

Tabla 13. Producción de betalaínas, dopamina y ácido betalámico en el medio líquido de cultivos en suspensión de <i>C. argentea</i>	121
--	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Orden Caryophyllales	6
Figura 2. Regulación positiva del gen BvMYB1 en <i>Beta vulgaris</i>	8
Figura 3. Estructuras generales del ácido betalámico, betaxantinas y betacianinas	10
Figura 4. Estructura de resonancia de las betalaínas	10
Figura 5. Estructura de los diateroisómeros de betacianinas	13
Figura 6. Propiedades ópticas de las betalaínas	13
Figura 7. Efecto de filtro interno y patrones de contraste de fluorescencia	16
Figura 8. Mecanismo propuesto para la síntesis y almacenamiento de betalaínas en el interior de la célula	20
Figura 9. Esquema completo de la ruta de biosíntesis de betalaínas	29
Figura 10. Encapsulados de betalaínas	35
Figura 11. Producción de betalaínas en sistemas <i>in vitro</i>	40
Figura 12. Cultivo de raíces transformadas de <i>Beta vulgaris</i>	42
Figura 13. <i>Amarantus hypochondriacus</i>	49
Figura 14. <i>Celosia argentea</i>	50

Capítulo 5

- Figura 15.** Características fenotípicas del explante de hipocótilo y callos inducidos en explantes de hoja de *A. hypochondriacus*, a los 30 días de cultivo 78
- Figura 16.** Establecimiento de líneas celulares in vitro derivadas de *A. hypochondriacus* 80
- Figura 17.** Curva de crecimiento para el cultivo de *A. hypochondriacus*, en suspensión a nivel de matraz y biorreactor de 3L 82
- Figura 18.** Perfil cromatográfico del pigmento amarillo obtenido de los cultivos *in vitro* de *A. hypochondriacus* 84
- Figura 19.** Espectros de fluorescencia de emisión y excitación del pigmento amarillo presente en las líneas celulares *in vitro* de *A. hypochondriacus* 85
- Figura 20.** Perfiles cromatográficos y espectros de masas de las fracciones purificadas por HPLC, del pigmento amarillo obtenido de los cultivos *in vitro* de *A. hypochondriacus* 86
- Figura 21.** Producción de ácido betalámico y betalaínas en la línea celular de callo de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, durante el envejecimiento del cultivo 88
- Figura 22.** Producción de ácido betalámico y betalaínas en la línea celular de callo y suspensión de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 100 μ M de MeJA y 10 mM de ácido salicílico. 91
- Figura 23.** Evolución temporal de las características fenotípicas del cultivo en suspensión y de callo de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 100 μ M de MeJA y 10 mM de SA 91
- Figura 24.** Producción de ácido betalámico y betalaínas en la línea celular de callo y suspensión de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 1.5 mM de tirosina y L-DOPA 96
-

Figura 25. Evolución temporal de las características fenóticas del cultivo en suspensión y de callo de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> variedad nutrisol, al adicionar 1.5 mM de tirosina.	96
Figura 26. Evolución temporal de las características fenóticas del cultivo en suspensión y de callo de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> variedad nutrisol, al adicionar 1.5 mM de L-DOPA.	97
Figura 27. Influencia general de respuesta al estrés abiótico y a la adición de precursores sobre la ruta de biosíntesis de betalaínas en las líneas in vitro de <i>A. hypochondriacus</i>	98
Capítulo 6	
Figura 28. Características fenóticas de callos inducidos en explantes de hipocótilos de <i>Celosia argentea</i> variedad plumosa a los 30 días de cultivo	108
Figura 29. Establecimiento de líneas celulares in vitro derivadas de <i>C. argentea</i> var. plumosa	112
Figura 30. Micrografía de las células de la línea de callo amarillo de <i>C. argentea</i>	114
Figure 31. Producción de betalaínas y dopamina por las líneas celulares derivadas de <i>C. argentea</i> var. plumosa	119
Figura 32. Curva de crecimiento para el cultivo en suspensión de <i>C. argentea</i>	120
Figura 33. Encapsulados de betalaínas y dopamina de cultivos de callo de <i>C. argentea</i>	123
Capítulo 7	
Figura 34. Estructuras de betalaínas obtenidas en cultivos in vitro de <i>A. hypochondriacus</i> variedad nutrisol y <i>C. argentea</i> variedad plumosa	128

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Se estima que el 25 % de medicamentos, cosméticos, esencias aromáticas, saborizantes y colorantes utilizados en los países desarrollados provienen de metabolitos secundarios de plantas silvestres o cultivadas (Ramesh *et al.*, 2013). Los metabolitos secundarios generalmente se producen en condiciones de estrés en un tipo particular de células y en pequeñas cantidades. El cultivo de células vegetales es una alternativa biotecnológica que permite optimizar la producción de compuestos químicos de interés como las betalaínas de forma aséptica, continua, en una superficie pequeña y bajo condiciones controladas. Habitualmente se utiliza la citocinina BAP y la auxina 2,4-D, para inducir la formación de cultivos de callo rojo y amarillo, y mantener suspensiones pigmentadas de muchas plantas Caryophyllales como *Beta vulgaris*, así como otras especies de amarantáceas (Georgiev *et al.*, 2008; Karuppusamy, 2009).

Amaranthus hypochondriacus var. *nutrisol*, especie originaria de México y *Celosia argentea* var. *plumosa*, son herbáceas anuales pertenecientes a la familia Amaranthaceae. Se encuentra documentado el uso medicinal y ornamental para estas dos plantas; en el caso particular del amaranto, éste se cultiva para la obtención de pseudocereales con alto valor nutritivo. Ambas especies vegetales producen betalaínas, pigmentos naturales que contienen nitrógeno y proporcionan coloración brillante a las frutas, flores, hojas y raíces de la mayoría de Caryophyllales (Moreno *et al.*, 2008). Las betalaínas se dividen en dos

grupos: las betacianinas de color violeta, con espectros de absorbancia centrados en 536 nm, y las betaxantinas de color amarillo, con espectros de absorbancia centrados en 480 nm. Ambos grupos comparten al ácido betalámico como unidad estructural y cromóforo, que se condensa con ciclo-DOPA en las betacianinas y con aminas y aminoácidos en las betaxantinas (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). Las betalaínas son solubles en agua y poseen actividad nutracéutica a concentraciones muy bajas, por lo que resulta viable su uso como colorante natural bioactivo (Kapadia *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2009; Lechner *et al.*, 2010; Gandía-Herrero *et al.*, 2013; Ravichandran *et al.*, 2014; Janiszewska, 2014; Robert *et al.*, 2015).

Actualmente no existen reportes con respecto al establecimiento de cultivos celulares de *Amaranthus hypochondriacus* var. nutrisol y de *Celosia argentea* var. plumosa, para la producción de colorantes, por lo que el objetivo principal del presente trabajo fue establecer cultivos *in vitro* de ambas especies para evaluar su capacidad de producción de betalaínas y caracterizar dichos pigmentos.

Capítulo 2. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Junto con la fragancia, la forma y el tamaño de la planta, los pigmentos desempeñan un papel clave en la biología de las angiospermas, actúan como señales visibles para la polinización, dispersión de semillas, así como protección al estrés por luz, fitopatógenos; además están involucrados en diferentes rutas de señalización interna. Los pigmentos vegetales más comunes son los carotenoides, clorofilas, antocianinas y betalainas. Mientras que las antocianinas participan en la coloración de todos los miembros de las angiospermas, las betalainas se han restringido al linaje de los hongos Basidiomycetes y de las plantas Caryophyllales, impartiendo en estas una gama de colores amarillos, anaranjados, violetas y rojos en raíces, hojas, flores, frutos y semillas (Stintzing y Carle, 2004; Brockington *et al.*, 2011).

I. Pigmentos de las Caryophyllales

El orden Caryophyllales (Figura 1) es un clado bien definido de Eudicotyledoneae, comprende alrededor de 29 familias y 9.000 especies (APG, 2003). Este orden, es muy heterogéneo, incluye amarantáceas como *Amaranthus hypochondriacus* (B), *Celosia argentea* (C), *Beta vulgaris* (D); cactáceas como *Opuntia ficus-indica* (E); nictagináceas como *Bougainvillea glabra* (F); cariofiláceas como *Silene dioica* (G); portulacáceas como *Portulaca oleracea* (H), entre los taxones y especies más representativos. Comprende

familias que producen sólo antocianinas o sólo betalainas, no se conocen especies que sinteticen ambos pigmentos. No obstante en dos familias de éste orden, la Molluginaceae y Caryophyllaceae, se producen antocianinas en lugar de betalainas, lo que indica que estos pigmentos son mutuamente excluyentes (Brockington *et al.*, 2011).

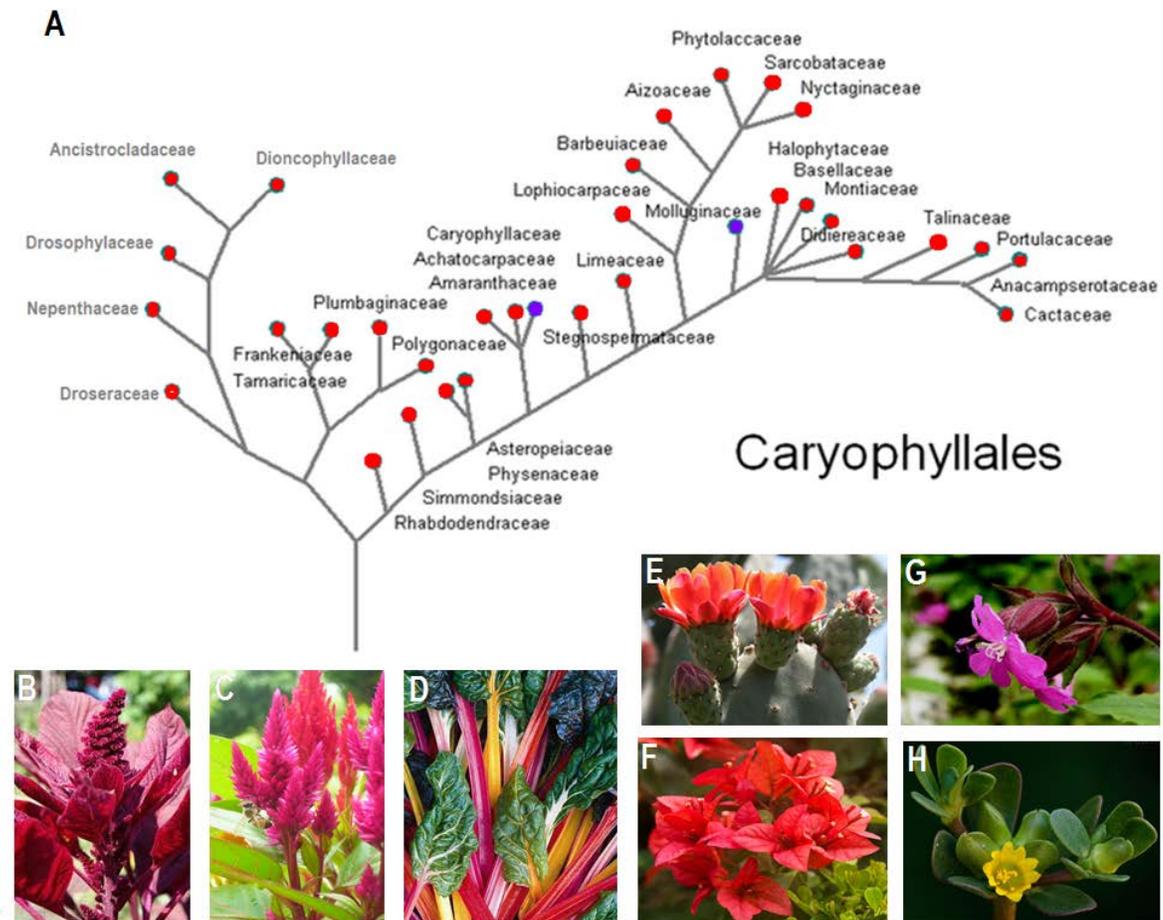


Figura 1. (A) Orden Caryophyllales: círculos de color rojo: pigmentación por betalainas, círculos morados: pigmentación por antocianinas. (B) *Amaranthus hypochondriacus*. (C) *Celosia argentea*. (D) *Beta vulgaris*. (E) *Opuntia ficus-indica*. (F) *Bougainvillea glabra*. (G) *Silene dioica*. (H) *Portulaca oleracea*. Tomado y modificado de http://www.honda-e.com/A03_Classification/APG-01-Tree.htm.

Las razones evolutivas para la aparente eliminación de uno u otro pigmento, según sea el caso, no ha sido explicada adecuadamente; no obstante, a nivel bioquímico, se ha demostrado que las enzimas relevantes para la producción de antocianinas no se expresan en las plantas productoras de betalaínas (Brockington *et al.*, 2011; Shimada *et al.*, 2007).

Recientemente se descubrió el factor de transcripción MYB de antocianinas en la remolacha de *Beta vulgaris* (BvMYB1), el cual regula positivamente los genes de los mapas del locus Y, y de las enzimas clave de la ruta biosintética de betalaínas: BvDODA1 y BvCYP76AD1 (Figura 2A y B). La sobre expresión de BvMYB1 en raíces transformadas de remolacha blanca, dio lugar a la aparición de raíces fibrosas rojas, similares a las raíces fibrosas de la remolacha roja (Figura 2C y D). Los análisis filogenéticos indican que BvMYB1 de remolacha y MYBs de las plantas que producen antocianinas probablemente derivan de un ancestro común, consistente con la hipótesis de que los genes implicados en la biosíntesis de antocianinas y betalaínas están regulados por el mismo tipo de factores de transcripción. Al parecer BvMYB1 evolucionó de MYBs de antocianina, con nuevas características. Esto podría ser un caso de cooptación génica: uso de un gen existente para un nuevo propósito. Es decir, parece que el factor de transcripción MYB existente adquirió de alguna manera nuevas dianas transcripcionales, lo que le permite regular genes de las enzimas implicadas en la ruta de betalaínas (Figura 2A). La cooptación de MYB de antocianina podría haber dado lugar a nuevos pigmentos con el mismo patrón de expresión. Lo anterior ha sido confirmado con el estudio filogenético sobre la reconstrucción ancestral de la aparición de betalaínas, el cual reveló que la duplicación del gen de DODA y

CYP76AD1, dio lugar a las isoformas DODA- α y CYP761A- α con la función específica de síntesis de betalainas; las subsiguientes duplicaciones de estos genes dieron lugar a la pérdida o a la baja regulación de los genes que codifican para las enzimas específicas de la ruta de antocianinas (Brockington et al., 2015). De esta forma podría explicarse la pérdida de una de las dos vías y por tanto el hecho de que las antocianinas y betalainas se excluyan de manera mutua, ya que aparentemente ambos pigmentos proporcionan en gran parte la misma función dentro de la planta. Sin embargo, se observa que las betalainas pueden ser amarillas o violetas y las antocianinas suelen ser sólo moradas, por lo que el espectro de colores y por lo tanto la función no es estrictamente idéntico; por lo que probablemente BvMYB1 se ha apartado de las MYBs de antocianina, perdiendo la capacidad de regular las antocianinas o interactuar con el complejo de MBW (Hatlestad *et al.*, 2015).

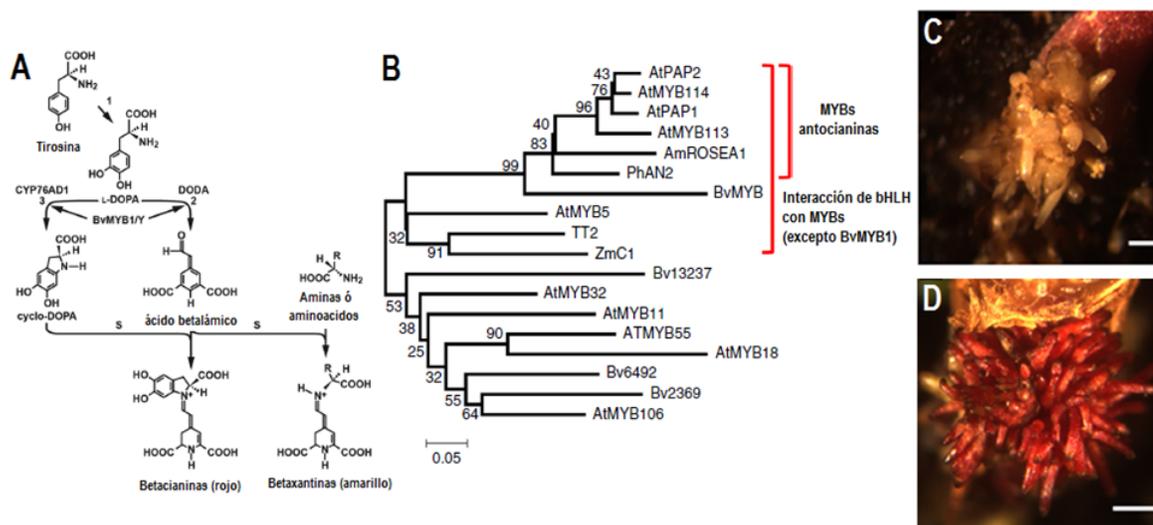


Figura 2. Regulación positiva del gen BvMYB1 en *Beta vulgaris*. (A) La sobreexpresión de BvMYB1 sobre la ruta de biosíntesis de betalainas, controla la expresión de genes de enzimas clave como BvDODA y BvCYP76AD1. Los pasos 1, 2 y 3 son mediados enzimáticamente. Los pasos marcados con S son espontáneos. (B) Empalme en el árbol filogenético de los dominios R2 y R3 de BvMYB1 y otros MYBs. (C) Raíces transformadas de remolacha blanca. (D) Raíces transformadas de remolacha blanca pigmentadas de rojo (betanina) debido a la presencia de la sobreexpresión del gen BvMYB1. Tomado y modificado de Hatlestad *et al.*, 2015.

II. Características generales de las betalaínas

1. Estructura química

Las betalaínas son pigmentos solubles en agua, que contienen nitrógeno y presentan un peso molecular entre 400 y 500 g/mol (Piattelli 1981). La unidad funcional y estructural de las betalaínas es el ácido betalámico (Figura 3A). Existen dos tipos de betalaínas: Las betaxantinas (Figura 3B), son derivados imonio producidos por la condensación del ácido betalámico con diferentes aminas y aminoácidos (Tabla 1), y las betacianinas (Figura 3C), que resultan de la condensación del ácido betalámico con ciclo-dihidroxifenilalanina (Ciclo-DOPA). Las betaxantinas son de color amarillo, su espectro de absorbancia tiene una longitud de onda máxima (λ_m) de aproximadamente 480 nm, independiente de la naturaleza del aminoácido. Por el contrario, las betacianinas de color violeta, presentan un espectro de absorbancia centrado en $\lambda_m = 536$ nm (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). El color de las betalaínas se atribuye a sus estructuras en resonancia (Figura 4): si R o R' no proyectan la resonancia, el compuesto es amarillo: betaxantinas; si R o R' proyectan resonancia, el compuesto es violeta: betacianinas (Fennema, 1995).

El nombre trivial de las betalaínas fue asignado atendiendo a la fuente de donde fue descrito, derivándolo del nombre de la planta y añadiendo el sufijo “-cianina” (gr. *kyanos*, color azul) para las betacianinas, o “-xantina” (gr. *xanthos*, color amarillo) para las betaxantinas (García-Carmona *et al.*, 2011).

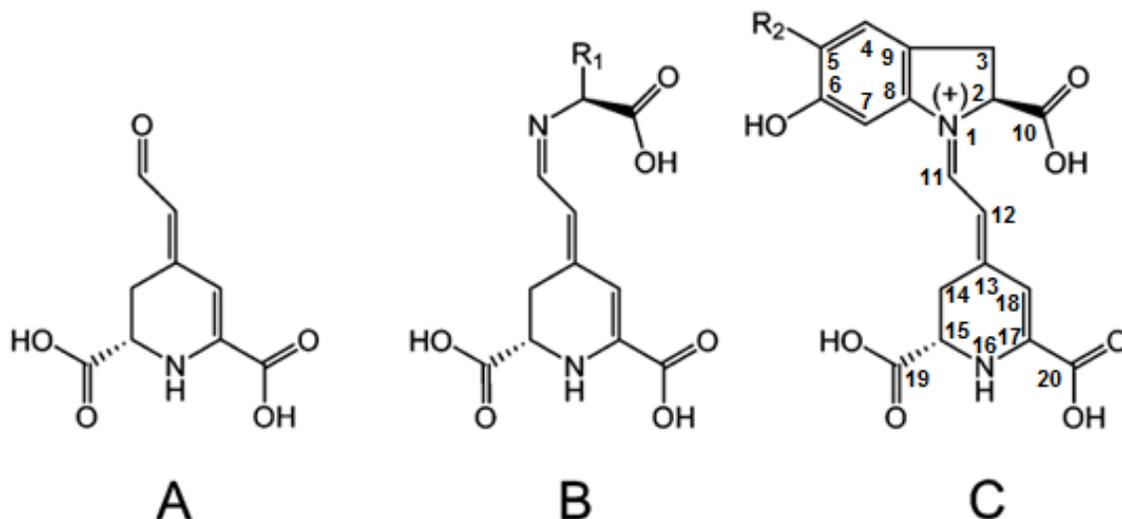


Figura 3. Estructuras generales del ácido betalámico (A), betaxantinas (B) y betacianinas (C). R_1 es cualquier residuo lateral presente en aminas o aminoácidos. R_2 es -OH (betanidina), glucosa (betanina), o un residuo o complejo de azúcar. Tomado de Gandía-Herrero *et al.*, 2012.

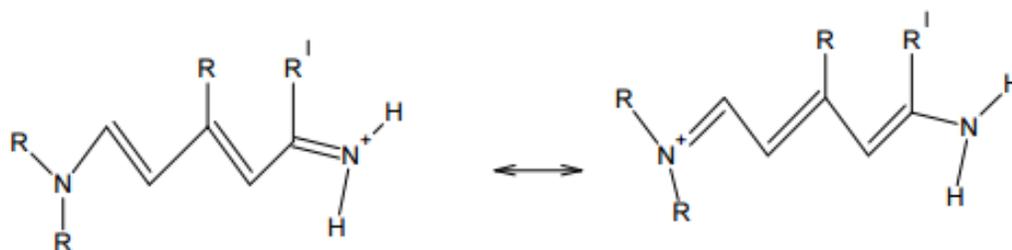


Figura 4. Estructura de resonancia de las betalaínas. Tomado de Fennema, 1995.

Las betacianinas tienen como principal componente a la betanina (Figura 5Aa). Las betacianinas incorporan fundamentalmente azúcares a su estructura (Strack *et al.*, 2003). La incorporación de azúcares y ácidos se produce a través de uno de los dos grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático de la betanidina y origina dos familias de compuestos, derivados de betanina (betanidina 5-*O*- β -glucósido) o los de gomfrenina (betanidina 6-*O*- β -glucósido) (Gandía-Herrero *et al.*, 2005a).

Tabla 1. Betaxantinas identificadas estructuralmente en las plantas

Nombre Trivial	Grupo amino	Fuente biológica	Referencia
Indicaxantina	Prolina	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1964
Vulgaxantina I	Glutamina	<i>Beta vulgaris</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Vulgaxantina II	Ácido glutámico	<i>Beta vulgaris</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Miraxantina I	Metionina sulfóxido	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Miraxantina II	Ácido aspártico	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Miraxantina III	Tiramina	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Miraxantina V	Dopamina	<i>Mirabilis jalapa</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Portulacaxantina I ^a	Hidroxiprolina	<i>Portulaca grandiflora</i>	Piatelli <i>et al.</i> , 1965
Dopaxantina	Dihidroxiifenilalanina	<i>Glottiphyllum longum</i>	Impellizzeri <i>et al.</i> , 1973
Humilixantina	5-Hidroxinorvalina	<i>Rivina humilis</i>	Strack <i>et al.</i> , 1987
Portulacaxantina II	Tirosina	<i>Portulaca grandiflora</i>	Trezzini y Zryd., 1991
Portulacaxantina III	Glicina	<i>Portulaca grandiflora</i>	Trezzini y Zryd., 1991
Vulgaxantina III	Asparagina	<i>Beta vulgaris</i>	Hempel y Bohom, 1997
Vulgaxantina IV	Leucina	<i>Beta vulgaris</i>	Hempel y Bohom, 1997
Muscaaurina VII ^b	Histidina	<i>Beta vulgaris</i>	Hempel y Bohom, 1997
	Triptófano	<i>Celosia argentea</i>	Schliemann <i>et al.</i> , 2001
	3-Metoxitiramina	<i>Celosia argentea</i>	Schliemann <i>et al.</i> , 2001
	Ácido γ -aminobutírico	<i>B. vulgaris</i> , <i>O. ficus-indica</i>	Stintzing <i>et al.</i> , 2002
	Serina	<i>B. vulgaris</i> , <i>O. ficus-indica</i>	Stintzing <i>et al.</i> , 2002
	Valina	<i>B. vulgaris</i> , <i>O. ficus-indica</i>	Stintzing <i>et al.</i> , 2002
	Isoleucina	<i>B. vulgaris</i> , <i>O. ficus-indica</i>	Stintzing <i>et al.</i> , 2002
	Fenilalanina	<i>B. vulgaris</i> , <i>O. ficus-indica</i>	Stintzing <i>et al.</i> , 2002
	Alanina	<i>Beta vulgaris</i>	Kugler <i>et al.</i> , 2004
	Histamina	<i>Beta vulgaris</i>	Kugler <i>et al.</i> , 2004
	Metionina	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Stintzing <i>et al.</i> , 2005
	Arginina	<i>Gomphrena globosa</i>	Kugler <i>et al.</i> , 2007
	Putrescina	<i>Bougainvillea</i> sp.	Kugler <i>et al.</i> , 2007
	Lisina	<i>Bougainvillea</i> sp.	Kugler <i>et al.</i> , 2007
	Etanolamina	<i>Beta vulgaris</i>	Kugler <i>et al.</i> , 2007
	Treonina	<i>Beta vulgaris</i>	Kugler <i>et al.</i> , 2007
	Feniletilamina	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Castellanos-Santiago y Yahia, 2008

^a Pigmento originalmente llamado “portulacaxantina”.

^b Pigmento previamente identificado en el hongo *Amanita muscaria* (Musso, 1979)

Tabla tomada y modificada de Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013.

A. Isómeros estructurales

Las betacianinas se pueden hidrolizar con ácidos o enzimas y formar las agliconas llamadas betacianidinas y el azúcar respectivo. Las agliconas de las betacianinas son

diastereoisómeros y se les dieron los nombres de betanina e isobetanina, betanidina e isobetanidina en el betabel y amarantina e isoamarantina en el amaranto (Figura 5). La presencia conjunta de diastereoisómeros en extractos de plantas conteniendo betacianinas es bien conocida (Piatelli, 1981; Stintzing y Carlie, 2004). Esta isomería es debida a la presencia del átomo de carbono quiral en la posición C-15 (Figura 3), que puede adoptar las configuraciones “S” o “R”. El átomo quiral en posición C-2 adopta en la naturaleza únicamente la configuración “S”. De este modo, para las betacianinas existentes los compuestos 2-*S*/15-*S* y 2-*S*/15-*R*, abreviadamente 2*S*/*S* y 2*S*/*R*. De ellos, el isómero 2*S*/*S* es el mayoritario y primario, postulándose que el 2*S*/*R* se obtiene por epimeración. La conversión de compuestos 2*S*/*S* en 2*S*/*R* ha sido descrita en función del pH (Schliemann y Strack, 1998). Por otro lado, de manera sintética pueden obtenerse los isómeros no naturales 2*R*/*S* y 2*R*/*R* de las betacianinas (Wilcox *et al.*, 1965) y análogamente de las betaxantinas (Schliemann *et al.*, 1999). Formas “R” de aminoácidos libres suministrados a plantas fueron incorporadas como betaxantinas (Hempel y Böhm, 1997), llevando a consideraciones acerca de una posible condensación espontánea entre el ácido betalámico y los aminoácidos y/o la falta de estereoespecificidad de las enzimas implicadas (Gandía-Herrero *et al.*, 2005a).

2. Propiedades ópticas

Los pigmentos son moléculas que por su estructura química absorben luz de una determinada longitud de onda y reflejan el resto, emisión que define el color que percibe el ojo humano. La parte de la molécula responsable del color (cromóforo), suele contener una

cadena de dobles enlaces conjugados, estos dobles enlaces generan un sistema de resonancia con los estados electrónicos, cuya separación energética coincide con la energía de ciertos fotones del rango visible de la luz; esos son los fotones que absorbe el pigmento. En algunos pigmentos la exposición a la luz provoca además la emisión de nuevos fotones, generando así la fluorescencia (Figura 6A) (García-Carmona *et al.*, 2011).

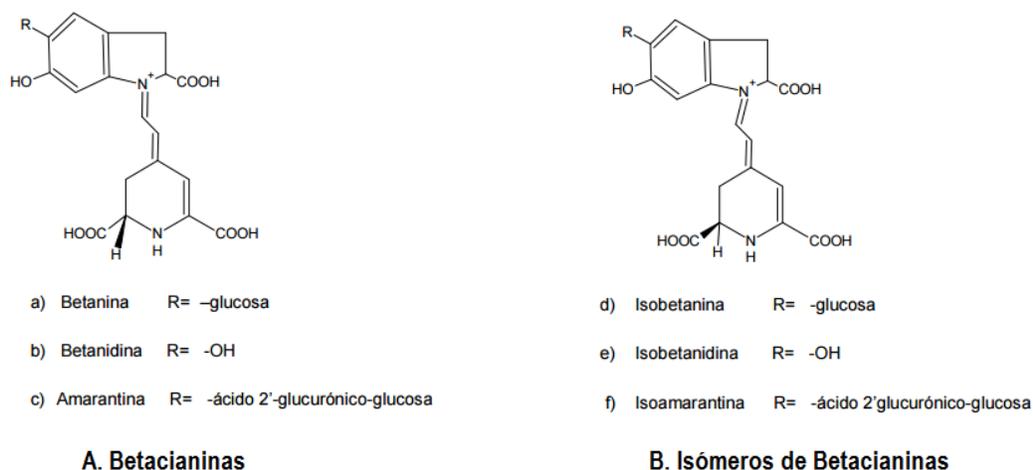


Figura 5. Estructura de los diateroisómeros de betacianinas. Tomado de Fennema, 1995.

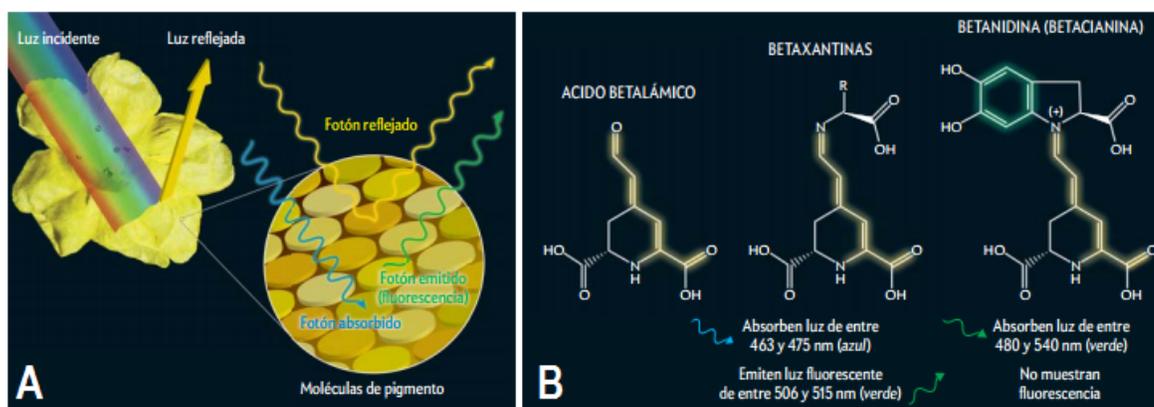


Figura 6. Propiedades ópticas de las betalaínas. (A) Fenómeno de absorción y emisión de fotones. (B) Patrón de fluorescencia con máximos de excitación y de emisión. Tomado y modificado de García-Carmona *et al.*, 2011.

Desde los primeros trabajos en betalaínas se caracterizaron los espectros de absorción en betacianinas (Wylér y Dreiding, 1957) y betaxantinas (Piattelli *et al.*, 1964). El espectro de betanina presenta un máximo a 536 nm (Trezza y Zrýd, 1991), que se desplaza hipsocrómicamente con la descarboxilación del grupo del carbono C-2 (Kobayashi *et al.*, 2001). El mayor desplazamiento en el mismo sentido se produce en el compuesto 14-15 dehidrobetanina (neobetanina) de color naranja y no violeta (Alard *et al.*, 1985). Por otra parte un desplazamiento batocrómico se observa al esterificar betacianinas con ácidos hidroxicinámicos (Stintzing y Carlie, 2004). En las betaxantinas puede observarse el mismo desplazamiento hipsocrómico con la descarboxilación de C-2 de tirosina betaxantina y de dopaxantina. El pigmento derivado de prolina presenta el máximo de mayor longitud de onda (484 nm), el cual presenta un coeficiente de absorción molar menor (Trezza y Zryd, 1991).

Actualmente se sabe que las betaxantinas presentan un patrón de fluorescencia con máximos de excitación comprendidos entre 463 y 475 nm y máximos de emisión entre 506 y 515 nm (Figura 6B). De modo que las betaxantinas absorben luz en el rango visible del espectro electromagnético correspondiente al color azul y emiten luz verde. Los espectros de excitación y emisión son muy similares en todos los casos y análogos al descrito para la betaxantina más sencilla, la alanina betaxantina. La separación entre la longitud de onda máxima de excitación y la máxima de emisión (desplazamiento de Stokes), así como la anchura de los espectros, (mediada a un valor de intensidad mitad del máximo) son también semejantes. Tantas semejanzas apuntan a la estructura de las betaxantinas y el ácido

betalámico, está implicado en el fenómeno de fluorescencia. Esta estructura básica es además la responsable del color de los pigmentos, debido a su sistema de dobles enlaces conjugados. La intensidad de la fluorescencia depende del carácter “dador” o “aceptor” electrónico del sustituyente (R) del grupo amina o aminoácido que se encuentre unido al ácido betalámico. Cuanto mayor sea su carácter aceptor y, cuanta más densidad electrónica “absorba” del sistema resonante, más intensa será la fluorescencia de la betaxantina. Las betacianinas en cambio no presentan fluorescencia. Ello se debe a la conexión que se produce entre los dos sistemas resonantes: el ácido betalámico (amarillo) (Figura 6B) y el del anillo aromático del ciclo DOPA (verde); esta ampliación del sistema resonante es la responsable del desplazamiento del máximo del espectro de absorbancia de 480 a 540 nm, así mismo es el responsable de la ausencia de fluorescencia en los pigmentos violetas (Figura 6B) (Gandía-Herrero *et al.*, 2010). También se observa un solapamiento entre el espectro de emisión de las betaxantinas y el de absorción de las betacianinas. Este fenómeno puede provocar en un sistema que contenga un fluoróforo (estructura responsable de la fluorescencia) y un cromóforo (estructura responsable del color), la atenuación de fluorescencia, si el cromóforo es capaz de absorber la radiación emitida por el compuesto fluorescente. Lo anterior se le conoce como “efecto de filtro interno” (Figura 7). La adición progresiva de una betacianina a una disolución de betaxantina, provoca la extinción, por este efecto, de la fluorescencia. Ello demuestra que las betacianinas absorben la radiación emitida por las betaxantinas (García-Carmona *et al.*, 2011). Para apreciar la fluorescencia específica de las betaxantinas se utiliza un sistema de filtros, uno limita las longitudes de onda para la excitación de los pigmentos de la muestra, otro filtra la luz residual reflejada

por la misma. De esta manera se ha demostrado que la emisión de luz visible por parte de las betaxantinas se mantiene en su entorno fisiológico y que las flores que las contienen pueden considerarse como elementos fluorescentes; tal es el caso de *Mirabilis jalapa* especie que puede presentar flores con patrones de colores variados dentro de la misma planta. En este caso pueden existir zonas que contienen sólo betaxantinas y otras que contienen sólo betacianinas. Al filtrar la radiación de excitación y la luz emitida, se observa que el efecto de filtro interno descrito en disolución se mantiene en el entorno fisiológico: las flores presentan patrones fluorescentes de contraste (Figura 7B). La interferencia de la fluorescencia también puede apreciarse a través de microscopía de fluorescencia (Figura 7B) (Gandía-Herrero *et al.*, 2005a).

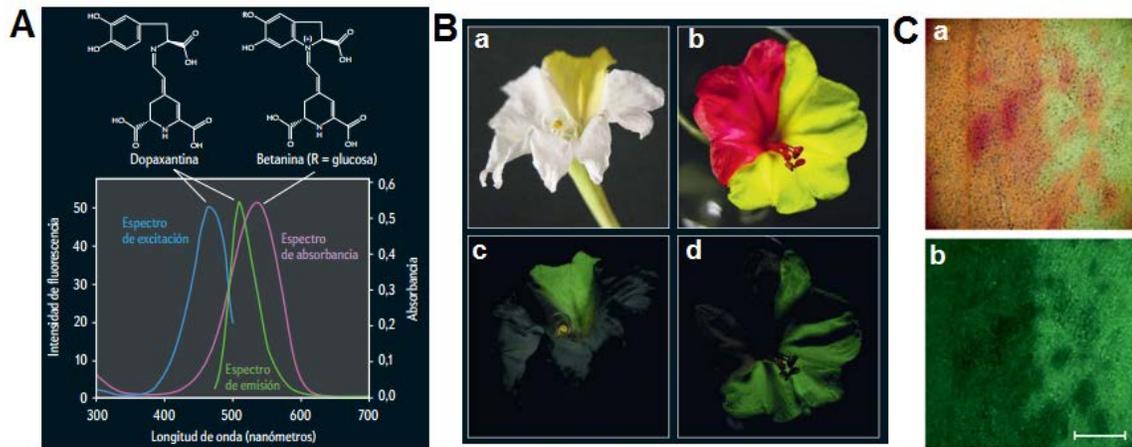


Figura 7. Efecto de filtro interno y patrones de contraste de fluorescencia. (A) Solapamiento entre el espectro de emisión de las betaxantinas (verde) y el de absorción de las betacianinas (violeta). (B) Fluorescencia en flores de *Mirabilis jalapa*, cuando se ilumina con luz blanca (a y b) las áreas de las flores que contienen sólo betaxantinas parecen amarillas debido a la combinación de fluorescencia y la radiación no absorbida, o reflejada. Cuando se ilumina con luz azul (c y d) las betaxantinas emiten fluorescencia verde. (C) Imágenes microscópicas de campo claro (a) y epifluorescencia (b) de una sección de un pétalo rojo y amarillo de *Mirabilis jalapa*. La fluorescencia verde se debe a las betaxantinas; en las áreas oscuras (naranjas en a), la luz emitida por el pigmento fluorescente es absorbida por la betanina. Tomado y modificado de García-Carmona *et al.*, 2011.

3. Actividad biológica

Las primeras investigaciones que evidenciaron la actividad atrapadora de radicales libres en betalaínas, fueron llevadas a cabo por separado con betacianinas y betaxantinas, extraídas de raíz de remolacha (Escribano *et al.*, 1998). En 2002 y 2003, se realizó la caracterización de betalaínas de diferentes extractos de plantas y frutos, elucidándose la importancia de los grupos hidroxilo en la estructura para la existencia de actividad antioxidante (Butera *et al.*, 2002; Pavlov *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2003). Subsiguientes trabajos del grupo de investigación de Kanner demostró la capacidad de betanina y betanidina de inhibir la peroxidación *in vitro* del ácido linoleico, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la hemólisis de glóbulos rojos a concentraciones más bajas que otros antioxidantes conocidos como el α -tocoferol y la catequina. Así mismo, las betalaínas presentan potencial quimiopreventivo contra diferentes tipos de cáncer (Wu *et al.*, 2006; Sreekanth *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2012). Se ha reportado que estos pigmentos inhiben *in vivo* la formación de tumores en ratones, consumiendo bajas concentraciones de betalaínas en la dieta (Kapadia *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2009; Lechner *et al.*, 2010). También ejercen influencia antioxidante y estabilizadora sobre el ácido hipocloroso, el cual está implicado en la respuesta inflamatoria (Allegra *et al.*, 2005). Así mismo, las betacianinas tienen efecto neuroprotector, ya que mejoran las deficiencias cognitivas y atenúan el daño oxidativo inducido por *D*-galactosa en el cerebro de ratones senescentes (Wang y Yang, 2010).

En 2012 y 2014 la actividad anti-inflamatoria demostrada en los extractos de inflorescencias de *Gomphrena* y frutos de *Opuntia* actividad anti-inflamatoria, ha sido atribuida a la presencia de betalaínas (Silva *et al.*, 2012; Dulce *et al.*, 2014). Recientemente se demostró que las betalaínas semi-sintéticas y betalaínas purificadas de extractos vegetales de raíces de *Beta vulgaris* y de flores amarillas y violetas de *Lampranthus productos*, inhiben la actividad de enzimas (lipooxigenasas y ciclooxigenasas) implicadas en la respuesta bioquímica a la inflamación (Vidal *et al.*, 2014).

La relación estructura-actividad de las betalaínas ha sido atribuida a la presencia del ácido betalámico en su estructura, aunque también puede ser modulada por otros factores estructurales (Gandía-Herrero *et al.*, 2012). La presencia de ciclos aromáticos en resonancia con el sistema principal de resonancia de electrones, para formar una subestructura tipo indolina, como la presente en betacianinas, implica una mejora en la actividad antirradical y antiinflamatoria (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2014). La presencia de grupos hidroxilo en la molécula aumenta la capacidad antioxidante y antirradical, en betaxantinas y en betacianinas. Se ha detectado un aumento en términos de unidades de Trolox (capacidad antioxidante equivalente de Trolox, TEAC), a 4.0 unidades TEAC para un hidroxilo y a 6.34 unidades TEAC para dos hidroxilos (Gandía-Herrero *et al.*, 2010). El último valor es mayor que el encontrado para otros antioxidantes conocidos tales como galato de epigallocatequina (EGCG) presente en el té verde (Rice-Evans *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2005).

III. Biosíntesis de las betalaínas

En la biosíntesis de metabolitos secundarios, como son las betalaínas, ocurren una serie de procesos biológicos y fisicoquímicos muy complejos, que tienen que ver con aspectos bioquímicos, fisiológicos y de fenómenos de transporte que dan como resultado diferentes niveles de diferenciación celular, la compartimentalización, translocación, almacenamiento e incluso procesos de redireccionamiento del flujo metabólico (Zhang *et al.*, 2002; Strack *et al.*, 2003). De manera general en las células de los vegetales, frecuentemente los precursores de metabolitos secundarios, se encuentran en el citoplasma y son trasladados hacia algún organelo para que se lleve a cabo la síntesis del metabolito (Zhang *et al.*, 2002). Parece ser que éste es el caso de las betalaínas.

La Figura 8 muestra de manera esquemática el mecanismo propuesto de síntesis y acumulación de betalaínas. Se ha sugerido que la biosíntesis de betaxantinas involucra el transporte del ácido betalámico del citosol hacia el interior de la vacuola, en donde bajo condiciones ácidas se condensa con diferentes aminoácidos y aminas (Schliemann *et al.*, 1999; Stintzing *et al.*, 1999). La síntesis de betanidina se realiza en el citoplasma, donde el pH es de 7 a 7.5. Por su naturaleza altamente hidrofílica, es transportada a la vacuola (pH 3 a 6), donde se ioniza de manera parcial, lo que impide que pueda difundir hacia el exterior, permitiendo por lo tanto su acumulación y almacenamiento. Al ser una molécula protonada, la betanidina puede interactuar con otras moléculas contenidas en la vacuola, como por

ejemplo la glucosa y a través de reacciones de glucosilación, formar otras betacianinas como la betanina (Stintzing *et al.*, 1999; Strack *et al.*, 2003).

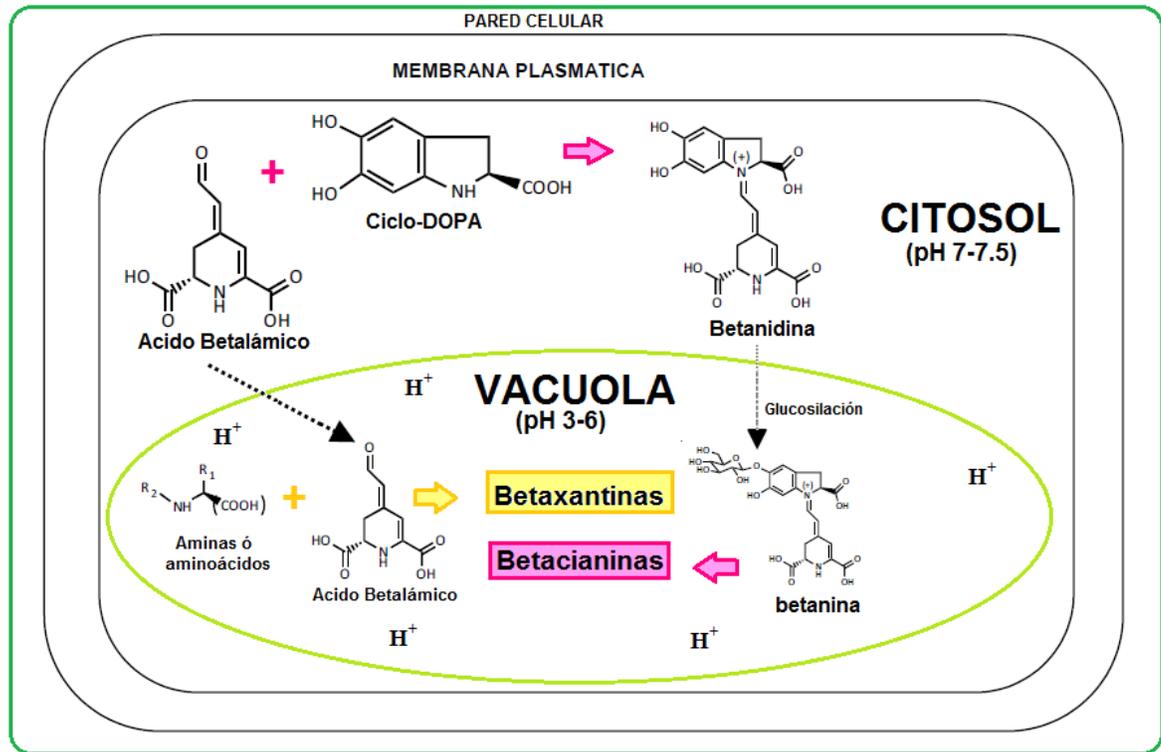


Figura 8. Mecanismo propuesto para la síntesis y almacenamiento de betalainas en el interior de la célula. Adaptado de Schliemann *et al.*, 1999; Stintzing *et al.*, 1999 y Strack *et al.*, 2003.

1. Enzimas clave

La ruta biosintética de betalainas incluye tres principales enzimas. Dos son oxidasas que dependen de oxígeno molecular para la catálisis: la tirosinasa y 4,5-DOPA-extradiol-dioxigenasa (DODA). La segunda enzima la betanidin-glicosiltransferasa adiciona a la unidad estructural de betacianinas un residuo de azúcar (Gandía Herrero y García Carmona, 2013).

La DODA cataliza la transformación de L-DOPA a 4,5-seco-DOPA (Figura 9, reacción de 2), que produce espontáneamente ácido betalámico, la unidad estructural y cromóforo de las betalaínas (Gandía-Herrero y García Carmona, 2013).

La actividad de la enzima tirosinasa se ha descrito en cinco pasos diferentes de la ruta biosintética de betalaínas (Figura 9, reacciones 1, 5, 14,15, y 23). Esta enzima esta ampliamente distribuida en la naturaleza y su mecanismo de acción es bien conocido, cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de los o-difenoles a o-quinonas (Gandía-Herrero y García Carmona, 2013).

Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de moléculas de azúcar a aceptores específicos como compuestos tóxicos ambientales, hormonas y metabolitos secundarios, incluyendo pigmentos. La adición de glucosa a betanidina es dirigida específicamente a uno de los dos grupos hidroxilo paragenerar betanina (Figura 9, reacción 19) o gomfrenina I. A pesar de las analogías estructurales con betacianinas, no hay evidencia *in vivo* o *in vitro* para la glicosilación en betaxantinas (Gandía-Herrero y García Carmona, 2013).

2. Formación de ácido betalámico

Las betalaínas se derivan del aminoácido L-tirosina. En las plantas dicho compuesto procede del ácido arogénico (Tzin y Galili, 2010). Experimentos pioneros con moléculas de L-tirosina marcadas radiactivamente demostraron su incorporación en las unidades estructurales de las betalaínas (Liebisch *et al.* 1969; Fischer y Dreiding, 1972).

La biosíntesis de las betalainas comienza con la hidroxilación de L-tirosina en L-DOPA a través de la actividad de la enzima tirosinasa monofenolasa (o polifenoloxidasas) (Figura 9, reacción 1). La tirosinasa se ha caracterizado en las plantas *Portulaca grandiflora*, *Beta vulgaris*, y *Suaeda salsa* (Steiner *et al.*, 1999; Gandía-Herrero *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2009). La enzima también se ha purificado a partir del hongo *Amanita muscaria* (Mueller *et al.*, 1996). La acumulación de L-DOPA, que es necesaria para la formación de ácido betalámico (Figura 9, reacción 2), requiere detener la oxidación de L-DOPA a o-DOPA-quinona (Figura 9, reacción 5) realizada por la actividad difenolasa de la misma enzima. Esta reacción puede ser necesaria para la formación de una parte de la estructura de betacianinas, como se discute a continuación, pero consumirá toda la L-DOPA formada como sustrato (Cabanés *et al.*, 1987). Por lo tanto, la presencia de ácido ascórbico o un agente de reducción análogo es necesario para transformar o-DOPA-quinona de nuevo a L-DOPA (Figura 9, reacción 6). Esto hace L-DOPA disponible nuevamente como sustrato para la segunda enzima de la ruta, la DODA, que cataliza la escisión extradiol de L-DOPA para formar el producto intermedio 4,5-seco-DOPA (Figura 9, reacción 2). La proteína se caracterizó primero a partir de extractos *A. muscaria* (Girod y Zryd, 1991), dicha enzima produce ácido betalámico y muscaflavina, que se encuentra exclusivamente en el hongo. Esto es debido a la actividad 2,3-DOPA-extradiol dioxigenasa que produce 2,3-seco-DOPA, producto análogo de 4,5-seco-DOPA en plantas (Mueller *et al.*, 1997). DODA en *P. grandiflora*, *Mirabilis jalapa*, y *B. vulgaris* se ha caracterizado funcionalmente y muestra la actividad de 4,5-DOPA-extradiol-dioxigenasa exclusivamente (Christinet *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2009; Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013).

El ácido betalámico se deriva a partir de 4,5-seco-DOPA, por la condensación intramolecular espontánea entre el grupo amina presente en L-DOPA y el grupo aldehído producido enzimáticamente (Fischer y Dreiding, 1972) (Figura 9, reacción 3). Las características estructurales del ácido betalámico no se entienden bien en términos de la configuración del carbono quiral. En las plantas, los pigmentos derivados del betalámico se reportan con frecuencia para mostrar el 95% del isómero quiral (S) y 5% de la forma (R). Además, las mismas proporciones se han reproducido *in vitro* a partir de L-DOPA en ensayos enzimáticos con la dioxigenasa (Sasaki *et al.*, 2009; Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). Este hallazgo señala a las reacciones 2 y 3 (Figura 9) como las responsables para las proporciones de isómeros que se encuentran en la naturaleza (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013).

3. Formación de betalaínas

La variedad de betalaínas surge de incorporar múltiples derivados amino a una unidad de ácido betalámico como estructura cromogénica en el sistema de resonancia de electrones. Dependiendo de la naturaleza de la molécula condensada, se obtienen diferentes propiedades espectroscópicas (Gandía-Herrero *et al.*, 2010).

En las plantas, las betaxantinas (pigmentos amarillos) se obtienen por condensación del ácido betalámico con aminas y aminoácidos (Figura 9, reacción de 4). Se asume que la reacción se produce de forma espontánea entre el grupo amino de la amina y el grupo aldehído del ácido betalámico para formar la imina correspondiente (Schliemann *et al.*,

1999; Godoy-Alcántar *et al.*, 2005). Esta reacción se puede reproducir *in vitro* para formar betaxantinas semisintéticas (Sekiguchi *et al.*, 2010). La diversidad de aminas disponibles en las plantas hace que sea difícil estimar el número real de betaxantinas existentes en la naturaleza (Tabla 1) (Gandía-Herrero y García Carmona, 2013).

La formación de betacianinas puede darse a través de la condensación con los derivados libres de L-DOPA; que en ausencia de un agente reductor se transforma por la tirosinasa en *o*-DOPA-quinona utilizando oxígeno molecular (Figura 9, reacción 5). Luego, el grupo amina de la *o*-quinona realiza un ataque nucleofílico intramolecular en el anillo, lo que conduce a la ciclación espontánea que forma la molécula de leuco-DOPA-cromo, también conocido como ciclo-DOPA (Wylter y Chiovini 1968; Li y Christensen, 1993; Cabanes *et al.*, 2002) (Figura 9, reacción 7). La conversión de L-DOPA en ciclo-DOPA se puede realizar por la citocromo P450, como se ha visto en *B. vulgaris* (Hatlestad *et al.*, 2012). Aunque el mecanismo involucrado en la formación de ciclo-DOPA, no ha sido plenamente identificado, sólo dos posibilidades parecen razonables: una oxidación clásica o una transferencia electrónica por etapas (Guengerich, 2001). En ambos casos, DOPA-quinona sería un producto de oxidación intermedio antes del ataque nucleófilo intramolecular que se produce, de acuerdo con las reacciones descritas para la tirosinasa (Figura 9, reacciones 5 y 7). Sin embargo, debido a la falta de información sobre el mecanismo de oxidación de la DOPA por la subfamilia citocromo P450 (Hatlestad *et al.*, 2012), esta reacción se muestra por separado en la Figura 9 (reacción 8). En cualquier caso, ciclo-DOPA presenta una estructura capaz de condensar con ácido betalámico y formar betanidina (Figura 9, reacción

12). Las condiciones para la formación de betanidina a partir de dopaxantina-quinona (Figura 9, reacción 17) no se han determinado, pero la vía es posible y la formación de betanidina puede ser favorecido *in vivo*. Otra forma de condensación se lleva a cabo entre el ácido betalámico y L-DOPA para formar dopaxantina (Figura 9, reacción 18). También podría llevarse a cabo la condensación de ácido betalámico con *o*-DOPA-quinona; aunque el grupo amino está disponible para reaccionar con el grupo aldehído de ácido betalámico, la inestabilidad química de la DOPA-quinona podría evitar esta reacción (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013).

4. Reacciones en betacianinas

La betanidina se puede transformar en betanina por la enzima betanidin-5-*O*-glucosiltransferasa, que incorpora un residuo de glucosa al grupo hidroxilo en la posición 5 (Figura 9, reacción 19) (Hans *et al.*, 2004). La betanidin-6-*O*-glucosiltransferasa también se ha purificado y caracterizado a partir de *Dorotheanthus bellidiformis* (Heuer *et al.*, 1996), esta enzima cataliza la incorporación de glucosa para el otro grupo hidroxilo de betanidina, formando el pigmento gomfrenina I. Glucosilaciones y acilaciones adicionales conducen a la amplia variedad de betacianinas identificadas en extractos naturales (Strack *et al.*, 2003). Sin embargo, las enzimas o las condiciones involucradas en estos procesos no han sido identificadas. Los pigmentos generados mantienen propiedades espectroscópicas análogas a los de betanidina, evitando su labilidad (Gandía-Herrero *et al.*, 2007; Stintzing *et al.*, 2002). La transformación de betanina a betanidina es posible debido a la actividad de β -glucosidasa (Figura 9, reacción 20) (Zakharova and Petrova, 2000). En contraste con la

aceptación general de la glucosilación de betanidina, también se ha propuesto que la betanina puede formarse por la acción de una ciclo-DOPA *O*-5-glucosiltransferasa que cataliza la transferencia del azúcar a la ciclo-DOPA (Figura 9, reacción 21) y su posterior condensación del derivado glucósido con ácido el betalámico (Figura 9, reacción 22) (Sasaki *et al.*, 2004). Esta actividad se ha encontrado en pruebas preliminares de *M. jalapa* y en otras plantas productoras de betalaínas (Sasaki *et al.*, 2005a). Por la acilación adicional de ciclo-DOPA-glucósido es posible producir más complejos de betacianinas después de la condensación con el ácido betalámico (Sasaki *et al.*, 2005b). Independientemente del papel desempeñado por la tirosinasa en la formación de betanidina, el pigmento es un sustrato para la enzima (Figura 9, reacción 23). Esto implica la formación de betanidina-quinona. La presencia de ácido ascórbico ha sido descrito en flores que contienen betanidina y revierte la quinona al pigmento original (Figura 9, reacción 24) (Gandía Herrero *et al.*, 2007). Aunque la glucosilación protege a la betanina de la labilidad, el grupo hidroxilo restante de la betanidina todavía puede ser oxidado por la enzima peroxidasa (Figura 9, reacción 25). La betanina es transformada en el radical fenoxi-betanina, el cual puede experimentar ulterior evolución que implica la hidrólisis de la molécula (Sasaki *et al.*, 2005b). Los productos de oxidación de betanina son también capaces de reorganizarse y producir betacianinas deshidrogenadas y descarboxiladas (Wybraniec y Michałowski, 2011). La peroxidasa también puede actuar sobre la betanidina para catalizar su conversión a betanidina-quinona a través de un mecanismo de radicales. Dependiendo del pH, este puede conducir a la generación de derivados de

betanidina-quinona deshidrogenados y descarboxilados (Wybraniec y Michałowski, 2011; Martínez-Parra y Muñoz, 2001).

5. Formación de betalaínas descarboxiladas

Las betacianinas descarboxiladas se han descrito en extractos de *Carpobrotus acinaciformis* (Piattelli y Impellizzeri, 1970) y *Celosia* sp. (Schliemann *et al.*, 2001) y en cultivos de raíces transformadas de *B. vulgaris* (Schliemann *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2001). Estas betacianinas contienen un fragmento de leuco-dopamina-cromo en lugar de leuco-DOPA-cromo presente en su estructura. El punto exacto en la ruta para la descarboxilación es actualmente desconocido, sin embargo dos alternativas son posibles:

1) La formación de descarboxi-betacianinas pueden producirse a partir de betaxantinas de la misma manera como se ha mencionado para los pigmentos carboxilados a través de las reacciones mediadas por tirosina (Figura 9, reacciones 14 y 15) (Gandía-Herrero *et al.*, 2005a). Análogos descarboxilados de tirosina-betaxantina y DOPA-betaxantina son tiramina betaxantina (miraxanthin III) y la dopamina-betaxantina (miraxanthin V), respectivamente. Esta posibilidad es apoyada por la presencia de dopamina-betaxantina y las betacianinas descarboxiladas en *B. vulgaris* (Schliemann *et al.*, 1999) y *Celosia* sp. (Schliemann *et al.*, 2001).

2) La descarboxilación, también puede ocurrir en niveles libres de L-tirosina o L-DOPA, para formar tiramina o dopamina, respectivamente. Reacciones mediadas por la tirosinasa o

bien reacciones espontáneas pueden conducir a la formación de dopamina cromo (Figura 9, reacciones 5 y 9), que podría ser transformada a leuco-dopamina-cromo (Figura 9, la reacción 11) por un agente reductor. La condensación con ácido betalámico entonces podría ocurrir para formar betacianinas descarboxiladas (Kobayashi *et al.*, 2001). Alternativamente la peroxidasa también podría estar mediando a través de las reacciones mencionadas anteriormente (Wybraniec y Michałowski, 2011), en los estudios sobre la formación de betalainas descarboxiladas como artefactos durante la extracción del pigmento en plantas (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013).

IV. Betaínas: colorantes naturales nutracéuticos

El término nutracéutico fue acuñado en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice, Presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina, de los EE.UU. La palabra derivada de nutrición y farmacéutico, lo cual hace referencia a todos aquellos alimentos que poseen un efecto benéfico demostrado sobre la salud humana (Serra-Majem, 2008; Gil, 2010). Las betaínas al presentar actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinogénica y neuroprotectora a bajas concentraciones, son consideradas sustancias nutracéuticas (Kapadia *et al.*, 2003; Stintzing y Carle, 2004; Henriette y Azeredo, 2009); además al ser pigmentos naturales han sido utilizadas como fuente de colorantes (Fernández y Giménez, 2013).

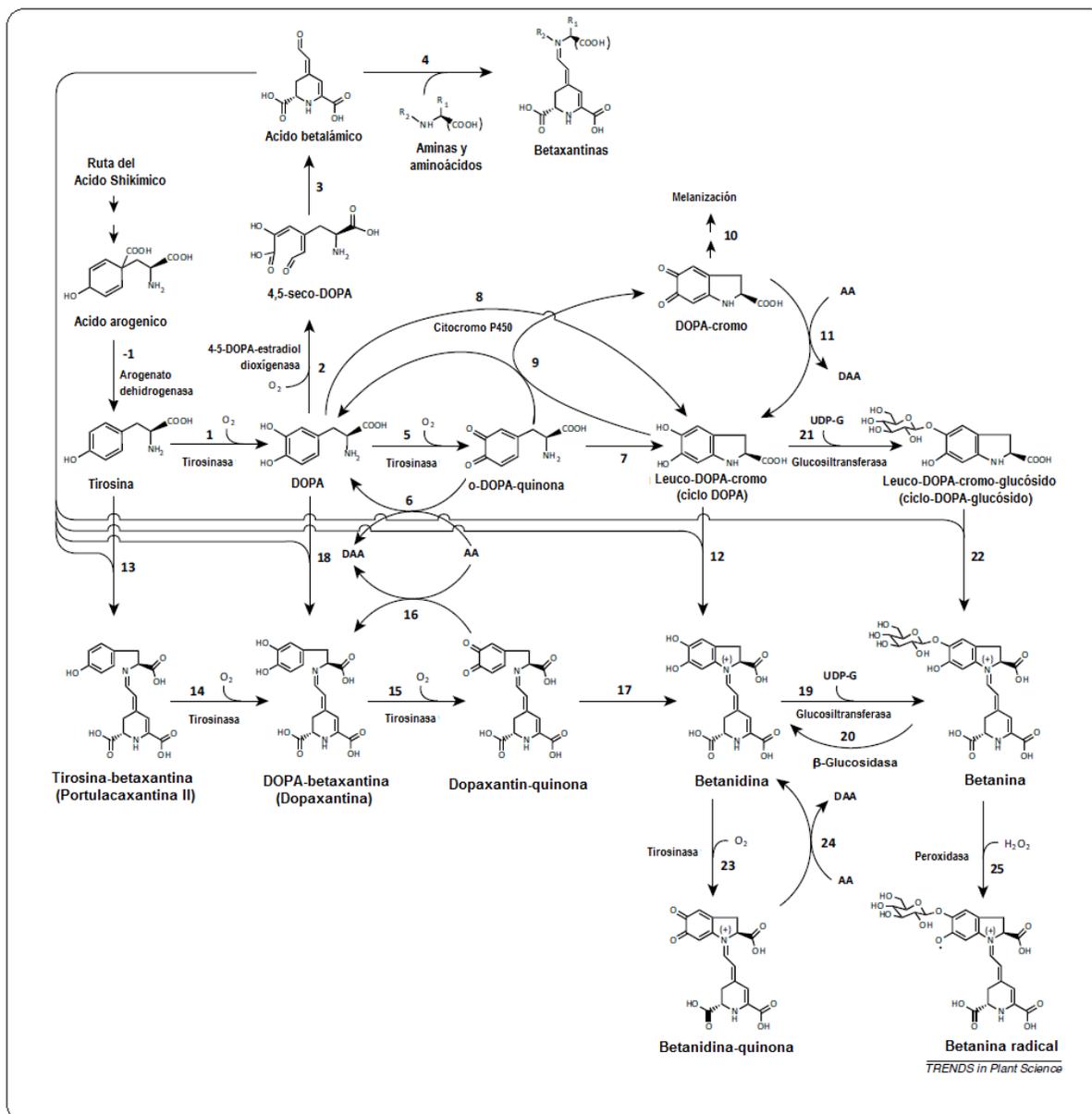


Figura 9. Esquema completo de la ruta de biosíntesis de betalainas. Todas las reacciones reportadas en la bibliografía están representadas. Abreviaturas: AA, ácido ascórbico; DAA, ácido dehidroascórbico. Tomado y modificado de Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013.

1. Colorantes

Los colorantes alimentarios se emplean desde hace más de 4000 años. En la actualidad se hallan presentes en la mayor parte de los alimentos industrializados, ya que incrementan su atractivo a los ojos de los consumidores. Un color estable y llamativo constituye un atributo de alto valor añadido en el competitivo mercado de las industrias elaboradoras de alimentos (Fernández y Giménez, 2013).

De acuerdo con su origen o procedencia, los colorantes pueden clasificarse en tres grandes grupos: 1) Los pigmentos naturales, que son generados por vegetales o animales, o bien encontrados en minerales. 2) Los idénticos a los naturales, que se obtienen por síntesis química, pero conservan características semejantes al natural. 3) Los colorantes sintéticos, que se producen exclusivamente por síntesis química. Entre los colorantes amarillos y rojos sintéticos usados como aditivos en alimentos destacan el amarillo quinoleína (E-104), amarillo anaranjado (E-110), tartrazina (E-102), azorrubina/ carmoisina (E-122), ácido carmínico (E-120), rojo ponceau 4R (E-124), rojo 40 ó rojo allura AC (E-129). Las autoridades sanitarias han restringido el permiso de uso de un gran número de aditivos coloridos. A finales de la década de los 90's la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) redujo la lista de 700 a 7 colorantes sintéticos autorizados; mientras la EFSA, por sus siglas en inglés (Agencia de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea), ha recomendado minimizar en general el agregado de aditivos, permitiendo su uso solamente cuando haya una necesidad real vinculada con la preservación, sabor o estabilidad de los alimentos. En el caso de los colorantes en

particular, se aprobó como protocolo que las empresas incorporen en la etiqueta de sus productos una advertencia sobre probables problemas de toxicidad en el caso de ingerir 6 de los colorantes sintéticos permitidos (Downham y Collins, 2000; McCann *et al.*, 2007; Fernández y Giménez, 2013).

Por ello, en los últimos años se ha aumentado la demanda de consumo de pigmentos amarillos y rojos provenientes de fuentes naturales, debido a las pequeñas cantidades que se utilizan en los alimentos, así como por la seguridad en relación con la salud de los consumidores (Fernández y Giménez, 2013). En 1994 el mercado global de colorantes era de alrededor 265 millones de dólares y, los colorantes naturales representaron el 25 %. En el 2000 esta cifra aumento a 1000 millones de dólares, ocupando los pigmentos naturales el 65 % del mercado mundial (Henriette y Azeredo, 2009). En 2011 las ventas ascendieron a 1550 millones, estableciéndose en un 70 % el consumo de colorantes naturales. El mercado estimado para las tinturas naturales está cubierto por el amarillo-naranja (55 %), rojos (25%) y otros colores (20%) (Carmona, 2013).

2. Aplicaciones industriales

Las betalaínas son uno de los colorantes rojos autorizados con el código 73.40 de la sección 21 CFR de la FDA y con la designación de E-162 en la Unión Europea. La disponibilidad de preparados comerciales de betalaínas se restringe a concentrados líquidos de remolacha (entre 60 y 65 % de sólidos totales), obtenidos por evaporación rotativa de extracto fresco, o al sólido (entre el 0.3 y 1 % de betanina) producido por atomización o liofilización del

líquido concentrado. El extracto de remolacha se obtiene tras el blanqueado (inactivación de enzimas que puedan degradar el color), troceando, prensando y posterior filtración de tubérculos de remolacha. Los preparados comerciales no son puros, difieren en su color según la proporción de betacianinas y betaxantinas. El rendimiento de la extracción llega a los 0.5 g/ Kg peso fresco de tubérculo procesado. Se trata de un colorante potente, bastan dosis inferiores a los 50 miligramos de betanina por kilogramo de producto final para obtener el tono de color deseado (Fernández y Giménez, 2013).

A nivel mundial la remolacha de *Beta vulgaris* es la principal materia prima natural para la fabricación de colorantes rojos, rosas y violetas para su uso en productos alimentarios (Villegas *et al.*, 1983; Junqueira-Goncalves *et al.*, 2011). En cuanto al uso de betalaínas en cosméticos se ha encontrado que pueden sustituir a algunos colorantes rojos como el rojo de santeño, azóico rojo, el óxido de hierro y colorantes amarillos como el azóico amarillo, utilizados en lápices de labios, polvos para la cara, cremas faciales, cremas corporales, champús, geles de baño, cremas capilares. Así mismo las betalaínas al ser compuestos que absorben luz en 480 y 540 nm, pueden utilizarse para la elaboración de protectores solares para evitar que la luz del sol incida directamente sobre la piel (Maltos *et al.*, 1999; Prudencio *et al.*, 2008).

En Estados Unidos desde 1960 los pigmentos obtenidos a partir de la remolacha están permanentemente en la lista de colorantes aceptados para la adición en alimentos y no necesitan certificación (Villegas *et al.*, 1983), no obstante dicho colorante presenta un sabor

particular debido a la presencia de la geosmina y algunas pirazinas que producen aversión particularmente al agregarlo a alimentos tales como los lácteos (Tesoriere *et al.*, 2004), por lo que se han propuesto nuevos colorantes derivados de frutos de *Opuntia*, así como de otras especies productoras de betalaínas (Tabla 2) (Fernández y Giménez, 2013). Tal es el caso de las betalaínas de amaranto, las cuales debido a la mayor gama de colores y sabor casi imperceptible al paladar, han comenzado a aplicarse en yogurt, helados, jaleas, aderezos, dulces, glaseados, tocino, salchichas, frutas en conserva y bebidas frías (Cai *et al.*, 1999; Santos-Díaz *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008; Castellar *et al.*, 2008).

Tabla 2. Principales especies vegetales productoras de betalaínas

Familia	Especie	Betalaínas	
		Betacianinas	Betaxantinas
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium rubrum</i>	Betanina Celosianina	Vulgaxantina I Vulgaxantina II
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Betanina Isobetanina	Indicaxantina
	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Betanina Isobetanina Phyllocactina Hylocerenina	
Amaranthaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Betanina Isobetanina	Vulgaxantina I Vulgaxantina II Indicaxantina
	<i>Amaranthus</i> sp.	Amarantina Isoamarantina	Dopaxantina Vulgaxantina I Indicaxantina Miraxantina V
Aizoaceae	<i>Lamprantus productus</i>	Betanidina	Dopaxantina
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i> sp.	Gomfrenina I Bougainvilleina V Ésteres cumaricos de la betanina	Dopaxantina Muscaaurina VII
Portulacaceae	<i>Portulaca grandiflora</i>		Dopaxantina Vulgaxantina I Portulacaxantina II Miraxantina V Indicaxantina

*Tomada de Fernández y Giménez, 2013.

3. Estabilidad

Cuando un compuesto es utilizado como colorante alimentario, la estabilidad del color es una de las mayores prioridades. La estabilidad de las betalaínas ha sido estudiada por varios autores en función de diversos parámetros. En cuanto al pH se encuentran estables en un extenso rango de valores (entre 3 a 7), lo que las hace especialmente aptas para ser empleadas en un amplio espectro de alimentos de acidez baja y neutra donde no se pueden usar antocianinas. Las temperaturas menores a 25° C promueven la estabilidad de estos pigmentos. Esta descrito el efecto adverso de la luz, la actividad de agua (aw) y el oxígeno; en condiciones anaeróbicas su oxidación es insignificante (Cai *et al.*, 2001; Pedreño, *et al.*, 2001; Castellar *et al.*, 2003; Tesoriere *et al.*, 2005; Fernández y Giménez, 2013). Otro factor negativo descrito para las betacianinas, es la presencia de enzimas degradativas en el tubérculo de *B. vulgaris*. Martínez-Parra y Muñoz en 1997 y 2001, establecieron el mecanismo de acción de la peroxidasa sobre betacianinas e identificaron los productos de reacción. Las actividades degradativas han sido también observadas en las amarántaceas y en *Phytolacca americana* (Gandía-Herrero *et al.*, 2005a).

De acuerdo con estas características, las betalaínas se pueden utilizar en alimentos procesados con un tratamiento de calor mínimo, envasándolos y colocándolos en un lugar seco, bajo niveles reducidos de luz, oxígeno y humedad (Rayner, 1993, Von Elbe, 1977; Cai *et al.*, 1999). Así mismo, se ha observado que es posible proteger adecuadamente a estos pigmentos naturales mediante su encapsulación. Indicaxantina, miraxantina V y betanidina, betalaínas con alta labilidad, fueron óptimamente encapsuladas con

maltodextrinas con una limitada pérdida de coloración y actividad antioxidante después de seis meses de almacenamiento en diferentes condiciones de luz-oscuridad. La combinación de proporciones variables de betaxantinas y betacianinas ofrece una amplia gama de polvos de diferentes colores (Figura 10) (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Gandía Herrero *et al.*, 2013b). Además del uso de maltodextrinas, se ha estudiado el efecto de otros agentes encapsulantes como goma guar, goma arábiga, pectina, goma xantana, inulina y aislados de proteína de soya (Figura 10H y 11I), observándose que la encapsulación con maltodextrina presenta la mayor estabilidad, tanto en polvos almacenados a la luz como en oscuridad, abriéndose así la posibilidad del uso de estas moléculas colorantes para aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Gandía-Herrero *et al.*, 2010; Gandía-Herrero *et al.*, 2013; Ravichandran *et al.*, 2014; Janiszewska, 2014; Robert *et al.*, 2015).

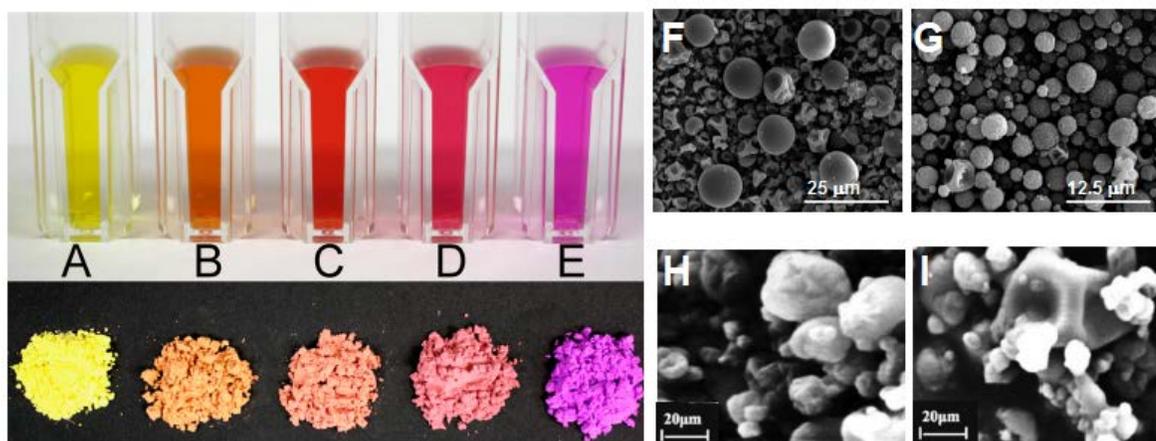


Figura 10. Encapsulados de betalaínas. Imágenes macroscópicas de combinaciones de miraxantina V y betanidina en forma soluble y como polvos resultantes de encapsulación con maltodextrinas. La proporción de ambos pigmentos varió de 100% miraxantina V (A), 100% betanidina (E), 75% miraxanthin V (B), 63% miraxantina V (C), 50% miraxantina V (D). Imágenes de microscopia electrónica de barrido de encapsulados de miraxantina V con maltodextrina (F), quitosano (G), y extracto de *Opuntia* con aislado de proteína de soya (H) y aislado de proteína de soya con maltodextrina (I). Tomado de Gandía-Herrero *et al.*, 2013b (A-G) y Robert *et al.*, 2015 (H-I).

V. Producción de betalaínas en cultivos *in vitro* de plantas

El cultivo de tejidos y células vegetales es una alternativa muy atractiva para proveer compuestos bioactivos, incluyendo pigmentos del tipo betalaínas (Rao *et al.*, 2002; Vanisree *et al.*, 2004; Strack *et al.*, 2003; Georgiev *et al.*, 2008). La producción biotecnológica de colorantes alimentarios utilizando cultivos *in vitro* ofrece varias ventajas sobre el cultivo convencional de plantas enteras, en particular la capacidad de mantener condiciones asépticas controladas, independientemente de las variaciones del clima o las propiedades del suelo (Vanisree *et al.*, 2004). La capacidad de definir y controlar las condiciones de producción ayuda a asegurar un suministro continuo y fácil extracción de productos con calidad y rendimiento uniforme, independientemente de la ubicación geográfica (Rao *et al.*, 2002). Además, los colorantes producidos de esta forma se clasifican como naturales en lugar de idénticos a naturales, lo que aumenta su atractivo de consumo (Hancock 1997; Georgiev *et al.*, 2008).

1. Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo, constituye un elemento fundamental para la producción de betalaínas y la composición de éste depende de la especie a cultivar. El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es el más extensamente usado en su formulación original o en numerosas variaciones. El medio B5 o de Gamborg *et al.* (1968) y sus derivados, también es utilizado eficazmente para la producción de betalaínas. La diferencia principal entre los medios MS

y B5, es la menor concentración de nitratos en B5. Usualmente estos medios de cultivo incluyen sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. Para la producción de betalaínas el medio es suplementado con reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los cuales se aplican de manera independiente o combinada, en concentraciones que oscilan entre 0.1 hasta 10 μ M. Habitualmente se utiliza la citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) y la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ya que han reportado tener efecto positivo para inducir formación de callos pigmentados y mantener suspensiones celulares coloreadas; sin embargo también se recurre a la cinétina (KIN) y al ácido naftalenacético (ANA), aunque su uso está menos extendido (Georgiev *et al.*, 2008).

2. Precursores y elicitores

Se ha encontrado que la incorporación de precursores y elicitores al medio de cultivo, estimula la producción de betalaínas; como pudo comprobarse al añadir DOPA y tirosina, en suspensiones celulares de *Chenopodium rubrum* (Berlin *et al.* 1986); o al elicitar con jasmonato de metilo, sulfato de cobre y β -glucano, cultivos líquidos de *Portulaca* sp., *Portulaca* Joya, *B. vulgaris* y *B. vulgaris* var. Rubí reina, con incrementos del pigmento 2.6, 1.8, 1.4 y 2 veces, respectivamente (Mukundan *et al.* 1999; Bhuiyan y Adachi 2003; Suresh *et al.*, 2004). Del mismo modo, la adición al medio de cantidades superiores a 50 g / L de sacarosa, incrementó la cantidad de betalaínas de manera similar que la elicitación con el hongo *Fusarium* sp., en tejido calloso de *Mammillaria candida* (Santos-Díaz *et al.*, 2005).

3. Influencia de la luz

La luz es otro factor importante a tomar en cuenta en la producción *in vitro* de estos pigmentos, su presencia favorece su acumulación en comparación con la obscuridad (Bianco-Colomas, 1980). En algunos casos los efectos de la luz depende de su longitud de onda. Por ejemplo, la luz blanca mejora la síntesis de betacianinas más que la luz UV-A (Silva *et al.* 2005). Se ha visto que la exposición a luz azul y UV en cultivos de callos de *Portulaca* sp. Joya induce la biosíntesis de betalaínas (Kishima *et al.* 1995). También se ha sugerido que la formación de betacianinas en cultivos en suspensión de *Chenopodium album* se regula por luz UV (Rudat y Göring 1995). Cuando se cultivan raíces transformadas de *B. vulgaris* bajo iluminación continua, acumulan altos niveles de betalainas (Mukundan *et al.* 1999), y cuando estas raíces se cultivan bajo una combinación de luz azul y radiación de color rojo, se mejora la acumulación de betacianinas y betaxantinas (Shin *et al.*, 2003).

4. Sistemas de cultivo establecidos

Entre los sistemas *in vitro* descritos para la producción de betalaínas a partir de diferentes especies de plantas, de manera general se cita la obtención de callos amarillos (ricos en betaxantinas) y/o rojos y suspensiones de células color violeta (ricas en betacianinas) (Tabla 3). Elliot y Murray en 1975 desarrollaron cultivos de callo de *Amaranthus tricolor*, demostrando que una amplia gama de bases de purina, nucleósidos y nucleótidos cíclicos, actúan como análogos de citocininas, lográndose inducir la síntesis de betacianinas. Berlin *et al.*, en 1986 obtuvieron de *C. rubrum* callos y suspensiones con alto contenido de

amarantina. Böhm *et al.*, en 1991 establecieron con *Portulaca grandiflora* líneas celulares de callo productoras de altas concentraciones de betaxantinas, así como callos con fenotipo naranja, rojo y violeta. De manera similar Girod y Zryd en 1991, obtuvieron de remolacha roja, líneas celulares de callo amarillo, anaranjado, rojo y violeta utilizando concentraciones bajas de 2,4-D y BAP en medios MS modificados, reportando que la metilación del ADN de las células por 5-azacitidina y la poliADP-ribosilación por 3-metoxibenzamida juega un papel clave en la represión de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de betacianinas (Figura 11F-L). Partiendo del trabajo de Girod y Zryd, Cueros *et al.*, en 1992, produjeron suspensiones celulares de color violeta con mayor contenido de betacianinas en comparación con el material vegetal de partida. Heuer *et al.*, en 1996, establecieron suspensiones celulares rojas de *Dorotheanthus bellidiformis* (Figura 11 M), en donde identificaron las enzimas betanidina 5-O- y 6-O-glicosiltransferasas (5-GT y GT-6). En 1998 Schliemann *et al.*, a partir de *Portulaca grandiflora* lograron desarrollar callos rojos, utilizando DOPA como sustrato. Akita *et al.*, en 2000, obtuvieron callos amarillos y rojos de *B. vulgaris* cv. Detroit, estableciendo cultivos en suspensión productores de betacianinas. En 2005, Santos-Díaz *et al.*, obtuvieron tejido calloso de *Mammillaria candida*, en donde demostraron que el estrés biótico y abiótico aumenta la producción de betacianinas. En 2011 Zhao *et al.*, obtuvieron cultivos de callo de tonalidades amarillas y rojas de *Suaeda salsa*, reportando que 2,4-D y BAP actúan sobre la expresión del gen de DODA, favoreciendo la acumulación de betalaínas. Radfar *et al.*, en 2012 partiendo de explantes de tallo de *Zaleya decandra* establecieron callos de color rosa y amarillo (Figura 11A). En 2013 Biswas *et al.*, a partir de explantes de tallo de *Amaranthus tricolor*, y

utilizando medio MS suplementado con concentraciones bajas de ANA y 2,4-D, desarrollaron líneas de callo rojo-violeta, rosa y/o amarillo (Figura 11C y 12D), informando la presencia de amarantina, isoamarantina y una betaxantina metilada derivada de arginina. Jamilah *et al.*, en 2014 utilizando medio MS adicionado con BAP, obtienen cultivos *in vitro* de *Celosia cristata* de color anaranjado a partir de explantes de hoja (Figura 11B).

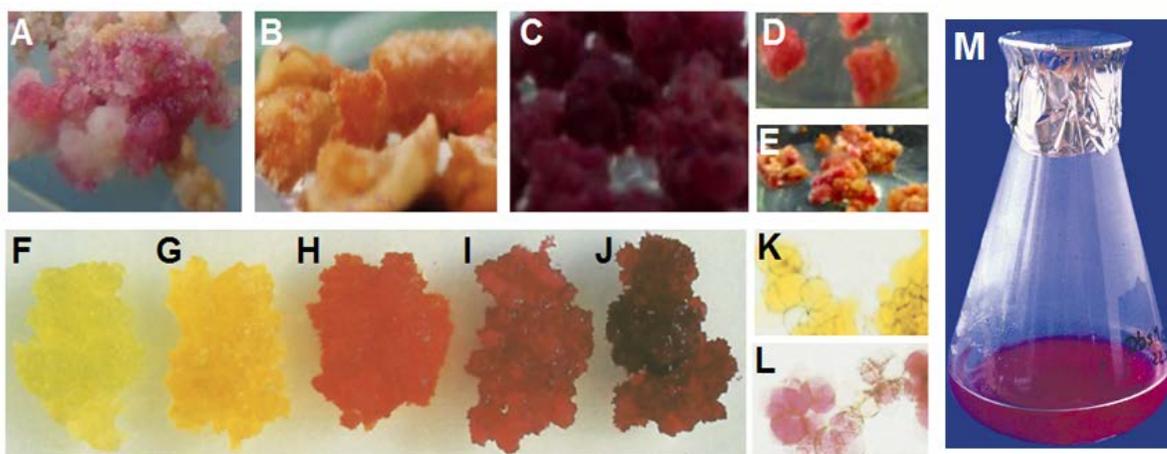


Figura 11. Producción de betalainas en sistemas *in vitro*. Características fenotípicas de tejido calloso de *Zaleya decandra* (A); *Celosia cristata* (B); *Amaranthus tricolor* (C-F); *Beta vulgaris* (F-J). Microscopía de células de callo amarillo (K) y rojo (L) de *Beta vulgaris*. Suspensiones celulares de *Dorotheanthus bellidiformis* (M).

El sistema de producción *in vitro* de betalainas, más utilizado es de suspensiones celulares de raíces transformadas de remolacha roja y amarilla (*Beta vulgaris*) obtenidas por *Agrobacterium* (Figura 12) (Taya *et al.* 1992; Jiménez-Aparicio y Gutiérrez-López 1999; Mukundan *et al.* 1999; Pavlov *et al.* 2002; Georgiev *et al.*, 2008). La elección de cultivares apropiados es importante para obtener líneas de raíces transformadas altamente productoras de betalainas, ya que pueden existir variaciones en la morfología celular, tasa de crecimiento y ramificación del cultivo, asociadas a su transformación (Taya *et al.* 1992).

Tabla 3. Producción de betalaínas en cultivos *in vitro* de plantas

Especie	Cultivo <i>in vitro</i>	Pigmento	Contenido	
<i>Amaranthus tricolor</i>	Cultivo de callo	Betacianinas	-	Elliot y Murray (1975)
<i>B. vulgaris</i> var. Boltardy	R. transformadas	Betacianinas	0.7 mg g ⁻¹ FW	Hamill <i>et al.</i> (1986)
		Betaxantinas	1.3 mg g ⁻¹ FW	
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	R. transformadas	Betanina	6.1 mg g ⁻¹ DW	Taya <i>et al.</i> (1992)
		Vulgaxantina I	9.3 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	R. transformadas	Betalaínas	2.9 mg g ⁻¹ DW	Weathers y Zobel (1992)
<i>B. vulgaris</i> var. lutea	R. transformadas	Portulaxantina II	-	Hempel y Bohom (1997)
		Vulgaxantina I	-	
<i>B. vulgaris</i> var. Mahyco Red	R. transformadas	Betalaínas	7.34 mg g ⁻¹ DW	Makundan <i>et al.</i> (1998)
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	R. transformadas	Betacianinas	18.5 mg g ⁻¹ DW	Shin <i>et al.</i> (2002)
<i>B. vulgaris</i> var. Ruby Queen	R. transformadas	Betalaínas	11.4 mg g ⁻¹ FW	Timmaraju <i>et al.</i> (2003)
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	R. transformadas	Betacianinas	10 mg g ⁻¹ DW	Pavlov <i>et al.</i> (2003)
		Betaxantinas	14.7 mg g ⁻¹ DW	
		Betalaínas Totales	24.7 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	Cultivo de Callo			Girod y Zryd (1991)
	Fenotipo amarillo	Vulgaxantina II	1.813 μM g ⁻¹ DW	
		Miraxantina V	1.177 μM g ⁻¹ DW	
		Betaxantinas Totales	4.278 μM g ⁻¹ DW	
	Fenotipo anaranjado	Vulgaxantina II	5.519 μM g ⁻¹ DW	
		Miraxantina V	3.061 μM g ⁻¹ DW	
		Betaxantinas Totales	12.21 μM g ⁻¹ DW	
	Fenotipo rojo	Betanina	8.69 μM g ⁻¹ DW	
		Isobetanina	0.72 μM g ⁻¹ DW	
		Total de betacianinas	11.22 μM g ⁻¹ DW	
	Fenotipo violeta	Betanina	22.63 μM g ⁻¹ DW	
		Isobetanina	2.90 μM g ⁻¹ DW	
		Total de betacianinas	28 μM g ⁻¹ DW	
<i>G. marocephala</i> St-Hil.	Cultivo de Callo	Betalaínas	-	Vieira <i>et al.</i> (1895)
<i>Mammillaria candida</i>	Cultivo de Callo	Betaxantinas	-	Santos- Díaz <i>et al.</i> (2005)
<i>Portulaca</i> sp. Jewel	Cultivo de Callo	Betalaínas	8.5 ng g ⁻¹ FW	Kishima <i>et al.</i> (1995)
<i>Suaeda salsa</i>	Cultivo de Callo	Betacianinas	-	Zhao <i>et al.</i> (2011)
<i>Zaleya decandra</i>	Cultivo de Callo	Betacianinas	-	Radfor <i>et al.</i> (2012)
<i>Celosia cristata</i>	Cultivo de Callo	Betaxantinas	-	Taha y Wafa (2012)
<i>Amaranthus tricolor</i>	Cultivo de Callo	Betacianinas	-	Biswas <i>et al.</i> (2013)
		Betaxantinas	-	
<i>Chenopodium rubrum</i> L.	C. en suspensión	Betacianinas	55 μM g ⁻¹ DW	Berlin <i>et al.</i> (1986)
<i>C. album</i> L.	C. en suspensión	Betalaínas	-	Rudat y Goring (1995)
<i>B. vulgaris</i>	C. en suspensión	Betalaínas	2.6 μM g ⁻¹ DW	Bokern <i>et al.</i> (1991)
<i>Dorotheanthus bellidiformis</i>	C. en suspensión	Betalaínas	-	Heuer <i>et al.</i> (1996)
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	C. en suspensión	Betalaínas	-	Leathers <i>et al.</i> (1992)
	Fenotipo anaranjado	Betaxantinas	10 mg g ⁻¹ DW	
	Fenotipo violeta	Betacianinas	28 mg g ⁻¹ DW	
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	C. en suspensión	Betalaínas	12-35 mg g ⁻¹ DW	Khlebnikov <i>et al.</i> (1995)
<i>B. vulgaris</i> var. Bikores Monogerm	C. en suspensión	Betalaínas	4.2 mg g ⁻¹ DW	Rodríguez-Monroy <i>et al.</i> (1994)
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	C. en suspensión	Betacianinas	7.9 mg g ⁻¹ DW	Akita <i>et al.</i> (2000)
<i>Portulaca</i> sp. Jewel	C. en suspensión	Betacianinas	5.3 mg g ⁻¹ FW	Bhuiyan y Adachi (2003)
<i>Phytolacca americana</i> L.	C. en suspensión	Betanidina	-	Schliemann <i>et al.</i> (1996)
<i>P. acinosa</i> Roxb.	C. en suspensión	Iamprantina II	-	
<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	C. en suspensión	Betaxantinas	-	Bohm <i>et al.</i> (1991)
<i>P. americana</i> L.	C. en suspensión	Betacianinas	-	Sakuta <i>et al.</i> (1991)

*Tomada y modificada de Georgiev *et al.*, 2008.

Se ha informado que líneas de raíces transformadas obtenidas de cuatro cultivares diferentes de *B. vulgaris* (cvs. Detroit, Dark Red, Egipto, Bordo y Detroit 2), acumulan desiguales niveles de betalaínas: 13.2, 5.0, 3.1 y 3.7 mg/g L (peso seco) respectivamente (Pavlov *et al.* 2002). Además la edad del inóculo y la duración de los periodos de subcultivo influyen fuertemente en el crecimiento las tasas de formación del producto (Pavlov *et al.*, 2003). La principal desventaja de estos cultivos *in vitro* es la presencia del ADN del plásmido bacteriano en sus genomas y la necesidad de utilizar sistemas de fermentadores complejos para su cultivo (Figura 12A). Sin embargo se ha reconocido el uso de biorreactores como alternativa viable, para la producción a gran escala de estos metabolitos (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999; Georgiev *et al.*, 2008).

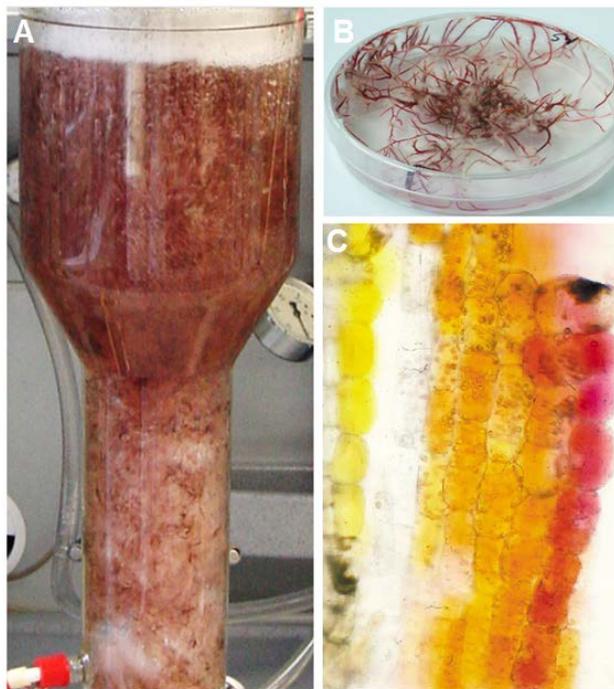


Figura 12: Cultivo de raíces transformadas de *Beta vulgaris* en columna de burbujeo (A) y placa de agar (B). Localización de betacianinas (pigmentos rojos) y betaxantinas (pigmentos amarillos), en la sección longitudinal de raíces transformadas de remolacha amarilla. Imágenes A y B tomadas de http://tudresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/fakultaet_maschinenwesen/ilb/projekte. Imagen C tomada de Strack *et al.*, 2003.

VI. Betalaínas en la familia Amaranthaceae

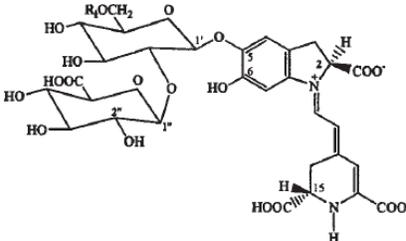
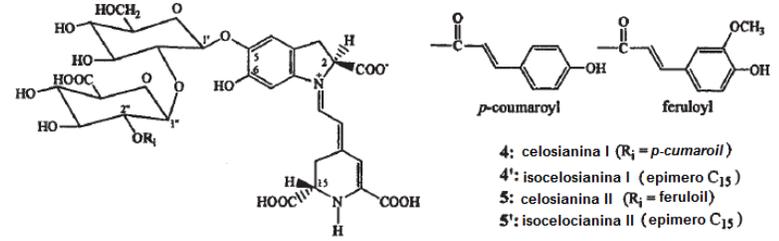
Como se mencionó en un inicio las betalaínas se distribuyen sólo en las plantas Caryophyllales (Piattelli y Minale, 1964; Cai *et al.*, 2005), orden al que pertenece la familia Amaranthaceae, la cual contiene varios géneros importantes como *Beta*, *Amaranthus*, *Celosia*, *Gomphrena*, e *Iresine* (Wheeler, 1992; Cai *et al.*, 2005). Piattelli y Minale investigaron diversos tipos de betacianinas de 16 especies de seis géneros de la familia Amaranthaceae (Piattelli y Minale, 1964). Huang y Hwang (1981) aislaron e identificaron las betacianinas (amarantina e isoamarantina) de hortalizas de amaranto (*Amaranthus tricolor*). Heuer *et al.*, identificaron betacianinas (gomfreninas e isogomfreninas) de flores de *Gomphrena globosa* (Heuer *et al.*, 1992). Cai y colaboradores lograron separar, identificar y cuantificar betalaínas de 37 especies de 8 géneros de la familia Amaranthaceae. Particularmente del género *Amaranthus* por ser considerado una fuente alternativa de pigmentos, ya que algunos genotipos de este género producen considerable biomasa, obteniéndose valiosos rendimientos de betalaínas. También lograron caracterizar 16 betacianinas de color rojo-violeta 8 del tipo amarantina, 6 gomfrenina y 2 betanina (Tabla 4), entre las que se encontraron betacianinas simples (libres de acilación) y betacianinas aciladas como betanina 5-*O*- β -glucuronosil-glucósido, betanidina 6-*O*- β -glucósido acilado con ácido ferúlico, ácido *p*-coumarico ó ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico. Las betaxantinas aisladas fueron dopamina-betaxantina, 3-metoxitiramina-betaxantina y (S) triptófano-betaxantina (Tabla 5), descritas en el género celosía (Cai *et al.*,

2005), donde también se encontraron 2-d Descarboxi-betanidina, así como dopamina libre (Schliemann *et al.*, 2001).

La familia Amaranthaceae fue descrita por Antoine-Laurent de Jussieu, en 1789. Comprende alrededor de 160 géneros y 2.400 especies. Están representadas como herbáceas o arbustos, anuales o perenes, con hojas alternas u opuestas. Presentan inflorescencias en espigas o glomérulos globosos, densamente bracteadas, frecuentemente formando espigas o panículas compuestas. Poseen tépalos pequeños escariosos, generalmente libres y blanquecinos. Contienen alrededor de 5 estambres, opuestos a los tépalos, filamentos parcial o completamente en forma de cono, generalmente con lóbulos, alternos con las anteras. Tienen óvulo súpero locular, de uno a tres estigmas y varios estilos; placentación basal, con presencia de uno o varios óvulos. El fruto se presenta en forma de cápsula, nuez pequeña o baya (Müller y Borsch, 2005; Judd *et al.*, 2007).

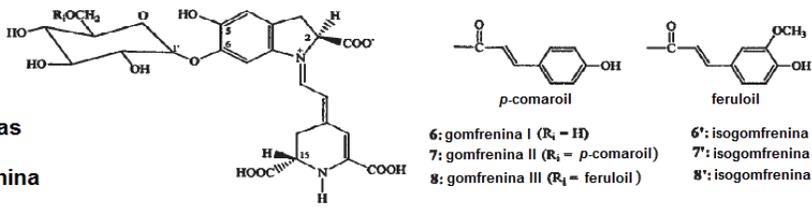
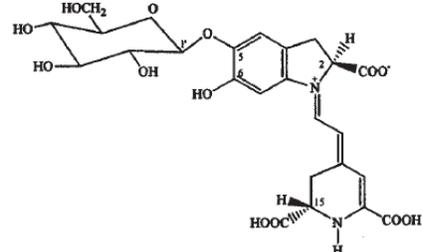
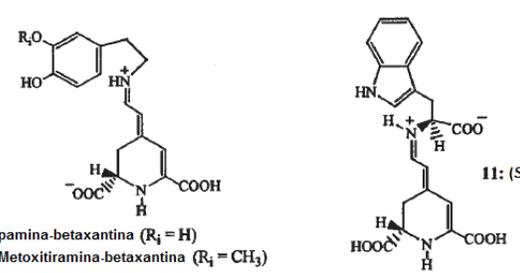
La distribución de la familia Amaranthaceae es cosmopolita, con especies tropicales centradas en África, América y Asia. Los usos de estas plantas son muy variados. Por ejemplo, el cultivo del género *Amaranthus sp.*, comúnmente se utiliza para la obtención de pseudocereales; el género *Celosia sp.*, tiene aplicaciones ornamentales (Judd *et al.*, 2007; Müller y Borsch, 2005). Recientemente se han reportado múltiples usos terapéuticos y medicinales de diferentes especies pertenecientes a esta amplia familia (Rahman-Mahbubu y Gulshana-Ara, 2014).

Tabla 4. Estructura química y betacianinas del tipo amarantina identificadas en Amaranthaceae

Número	Betalaina (nombre)	Tiempo de Retención (min)	UV-VIS λ_{max} (nm) †	MS [M+H] ⁺	Fuente Vegetal representativa
<p>Betacianinas Tipo Amarantina</p>  <p>3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)</p> <p>1: amarantina (R₁ = H) 1': isoamarantina (epimero C₁₅) 3: iresina I (R₁ = HMG) 3': isoiresinina I (epimero C₁₅)</p>					
1	Amarantina	10.71	536	727	<i>Amaranthus cruentus</i>
1'	Isoamarantina	12.01	536	727	<i>Amaranthus cruentus</i>
3	Iresina I	17.49	298, 540	871	<i>Iresine herbstii</i>
3'	Isoiresinina I	18.37	298, 540	871	<i>Iresine herbstii</i>
<p>Betacianinas Tipo Amarantina</p>  <p>4: celosianina I (R₁ = <i>p</i>-coumaroil) 4': isocelosianina I (epimero C₁₅) 5: celosianina II (R₁ = feruloil) 5': isocelosianina II (epimero C₁₅)</p>					
4	Celosianina I	19.90	306, 546	872	<i>Celosia cristata</i>
4'	Isocelosianina I	20.56	306, 546	–	<i>Celosia cristata</i>
5	Celosianina II	21.32	312, 546	903	<i>Celosia cristata</i>
5'	Isocelosianina II	22.11	312, 546	–	<i>Celosia cristata</i>

*Tomada y modificada de Cai *et al.*, 2005

Tabla 5. Estructura química y betacianinas del tipo gomfrenina, betanina y betaxantinas identificadas en Amaranthaceae.

Número	Betalaina (nombre)	Tiempo de Retención (min)	UV-VIS λ_{max} (nm) †	MS [M+H] ⁺	Fuente Vegetal representativa
<p>Betacianinas</p> <p>Tipo Gomfrenina</p>  <p>6: gomfrenina I (R₁ = H) 7: gomfrenina II (R₁ = p-comaroil) 8: gomfrenina III (R₁ = feruloil)</p> <p>6': isogomfrenina I (epimero C₁₅) 7': isogomfrenina II (epimero C₁₅) 8': isogomfrenina III (epimero C₁₅)</p>					
6	Gomfrenina I	32.83	540	551	<i>Gomphrena globosa</i>
6'	Isogomfrenina I	35.19	540	551	<i>Gomphrena globosa</i>
7	Gomfrenina II	58.34	310, 552	697	<i>Gomphrena globosa</i>
7'	Isogomfrenina II	61.58	310, 552	–	<i>Gomphrena globosa</i>
8	Gomfrenina III	59.10	322, 552	727	<i>Gomphrena globosa</i>
8'	Isogomfrenina III	63.59	324, 552	–	<i>Gomphrena globosa</i>
<p>Betacianinas</p> <p>Tipo Betanina</p>  <p>2: betanina 2': isobetanina (epimero C₁₅)</p>					
2	Betanina	14.77	538	551	<i>Amaranthus powellii</i>
2'	Isobetanina	12.01	538	–	<i>Amaranthus powellii</i>
<p>Betaxantinas</p>  <p>9: Dopamina-betaxantina (R₁ = H) 10: 3-Metoxitiramina-betaxantina (R₁ = CH₃) 11: (S)-Triptófano-betaxantina</p>					
9	Dopamina-betaxantina	17.1	216, 260, 474	347	<i>Celosia cristata/plumosa</i>
10	3-Metoxitiramina-betaxantina	20.8	216, 312, 474	361	<i>Celosia cristata/plumosa</i>
11	(S)-Triptófano-betaxantina	22.0	218, 268, 478	398	<i>Celosia cristata/plumosa</i>

*Tomada y modificada de Cai *et al.*, 2005

1. *Amaranthus hypochondriacus*

La especie *A. hypochondriacus* variedad nutrisol, pertenece a las dicotiledóneas C4 (Figura 13A y C). Fue descrita por Carlos Linneo en 1753. La palabra *Amaranthus* procede del griego *amaranthos*, que significa "flor que no se marchita" y del epíteto *hypochondriacus*. *A. hypochondriacus* es una planta ornamental y medicinal propia y exclusiva de México, distribuida en el Centro y Sur de América y Asia (Pedersen, 1987; CONABIO, 2009). Destaca por su capacidad para tolerar condiciones de estrés y producir semillas de alto valor nutracéutico. Las semillas de amaranto son apreciadas por su capacidad para resistir estrés por sequía y salinidad con mayor eficiencia que muchos otros cultivos C3 y C4. Su tolerancia a la sequía también se atribuye a las ventajas fisiológicas conferidas por la vía C4, un hábito de floración indeterminada, crecimiento de las raíces primarias largas y extensas y sistemas de raíces laterales en respuesta a la escasez de agua en el suelo, la acumulación de osmolitos y la expresión de genes que codifican para la eliminación de especies reactivas de oxígeno, estabilizantes de proteínas y factores de transcripción (Casique-Arroyo *et al.*, 2014)

A. hypochondriacus es una de las aproximadamente 70 especies que comprenden el género *Amaranthus*. La pigmentación de esta especie se debe predominantemente a dos betacianinas: amarantina, la forma más abundante y su isómero isoamarantina (Tabla 4). Ambos son 5-*O*-glucuroindoglucósidos de dos agliconas: betanidina e isobetanidina (su epímero C-15) respectivamente (Cai *et al.*, 2001; Strack *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 1998).

Un análisis de genes y enzimas claves de la ruta biosintética de betacianinas en *Amaranthus hypochondriacus* (*Ah*), generó una agrupación de proteínas semejantes a las ya reportadas. La única excepción fue la enzima *AhDODA-2*, la cual mostró similitudes con las proteínas DODA presentes en las especies productoras de antocianinas, que no pertenecen al orden Caryophyllales. Este hallazgo podría tener implicaciones evolutivas y fisiológicas importantes. También fueron relevantes los resultados que indican que la acumulación del pigmento no siempre se correlaciona con los niveles de expresión génica y/o actividad de la tirosinasa. Esta discrepancia permite ver que ese trata de un genotipo dependiente y específico del tejido, que además puede ser influenciado por el tipo de estrés aplicado a la planta (Casique-Arroyo *et al.*, 2014).

En 2014 fue secuenciado el genoma y transcriptoma de *Amaranthus hypochondriacus*, un diploide ($2n = 32$) (Figura 13 B), con un tamaño de genoma estimado de 466 Mb. De los 411 polimorfismos, un solo nucleótido de vinculación (SNPs), representa 355 SNPs (86%) y el 74% de las 8600 millones de bases del mapa del transcriptoma secuenciado están vinculadas a los andamios del genoma; el cual codifica para al menos 24.829 proteínas. Comparte paleohexaploidía con especies del súper orden *Magnoliopsida* y *Asteridae* (Figura 13 C). Alberga un SNP en 1000 bases y contiene 13.76 % de elementos de repetición (Meeta *et al.*, 2014), lo cual representa un avance clave en el estudio de esta especie, ya que ofrece herramientas para comprender los diversos fenotipos que son exclusivos del amaranto, incluyendo el perfil nutricional, su comportamiento como maleza,

su resistencia a diferentes tipos de estrés y caracterizar los genes implicados en la biosíntesis de betalainas.

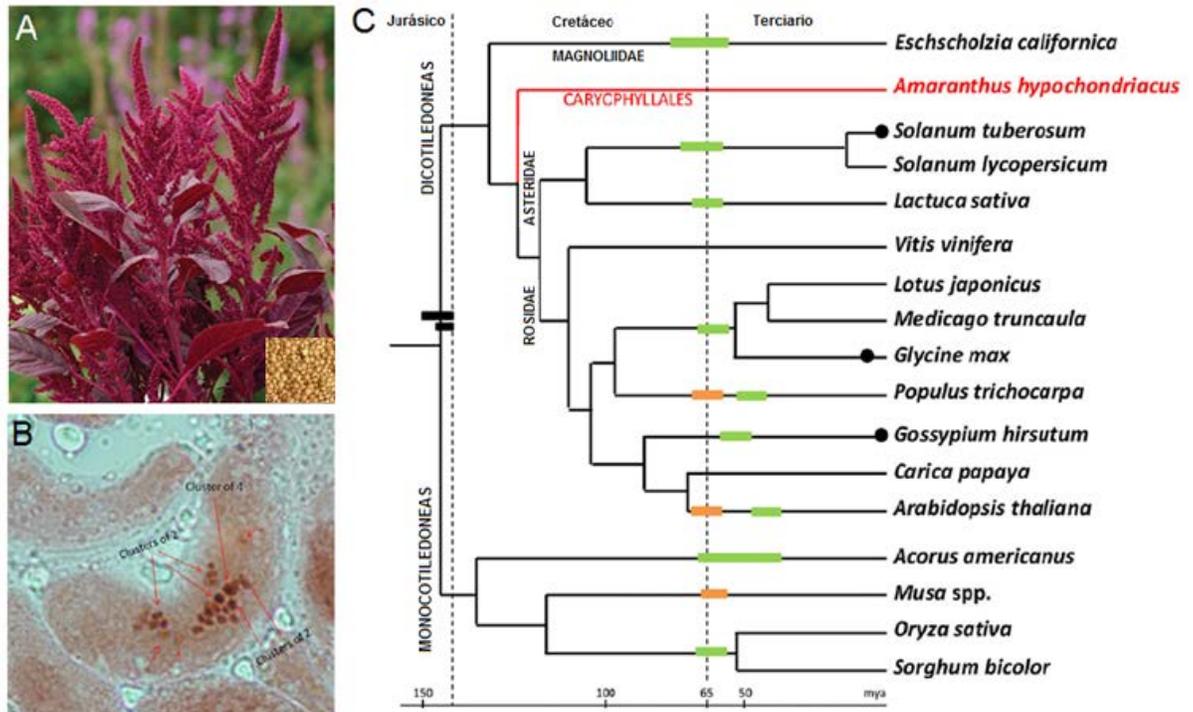


Figura 13: *Amaranthus hypochondriacus*. (A) Características fenotípicas de la parte aérea de la planta y sus semillas en la variedad nutrisol (B) Cariotipo mostrando la diploidía con 32 cromosomas en regiones mitóticas de la raíz de la planta. (C) Árbol filogenético comparando eventos de duplicación de todo el genoma en muchas especies, incluyendo *A. hypochondriacus*. Imágenes B-C tomadas de Meeta *et al.*, 2014.

2. *Celosia argentea*

Celosia argentea variedad plumosa, fue descrita por Carlos Linneo en 1753; es una herbácea anual, dicotiledónea C4 (Figura 14). Su nombre deriva del griego *kelos* "quemado", y del epíteto latino *argentea* "plateada" (Pedersen, 1987).

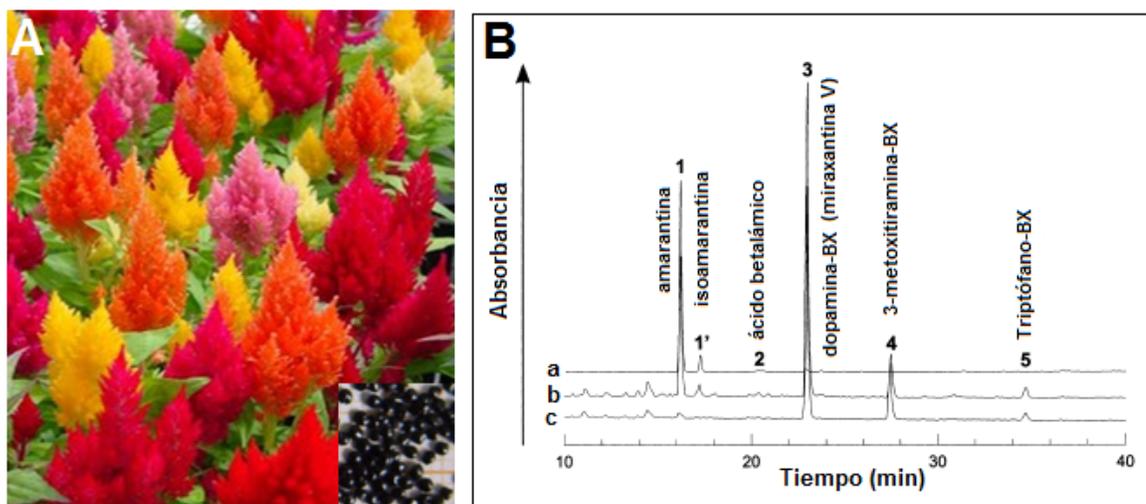


Figura 14. *Celosia argentea*. (A) Características fenotípicas de la parte aérea de la planta y sus semillas en la variedad plumosa. (B) Perfiles de elución en HPLC de betalainas presentes en: a) inflorescencias rojas (400-650 nm; de escala completa: 1,55 UA); b) inflorescencias anaranjadas (470 nm; a gran escala: 0,255 UA); c) inflorescencias amarillas (470 nm; de escala completa: 0,185 UA). Imagen B tomada y modificada de Schliemann *et al.*, 2001.

Celosia argentea es una de las 60 especies que conforman el género *Celosia*. Es nativa de las zonas subtropicales y templadas de África, Centro y Sur de América y el Sudeste Asiático, sin embargo es una especie ampliamente extendida debido a su uso ornamental (Taha y Wafa, 2011; Ahmad y Dole; 2014). También se ha documentado su aplicación como planta medicinal, haciendo uso de extractos del vegetal entero o de las inflorescencias para tratar diabetes *mellitus*, cáncer, enfermedades epiteliales, respiratorias, inflamatorias como artritis reumatoide, trastornos hepáticos, gastrointestinales, hematológicos y ginecológicos (Priya *et al.*, 2004, Ramesh *et al.*, 2013). Sus propiedades medicinales se han asociado a la gran variedad de constituyentes que presenta, entre los

que se encuentran altas concentraciones de dopamina y betalaínas. La variación de colores de las inflorescencias depende de contenido de betalaínas. Tonos amarillos corresponden a la presencia de dopamina-betaxantina, 3-metoxitiramina-betaxantina y (S) triptófano-betaxantina (Tabla 4), tonos violetas se deben al contenido de amarantina, betanina y sus respectivos isómeros (Tabla 5), tonos rojos y anaranjados ocurren de la combinación de betaxantinas y betacianinas en diferentes proporciones (Figura 14) (Schliemann *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2005).

Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

Los colorantes sintéticos han sido ampliamente utilizados sobre los pigmentos naturales por su gran capacidad tintórea, estabilidad y bajo costo de producción. Se ha observado que estos colorantes, provocan efectos adversos en la salud, como trastornos gastrointestinales, hepáticos, alteraciones de conducta y aprendizaje (Downham y Collins 2000, Biswas *et al.*, 2013). Por tal motivo, a finales de los años 90 la FDA redujo la autorización del uso de colorantes sintéticos de 700 a 7 los colorantes sintéticos autorizados. Actualmente la EFSA sólo permite el uso de aditivos coloridos, cuando existe necesidad real vinculada con la preservación, sabor o estabilidad de los alimentos (Downham y Collins, 2000; McCann *et al.*, 2007; Fernández y Giménez, 2013). Lo anterior se ha visto reflejado en el mercado global de colorantes, ya que en 2011 ascendió a 1550 millones de dólares, correspondiendo el 70 % a tinturas naturales (Carmona, 2013); entre estas las betalaínas han despertado gran interés en la industria, debido a las ventajas que presentan con respecto a las antocianinas y carotenoides, como son su hidrosolubilidad, sus tonalidades amarillas (betaxantinas) y violetas (betacianinas), su estabilidad en medio ácido (Santos-Díaz *et al.*, 2005). Otras características favorables de las betalaínas son su actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinogénica y neuroprotectora, reconociéndoseles como sustancias nutracéuticas (Stintzing y Carle, 2004; Henriette y Azeredo, 2009; Wang y Yang, 2010; Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013).

De manera natural *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol y *Celosia argentea* variedad plumosa sintetizan betalaínas, sin embargo el cultivo de ambas especies no está destinado a la producción de pigmentos. El amaranto se reserva a la obtención de grano (Mapes, 1996; Espitia-Rangel, 1991); y celosía preferentemente al uso ornamental (Taha y Wafa, 2012; Jamilah *et al.*, 2014). Además el contenido de betalaínas en ambos vegetales es bajo (<1 %), ya que son metabolitos secundarios (Buchanan *et al.*, 2000); lo que puede provocar una sobreexplotación de estas especies y de los recursos naturales para su producción. Por tanto, el establecimiento de cultivos *in vitro* de estas dos amarantáceas, representa una alternativa biotecnológica sustentable para obtener líneas celulares con capacidad de síntesis de betalaínas. Con las herramientas del cultivo de tejidos vegetales (CTV), la producción puede ser incrementada consiguiendo eliminarse las desventajas de la estacionalidad, las variaciones geográficas y anuales en los cultivos, así como las fluctuaciones en los rendimientos debido a enfermedades o plagas que surgen al cultivar las plantas en campo. De esta forma sería factible obtener una fuente sostenible de pigmentos naturales de interés para la industria, los cuales al ser encapsulados seguirán siendo moléculas bioactivas y funcionales, pudiéndose aplicar a diferentes productos asegurando una concentración estable de colorante.

Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL Y METODOS

I. Reactivos

Productos químicos y reactivos fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, EEUU). Los disolventes se obtuvieron de Merck Chemicals Ltd. (Dorset, Inglaterra). Acetonitrilo y metanol de grado HPLC fueron adquiridos de Labscan Ltd. (Dublín, Irlanda). El agua destilada se purificó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

II. Material vegetal

En el caso de la especie *Amaranthus hypochondriacus* var. nutrisol, las semillas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México. En el caso de la especie de *Celosia argentea* var. plumosa las semillas fueron obtenidas de plantas con inflorescencias violetas, adquiridas en Viveros La Generala (Murcia, España) y cultivadas en los invernaderos de la Universidad de Murcia (Murcia, sureste de España).

III. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, fueron sometidas a los siguientes tratamientos de desinfección: 1) lavado con detergente líquido comercial al 1 % durante 10 y 15 min; 2) inmersión en etanol al 70% durante 30s; 3) lavado en solución de hipoclorito de sodio al 0.6 %, 1.2 %, 1.8% y 0.2% de Tween-20 durante 10 y 20 min; y 4) tres enjuagues con agua estéril bajo condiciones asépticas. En esta especie, el tratamiento de

desinfección con detergente líquido comercial 1% durante 15 min, seguido por etanol al 70 % durante 30 s, y solución de hipoclorito de sodio 1.8% con 0.2% de Tween-20 durante 30 min, presentó asepsia del 100 %, por lo que se decidió aplicar directamente dicho tratamiento de desinfección a las semillas *Celosia argentea*.

Una vez realizado el proceso de desinfección, las semillas de ambas especies vegetales se transfirieron a tubos esterilizados (25 x150 mm) que contenían 15 mL de medio semi-sólido Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962). De las plántulas obtenidas con crecimiento aproximado de 3 cm en amarantoy 2 cm en celosía (20 días de edad) se tomaron como fuente de explante, hipocótilos y hojas de la primera especie vegetal, y sólo hipocótilos de la segunda, tomando como referencia la presencia de coloración roja en dichas estructuras.

IV. Inducción de callo

Los explantes de hipocótilos y hojas de amaranto y los explantes de hipocótilos de celosía, se transfirieron a tubos individuales (n = 6), con 10 mL de medio MS, suplementado con 30 g / L de sacarosa y 2 g / L de phytigel como agente solidificante. Para evaluar la respuesta a callo, los medios de inducción fueron enriquecidos con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal: BAP (0.0, 2.22, 4.44, 6.66, 8.88 μ M) y 2,4-D (0.0, 2.26, 4.52, 6.79, 9.05 μ M). Todos los medios de cultivo se ajustaron a pH 5.8 con NaOH 1N y HCl y se esterilizaron en autoclave a 121 ° C durante 18 min. Los cultivos se incubaron bajo un fotoperíodo de 16 h bajo luz fluorescente a una irradiancia de 50 μ mol / m² / s, y temperaturas de 23 ° C (día) y 18 ° C (noche). La respuesta de formación de callo

de los explantes para cada uno de los tratamientos de inducción fue expresada como el porcentaje del número de hojas formando callo respecto al total de explantes evaluados, el cual fue registrado a los 30 d de cultivo. La proliferación de las líneas celulares de callo se realizó mediante subcultivos en medio fresco, cada 20 d durante 9 ciclos de subcultivo (celosía), y cada 30 d durante 21 ciclos de subcultivo (amaranto). En ambas especies vegetales dicho tratamiento dio origen a una línea celular de rápido crecimiento y formación de callo friable. En *A. hypochondriacus* se obtuvo una línea de callo color amarillo verdoso. En *C. argentea* se produjeron dos líneas de callo de color amarillo y rojo.

V. Establecimiento de suspensiones celulares

El cultivo en suspensión de células se inició a partir de callo friable de 3 semanas de edad de la línea celular de callo amarillo verdoso (*A. hypochondriacus*), y de la línea celular de callo rojo (*C. argentea*) mediante la transferencia de 2.5 g a matraces Erlenmeyer de 100 mL, que contenían 30 mL de medio de inducción (sin phytigel), suplementado con 10 mM de ácido ascórbico en el caso de celosía. Los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones en un agitador orbital a 110 rpm. Después de tres subcultivos cada 15 días, las células se tamizaron a través de filtros de tela de nylon de 200 μm de poro, para obtener un cultivo de suspensión celular homogénea. El cultivo se mantuvo durante 6 meses por subcultivo cada 15 días, utilizando un tamaño de inóculo celular de 10 % (v / v) en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo.

VI. Cultivo de suspensiones celulares de *A. hypochondriacus* en biorreactor de 3L

En el caso de la línea celular en suspensión de amaranto, se utilizó para su cultivo, un biorreactor de vidrio de 3 L de volumen nominal (Applikon Schiedam, Holanda), provisto de una tapa de acero inoxidable con multipuertos. Los puertos se usaron para la colocación de un electrodo para pH y uno para oxígeno (AppliSens, Schiedam, Holanda), un termopozo, una entrada de aire, un dispositivo para tomar muestra, tres mamparas y un tablón con tres entradas; donde se colocaron dos salidas de venteo y una entrada de HCl. En la entrada de aire, en las salidas de venteo y de toma de muestra se colocaron filtros de tamaño de poro de 0.2 μ M (POLICAP, Whatman, EEUU). Los electrodos de pH y oxígeno fueron conectados a un biocontrolador modelo ADI 1030 (Applikon Schiedam, Holanda), para realizar el registro y control de pH y tensión de oxígeno disuelto en el medio (TOD). La agitación de los cultivos se realizó a 400 rpm con un motor de velocidad variable y un controlador de velocidad modelo ADI 1012 (Applikon Schiedam, Holanda). El impulsor tipo Rushton se colocó a 2,6 cm, del fondo del tanque. La relación diámetro del impulsor/diámetro del tanque fue de 0.35.

El biorreactor de 3L conteniendo 900 mL del medio de cultivo MS (mismo utilizado para el mantenimiento de las células en suspensión, sin ningún suplemento), se inoculó con 300 mL de células de un cultivo de *A. hypochondriacus* de 8 días de cultivo, cuya relación fue al 20 % de células, con respecto al volumen del medio. El biorreactor fue puesto en operación a 400 rpm a 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

VII. Cinéticas de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento en matraz de ambas especies vegetales, 2.5 g de células frescas cosechadas después de 8 días de cultivo, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 30 mL de medio de cultivo. En el caso de amaranto, la cinética de crecimiento en biorreactor de 3L se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez Monroy y Galindo (1999). El medio de cultivo utilizado en ambos sistemas y para las dos especies, fue MS líquido suplementado con sacarosa al 30 g /L, BAP 6.66 μ M y 2,4-D 6.79 μ M. Se extrajeron alícuotas cada 3 días durante un período de 14 (amaranto) y 30 (celosía) días, a partir de matraces de cultivo y de biorreactor, para determinar el crecimiento celular, la morfología celular, la viabilidad celular, y en su caso el contenido de betalaínas y dopamina. Todos los experimentos se realizaron por triplicado ($n = 3$) y los resultados se expresaron como valores promedio y las desviaciones estándar (SD).

VIII. Viabilidad celular

La viabilidad de las células se determinó por la prueba de tinción con azul del Evans (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999). Dos mililitros de muestra tanto de matraz, como de biorreactor se incubó en una solución 0.25 % de azul de Evans, durante 5 min y luego se contaron las células en una cantidad al menos de 700; esto se repitió dos veces ($n = 6$). Se calculó la viabilidad mediante el conteo de las células que no se colorearon (células viables).

IX. Envejecimiento de líneas celulares de *Amaranthus hypochondriacus*

Dos gramos de células de callo y de suspensiones celulares de amaranto, se transfirieron a frascos tipo gerber y matraces Erlemeyer de 100 mL, conteniendo 25 mL y 20 mL de medio sólido y líquido, respectivamente (n = 6). El medio de cultivo y las condiciones de incubación fueron idénticos al de las línea celulares de partida. El monitoreo y toma de muestras se realizó semanalmente, dejándose envejecer los cultivos hasta completar once semanas sin subcultivo.

X. Adición de precursores y elicitores en líneas celulares de *A. hypochondriacus*

Para determinar el efecto de la adición de precursores y elicitores en la producción de betalainas en la línea celular de amaranto, 2 g de células de callo y 2.5 g de células en suspensión de 8 días de cultivo, se transfirieron a frascos tipo gerber con 25 mL de medio sólido, y a matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio líquido, respectivamente. Tanto para la línea de callo como para la línea en suspensión se utilizó medio MS con la misma formulación y bajo idénticas condiciones de incubación de las líneas celulares de partida. En condiciones de esterilidad, de manera individual y según el caso, los cultivos fueron inoculados con tirosina 1.5 mM, L-DOPA 1.5 mM, metiljamonato (MeJA) 100 µM y ácido salicílico (SA) 10 mM. Para las suspensiones celulares y cultivos de callo, se realizaron subcultivos cada 15 y 30 días, respectivamente. Cada tratamiento constó de 3 repeticiones cada una conformada dos frascos.

XI. Extracción y purificación del pigmento amarillo de *A. hypochondriacus*

Muestras liofilizadas de *A. hypochondriacus*, provenientes de tejido calloso y de suspensiones celulares cultivadas a nivel de matraz y biorreactor de 3L, se extrajeron por separado con ciclo hexano (10 g /150 mL), para aislar la mayor cantidad de compuestos lipofílicos, retirándose el solvente cada 24 horas, repitiéndose este proceso tres veces. Posteriormente para obtener el pigmento amarillo, las muestras se sometieron a un proceso de extracción durante 15 horas con 50 mL de metanol al 100 %, cambiándose el disolvente 3 veces y apartándose en recipientes protegidos de la luz. Las muestras líquidas de pigmento, fueron centrifugadas a 120000 g durante 40 minutos y extraídas en fase sólida con cartuchos C-18 de 1 mL (Waters, Milford, EEUU), acondicionados con 5 mL de metanol al 100 %, seguido de 5 mL de metanol al 30 %. Las muestras de pigmento amarillo en metanol al 30 %, se inyectaron en la minicolumna, realizándose un lavado con 5 mL de acetona al 40 %, seguido de 5 mL de metanol al 30 %. El pigmento amarillo se eluyó con metanol al 100 %, la fracción resultante se purificó por HPLC (apartado XVI), inyectando 100 µL de muestra y obteniéndose dos fracciones de color amarillo, las cuales fueron evaporadas a sequedad bajo presión reducida a temperatura ambiente. Los residuos de ambas fracciones, se re-disolvieron en metanol al 100 % y se analizaron por HPLC-ESI-MS (apartado XVII). El pigmento restante se guardó a -80 °C para posterior uso. El proceso de extracción y purificación se llevó a cabo en condiciones de obscuridad a 25 °C.

XII. Extracción de betalaínas

En el caso de las muestras de *A. hypochondriacus* de cultivos de callo y suspensión sometidos a envejecimiento, las muestras fueron tomadas semanalmente hasta completar 11 semanas; en los experimentos de adición de precursores y elicitores las muestras se recolectaron cada 3 h, 6 h, 14 h, 24 h, 38 h, 48 h, 62 h, 72 h, 1, 2, 3, 4 y 8 semanas. En cuanto a las muestras de callos y de células en suspensión de *Celosia argentea*, fueron recogidas de 1, 8, 15 y 30 días de cultivo. Las muestras de ambas especies vegetales, se homogeneizaron manualmente en 10 mM tampón fosfato pH 6.0, que contenía ácido ascórbico 10 mM. El homogeneizado y muestras del medio líquido de los cultivos en suspensión se centrifugaron a 14.000 g durante 15 min. El sobrenadante de cada muestra se utilizó para el análisis por HPLC de betalaínas, y ácido betalámico (n = 3). En el caso de celosía también se analizó la presencia de dopamina (n = 3). Todo el proceso se llevó a cabo a 4° C. El porcentaje de humedad y el peso seco de las células se obtuvieron con un analizador de humedad electrónico Kern MLS (Balingen, Alemania).

XIII. Estándares de betalaínas

La betanina se obtuvo a partir de raíces de *Beta vulgaris*, dopaxantina se extrajo y se purificó a partir de flores amarillas de *Lampranthus productus*, betanidina se obtuvo de flores de color violeta de la misma planta, y amarantina se extrajo de *Amaranthus spinosus* (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013; Cai *et al.*, 2005). Los pigmentos restantes se obtuvieron mediante un procedimiento combinado para la liberación de ácido

betalámico y la condensación de éste con la amina de la dopamina y los aminoácidos (S) - glutamina y (S)- triptófano (Gandía-Herrero *et al.*, 2006). El ácido betalámico se obtuvo mediante hidrólisis básica de la betanina (Gandía-Herrero *et al.*, 2012). Todos los compuestos se caracterizaron por espectrofotometría, cromatografía, espectrometría de masas y ionización por electrospray (ESI-MS).

XIV. Cromatografía de intercambio aniónico

La Cromatografía de intercambio aniónico se realizó en un aparato Äkta purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) usando una columna de Q-Sepharose 25 × 7 mm (agarosa reticulada con amonio cuaternario como grupo intercambiador, 90 micras de tamaño de partícula), con un flujo de 1 mL. Los disolventes utilizados fueron fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0 (disolvente A), y fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0, con NaCl 2 M (disolvente B). Después de la inyección de la muestra, el proceso de elución fue el siguiente: 0% de B desde el principio hasta 3 mL, y luego un gradiente lineal se desarrolló a partir de 0% de B a 35% B en 20 mL. En todos los casos, la tasa de flujo fue de 1 mL / min, se recogieron fracciones de 1 mL y el volumen de inyección fue de 1 mL. Las eluciones fueron seguidas por detección UV / VIS a 280, 480 y 536 nm.

XV. Extracción de betalaínas en fase sólida con cartuchos C-18

Se utilizaron cartuchos C-18 de 1 mL (Waters, Milford, MA) y se acondicionaron con 5 mL de etanol seguido de 10 mL de agua purificada. Las soluciones acuosas de pigmentos extraídos y las betalaínas semisintéticas se inyectaron en la minicolumna. Las sales y los

tampones se eliminaron por lavado de la columna con agua purificada. Las betalaínas se eluyeron con etanol y la fracción resultante se evaporó a sequedad bajo presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se volvió a disolver en agua para su uso posterior o se almacenaron a -80°C .

XVI. Análisis por HPLC-DAD

Se utilizó un aparato LC-20AD de Shimadzu (Kyoto, Japón), equipado con un detector SPD-M20A de fotodiodos en serie (PDA). Se desarrolló la cromatografía con una columna C-18 de dimensiones de $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, Kromasil 100 (Teknokroma, Barcelona, España) (Gandía-Herrero *et al.*, 2005). El disolvente A de la fase móvil, consistió de agua con ácido trifluoroacético al 0,05% (TFA), y de un disolvente B compuesto de acetonitrilo con 0.05% de TFA. Un gradiente lineal se realizó durante 42 min de 0% de B a 65% de B. Con un flujo de $1\text{ mL} / \text{min}$, operado a 30°C . Las eluciones se siguieron a λ 270 nm (dopamina), 405 nm (ácido betalámico), 420 nm (pigmento amarillo de amaranto), 480 nm (betaxantinas) y 536 nm (betacianinas). El volumen de inyección fue de $40\text{ }\mu\text{L}$. La identificación de los compuestos (dopamina y betalaínas) se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción con los de los patrones correspondientes y por experimentos de co-elución.

XVII. Espectrometría de masas con ionización por electropray

Para el análisis de espectrometría de masas con ionización por electropray (HPLC-ESI-MS), se utilizó un aparato 1100 VL LC / MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Las condiciones de elución fueron como se describieron anteriormente usando la misma columna (250 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m, Kromasil 100 C-18), con una velocidad de flujo a 0.8 mL / min. La temperatura del vaporizador fue de 350 ° C, y el voltaje se mantuvo en 3,5 kV. El gas transportador fue nitrógeno, a una presión de 45 psi. Las muestras fueron ionizadas en modo positivo. La ionización se monitorio en un rango de m / z 50-1000. El voltaje del multiplicador electrónico del detector fue de 1.350 V.

XVIII. Espectrometría de fluorescencia del pigmento amarillo de *A. hypochondriacus*

Los ensayos espectrofluorimétricos del pigmento amarillo obtenido en las líneas celulares de amaranto, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia LS50B (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, EEUU), equipado con una célula termostatizable. Las medidas fueron realizadas en metanol a 4 ° C en cubetas de cuarzo de 3 mL. El espectro de excitación fue obtenido siguiendo la fluorescencia a la máxima longitud de onda de emisión. Así mismo el espectro de emisión se obtuvo excitando a la correspondiente longitud de onda máxima.

XIX. Espectroscopía UV-Vis

Las medidas espectrofotométricas UV-Vis se realizaron en un aparato V-630 (Jasco Corporation, Tokio, Japón), unido a un baño termostático Tectron (JP Selecta, Barcelona, España). Para la cuantificación de betalaínas, la concentración de pigmento fue evaluada usando coeficientes de extinción molar de $\epsilon = 46,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (dopaxantina), $\epsilon = 27,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ácido betalámico), $\epsilon = 44,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (triptófano-betaxantina), $\epsilon = 46,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (dopaxantina), $\epsilon = 48,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (glutamina-betaxantina y la dopamina-betaxantina), $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (betanina y amarantina) y $\epsilon = 54000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (betanidina) (Schwartz y von Elbe, 1980; Trezzini y Zryd, 1991; Gandía-Herrero *et al.*, 2010). Las medidas fueron realizadas en disoluciones acuosas a 25 °C.

XX. Microscopía

Para la microscopía de campo claro y fluorescencia se utilizó un microscopio Leica DMRB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). En el caso de imágenes de fluorescencia, se utilizó el sistema de filtros I3 (Leica Microsystems) que limitó la luz de excitación al rango de 450-490 nm.

XXI. Encapsulación de betalaínas y dopamina en cultivos *in vitro* de *C. argentea*

De la línea celular de callo rojo y callo amarillo de celosía, por separado se tomaron 35 g de tejido fresco y se extrajeron en 25 mL de tampón fosfato 10 mM pH 6.0, en un homogeneizador Polytron (Kinematica AG, Suiza) (5 s, 2 pulsos, a velocidad media). El

homogeneizado de ambas líneas, fue filtrado a través de tela de nylon y se centrifugo a 120000 g durante 40 min. Al extracto resultante se le adicionó maltodextrina al 10 y 20 % w / v, bajo agitación vigorosa con vórtex. Los extractos fueron sometidos a un secado por pulverización en un mini secador Büchi B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). La temperatura del aire de entrada fue de 140° C, y el aire de salida se mantuvo a 75° C. La alimentación del líquido fue de 5 mL / min. La automatización del flujo fue de 246 L / h, y el flujo de aire de secado de 36 m³ / h (Gandía- Herrero *et al.*, 2013).

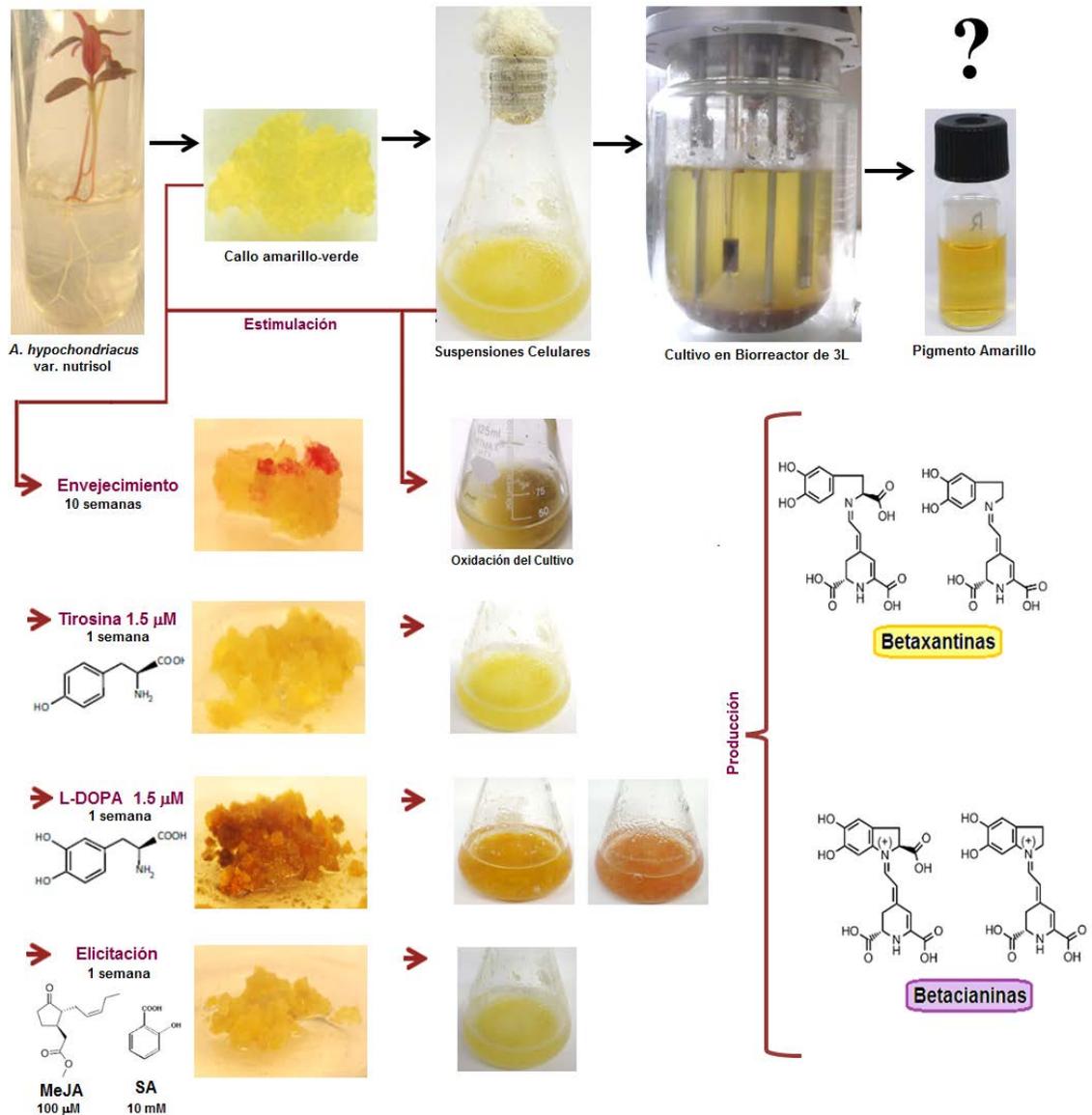
XXII. Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo mediante una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tuckey con una $P < 0.05$, con el programa SPSS versión 8.0 (SPSS, Chicago, IL). En cada caso, los errores asociados a los resultados proporcionados se calcularon sobre la base de la desviación estándar residual.

Capítulo 5.

**PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS EN CULTIVOS *IN VITRO*
DE *Amaranthus hypochondriacus* variedad *nutrisol***

I. TABLA DE CONTENIDO GRÁFICO



De nuestro conocimiento, este es el primer informe sobre la producción de betalaínas mediante la estimulación con estrés abiótico y biotransformación, en cultivos *in vitro* en *A. hypochondriacus* var. nutrisol. El cultivo también produce un pigmento amarillo que no son betaxantinas, del cual se ha realizado parcialmente su caracterización.

II. RESUMEN

Con el objetivo de obtener cultivos celulares de *A. hypochondriacus* productores de betalainas, se estableció una línea estable de callo color amarillo verdoso, en medio MS con 6.66 μM de BAP y 6.79 μM de 2,4-D, de la que derivó una línea de células en suspensión a nivel de matraz, la cual se escaló a biorreactor de tanque agitado de 3L. Estos cultivos produjeron un pigmento amarillo fluorescente, diferente a las betaxantinas que no pertenece al grupo de las betaxantinas. Para inducir la síntesis de betalainas, las líneas de callo y suspensiones en matraz, se sometieron a envejecimiento del cultivo, elicitación con 100 μM de metil jasmonato (MeJA) y 10 mM de ácido salicílico (SA), y adición de 1.5 mM de tirosina y L-DOPA. Con estas estrategias, se logró obtener betalainas, tres de estas dihidroxiladas: dopaxantina carboxilada, miraxantina V y betanidina. La máxima acumulación de los pigmentos se alcanzó en las líneas en suspensión tratadas con L-DOPA, una semana posterior a la inoculación (18.07 mg/ g de peso seco). Estos cultivos representan un modelo adecuado para el estudio de las vías de activación en la ruta de biosíntesis de betalainas, y pueden también una fuente viable de pigmentos con potencial aplicación industrial.

Palabras clave: *betalainas, estrés abiótico, precursor, antiradical, bioactivo.*

III. ABSTRACT

In order to obtain a cell line from *A. hypochondriacus* producer of betalains, callus culture were established in MS medium with 6.66 μ M BAP and 6.79 μ M 2,4-D. A stable cell line of callus greenish yellow in color was obtained and used to develop a cell line in suspension, grown in flasks and scaled up in stirred tank bioreactor of 3L. These cultures produced a fluorescent yellow pigment that does not belong to the group of betaxanthins. To induce betalains synthesis, callus and suspensions in flasks, were stimulated with aging of culture, 100 μ M methyl jasmonate (MeJA) and 10 mM (salicylic acid) SA elicitors, and by addition of 1.5 mM tyrosine and L-DOPA precursors of betalains biosynthesis. It was possible to obtain betalains, three of these being dihydroxylated: dopaxanthin, miraxanthin V and betanidin. The maximum accumulation of pigments was reached in suspension cell lines treated with L-DOPA, a week after inoculation (18.07 mg / g dry weight). These *in vitro* cultures could be a suitable model to study the activation ways of betalains biosynthesis pathway and a viable source of pigments with potential industrial application.

Keywords: *betalains, abiotic stress, elicitor, precursor, antiradical, bioactive*

IV. HIPÓTESIS

Amaranthus hypochondriacus variedad nutrisol, sintetiza de manera natural betalaínas, por tanto es posible establecer líneas celulares de la especie productoras de estos pigmentos empleando reguladores del crecimiento vegetal como 2,4-D y BAP.

La adición de precursores de la ruta de biosíntesis como tirosina y L-DOPA, así como los elicitores metiljasmonato (MeJA) y ácido salicílico (SA), promoverá la producción de betalaínas en los cultivos de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Establecer cultivos *in vitro* de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, para la obtención y caracterización de betalaínas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A.** Establecer cultivos asépticos de *Amaranthus hypochondriacus* var. nutrisol

- B.** Evaluar en explantes de hipocótilos y hojas de *A. hypochondriacus*, el efecto de distintas combinaciones de RCV para la inducción de callo.

- C.** Establecer una línea celular de *A. hypochondriacus* en suspensión a nivel de matraz, a partir del tratamiento que presente mayor crecimiento, friabilidad y pigmentación.

- D.** Establecer una línea celular de *Amaranthus hypochondriacus* en suspensión a nivel de biorreactor de 3 L, a partir de la línea celular en suspensión.

E. Evaluar la progresiva síntesis de betalaínas y sus intermediarios, en la línea celular de callo y suspensión de *A. hypochondriacus*, durante el envejecimiento del cultivo.

F. Evaluar el efecto de la adición de tirosina, L-DOPA, MeJA y SA, sobre la producción de betalaínas, en los cultivos celulares de callo y suspensión de *Amaranthus hypochondriacus*.

G. Caracterizar y cuantificar las betalaínas presentes en la línea celular de *Amaranthus hypochondriacus*, producidas durante el envejecimiento del cultivo y al adicionar tirosina, L-DOPA, MeJA y SA.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Establecimiento de cultivo aséptico

El punto de partida para el cultivo de tejidos vegetales es la iniciación, es decir el establecimiento de la asepsia, donde las semillas o explantes son sometidos a condiciones de desinfección, con el propósito de ser transferidos a un medio de cultivo libre de microorganismos, ya que estos crecen de manera oportunista a una velocidad mucho más rápida que las células vegetales y eventualmente colonizan y matan a los tejidos (Cardoza, 2008). Por tanto, para la limpieza de semillas de *A. hypochondriacus*, se evaluaron seis tratamientos distintos, demostrándose que la exposición a detergente aniónico líquido al 1 % durante 15 minutos, 70 % de alcohol durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 1.8 % y 0.2 % de polisorbato-20 por 30 min, promovió la desinfección del 100 % de las semillas sin mostrar contaminación (Tabla 6); estableciéndose este procedimiento como protocolo de lavado.

2. Obtención de líneas celulares de callo de *A. hypochondriacus* var. *nutrisol*.

Todas las semillas de *A. hypochondriacus* var. *nutrisol*, germinaron 8 días después de su siembra; coincidiendo con lo reportado para esta especie, ya que se consideran como condiciones óptimas de germinación temperaturas de 25 a 30 ° C, 18 a 30 horas para que brote la radícula y un aproximado de 10 días para el establecimiento de la plántula (Alejandre-Iturbide y Gómez-Lorence, 1986). Durante 20 días y bajo condiciones asépticas,

las plántulas de *A. hypochondricus* (Figura 16A) fueron cultivadas, para su uso posterior en los experimentos de inducción de callo. Se realizó un estudio con explantes de hipocótilos y hojas de las plántulas debido a la presencia de coloración roja en el tejido, utilizando distintas concentraciones de 2,4-D y BAP, por separado y en combinación (Tabla 7). En los explantes de hipocótilo, en todos los casos se observó pérdida de color, sin presentar respuesta a callo a los 30 días de cultivo (Figura 15A). Lo anterior difiere a lo reportado en hipocótilos de *Beta vulgaris*, tratados con bajas cantidades de 2,4-D y cinétina, generan callos rojos (Rodríguez-Monroy *et al.* 1994); no obstante las citocininas, pueden reducir la acumulación de betalaínas en los tejidos (Santos-Díaz *et al.* 2005). Por el contrario, los explantes de hojas registraron alta inducción a callo, la cual se vio afectada por el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento vegetal (Tabla 7). Los tratamientos que contenían exclusivamente la auxina 2,4-D formaron callo de coloración verde olivo (Figura 15B). En cuanto al tejido calloso obtenido solamente con la citocinina BAP, en un inicio fue de color blanco amarillento, observándose obscurecimiento en casi la totalidad del tejido a los 15 días de cultivo (Figura 15C). De manera general, los tratamientos con BAP y 2,4-D, desarrollaron callos de color verde, con textura muy compacta al momento de ser subcultivados. Sin embargo el tratamiento con 6.66 μM de BAP y 6.79 μM de 2,4-D, promovió la formación de callo friable color amarillo verdoso y proliferación celular mayor en comparación con los tratamientos anteriores (Figura 15 D), a los 30 días de cultivo; por lo que este tratamiento fue seleccionado para realizar la propagación del cultivo. Lo anterior coincide con lo reportado en la literatura, ya que en líneas celulares de

Amaranthus tricolor, utilizando distintas concentraciones de auxinas y citocininas (BAP), se obtuvo tejido calloso con diferentes tipos de pigmentación (Biswas *et al.*, 2013).

Tabla 6. Porcentaje de contaminación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, sometidas a seis tratamientos distintos de asepsia

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	% CONTAMINACIÓN
1	70 % de alcohol 15 seg/0.6 % de hipoclorito de sodio 20 min	75 ± 0.25
2	70 % de alcohol 30 seg/0.6 % de hipoclorito de sodio 30 min	62 ± 0.38
3	70 % de alcohol 15 seg/1.2 % de hipoclorito de sodio 20 min	48 ± 0.41
4	70 % de alcohol 30 seg/1.2 % de hipoclorito de sodio 30 min	20 ± 0.33
5	70 % de alcohol 15 seg/1.8 % de hipoclorito de sodio 20 min	15 ± 0.13
6	70 % de alcohol 30 seg/1.8 % de hipoclorito de sodio 30 min	0 ± 0.00

*Cada tratamiento con lotes de cinco unidades por triplicado

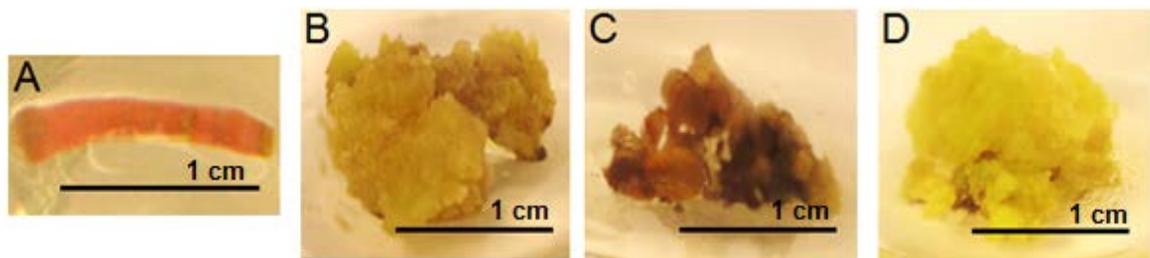


Figura 15: Características fenotípicas del explante de hipocótilo (A) y callos inducidos en explantes de hoja de *A. hypochondriacus* a los 30 días de cultivo. (B) 2,4-D 6.79 μM, callo color verde olivo. (C) BAP 6.66 μM, callo color blanco amarillento, con obscurecimiento en casi la totalidad del tejido. (D) BAP 6.66 μM con 2,4-D 6.79 μM, callo color amarillo verdoso.

Tabla 7. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), sobre la inducción de callos a partir de explantes de hoja de *A. hypochondriacus* var. nutrisol, después de 30 días de cultivo.

RCV (μM)		Explantes formando callo (%)
BAP	2,4-D	
0.00	0.00	100.00 \pm 0.00 ^a
0.00	2.26	100.00 \pm 0.00 ^a
0.00	4.52	100.00 \pm 0.00 ^a
0.00	6.79	100.00 \pm 0.00 ^a
0.00	9.05	100.00 \pm 0.00 ^a
2.22	0.00	100.00 \pm 0.00 ^a
2.22	2.26	100.00 \pm 0.00 ^a
2.22	4.52	100.00 \pm 0.00 ^a
2.22	6.79	100.00 \pm 0.00 ^a
2.22	9.05	100.00 \pm 0.00 ^a
4.44	0.00	100.00 \pm 0.00 ^a
4.44	2.26	100.00 \pm 0.00 ^a
4.44	4.52	100.00 \pm 0.00 ^a
4.44	6.79	93.30 \pm 19.04 ^b
4.44	9.05	100.00 \pm 0.00 ^a
6.66	0.00	86.66 \pm 23.09 ^b
6.66	2.26	100.00 \pm 0.00 ^a
6.66	4.52	100.00 \pm 0.00 ^a
6.66	6.79	100.00 \pm 0.00 ^a
6.66	9.05	100.00 \pm 0.00 ^a
8.88	0.00	80.00 \pm 10.24 ^b
8.88	2.26	100.00 \pm 0.00 ^a
8.88	4.52	100.00 \pm 0.00 ^a
8.88	6.79	100.00 \pm 0.00 ^a
8.88	9.05	100.00 \pm 0.00 ^a

Cada valor se deriva de tres tubos independientes por triplicado. Los valores que comparten la misma letra se corresponden con diferencias no significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

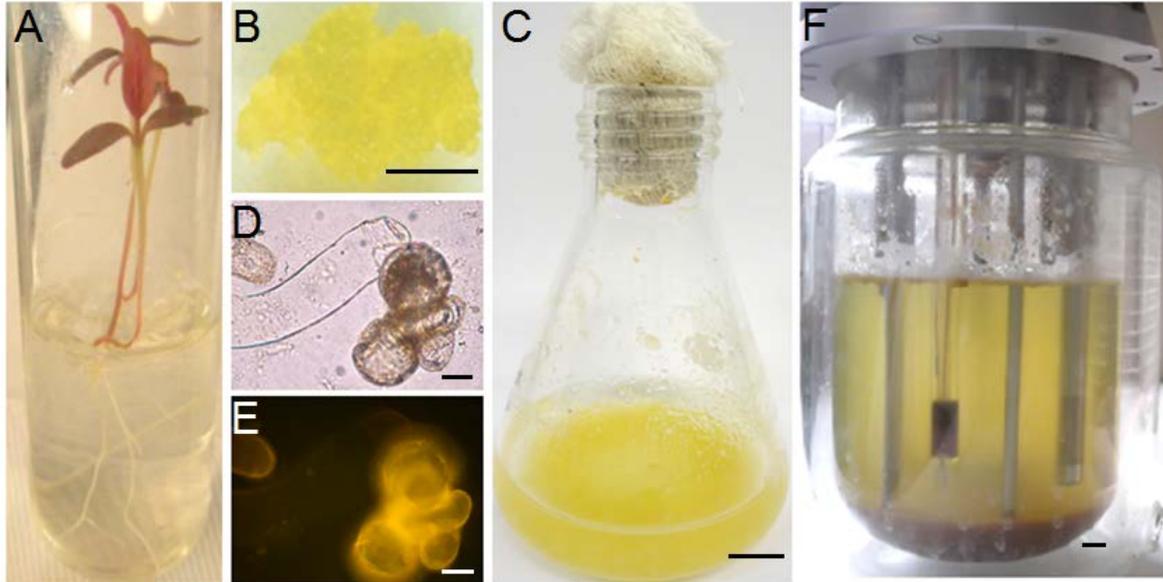


Figura 16. Establecimiento de líneas celulares *in vitro* derivadas de *A. hypochondriacus* var. *nutrisol*. (A) Plántulas de veinte días de edad fueron utilizadas como fuente de explantes. (B) Características fenotípicas de la línea de callo amarillo verdoso. (C) Cultivo de células en suspensión a nivel de matraz, 14 días después de subcultivo. Micrografía de células en suspensión; técnica de campo claro (D), técnica de fluorescencia (E); sólo las porciones amarillas de la imagen de campo claro, que contienen pigmento amarillo, presentan emisión de luz en el perfil de fluorescencia. (F) Cultivo de células en suspensión a nivel de biorreactor de 3L, a los 14 días de cultivo. Barra en B, C y F equivale a 1 cm; en D 5 a 10 μm .

3. Cultivos en suspensión a nivel de matraz y biorreactor de 3L

La línea celular de callo de color amarillo verdoso, se utilizó para iniciar suspensiones celulares de *A. hypochondriacus* (Figura 16C). El cultivo líquido fue establecido con éxito en medio MS suplementado con 30 g / L sacarosa, 6.66 μM BAP y 6.79 μM 2,4-D. El cultivo de suspensiones en matraz se escaló a biorreactor de tanque agitado con capacidad

de 3 L, conteniendo 1.2 L de células en suspensión (Figura 16F), utilizando el mismo medio y condiciones de incubación.

La evaluación del crecimiento celular del cultivo en suspensión resulta fundamental para caracterizar el tiempo de mayor producción de biomasa, ya que en muchas ocasiones esto conlleva la obtención de altas cantidades de los compuestos de interés (Cardosa, 2008). La cinética de crecimiento celular (Figura 17A), indica una fase *lag* de 3 días, en los que la biomasa alcanzó 4.78 ± 0.77 g peso seco / L en matraz, y 5.88 ± 0.79 g peso seco / L en biorreactor. Después de este tiempo, las células entraron en fase de crecimiento exponencial. El crecimiento se prolongó hasta el día 12, con un máximo de acumulación de biomasa de 13.09 ± 0.88 y 13.95 ± 0.74 g peso seco / L; un tiempo de duplicación de 5.20 y 4.92 días; una tasa de crecimiento (μ) de $0.133/\text{día}^{-1}$ y $0.140/\text{día}^{-1}$; y viabilidad celular de 75.40 % y 85.53 % (Figura 17B y 18C), en cultivos en matraz y biorreactor respectivamente. En ambos sistemas el pH fue supervisado, durante toda la cinética (resultados no mostrados), sin presentar variación significativa, obteniéndose un valor medio de 4.86. Esto demuestra que los cultivos celulares de *A. hypochondricus* en matraces agitados, bajo las condiciones descritas, se establecieron de manera favorable, alcanzando un rendimiento en biomasa correspondiente a valores usualmente reportados en la literatura, para otros cultivos vegetales en condiciones semejantes (Rao y Ravishankar, 2002). Sin embargo al comparar el sistema de cultivo en matraz y en reactor, se observa que la velocidad de crecimiento celular, la viabilidad celular y la acumulación de biomasa celular, presentan una ligera tendencia a ser mayores en los cultivos de biorreactor; esta

aparente ventaja puede corresponder a que el cultivo en tanque agitado favorece el incremento de la transferencia de oxígeno y el mezclado de nutrientes, debido al patrón de flujo radial que resulta del uso de la turbina Rushton; como se observó en las células de *Beta vulgaris*, cultivadas bajo condiciones similares (Jiménez-Aparicio *et al.*, 1999; Rodríguez Monroy *et al.*, 1999); corroborándose que el crecimiento y viabilidad celular depende de las condiciones del sistema donde se cultivan las células vegetales (Cardosa, 2008).

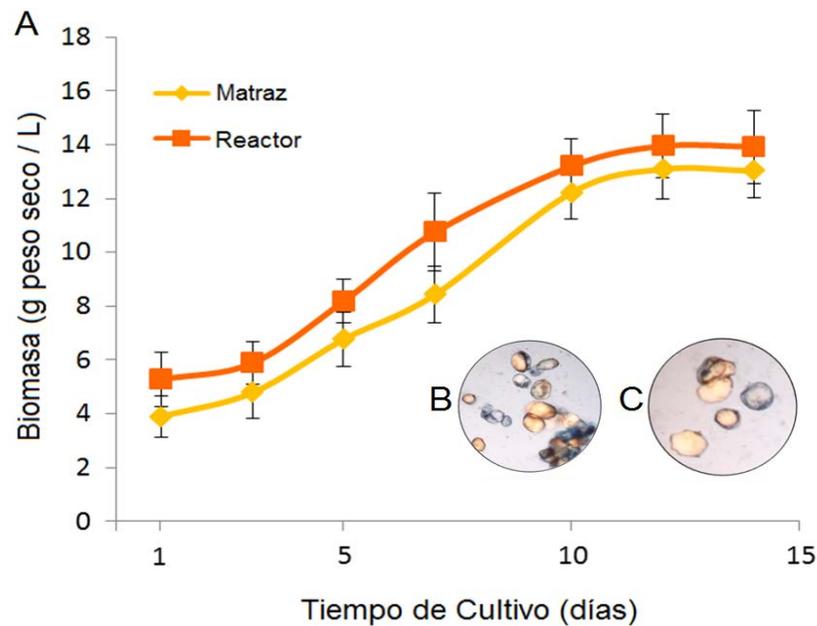


Figura 17. Curva de crecimiento para el cultivo de *A. hypochondriacus*, en suspensión a nivel de matraz y biorreactor de 3L, obtenido en medio líquido MS suplementado con 30 g / L de sacarosa, 6.66 μ M de BAP y 6.79 μ M 2,4-D. (A) Evolución temporal del crecimiento. Micrografía en campo claro de células cultivadas en matraz (B) y reactor (C); se muestra la viabilidad celular determinada a los 8 días por la prueba de tinción con azul de Evans, mediante el conteo de las células que no se colorearon (células viables).

La morfología de las células crecidas en matraz y biorreactor, en general fue redondeada, aunque también se visualizaron células con forma alargada, con tendencia a formar agregados (Figura 17B y 18C); probablemente en relación con las propiedades de cohesión de la pared celular y el estrés hidrodinámico (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). Mediante microscopía de campo claro, se observó que bajo estos sistemas de cultivo, la pigmentación de las células fue de color amarillo ámbar (Figura 16D). Por microscopía de fluorescencia, pudo observarse que sólo las porciones de las células que contienen el pigmento amarillo presentan emisión de luz en el perfil de fluorescencia (Figura 16E). Esta propiedad está descrita para las betaxantinas (Gandía-Herrero *et al.*, 2005b), por lo que se procedió a realizar la caracterización del pigmento para conocer su naturaleza química y corroborar si la coloración amarilla de las células se debía a este tipo particular de betalainas.

4. Caracterización parcial del pigmento amarillo

Para extraer y caracterizar el pigmento amarillo presente en las líneas celulares de callo y de suspensiones en matraz y biorreactor, se utilizó el protocolo específico para la determinación de betaxantinas, publicado por Gandía-Herrero *et al.*, en 2005b. Sin embargo con el tampón fosfato 10 mM (pH 6.0) y ácido ascórbico 10 mM, no fue posible obtener el pigmento; por lo que la extracción se realizó con metanol, un disolvente con menor polaridad, obteniendo un extracto amarillo de las líneas celulares de *A. hypochondricus*. Al analizar el extracto metanólico por HPLC (Gandía-Herrero *et al.*,

2005b), se observaron dos picos mayoritarios con tiempos de retención de 24.95 y 27.26 minutos (Figura 18), y con longitudes de absorción máxima (λ) de 418 y 413 nm, respectivamente. Estos datos fueron diferentes a lo establecido para las betaxantinas con tiempos de retención menores a los 21 minutos y $\lambda = 480$ nm, bajo las mismas condiciones de operación y análisis (Gandía-Herrero *et al.*, 2005b). El análisis de fluorescencia detectó un espectro de excitación máxima de 380 nm y un espectro de emisión máxima de 560 nm (Figura 19), los cuales también difieren de los reportados para las betaxantinas, con máximos de excitación comprendidos entre 463 y 475 nm y máximos de emisión comprendidos entre 506 y 515 nm (Gandía-Herrero *et al.*, 2005b). Todos estos análisis evidencian que el pigmento amarillo de las líneas *in vitro* de *A. hypochondricus*, no corresponde al grupo de betalaínas.

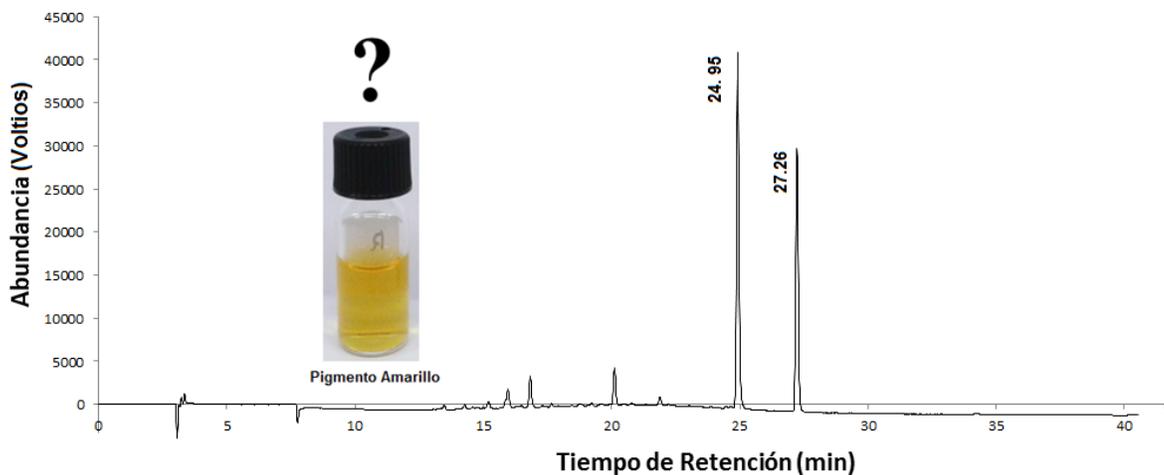


Figura 18. Perfil cromatográfico del pigmento amarillo obtenido de los cultivos *in vitro* de *A. hypochondriacus* var. *nutrisol*. Los perfiles de HPLC a 420 nm, son representativos para el pigmento amarillo obtenido de las muestras de la línea celular de callo, suspensión a nivel de matraz y biorreactor a los 12 días de cultivo.

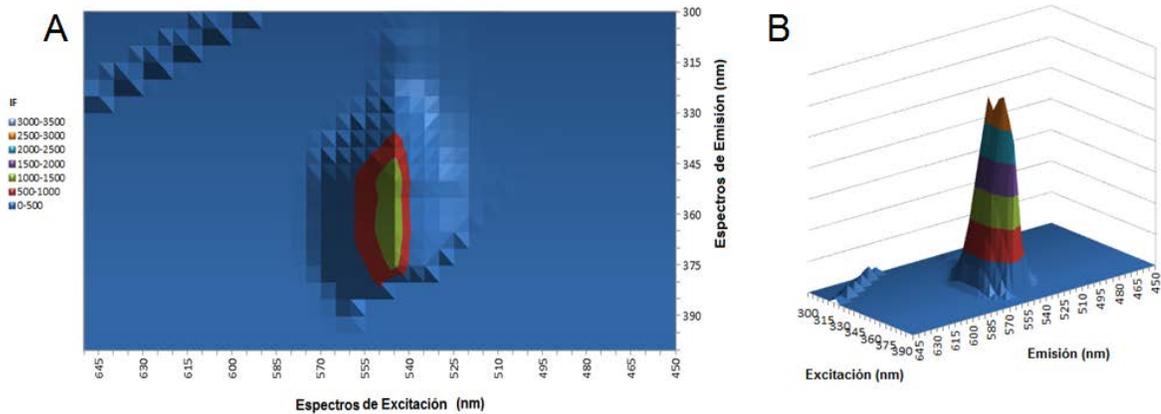


Figura 19: Espectros de fluorescencia de emisión y excitación del pigmento amarillo presente en las líneas celulares *in vitro* de *A. hypochondriacus*. Gráfico 3D de contorno (A) y de montaña (B). Los espectros se obtuvieron en metanol a 4 ° C.

Con el propósito de dilucidar la naturaleza química del pigmento amarillo se procedió a purificarlo por HPLC, obteniéndose dos fracciones. Cada fracción fue analizada por HPLC-ESI-MS. Los valores de masa determinados para la primera fracción (T_r 24.95 min), corresponde a un ion molecular de m/z 219.0721, y para la segunda fracción (T_r 27.26 min) corresponde a un ion molecular de m/z 233.0902 (Figura 20). Estudios parciales por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (datos no mostrados), presentan la posibilidad de que los pigmentos amarillos purificados, puedan corresponder a derivados del ácido ferúlico.

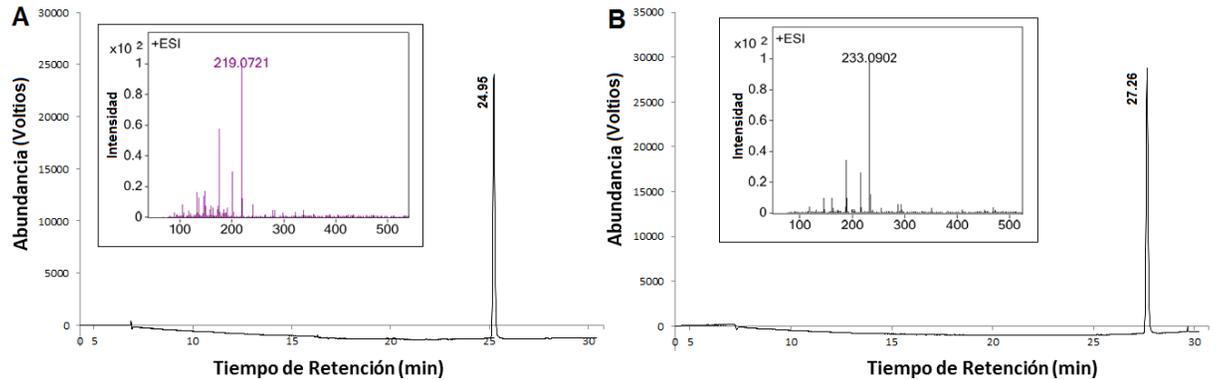


Figura 20: Perfiles cromatográficos y espectros de masas de las fracciones purificadas por HPLC, del pigmento amarillo obtenido de los cultivos *in vitro* de *A. hypochondriacus*. (A) Fracción 1 con tiempo de retención (T_r) de 24.95 minutos y m/z 219.0721. (B) Fracción 2 con T_r de 27.26 y m/z 233.0902. Los perfiles de HPLC a 420 nm y los ESI-MS, son representativos para el pigmento amarillo obtenido de las muestras de la línea celular de callo, suspensión a nivel de matraz y biorreactor a los 12 días de cultivo.

5. Inducción de la biosíntesis de betalaínas en líneas *in vitro* de *A. hypochondriacus*

Habiéndose corroborado la ausencia de betalaínas en los cultivos celulares de *A. hypochondricus*, obtenidos en medio MS con 6.66 μM de BAP y 6.79 μM de 2,4-D, se procedió a estimular la síntesis de estos metabolitos secundarios, en la línea de callo y de suspensiones celulares a nivel de matraz, mediante estrés abiótico (envejecimiento del cultivo y elicitores: metiljasmonato y ácido salicílico) y la adición de precursores (tirosina y L-DOPA). En el caso de los estudios de elicitación y aplicación de precursores, se realizaron ensayos preliminares partiendo de las concentraciones comúnmente reportadas en la literatura. Para los sustratos tirosina y L-DOPA se ensayaron 1.0, 1.5, 2.0 y 2,5 mM;

para metiljasmonato (MeJA) 50, 100 y 150 μ M; y para ácido salicílico (SA) 5, 10 y 15 mM. La mayor respuesta de síntesis de pigmento se reportó con 1.5 mM de tirosina y L-DOPA, 100 μ M de MeJA y 10 mM de SA; por lo que dichas concentraciones fueron utilizadas para el análisis de inducción de betalainas.

A. Envejecimiento del cultivo

Las plantas acumulan metabolitos secundarios como respuesta a factores ambientales desfavorables (Radman *et al.*, 2003; Baenas *et al.*, 2014). Por tanto, para estimular la síntesis de betalainas, a la línea celular de callo y a la línea celular de suspensión en matraz, se sometieron a un proceso de envejecimiento del cultivo, hasta completar once semanas sin subcultivar a medio fresco. La línea en suspensión celular presentó coloración café y viabilidad celular del 15 % a las ocho semanas de cultivo sin mostrar la presencia de pigmentos (datos no presentados). En cambio la línea celular de callo a las seis semanas de cultivo, exhibió pequeños fragmentos de pigmentación roja en la superficie del tejido, la cual aumentó progresivamente observándose la máxima coloración a las diez semanas de cultivo (Figura 21B). Mediante el análisis por HPLC-DAD y ESI-MS, se corroboró que dicha pigmentación se correspondía a las betalainas (Figura 21A), con una producción total máxima de 7.84 mg/g peso seco, presentándose mayoritariamente betanina (7) con 5.76 mg/ g de peso seco, así como betanidina (3), isobetanina, amarantina (8), isoamarantina, vulgaxantina I (5) y ácido betalámico (10) (Tabla 8). La aparición paulatina de betalainas durante el envejecimiento del cultivo, puede deberse a la respuesta de las células al estrés por la reducción de nutrientes. Sin embargo al disminuir la concentración del medio MS al

85, 75, 50, 30 y 15 %, las células no presentaron cambios en su coloración (datos no mostrados). Por lo que la inducción de betalaínas en este caso puede deberse, no sólo al descenso de nutrientes, sino también a cambios particulares en la señalización celular que ocurren por factores ligados a la senescencia y envejecimiento. En las células vegetales el metabolismo secundario se ve favorecido por envejecimiento, en particular para la reducción de las especies reactivas de oxígeno y conservar la homeostasis celular (Sepúlveda-Jiménez *et al*, 2004; Hadacek *et al.*, 2011).

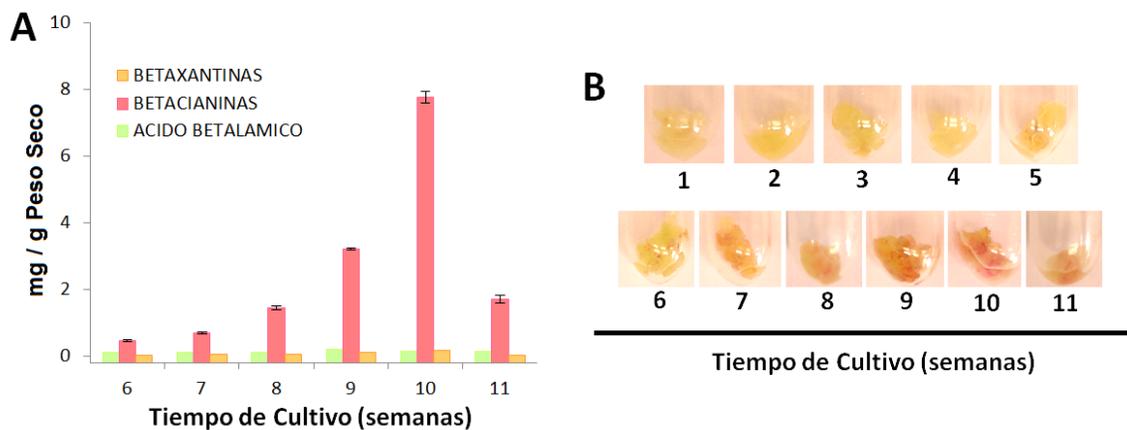


Figura 21. Producción de ácido betalámico y betalaínas en la línea celular de callo de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol. Evolución temporal de la biosíntesis de compuestos (A) y características fenotípicas del tejido calloso (B) durante el envejecimiento del cultivo. Las barras representan el error estándar de la media de tres mediciones independientes.

Tabla 8. Producción de betalaínas y ácido betalámico en células de la línea de callo de *Amaranthus hypochondriacus*, sometida a estrés abiótico por envejecimiento del cultivo.

COMPUESTO	T_r (min)	ESI-MS (m/z)	λ_{max} (nm)	Infl ^a (mg / g de peso seco)	Hip ^b (mg / g de peso seco)	Hoja (mg / g de peso seco)	10 S ^d sin subcultivo
							Callo (mg / g de peso seco)
dopaxantina (1)	11.27	391	472	nd ^c	nd	nd	nd
miraxantina V (2)	12.54	347	460	nd	nd	nd	nd
betanidina (3)	11.76	389	542	nd	nd	nd	0.10 ± 0.01
vulgaxantina I (5)	8.45	340	472	nd	nd	nd	0.11 ± 0.01
triptófano-bx (6)	10.09	398	472	nd	nd	nd	nd
betanina (7)	10.25	551	535	nd	nd	nd	5.76 ± 0.35
iso-betanina	16.67	551	535	nd	nd	nd	1.06 ± 0.07
amarantina (8)	9.48	727	535	20.25 ± 0.39	1.65 ± 0.02	1.87 ± 0.03	0.81 ± 0.05
iso-amarantina	9.81	727	535	6.48 ± 0.20	0.58 ± 0.01	0.73 ± 0.05	0.05 ± 0.01
ácido betalámico (10)	12.05	211	405	nd	nd	nd	0.13 ± 0.01

^aInflorescencia e ^bHipocótilos de la planta. ^cND: no detectado. ^dS: semanas. Se muestran los tiempos de retención (T_r) de HPLC, iones moleculares determinados por ESI-MS, longitudes de onda máximas establecidas por DAD y las concentración más altas de betalaínas obtenida en los cultivos a las 10 semanas sin subcultivo. Los pigmentos analizados en inflorescencia, hipocótilos y hojas de la planta se muestran para comparación.

B. Adición de elicitores

Un elicitor es una sustancia de diverso origen estructural que puede inducir mecanismos de defensa que en ocasiones incrementan la síntesis de metabolitos secundarios específicos (Radman *et al.*, 2003; Baenas *et al.*, 2014). Por lo que, para estimular la acumulación de betalaínas, en la línea celular de callo y suspensión en matraz, se añadió al medio de cultivo de forma individual 100 μ M de MeJA y 10 mM de SA. Por el análisis de HPLC-DAD y

ESI-MS, en ambos sistemas de elicitación se detectaron betalaínas. La mayor cantidad de pigmentos, se produjo en las células tratadas con MeJA (0.50 mg/g de peso seco), en relación con SA (0.06 mg/g de peso seco), a las 62 y 38 horas posteriores a la inoculación, respectivamente. Con ambos elicitores, las más altas concentraciones de betalaínas se encontraron en las células en suspensión (Figura 22B y 23D). Las células de callo y suspensión, mostraron una coloración ligeramente amarilla (Figura 23), probablemente debido a la presencia exclusiva de vulgaxantina I (5) y ácido betalámico (10), a excepción de las células en suspensión tratadas con MeJA, en las cuales también se detectó de forma mayoritaria miraxantina V (2) con 2.06 mg/g de peso seco, además de triptófano betaxantina (6) y dopa betaxantina (1), a las 62 horas posteriores a la inoculación (Tabla 9). También en este cultivo en suspensión se observó la presencia de betanina (7), con la acumulación más alta 0.238 mg/g de peso seco a las 72 horas después de añadir MeJA (Figura 22B). Los resultados anteriores corroboran que ambos elicitores poseen la capacidad de estimular la síntesis de betalaínas de manera similar a lo observado en cultivos *in vitro* de distintas plantas, donde han promovido la producción de antocianinas, carotenoides o fenoles, entre otros compuestos (Mihai *et al.*, 2010; Silva da Rocha *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2014). MeJA y SA activan la vía de la MAP kinasa MPK4, la cual es necesaria para la inducción de los genes defensina (PDF1.2) y tionina (THI2.1), que a su vez inciden en la activación de diferentes rutas del metabolismo secundario en plantas (Petersen *et al.*, 2000).

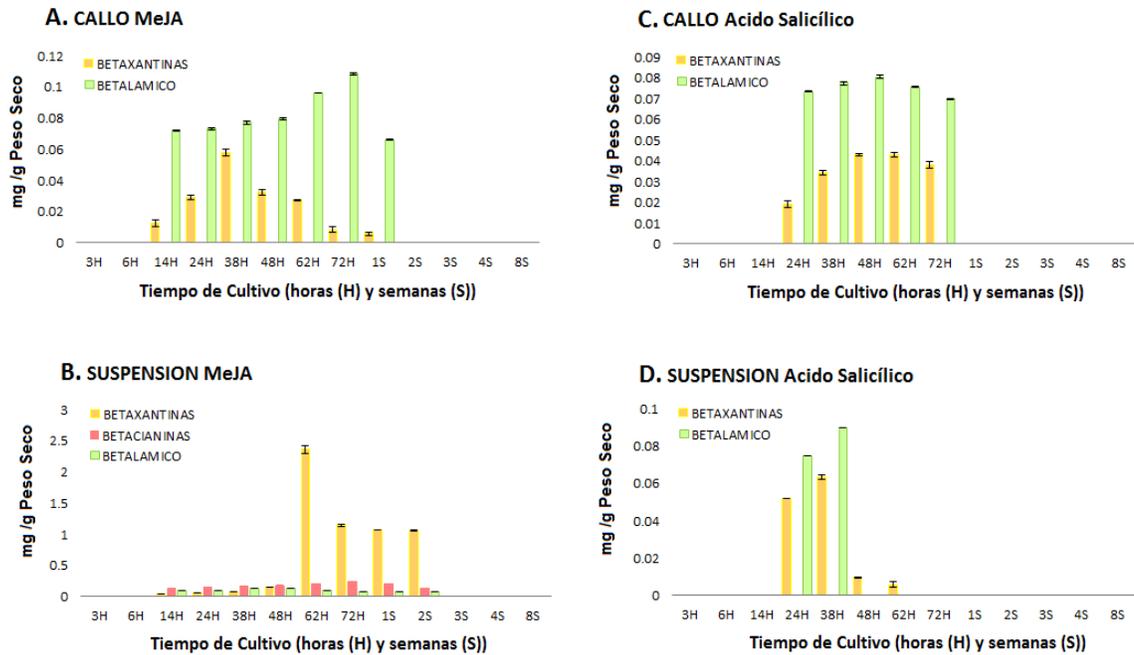


Figura 22. Producción de ácido betalámico y betalainas en la línea celular de callo y suspensión de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 100 μ M de MeJA y 10 mM de ácido salicílico. Las barras representan el error estándar de la media de tres mediciones independientes.

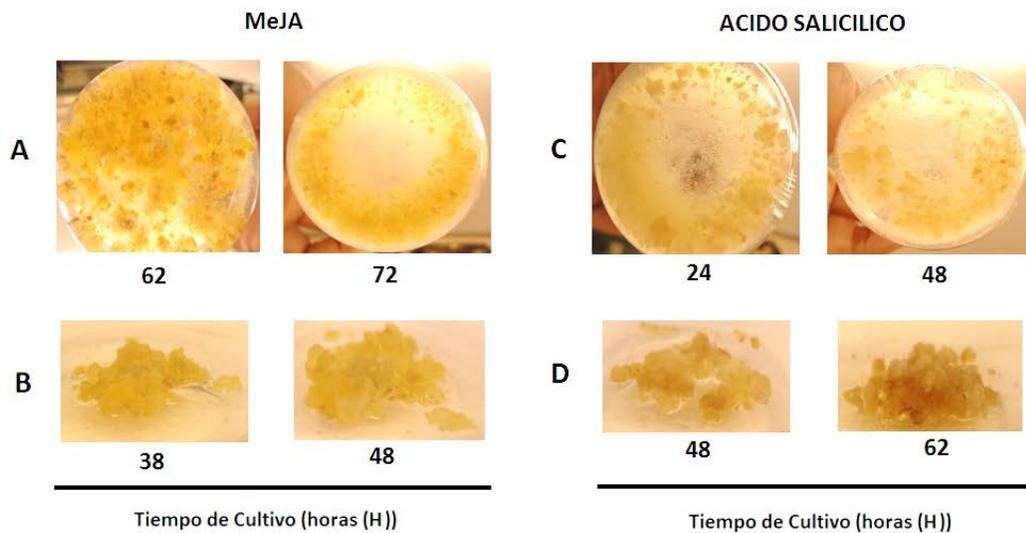


Figura 23. Evolución temporal de las características fenóticas del cultivo en suspensión (A y C) y de callo (B y D) de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 100 μ M de MeJA y 10 mM de SA.

Tabla 9. Producción de betalaínas y ácido betalámico en células de la línea de callo y en cultivos en suspensión de *Amaranthus hypochondriacus*, sometidas a estrés abiótico por elicitación con 100 μ M de MeJA y 10 mM de SA.

COMPUESTO	T_r (min)	ESI-MS (m/z)	λ_{max} (nm)	MeJA		SA	
				Tiempo de cultivo		Tiempo de cultivo	
				38 h ^a Callo (mg / g de peso seco)	62 h ^a Suspensión (mg / g de peso seco)	62 h ^a Callo (mg / g de peso seco)	38 h ^a Suspensión (mg / g de peso seco)
dopaxantina (1)	11.27	391	472	nd ^b	0.13 ± 0.01	nd	nd
miraxantina V (2)	12.54	347	460	nd	2.06 ± 0.06	nd	nd
betanidina (3)	11.76	389	542	nd	nd	nd	nd
vulgaxantina I (5)	8.45	340	472	0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01
triptófano-bx (6)	10.09	398	472	nd	0.03 ± 0.01	nd	nd
betanina (7)	10.25	551	535	nd	0.20 ± 0.01	nd	nd
iso-betanina	16.67	551	535	nd	nd	nd	nd
amarantina (8)	9.48	727	535	nd	nd	nd	nd
iso-amarantina	9.81	727	535	nd	nd	nd	nd
ácido betalámico (10)	12.05	211	405	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01

^ah: horas. ^bND: no detectado. Se muestran los tiempos de retención (T_r) de HPLC, iones moleculares determinados por ESI-MS, longitudes de onda máximas establecidas por DAD y las concentraciones más altas de betalaínas obtenidas en los cultivos a las 38 y 62 horas posteriores a la elicitación.

C. Adición de precursores

Un precursor es una molécula que interviene en la ruta biosintética de un metabolito, pudiendo agregarse al medio de cultivo para incrementar el rendimiento del proceso (Radman *et al.*, 2003; Baenas *et al.*, 2014). Por tanto se añadió 1.5 mM de tirosina y L-DOPA, de manera individual al medio de la línea celular de callo y de suspensión en matraz, para provocar la biotransformación por las células y la producción de pigmentos. Por el análisis de HPLC-DAD y ESI-MS, se observó que ambos precursores favorecen la biosíntesis de betalainas, determinándose en general la máxima producción de estos metabolitos una semana posterior a la inoculación (Figura 24). Las betalainas detectadas en los cultivos fueron betanidina (3), betanina (7), amarantina (8), vulgaxantina I (5), triptófano betaxantina (6), dopa-betaxantina (1) y miraxantina V (2), así como ácido betalámico (10) (Tabla 10). Las concentraciones más elevadas de betalainas totales se alcanzaron una semana posterior a la inoculación con L-DOPA en las suspensiones celulares, reportándose 18.07 mg/g de peso seco, correspondiendo 5.18 mg/g de peso seco a betanina (7), 4.90 mg/g de peso seco a miraxantina V (2) y 4.30 mg/g de peso seco a vulgaxantina I (5) (Tabla 10 y Figura 24D). La presencia mayoritaria de estos pigmentos, explica la coloración amarilla y roja observada en las células tratadas con L-DOPA (Figura 26). En cambio, los cultivos *in vitro* tratados con tirosina, produjeron menor cantidad de betalainas totales 1.99 mg/g de peso seco, a las 72 horas de cultivo, correspondiendo 1.74 mg/g de peso seco a miraxantina V (2), 0.06 mg/g de peso seco a vulgaxantina I (5) y 0.02

mg/g de peso seco a triptófano-betaxantina (Tabla 10). La presencia de estas betaxantinas, explica la pigmentación amarilla de las células de callo y suspensiones en matraz, tratadas con tirosina (Figura 25). También se detectó betanina en las células de callo con 0.96 mg/ g de peso seco, y en las células en suspensión con 0.50 mg/ g de peso seco, una y tres semanas posteriores a la inoculación de tirosina respectivamente (Figura 24A y 25B); sin hacerse evidente la presencia de esta betacianina en la coloración de los cultivos. De esta manera se corrobora que la activación e incremento de la ruta biosintética puede lograrse insertando sustratos de las enzimas de la vía, ocasionando la producción del metabolito de interés (Radman *et al.*, 2003; Baenas *et al.*, 2014). La adición de tirosina al sistema estimula la actividad monofenolasa de la enzima citosólica tirosinasa o polifenoloxidasa, la cual hidroxila a dicho sustrato y lo transforma en L-DOPA (Figura 27: reacción 6). El sustrato L-DOPA, formado a partir de tirosina o añadido al sistema, es sustrato de la enzima 4,5-DOPA extradiol-dioxigenasa, que cataliza la ruptura del anillo de L-DOPA para formar al intermedio 4,5-seco-DOPA (Figura 27, reacción 7). A partir de 4,5-seco-DOPA, se forma el ácido betalámico, precursor de todas la betalainas (Figura 27, reacción 8). El ácido betalámico, puede dirigirse al interior de la vacuola y condensarse con aminas y aminoácidos, formando betaxantinas (Figura 27, reacción 10); o bien condensarse en el citosol con ciclo-DOPA, compuesto derivado de la acción enzimática de la tirosinasa o de la citocromo P450 sobre L-DOPA, y formar betacianinas como betanidina (Figura 27, reacciones 7-9 y 11), que es el intermedio clave de la formación en la vacuola de betacianinas glucosiladas como betanina (Figura 27, reacciones 12-13) y amarantina (Gandía Herrero y García Carmona, 2013).

Tabla 10. Producción de betalaínas y ácido betalámico en células de la línea de callo y en cultivos en suspensión de *Amaranthus hypochondriacus*, al añadir 1.5 mM de tirosina y L-DOPA.

COMPUESTO	T_r (min)	ESI-MS (m/z)	λ_{max} (nm)	TIROSINA		L-DOPA	
				Tiempo de cultivo		Tiempo de cultivo	
				1 S ^a Callo (mg / g de peso seco)	72 h ^b Suspensión (mg / g de peso seco)	1 S ^a Callo (mg / g de peso seco)	1 S ^a Suspensión (mg / g de peso seco)
dopaxantina (1)	11.27	391	472	0.14 ± 0.01	nd	0.19 ± 0.01	1.68 ± 0.01
miraxantina V (2)	12.54	347	460	nd ^c	1.74 ± 0.02	1.17 ± 0.03	4.90 ± 0.05
betanidina (3)	11.76	389	542	nd	nd	0.07 ± 0.01	0.64 ± 0.01
vulgaxantina I (5)	8.45	340	472	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.70 ± 0.01	4.30 ± 0.04
triptófano-bx (6)	10.09	398	472	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.22 ± 0.01	1.01 ± 0.03
betanina (7)	10.25	551	535	0.96 ± 0.01	0.17 ± 0.01	2.90 ± 0.06	5.18 ± 0.14
iso-betanina	16.67	551	535	nd	nd	0.24 ± 0.01	0.35 ± 0.01
amarantina (8)	9.48	727	535	0.19 ± 0.01	nd	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
iso-amarantina	9.81	727	535	nd	nd	nd	nd
ácido betalámico (10)	12.05	211	405	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.60 ± 0.01	1.35 ± 0.04

^aS: semanas. ^bh: horas. ^cND: no detectado. Se muestran los tiempos de retención (T_r) de HPLC, iones moleculares determinados por ESI-MS, longitudes de onda máximas establecidas por DAD y las más altas concentración de betalaínas obtenidas en los cultivos a las 72 horas y una semana posterior a la inoculación de los precursores.

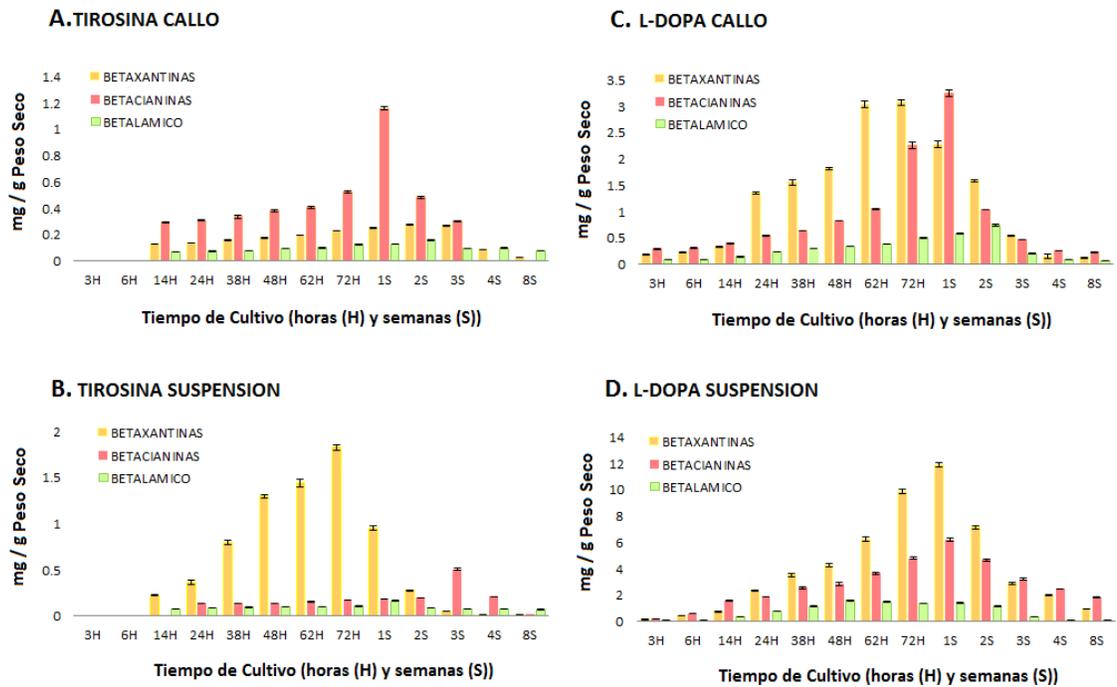


Figura 24. Producción de ácido betalámico y betalainas en la línea celular de callo y suspensión de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 1.5 mM de tirosina y L-DOPA. Las barras representan el error estándar de la media de tres mediciones independientes.

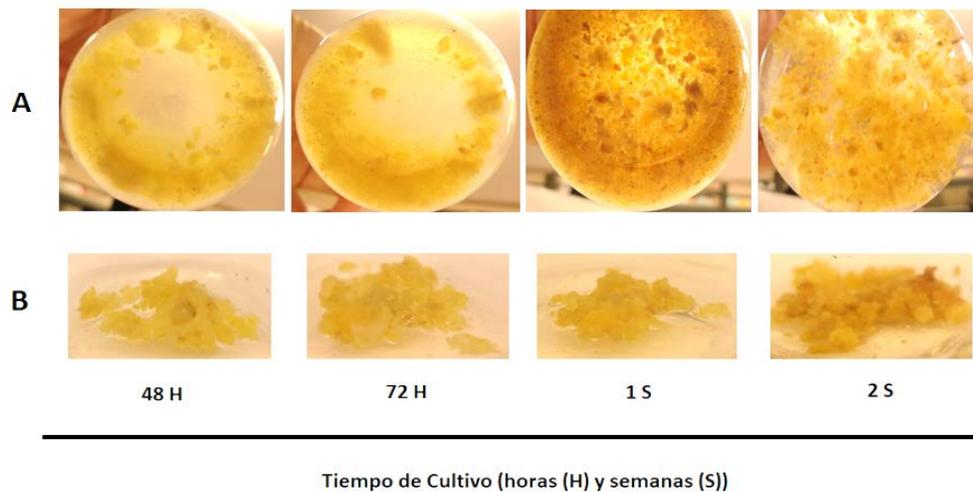


Figura 25. Evolución temporal de las características fenotípicas del cultivo en suspensión (A) y de callo (B) de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 1.5 mM de tirosina.

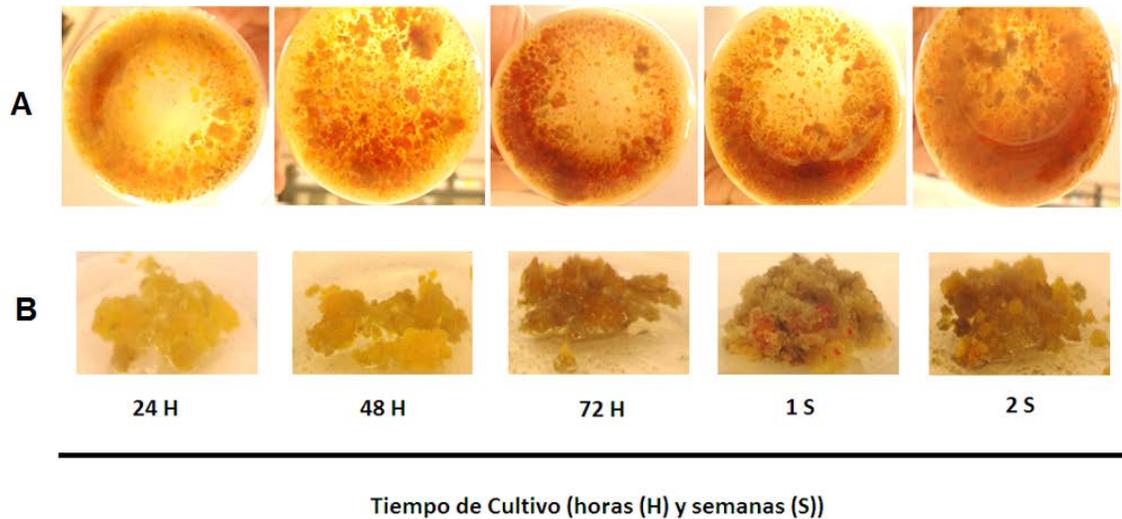


Figura 26. Evolución temporal de las características fenotípicas del cultivo en suspensión (A) y de callo (B) de *Amaranthus hypochondriacus* variedad nutrisol, al adicionar 1.5 mM de L-DOPA.

D. Influencia general de la respuesta al estrés abiótico y adición de precursores

Los estudios sobre inducción de la síntesis de betalaínas, sugieren que las líneas celulares de *A. hypochondricus* fueron estimuladas positivamente por estrés abiótico (envejecimiento del cultivo, elicitores) y la biotransformación de las células por la adición de sustratos. Se demostró que la máxima producción de pigmentos se llevó a cabo en las líneas en suspensión expuestas a 1.5 mM de L-DOPA, una semana posterior a la inoculación (18.07 mg/ g de peso seco); seguido por los cultivos de callo, después de 10 semanas sin renovar el medio de cultivo (7.84 mg/g de peso seco); al añadir 1.5 mM de tirosina en las suspensiones celulares, 72 horas después de la inoculación (1.99 mg/g de peso seco); y en muy bajas proporciones en cultivos líquidos tratados con 100 μ M de MeJA (0.50 mg/g de peso seco) y 10 mM de SA (0.06 mg/g de peso seco), a las 62 y 38 horas posteriores a la elicitación, respectivamente.

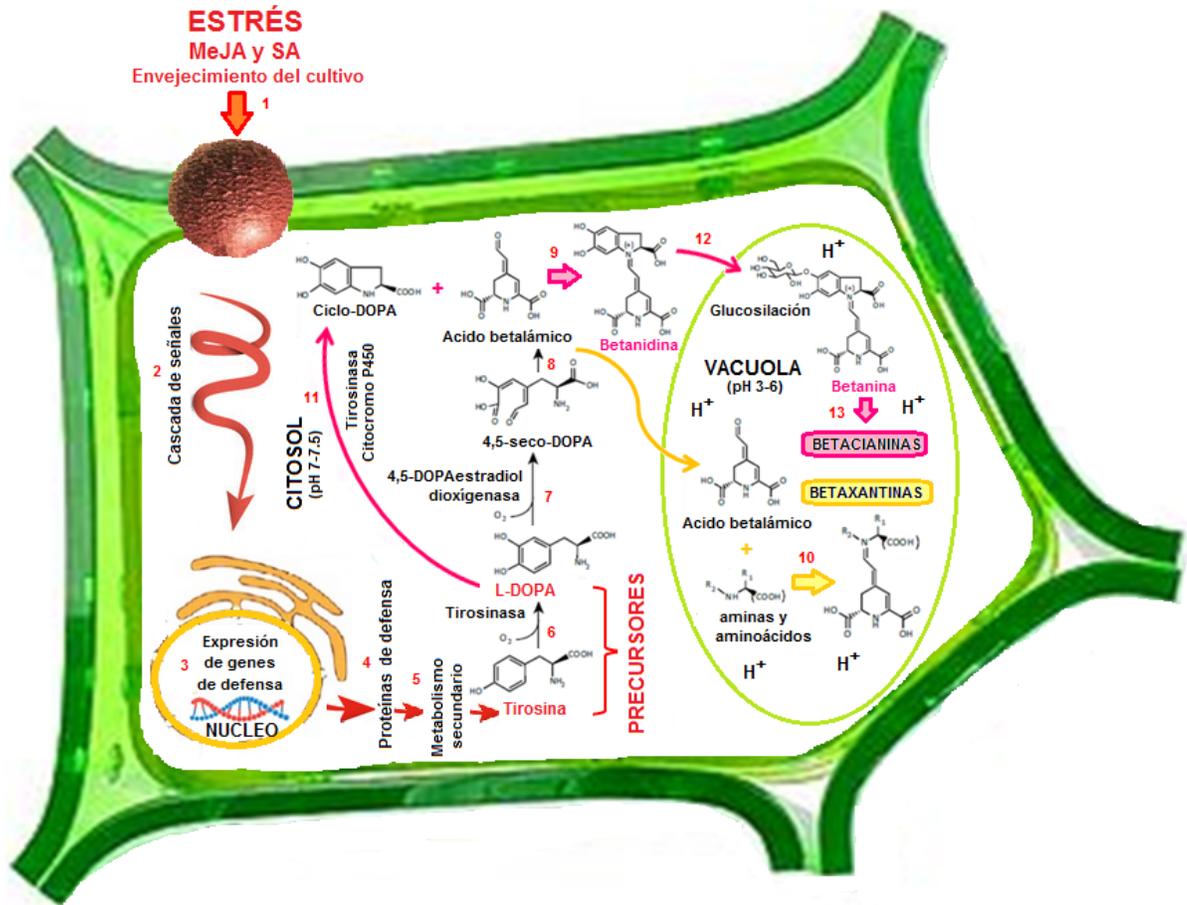


Figura 27. Influencia general de respuesta al estrés abiótico y a la adición de precursores sobre la ruta de biosíntesis de betalainas en las líneas *in vitro* de *A. hypochondriacus*. Las flechas y los números representan la señalización celular y el camino metabólico recorrido en la ruta al ser estimuladas las células con envejecimiento del cultivo, MeJA, SA, tirosina y L-DOPA. Basado en Buchanan *et al.*, 2000; Strack *et al.*, 2003; Gandía Herrero y García Carmona, 2013.

En general, la producción mayoritaria de betalaínas se obtuvo en las células en suspensión, probablemente debido a la presión osmótica presente en estos cultivos, la cual incrementa la acumulación intracelular de metabolitos secundarios (Radman *et al.*, 2003; Baenas *et al.*, 2014).

Este trabajo sugiere, que los cultivos *in vitro* de *A. hypochondriacus*, cuentan con la actividad de las enzimas clave de la ruta de biosíntesis de betalaínas: la tirosinasa y la 4,5-DOPA-estradiol-dioxigena, así como la citocromo P450. No obstante, como sucede en varios cultivos vegetales, en este caso también se requirió de factores de estrés como el envejecimiento del cultivo, la elicitación del sistema, o bien la adición de moléculas precursoras de la vía de síntesis, para la acumulación de betalaínas (Figura 27). Probablemente el mecanismo de protección de las células de *A. hypochondricus* en respuesta al estrés abiótico inició con una cascada de señalización que provocó la expresión de genes y proteínas de defensa, que a su vez indujeron el metabolismo secundario (Buchanan *et al.*, 2000), pudiéndose producir de esta manera tirosina y L-DOPA; o bien al agregar dichos precursores al medio de cultivo fue posible activar la maquinaria metabólica de síntesis de betacianinas y betaxantinas.

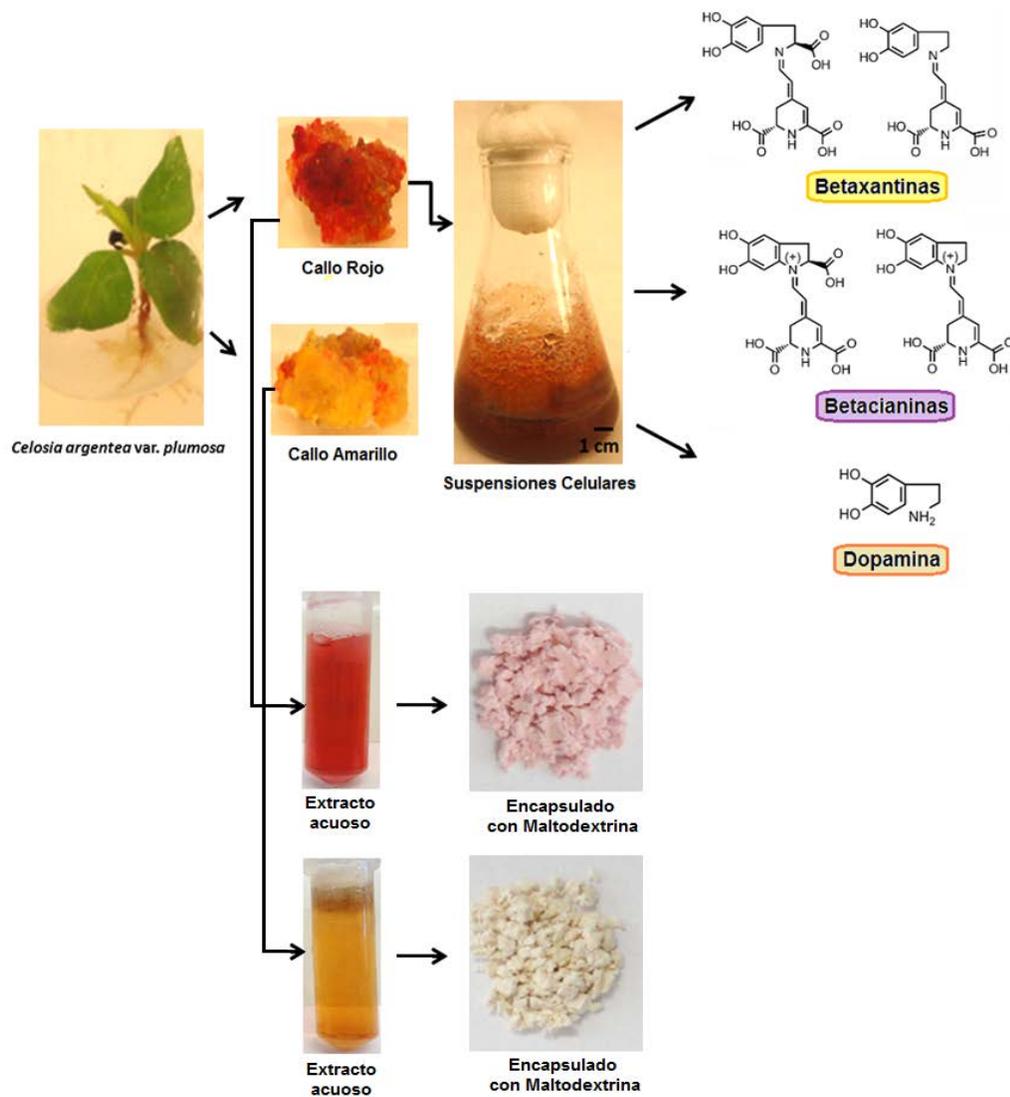
VIII. CONCLUSIONES

1. Los cultivos de células de callo y suspensiones a nivel de matraz y biorreactor de *A. hypochondriacus*, obtenidos en medio MS con 6.66 μM de BAP y 6.79 μM de 2,4-D, producen un pigmento amarillo fluorescente, que no pertenece al grupo de las betalaínas.
2. Los cultivos de células de *A. hypochondriacus*, al ser estimuladas por estrés abiótico y adición de moléculas precursoras, producen dopaxantina, miraxantina V y betanidina; para dichas betalaínas dihidroxiladas se reporta la más alta actividad antirradical y antioxidante.
3. Los cultivos de células de *A. hypochondriacus*, estimulados con MeJA, tirosina y L-DOPA, producen triptófano-betaxantina, que ha sido identificado como un importante compuesto bioactivo por su posible interacción con las sirtuinas enzimas relacionadas con el envejecimiento.
4. Las líneas celulares *in vitro* de *A. hypochondriacus*, representan un modelo apropiado para el estudio de los posibles factores implicados en la activación de la ruta de biosíntesis de betalaínas.
5. Los cultivos de *A. hypochondriacus* muestran la capacidad para convertirse en fuentes de pigmentos con aplicación potencial en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Capítulo 6.

**PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS DIHIDROXILADAS Y
DOPAMINA EN CULTIVOS *IN VITRO* DE
Celosia argentea variedad *plumosa***

I. TABLA DE CONTENIDO GRÁFICO



Este es el primer informe sobre la producción de betalaínas dihidroxiladas y dopamina en cultivos *in vitro* de *Celosia argentea* var. *plumosa*. Se realizó una encapsulación preliminar con maltodextrina de los extractos acuosos de callo rojo y amarillo. Se obtuvieron polvos solubles en agua de color rosa y amarillo, correspondiendo esta coloración al contenido de betacianinas y betaxantinas, respectivamente.

II. RESUMEN

Las betalaínas son pigmentos de las plantas de naturaleza hidrófila con potencial quimiopreventivo demostrado en líneas celulares de cáncer y modelos animales. Las betalaínas que contienen un anillo aromático con dos grupos hidroxilo libres poseen la más alta capacidad antioxidante y actividades de captura de radicales libres. Las betaxantinas dopaxantina y miraxantina V, y las betacianinas betanidina y descarboxi betanidina son las únicas betalaínas naturales con subestructuras catecólicas. Estos cuatro pigmentos se han producido en cultivos celulares establecidos a partir de hipocótilos de la planta *Celosia argentea*. Dos líneas celulares estables y de color diferente, amarillo y rojo, se mantuvieron en medio MS suplementado con BAP 6.66 μM y 2,4-D 6.79 μM . Extractos acuosos de estas dos líneas de callo fueron encapsulados con maltodextrina obteniéndose polvos de color rosa y amarillo. Los cultivos en suspensión derivados de la línea de callo rojo, mostraron un aumento de la producción de betalaínas dihidroxiladas en las células y secretadas al medio, con un máximo alcanzado después de 8 días de cultivo. Además, se obtuvieron las moléculas precursoras: ácido betalámico y dopamina, ésta última con un contenido de hasta 42,08 mg / g de peso seco. La presencia conjunta de las betalaínas bioactivas junto con dopamina y ácido betalámico, muestran la capacidad de los cultivos celulares de *C. argentea* para convertirse en una fuente estable de fitoquímicos valiosos con aplicación como colorantes naturales.

Palabras clave: *betalainas, antiradical, bioactivo, dopamina, encapsulación.*

III. ABSTRACT

Betalains are hydrophilic pigments of plant with a chemopreventive potential demonstrated in cancer cell lines and animal models. Among the betalains, those containing an aromatic moiety with two free hydroxyl groups possess the strongest antioxidant and free radical scavenging activities. The betaxanthins dopaxanthin and miraxanthin V, and the betacyanins betanidin and decarboxy-betanidin are the only natural betalains with catecholic sub-structures. These four pigments are produced in cell cultures established from *Celosia argentea* hypocotyls. Two stable and differentially colored callus cell lines, yellow and red, were maintained on MS medium supplemented with BAP 6.66 μM and 2,4-D 6.79 μM . Aqueous extracts of these calli were encapsulated with maltodextrin achieving powder pink and yellow. Derived suspension cultures show higher contents of dihydroxylated betalains in the cells than in the calli; compounds are accumulated and excreted to the medium with a maximum production after 8 days of culture. In addition, precursor molecules as the betalamic acid and dopamine were detected, with dopamine levels of 42.08 mg/g dry weight. The production of bioactive betalains with dopamine and betalamic acid precursors show the capacity of *C. argentea* cell cultures as a stable source for valuable phytochemicals with application as natural colorants.

Keywords: *betalains, antiradical, bioactive, dopamine, encapsulation.*

IV. HIPÓTESIS

Celosia argentea variedad plumosa sintetiza de manera natural betalaínas y dopamina, por lo que es posible establecer líneas celulares de la especie, capaces de producir estos compuestos bioactivos, utilizando reguladores del crecimiento como 2,4-D y BAP.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Establecer el cultivo *in vitro* de *Celosia argentea* variedad plumosa, para la obtención, caracterización y protección de betalaínas y dopamina.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A.** Establecer cultivos asépticos de *Celosia argentea* variedad plumosa

- B.** Evaluar en explantes de hipocótilo de *C. argentea* var. plumosa, el efecto de distintas combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal para la inducción de callo.

- C.** Establecer líneas celulares de *C. argentea* var. plumosa, en suspensión a nivel de matraz, a partir de los tratamientos con mayor crecimiento, friabilidad y pigmentación.

- D.** Caracterizar y cuantificar las betalaínas y la dopamina presentes en las líneas celulares de *C. argentea* var. plumosa.

- E.** Encapsular con maltodextrina las betalaínas y la dopamina presentes en las líneas celulares de callo de *C. argentea* var. plumosa.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de líneas celulares de callo de *Celosia argentea* var. *plumosa*.

Todas las semillas de *C. argentea* var. *plumosa* germinaron 10 días después de su siembra, sin presentar contaminación por microorganismos. Las plántulas resultantes (Figura 29A) se mantuvieron bajo condiciones asépticas durante 20 días. Los hipocótilos se utilizaron como fuente de explantes para la inducción de calogénesis, actividad que se vio afectada por el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento vegetal (Tabla 11). La presencia única de 2,4-D, no fue suficiente para inducir formación de callos. Tal inhibición del crecimiento celular podría corresponder a un aumento de auxinas en el explante, ya que se ha reportado que 2,4-D promueve la sobreexpresión de genes ARR7 y ARR15, represores de la retroalimentación de la señalización de citoquininas (Ying-Hua *et al.*, 2011). La presencia de BAP a una concentración 4.44 μM , también derivó resultados negativos cuando no hay otro regulador presente, lo cual coincide con lo reportado en tratamientos de *Celosia cristata* (Taha y Wafa, 2012). Combinaciones de BAP 6.66 μM con 2,4-D 8.88 μM (Figura 28A), así como BAP 6.66 μM con 2,4-D 9.05 μM 2,4-D (Figura 28B) generaron callos de color marrón pálido con pequeños fragmentos rojos y amarillos, con rendimientos de 33% o 66%, respectivamente. Los experimentos con las mayores concentraciones de BAP y 2,4-D mostraron la capacidad de inducción a callo del 100 % de callos blanco-verde a los 30 días de cultivo (Figura 28C). El medio suplementado con BAP 6.66 μM y 2,4-D 6.79 μM , generó callos friables de color de color rojo y

amarillo (Figura 28D), a los 30 días de cultivo. Estos datos concuerdan con las observaciones en la planta halófila *Salsa suaeda* (Zhao *et al.*, 2011), en *C. cristata* (Taha y Wafa, 2012; Jamilah *et al.*, 2014), y en cultivos de *B. vulgaris* cultures (Akita *et al.*, 2000).

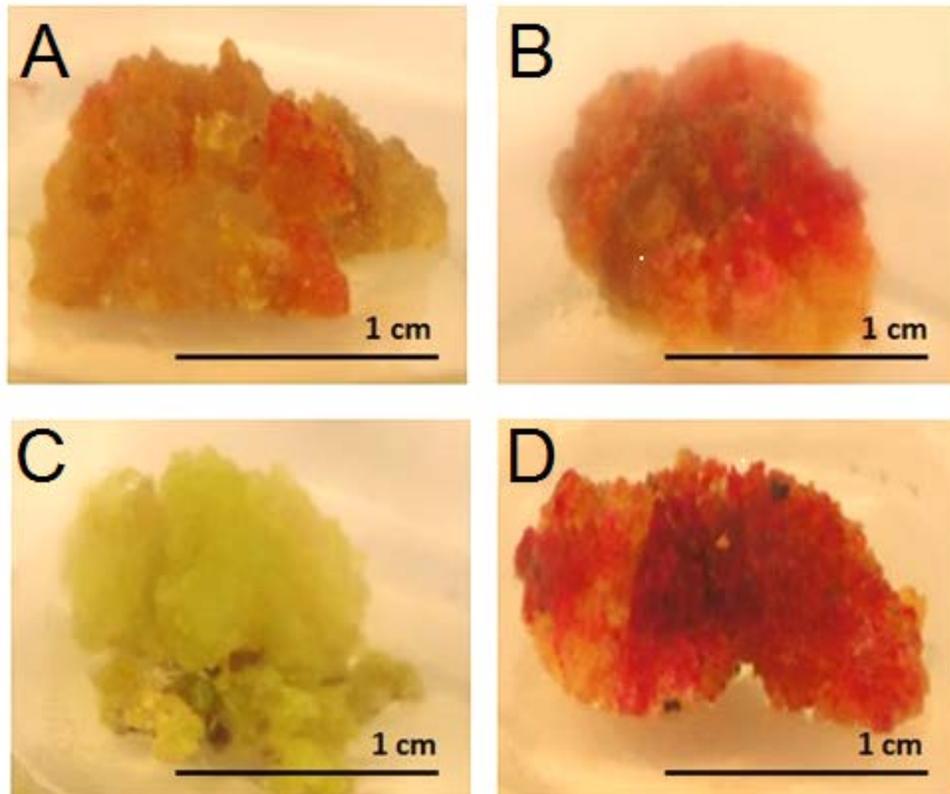


Figura 28: Características fenotípicas de callos inducidos en explantes de hipocótilos de *Celosia argentea* variedad plumosa a los 30 días de cultivo. (A) BAP 8.88 μM y (B): BAP 6.66 μM con 2,4-D 9.05 μM , callos marrón con pequeños fragmentos rojos-amarillos en algunos extremos del tejido. (C) BAP 8.88 μM con 2,4-D 9.05 μM , callo color blanco-verde. (D) BAP 6.66 μM con 2,4-D 6.79 μM , callo color rojo-amarillo.

Tabla 11. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), sobre la inducción de callos a partir de explantes de hipocótilos de *Celosia argentea* var. plumosa después de 30 días de cultivo.

RCV (μM)		Explantes formando callo (%)
BAP	2,4-D	
0.00	0.00	0.00 \pm 0.00 ^a
0.00	6.79	0.00 \pm 0.00 ^a
0.00	9.05	0.00 \pm 0.00 ^a
4.44	0.00	0.00 \pm 0.00 ^a
4.44	6.79	0.00 \pm 0.00 ^a
4.44	9.05	33.33 \pm 10.09 ^{a,b}
6.66	0.00	66.66 \pm 15.04 ^b
6.66	6.79	100.00 \pm 0.00 ^b
6.66	9.05	33.33 \pm 10.09 ^{a,b}
8.88	0.00	33.33 \pm 10.09 ^{a,b}
8.88	6.79	100.00 \pm 0.00 ^b
8.88	9.05	100.00 \pm 0.00 ^b

Cada valor se deriva de tres tubos independientes que contenían cada uno tres diferentes explantes. Los valores que comparten la misma letra se corresponden con diferencias no significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

La presencia de tonalidades rojas y amarillas, indicaba la presencia de betalaínas, con base a estas características del tejido, se determinó que el mejor medio para la propagación del callo fue el suplementado con BAP 6.66 μM y 2,4-D 6.79 μM . La proliferación de este cultivo se llevó a cabo mediante subcultivos en medio fresco, con la misma fórmula de inducción cada 20 días durante 11 ciclos (tiempo total de cultivo 7.5 meses). Como resultado de este proceso se establecieron dos líneas de cultivo de callo para *C. argentea*, una de color amarillo y otra de color rojo (Figura 29B y 29C). Ambas líneas celulares obtenidas se observaron bajo microscopía. La línea amarilla mostró una forma celular redonda y pigmentación amarilla compatible con la presencia de betaxantinas (Figura 29E), y la línea de color rojo presentó una morfología celular redonda y alargada (Figura 29F). La pigmentación roja dentro de las células es compatible con la presencia de betacianinas.

2. Identificación del pigmento en líneas celulares amarillas y rojas.

Las líneas celulares de callos amarillos y rojos obtenidas de *C. argentea* fueron analizadas en términos de la presencia de betalaínas. Las muestras de ambas líneas fueron extraídas y analizadas por HPLC con detección de DAD y ESI-MS / MS (Tabla 12). La línea amarilla exhibió la mayor presencia de betaxantinas como vulgaxantina I (5), derivado de L-glutamina (1,78 mg / g seco peso) y miraxantina V (2) y, derivado de la dopamina (1,64 mg / g de peso seco) (Tabla 12). También se detectaron betaxantinas provenientes de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), dopaxantina (1) y L-triptófano (6). Además de los pigmentos amarillos, se encontraron las betacianinas amarantina (8) y betanina (7) y la

betanidina (3); asimismo se identificó una descarboxi-betanidina (4). En la línea roja, la coloración también se debió a las betalaínas y el contenido de betacianinas fue mayor. La amarantina (8) fue el pigmento mayoritario (4,92 mg / g seco peso), acompañado de la descarboxi-betanidina (4) (1,32 mg / g peso seco), betanina (7) (0,80 mg / g de peso seco), y betanidina (3) (0,74 mg / g de peso seco) (Tabla 12). Las betaxantinas también estuvieron presentes, la betaxantina derivada de dopamina (2) fue el mayor constituyente del pigmento amarillo (3,04 mg / g de peso seco). La presencia conjunta de betacianinas (violeta) y betaxantinas (amarillo) produce el color rojo descrito para la masa celular. Las inflorescencias e hipocótilos, éste último utilizado como material vegetal de partida para establecer las líneas celulares, presentaron una coloración violeta, y en estos órganos sólo se encontró la presencia de amarantina (8) y su isómero iso-amarantina (Tabla 12). El número de betalaínas presentes en los cultivos celulares indica que 6.79 μM de 2,4-D y 6.66 μM BAP, podrían estar favoreciendo la estimulación de la biosíntesis de un mayor número de betalaínas en comparación con el material vegetal de partida. Esto probablemente debido al efecto del 2,4-D y BAP, sobre la expresión de las enzimas clave de la ruta biosintética de betalaínas: dioxigenasa 4,5-DOPA-extradiol (DODA), tirosinasa, y citocromo P450. En este sentido, los niveles de mRNA de DODA y la acumulación de betalaínas han sido previamente correlacionadas con la concentración de los reguladores del crecimiento en cultivos *in vitro* de *S. salsa* (Zhao *et al.*, 2011).

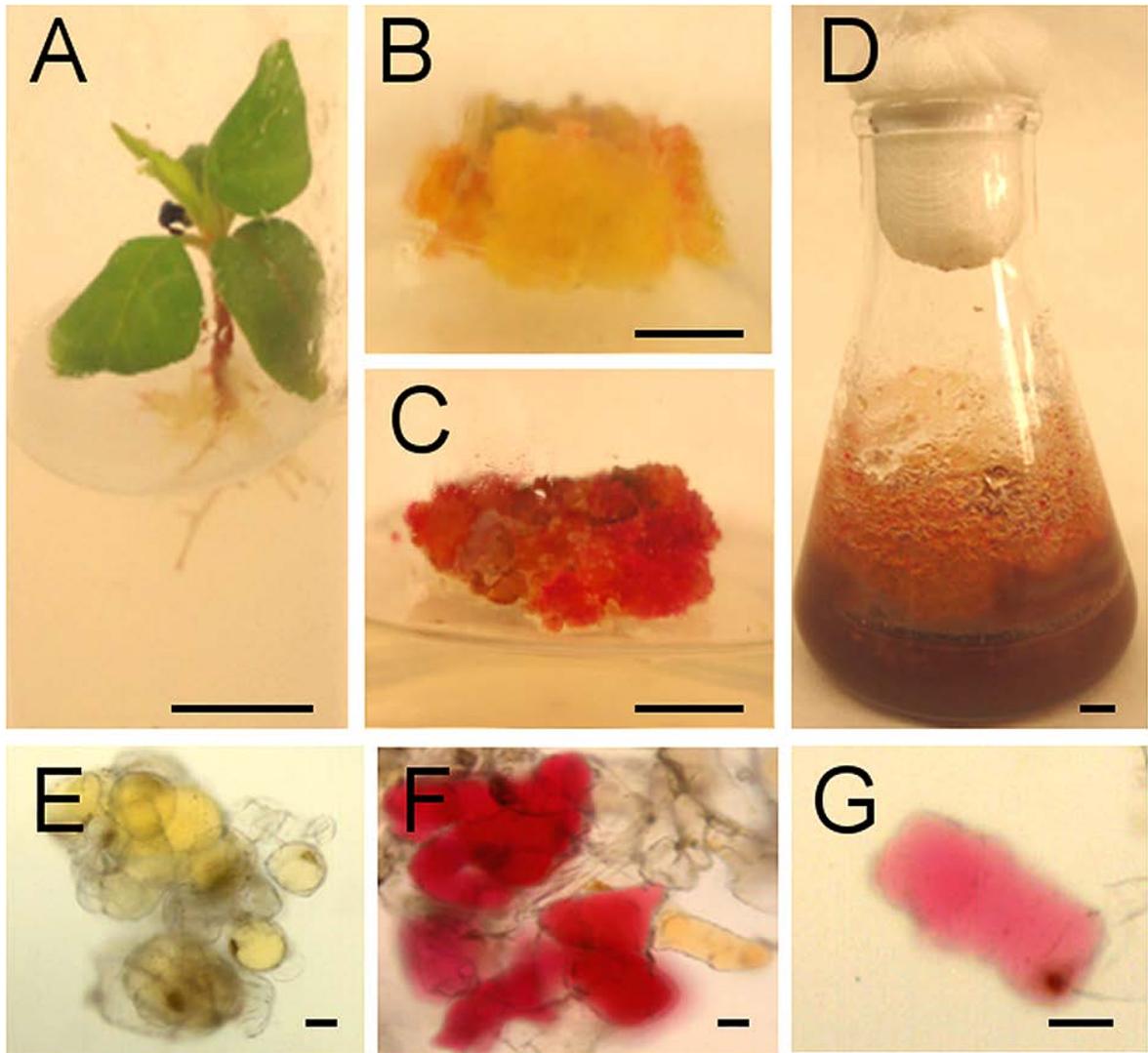


Figura 29. Establecimiento de líneas celulares *in vitro* derivadas de *C. argentea* var. plumosa. (A) Plántulas de veinte días de edad fueron utilizadas como fuente de explantes. (B y C) imágenes macroscópicas que muestra las características fenotípicas de líneas de callos amarillo y rojo, respectivamente. (D) Cultivo de células en suspensión 15 días después de subcultivo. (E, F y G) Imágenes microscópicas de campo claro de células presentes en el callo de color amarillo, rojo y cultivo en suspensión, respectivamente. Barra en A, B, C y D equivale a 1 cm; en E, F y G a 10 μ m.

Tabla 12. Producción de betalaínas, dopamina y ácido betalámico en las líneas celulares de callo amarillo y rojo y en cultivos en suspensión de *C. argentea*.

COMPUESTO	T_r (min)	ESI-MS (<i>m/z</i>)	λ_{max} (nm)	infl ^a (mg / g peso seco)	hip ^b (mg / g peso seco)	línea amarilla (mg / g peso seco)	línea roja (mg / g peso seco)	cultivos en suspensión			
								1 día (mg / g peso seco)	8 días (mg / g peso seco)	15 días (mg / g peso seco)	30 días (mg / g peso seco)
dopaxantina (1)	11.27	391	472	nd ^c	nd	0.22 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.01
miraxantina V (2)	12.54	347	460	nd	nd	1.64 ± 0.01	3.04 ± 0.02	1.84 ± 0.07	1.47 ± 0.06	1.49 ± 0.09	0.52 ± 0.02
betanidina (3)	11.76	389	542	nd	nd	0.45 ± 0.01	0.74 ± 0.03	2.05 ± 0.04	6.27 ± 0.05	2.46 ± 0.07	0.39 ± 0.04
descarboxi- betanidina (4)	13.37	345	539	nd	nd	0.71 ± 0.01	1.32 ± 0.05	2.16 ± 0.05	2.30 ± 0.06	2.21 ± 0.08	0.34 ± 0.01
vulgaxantina I (5)	8.45	340	472	nd	nd	1.78 ± 0.01	2.65 ± 0.01	2.01 ± 0.08	2.01 ± 0.1	0.15 ± 0.04	0.09 ± 0.03
triptófano-bx (6)	10.09	398	472	nd	nd	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
betanina (7)	10.25	551	535	nd	nd	0.62 ± 0.03	0.80 ± 0.01	0.95 ± 0.03	0.75 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.15 ± 0.01
iso-betanina	16.67	551	535	nd	nd	0.94 ± 0.01	1.25 ± 0.01	1.43 ± 0.07	0.67 ± 0.08	0.30 ± 0.07	0.49 ± 0.04
amarantina (8)	9.48	727	535	18.68 ± 0.16	1.52 ± 0.04	1.37 ± 0.01	4.92 ± 0.02	0.62 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.2 ± 0.02
iso-amarantina	9.81	727	535	6.20 ± 0.05	0.60 ± 0.09	0.21 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.22 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01
dopamina (9)	8.60	137	278	nd	nd	17.70 ± 0.05	19.62 ± 0.06	35.28 ± 0.12	42.08 ± 0.15	15.48 ± 0.11	0.94 ± 0.14
ácido betalámico(10)	12.05	211	405	nd	nd	0.29 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.32 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.03

^aInflorescencia de la planta. ^bHipocótilos utilizados como fuente de explantes. ^cnd: No detectado. Se muestran los tiempos de retención (T_r) de HPLC, iones moleculares determinados por ESI-MS y longitudes de onda máximas establecidas por DAD. Los pigmentos analizados en inflorescencias de toda la planta y en hipocótilos se muestran para comparación.

La Figura 30 muestra las imágenes derivadas de la fluorescencia de las betaxantinas. Como puede verse, sólo las porciones de color amarillo de la imagen de campo claro, que contienen el pigmento amarillo, presenta emisión de luz en la imagen de fluorescencia. Anteriormente la fluorescencia de betaxantinas se había utilizado para visualizar células de pétalos (Gandía-Herrero *et al.*, 2005), y para detectar la presencia de *Plasmodium falciparum* (malaria) en eritrocitos (Goncalves *et al.*, 2013). Sin embargo, esta es la primera ocasión que la fluorescencia de las betalaínas demostró ser de utilidad en la visualización de células individuales de plantas cultivadas *in vitro*.

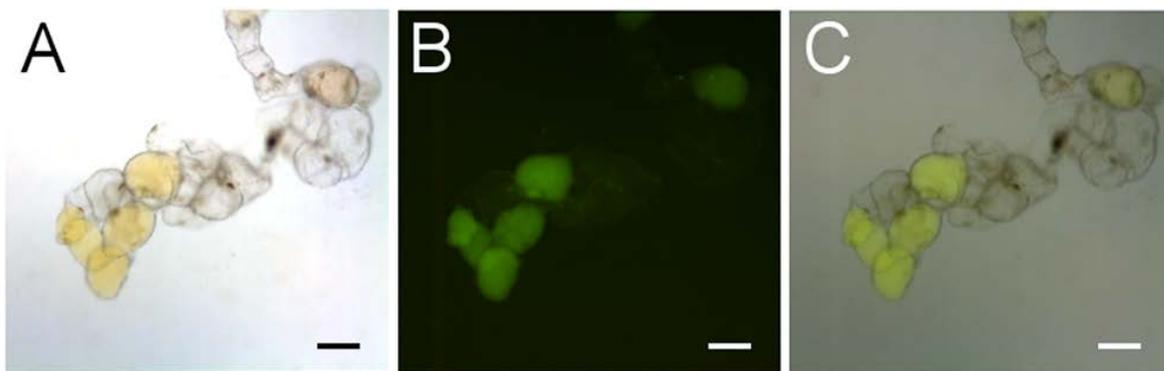


Figura 30. Micrografía de las células de la línea de callo amarillo de *C. argentea*. (A) Técnica de campo claro. (B) Técnica de fluorescencia. Sólo las porciones amarillas de la imagen de campo claro, que contienen betaxantinas, presentan emisión de luz en el perfil de fluorescencia. (C) Combinación de las dos imágenes anteriores.

Todos los pigmentos se identificaron por comparación con estándares en términos de tiempos de retención (T_r) de HPLC, espectros DAD y análisis de espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). Los valores de masa determinados para los iones de partida de todos los compuestos fueron los esperados para los correspondientes iones moleculares protonados $[M + H]^+$ de las betalaínas, confirmando de esta manera las estructuras propuestas (Tabla 12). Para los pigmentos que contienen una subestructura de amonio cuaternario, la masa obtenida corresponde a la forma cargada. En todos los casos el ion resultante correspondiente a $m/z [M + H]^+ - 44$ se detectó, lo que representa la pérdida de un grupo carboxílico. Para betanina (7) (T_r 10,25 min), el fragmento resultante principal presentó m/z 389, correspondiente a la masa determinada para betanidina (3), obtenido a través de la escisión de la unidad de glucosa en el nivel del enlace *O*-glucosídico ($m/z [M$

+ H]⁺ - 162). Amarantina (8) (T_r 9,48 min) proporcionó un ion molecular de m/z 727 que al ser fragmentado presentó una m/z 551, correspondiente a la pérdida de un residuo de ácido glucurónico m/z [M + H]⁺ - 176 (betanina), y en m/z 389, correspondiente a la pérdida adicional de glucosa m/z [M + H]⁺ -176-162 (betanidina). Betanidina (3) también se detectó en los extractos derivados de ambas líneas celulares (T_r 11,76 min). Por lo tanto, todos los productos intermedios de la ruta bioquímica de formación de las betacianinas carboxiladas desde betanidina hasta amarantina estuvieron presentes. Esto sugiere la transformación de betanidina (3) en betanina (7) por glucosilación (Hans *et al.*, 2004), y betanina en amarantina (8) mediante la adición de un residuo de ácido glucurónico. La presencia de los compuestos intermedios apunta a la biosíntesis de amarantina en el callo a través de esta ruta en lugar de la glucosilación y la glucuronilación de ciclo-DOPA y la posterior condensación con betanidina (Sasaki *et al.*, 2005). Estos intermediarios no estuvieron presentes en la inflorescencia e hipocótilos de la planta de partida, en los cuales sólo se detectó el producto final de la ruta: la amarantina. La posible presencia en los cultivos de células de la unidad estructural de todas las betalaínas, el ácido betalámico (10), y el precursor molecular para la miraxantina V, así como la dopamina (9), también fue investigado. El ácido betalámico se pudo detectar en la línea celular amarilla de *C. argentea* en 0,29 mg / g de peso seco (Tabla 12), mientras que en la línea roja se detectó un contenido más alto con 0,46 mg / g seco de peso. La presencia de ácido betalámico (10) complementa la presencia de compuestos intermedios de la ruta biosintética de betalaínas. Es una molécula difícil de detectar, debido a la ciclación casi espontánea de la molécula de 4,5-seco-DOPA obtenido por la escisión intramolecular del aminoácido L-DOPA por la

enzima 4,5-DOPA-extradiol-dioxigenasa (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). El ácido betalámico libre se ha encontrado previamente como un componente natural de frutos de *Opuntia ficus-indica* (42). La dopamina (9) también se detectó en las líneas celulares en cantidades significativas. La identificación fue corroborada por comparación con el estándar comercial (T_r 8.60 min) y ESI-MS. El ion residual predominante de m/z 137 resultante de la pérdida del grupo amina se encontró como derivado de este compuesto. Este metabolito no se detectó en las inflorescencias e hipocótilos de las plantas de partida, sin embargo se encontraron cantidades importantes en la línea celular de callo amarillo con 17.70 mg / g de peso seco y 19.63 mg / g peso seco en la línea roja. Además de su papel clave en la construcción estructural de las betalaínas, el ácido betalámico es un pigmento natural con fuerte actividad antioxidante (Gandía-Herrero *et al.*, 2012). Por su parte la dopamina es un neurotransmisor, y se ha informado que su déficit origina enfermedades mentales tales como depression (Dunlop y Nemeroff, 2007). La presencia de betacianinas dihidroxiladas como betanidina (3) y descarboxi-betanidina (4), así como la dopa y la dopamina betaxantinas (1 y 2) en las líneas celulares obtenidas, es de particular importancia debido a su potente capacidad antioxidante y su actividad de eliminación de radicales libres (Gandía-Herrero *et al.*, 2009; Gliszczynska-Swigło *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2003). Además, la presencia de la betaxantina derivada de triptófano (6) en ambas líneas celulares resulta trascendente, ya que recientemente se ha identificado en la medicina tradicional china como un compuesto bioactivo que interactúa con las sirtuinas, enzimas relacionadas con el envejecimiento (Chen *et al.*, 2013). La triptófano betaxantina es un

compuesto con posible aplicación en el desarrollo de medicamentos para enfermedades asociadas con el envejecimiento.

3. Cultivos en suspensión de *C. argentea*

Los análisis realizados en las líneas celulares derivadas de *C. argentea* reportaron que la línea roja produce niveles más altos de dopamina, betacianinas, y betaxantinas que el homólogo de color amarillo (Figura 31C). Por lo tanto, la línea celular de color rojo fue elegida para iniciar el cultivo en suspensión de *C. argentea* que podría ser utilizado para producir los fitoquímicos identificados. El cultivo líquido fue establecido con éxito en medio MS suplementado con 30 g / L de sacarosa, 6.66 μ M BAP, 6.79 μ M 2.4-D, y 10 mM ácido ascórbico (Figura 29D). La cinética de crecimiento celular (Figura 32) indica que la fase *lag* o de retardo, constó de 4 días, en los que la biomasa alcanzó 3.18 g peso seco / L. Después de este tiempo, las células alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, hasta el día 15, tiempo al cual el acumulado de biomasa fue de 10.96 g peso seco / L. Durante esta fase, el tiempo de duplicación del cultivo fue de 6.1 días con una tasa de crecimiento (μ) de 0.113 / día. Durante todo el tiempo de cultivo el pH de la suspensión fue supervisado (resultados no mostrados) sin variación significativa, presentando un valor medio de pH de 4.9. Este valor de pH es apropiado para promover la estabilidad de los pigmentos betalainas con especial énfasis en aquellos que contienen la subestructura dihidroxilada (Gandía-Herrero *et al.*, 2013). La morfología de las células en suspensión fue alargada, mostrando predominantemente coloración roja (96%) (Figura 29G), también se visualizaron células globulares amarillas en un grado mucho menor (4%) en todos los

cultivos. La presencia conjunta de betaxantinas y betacianinas en la mayoría de las células, tal como se detectó en el callo rojo utilizado para iniciar el cultivo líquido. Las células presentaron la tendencia a formar agregados, probablemente por la lignificación de las paredes celulares debido al contenido de fenoles simples, o bien a la relación de las propiedades de cohesión de la pared celular y el estrés hidrodinámico (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

La viabilidad celular del cultivo en suspensión fue también monitoreada durante el proceso y se observó que ésta se mantuvo en un 74% durante los 30 días del período de cultivo (Figura 32B), por lo que se consideró un cultivo en suspensión de células de *C. argentea* (viabilidad celular > a 50%), establecido exitosamente.

4. Producción de betalainas y dopamina en cultivos en suspensión de *C. argentea*

La presencia de betalainas y dopamina en cultivos líquidos se analizó por HPLC-DAD y ESI-MS. Los pigmentos se identificaron y se cuantificaron tanto en las células en suspensión como en el medio líquido a diferentes tiempos de cultivo. Los extractos celulares y el análisis de medios de cultivo se realizaron a los días 1, 8, 15, y 30 como se muestran en las Tablas 12 y 13.

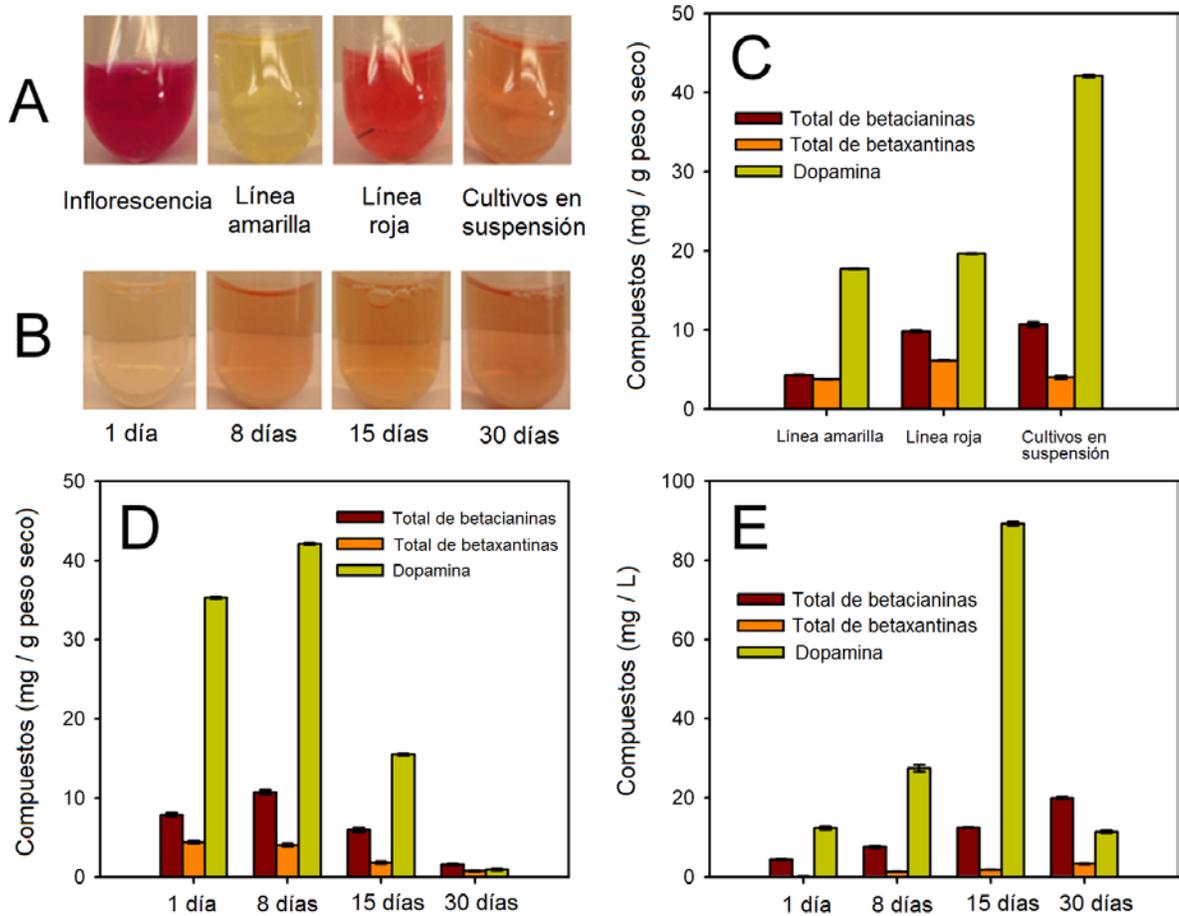


Figure 31. Producción de betalainas y dopamina por las líneas celulares derivadas de *C. argentea* var. plumosa. (A) La imagen muestra la pigmentación de los extractos celulares obtenidos de las inflorescencias de la planta, la línea de callo amarilla, la línea de callo roja, y el cultivo en suspensión 8 días después de subcultivo. (B) Evolución del color en el medio de cultivo líquido a los días 1, 8, 15, y 30 después del subcultivo. (C) Contenido total de pigmentos y la presencia de dopamina obtenidos en los extractos de cultivos semi-sólidos y en suspensión. (D) Evolución temporal para la producción de betalainas y dopamina en las células del cultivo en suspensión en los tiempos indicados después del subcultivo. (E) Evolución temporal de la presencia de betalainas y dopamina en el medio líquido en los tiempos indicados después del subcultivo.

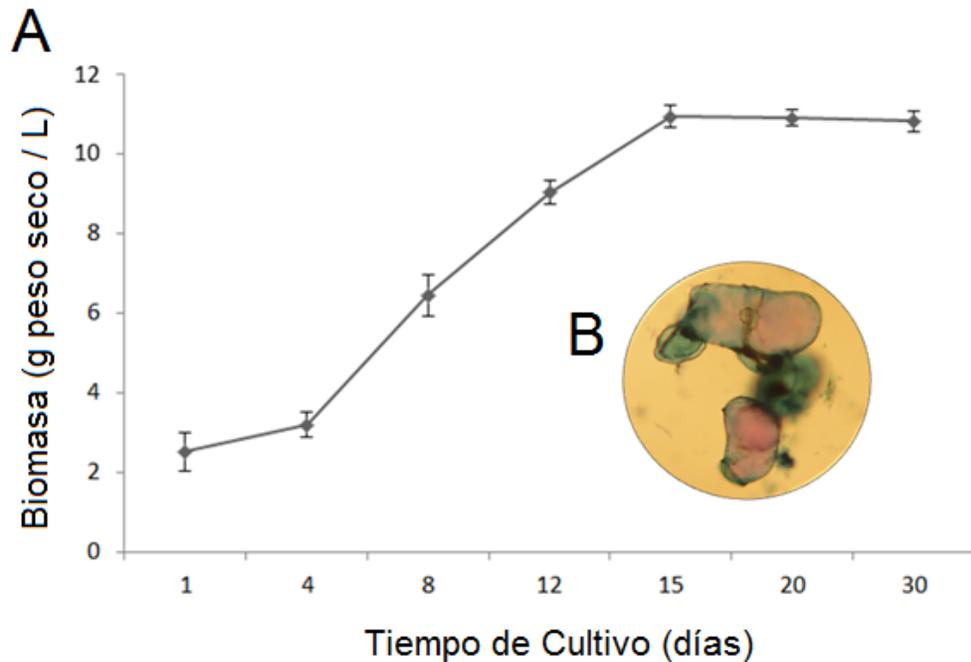


Figura 32. Curva de crecimiento para el cultivo en suspensión de *C. argentea* obtenido en medio líquido MS suplementado con 30 g / L de sacarosa, 6.66 μ M de BAP, 6.79 μ M 2,4-D, y 10 mM de ácido ascórbico. (A) Evolución temporal del crecimiento. (B) Viabilidad celular determinada a los 8 días por la prueba de tinción con azul del Evans.

La máxima acumulación de betalaínas en las células se exhibió al día 8, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial (Figura 31D). Se identificó la presencia de 10 pigmentos en la biomasa celular de los callos, con un mayor contenido de miraxanthin V (2) (1.84 mg / g de peso seco), vulgaxantina I (5) (2.01 mg / g de peso seco), y betanidina (3) (6.27 mg / g de peso seco). Este contenido de pigmento explica la coloración de la suspensión celular y sugiere la posible secreción de pigmentos en el medio de cultivo (Tabla 13). La presencia

de betalaínas en el medio de cultivo se detectó durante todo el proceso, aumentando con el tiempo de incubación (Figura 31B y 31E). Los pigmentos identificados fueron ácido betalámico (10), vulgaxantina I (5), miraxantina V (2), amarantina (8), y betanidina (3). La cantidad total de betalaínas detectada al final del cultivo (día 30) fue de 23.27 mg / L, de este valor corresponde el 13.40 mg / L a la betacianina dihidroxi-betanidina (3). La betanidina, es la betalaína con la actividad antioxidante y la capacidad antirradical más alta, además los extractos que contienen betalaínas presentan potencial anti-inflamatorio (Vidal *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014).

Tabla 13. Producción de betalaínas, dopamina y ácido betalámico en el medio líquido de cultivos en suspensión de *C. argentea*.

COMPUESTO	1 día (mg/L)	8 días (mg/L)	15 días (mg/L)	30 días (mg/L)
dopaxantina (1)	nd ^a	nd	nd	nd
miraxantina V (2)	0.03 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.50 ± 0.02	1.17 ± 0.04
betanidina (3)	0.50 ± 0.04	2.85 ± 0.11	6.75 ± 0.02	13.40 ± 0.04
descarboxi-betanidina (4)	1.14 ± 0.05	1.51 ± 0.20	2.47 ± 0.03	4.17 ± 0.09
vulgaxantina I (5)	0.08 ± 0.03	0.88 ± 0.02	1.24 ± 0.03	2.16 ± 0.06
triptófano-bx (6)	nd	nd	nd	nd
betanina (7)	nd	nd	nd	nd
iso-betanina	nd	nd	nd	nd
amarantina (8)	2.70 ± 0.07	3.04 ± 0.11	2.99 ± 0.02	2.33 ± 0.08
iso-amarantina	0.04 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.04 ± 0.03
dopamina (9)	12.34 ± 0.48	27.42 ± 0.85	89.20 ± 0.51	11.35 ± 0.35
ácido betalámico(10)	0.88 ± 0.02	0.84 ± 0.01	1.23 ± 0.03	3.63 ± 0.06

^and: No detectado

Las células en suspensión presentaron un aumento significativo en el contenido de dopamina (9) en comparación con los niveles detectados en las células cultivadas en medios semi-sólidos. Después de 8 días en cultivo en suspensión, el contenido de dopamina presente en las células fue de 42.08 mg / g seco peso, más del doble de la cantidad

detectada en las células del callo de la línea de color rojo (19.62 mg / g de peso seco) (Figura 31C). Las células vegetales en suspensión sufren estrés hidrodinámico debidas a la agitación continua probablemente implicando el aumento del metabolismo secundario (Hua *et al.*, 1993; Joshi *et al.*, 1996). El contenido de dopamina en el medio de cultivo fue menor. En este caso, la concentración máxima se encontró después de 15 días de cultivo con un contenido de 89 mg / L (Figura 31E). Aunque se conoce la presencia de dopamina en plantas de *C. argentea* (Schliemann *et al.*, 2001), este es el primer informe sobre la producción de este metabolito en cultivo celular de esta especie. La producción *in vitro* de dopamina a través de cultivo de células vegetales transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, se reportó anteriormente para la especie *Portulaca oleracea* (Caryophyllales), con una máxima producción de 0.90 mg / g de peso seco después de 28 días de cultivo (Ahmadi-Moghadam *et al.*, 2014). Este valor es 40 veces menor, al obtenido en sólo 8 días en las células no transformadas de *C. argentea* (42.08 mg / g del peso seco).

5. Encapsulación preliminar de betalaínas y dopamina

Un requisito que debe cumplir todo pigmento para convertirse en colorante es ser estable (Fernández y Giménez, 2013). Con el fin de explorar la posibilidad de la estabilización de las betalaínas y la dopamina presentes en los cultivos *in vitro* de *C. argentea* var. plumosa, se realizó un estudio preliminar de encapsulación con los extractos acuosos de las líneas de callo rojo y amarillo. Para ambos casos, por separado y a una temperatura de 140° C del aire de entrada se llevó a cabo un proceso de secado por pulverización utilizando como matriz maltodextrina al 10 y al 20 %. Se obtuvieron polvos solubles en agua de color rosa y

amarillo, correspondiéndose esta coloración al contenido de betacianinas y betaxantinas, respectivamente (Figura 33). La mayor pigmentación de los encapsulados se alcanzó con maltodextrina al 10 % (Figura 33B-C y 33E-F), debido a la concentración del extracto en la matriz de encapsulación.

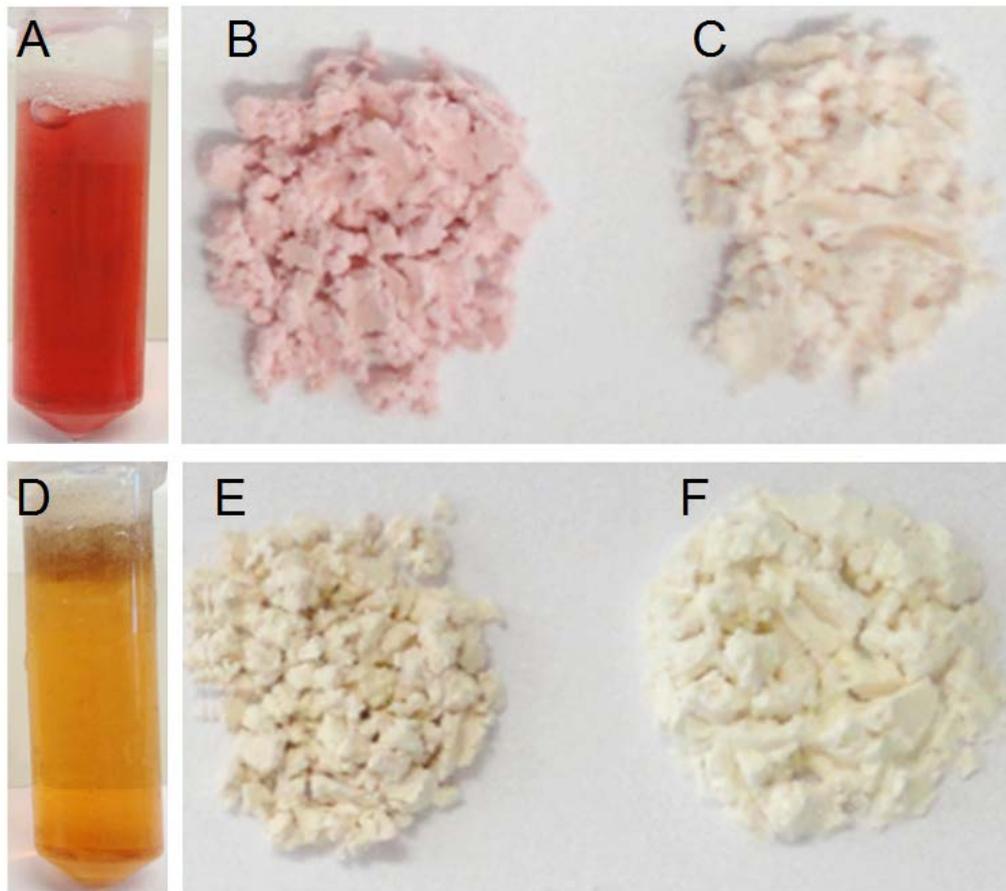


Figura 33. Encapsulados de betalaínas y dopamina de cultivos de callo de *Celosia argentea*. Extractos acuosos de la línea de callo rojo (A) y callo amarillo (D). Imágenes macroscópicas de los polvos resultantes de la encapsulación con maltodextrina al 10 % (B y E) y 20 % (C y F).

Se espera una mayor estabilidad del pigmento encapsulado, persistencia del color, duración de la actividad antioxidante y antirradical de las betalaínas y permanencia de los compuestos bioactivos de alrededor de 6 meses; como lo reportado para indicaxantina, miraxantina V y betanidina, los cuales fueron encapsulados bajo condiciones equivalentes (Gandía-Herrero *et al.*, 2010 y 2015). Por lo que estos polvos pueden ser candidatos apropiados como fuente estable de colorante para la aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los cultivos de células de *C. argentea*, obtenidos en medio MS con 6.66 μ M de BAP y 6.79 μ M de 2,4-D, producen dopaxantina, betanidina, miraxanthin V y descarboxi-betanidina, para dichas betalaínas dihidroxiladas se ha reportado la más alta actividad antioxidante y antirradical.
2. Los cultivos de células de *C. argentea* producen triptófano-betaxantina, que ha sido identificado como un importante compuesto bioactivo de la medicina tradicional china por su posible interacción con las sirtuinas, enzimas relacionadas con el envejecimiento.
3. La presencia conjunta de compuestos bioactivos tales como betalaínas y dopamina, muestra la capacidad de las células de los cultivos de *C. argentea*, para convertirse en fuentes estables de valiosos fitoquímicos.
4. Extractos acuosos de la línea celular de callo rojo y callo amarillo, fueron encapsulados favorablemente con maltodextrina mediante secado por pulverización, obteniéndose polvos solubles en agua de color rosa y amarillo. Esto indica que los cultivos *in vitro* de *C. argentea* pueden ser fuente sostenible de compuestos bioactivos con posible aplicación como colorantes naturales.

Capítulo 7. CONCLUSIÓN GENERAL

CONCLUSIÓN GENERAL

En esta investigación se logró establecer cultivos *in vitro* de *A. hypochondiacus* var. nutrisol y de *C. argentea* var. plumosa, productores de betalaínas, ácido betalámico y en el caso de celosía, dopamina (Figura 34). Los cultivos celulares de ambas especies de amarantáceas, fueron obtenidos utilizando medio MS con 6.66 μ M de BAP y 6.79 μ M de 2,4-D, bajo las mismas condiciones de cultivo. Como fuente de explantes se ocuparon hojas e hipocótilos de amaranto y celosía, respectivamente. Con amaranto se obtuvo una línea de callo de color amarillo verdoso, del cual derivó una línea en suspensión y biorreactor de 3L, la cual no acumuló betalaínas. La producción de pigmentos se logró, por estimulación mediante estrés abiótico y la adición de sustratos al medio de cultivo. Con celosía, se obtuvieron dos líneas celulares de callo color amarillo y rojo, con este último se estableció una línea en suspensión celular productora de betalaínas. En amaranto, la acumulación máxima de betalaínas (18.07 mg/ g de peso seco) se alcanzó en los cultivos en suspensión suplementados con 1.5 mM de L-DOPA, ocho días posteriores a la inoculación. En celosía el máximo de betalaínas (14.71 mg/g de peso seco) se logró en suspensiones celulares, a los 8 días de cultivo, sin la adición de intermediarios biosintéticos en el medio de cultivo. Los extractos acuosos de callo rojo y callo amarillo de celosía, se encapsularon con maltodextrina al 10 %, obteniéndose polvos solubles en agua de color rosa y amarillo. Los resultados obtenidos revelan el potencial de los cultivos celulares de estas dos especies para la obtención de compuestos nutraceuticos, con posible aplicación como colorantes naturales en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

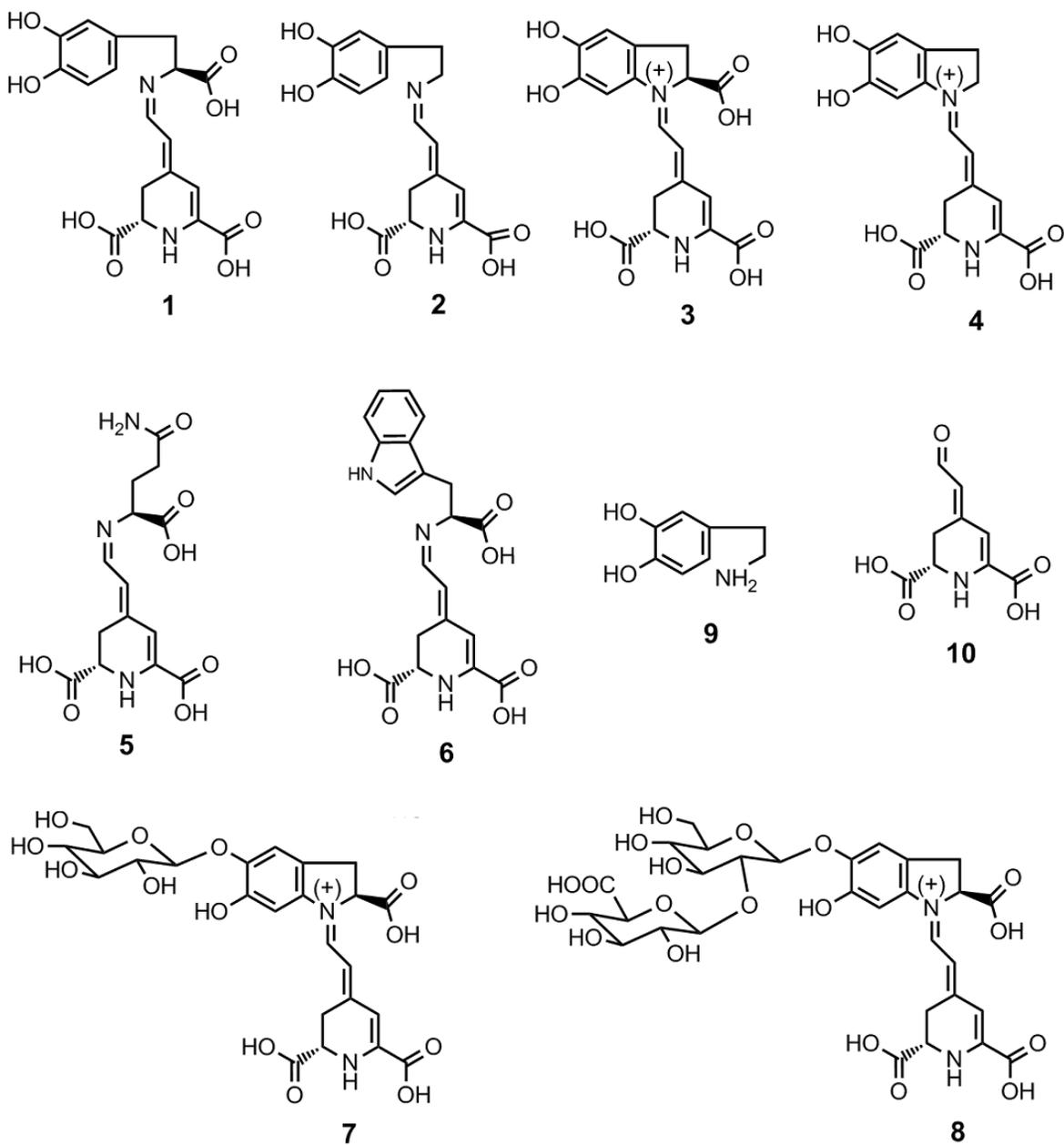


Figura 34. Estructuras de betalainas obtenidas en cultivos *in vitro* de *A. hypochondriacus* y *C. argentea*. Dopaxantina (1), miraxantina V (2), betanidina (3), y descarboxi-betanidina (4), vulgaxantina I (5) y triptófano-betaxantina (6), betanina (7) y amarantina (8). También se muestran las moléculas precursoras dopamina (9) y ácido betalámico (10).

Capítulo 8. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Determinar la estructura química de los pigmentos amarillos presentes en las líneas celulares de callo y suspensiones de *Amaranthus hypochondriacus*.

Utilizar diferentes factores de estrés y la biotransformación de sustratos, como estrategia de estimulación para incrementar la sobreproducción de betalaínas, en las líneas celulares *in vitro* de *A. hypochondriacus* y *C. argentea*.

Escalar a biorreactor la producción de betalaínas en las líneas celulares *in vitro* de *A. hypochondriacus* y *C. argentea*.

Evaluar las diferencias genéticas, bioquímicas y fisiológicas de las líneas celulares en suspensión de *A. hypochondriacus* y *C. argentea*, que producen las más altas concentraciones de betalaínas; para aclarar cómo actúan los diversos factores de estrés implicados en la activación de la ruta biosintética de betalaínas.

Evaluar la estabilidad de encapsulación y la estabilidad de las betalaínas encapsuladas de los extractos acuosos de *C. argentea*.

Continuar los estudios de encapsulación de los compuestos nutraceuticos acumulados en los cultivos celulares de estas dos Caryophyllales.

Aplicar nuevas herramientas biotecnológicas encaminadas no sólo a la producción de betalaínas; sino también a la obtención de otros metabolitos secundarios de interés, tales como compuestos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en *A. hypochondriacus* var. *nutrisol* y *C. argentea* var. *plumosa*.

Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Romman, S. The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Adv. Environ. Biol.* 2013, 7, 339–343.

Ahmadi-Moghadam, Y.; Piri, K.; Bahramnejad, B.; Ghiasvand, T. Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (purslane) using *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Agric. Sci. Technol.* 2014, 16, 409–420.

Ahmad, I.; Dole J. M. Optimal postharvest handling protocols for *Celosia argentea* var. *crispata* L. ‘Fire Chief’ and *Antirrhinum majus* L. ‘Chantilly Yellow’. *Scientia Horticulturae.* 2014, 172, 308–316.

Akita, T.; Hina, Y.; Nishi, T. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Biosci Biotech Biochem.* 2000, 64, 1807–1812.

Alard, D; Wray, V.; Grotjahn, L.; Reznik, H.; Strack, D. Neobetanin: Isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, 1985, 24, 2383-2385.

Alejandro-Iturbide, G.; Gómez-Lorence, F. Cultivo del amaranto en México. Colección Cuadernos Universitarios. Serie Agronomía No. 12. Universidad Autónoma Chapingo. 1986, 245.

Allegra, M.; Furtmüller, p. G.; Jantsscko, w.; Zederbauer, M.; Tesoriere, L.; Livrea, M. A.; Obinger, C. mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 332, 837-844.

Amin, I.; Norazaidah, Y.; Hainida, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chem.* 2006, 94, 47–52.

APG II. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2003. 141, 399-436

Baenas, N.; García-Viguera C.; Moreno, D. A. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules.* 2014, 19, 13541-13563.

Berlin, J.; Sieg, S.; Strack, D.; Bokern, M.; Harms, H. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1986, 5, 163–174.

- Bianco-Colomas, J. Qualitative and quantitative aspects of betalains biosynthesis in *Amaranthus caudatus* L. var pendula seedlings. *Planta*. 1980. 149:176–180.
- Biswas, M.; Sekhar-Das, S.; Dey, S. Establishment of a Stable *Amaranthus tricolor* Callus Line for Production of Food Colorant. *Food Sci. Biotechnol.* 2013, 22(S): 1-8.
- Böhm, H.; Böhm, L.; Rink, E.; Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1991, 26, 75–82.
- Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA. 2000.
- Butera, D.; Tesoriere, L.; Di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A. M.; Kohen, R.; Livrea, M. A. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6895-6901.
- Bhuiyan, N. H.; Adachi, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol.* 2003, 160, 1117–1124.
- Brockington, S. F.; Walker, R. H.; Glover, B. J.; Soltis, P.S.; Soltis, D. E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist*. 2011, 190, 854–864.
- Brockington, S. F.; Yang, Y.; Gandia-Herrero, F.; Covshoff, S.; Hibberd, J. H.; Sage, R. F.; Wong, G. K.; Moore, M. J.; Smith, S. A. Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*. 2015. En prensa.
- Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; Lozano, J. A.; García-Carmona, F. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim. Biophys.* 1987, 923, 187–195.
- Cabanes, J.; Chazarra, S.; Garcia-Carmona, F. Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates – reply. *J. Theor. Biol.* 2002, 214, 321–325.
- Cardoza, V. Tissue culture: The manipulation of plant development. En: *Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications*. CN Stewart Jr (Ed). John Wiley and Sons, Inc. Knoxville, Tennessee. 2008, 113-134.
- Carmona, I. De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. *Agrimundo*. Reporte 5. Alimentos Procesados. ODEPA. 2013, 26-31.

- Castellar, M. R.; Obón, J. M.; Alacid, M.; Fernández-López, J. A. (2008) Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) Fruits for Betalains Concentration. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4253–4257.
- Cai, Y. Z.; Corke, H. *Amaranthus* betacyanin pigments applied in model food systems. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 64, 869-873.
- Cai, Y. Z.; Sun, M.; Schliemann, W.; Corke, H. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigment from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4429-4435.
- Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2288–2294.
- Cai, Y.Z.; Sun, M.; Corke, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16, 370–376.
- Casique-Arroyo, G.; Martínez-Gallardo, N.; González de la Vara, Luis.; Délano-Frier, J.P. Betacyanin Biosynthetic Genes and Enzymes Are Differentially Induced by (a)biotic Stress in *Amaranthus Hypochondriacus*. *PLOS ONE*. 2014, 9(6), 99012.
- CONABIO. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. 2009, 196-199.
- Chapman, E. J.; Greenham K.; Castillejo, C.; Sartor, R.; Bialy, A. Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through ga-dependent and independent pathways. *PLoS One* 2012, 7, 10.1371/journal.pone.0036210.
- Chen, K.-C.; Jian, Y.-R.; Sun, M.-F.; Chang, T.-T.; Lee, C.-C.; Chen, C. Y.-C. Investigation of silent information regulator 1 (Sirt1) agonists from traditional Chinese medicine. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2013, 31, 1207–1218.
- Christinet, L.; Burdet, F. X.; Zaiko, M.; Hinz, U.; Zrýd, J. P. Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiol.* 2004, 134: 265–274.
- del Campo, N.; Chamberlain, S. R.; Sahakian, B. J.; Robbins, T. W. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 2011, 69, E145–E157.
- Downham, A.; Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology.* 2000, 35, 5–22.
-

Dulce, M., Jiménez-Aguilar, Mújica-Paz, H., Welti-Chanes, J. Phytochemical Characterization of Prickly Pear (*Opuntia* spp.) and of its Nutritional and Functional Properties: A Review. *Current Nutrition & Food Science*. 2014, 10, 57-69.

Dunlop, B. W.; Nemeroff, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 2007, 64, 327–337.

Elliot, D. C. Ionic regulation for cytokinin-dependent betacyanin synthesis in *Amaranthus* seedlings. *Plant Physiol*. 1975, 63, 264-268.

Espitia-Rangel E. Estabilidad del rendimiento en amaranto, en Primer Congreso Internacional del Amaranto, Oaxtepec, Mor. México. 1991, 22(27), 65.

Fennema, O.R.; Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1995. Capítulo 10, 773-849.

Fernández-López, J. A.; Giménez, P. J. Betalaínas: colorantes naturales bioactivos. *Investigación y Ciencia*, ISSN 0210-136X. 2013 , 445, 10-12

Fifel, K.; Cooper, H. M. Loss of dopamine disrupts circadian rhythms in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2014, 71, 359–369.

Fischer, N.; Dreiding, A.S. Biosynthesis of betalaines. On the cleavage of the aromatic ring during the enzymatic transformation of dopa into betalamic acid. *Helv. Chim.* 1972, 55, 649–658.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*.1968. 50,151-158.

Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 609–615.

Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. Floral fluorescence effect. *Nature* 2005a, 437, 334–334.

Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *J. Chromatogr. A* 2005b, 1078, 83–89.

Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.* 2006, 17, 262–269.

- Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1546–1551
- Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1142–1146.
- Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta.* 2010, 232, 449–460.
- Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 1030–1036.
- Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci.* 2013, 18, 334–343.
- Gandía-Herrero, F.; Cabanes, J.; Escribano, J.; García-Carmona, F.; Jiménez-Atiénzar, M. Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *J. Agric. Food Chem.* 2013b, 61, 4294–4302.
- Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Biological activities of plant pigments betalains. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, DOI: 10.1080/10408398.2012.740103.
- García-Carmona, F.; Gandía-Herrero, F.; Escribano, J. Flores Fluorescentes. *Investigación y Ciencia.* 2011, 50-57.
- Gao, Z. J.; Han, X.H.; Xiao, X.G. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chem.* 2009, 117, 342–348.
- Georgiev, V.; Ilieva, M.; Bley, T.; Pavlov, A. Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiol Plant*, 2008. DOI: 10.1007/s11738-008-0170-6.
- Gil, A. Tratado de nutrición. *Medica Panamericana.* 2010, 89-92.
- Girod, P.A.; Zrýd, J. P. Biogenesis of betalains: purification and partial characterization of DOPA 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry.* 1991, 30, 169–174
- Gonçalves, L. C. P.; Tonelli, R. R.; Bagnaresi, P.; Mortara, R. A.; Ferreira, A. G.; Bastos, E. L. A nature-inspired betalainic probe for livecell imaging of Plasmodium-infected erythrocytes. *PLoS One* 2013, 8, e53874.
- Godoy-Alcántar, C.; Anatoly, K.; Yatsimirsky.; Lehn, J. M. Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution. *J. Phys. Org. Chem.* 2005, 18, 979–985.

Guengerich, F.P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 611–650.

Gliszczyńska-Świgło, A.; Szymusiak, H.; Malinowska, P. Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Addit. Contam.* 2006, 23, 1079–1087.

Hadacek, F.; Bachmann, G.; Engelmeier, D.; Chobot, V. Hormesis and a chemical raison d'être for secondary plant metabolites. *Dose-Response.* 2011, 9 (1), 79-116.

Hancock, M. Potential for colourants from plant sources in England & Wales. ADAS Arable Crops & Horticulture Division, Boxworth. 1997, 4–52.

Hans, J.; Brandt, W.; Vogt, T. Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modeling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dortheanthus bellidiformis*. *Plant J.* 2004, 39, 319–333.

Hatlestad, G. J.; Sunnadeniya, R. M.; Akhavan, N. A.; Gonzalez, A.; Goldman, I. L. The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nat. Genet.* 2012, 44, 816–820.

Hatlestad, G. J.; Akhavan, N. A.; Sunnadeniya, R. M.; Elam, L.; Cargile, S.; Hembd A.; Gonzalez A.; McGrath J. M.; Lloyd, A. M. The beet Y locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. *Nature Genetics.* 2015, 47, 92-96.

Hempel, J.; and Böhm, H. Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var. *lutea* and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochemistry.* 1997, 44, 847–852

Henriette, M. C.; Azeredo. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 2009, 44, 2365–2376.

Heuer, S.; Wray, V.; Metzger, J.W.; Strack, D. Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. *Phytochemistry.* 1992, 31: 1801–1807.

Heuer, S.; Vogt, T.; Boehm, H.; Strack, D. Partial purification and characterization of UDP-glucose:betanidin 5-O- and 6-O-glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dortheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N.E.Br. *Planta.* 1996, 199, 244–250.

Hua, J.; Erickson, E.; Yiin, T. Y.; Glasgow, L. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1993, 13, 305–328.

Huang; Hwang, L. S. Studies on the red pigment of *A. tricolor*. Separation and identification of the red pigment by HPLC. Shih P'in K'o Hsueh. 1981, 8(1-2), 13–25.

- Ibrahim, B.; Sowemimo, A.; van Rooyen, A.; Van de Venter, M. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrate* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *J. Ethnopharmacol.* 2012, 141, 282–289.
- Impellizzeri, G.; Piattelli, M.; Sciuto, S. A new betaxanthin from *Glottiphyllum longum*. *Phytochemistry* 1973, 12, 2293–2294.
- Jamilah, S. Y.; Azani, S.; Hashimah, E.; Sakinah, A.; Noraini, M.; Normadiha, M. In vitro regeneration and acclimatization protocols of selected ornamental plants (*Agapanthus praecox*, *Justicia betonica* and *Celosia cristata*). *Sains Malays.* 2014, 43, 715–722.
- Jimenez-Aparicio, F.; Gutierrez-Lopez, G. Production of food related colorants by culture of plant cells. The case of betalains. *Adv Exp Med Biol.* 1999, 464, 195–210.
- Jiratanan, T.; Liu, R. H. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2659–2670.
- Joshi, J. B.; Elias, C. B.; Patole, M. S. Role of hydrodynamic shear in cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chem. Eng. J.* 1996, 62, 121–141.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. 3 Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 2007, 189-196.
- Junqueira-Gonçalves, M. P.; Zuñiga, G. E.; Zárate, H.; Arcos, K.; Ganga, A.; Miltz, J. Irradiated beetroot extract as a colorant for cream cheese. *International Journal of Food Science and Technology.* 2012; 47(11). DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03120.x.
- Kapadia, G. J.; Azuine, M. A.; Sridhar, R.; Okuda, Y.; Tsuruta, A.; Ichiishi, E.; Mukainake, T.; Takasaki, M.; Konoshima, T.; Nishino, H.; Tokuda, H. Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol. Res.* 2003, 47, 141–148.
- Kishima, Y.; Shimaya, A.; Adachi, T. Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca callas*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1995, 43:67–70.
- Kobayashi, N.; Schmidt, J.; Wray, V.; Schliemann, W. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry.* 2001, 56, 429–436.
- Kugler, F.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] alef. cv. bright lights) by high-

performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2975–2981.

Khan, M. I.; Harsha, P. S. C. S.; Giridhar, P.; Ravishankar, G. A. Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and in vitro cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L. berries, potential source of betalains. *LWT–Food Sci. Technol.* 2012, 47, 315–323.

Li, J.; Christensen, B.M. Identification of products and intermediates during L-DOPA oxidation to dopachrome using highperformance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 1117–1133.

Liebisch, H.W.; Matschiner, B.; Schütte, H. R. Beiträge zur Physiologie und Biosynthese des Betanins. *Z. Pflanzenphysiol.* 1969, 61, 269–278

Lechner, J. F.; Wang, L. S.; Rocha, C. M.; Larue, B.; Henry, C.; McIntyre, C. M.; Riedl, K. M.; Schwartz, S. J.; Stoner, G. D. Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats. *J. Med. Food.* 2010, 13, 733–739.

Lu, X.; Wang, Y.; Zhang, Z. Radioprotective activity of betalains from red beets in mice exposed to gamma irradiation. *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 615, 223–227.

Mapes, C. J.; Caballero, E.; Espitia, R. Bye. Morphophysiological variation in some Mexican species of vegetable *Amaranthus*: evolutionary tendencies under domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 1996, 43 (3), 283-290.

Martínez-Parra, J.; Muñoz, R. Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. roots. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4064–4068.

Martinez, R. M.; Longhi-Balbinot, D. T.; Zarpelon, A. C.; Staurengo-Ferrari, L.; Baracat, M. M.; Georgetti, S. R.; Sassonia, R. C.; Verri, W. A., Jr.; Casagrande, R. Anti inflammatory activity of betalainrich dye of *Beta vulgaris*: effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. *Arch. Pharmacol. Res.* 2014, DOI: 10.1007/s12272-014-0473-7.

Meeta, S.; Arun, K.; Hariharan.; Soumya, N.; Saurabh, G.; Suran, R.; Nambisan.; Ravi, P.; Binay, P.; Bibha, C.; Subhashini, S. The Draft Genome And Transcriptome Of *Amaranthus Hypochondriacus*: A C4 Dicot Producing High-Lysine Edible Pseudo-Cereal. *Dna Research.* 2014, 21, 585–602.

Miao, G. P.; Zhu, C.S.; Feng, J.T.; Han, L.R.; Zhang, X. Effects of Plant Stress Signal Molecules on the Production of Wilforgine in an Endophytic Actinomycete Isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook. *Current Microbiology.* 2014. En prensa.

Mihai, R.; Mitoi, M.; Brezeanu, A.; Cogalniceanu, G. Two-stage system, a possible strategy for the enhancement of anthocyanin biosynthesis in a long-term grape callus cultures. *Romanian Biotechnological Letters*. 2010, 15 (1), 5025-5033.

Moreno, D. A.; García-Viguera, C.; Gil, J. I.; Gil-Izquierdo, A. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochem. Rev.* 2008, 7, 261–280.

Mueller, L.A.; Hinz, U.; Zrýd, J. P. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*. 1996, 42, 1511–1515.

Mueller, L. A.; Hinz,U.; Uze, M.; Sautter, C.; Zrýd, J. P. The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*. 1997, 44, 567–569.

Mukundan, U.; Bhide, V.; Dawda, H. Production of betalains by hairy root cultures of *Beta vulgaris* L. In: Fu TJ, Singh G, Curtis WR (eds) *Plant cell and tissue culture for the production of food ingredients*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999, 121–127.

Müller, K.; Borsch, T. Phylogenetics of Amaranthaceae Based on matK/trnK sequence data: evidence from Parsimony, Likelihood, and Bayesian analyses. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 2005, 92, 66-102.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, 15, 473–97.

Musso, H. Pigments of fly agaric, *Amanita muscaria*. *Tetrahedron*. 1979, 35, 2843–2853.

McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L.; Prince, E.; Sonuga-Barke, E.; O-Warner, J.; Stevenson, J. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2007, 370, 1560–1567.

Pavlov, A.; Kovatcheva, P.; Georgiev, V.; Koleva, I.; Ileva M. Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z. Naturforsch.* 2002, 57c, 640-644.

Pedersen, T. M. Amaranthaceae, Caryophyllaceae. In A. Burkart. In A. Burkart Fl. II. Entre Ríos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 1987, 3: 160–203.

Pedreño, M. A.; Escribano, J. Correlation between antiradical activity and stability of betanine from *Beta vulgaris* L roots under different pH, temperature and light conditions. *J. Sci. Food Agric.* 2001, 81, 627–631.

Petersen, M. Arabidopsis Map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*. 2000, 103, 1111-1120.

Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G. Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron*. 1964, 20, 2325–2329.

Piattelli, M.; Minale, L.; Nicolaus, R. A. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa* L. *Phytochemistry* 1965, 4, 817–823.

Piattelli, M.; Impellizzeri, G. 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrothus acinaciformis*. *Phytochemistry* 1970, 9, 2553–2556.

Piattelli, M. The betalains: structure, biosynthesis, and chemical taxonomy. In EE Conn, ed, *The Biochemistry of Plants*, 1981, 7, 557–575

Priya, K.S.; Arumugam, G.; Rathinam, B. *Celosia argentea* Linn. leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. *Wound Repair Regen*. 2004, 12(6), 618–625.

Qui, J. A.; Castro-Concha, L. A.; García-Sosa, K.; Peña-Rodríguez, L. M.; Miranda-Ham, M. L. Differential effects of phytotoxic metabolites from *Alternaria tagetica* on *Tagetes erecta* cell cultures. *J. Gen. Plant Pathol*. 2009, 75, 331–339.

Radfar, M.; Sudarshana, M. S.; Niranjana, M. H. Betalains from stem callus cultures of *Zaleya decandra* L. N. Burm. f. - A medicinal herb. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012, 6(12), 2443-2447.

Radman, R.; Saez, T.; Bucke, C.; Keshavarz, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem*. 2003, 37(1), 91-102.

Rahman-Mahbubu, A. H. M.; Gulshana-Ara, M, I. Taxonomy and Medicinal Uses on *Amaranthaceae* Family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*. 2014, 2(2), 54-59.

Ramesh, B.; Nidavani.; Mahalakshmi, A. M.; Mallappa, S. Towards a better understanding of an updated ethnopharmacology of *Celosia argentea* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013, 5(3), 0975-1491.

Rao, S.R.; Ravishankar, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 2002, 20:101–153

Ravichandran, K.; Palaniraj, R.; Thaw, Saw.; Ahmed M. G.; Ahmed R.; Knorr, D.; Smetanska, I.; Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *J Food Sci Technol*. 2014, 51(9):2216–2221.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganda, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 1996, 20, 933–956.

Robert, P.; Torres, V.; García, P.; Vergara, C.; Sáenz, C. The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *Food Science and Technology*. 2015, 60, 1039-1045.

Rodríguez-Monroy, M.; Jiménez-Aparicio, A.; Dávila-Ortíz, G.; Sepúlveda-Jiménez, G. Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnol Lett.* 1994, 16, 853–858.

Rodríguez-Monroy, M.; Galindo, E. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in stirred tank. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 24, 687–693.

Rudat, A.; Göring, H. Induction of betacyanin formation in cell cultures of *Chenopodium album* under UV-light irradiation. *J Exp Bot.* 1995, 46:129–134.

Sang-Uk, C.; Buk-Gu, H.; Yong-Seo, P.; Dong-Kwan, K.; Shela, G. Total phenolics level, antioxidant activities and cytotoxicity of young sprouts of some traditional Korean salad plants. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2009, 64, 25–31.

Santos-Díaz, M.S.; Velásquez-García, Y.; González-Chávez, M. M. Pigment production by callus of *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia*. 2005, 39, 619–626

Sasaki, N.; Abe, Y.; Wada, K.; Koda, T.; Goda, Y.; Adachi, T. Detection of UDP-glucose: cyclo-DOPA 5-Oglucosyltransferase activity in four o'clocks (*Mirabilis jalapa* L.). *FEBS Lett.* 2004, 568, 159–162

Sasaki, N.; Adachi, T.; Koda, T.; Ozeki, Y. Isolation and characterization of cDNAs encoding an enzyme with glucosyltransferase activity for cyclo-DOPA from four o'clocks and feather cockscombs. *Plant Cell Physiol.* 2005, 46, 666–670.

Sasaki, N.; Abe, Y.; Wada, K.; Koda, T.; Goda, Y.; Adachi, T.; Ozeki, Y. Amaranthin in feather cockscombs is synthesized via glucuronylation at the cyclo-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway. *J. Plant Res.* 2005, 118, 439–442.

Sasaki, N.; Wada, K.; Koda, T.; Kasahara, K.; Adachi, T. Amaranthin in feather cockscombs is synthesized via glucuronylation at the cyclo-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway. *J. Plant Res.* 2005b, 118, 439–442.

Sasaki, N.; Abe, Y.; Goda, Y.; Adachi, T.; Kasahara, K. Detection of DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) activity using recombinant protein prepared from *Escherichia coli* cells

harboring cDNA encoding DOD from *Mirabilis jalapa*. *Plant Cell Physiol.* 2009, 50, 1012–1016.

Sekiguchi, H. Ozeki, Y.; Sasaki, N. In vitro synthesis of betaxanthins using recombinant DOPA 4,5-dioxygenase and evaluation of their radicalscavenging activities. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 12504–12509.

Sepúlveda-Jiménez, G.; Rueda-Benítez, P.; Porta, H.; Rocha-Sosa, M.; Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 2004, 64 (3)125-133.

Serra-Majem, L. Guía de la alimentación funcional: Los probióticos en la alimentación humana. Elsevier Masson. 2008, 103-112.

Silva da Rocha, A.; Rocha, E. K.; Alves, L. M.; Amaral de Moraes, B.; Carvalho de Castro, T.; Albarello, N.; Simões-Gurgel, C. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology.* 2013, 24 (1), 105-113.

Silva, L. R.; Valentão, P.; Faria, J.; Ferreres, F.; Sousa, C.; Gil-Izquierdo, A.; Pinho, B. R.; Andrade, P. B. Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chem.* 2012, 135, 756–763.

Silva, N. C.; Macedo, A. F.; Lage, C. L.; Esquibel, M. A.; Sato, A. Developmental effects of additional ultraviolet A radiation, growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured in vitro. *Braz Arc Biol Technol.* 2005, 48:779–786.

Suresh, B.; Thimmaraju, R.; Bhagyalakshmi, N.; Ravishankar, G. A. Polyamine and methyl jasmonate-induced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in bubble column reactor and studies on efflux of pigments. *Process Biochem.* 2004, 39, 2091–2096.

Schliemann, W.; Kobayashi, N.; Strack, D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.* 1999, 119, 1217–1232.

Schliemann, W.; Cai, Y.; Degenkolb, T.; Schmidt, J.; Corke, H. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry.* 2001, 58, 159–165.

Schwartz, S. J.; von Elbe, J. H. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 540–543.

- Shimada, S.; Otsuki H.; Sakuta M. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. *J. Exp. Bot.* 2007, 58, 957–967.
- Shin, K. S.; Murthy, H. N.; Heo, J. W.; Paek, K. Y. Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources. *Biol Plant.* 2003, 47:149–152.
- Shiyi, Ou.; Kin-Chor, Kwok. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2004. 84 (11) 1261–1269.
- Sreekanth, D.; Arunasree, M. K.; Roy, K. R.; Reddy, T. C.; Reddy, G. V.; Reddanna, P. Betanin, a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine* 2007, 4, 739–746.
- Steiner, U.; Schliemann, W.; Böhm, H., Strack, D. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 1999, 208, 114–124.
- Stewart, A. J.; Mullen, W.; Crozier, A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 52–60.
- Stintzing, F. C.; Schieber, A.; Carle, R. Amino acid composition and betaxanthin formation in fruits from *Opuntia ficus-indica*. *Planta Med.* 1999, 65, 632–635.
- Stintzing, F. C.; Carle, R. C. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition *Trends in Food Science & Technology.* 2004, 15, 19–38.
- Strack, D.; Vogt, T.; Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry.* 2003, 62, 247–269.
- Taha, R. M.; Wafa, S. N. Plant regeneration and cellular behaviour studies in *Celosia cristata* grown in vivo and in vitro. *Sci. World J.* 2012, DOI: 10.1100/2012/359413.
- Taya, M.; Mine, K.; Kino-Oka, M.; Tone, S.; Ichi, T. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J. Ferment Bioeng.* 1992, 73:31–36.
- Tesoriere, L.; Allegra, M.; Butera, D.; Livrea, M. A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2004, 80, 941–945.

Tesoriere, L.; Butera, D.; Allegra, M.; Fazzari, M.; and Livrea, M. A. Distribution of Betalains Pigments in Red Blood Cells After Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1266-1270.

Trejo-Tapia, G.; Rodríguez-Monroy, M. Cellular aggregation in secondary metabolite production in in vitro plant cell cultures. *Interciencia* 2007, 32, 669–674.

Trezzini, G. F.; Zrýd, J.-P. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. *Phytochemistry* 1991, 30, 1897–1899.

Trezzini, G. F.; Zrýd, J.-P. Characterization of some natural and semisynthetic betaxanthins. *Phytochemistry* 1991b, 30, 1901–1904.

Tzin, V.; Galili, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol. Plant.* 2010. 3, 956–972

Vanisree, M.; Lee, C. Y.; Lo, S. F.; Nalawade, S. M.; Lin, C. Y.; Tsay, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin.* 2004, 45,1–22.

Vasu, T. S.; Cavallazzi, R.; Hirani, A.; Kaplan, G.; Leiby, B.; Marik, P. E. Norepinephrine or dopamine for septic shock: systematic review of randomized clinical trials. *J. Intensive Care Med.* 2012, 27, 172–178.

Vidal, P. J.; López-Nicolás, J. M.; Gandía-Herrero, F.; García- Carmona, F. Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem.* 2014, 154, 246–254.

Villegas, R. L.; García, H. F.; Caballero, A. Y.; Santos de Flores, E. Estudio de los colorantes del betabel (*Beta vulgaris L.*). *Revista de la Sociedad Química de México.* 1983, 27 (4), 175-183.

Wang, C. Quan.; Yang, G. Q. Betacyanins from *Portulaca oleracea L.* ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* . 2010, 17, 527–532.

Wu, L. C.; Hsu, H. W.; Chen, Y. C.; Chiu, C. C.; Lin, Y. I.; Ho, J. A. A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* 2006, 95, 319–327.

Wheeler, J. R. “Family 36 Amaranthaceae.” In *Flora of the Kimberley Region*. J.R. Wheeler, B.L. Rye, B.L. Koch, and A.J.G. Wilson, Eds. Department of Conservation and Land Management, Como, Australia, 1992,106–33.

Wyler, H.; Dreiding, A. S.; Darstellung und Abbauprodukte des Betanidins. *Helv. Chim. Acta*, 1957, 42, 1699-1702.

Wyler, H.; Chiovini, J. Die Synthese von Cyclodopa (Leukodopachrom). *Helv. Chim.* 1968, 51, 1476–1494.

Wybraniec, S.; Michałowski, T. New pathways of betanidin and betanin enzymatic oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 9612–9622.

Ying-Hua, S.; Yu-Bo, L.; Xian-Sheng, Z. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant* 2011, 4, 616–625.

Zakharova, N. S.; Petrova, T. A. β -Glucosidases from leaves and roots of the common beet, *Beta vulgaris*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2000, 36, 394–397.

Zhang, M.; Curtin, C.; Franco, C.; Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology.* 2002, 30, 688-696.

Zhao, S. Z.; Sun, H. Z.; Gao, Y.; Sui, N.; Wang, B. S. Growth regulator-induced betacyanin accumulation and dopa-4,5-dioxygenase (DODA) gene expression in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant* 2011, 47, 391–398.

Capítulo 10. ARTÍCULO

Production of Dihydroxylated Betalains and Dopamine in Cell Suspension Cultures of *Celosia argentea* var. *plumosa*

Berenice Guadarrama-Flores,^{†,‡,§} Mario Rodríguez-Monroy,[‡] Francisco Cruz-Sosa,[†] Francisco García-Carmona,[§] and Fernando Gandía-Herrero^{*,§}

[†]Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Col. Vicentina, 09340 Ciudad de México, Federal District, Mexico

[‡]Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi), Instituto Politécnico Nacional, San Isidro, Yautepec, Morelos, Mexico

[§]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Unidad Docente de Biología, Facultad de Veterinaria, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, E-30100 Espinardo, Murcia, Spain

ABSTRACT: Betalains are plant pigments of hydrophilic nature with demonstrated chemopreventive potential in cancer cell lines and animal models. Among the betalains, those containing an aromatic moiety with two free hydroxyl groups possess the strongest antioxidant and free radical scavenging activities. The betaxanthins dopaxanthin and miraxanthin V and the betacyanins betanidin and decarboxy-betanidin are the only natural betalains with catecholic substructures. These four pigments have been produced in cell cultures established from hypocotyls of the plant *Celosia argentea*. Two stable and differentially colored cell lines, yellow and red, were maintained on Murashige and Skoog medium supplemented with the plant growth regulators 6-benzylaminopurine (6.66 μ M) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (6.79 μ M). Derived suspension cultures showed increased production of dihydroxylated betalains in the cells and secreted to the medium with a maximum reached after 8 days of culture. In addition, precursor molecules betalamic acid and dopamine, with content up to 42.08 mg/g dry weight, were also obtained. The joint presence of the bioactive betalains together with the production of dopamine and betalamic acid show the ability of cell cultures of *C. argentea* to become a stable source of valuable phytochemicals.

KEYWORDS: antiradical, betalains, bioactive, dopamine, secondary metabolism

■ INTRODUCTION

Betalains are plant pigments of hydrophilic nature responsible for the bright coloration of species belonging to the order Caryophyllales where they substitute for anthocyanins. They are bioactive molecules with high antioxidant and free radical scavenging activities and have demonstrated a strong chemopreventive potential both in cancer cell lines and in vivo studies with animal models.¹ Betalains are classified into two structural groups: betacyanins and betaxanthins. The violet betacyanins possess an indoline-derived moiety, and the yellow betaxanthins contain open structures derived from amines and amino acids (Figure 1).² Among the betalains, those containing free hydroxyl groups possess the strongest antioxidant and free radical scavenging activities with Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of 4.0 mM for those pigments with one hydroxyl group and 5.8 mM for those containing two groups.^{3,4} Thus, the natural betalains with the highest antioxidant potential are the betaxanthins dopaxanthin (1) and miraxanthin V (2) and the betacyanins betanidin (3) and decarboxy-betanidin (4) (Figure 1).

Miraxanthin V (dopamine-betaxanthin) (2) and decarboxy-betanidin (4) are natural pigments derived from dopamine (9). Dopamine is a neurotransmitter involved in the reward response, a deficit that has been correlated with depression,⁵ Parkinson's disease,⁶ and attention deficit hyperactivity disorder.⁷ Dopamine, together with norepinephrine, is also therapeutically used in the treatment of septic shocks.⁸ The

potential applications of these natural bioactive betalains are limited due to the reduced number of known plant sources and tools to produce them. Miraxanthin V (2) has been described in the genus *Mirabilis*,⁹ *Beta*,¹⁰ *Portulaca*,¹¹ and *Celosia*,¹² while decarboxy-betanidin (4) has been described in the genus *Carpobrotus*,¹³ *Beta*,¹⁴ and *Celosia*.¹² The carboxylated forms of the dihydroxylated betaxanthin, dopaxanthin (1), can be found in *Glottiphyllum*,¹⁵ *Portulaca*,¹¹ and *Lampranthus*.² The carboxylated betacyanin betanidin (3) can be found as a precursor of the glucosylated betanin (7) or as a pigment in *Dorotheanthus bellidiformis*¹⁶ and *Lampranthus productus*.² Pigment biosynthesis is exclusive of colored structures, and thus, dihydroxylated betalains production depends in most cases on the presence of flowers and their number in fully developed plants for extraction. A biotechnological approach to the production of these molecules is necessary to avoid this dependence.

In addition to their bioactive properties, the current interest in betalains is driven by their use as safe food colorants under the E-162 code in the European Union and as the additive 73.40 in the 21 CFR section of the Food and Drug Administration (FDA) in the United States. A diversification

Received: January 5, 2015

Revised: February 27, 2015

Accepted: March 1, 2015

Published: March 1, 2015

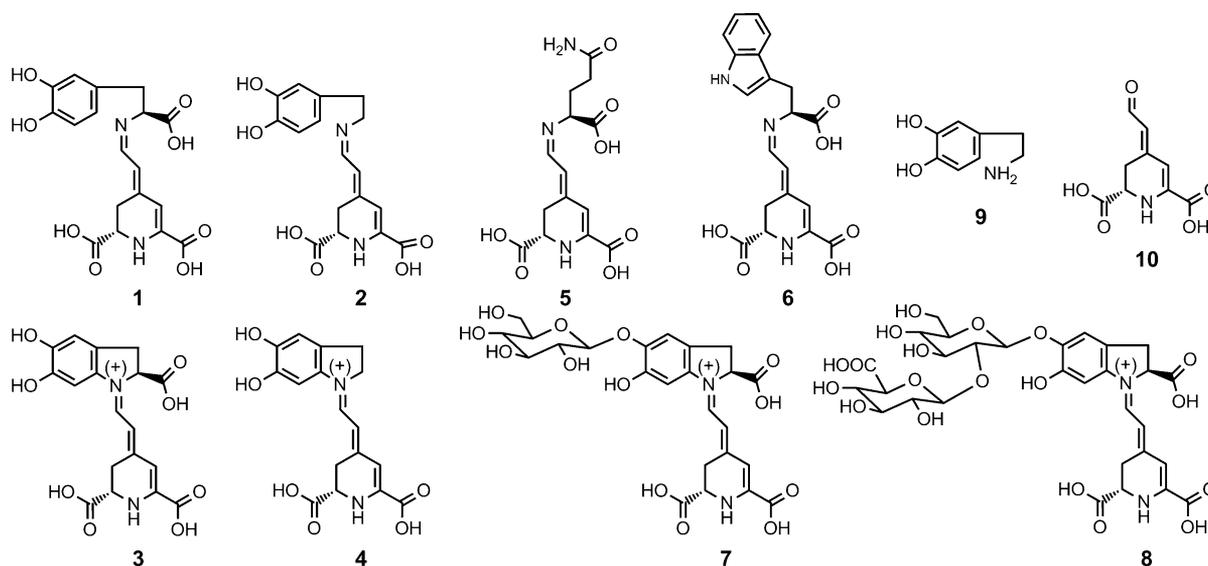


Figure 1. Structures for the dihydroxylated betalains dopaxanthin (1), miraxanthin V (2), betanidin (3), and decarboxy-betanidin (4). Structures for additional pigments obtained in this study are also shown, corresponding to the betaxanthins vulgaxanthin I (5) and tryptophan-betaxanthin (6) and the betacyanins betanin (7) and amaranthin (8). Precursor molecules dopamine (9) and betalamic acid (10) are also shown.

in the sources of betaxanthins and betacyanins may lead to different shades to be used in the coloration of foods and beverages. In this sense, some betalain-containing plants of the Amaranthaceae are consumed cooked or fresh^{17,18} and used in traditional medicine to alleviate the symptoms of inflammation.^{19,20}

Dihydroxylated betalains have the potential to become bioactive constituents in foods and can be combined to generate tailor-made colors which can be encapsulated to obtain products with a shelf life of months.²¹ This study was designed to develop cell cultures of *Celosia argentea* as a model plant of the Amaranthaceae family and to explore the potential of liquid culture in the production of dihydroxylated betalains. The appearance of structurally related molecules is quantitated and discussed in terms of the biosynthetic pathway of betalains.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Chemicals and reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Solvents were from Merck Chemicals Ltd. (Dorset, England). HPLC-grade acetonitrile and methanol were purchased from Labscan Ltd. (Dublin, Ireland). Distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Plant Material. *C. argentea* var. *plumosa* plants with violet inflorescences were obtained from Viveros la Generala (Murcia, Spain) and grown at the greenhouse facilities at the University of Murcia (Murcia, Southeastern Spain). Seeds were surface sterilized in commercial liquid detergent 1% for 15 min, followed by 70% ethanol for 30 s, and by 1.8% sodium hypochlorite solution containing 0.2% Tween-20 for 30 min. Seeds were then washed three times with sterile water under aseptic conditions. Sterile seeds were transferred to sterilized tubes (25 × 150 mm) containing 15 mL of semisolid Murashige and Skoog medium (MS).²² Seedlings were grown up to 2 cm (20 days), and then hypocotyls were removed as explants source. Hypocotyls were transferred to individual tubes ($n = 6$), with 10 mL of MS medium supplemented with different plant growth regulators (PGRs). Environmental conditions consisted of a photoperiod of 16 h under fluorescent light at an irradiance of 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and temperatures of 23 (day) and 18 °C (night).

Callus Induction. The culture medium used was MS supplemented with 30 g/L sucrose and 2 g/L of the solidifying agent phytigel. To assess response to callus explant induction media were enriched with different concentrations and combinations of PGRs: 6-

benzylaminopurine (BAP) (0.0, 4.44, 6.66, 8.88 μM) with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0.0, 6.79, 9.05 μM) (Table 1). All

Table 1. Effect of Plant Growth Regulators (PGRs) on Callus Induction from Hypocotyls Explants Obtained from *C. argentea* var. *plumosa* after 30 Days of Culture^a

PGRs (μM)		callus-forming explants (%)
BAP	2,4-D	
0.00	0.00	0.00 ^a
0.00	6.79	0.00 ^a
0.00	9.05	0.00 ^a
4.44	0.00	0.00 ^a
4.44	6.79	0.00 ^a
4.44	9.05	33.33 ^{a,b}
6.66	0.00	66.66 ^b
6.66	6.79	100.00 ^b
6.66	9.05	33.33 ^{a,b}
8.88	0.00	33.33 ^{a,b}
8.88	6.79	100.00 ^b
8.88	9.05	100.00 ^b

^aEach value was derived from three independent tubes containing three different explants. Those values sharing the same letter correspond to nonsignificant differences according to the Tukey test ($p < 0.05$).

culture media were adjusted to pH 5.8 with 1 N NaOH and HCl and sterilized by autoclaving at 121 °C for 18 min. The cultures were incubated under a photoperiod of 16 h under fluorescent light at an irradiance of 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ and temperatures of 23 (day) and 18 °C (night). The response of the explants for callus formation at each induction treatment was expressed as the percentage of the number of forming callus hypocotyls explants on the total evaluated, which was recorded at day 30 of culture. Propagation of callus cell lines was done under the same conditions in a MS medium supplemented with 6.66 μM BAP and 6.79 μM 2,4-D. It was selected for proliferation by subcultures on fresh medium with induction every 20 days for 9 subculture cycles. Subculturing and selection gave rise to two callus cell lines with different colors: yellow and red.

Establishment of Cell Suspension Culture and Growth Kinetics. *C. argentea* cell suspension culture was initiated from 3-

week-old red friable callus by transferring 2.5 g to 100 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of callus induction medium (without phytigel) supplemented with 10 mM ascorbic acid in order to avoid dopamine oxidation and incubated under the same conditions on an orbital shaker at 110 rpm. After subculturing every 15 days during 3 months, the cells were sieved through 200 μm nylon cloth filters in order to obtain a homogeneous and fine cell suspension culture. Then, the culture was maintained during 6 months by subculturing every 15 days using a cell inoculum size of 10% (v/v) in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of cultured medium. To determine the growth kinetics, 2.5 g of fresh cells harvested after 8 days was inoculated into 100 mL Erlenmeyer flasks containing 30 mL of liquid MS medium supplemented with 3% sucrose (w/v), 10 mM ascorbic acid, BAP 6.66 μM , and 2,4-D 6.79 μM . Aliquots were removed every 3–10 days over a 30 day period from culture flasks and used to determine cell growth, cell morphology, cell viability, and dopamine and betalains content. All experiments were performed in triplicate ($n = 3$), and the results were expressed as mean values and standard deviations (SD).

Cell Viability. Cell viability was determined by the Evan's blue staining test.²³ A 2 mL amount of samples from each flask was incubated into 0.25% Evan's blue stain for 5 min, and then at least 700 cells were counted. This was repeated twice for each measurement ($n = 6$).

Preparation of Extracts. Callus samples and cell suspensions of 1, 8, 15, and 30 days of culture were homogenized manually in 10 mM phosphate buffer pH 6.0 containing 10 mM ascorbic acid. The resulting homogenate and samples of the liquid medium of the suspension culture were centrifuged at 14 000g for 15 min. The supernatant of each sample was used for analysis of betalains and dopamine ($n = 3$) by HPLC. The whole process was carried out at 4 °C. The humidity percentage and dry weight of the cells was obtained with a Kern MLS electronic moisture analyzer (Balingen, Germany).

Standard Betalains. Betanin was obtained from roots of *Beta vulgaris*, dopaxanthin was extracted and purified from yellow flowers of *L. productus*, betanidin was obtained from violet flowers of the same plant, and amaranthin was extracted from *Amaranthus spinosus*.^{2,24} Other pigments were obtained by a combined procedure for the release of betalamic acid from purified betanin and condensation with the amine dopamine and the amino acids (S)-glutamine and (S)-tryptophan, following a previously described method.²⁵ Betalamic acid was obtained through basic hydrolysis of betanin.²⁶ All compounds were characterized spectrophotometrically, chromatographically, and by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

Anionic Exchange Chromatography. Anionic exchange chromatography was performed in an Äkta purifier apparatus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) using a 25 \times 7 mm, 1 mL Q-Sepharose Fast Flow column (cross-linked agarose with quaternary ammonium as exchanger group, 90 μm particle size). Solvents used were sodium phosphate 10 mM, pH 6.0 (solvent A), and 10 mM sodium phosphate, pH 6.0, with 2 M NaCl (solvent B). After sample injection, the elution process was as follows: 0% B from beginning to 3 mL, and then a linear gradient was developed from 0% B to 35% B in 20 mL. In all cases, the flow rate was 1 mL/min, 1 mL fractions were collected, and injection volume was 1 mL. Elutions were followed by UV–vis detection at 280, 480, and 536 nm.

Solid-Phase Extraction. One milliliter C-18 cartridges (Waters, Milford, MA) were conditioned with 5 mL of ethanol followed by 10 mL of purified water. Aqueous solutions of extracted pigments and semisynthetic betalains were injected and bound to the minicolumn. Salts and buffers were washed off by rinsing the column with purified water. Betalains were eluted with ethanol, and the resulting fraction was evaporated to dryness under reduced pressure at room temperature. The residue was redissolved in water for further use or stored at -80 °C.

HPLC-DAD Analysis. A Shimadzu LC-20AD apparatus (Kyoto, Japan) equipped with a SPD-M20A photodiode array detector (PDA) was used for analytical HPLC separations. Reversed phase chromatography was performed with a 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm , Kromasil 100 C-18 column (Teknokroma, Barcelona, Spain) for

identification of betalains.²⁷ Solvent A was water with 0.05% trifluoroacetic acid (TFA), and solvent B was composed of acetonitrile with 0.05% TFA. A linear gradient was performed for 42 min from 0% B to 65% B. The flow rate was 1 mL/min, operated at 30 °C. Elutions were followed at $\lambda = 270$ (dopamine), 405 (betalamic acid), 480 (betaxanthins), and 536 nm (betacyanins). Injection volume was 40 μL . Dopamine and betalains presented the same elution times as the corresponding standards in coelution experiments and superimposable spectra.

Electrospray Ionization Mass Spectrometry. A VL 1100 apparatus with LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) was used for HPLC-ESI-MS analyses. Elution conditions were as described above using the same column (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm , Kromasil 100 C-18) decreasing the flow rate to 0.8 mL/min. Vaporizer temperature was 350 °C, and voltage was maintained at 3.5 kV. The sheath gas was nitrogen, operated at a pressure of 45 psi. Samples were ionized in positive mode. Ion monitoring mode was full scan in the range m/z 50–1000. The electron multiplier voltage for detection was 1350 V.

UV–Vis Spectroscopy. A V-630 spectrometer (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) attached to a Tectron thermostatic bath (JP Selecta, Barcelona, Spain) was used for UV–vis spectroscopy. For quantitation of betalains, pigment concentration was evaluated using molar extinction coefficients of $\epsilon = 46\,000$ (dopaxanthin), 27 000 (betalamic acid), 44 000 (tryptophan-betaxanthin), 46 000 (dopaxanthin), 48 000 (glutamine-betaxanthin and dopamine-betaxanthin), 65 000 (betanin and amaranthin), and 54 000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (betanidin).^{28–30} All measurements were performed in water at 25 °C.

Microscopy. Brightfield and fluorescence microscopy were performed in a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with incident light beam. In the case of fluorescence imaging, the filtercube I3 (Leica Microsystems) was used limiting excitation to the range $\lambda = 450$ –490 nm.

Statistical Analysis. Data analysis was carried out by using ANOVA variance parametric analysis and Tuckey range test ($P < 0.05$) using SPSS software, version 8.0 (SPSS, Chicago, IL). In each case, errors associated with the results provided were calculated on the basis of the residual standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of Callus Lines of *C. argentea* var. *plumosa*. All seeds from *C. argentea* var. *plumosa* were germinated on day 10 after sowing, with no sign of microbial contamination. Seedlings were maintained under aseptic conditions for 20 days and then used for callus induction experiments (Figure 2A). Hypocotyls were considered as primary explant sources due to the presence of meristem tissue and the reported endogenous levels of auxins and cytokines.^{31,32} Table 1 summarizes the results for callus induction as affected by the presence and concentration of different plant growth regulators. It can be seen that the sole presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was not enough to induce the formation of calli. Such inhibition of the cell growth could be due to the overexpression of genes ARR7 and ARR15 promoted by the auxin as previously reported.³³ The presence of 6-benzylaminopurine (BAP) at a concentration 4.44 μM also yielded negative results if no other regulator was present, in accordance to previous reports with *Celosia cristata*.³⁴ Treatments with BAP at concentrations 6.66 and 8.88 μM and the combination of 6.66 μM BAP with 9.05 μM 2,4-D generated calli with pale brown color with yields of 33% or 66%. Experiments with the highest concentrations of BAP and 2,4-D showed 100% induction capacity of white-green calli in 30-day cultures.

The medium supplemented with 6.66 μM BAP and 6.79 μM 2,4-D showed the highest cell growth, and the cell mass

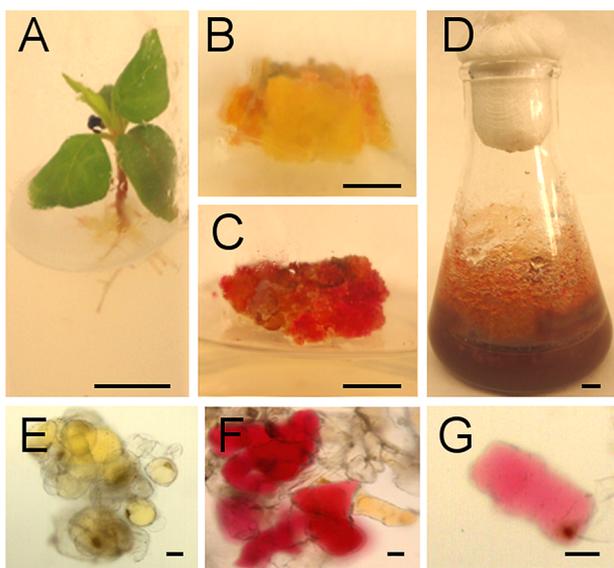


Figure 2. Establishment of in vitro cell lines derived from *C. argentea* var. *plumosa*. (A) Twenty days old seedling used as explants source. (B and C) Macroscopic images showing phenotypic characteristics for yellow and red callus lines, respectively. (D) Suspension culture 15 days after inoculation. (E, F, and G) Brightfield microscopic images of cells present in yellow callus, red callus, and suspension culture, respectively.

presented yellow and red color after 14 days of culture, spreading to the full explants at day 30. The presence of yellow and red colors suggested the presence of betalains. These data are in relation to the observations on the halophytic plant *Suaeda salsa*,³⁵ on *C. cristata*,^{34,36} and on *B. vulgaris* cultures.³⁷ Due to the presence of red and yellow hues and the culture characteristics, the medium supplemented with 6.66 μ M BAP and 6.79 μ M 2,4-D was considered for further experimentation. Callus propagation was performed in fresh medium every 20 days for 11 cycles (total cultivation time 7.5 months). As a result of this process two stable and differentially colored lines of *C. argentea* were established: yellow and red (Figure 2B and 2C). Both cell lines obtained were observed under microscopy. The yellow line showed a round shape and yellow pigmentation compatible with the presence of betaxanthins (Figure 2E). The red cell line presented a morphology with round and elongated cells with a major presence of the former (Figure 2F). This phenomenon might be in relation with the cohesive properties of the cell wall reported to occur during plant cell division.³⁸ Red pigmentation was observed within the line cells compatible with the presence of betacyanins.

Pigment Identification in Yellow and Red Cell Lines.

The yellow and red *C. argentea* cell lines obtained were analyzed in terms of the presence of the bioactive pigments betalains. Samples from both lines were extracted and analyzed by HPLC with PDA and ESI-MS/MS detection (Table 2). The yellow line exhibited the major presence of the betaxanthins vulgaxanthin I (5), derived from L-glutamine (1.78 mg/g dry weight) and miraxanthin V (2), derived from dopamine (1.64 mg/g dry weight) (Table 2). Other betaxanthins detected were those derived from L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), named dopaxanthin (1), and L-tryptophan (6). In addition to the yellow pigments, the betacyanins amaranthin (8) and betanin (7) and the dihydroxylated betanidin (3) and decarboxy-betanidin (4) were also identified.

Table 2. Production of Betalains, Dopamine, and Betalamic Acid in Cells of the Yellow and Red Callus Lines and in Suspension Cultures of *C. argentea*

compound	R_t (min)	ESI-MS (m/z)	λ_{max} (nm)	infl ^a (mg/g dry weight)	hyp ^b (mg/g dry weight)	suspension culture					
						yellow line (mg/g dry weight)	red line (mg/g dry weight)	1 day (mg/g dry weight)	8 days (mg/g dry weight)	15 days (mg/g dry weight)	30 days (mg/g dry weight)
dopaxanthin (1)	11.27	391	472	nd ^c	nd	0.22 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.01
miraxanthin V (2)	12.54	347	460	nd	nd	1.64 ± 0.01	3.04 ± 0.02	1.84 ± 0.07	1.47 ± 0.06	1.49 ± 0.09	0.52 ± 0.02
betanidin (3)	11.76	389	542	nd	nd	0.45 ± 0.01	0.74 ± 0.03	2.05 ± 0.04	6.27 ± 0.05	2.46 ± 0.07	0.39 ± 0.04
decarboxy-betanidin (4)	13.37	345	539	nd	nd	0.71 ± 0.01	1.32 ± 0.05	2.16 ± 0.05	2.30 ± 0.06	2.21 ± 0.08	0.34 ± 0.01
vulgaxanthin I (5)	8.45	340	472	nd	nd	1.78 ± 0.01	2.65 ± 0.01	2.01 ± 0.08	2.01 ± 0.1	0.15 ± 0.04	0.09 ± 0.03
tryptophan-bx (6)	10.09	398	472	nd	nd	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
betanin (7)	10.25	551	535	nd	nd	0.62 ± 0.03	0.80 ± 0.01	0.95 ± 0.03	0.75 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.15 ± 0.01
iso-betanin	16.67	551	535	nd	nd	0.94 ± 0.01	1.25 ± 0.01	1.43 ± 0.07	0.67 ± 0.08	0.30 ± 0.07	0.49 ± 0.04
amaranthin (8)	9.48	727	535	18.68 ± 0.16	1.52 ± 0.04	1.37 ± 0.01	4.92 ± 0.02	0.62 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.2 ± 0.02
iso-amaranthin	9.81	727	535	6.20 ± 0.05	0.60 ± 0.09	0.21 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.22 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01
dopamine (9)	8.60	137	278	nd	nd	17.70 ± 0.05	19.62 ± 0.06	35.28 ± 0.12	42.08 ± 0.15	15.48 ± 0.11	0.94 ± 0.14
betalamic acid (10)	12.05	211	405	nd	nd	0.29 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.32 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.03

^aInfluorescences of the whole plant. ^bHypocotyls used as explants source. ^cnd: not detected. HPLC retention times, molecular ions as determined by ESI-MS, and PDA maximum wavelengths are shown. Pigment analyses in inflorescences of the whole plant and hypocotyls are shown for comparison.

In the red line, coloration was also due to betalains and the content of betacyanins was higher. In this case the major pigment detected was the violet amaranthin (8) (4.92 mg/g dry weight), accompanied by decarboxy-betanidin (4) (1.32 mg/g dry weight), betanin (7) (0.80 mg/g dry weight), and betanidin (3) (0.74 mg/g dry weight). Betaxanthins were also present (Table 2) with dopamine-derived betaxanthin (2) being the major yellow pigment (3.04 mg/g dry weight). The joint presence of betacyanins (violet) and betaxanthins (yellow) yields the red color described for the cell mass. Inflorescences of the starting plant material and the hypocotyls used to establish the cell lines were violet. These two samples were also analyzed as a control, and only the presence of amaranthin (8) and its isomer iso-amaranthin were found (Table 2). The number of betalains present in the cell cultures indicates that the presence of 6.79 μM 2,4-D and 6.66 μM BAP promotes the biosynthesis of an increased number of betalains compared to the starting plant material. This could be due to the effect of 2,4-D and BAP in the concentrations mentioned on the expression of the key enzymes of the biosynthetic pathway of betalains: 4,5-DOPA-extradiol dioxygenase (DODA), tyrosinase, and cytochrome P450. In this sense, the levels of DODA mRNA and the accumulation of betalains have been previously correlated with the concentration of the growth regulators in *in vitro* cultures of *S. salsa*.³⁵

The presence of betaxanthins in the cells of the yellow *C. argentea* line together with the described fluorescence of these pigments under physiological conditions³⁹ makes the cells fluorescent in the visible range of the electromagnetic spectrum. Figure 3 shows the pictures derived from the betaxanthins

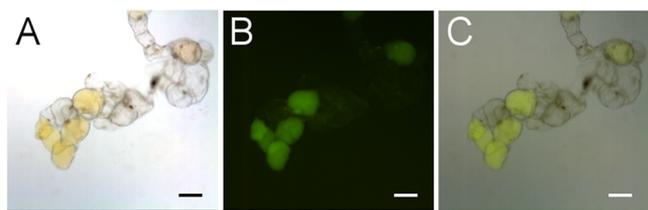


Figure 3. *C. argentea* microscopic images of cells present in the yellow line callus. (A) Brightfield technique. (B) Fluorescence. Only yellow portions of the brightfield image, containing betaxanthins, present light emission in the fluorescence image. (C) Combination of the previous two images.

autofluorescence obtained under a filter system able to irradiate the sample with blue light and to record the emitted light in the green range of the visible spectrum. As can be seen, only the yellow portions of the brightfield image, containing the yellow pigments, present light emission in the fluorescence image. Fluorescence of betaxanthins has previously been used to visualize petal cells³⁹ and to detect the presence of *Plasmodium falciparum* (malaria) in erythrocytes.⁴⁰ However, this is the first time that betalains fluorescence was demonstrated to be of utility in the visualization of plant single cells grown *in vitro*.

All pigments were identified by comparison with real standards in terms of HPLC retention times, PDA spectra, and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses. The mass values determined for the parent ions of all compounds were as expected for the corresponding protonated molecular ions $[M + H]^+$ of the betalains, thus confirming the proposed structures (Table 2). For pigments containing a quaternary ammonium substructure, the mass

obtained corresponds to the charged form, as drawn in Figure 1. In all cases a daughter ion corresponding to $m/z [M + H]^+ - 44$ was detected, accounting for loss of a carboxylic group. For betanin (7) (R_t 10.25 min), the main daughter ion was m/z 389, corresponding to the mass determined for betanidin (3), obtained through cleavage of the glucose unit at the level of the O-glucosidic bond ($m/z [M + H]^+ - 162$). Amaranthin (8) (R_t 9.48 min) yielded a molecular ion of m/z 727 that was fragmented into m/z 551, corresponding to loss of a glucuronic acid moiety $m/z [M + H]^+ - 176$ (betanin), and into m/z 389, corresponding to an additional loss of glucose $m/z [M + H]^+ - 176 - 162$ (betanidin). Betanidin (3) itself was also present in the extracts derived from both cell lines (R_t 11.76 min). Thus, all the intermediates of the biochemical route of carboxylated betacyanins from betanidin to amaranthin were present. This suggests the transformation of betanidin (3) into betanin (7) by glucosylation¹⁶ and betanin into amaranthin (8) by addition of a glucuronic acid residue. The presence of the intermediates points to the biosynthesis of amaranthin in the callus through this route instead of via cyclo-DOPA glucosylation and glucuronylation and further condensation with betanidin.⁴¹ These intermediates were not present in the starting plant material inflorescences or hypocotyls, where only the final product of the route amaranthin was detected.

The possible presence in the cell cultures of the structural unit of all betalains, betalamic acid (10), and the precursor molecule for miraxanthin V, dopamine (9), was also investigated. Betalamic acid could be detected in the yellow *C. argentea* cell line at 0.29 mg/g dry weight (Table 2), while in the red line a higher content was detected with 0.46 mg/g dry weight. The presence of betalamic acid (10) complements the presence of intermediates of the biosynthetic pathway of betalains. It is an elusive molecule derived from cyclization of the 4,5-seco-DOPA molecule obtained by intramolecular cleavage of the amino acid L-DOPA by the enzyme 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase.² Free betalamic acid has previously been found as a natural constituent in fruits of *Opuntia ficus-indica*.⁴² Dopamine (9) was also detected in the cell lines at significant quantities. Identification was corroborated by comparison with commercial standard (R_t 8.60 min) and ESI-MS. A predominant daughter ion of m/z 137 resulting from loss of the amine group was found in the standard and culture-derived compound. This metabolite was not detected in the plant inflorescences or hypocotyls, but its presence accounts for 17.70 mg/g dry weight in the yellow cell line and 19.63 mg/g dry weight in the red line. In addition to its role as the building block of betalains, betalamic acid itself is a natural pigment with strong antioxidant activity.²⁶ Dopamine acts as a neurotransmitter, and its deficit has been reported in mental illness such as depression.⁵

The presence of the dihydroxylated betacyanins betanidin (3) and decarboxy-betanidin (4) and the DOPA and dopamine-derived betaxanthins (1, 2) in the obtained cell cultures is of particular relevance due to their strong antioxidant and free radical scavenging activities.^{3,4,43} Furthermore, the tryptophan-derived betaxanthin (6) present in both cell lines has recently been identified among all traditional Chinese medicine phytochemicals in a massive *in silico* screening as a bioactive compound interacting with the age-related enzymes sirtuins.⁴⁴ Tryptophan-derived betaxanthin is a lead compound with possible application in drug development for diseases associated with aging.

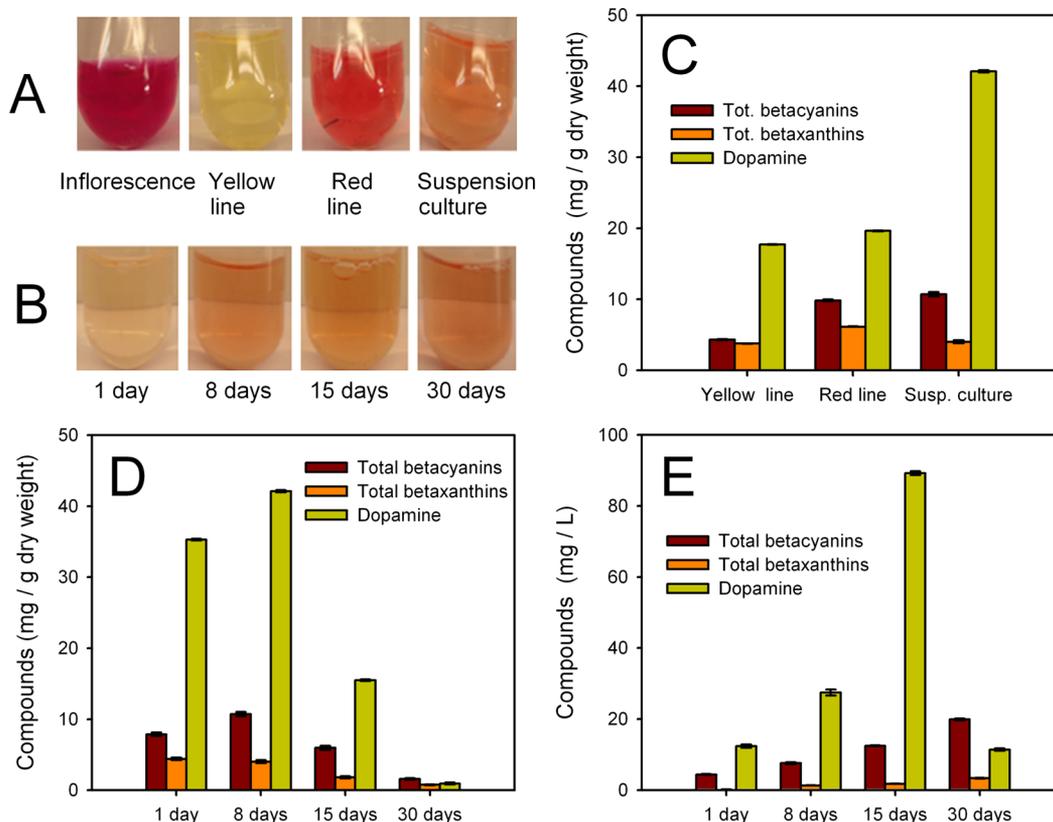


Figure 4. Production of betalains and dopamine by cell lines derived from *C. argentea* var. *plumosa*. (A) Picture showing the pigmentation of cell extracts obtained from plant inflorescences, yellow callus line, red callus line, and suspension culture 8 days after inoculation. (B) Color evolution of the liquid culture medium photographed 1, 8, 15, and 30 days after inoculation. (C) Total pigment content and dopamine presence in extracts obtained from solid and suspension cultures. (D) Time evolution for the production of betalains and dopamine in the cells of the suspension culture at the indicated times after inoculation. (E) Time evolution for the presence of betalains and dopamine in the liquid medium at the indicated times after inoculation.

Suspension Cultures of *C. argentea*. The analyses performed in the cell lines derived from *C. argentea* show that the red line produces higher levels of dopamine, betacyanins, and betaxanthins than the yellow homologue (Figure 4C). Thus, the red cell line was chosen to attempt a suspension culture of *C. argentea* that could be used to produce the identified phytochemicals. The liquid culture was successfully established in MS liquid medium supplemented with 30 g/L sucrose, 6.66 μ M BAP, 6.79 μ M 2,4-D, and 10 mM ascorbic acid. Figure 2D shows the established culture. The cell growth curve (Figure 5) indicates that a lag phase was present for 4 days, in which biomass reached 3.18 g dry weight/L. After this time, cells entered exponential growth phase. Growth was prolonged up to day 15, and in that time the accumulated biomass was 10.96 g dry weight/L. During this phase, the doubling time of the culture was 6.1 days with a calculated growth rate (μ) of 0.113/day.

During the whole culture time the pH of the suspension was monitored (results not shown) with no significant variation being recorded and a mean pH value of 4.9. This is a convenient pH value to promote the stability of the pigments betalains with special emphasis of those containing the dihydroxylated moiety.²¹ The cell shape found in suspension was elongated, showing predominantly red coloration (96%) (Figure 2G). In addition to the red-colored cells, yellow cells were detected in a much lesser extent (4%). This points to the joint presence of betaxanthins and betacyanins in the majority of cells, as detected in the red callus used to start the liquid

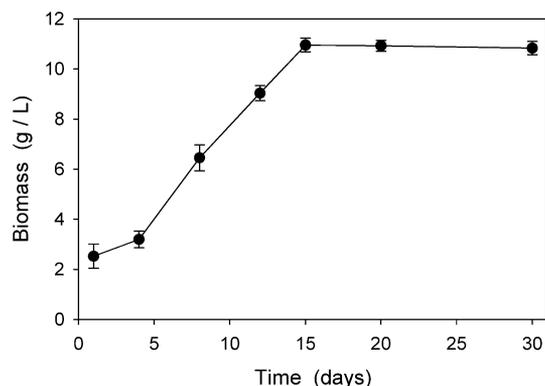


Figure 5. Growth curve for the suspension culture of *C. argentea* obtained in MS liquid medium supplemented with 30 g/L sucrose, 6.66 μ M BAP, 6.79 μ M 2,4-D, and 10 mM ascorbic acid.

culture. Cells tended to form aggregates, probably in relation to the cohesive properties of the cell wall and the hydrodynamic stress experienced in suspension culture.³⁸ Cell viability was also monitored during the process and maintained at 74% during the 30 days of culture period. Viability is well above the limit of 50% considered as positive in plant cell culture,⁴⁵ thus confirming the success of the *C. argentea* suspension culture.

Production of Betalains and Dopamine in Liquid Culture. The presence of betalains and dopamine in *C. argentea* liquid culture was analyzed by HPLC-PDA and ESI-

Table 3. Production of Betalains, Dopamine, and Betalamic Acid in the Liquid Medium of Suspension Cultures of *C. argentea*

compound	1 day (mg/L)	8 days (mg/L)	15 days (mg/L)	30 days (mg/L)
dopaxanthin (1)	nd ^a	nd	nd	nd
miraxanthin V (2)	0.03 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.50 ± 0.02	1.17 ± 0.04
betanidin (3)	0.50 ± 0.04	2.85 ± 0.11	6.75 ± 0.02	13.40 ± 0.04
decarboxy-betanidin (4)	1.14 ± 0.05	1.51 ± 0.20	2.47 ± 0.03	4.17 ± 0.09
vulgaxanthin I (5)	0.08 ± 0.03	0.88 ± 0.02	1.24 ± 0.03	2.16 ± 0.06
tryptophan-bx (6)	nd	nd	nd	nd
betanin (7)	nd	nd	nd	nd
iso-betanin	nd	nd	nd	nd
amaranthin (8)	2.70 ± 0.07	3.04 ± 0.11	2.99 ± 0.02	2.33 ± 0.08
iso-amaranthin	0.04 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.04 ± 0.03
dopamine (9)	12.34 ± 0.48	27.42 ± 0.85	89.20 ± 0.51	11.35 ± 0.35
betalamic acid (10)	0.88 ± 0.02	0.84 ± 0.01	1.23 ± 0.03	3.63 ± 0.06

^and: Not detected.

MS. Pigments were identified and quantitated both in cells and in liquid medium at different culture times. Cell extracts and media analyses were performed at days 1, 8, 15, and 30 as shown in Tables 2 and 3. Cells exhibited maximum accumulation of total betalains at day 8, corresponding to the exponential growth phase (Figure 4D). Up to 10 pigments were identified corresponding to those present in the calli with a higher content of miraxanthin V (2) (1.84 mg/g dry weight), vulgaxanthin I (5) (2.01 mg/g dry weight), and betanidin (3) (6.27 mg/g dry weight).

This pigment content explains the cell suspension coloration and suggests the possible secretion of pigments into the culture medium. Table 3 shows the results for the analyses of the medium at different culture times. The presence of betalains was detected during all of the process, increasing with incubation time (Figure 4B and 4E). Pigments identified in the culture medium were betalamic acid (10), vulgaxanthin I (5), miraxanthin V (2), amaranthin (8), and betanidin (3). The total quantity of betalains detected at the end of culture (day 30) was 23.27 mg/L, mainly accounting for the presence of the dihydroxylated betacyanin betanidin (3) (13.40 mg/L). Betanidin, which is the betalain with the strongest antioxidant and free radical scavenging activities and also involved in the anti-inflammatory potential of betalain-containing extracts,^{46,47} is here the betalain produced in a higher extent.

Cells grown in liquid culture presented a significant increase in the content of dopamine (9) in comparison to the levels detected in the cells grown in solid media. After 8 days in liquid culture the levels of dopamine in the cells were 42.08 mg/g dry weight, which is more than double the levels found in the cells grown in solid media (19.62 mg/g dry weight for the red line) (Figure 4C). Plant cells in suspension suffer hydrodynamic forces due to continuous shaking which generates a stress probably involved in the increase of the secondary metabolism.^{48,49} Dopamine was also detected to a lesser extent in the culture medium. Figure 4E shows the time evolution of dopamine content. In this case the maximum concentration was achieved after 15 days of culture with a content of 89 mg/L. Although the presence of dopamine in *C. argentea* was known for intact plants,¹² this is the first report on the production of the metabolite in cell culture. In vitro production of dopamine through a plant cell culture was previously only attempted for another plant belonging to the Caryophyllales, *Portulaca oleracea* but using *Agrobacterium rhizogenes* transformation. This achieved a maximum production of dopamine of 0.90 mg/g dry weight after 28 days of culture and chemical elicitation.³⁰

This value is far from the 42.08 mg/g dry weight obtained here in only 8 days with untransformed cells of *C. argentea*, thus significantly increasing the yield and reducing the culture time.

Cell cultures of *C. argentea* produce four dihydroxylated betalains with the highest antioxidant and free radical scavenging activities, the carboxylated dopaxanthin (1) and betanidin (3) and the decarboxylated homologues miraxanthin V (2) and decarboxy-betanidin (4). In addition, they produce tryptophan-betaxanthin (6), which has been identified among the bioactive compounds of the traditional Chinese medicine database for their interaction with the age-related enzymes sirtuins. The joint presence of these bioactive betalains together with the production of dopamine (9) shows the ability of cell cultures of *C. argentea* to become stable sources of valuable phytochemicals of potential application in the food, pharmaceutical, and cosmetic fields.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +34 868 884786. Fax: +34 868 884147. E-mail: fgandia@um.es.

Funding

This work was supported by “Ministerio de Ciencia e Innovación” (MCINN, FEDER, Spain) (Projects AGL2011-25023 and AGL2014-57431). B.G.-F. holds a fellowship from “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” and the “Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado” (CONACYT, Mexico and AUIP, Spain). F G.-H. has a contract with the “Programa Ramón y Cajal” (MCINN, FEDER, Spain).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. María Inmaculada García, Dr. María Teresa Castells, and Dr. José Rodríguez (SAI, University of Murcia) for skillful technical assistance in Image Analysis and ESI-MS experiments.

REFERENCES

- (1) Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Biological activities of plant pigments betalains. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, DOI: 10.1080/10408398.2012.740103.
- (2) Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci.* **2013**, *18*, 334–343.

- (3) Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1142–1146.
- (4) Gliszczynska-Świgło, A.; Szymusiak, H.; Malinowska, P. Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 1079–1087.
- (5) Dunlop, B. W.; Nemeroff, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **2007**, *64*, 327–337.
- (6) Fifel, K.; Cooper, H. M. Loss of dopamine disrupts circadian rhythms in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *71*, 359–369.
- (7) del Campo, N.; Chamberlain, S. R.; Sahakian, B. J.; Robbins, T. W. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* **2011**, *69*, E145–E157.
- (8) Vasu, T. S.; Cavallazzi, R.; Hirani, A.; Kaplan, G.; Leiby, B.; Marik, P. E. Norepinephrine or dopamine for septic shock: systematic review of randomized clinical trials. *J. Intensive Care Med.* **2012**, *27*, 172–178.
- (9) Piattelli, M.; Minale, L.; Nicolaus, R. A. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa* L. *Phytochemistry* **1965**, *4*, 817–823.
- (10) Kugler, F.; Stintzing, F. C.; Carle, R. Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] alef. cv. bright lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2975–2981.
- (11) Trezzini, G. F.; Zrýd, J.-P. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1897–1899.
- (12) Schliemann, W.; Cai, Y.; Degenkolb, T.; Schmidt, J.; Corke, H. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 159–165.
- (13) Piattelli, M.; Impellizzeri, G. 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrothus acinaciformis*. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 2553–2556.
- (14) Kobayashi, N.; Schmidt, J.; Wray, V.; Schliemann, W. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 429–436.
- (15) Impellizzeri, G.; Piattelli, M.; Sciuto, S. A new betaxanthin from *Glottiphyllum longum*. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2293–2294.
- (16) Hans, J.; Brandt, W.; Vogt, T. Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modeling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dortheanthus bellidifloris*. *Plant J.* **2004**, *39*, 319–333.
- (17) Amin, I.; Norazaidah, Y.; Hainida, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chem.* **2006**, *94*, 47–52.
- (18) Sang-Uk, C.; Buk-Gu, H.; Yong-Seo, P.; Dong-Kwan, K.; Shela, G. Total phenolics level, antioxidant activities and cytotoxicity of young sprouts of some traditional Korean salad plants. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2009**, *64*, 25–31.
- (19) Ibrahim, B.; Sowemimo, A.; van Rooyen, A.; Van de Venter, M. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 282–289.
- (20) Silva, L. R.; Valentão, P.; Faria, J.; Ferreres, F.; Sousa, C.; Gil-Izquierdo, A.; Pinho, B. R.; Andrade, P. B. Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chem.* **2012**, *135*, 756–763.
- (21) Gandía-Herrero, F.; Cabanes, J.; Escribano, J.; García-Carmona, F.; Jiménez-Atiéndar, M. Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4294–4302.
- (22) Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–97.
- (23) Rodríguez-Monroy, M.; Galindo, E. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in stirred tank. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *24*, 687–693.
- (24) Cai, Y.-Z.; Sun, M.; Corke, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 370–376.
- (25) Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 262–269.
- (26) Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1030–1036.
- (27) Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1078*, 83–89.
- (28) Schwartz, S. J.; von Elbe, J. H. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 540–543.
- (29) Trezzini, G. F.; Zrýd, J.-P. Characterization of some natural and semisynthetic betaxanthins. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1901–1904.
- (30) Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **2010**, *232*, 449–460.
- (31) Chapman, E. J.; Greenham K.; Castillejo, C.; Sartor, R.; Bialy, A. Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through ga-dependent and independent pathways. *PLoS One* **2012**, *7*, 10.1371/journal.pone.0036210.
- (32) Abu-Romman, S. The influence of plant growth regulators on callus induction from hypocotyls of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Adv. Environ. Biol.* **2013**, *7*, 339–343.
- (33) Ying-Hua, S.; Yu-Bo, L.; Xian-Sheng, Z. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant* **2011**, *4*, 616–625.
- (34) Taha, R. M.; Wafa, S. N. Plant regeneration and cellular behaviour studies in *Celosia cristata* grown *in vivo* and *in vitro*. *Sci. World J.* **2012**, DOI: 10.1100/2012/359413.
- (35) Zhao, S. Z.; Sun, H. Z.; Gao, Y.; Sui, N.; Wang, B. S. Growth regulator-induced betacyanin accumulation and dopa-4,5-dioxygenase (DODA) gene expression in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant* **2011**, *47*, 391–398.
- (36) Jamilah, S. Y.; Azani, S.; Hashimah, E.; Sakinah, A.; Noraini, M.; Normadiha, M. *In vitro* regeneration and acclimatization protocols of selected ornamental plants (*Agapanthus praecox*, *Justicia betonica* and *Celosia cristata*). *Sains Malays.* **2014**, *43*, 715–722.
- (37) Akita, T.; Hina, Y.; Nishi, T. Production of betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2000**, *64*, 1807–1812.
- (38) Trejo-Tapia, G.; Rodríguez-Monroy, M. Cellular aggregation in secondary metabolite production in *in vitro* plant cell cultures. *Interciencia* **2007**, *32*, 669–674.
- (39) Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.; Escribano, J. Floral fluorescence effect. *Nature* **2005**, *437*, 334–334.
- (40) Gonçalves, L. C. P.; Tonelli, R. R.; Bagnaresi, P.; Mortara, R. A.; Ferreira, A. G.; Bastos, E. L. A nature-inspired betalainic probe for live-cell imaging of *Plasmodium*-infected erythrocytes. *PLoS One* **2013**, *8*, e53874.
- (41) Sasaki, N.; Abe, Y.; Wada, K.; Koda, T.; Goda, Y.; Adachi, T.; Ozeki, Y. Amaranthin in feather cockscombs is synthesized via glucuronylation at the cyclo-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway. *J. Plant Res.* **2005**, *118*, 439–442.
- (42) Stintzing, F. C.; Schieber, A.; Carle, R. Amino acid composition and betaxanthin formation in fruits from *Opuntia ficus-indica*. *Planta Med.* **1999**, *65*, 632–635.
- (43) Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2288–2294.
- (44) Chen, K.-C.; Jian, Y.-R.; Sun, M.-F.; Chang, T.-T.; Lee, C.-C.; Chen, C. Y.-C. Investigation of silent information regulator 1 (Sirt1)

agonists from traditional Chinese medicine. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2013**, *31*, 1207–1218.

(45) Qui, J. A.; Castro-Concha, L. A.; García-Sosa, K.; Peña-Rodríguez, L. M.; Miranda-Ham, M. L. Differential effects of phytotoxic metabolites from *Alternaria tagetica* on *Tagetes erecta* cell cultures. *J. Gen. Plant Pathol.* **2009**, *75*, 331–339.

(46) Vidal, P. J.; López-Nicolás, J. M.; Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem.* **2014**, *154*, 246–254.

(47) Martinez, R. M.; Longhi-Balbinot, D. T.; Zarpelon, A. C.; Staurengo-Ferrari, L.; Baracat, M. M.; Georgetti, S. R.; Sassonia, R. C.; Verri, W. A., Jr.; Casagrande, R. Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of *Beta vulgaris*: effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. *Arch. Pharmacol. Res.* **2014**, DOI: 10.1007/s12272-014-0473-7.

(48) Hua, J.; Erickson, E.; Yiin, T. Y.; Glasgow, L. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1993**, *13*, 305–328.

(49) Joshi, J. B.; Elias, C. B.; Patole, M. S. Role of hydrodynamic shear in cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chem. Eng. J.* **1996**, *62*, 121–141.

(50) Ahmadi-Moghadam, Y.; Piri, Kh.; Bahramnejad, B.; Ghiasvand, T. Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (purslane) using *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Agric. Sci. Technol.* **2014**, *16*, 409–420.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00156

Matrícula: 2113803171

PRODUCCION DE BETALAINAS EN CULTIVOS *in vitro* DE AMARANTHACEAS

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 17 del mes de julio del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO
DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA
DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: BERENICE GUADARRAMA FLORES

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



BERENICE GUADARRAMA FLORES
ALUMNA

Aprobar

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JOSE RAMÓN VERDE CALVO

VOCAL

DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

VOCAL

Ma. del Pilar Nicasio T.
DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 16/07/2015
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA de la alumna BERENICE GUADARRAMA FLORES, matrícula 2113803171, quien cumplió con los 256 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha diecisiete de julio del 2015 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

PRODUCCION DE BETALAINAS EN CULTIVOS *in vitro* DE AMARANTHACEAS

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 391 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO

Secretaria

DRA. ANGÉLICA ROMAN GUERRERO

Vocal

DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

Vocal

DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

Otorga el presente reconocimiento a

BERENICE GUADARRAMA FLORES

En virtud de haber aprobado el examen de grado de

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

*De la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
México, D.F., a 17 de julio de 2015.*

Dr. Francisco Cruz Sosa
Dr. Mario Rodríguez Monroy
Co-Directores de Tesis

Dr. José Ramón Verde Calvo
Presidente del Jurado

Dr. Héctor B. Escalona Buendía
Coordinador del Posgrado