



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

## FACULTAD DE QUÍMICA

“Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Vachellia farnesiana* para la obtención de metabolitos secundarios con potencial actividad citotóxica”

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS Y  
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

Presenta

Q.F.B. José Alejandro Domínguez Colín

Director: Dr. Juan Orozco Villafuerte (Facultad de Química, UAEMéx.)

Co-tutor: Dra. Leticia Buendía González (Facultad de Ciencias, UAEMéx.)

Asesor externo: Dr. Francisco Cruz Sosa (Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa)



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO; JUNIO 2024



*Vachellia farnesiana* Lena Lewis, Familiar Indian Flowers, 1878.

# I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL	1
II. ÍNDICE DE TABLAS	4
III. ÍNDICE DE FIGURAS	5
IV. RESUMEN	8
V. ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	15
2.1 CÁNCER	15
2.1.1 ESTADÍSTICAS NACIONALES E INTERNACIONALES	16
2.1.2 TRATAMIENTOS	18
2.2 BIOTECNOLOGÍA	18
2.2.1 BIOTECNOLOGÍA VEGETAL	19
2.3 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	20
2.3.1 MEDIO DE CULTIVO PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	21
2.4 METABOLITOS SECUNDARIOS	23
2.4.1 METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA	26
2.4.2 TÉCNICAS PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES	28
2.4.3 METABOLITOS SECUNDARIOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA	30
2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO HERRAMIENTA PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	33
2.6 CULTIVO <i>in vitro</i> PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA	35
2.7 GENERO <i>Acacia</i>	36
2.8 <i>Vachellia farnesiana</i>	37
2.8.1 CULTIVO <i>in vitro</i> DEL GENERO <i>Acacia</i>	41
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
4. HIPÓTESIS	44
5. OBJETIVOS	44
5.1 OBJETIVO GENERAL	44
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44

6.	METODOLOGÍA	45
6.1	MATERIAL VEGETAL	45
6.2	ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASÉPTICOS	46
6.2.1	Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Vachellia farnesiana</i>	46
6.2.2	Establecimiento de cultivos de callo	46
6.3	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	47
6.4	DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES, TERPENOS Y FENOLES	48
6.4.1	Análisis cualitativo de metabolitos secundarios	48
6.4.2	Análisis cuantitativo de alcaloides totales	48
6.4.3	Análisis cuantitativo de terpenos totales	49
6.4.4	Análisis cuantitativo de fenoles totales	49
6.5	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	49
6.5.1	Mantenimiento y proliferación de la línea celular HeLa	49
6.5.2	Preparación de las multiplacas de 96 pozos	50
6.5.3	Preparación y adición de los extractos al cultivo celular	51
6.5.4	Ensayo con MTT	51
6.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS	52
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MATERIAL VEGETAL	52
7.2	GERMINACIÓN	53
7.3	INDUCCIÓN DE CALLO	54
7.3.1	Variedad Guanajuato	54
7.3.2	Variedad Querétaro	55
7.4	DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES	57
7.5	DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	59
7.6	DETERMINACIÓN DE TRITERPENOS	62
7.7	BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD	64
8.	CONCLUSIONES	67
9.	PERSPECTIVAS	68
10.	REFERENCIAS	69
11.	ANEXOS	85
	Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog MS (1962).	85
	Anexo 2. Formulación y preparación de solución stock de macronutrientes MS x 10 <sup>87</sup>	

Anexo 3. Formulación y preparación de solución stock de micronutrientes MS x 100	88
Anexo 4. formulación y preparación de solución stock de hierro MS x 200	89
Anexo 5. Formulación y preparación de solución stock de vitaminas y myo- inositol MS x 200	90
Anexo 6. Formulación y preparación del medio de cultivo MS base sin RCV (en agua destilada, para un litro)	91
Anexo 7. Formulación y preparación del Reactivo de Dragendorff:	92
Anexo 8. Procedimiento para el ensayo de Liebermann- Burchard	92
Anexo 9. Formulación y preparación de solución del buffer de fosfatos (pH 4.7) y la solución de Verde de Bromocresol (BCG)	93
Anexo 10. Curva de calibración con atropina para la cuantificación de alcaloides totales	94
Anexo 11. Curva de calibración con ácido ursólico para la determinación de triterpenos	96
Anexo 12. Curva de calibración con ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales	98
Anexo 13. Presentación de cartel en el XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ	100

## II. ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Cultivo de tejidos vegetales en plantas del género Acacia. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 2. Combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) para la inducción de callo; BAP, 6-bencilaminopurina; 2,4-D, 2,4-diclorofenoxiacético y KIN, Cinetina. ....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 3. Concentración inhibitoria media de los extractos clorofórmicos de hoja y callo de Vachellia farnesiana de dos sitios de distribución, bajo dos tiempos de exposición. ....</i>	<i>65</i>

### III. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Nuevos casos de cáncer reportados en 2020. Tomado de GLOBOCAN, 2020 IARC (23) .....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2. Principales causas de muerte en 2020. Tomado de INEGI, 2020..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3. Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro. (INEGI, 2020).  
.....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4. Metabolismo secundario del carbono en plantas Tomado de Avalos García A, et al., 2009 (52). .....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5. Estructura molecular de a) Vinblastina b) Vincristina. Tomado de Martino E, et al., 2018 (67). .....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6. Estructura molecular de Paclitaxel. Tomado de Alqahtani FY, et al., 2019 (72).  
.....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7. A) acetato de geranilo, B) geraniol, modificado o de Qi, et al., 2018 (15)**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 8. Diosmetina modificado de Mingning, et al., 2020 (17)**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 9. Kampferol modificado de Rho, et al., 2011 (86) **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10. Ácido betulínico modificado de Mukherjee, et al., 2006 (90)**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11. Artemisina modificado de Kong & Tan, 2015 (94)**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 12. A) Hojas y B) espinas de *V. farnesiana*. (fuente propia).**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 13. A) Flores de *Vachellia farnesiana*. Foto de Wynn Anderson 2017. B) Vainas y semillas de *V. farnesiana* (Fuente propia). .....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 14. Mapa de distribución potencial de la especie *Acacia farnesiana*, (L.) Willd. (CONABIO, 2005). .....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 15. Semillas de *V. farnesiana*.....**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 16. Diagrama de carga de multiplaca de 86 pozos. Blanco (B), Control negativo (C-), Control positivo (C+). T<sub>1</sub>: 1 µg/mL, T<sub>2</sub>: 5 µg/mL, T<sub>3</sub>: 10 µg/mL, y T<sub>4</sub>: 50 µg/mL. Extractos: Guanajuato Callo, Querétaro Callo, Guanajuato Silvestre, Querétaro Silvestre. ....**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17. Comprobante de identificación y registro del material vegetal proporcionado por el Herbario Medicinal del IMSS. .... 53

Figura 18. Plántulas de *V. farnesiana* obtenidas in vitro A) 5 días de cultivo y B) 15 días de cultivo. .... 54

Figura 19. Porcentaje de inducción de callo en diferentes explantes de plántulas de *Vachellia farnesiana* derivadas de semillas provenientes de Guanajuato; tratadas con diferentes combinaciones de RCV. Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. Barras con distinta letra muestras diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). .... 55

Figura 20. Cultivos de callos a partir de explantes de (a) Raíz, (b) Cotiledón, (c) Hipocótilo y (d) Hoja de *V. farnesiana* del sitio de distribución Guanajuato. .... 55

Figura 21. Porcentaje de inducción de callo en diferentes explantes de plántulas de *Vachellia farnesiana* derivadas de semillas provenientes de Querétaro; tratadas con diferentes combinaciones de RCV. Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. Barras con distinta letra muestras diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). .... 56

Figura 22. Cultivos de callos a partir de explantes de (a) Raíz, (b) Cotiledón, (c) Hipocótilo y (d) Hoja de *V. farnesiana* del sitio de distribución Querétaro. .... 56

Figura 23. Contenido de alcaloides totales en extractos clorofórmicos de hojas y callos de *V. farnesiana* de dos zonas de distribución. Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. Barras con distinta letra muestras diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). .... 59

Figura 24. Contenido de fenoles totales en extractos clorofórmicos de hojas y callos de *V. farnesiana* de dos zonas de distribución. Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. Barras con distinta letra muestras diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). .... 60



*Figura 25. Contenido de triterpenos totales en extractos clorofórmicos de hojas y callos de V. farnesiana de dos zonas de distribución. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Barras con distinta letra muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ )..... 63*

*Figura 26. Figura 5. Curvas dosis-respuesta de la viabilidad de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de los extractos, derivadas de dos sitios de distribución y dos tipos de tejido. A) G-hoja silvestre, B) G- cultivos de callo, C) Q-hoja silvestre, D) Q- cultivos de callo. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS..... 66*

## IV. RESUMEN

El huizache (*Vachellia farnesiana*) es una especie originaria de América Tropical, la cual es ampliamente utilizada en la medicina tradicional como antiespasmódico, astringente, estimulante y demulcente, así como para tratar diarreas, febrículas y el reumatismo, también se ha documentado que emplastes hechos con la pulpa de sus vainas, disminuyen la severidad de algunos tumores. Así mismo, en diversos tejidos de esta especie se han identificado metabolitos secundarios que han exhibido actividad citotóxica contra distintas líneas celulares de cáncer. Sin embargo, el contenido de los compuestos secundarios en los tejidos vegetales es muy bajo. Una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos es el cultivo de tejidos vegetales, permitiendo una producción controlada y disminuyendo el impacto en las plantas de vida silvestre. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue establecer cultivos de callo de *V. farnesiana* de dos sitios de distribución para la obtención de metabolitos secundarios con potencial actividad citotóxica. Para ello, plántulas germinadas *in vitro* con escarificación química fueron fuente de explantes (cotiledón, hipocótilo, hoja y raíz), los cuales fueron sembrados en medio de cultivo Murashige & Skoog, suplementado con diferentes tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP) y cinetina (KIN). Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz a  $25 \pm 2$  °C, durante 30 días. Se obtuvo una germinación mayor al 85% mediante la escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Respecto a la inducción de callo, todos los reguladores y sus combinaciones generaron callo en los cuatro explantes evaluados (100% de inducción), sin embargo, solo las hojas inoculadas en el medio suplementado

con BAP (2.32  $\mu$ M) y 2,4-D (13.57  $\mu$ M) indujeron la formación de callo abundante y friable, el cual cubrió por completo la superficie del explante. Además, se determinó la presencia y el contenido de alcaloides, triterpenos y fenoles totales en extractos clorofórmicos de hojas de la planta madre y en la biomasa obtenida mediante cultivo *in vitro*. El contenido de alcaloides y fenoles totales en las hojas de la planta madre (258.8  $\pm$  18 mg EA/g ES) fue significativamente mayor que en los cultivos de callo (187.32  $\pm$  15 mg EA/g ES). Mientras que el contenido de triterpenos totales fue significativamente mayor en la biomasa generada *in vitro* (381.46  $\pm$  22 mg EAU/mL), con respecto a lo determinado en la planta madre (208.26  $\pm$  11 mg EAUmL). Finalmente, se determinó la actividad citotóxica contra líneas celulares HeLa, observándose que los extractos de las cuatro fuentes de material vegetal mostraron citotoxicidad, siendo significativamente mayor la reducción en la viabilidad celular ante los extractos obtenidos a partir de hojas de ejemplares adultos para ambos sitios de distribución, a las 72 horas de exposición (28.02  $\pm$  1.71%), lo que permitió clasificar a los extractos como citotóxicos (IC<sub>50</sub>= 28.83  $\pm$  1.49). Mientras, que la IC<sub>50</sub> determinada para los extractos obtenidos a partir de los cultivos *in vitro* (43.9  $\pm$  1.82) fue mayor al criterio propuesto por el American National Cancer Institute.

## V. ABSTRACT

Huizache (*Vachellia farnesiana*) is a species native to Tropical America, which is widely used in traditional medicine as an antispasmodic, astringent, stimulant, and demulcent, as well as for treating diarrhea, febrile illnesses, and rheumatism. It has also been documented that poultices made from the pulp of its pods decrease the severity of some tumors. Likewise, various secondary metabolites have been identified in tissues of this species that have exhibited cytotoxic activity against different cancer cell lines. However, the content of secondary compounds in plant tissues is very low. An alternative for obtaining bioactive compounds is the plant tissue culture, allowing controlled production and reducing the impact on wild plant populations. Therefore, the objective of this work was to establish callus cultures of *V. farnesiana* from two distribution sites for the obtainment of secondary metabolites with potential cytotoxic activity. For this purpose, in vitro germinated seedlings with chemical scarification were the source of explants (cotyledon, hypocotyl, leaf, and root), which were planted in Murashige & Skoog culture medium, supplemented with different types and concentrations of plant growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzylaminopurine (BAP), and kinetin (KIN). The cultures were incubated under a photoperiod of 16 h light at  $25 \pm 2$  °C for 30 days. Germination higher than 85% was obtained through scarification with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Regarding callus induction, all regulators and their combinations generated callus in the

four evaluated explants (100% induction); however, only the leaves inoculated in the medium supplemented with BAP (2.32  $\mu$ M) and 2,4-D (13.57  $\mu$ M) induced the formation of abundant and friable callus, which completely covered the surface of the explant. In addition, the alkaloids, triterpenes and phenolics content in chloroform extracts of leaves from the mother plant and in the biomass obtained through *in vitro* culture were determined. The concentration of alkaloids and phenolics content in the leaves of the mother plant (258.8  $\pm$  18 mg GAE/g DW) was significantly higher than in the callus cultures (187.32  $\pm$  15 mg GAE/g DW). Meanwhile, the triterpenes content was significantly higher in the *in vitro* generated biomass (381.46  $\pm$  22 mg AUE/mL) compared to that determined in the mother plant (208.26  $\pm$  11 mg AUE/mL). Finally, cytotoxic activity against HeLa cell lines was determined, with extracts from all four sources of plant material showing cytotoxicity, with a significantly greater reduction in cell viability observed with extracts obtained from leaves of adult specimens from both distribution sites at 72 hours of exposure (28.02  $\pm$  1.71%), classifying the extracts as cytotoxic (IC<sub>50</sub>= 28.83  $\pm$  1.49). Meanwhile, the IC<sub>50</sub> determined for extracts obtained from *in vitro* cultures (43.9  $\pm$  1.82) was higher than the criterion proposed by the American National Cancer Institute.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es y seguirá siendo una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial, se suele utilizar la palabra cáncer como un término genérico para relacionar a un amplio grupo de enfermedades que afectan a diferentes partes del organismo, es común referirse a esta enfermedad como “tumor o neoplasia maligna”, siendo la multiplicación incontrolada de células anormales que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Las células cancerosas suelen invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo (1). Tan solo en el año 2020 se reportaron 19.3 millones de casos nuevos y aproximadamente 9.9 millones de defunciones en el mundo (2). Las estrategias de tratamiento contra esta enfermedad incluyen quimioterapia, cirugía, radioterapia y terapia hormonal, la elección de alguna o la combinación de estas estrategias depende del órgano afectado, el tipo de cáncer y una serie de otros factores (3). En la actualidad se sigue trabajando para el desarrollo de medicamentos que sean más efectivos y de fácil obtención. Por otro lado, las plantas han demostrado ser una fuente natural de compuestos bioactivos, en particular de metabolitos secundarios, de hecho, estos productos naturales constituyen una proporción considerable de los fármacos antineoplásicos disponibles comercialmente (4). Sin embargo, por las bajas concentraciones en las que se encuentran estos compuestos en la planta y posibles dificultades en su cultivo, la obtención de metabolitos mediante cultivo tradicional puede no resultar económicamente viable, esto ha provocado la necesidad de encontrar estrategias para mejorar su producción sin atentar contra la biodiversidad de estas especies. En este sentido, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una alternativa para la obtención de metabolitos

secundarios de interés industrial y farmacológico de una forma constante y en cualquier época del año (5). Esta alternativa biotecnológica se basa en la teoría celular, que establece que todos los organismos vivos están constituidos por células, las unidades básicas de estructura y reproducción, y también demuestra el concepto de totipotencia, que se define como el potencial genético de una célula para generar un organismo multicelular completo a partir de cualquier parte de una planta (células, tejidos u órganos) en medios artificiales, en condiciones asépticas y en ambientes controlados (6). Existen numerosas aplicaciones del CTV entre las cuales se encuentran la conservación de germoplasma, la mejora de cultivos de interés agronómico, la producción de nuevas variedades de plantas resistentes a enfermedades, la fabricación de semillas artificiales y la producción de metabolitos secundarios (7). La producción de metabolitos secundarios *in vitro* es un procedimiento en dos etapas, una primera fase que estimule el crecimiento de la biomasa, y una segunda que favorezca la biosíntesis del metabolito deseado (8). Para la producción de metabolitos secundarios se han empleado estructuras organizadas como brotes, raíces, callos, suspensiones celulares, etc. (9). Para la inducción de callos, se usa comúnmente una gran variedad de auxinas en diferentes concentraciones o la combinación de auxinas y citocininas (10). La producción de compuestos químicos mediada por el cultivo *in vitro* ofrece una excelente oportunidad para la obtención de metabolitos secundarios en condiciones controladas independientes de factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, luz ultravioleta y temperaturas extremas), así como el posible incremento considerable en el rendimiento de metabolitos específicos (11).

*Vachellia farnesiana* también conocido como "huizache" o "acacia dulce", es una especie vegetal conocida por sus largas espinas y fragantes flores amarillas, es una especie utilizada frecuentemente como fuente de ingredientes para la elaboración de perfumes, y ampliamente usada en la medicina tradicional; los extractos de las flores se utilizan en remedios para dolores de cabeza y en el tratamiento de malestares estomacales, su fruto se usa para tratar la disentería e inflamaciones en la piel (12). Las ramas leñosas son utilizadas en la India como cepillos de dientes, las raíces gomosas se mastican para el dolor de garganta. Se ha utilizado como antiespasmódico, afrodisíaco, astringente, estimulante y demulcentes, así como para tratar diarreas, febrículas y el reumatismo,

también se ha reportado que la raíz, utilizada en baños calientes, ayuda al cáncer de estómago, además se ha documentado que emplastes hechos de la pulpa, disminuyen la severidad de algunos tumores (13). Además de sus usos en la medicina tradicional, se ha demostrado la actividad citotóxica del farnesol presente en las flores y el geraniol presente tanto en hojas como en flores, contra células HeLa y COLO-205, respectivamente (14,15). Mientras que el ácido betulínico presente en las raíces, se ha evaluado en tres líneas celulares de cáncer (Hep-G2, A549, Ca9-22) (16). Así mismo, Qiu y colaboradores en el 2020 (17) reportan que la diosmetina, un flavonoide presente en las hojas de *V. farnesiana* inhibió la viabilidad celular e indujo citotoxicidad y apoptosis en células ACHN.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CÁNCER

El cáncer es un término genérico para relacionar a un amplio grupo de enfermedades que afectan a diferentes partes del organismo, es común referirse a esta enfermedad como “tumor o neoplasia maligna”. Una característica que lo define es la multiplicación incontrolada de células anormales, y puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo (1). El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis, la comprensión de este proceso se logró principalmente por el desarrollo de técnicas de estudio genético. Mediante estas, se estableció que la transformación progresiva de células normales a derivados altamente malignos se originaba en alteraciones en el material genético, estas alteraciones se denominan mutaciones (18). Los tejidos normales del organismo están compuestos por distintos tipos de células, los tumores en cambio están constituidos por solo un tipo de células que se multiplican incontroladamente, sin embargo, éstas interactúan con un conjunto de células que colaboran al crecimiento tumoral, dando el soporte funcional y nutricional, estableciendo lo que se ha denominado el microambiente tumoral. Dentro de estas, se encuentran fibroblastos anormales, células endoteliales y células del sistema inmune innato y adaptativo (19). Las células del sistema inmune son las principales responsables de la inmunovigilancia tumoral y eliminación de los clones tumorales, sin embargo, el sistema inmune también puede favorecer la aparición de nuevos tumores ya que puede producir un estado de inflamación crónico mediado principalmente por macrófagos y mastocitos que infiltran el tumor y que producen factores que promueve el crecimiento tumoral en todas sus etapas (20). Por otro lado, la

inflamación también promueve la iniciación tumoral al generar un estrés genotóxico, que favorece nuevas mutaciones, participa en la promoción al inducir la proliferación y la progresión tumoral al incrementar la producción de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) alrededor del tumor lo que a su vez favorece la migración de células neoplásicas a otras partes de cuerpo, generando metástasis (21).

El conocimiento generado en las últimas décadas sobre la fisiopatología del cáncer ha abierto un abanico de posibilidades para mejorar el manejo de esta patología. Por una parte, la identificación de moléculas que son expresadas sólo por células tumorales ha permitido la introducción de nuevos biomarcadores específicos para mejorar el diagnóstico tumoral. Mientras que la identificación de potenciales blancos terapéuticos ha motivado el incremento explosivo de la investigación farmacológica de la última década. (22).

### **2.1.1 ESTADÍSTICAS NACIONALES E INTERNACIONALES**

De acuerdo con datos de la OMS, en el año 2020 se reportaron 19 millones de nuevos casos de cáncer, por otro lado en ese mismo año esta enfermedad causo casi 10 millones de defunciones en el mundo (Fig. 1), siendo uno de los mayores retos en salud pública dado que los tumores malignos se han posicionado como primeras causas de mortalidad desde hace varias décadas (23).

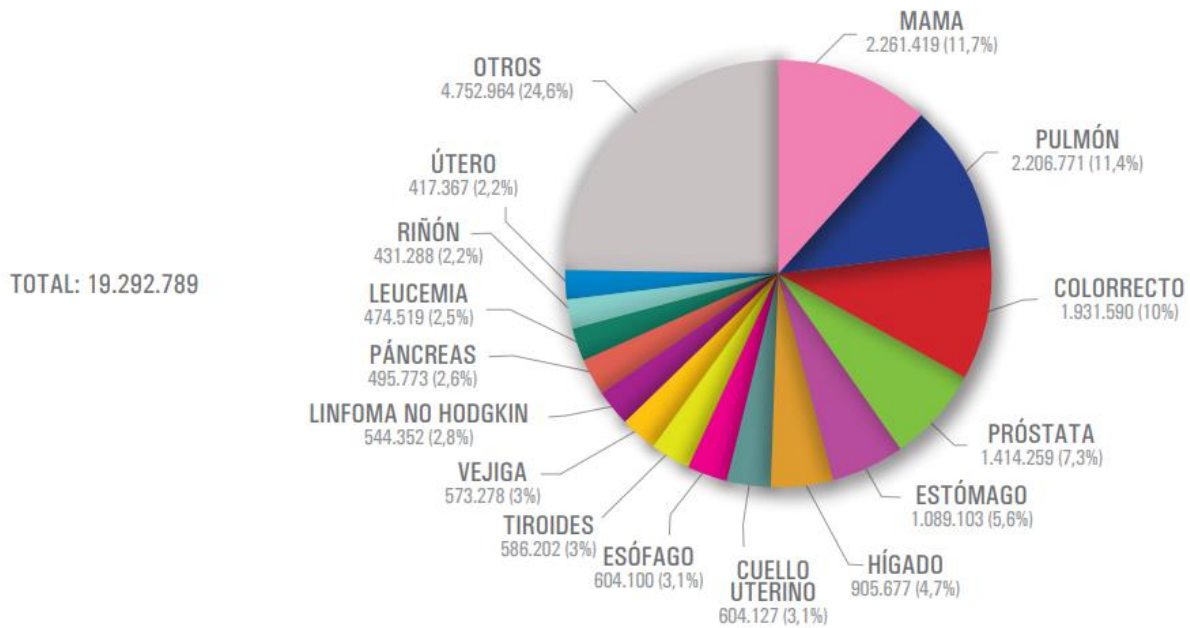


Figura 1. Nuevos casos de cáncer reportados en 2020. Tomado de GLOBOCAN, 2020 IARC (23)

En México, la magnitud de los efectos del cáncer en la salud pública no es muy diferente al panorama mundial, según datos la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, en el año 2021 el cáncer se posesiono como la cuarta causa de muerte, después de la pandemia de COVID-19, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Fig. 2.)

Rango	Total	Hombre	Mujer
1	Enfermedades del corazón 218 704 En 2019 fueron 156 041	COVID-19 128 793	Enfermedades del corazón 97 133 En 2019 fueron 72 768
2	COVID-19 200 256	Enfermedades del corazón 121 556 En 2019 fueron 83 258	Diabetes mellitus 72 094 En 2019 fueron 52 643
3	Diabetes mellitus 151 019 En 2019 fueron 104 354	Diabetes mellitus 78 922 En 2019 fueron 51 711	COVID-19 71 458
4	Tumores malignos 90 603 En 2019 fueron 88 680	Tumores malignos 44 476 En 2019 fueron 43 296	Tumores malignos 46 125 En 2019 fueron 45 384

Figura 2. Principales causas de muerte en 2020. Tomado de INEGI, 2020

En este mismo contexto, los cálculos de esta misma agencia nacional muestran que en 2020 se registraron 1,086,743 defunciones en México, de las cuales 8% fueron por tumores malignos (90,603 casos). La tasa de defunciones por esta causa aumentó durante la última década, al pasar de 6.18 defunciones por cada 10 mil personas en 2010

a 7.17 por cada 10 mil personas en 2020 (Fig. 3), siendo los tumores que ocasionan cáncer de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón los más recurrentes en la población en ambos sexos. Para los hombres, los cánceres más mortales son de próstata, de pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico, en ese orden; mientras que para las mujeres son el cáncer de seno, cervicouterino, de hígado, colorrectal y de ovario (24).

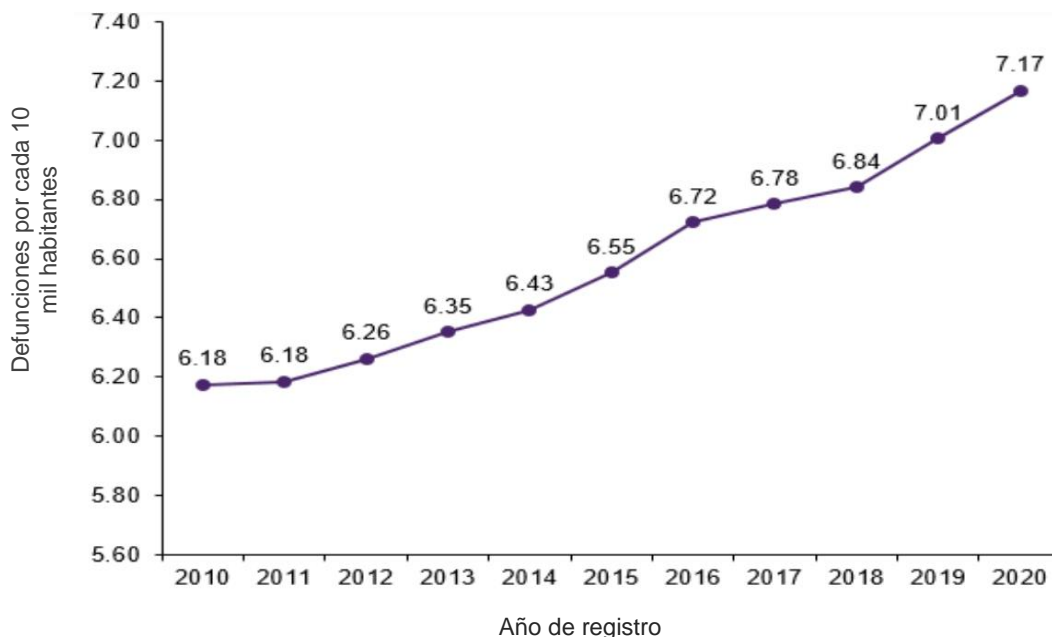


Figura 3. Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro. (INEGI, 2020).

### 2.1.2 TRATAMIENTOS

Las estrategias de tratamiento contra las neoplasias incluyen quimioterapia, cirugía, terapia hormonal y radioterapia, la elección alguna o la combinación de estas estrategias depende del órgano afectado, el tipo de cáncer y una serie de otros factores (3).

Los agentes quimioterapéuticos utilizados en la terapia del cáncer tienen un origen amplio y actúan de diversas formas. Las principales clases de agentes quimioterapéuticos y sus mecanismos se describen a continuación:

- **Fármacos alquilantes polifuncionales:** Inducen la alquilación del ADN en una hebra o en ambas, principalmente en la posición N7 de la guanina (25).
- **Antimetabolitos:** Interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos o la síntesis de nucleótidos. Los antagonistas de metotrexato, purina y pirimidina, etc. son antimetabolitos utilizados en el tratamiento del cáncer (26).

- **Antibióticos:** Se derivan principalmente de *Streptomyces* spp. y actúan principalmente bloqueando la síntesis de ADN y ARN y por la escisión de las cadenas de ADN al afectar a la topoisomerasa II (27).
- **Agentes hormonales:** Cuando el tumor es sensible a hormonas, se pueden usar inhibidores hormonales para la terapia. Algunos de ellos se unen directamente a los receptores hormonales, mientras que otros inhiben la producción directamente en la glándula que secreta dicha hormona (28).
- **Metabolitos secundarios derivados de plantas:** Los fármacos quimioterapéuticos derivados de plantas poseen diversos mecanismos de acción, de entre los cuales destacan los alcaloides tipo vinka y los taxanos, estos compuestos inducen una alteración de los microtúbulos que conduce a la detención mitótica en la metafase. Así mismo, las podofilotoxinas y camptotecinas interfieren con la actividad de las topoisomerasas ocasionando daños en el ADN de las células cancerosas (29).

## 2.2 BIOTECNOLOGÍA

El término biotecnología fue acuñado por Karl Ereky en 1919 para describir la interacción entre biología y tecnología, sin embargo, la biotecnología no solamente engloba estas dos ciencias, sino también un esfuerzo multidisciplinario de la humanidad desde hace al menos 5,000 años (30). Por otro lado, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) define a la biotecnología como “la aplicación de la ciencia y la tecnología a organismos vivos, así como a las piezas, productos y modelos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción de bienes, servicios y conocimiento (31).

Los inicios de la biotecnología se encuentran en las sociedades primitivas con la elaboración de pan, queso, vino y la cerveza, también en prácticas tan antiguas como la apicultura y la ganadería. Actualmente, la biotecnología engloba la manipulación genética y la biología molecular aplicada a la obtención de bienes y servicios. Por tanto, la biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que abarca desde la biología clásica, hasta la bioingeniería, pasando por la ingeniería genética, la microbiología, la bioquímica, la biología celular y molecular, la inmunología, entre otras (32). Así, podemos describir a la Biotecnología como el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos o parte de

estos, para obtener, modificar y mejorar especies de plantas y animales o desarrollar microorganismos para determinados usos, es en términos simples, la tecnología que aplica el potencial de los seres vivos y su posibilidad de modificación selectiva e intencionada para la obtención de productos, bienes y servicios. La biotecnología a su vez se puede dividir en varias ramas (33), las cuales se enfocan cada una en un área del conocimiento o disciplinas.

### **2.2.1 BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

Las plantas han sido el primero y uno de los factores más importantes para la civilización y el desarrollo cultural de la humanidad, cuando iniciaron el cultivo de aquellas que le servían de alimento, o la búsqueda de otras valiosas, que le indujeron a migrar, contribuyeron decisivamente al conocimiento de la configuración de la Tierra. Mientras que la selección, mejoramiento genético y desarrollo de plantas, se registra desde tiempos prehistóricos pues las tribus primitivas seleccionaban cuidadosamente plantas, semillas o esquejes, con el propósito de usarlas como fuente de alimento, remedios herbolarios e incluso fibras para la elaboración de herramientas y prendas de vestir (34). Por otro lado, las plantas han sido también, sustancias “maestras” para la humanidad, al revelarles caminos de síntesis de numerosos compuestos, que después ha imitado en el laboratorio para la producción de nuevos fármacos (35).

La biotecnología vegetal se puede definir como el conjunto de técnicas utilizadas para mejorar ciertas características de las plantas de acuerdo con las necesidades de producción agrícola de tal forma que con ayuda de esta disciplina se pueden obtener nuevos productos y modificar las características de otros, con el objetivo de aumentar su productividad, volumen y resistencia a condiciones adversas como las generadas por bacterias, virus, hongos, sequía, salinidad, frío y calor (36). Además, esta tecnología puede solucionar algunas problemáticas sociales que pueden ser abordadas aprovechando las cualidades de las plantas, contribuyendo a su vez con diversas áreas del conocimiento como la bioquímica, agronomía, biología celular y genética.

## **2.3 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un término amplio, que en general se refiere al cultivo de cualquier parte de una planta (células, tejidos u órganos) en medios artificiales, en condiciones asépticas y en ambientes controlados. Este conjunto de técnicas se basa en la teoría celular, que establece que todos los organismos vivos están constituidos por células, las unidades básicas de estructura y reproducción, y también demuestra el concepto de totipotencia, que se define como el potencial genético de una célula para generar un organismo multicelular completo (6). Existen numerosas aplicaciones del CTV dentro de las cuales se encuentran la producción de nuevas variedades libres de enfermedades, mejoras de cultivares de interés agronómico mediante estudios de biología molecular o la modificación genética de plantas, conservación de germoplasma, fabricación de semillas artificiales, síntesis de proteínas recombinantes, producción de metabolitos secundarios utilizados como potenciales fármacos o sustancias aditivas en la industria de alimentos, sin embargo, también se han utilizado cultivos *in vitro* de tejidos vegetales para la obtención de vacunas o anticuerpos utilizando la maquinaria de la célula vegetal (37).

### **2.3.1 MEDIO DE CULTIVO PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

Los medios de cultivo de tejidos vegetales permiten el crecimiento de plantas enteras, órganos, tejidos o células en condiciones asépticas y controladas en el laboratorio. El medio de cultivo de tejidos suministra todos los nutrientes, energía y agua necesarios para el crecimiento de plantas o explantes a través del medio basal. Además, las condiciones de incubación controladas brindan configuraciones optimizadas de luz y temperatura para promover el crecimiento. El desarrollo de las plantas se puede manipular luego mediante la adición de reguladores del crecimiento de las plantas (ya sean fitohormonas naturales o versiones sintéticas) en etapas particulares de crecimiento o maduración (38). Los medios nutritivos para el CTV son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar

empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (39).

El éxito del CTV radica en la naturaleza del medio de cultivo utilizado. Para un crecimiento saludable y vigoroso, los medios de cultivo pueden contener los siguientes componentes (40):

**Nutrientes minerales:** son cantidades relativamente grandes de algunos elementos inorgánicos, estos incluyen iones de: nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S); y, pequeñas cantidades de otros elementos (micronutrientes vegetales u oligoelementos): hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molibdeno (Mo). Los elementos enumerados anteriormente son, junto con el carbono (C), el oxígeno (O) y el hidrógeno (H), los 17 elementos esenciales.

**Fuente de carbono:** Los medios de cultivo de tejidos vegetales proporcionan no solo los nutrientes inorgánicos mencionados anteriormente, sino también una fuente de carbono siendo la más común la sacarosa, siendo la función de esta reemplazar el carbono que la planta normalmente fija de la atmósfera mediante la fotosíntesis, ya que este proceso se ve sustancialmente disminuido en el CTV.

Para mejorar el crecimiento, muchos medios también incluyen pequeñas cantidades de ciertos compuestos orgánicos, especialmente vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal.

**Sustancias vitamínicas:** Son aquellas que contienen cofactores enzimáticos, siendo necesarias para mejorar una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo de tal forma que son requeridas en pequeñas cantidades (41):

- Ácido Nicotínico que forma parte de las coenzimas NAD y NADP las cuales intervienen en la transferencia de hidrógeno en la respiración celular.
- Tiamina o vitamina B1, la cual se añade como hidrocloreto de tiamina al medio de cultivo y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.
- Piridoxina o vitamina B6 en su forma de hidrocloreto de Piridoxina, esta participa como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos como el triptófano y el ácido nicotínico, esta vitamina favorece la formación y crecimiento de raíces.



- Myo-inositol, actúa sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.

**Reguladores de crecimiento vegetal (RCV):** Son aquellas sustancias que influyen en diversos procesos fisiológicos, principalmente crecimiento, diferenciación y desarrollo celular. Estas moléculas actúan a muy bajas concentraciones y son sintetizadas en las plantas denominadas fitohormonas u hormonas vegetales, aunque también se han creado reguladores sintéticos que actúan como estimuladores de la respuesta deseada en el CTV (42).

Los RCV más usadas en el CTV son las auxinas y las citocininas, estas últimas se usan para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo las más comunes, la 6-furfurilaminopurina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), 6-hidroximetilbuterilaminopurina (zeatina) y el tidiazuron (TDZ). Estos reguladores, promueven la división celular e inducen la formación de vástagos axilares, además retarda el envejecimiento y se usan generalmente altas concentraciones (38).

Las auxinas, por su parte, promueven la elongación celular y expansión de los tejidos, mediante la división celular y la formación de raíces adventicias, también tienen un efecto inhibitorio de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos de células en suspensión. Es decir, con una concentración baja de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones da lugar a la formación de callo (43).

Las auxinas más utilizadas son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indolacético (AIA), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), las auxinas como el AIA se utilizan en concentraciones de 0.01 a 10 mg/L, mientras que las auxinas sintéticas como ANA o 2,4-D, se usan desde concentraciones menores que van desde 0.001-10 mg/L, por ser relativamente más activas (44).

**Antioxidantes:** Una vez establecido el CTV ocurre un fenómeno denominado lixiviación de fenoles, en el cual los explantes de la mayoría de las plantas leñosas y algunas herbáceas liberan compuestos fenólicos al medio de cultivo provocando una coloración amarillenta al medio, este proceso resulta ser letal para los explantes, lo que dificulta la regeneración *in vitro* que conduce a la muerte de los explantes (45). Para reducir este

proceso se suelen agregar antioxidantes y ciertas sustancias que atrapan estos compuestos fenólicos evitando así que el explante muera y no se tenga la respuesta deseada. Algunas de estas sustancias se enlistan a continuación:

- El ácido ascórbico y ácido cítrico: Son añadidos a los medios como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos (46).
- Carbón activado: Funciona como adsorbente, removiendo compuestos fenólicos, evitando o disminuyendo el deterioro del explante. Este efecto se atribuye a su capacidad para remover sustancias tóxicas o inhibitoras del crecimiento del medio de cultivo que son producidas durante la esterilización del medio o liberadas por el explante cuando este se oxida (47)
- Polivinilpirrolidona (PVP): Es una poliamida, utilizada en la prevención de la oxidación de tejidos, desde su aplicación en el enjuague del explante o mediante su incorporación al medio de cultivo (48).

## 2.4 METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas poseen la capacidad de sintetizar diferentes compuestos orgánicos llamados metabolitos secundarios, estos no son esenciales para la sobrevivencia del organismo, pero juegan un papel importante en la interacción del organismo con su entorno, asegurando la existencia continua del mismo en sus ecosistemas (49).

La formación de metabolitos secundarios es generalmente específica de órganos, tejidos y células. Estos compuestos son de bajo peso molecular y a menudo difieren entre individuos de la misma población de plantas con respecto a su cantidad y tipos. Su principal función radica en proteger a las plantas contra fuentes de estrés, tanto biótico (bacterias, hongos, nematodos, insectos o pastoreo de animales) como abiótico (cambios de temperatura, humedad y luz; lesiones o presencia de metales pesados), además se ha demostrado que las plantas utilizan estos compuestos (aceites esenciales volátiles y flavonoides coloreados) para captar la atención de los polinizadores para la propagación del polen (50).

Los metabolitos secundarios se pueden separar en tres grandes grupos en función de su origen de biosíntesis (Fig. 4) (51), terpenos, fenoles y alcaloides.

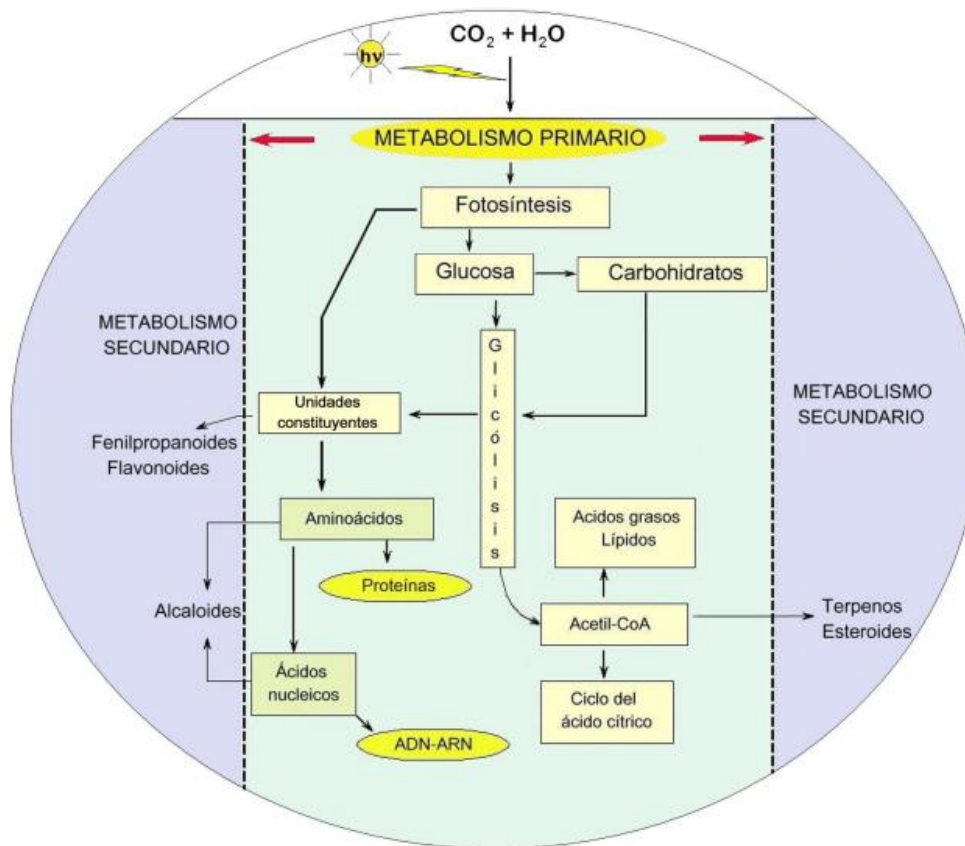


Figura 4. Metabolismo secundario del carbono en plantas Tomado de Avalos García, *et al.*, 2009 (52).

- **Terpenos:** Los terpenos comprenden el grupo más grande de metabolitos secundarios y, por su origen biosintético, no dependen de acetil-CoA o intermedios glicolíticos (49). La mayoría de los terpenos producidos por las plantas como metabolitos secundarios están involucrados en la defensa como toxinas y elementos disuasorios para la alimentación de un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de plantas. Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isopreno y según la cantidad de unidades de isopreno en su estructura se dividen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y politerpenos (53).
- **Compuestos fenólicos:** Se les conoce como compuestos fenólicos a aquellos compuestos que contienen un grupo funcional hidroxilo (OH) en un anillo aromático (benceno) llamado Fenol, estos forman una parte importante del sistema de defensa de las plantas contra plagas y enfermedades (54). Los compuestos fenólicos se pueden clasificar como flavonoides y no flavonoides (55). Los flavonoides son los

compuestos responsables del color de las flores y frutas, estos contienen 15 átomos de carbono con dos anillos aromáticos conectados a través de un puente de 3 carbonos. Los flavonoides incluyen a los flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, cumarinas, auronas, chalconas y flavan-3,4-dioles (55). Los compuestos no flavonoides son más simples e incluyen a los ácidos fenólicos, taninos, hidroxicinamatos, polifenoles y estilbenos (56).

- **Compuestos que contienen nitrógeno:** Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno son el resultado de la síntesis de varios aminoácidos, como el triptófano, tirosina, lisina y el ácido aspártico. Estos compuestos incluyen a los alcaloides, glucósidos cianogénicos y aminoácidos no proteicos (57).

Los alcaloides poseen acción fisiológica intensa en los animales incluso a bajas dosis con efectos psicoactivos, debido a que interfieren con las funciones del sistema nervioso, algunos alteran la síntesis de proteínas, otros afectan el transporte de membrana y la actividad enzimática (58). Se han propuesto diversas clasificaciones para separar a los alcaloides, una de las más usadas es dividirlos en tres categorías. Los alcaloides verdaderos, son los compuestos que se derivan de un aminoácido y un anillo heterocíclico con nitrógeno, p. ej. atropina, nicotina, etc. Los proto-alcaloides son los compuestos que contienen un átomo de nitrógeno derivado de un aminoácido que no forma parte del anillo heterocíclico, p. ej. adrenalina, efedrina, etc. Los pseudo-alcaloides son los compuestos que no se originan a partir de aminoácidos, p. ej. cafeína, teobromina, etc. (59).

- **Compuestos que contienen azufre:** Estos compuestos incluyen glutatión (GSH), glucosinolato hidrolizado (GSL), fitoalexinas, tioninas, defensinas y alininas que se han relacionado directa o indirectamente con la defensa de las plantas contra patógenos microbianos (60). Estos compuestos son el resultado de dos vías diferentes (61). El primer grupo contiene glucosinolato hidrolizado (GSL) por la enzima miosinasa y está presente en las crucíferas. El segundo grupo resultó de la hidrólisis de la alinina a través de una enzima (aliinasa) y están presentes en el género *Allium*, los racimos de cultivos de este género se utilizan de forma significativa como verduras, saborizantes y estimulantes inmunitarios debido a la presencia de estos compuestos. El glutatión (GSH) es azufre natural que se encuentra en las plantas y

actúa como un remedio contra la reducción de la intensificación de las plantas y también como un agente antioxidante en las reacciones de estrés (62).

#### **2.4.1 METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

Las plantas han demostrado ser una fuente natural de compuestos bioactivos, en particular de metabolitos secundarios, de hecho, estos productos naturales constituyen el 65% de los fármacos antineoplásicos de bajo peso molecular aprobados por la FDA, ya sean puramente compuestos naturales, semi-sintéticos o totalmente sintéticos pero basados estrictamente en un producto natural (4).

Los primeros compuestos con actividad anticancerígena obtenidos de las plantas fueron la vincristina y la vinblastina, los cuales pertenecen al subgrupo de alcaloides, estos fueron aislados de *Catharanthus roseus*. Las modificaciones químicas que se realizaron a la vincristina y vinblastina (Fig. 5) condujeron a la obtención de los compuestos semisintéticos vinorebina y vindesina (63). Estos son administrados en combinación con otros quimioterapéuticos para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda en niños, cáncer cervicouterino, cáncer de colon, de mama y otros carcinomas, mientras que la vinblastina se emplea para el tratamiento de linfoma de Hodgkin, carioepitelioma y cáncer de ovario (64). Estas patologías involucran una multiplicación descontrolada de células debido a un marcado deterioro de los reguladores del ciclo celular específicamente de los mecanismos proliferativos, desencadenando un ciclo celular hiperactivo (18). En este contexto, los microtúbulos, componentes del citoesqueleto, juegan un papel fundamental en procesos celulares de gran importancia como los son el crecimiento y la división celular (65). El mecanismo de acción de los vinca-alcaloides se basa en su unión a la tubulina impidiendo la polimerización de los dímeros de tubulina que a su vez interrumpe la formación de los microtúbulos, estos microtúbulos son de vital importancia para la formación del huso en las células que se están preparando para la mitosis. De tal forma que interrumpen la división celular y así evitan que el tumor o neoplasia siga creciendo y diseminándose (66).

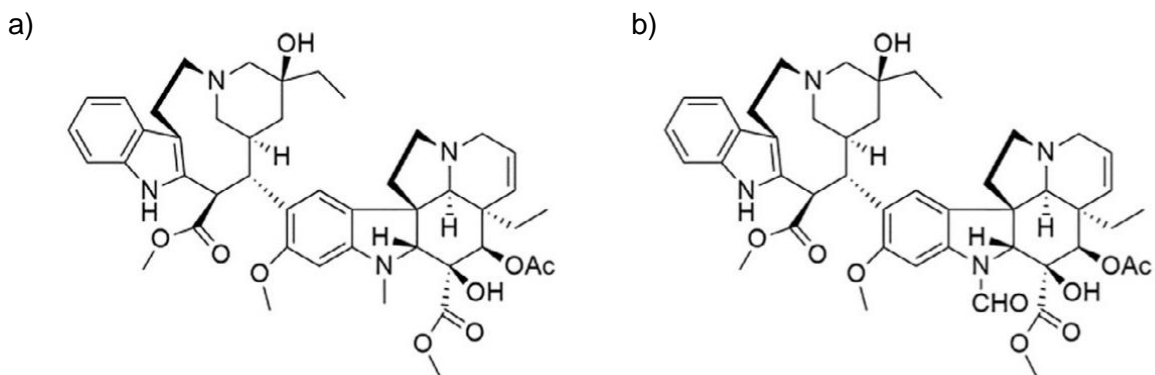


Figura 5. Estructura molecular de a) Vinblastina b) Vincristina. Tomado de Martino, et al., 2018 (67).

Posteriormente se logró aislar la camptotecina que pertenece al grupo de alcaloides de tipo indólico que inicialmente se aisló de *Camptotheca acuminata* (“Xi Shu” o árbol de la alegría). Este árbol es nativo del Tibet y se emplea en la medicina tradicional china (68). La elipticina, es otro alcaloide que fue aislado en 1957 por Goodwin y colaboradores, de las hojas del árbol *Ochrosia elliptica* que crece de manera silvestre en Oceanía (69), sin embargo, fue hasta 1967 que Dalton reportó la actividad antineoplásica de la elipticina, 9-metoxielipticina y otros de sus derivados (70).

Otro compuesto aislado de plantas con actividad anticancerígena es el paclitaxel, el cual es un alcaloide diterpénico que inicialmente se aisló de la corteza de *Taxus brevifolia*. Los taxanos como el paclitaxel (Fig. 6) tienen un mecanismo de acción similar a la vincristina y la vinblastina, pues se unen a los microtúbulos, estructuras flexibles que participan dinámicamente en el proceso de la división celular y los convierten en estructuras estáticas, lo que impide la multiplicación de diversos tipos de células cancerosas (71).

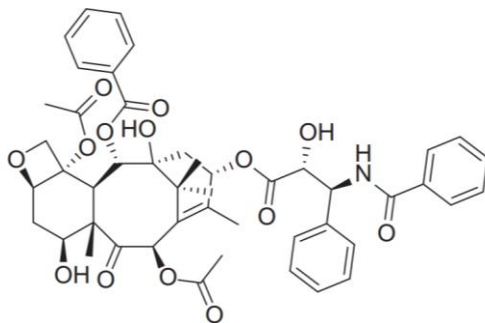


Figura 6. Estructura molecular de Paclitaxel. Tomado de Alqahtani, et al., 2019 (72).

## 2.4.2 TÉCNICAS PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES

En la actualidad existen diferentes ensayos *in vitro* para medir los efectos citotóxicos de diferentes compuestos, los cuales utilizan principalmente cultivos adherentes, cultivos de órganos aislados o líneas celulares específicas, esto como una alternativa a la experimentación *in vivo* (73). Algunas de estas pruebas *in vitro* incluyen a los llamados ensayos de citotoxicidad, los cuales se basan en el cultivo *in vitro* de células eucariotas que se exponen a un compuesto de prueba con potencial actividad citotóxica y después de un período de incubación se mide un marcador para reflejar el número de células muertas presentes en comparación con un tratamiento control (74). Estos son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares, los efectos citotóxicos, como las interferencias que provocan el compuesto con la estructura y propiedades esenciales para la supervivencia celular, además pueden medir la tasa de proliferación y las funciones vitales de las células al determinar la integridad estructural de la membrana y del citoplasma, la liberación de enzimas, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas, la síntesis de ADN y la actividad de absorción de nucleótidos, liberación de constituyentes o productos celulares al medio y la regulación iónica (75).

Una de las características más utilizadas para detectar a las células muertas es la integridad de la membrana celular, con esta se puede detectar a las células que permiten el movimiento de moléculas no permeables las cuales se pueden clasificar como células no viables o muertas, para identificar o cuantificar a las células muertas se detectan estas moléculas que sirven como indicadores de rompimiento de membrana e incluyen a marcadores que existen en el citoplasma de las células viables, pero que se filtran al medio de cultivo circundante. (76).

Los extractos vegetales son una fuente común de compuestos bioactivos que se han utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades. Por lo tanto, se han desarrollado varios tipos de ensayos para determinar la actividad citotóxica de extractos vegetales contra diversas líneas celulares de cáncer. Algunos de los tipos más comunes de ensayos de citotoxicidad se describen a continuación:

### **Ensayos de viabilidad celular con azul de tripano**



El ensayo de viabilidad celular con azul de tripano mide la cantidad de células viables presentes en una muestra. El azul de tripano es un colorante que se une a las células muertas o moribundas, lo que les da un color azul oscuro. Las células vivas no toman el colorante y, por lo tanto, se pueden distinguir visualmente. Este ensayo es simple, rápido y se puede realizar en un tubo de ensayo (77).

### **Ensayos MTT**

Los ensayos MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) son una forma popular de determinar la citotoxicidad. Estos ensayos miden la capacidad de una sustancia para reducir el MTT, un compuesto soluble en agua que se convierte en un precipitado insoluble de color púrpura cuando se reduce. Las células viables convierten el MTT en su forma reducida, mientras que las células muertas no lo hacen. Por lo tanto, la cantidad de precipitado púrpura producido se correlaciona con la cantidad de células vivas en la muestra. Este ensayo es simple y se puede realizar en placas de múltiples pozos para cultivo celular (78).

### **Ensayos de muerte celular por liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)**

Los ensayos de liberación de LDH miden la cantidad de LDH liberada de las células dañadas. LDH es una enzima que se encuentra en la mayoría de las células del cuerpo y se libera cuando las células están dañadas o mueren. Por lo tanto, si una sustancia es citotóxica, se espera que cause la liberación de LDH de las células afectadas. Este ensayo es útil para evaluar la muerte celular de manera cuantitativa y se puede realizar en un plato de cultivo de células (79).

### **Ensayos de apoptosis**

La apoptosis es una forma natural de muerte celular programada que ocurre en las células normales y cancerosas. Los ensayos de apoptosis miden la cantidad de células que están experimentando apoptosis después del tratamiento con una sustancia. Estos ensayos utilizan métodos como la tinción con Hoechst o la detección de caspasa-3 activa para identificar células apoptóticas. Estos ensayos pueden proporcionar información sobre el mecanismo de muerte celular que se produce después del tratamiento con una sustancia (80).

Según el American National Cancer Institute (NCI), el criterio para determinar la actividad citotóxica para extractos vegetales/crudos es con una  $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$  o  $10 \mu\text{M}$  tras 48 a



72 h de incubación (81). El NCI considera un criterio de límite superior  $IC_{50}$  de 30  $\mu\text{g/mL}$  como un extracto crudo prometedor para la purificación. Sin embargo, otros autores como Ayoub y colaboradores consideran que concentraciones más altas de hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  de extracto podrían ser efectivos como citotóxicos una vez fraccionado el extracto e identificando el o los compuestos con dicha bioactividad (82).

### 2.4.3 METABOLITOS SECUNDARIOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA

Actualmente se han probado una enorme cantidad de compuestos fitoquímicos con actividad antineoplásica en ensayos preclínicos (tanto *in vitro* como *in vivo*). Debido a los buenos resultados en estos ensayos se han iniciado nuevos ensayos clínicos, para estimar la idoneidad de los compuestos como posibles agentes quimioterapéuticos (83). Algunos ejemplos destacados son los siguientes:

El acetato de geranilo y el geraniol (Fig. 7) son dos monoterpenos presentes en innumerables especies de plantas los cuales exhibieron una actividad anticancerígena significativa contra la línea celular de cáncer de colon, colo-205, con valores de  $CI_{50}$  de 20 y 30  $\mu\text{M}$  respectivamente. El mecanismo de acción que mejor explica este efecto citotóxico es la apoptosis mitocondrial la cual se asoció con la regulación positiva de Bax y la regulación negativa de las expresiones de Bcl-2 (15).

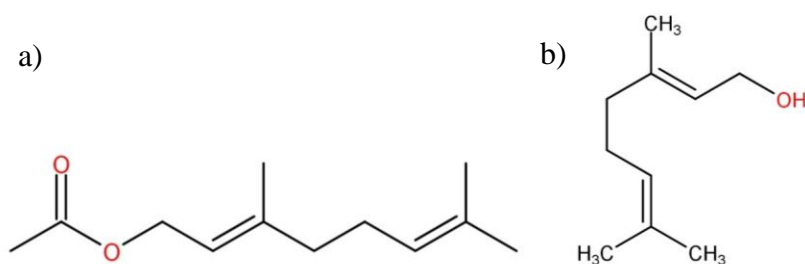


Figura 7. A) acetato de geranilo, B) geraniol, modificado de Qi, *et al.*, 2018 (15)

La diosmetina (Fig. 8) es una aglicona derivada del flavonoide diosmina, este se encuentra naturalmente en las hojas de *Olea europaea* y *Vachellia farnesiana*. Esta molécula tiene una potente actividad citotóxica en células ACHN. El mecanismo por el

cual induce este efecto es vía la apoptosis, al reducir la fosforilación de AKT a través de la regulación positiva de p53 (17).

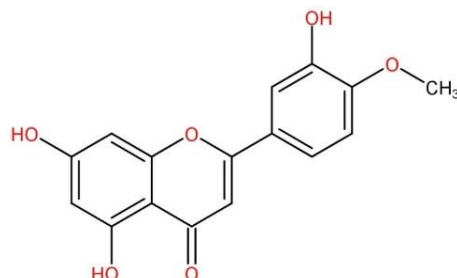


Figura 8. Diosmetina modificado de Mingning, *et al.*, 2020 (17)

El kampferol (Fig. 9) es uno de los flavonoides más comunes, que se encuentra en diversas frutas y verduras, varios estudios clínicos han evaluado la relación entre la ingesta de flavonoides dietéticos y el cáncer, mostrando resultados variables. Muchos estudios no han informado de una relación significativa entre la ingesta oral del kaempferol y el riesgo de desarrollo de

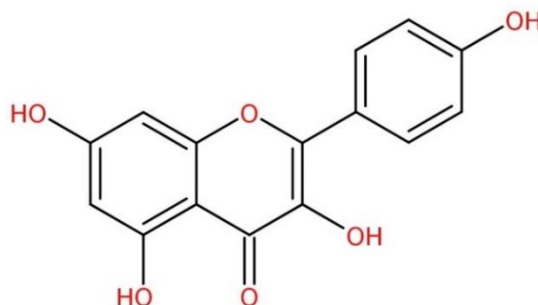


Figura 9. Kampferol modificado de Rho, *et al.*, 2011 (86)

cáncer (14), sin embargo, algunos estudios clínicos han informado de una reducción significativa del cáncer de ovario (84) y del riesgo de desarrollo de cáncer de páncreas en pacientes fumador es (85).

El ácido betulínico (Fig. 10) es un triterpeno presente en varias plantas, que ha exhibido efectos antineoplásicos significativos tanto *in vitro* como *in vivo* al manifestar citotoxicidad en varias líneas celulares de cáncer al suprimir el crecimiento de tumores (87), mostrando un mayor efecto citotóxico en células cancerosas de melanoma (88). Existen múltiples mecanismos implicados en su actividad anticancerígena, siendo el mecanismo mejor caracterizado la inducción de la apoptosis mediante la regulación directa de la vía apoptótica mitocondrial (89).

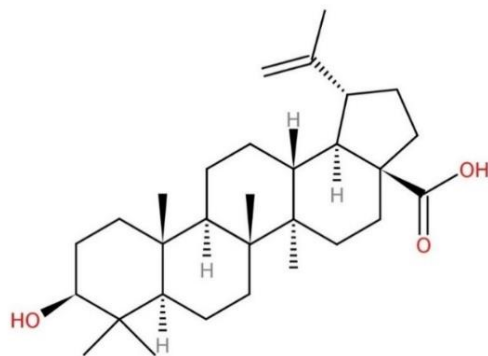


Figura 10. Ácido betulínico modificado de Mukherjee, *et al.*, 2006 (90)

La artemisinina (Fig. 11) es una lactona sesquiterpénica derivada de *Artemisia annua*, es comúnmente conocida por su actividad antipalúdica, sin embargo, estudios recientes han demostrado que este compuesto tiene efecto citotóxico en células de melanoma humano (91). Recientemente se ha descubierto que la artemisinina es capaz de inducir una forma de muerte celular no apoptótica dependiente del hierro llamada ferroptosis (92), sin embargo, no sólo la artemisinina sino también sus derivados semisintéticos (por ejemplo, el artesunato) poseen importantes propiedades citotóxicas en células cancerosas de mama, pulmón, páncreas y glioma (93).

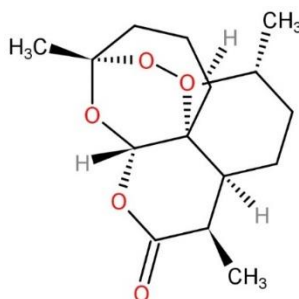


Figura 11. Artemisina, modificado de Kong & Tan, 2015 (94)

## 2.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO HERRAMIENTA PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Como se mencionó anteriormente, el cultivo de tejidos vegetales es una técnica que permite la propagación y producción masiva de plantas en condiciones controladas en el laboratorio. Esta técnica ha demostrado ser muy útil en la producción de metabolitos

secundarios. El proceso de producción de metabolitos secundarios a través del cultivo de tejidos vegetales comienza con la selección de una planta fuente que produce el compuesto de interés en cantidades limitadas o que es difícil de obtener mediante métodos convencionales. Se toma una pequeña muestra de tejido de la planta fuente (explante), como una hoja o una raíz, y se coloca en un medio de cultivo estéril y nutritivo que contiene sales minerales, vitaminas, carbohidratos y reguladores de crecimiento vegetal.

El explante se coloca en condiciones de cultivo controladas, como una cámara de crecimiento con temperatura, humedad y luz adecuadas. A partir de este explante, se puede inducir la formación de callos, masas de células indiferenciadas, que se pueden manipular para producir los metabolitos deseados. Una vez que se ha establecido el cultivo de callos, se pueden aplicar diferentes estrategias para aumentar la producción de metabolitos secundarios (95). Estas estrategias incluyen la optimización del medio de cultivo, el ajuste de los niveles de reguladores de crecimiento vegetal, la aplicación de estrés físico o químico, y la utilización de técnicas de ingeniería genética para aumentar la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de los metabolitos (96). Además, se pueden utilizar otras técnicas de cultivo de tejidos, como la organogénesis y la embriogénesis somática, para producir estructuras vegetales completas, como brotes y plántulas, que también son capaces de producir metabolitos secundarios (97).

Una vez que se ha logrado una producción satisfactoria de metabolitos secundarios en el cultivo de tejidos vegetales, se pueden realizar diferentes etapas de purificación y extracción para obtener el compuesto en forma pura. Esto puede implicar el uso de técnicas de cromatografía, como la cromatografía de capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución, así como técnicas de extracción con disolventes orgánicos (98).

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional de plantas radican en producción controlada y sostenible, mayor rendimiento, obtención de metabolitos raros, manipulación genética, reducción de costos y tiempos de producción, y eliminación de contaminantes. Estos beneficios hacen que esta técnica sea altamente prometedora para diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y agrícola (99).

Algunos ejemplos de metabolitos secundarios producidos mediante el cultivo de tejidos vegetales incluyen:

- Alcaloides: Se han producido alcaloides como la vinblastina y la vincristina, que se utilizan en el tratamiento del cáncer, a partir del cultivo de células de *C. roseus* (100).
- Fenilpropanoides: Se ha producido el resveratrol, un compuesto con propiedades antioxidantes y anticancerígenas, a partir del cultivo de células de *Vitis vinifera* (101).
- Terpenoides: Se han producido terpenoides como el taxol, un agente quimioterapéutico utilizado en el tratamiento del cáncer, a partir del cultivo de células de *T. cuspidata* (102).
- Flavonoides: Se han producido flavonoides como la quercetina y el kaempferol, que tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, a partir del cultivo de células de diferentes especies vegetales (103).

## **2.6 CULTIVO *IN VITRO* PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

Como se mencionó anteriormente, existen productos naturales que constituyen una proporción considerable de los fármacos antineoplásicos disponibles comercialmente (104). El consumo de estos fármacos ha llevado a una sobreexplotación de las especies que son fuente de estos compuestos, dado que la obtención convencional de los mismos implica en la mayoría de las veces la extracción directa del metabolito secundario de interés, del órgano de la planta en donde mayor concentración se tenga de este, por ejemplo, para obtener 1kg de Taxol, se necesita la corteza de 1000 árboles de *T. brevifolia* (105). Asimismo, para obtener 1g de vinblastina, se necesita media tonelada de hojas secas de *C. roseus* (106). Esta sobreexplotación ha ocasionado un grave desequilibrio en la biodiversidad de estas plantas (107), por lo que se requieren de una producción continua, ecológicamente sustentable y con altos rendimientos, lo cual se puede lograr mediante el cultivo *in vitro* (108).

Existen varios ejemplos de fármacos antineoplásicos producidos mediante técnicas de cultivo *in vitro*, tal es el caso de la podofilotoxina, la cual se ha obtenido a partir de cultivos de callos de *P. peltatum*, estudios realizados en la década de los 80`s muestran una alta acumulación de podofilotoxina en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con cinetina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (109). Estudios recientes muestran que al agregar metiljasmonato (MeJA), una fitohormona endógena específica de las plantas que regula la síntesis de metabolitos vegetales especializados (110), desencadena la vía biosintética de la podofilotoxina, y aunado a esto, también estimula la expresión génica específica que conduce a un mayor rendimiento de muchos compuestos anticancerígenos. Mediante la obtención de cultivos en suspensión celular de la línea celular de *L. album* 2-5 aH con metiljasmonato, se estimula la acumulación de podofilotoxina alcanzando una concentración de 7 mg/g de peso seco (111).

En este mismo contexto, se ha demostrado que el ácido salicílico actúa como elicitador conduciendo a la producción de metabolitos secundarios (112). Un estudio evidenció que al utilizar ácido salicílico como elicitador, la cantidad de taxol producido fue de 50 mg/L. Además, combinando este tratamiento con la extracción mediante baño ultrasónico (40 kHz, 10 min) se logró aumentar sinérgicamente la producción de taxol 14 veces más que los cultivos de control (113).

La producción de camptotecina también se ha realizado mediante estas técnicas de cultivo *in vitro*, a través del cultivo de raíces adventicias de *Ophiorrhiza prostrata* cultivadas a partir de hojas y entrenudos producen una mayor cantidad de camptotecina en comparación con el corte del tallo enraizado *ex vitro* (114). También se ha reportado que el ácido salicílico como elicitador produce un aumento de 25 veces en los rendimientos de 10-hidroxicamptotecina en cultivos en suspensión de *C. acuminata* (115). Por otro lado para la producción de alcaloides de la vinka se han utilizado cultivos en suspensión de *C. roseus* y mediante la radiación UV-B durante 5 minutos como elicitador abiótico se ha logrado aumentar la concentración de catarantina y vindolina en 3 y 12 veces respectivamente (100).

## 2.7 GENERO *Acacia*

*Acacia farnesiana* nombrada recientemente como *Vachellia farnesiana* (116), pertenece al género *Acacia* el cual a su vez pertenece a la familia Fabaceae y se estima que hay aproximadamente 1380 especies de este género distribuidas en todo el mundo (117,118). Si bien la mayoría de las especies del género *Acacia* están extendidas en las partes cálidas y áridas del mundo, actualmente se le ha definido como un género cosmopolita.

Las diferentes partes de las plantas de *Acacia*, como la corteza, las hojas, las flores y las semillas, han sido utilizadas en la medicina tradicional de diversas culturas durante siglos. Estos usos medicinales se deben a la presencia de varios compuestos bioactivos en las plantas de *Acacia*, incluyendo taninos, flavonoides, alcaloides y saponinas (119).

Las propiedades medicinales de las especies de *Acacia* varían según la región y la especie específica, pero se han informado diversos usos terapéuticos. Algunas de las actividades farmacológicas y usos medicinales atribuidos a especies del género *Acacia* son los siguientes:

- Propiedades antiinflamatorias: Algunas especies de *Acacia* han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, lo que las hace útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis y las afecciones de la piel (120).
- Propiedades antimicrobianas: Se ha descubierto que ciertas especies de *Acacia* poseen actividades antimicrobianas, lo que las hace efectivas contra bacterias, hongos y parásitos. Estas propiedades pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones y enfermedades causadas por microorganismos (121).
- Propiedades antioxidantes: Algunas especies de *Acacia* contienen compuestos antioxidantes que pueden ayudar a proteger las células del daño causado por los radicales libres, lo que se ha asociado con la prevención de enfermedades crónicas y el envejecimiento (122).
- Efectos antidiabéticos: Algunas investigaciones han demostrado que ciertas especies de *Acacia* pueden tener efectos antidiabéticos al ayudar a regular los niveles de azúcar en sangre. Esto las convierte en posibles candidatas para el tratamiento de la diabetes (123).



- Propiedades antitumorales: Algunos estudios han investigado el potencial de ciertas especies de *Acacia* como agentes antitumorales. Se ha observado que ciertos extractos de especies de *Acacia* tienen efectos citotóxicos sobre las células cancerosas, lo que podría conducir a futuros desarrollos en el campo de la terapia contra el cáncer, dentro de estas especies se encuentran *V. farnesiana* (16), *A. nilotica* (124), *A. mellifera* (125), *A. pennatula* (12) y *A. macrostachya* (126).

## 2.8 *Vachellia farnesiana*

*Vachellia farnesiana* también conocido como "árbol de agujas" o "acacia dulce", es bien conocido por sus espinas y fragantes flores amarillas, utilizado frecuentemente como fuente de ingredientes para la elaboración de perfumes. *V. farnesiana*, es un árbol perenne perteneciente a la familia de las leguminosas (Fabaceae). Es originaria de América Central y del Sur, pero se ha introducido en muchas otras partes del mundo debido a su valor ornamental y sus propiedades beneficiosas. Es una especie leñosa de tamaño mediano que alcanza alturas de 3 a 8 metros. Tiene un tronco ramificado con una corteza lisa de color gris claro. Sus hojas son bipinnadas, lo que significa que están divididas en numerosos folíolos pequeños. Los folíolos son de color verde brillante y tienen una forma oblonga (Fig 12). La especie es conocida por sus espinas afiladas que se encuentran en las ramas y los tallos.



Figura 12. A) Hojas y B) espinas de *V. farnesiana*. (fuente propia).



Una de las características más distintivas de *V. farnesiana* es su fragancia. Las flores amarillas pequeñas y llamativas que produce la especie tienen un aroma dulce y embriagador, similar al del jazmín. Estas flores se agrupan en racimos globosos y aparecen a principios de la primavera, a medida que las flores se marchitan, dan lugar a vainas largas y planas que contienen semillas de color marrón oscuro (Fig. 13).



Figura 13. A) Flores de *Vachellia farnesiana*. Foto de Wynn Anderson 2017. B) Vainas y semillas de *Vachellia farnesiana* (Fuente propia).

Esta especie es conocida por su adaptabilidad y resistencia, y puede crecer en una amplia variedad de suelos, incluyendo los secos y pobres en nutrientes. También es tolerante a condiciones extremas como sequías y altas temperaturas. La especie crece en climas cálidos y semiáridos donde las temperaturas anuales promedio varían entre 15 y 28°C. Se caracteriza por ser resistente a la sequía y prospera en una gran variedad de suelos, desde arcillas pesadas hasta arenas, y en un amplio rango de pH. Sus semillas miden de 6 a 8 mm de largo y son de color pardo-amarillentas, estas pueden conservar su viabilidad durante 30 o más años (127).

En México, se le conoce comúnmente como "huizache" y se distribuye de manera heterogénea en toda la costa del pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas y de manera discontinua en la costa del océano atlántico (Fig. 14), crece a una altitud de 36 a 1,500 msnm (128). Aunque también se le ha encontrado creciendo en laderas cubiertas de matorral a 2400 metros de altitud en los municipios de Cuautitlán, Acolman,

Tepetlaztoc y Texcoco. Se la ha observado sobre todo en regiones que tienen hasta 900 mm de precipitación anual (128).

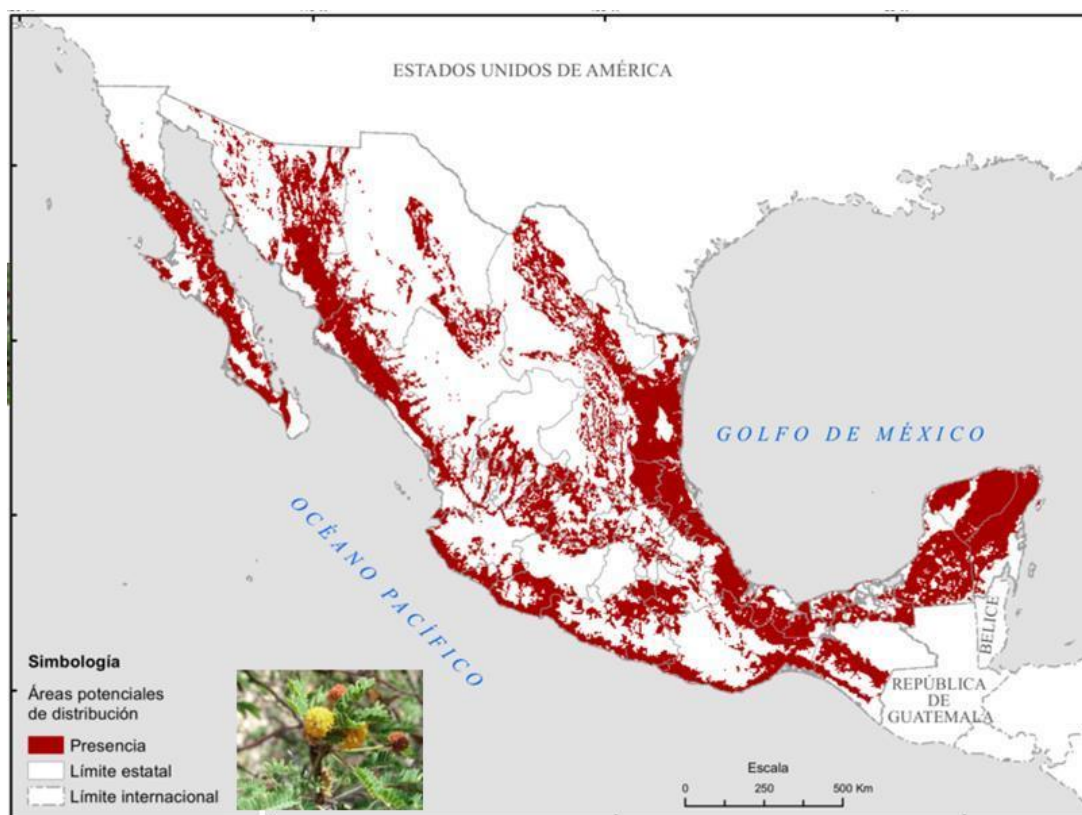


Figura 14. Mapa de distribución potencial de la especie *Acacia farnesiana*, (L.) Willd. (CONABIO, 2005).

Debido a su amplia distribución, se pueden presentar diferencias morfológicas y de concentración de metabolitos secundarios entre individuos de diferentes sitios de colecta, pues, existen variaciones ambientales que pueden influir en la morfología de las plantas y en la producción de metabolitos secundarios. Por ejemplo, la disponibilidad de luz solar, la temperatura, la humedad y la disponibilidad de nutrientes pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que se reflejará en su morfología y en la concentración de metabolitos secundarios (129), además, Las interacciones con otros organismos, como herbívoros, polinizadores, patógenos y competidores, pueden variar en diferentes lugares. Estas interacciones pueden desencadenar respuestas morfológicas y metabólicas en las plantas. Induciendo, por ejemplo, el desarrollo de estructuras de floración distintas para atraer a polinizadores específicos en diferentes lugares, lo que a su vez puede afectar la producción de metabolitos secundarios (130).

Por sus características de crecimiento, *V. farnesiana* se considera una planta útil para la reforestación de tierras secas o degradadas, previene la erosión de suelos y ayuda a la estabilización de dunas en desiertos extensos (131).

Esta especie ha sido utilizada ampliamente en la medicina tradicional; los extractos de las flores se utilizan en remedios para los dolores de cabeza y en el tratamiento de malestares estomacales, su fruto se usa para tratar la disentería e inflamaciones en la piel (12). La corteza del huizache es astringente y demulcente, y junto con las hojas y las raíces se utiliza con fines medicinales, las ramas leñosas son utilizadas en la India como cepillos de dientes. Las raíces gomosas también se mastican para el dolor de garganta. Se ha utilizado como antiespasmódico, afrodisíaco, astringente, estimulante y demulcente, así como para tratar diarreas, febrículas y el reumatismo (132). Hartwell (1970) (13) menciona que la decocción de la raíz, utilizada en baños calientes, ayuda al cáncer de estómago, además se ha documentado que emplastes hechos de la pulpa, disminuyen la severidad de tumores. Por otra parte, se ha demostrado la actividad citotóxica del ácido betulínico presentes en las raíces de esta especie (16), esto contra tres líneas celulares de cáncer (Hep-G2, A549, Ca9-22), también el farnesol presente en las flores y el geraniol presente tanto en hojas como en flores han demostrado esta actividad contra células HeLa y Colo-205, respectivamente (133) (15); Otro estudio de citotoxicidad realizado por Qiu en 2020 (15) reportó que la diosmetina, un flavonoide presente en las hojas de *V. farnesiana* inhibió la viabilidad celular e indujo citotoxicidad y apoptosis en células ACHN (132).

### **2.8.1 CULTIVO *IN VITRO* DEL GENERO *Acacia***

Diferentes especies del género *Acacia* han sido estudiadas y sometidas a las diferentes técnicas englobadas en el cultivo de tejidos vegetales (Tabla 1). Morales, et al (2019) (134), desarrollaron un protocolo de escarificación y germinación *in vitro* para semillas de *V. farnesiana*, el cual consistió en sumergir las semillas en ácido sulfúrico concentrado durante 1 hora, dando como resultado un 100% de germinación a los dos días de iniciados los cultivos *in vitro*. Mittal (135) micropropagó plantas de *A. auriculiformes*

tomando como fuente de explantes yemas axilares de plántulas desarrolladas *in vitro*. El tratamiento que generó la mayor cantidad de brotes fue el suplementado con leche de coco (5-10%) y bencilaminopurina (BAP) (10  $\mu$ M), mientras que, en la fase de enraizamiento, la presencia en el medio de cultivo de los reguladores del crecimiento ácido indol-3-acético (AIA) o ácido naftalenacético (ANA) (10  $\mu$ M) produjeron el mayor número de raíces adventicias. Torres, et al (2013) (136), llevaron a cabo la micropropagación de *A. mangium* a partir de explantes obtenidos de brotes de plantas de tres meses de edad mantenidas en invernadero, obteniendo el mayor número de brotes al suplementar el medio de cultivo con 2,22  $\mu$ M de 6-bencilaminopurina (BAP). Rathore, et al (2012) (137), probaron diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento y la adición de aminoácidos para inducir embriogénesis somática en *A. senegal*. Los mejores resultados se obtuvieron al suplementar el medio de cultivo MS con 0.45  $\mu$ M de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 2.32  $\mu$ M de cinetina (KIN) y 15 mM de L-glutamina. Kaur, et al (2000) (138), describen un método para la propagación *in vitro* a partir de explantes nodales de *A. catechu*, obteniendo un máximo de 12 brotes al utilizar medio MS suplementado con 1,5 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de KIN.

Tabla 1. Cultivo de tejidos vegetales en plantas del género *Acacia*.

ESPECIE	EXPLANTE	RCV	TRATAMIENTO MAS EXITOSO	REFERENCIA
<i>A. farnesiana</i>	Explantes nodales	<ul style="list-style-type: none"> <li>BAP</li> </ul>	Medio basal semisólido MS suplementado con 1.0 mg/L de BAP para la <b>obtención de brotes</b>	Al-Joboury, 2012 (139)
<i>A. farnesiana</i>	Brotes desarrollados <i>in vitro</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>IBA</li> <li>ANA</li> </ul>	Medio basal semisólido MS suplementado con 0,5 mg/L de IBA y 0,05 mg/L de ANA para la <b>producción de raíces</b>	Al-Joboury, 2012 (139)

<i>A. farnesiana</i> y <i>A. schaffneri</i>	Embriones cigóticos inmaduros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KIN</li> <li>• 2,4-D</li> </ul>	Medio basal semisólido MS suplementado con 9,05 $\mu$ M de Ácido 2, 4-D y 4,65 $\mu$ M de cinetina (KIN) para la <b>producción de callos embriogénicos</b>	Ortiz, <i>et al.</i> , 2000(140)
<i>A. mangium</i>	Brotos de plantas de tres meses de edad mantenidas en invernadero.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BAP</li> </ul>	Medio semisólido MS suplementado con 2,22 $\mu$ M de BAP para la <b>obtención de brotes.</b>	Torres, <i>et al.</i> , 2013(136)
<i>A. mangium</i>	Brotos desarrollados <i>in vitro</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ANA</li> </ul>	Medio semisólido MS suplementado con 2,69 $\mu$ M de ANA para la <b>producción de raíces</b>	Torres, <i>et al.</i> , 2013 (136)
<i>A. catechu</i>	Explantes nodales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KIN</li> <li>• BAP</li> </ul>	Medio semisólido MS suplementado con 1,5 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de KIN para la <b>obtención de brotes.</b>	Kaur & Kant, 2000 (138)
<i>A. senegal</i>	Cotiledón inmaduro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KIN</li> <li>• L-Glut</li> <li>• 2,4-D</li> </ul>	Medio semisólido MS suplementado con 0,45 $\mu$ M de 2, 4-D, 2,32 $\mu$ M de Kin y 15 mM de L-glutamina para la <b>inducción de la embriogénesis somática</b>	J. S. Rathore, <i>et al.</i> , 2012 (137)
<i>A. sinuata</i>	Hojas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BAP</li> <li>• 2,4-D</li> </ul>	Medio semisólido MS suplementado con 4,52 $\mu$ M de 2,4-D y 2,22 $\mu$ M de BAP para la <b>producción de callos embriogénicos.</b>	Vengadesan <i>et al.</i> , 2002 (141)
<i>A. nilótica</i>	Nódulo cotiledonario	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BAP</li> <li>• 2,4-D</li> </ul>	Medio semisólido MS suplementado con 0.4 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de BAP para la <b>producción de callos embriogénicos.</b>	Dhabhai y Batra, 2010 (142)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte tanto a nivel nacional como internacional. A pesar de que actualmente se siguen desarrollando investigaciones enfocadas en la formulación de medicamentos que cada vez sean más efectivos, rápidos, de fácil obtención y por supuesto que sean asequibles para toda la población, hasta el momento no se han desarrollado y/o descubierto fármacos que manifiesten una baja toxicidad subyacente, además de que su proceso de obtención resulta complicado y por lo mismo

costoso. Por ejemplo, las plantas estudiadas por su contenido de metabolitos potencialmente citotóxicos presentan concentraciones muy pequeñas de dichos compuestos, sin considerar también las dificultades que presentan varias de estas especies con respecto a su cultivo y en general al procedimiento “tradicional” seguido para la obtención de los metabolitos de interés. Es en este contexto que la producción de metabolitos secundarios mediante las tecnologías englobadas en el cultivo de tejidos vegetales se viene presentando desde hace varias décadas como una alternativa biotecnológicamente viable, además de que dichas tecnologías no atentan contra la biodiversidad y la densidad poblacional de las especies de interés.

Innumerables especies de plantas han demostrado ser una fuente natural de compuestos bioactivos, en particular de metabolitos secundarios con actividad citotóxica, los cuales constituyen una proporción considerable de los fármacos antineoplásicos disponibles comercialmente. En este sentido, *V. farnesiana*, ha sido reportada por su uso en la medicina tradicional como tratamiento para distintos tipos de cáncer, lo cual ha quedado de manifiesto en diferentes investigaciones donde se han extraído compuestos de esta especie y han sido probados en líneas celulares, cuyos resultados han sido positivos. Esto último coloca a esta especie como una fuente potencial de compuestos bioactivos con actividad antineoplásica, de tal forma que el cultivo de tejidos vegetales puede ser una alternativa para la obtención de estos compuestos que permita una producción controlada y disminuir el uso de plantas de vida silvestre de esa especie.

## 4. HIPÓTESIS

“Los cultivos de callo de *V. farnesiana*, retendrán su capacidad natural de producir metabolitos secundarios con potencial actividad citotóxica”.



## **Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Vachellia farnesiana* para la obtención de metabolitos secundarios con potencial actividad citotóxica**

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer cultivos de callo de *Vachellia farnesiana* para la obtención de metabolitos secundarios con potencial actividad citotóxica.

#### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Establecer cultivos asépticos de semillas de *V. farnesiana* de dos sitios de colecta.
- II. Inducir callogénesis en *V. farnesiana* de dos sitios de colecta, evaluando diferentes tipos de explantes y reguladores del crecimiento vegetal.
- III. Obtener extractos enriquecidos en alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos a partir de la biomasa generada *in vitro* y de hojas de ejemplares adultos de *V. farnesiana*.
- IV. Determinar el contenido de alcaloides, terpenos y fenoles totales en los extractos mediante espectrofotometría UV-Vis.
- V. Determinar la actividad citotóxica de extractos crudos de hojas y cultivos *in vitro* de *V. farnesiana*

### **6. METODOLOGÍA**

#### **6.1 MATERIAL VEGETAL**

Para el establecimiento de los cultivos asépticos se utilizaron semillas de *V. farnesiana* (Fig. 12), las cuales se adquirieron en dos sitios de colecta diferentes: el primero se

localizó en un vivero Huerta Amezquita del municipio de León, Guanajuato, adquiriendo las semillas directamente; por su parte el segundo punto de colecta comprendió el municipio de San Juan del Río, Querétaro, se colectaron semillas de individuos silvestres creciendo en este lugar.

Además de las semillas, también se obtuvieron hojas de cada uno de los especímenes de los cuales se recolectaron las semillas, las hojas (folíolos) serán sometidas a un análisis cualitativo y cuantitativo para alcaloides, el cual se describe más adelante. Por otra parte, también se colectaron ejemplares para herbario (tallos, hojas y flores), los que se prensaron y enviaron al Herbario Medicinal del IMSS para su identificación.



Figura 15. Semillas de *V. farnesiana*

## 6.2 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS ASÉPTICOS

### 6.2.1 Establecimiento del cultivo *in vitro* de semillas de *Vachellia farnesiana*

Las semillas fueron escarificadas químicamente al ser sumergidas en ácido sulfúrico concentrado, en agitación constante por 1h (143). Posteriormente, las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril, seguido de un lavado con etanol al 70% (v/v) durante 30s, enseguida, las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (0.5%; v/v) por 15 min, retirando el exceso de cloro con lavados de agua destilada estéril



(144). Las semillas desinfectadas fueron sembradas bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar en tubos de cultivo conteniendo medio de cultivo MS a la mitad de su concentración (Anexo 1), suplementado solo con 10 g/L de sacarosa y 2.7 g/L de fitagel, el pH del medio de cultivo se ajustó a  $5.75 \pm 0.5$  con HCl 1M y NaOH 1M, para posteriormente ser esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos se monitorearon cada tercer día, registrando la emergencia de la radícula como indicativo de la germinación, al término de los 30d de cultivo se obtuvo el porcentaje y tiempo de germinación.

### 6.2.2 Establecimiento de cultivos de callo

Los explantes a utilizar para el establecimiento de los cultivos de callo se tomaron de las plántulas generadas *in vitro* a los 15d de cultivo. Se evaluaron los hipocótilos, cotiledones, raíces, y las primeras hojas verdaderas. Los diferentes explantes fueron diseccionados de las plántulas en una solución antioxidante (150 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico). Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo MS (145) suplementado con 30 g/L de sacarosa, antioxidantes (150 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico, 500 mg/L de PVP, 500 mg/L de carbón activado) y 2.7 g/L de fitagel (Anexo 6), además se evaluaron diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.0 a  $13.57 \mu\text{M}$ ) en combinación con cinetina (KIN) (0.0 a  $4.64 \mu\text{M}$ ) ó 6-bencilaminopurina (BAP) (0.0 a  $4.64 \mu\text{M}$ ) (Tabla 2).

Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y a los 30d de cultivo se determinó el porcentaje de inducción de callo en los explantes, así como las características del callo formado: oxidación, color y friabilidad.

Los callos obtenidos fueron subcultivados cada 30d para su proliferación en el tratamiento que resultó con el menor grado de oxidación, el mayor porcentaje de inducción y con alta friabilidad.

Tabla 2. Combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) para la inducción de callo; BAP, 6-bencilaminopurina; 2,4-D, 2,4-diclorofenoxiacético y KIN, Cinetina.

<b>K<sub>0</sub>D<sub>0</sub></b>	<b>2,4-D</b>
-----------------------------------	--------------

	<b>B<sub>0</sub>D<sub>0</sub></b>	9.04 μM	13.57 μM
<b>KIN</b>	2.32 μM	K <sub>2.32</sub> D <sub>9.04</sub>	K <sub>2.32</sub> D <sub>13.57</sub>
	4.64 μM	K <sub>4.64</sub> D <sub>9.04</sub>	K <sub>4.64</sub> D <sub>13.57</sub>
<b>BAP</b>	2.32 μM	B <sub>2.32</sub> D <sub>9.04</sub>	B <sub>2.32</sub> D <sub>13.57</sub>
	4.64 μM	B <sub>4.64</sub> D <sub>9.04</sub>	B <sub>4.64</sub> D <sub>13.57</sub>

### 6.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se tomó como fuente de biomasa las hojas de ejemplares adultos de *V. farnesiana*, al igual que los callos obtenidos, ambas fuentes de biomasa fueron secadas por liofilización. Las muestras secas fueron pulverizadas con ayuda de un mortero para obtener un tamaño de partícula uniforme.

Ambas biomosas secas y pulverizadas se mezclaron de manera independiente en etanol en una proporción 1:30 (m/v) y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 24 h. Posteriormente las muestras fueron colocadas en un baño ultrasónico a 40 °C y 53 KHz durante 40 min. Transcurrido los 40 min, se recuperó el sobrenadante de las muestras, las cuales pasan por un proceso de desengrasado, en un embudo de separación, empleando hexano en volúmenes iguales, recuperándose la parte inferior que contiene el extracto etanólico. Los extractos fueron concentrados en rotavapor y reconstituidos en agua, después se dio paso a una segunda partición en un embudo de separación para remover los compuestos más polares, empleando cloroformo en volúmenes iguales, colectándose la fracción orgánica, este proceso se realizó por triplicado y se mezclaron los extractos obtenidos, las mezclas fue concentradas al vacío. Los extractos orgánicos pasaron por una tercera partición con una solución al 1% de NaCl para parcialmente remover los taninos, los extractos resultantes fueron concentrados hasta sequedad y almacenados en frascos ámbar a 4 °C, hasta su uso (146).

## **6.4 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES, TERPENOS Y FENOLES**

### **6.4.1 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios**

Para la determinación cualitativa de alcaloides se realizó la prueba de Dragendorff (147). Se adicionaron 3 gotas del reactivo de Dregendorff (Anexo 7) a 1 mL del extracto (1 mg/mL) previamente disuelta y acidificada (se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo se resuspendió en 1mL de HCl 1%). La presencia de un precipitado café oscuro indicó la presencia de alcaloides. Para la determinación cualitativa de terpenos se utilizó el reactivo de Liebermann-Burchard (148). Para lo cual se disolvió 1 mg de la muestra en 1 mL cloroformo y luego se le añadieron unas gotas del reactivo (Anexo 8). La presencia de un precipitado rojo-violeta indicó la presencia de terpenoides. Finalmente, para determinar la presencia de fenoles se utilizó Cloruro Férrico agregando 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% a 1 mL del extracto (1 mg/mL). El desarrollo de una coloración rojo oscuro indicó la presencia de compuestos fenólicos.

### **6.4.2 Análisis cuantitativo de alcaloides totales**

La determinación cuantitativa de alcaloides presentes en los extractos se realizó por la reacción con verde de bromocresol (BCG), de acuerdo con Shamsa *et al* (149). Previo al análisis se prepararon soluciones de verde de bromocresol, solución de ácido cítrico y el buffer de fosfato ácido (Anexo 9).

A partir de una solución de atropina se construyó una curva patrón (Anexo 10). Para la determinación en los extractos, fueron transferidos 800  $\mu$ L de cada extracto a un embudo de separación, al cual se le agregaron 5 mL de la solución de verde de bromocresol y 5 mL de la solución buffer de fosfato a pH 4.7. La mezcla se agito vigorosamente, y el complejo formado fue extraído con cloroformo. Los extractos fueron recuperados en un matraz aforado de 10 mL y se llevaron a ese volumen con cloroformo. Finalmente, las absorbancias de las soluciones del material de referencia y del complejo en cloroformo fueron medidas a una longitud de onda de 470 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS). Los resultados fueron expresados como mg EA/g de extracto seco.

### **6.4.3 Análisis cuantitativo de terpenos totales**

Se utilizó ácido ursólico como estándar en un rango de concentraciones (1 a 16 mg/L) para crear una curva estándar (Anexo 11). Se añadió ácido sulfúrico (1 mL) y reactivo de vainillina-ácido acético glacial (5%, 400 µL) a 100 µL de extracto (1 mg/mL). La mezcla de reacción se incubó a 70 ° C durante al menos 30 min. Posteriormente, se mezcló con ácido acético glacial (5 ml) y aforo a 10 mL, finalmente se midió la absorbancia de la mezcla a 547 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS). (150). Los resultados fueron expresados como mg EAU/g de extracto seco.

#### **6.4.4 Análisis cuantitativo de fenoles totales**

Se determinó el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) de acuerdo con lo descrito por Singleton, et. al. (151), para lo cual se construyó una curva de concentraciones conocidas usando ácido gálico como estándar (Anexo 12), En tubos eppendorf se colocaron 200 µL del extracto y se agregaron 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu dejando reposar la mezcla en oscuridad por 8 min, posteriormente se agregaron 200 µL de carbonato de sodio anhidro (14% p/v) y 1500 µL agua destilada, se homogenizaron y se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. La absorbancia fue leída a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific- Genesis 10S UV-VIS). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como mg EAG/g de extracto seco.

## **6.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS VEGETALES**

### **6.5.1 Mantenimiento y proliferación de la línea celular HeLa**

La línea celular HeLa a estudiar se obtuvo por donación del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la UAEMéx. Se realizó un pase en medio de cultivo medio mínimo esencial Eagle (EMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), con la finalidad de detectar alguna señal de contaminación dejándolas en cuarentena durante una semana (152). Al concluir el tiempo no se observaron señales de contaminación, por lo cual se procedió con la multiplicación de la línea celular. Una vez alcanzada una población celular de 15 cajas T25 cada una con una confluencia del 80 %, se procedió a ultracongelar 3 millones de células en crioviales, con un total de 15 viales como banco de trabajo. La línea celular fue mantenida empleando medio EMEM,

suplementado con 10 % de SFB, 2 mM de L–glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales, a 37°C, en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad relativa. El subcultivo se realizó con 70% de confluencia celular, mediante el uso de tripsina en un radio 1:10, con cambio de medio de cultivo cada 4 días.

### **6.5.2 Preparación de las multiplacas de 96 pozos**

A partir de uno de los crioviales, se prepararon 3 cajas T25 con una confluencia del 80% cada una, a las cuales se les realizó un conteo celular con el fin de determinar la concentración celular. Una vez determinada la concentración, se preparó una suspensión celular con una concentración final de  $1 \times 10^4$  cel/mL con la cual se inoculo cada uno de los pozos que se ocuparían para el ensayo, una vez sembradas, las células se dejaron incubar durante 24 h antes de colocar los controles y los extractos a evaluar, pues al ser células adherentes es necesario que recuperen su conformación. Cada placa contenía 3 pozos blanco (sin células), 3 pozos como control negativo (células sin exposición al compuesto de prueba), 3 pozos como control positivo (células + 2 ng/mL de paclitaxel), 3 pozos como control del solvente utilizado para diluir el extracto y 4 pozos con las diferentes concentraciones de los extractos a probar (1, 5, 10 y 50 µg/mL) (Fig. 13). Los pozos no utilizados contenían buffer fosfato salino (PBS), con el fin de evitar la evaporación y para separar los pozos, evitando así la influencia entre pozos vecinos. El volumen final en cada pozo (150 µL) fue distribuido de la siguiente manera: 120 µL de la suspensión celular + 30 µL de la solución de extracto correspondiente.

### **6.5.3 Preparación y adición de los extractos al cultivo celular**

Una vez obtenidos los extractos de la biomasa generada *in vitro* y la recolectada de vida silvestre, se llevaron a sequedad, y posteriormente, el extracto fue resuspendido en etanol a un volumen de 10 mL, a partir de esta solución se ajustó hasta alcanzar una concentración de 10 mg/mL. A partir de esta solución, se preparó una solución stock de los extractos a una concentración de 1000 µg/mL disueltos en medio de cultivo celular (EMEM+ SFB al 10%). Esta solución fue filtrada (0.22 µm), a partir de esta solución se

realizaron diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, y 50  $\mu\text{g/mL}$ . Para el caso del control del solvente se empleó como base una solución al 90% de etanol, tomando el volumen correspondiente a la concentración más alta de los tratamientos empleados (45  $\mu\text{L}$ ) y diluyéndose en el medio de cultivo.

#### 6.5.4 Ensayo con MTT

Una vez finalizado el tiempo de exposición a los extractos (48 y 72 h), a cada pozo se le agregó 15  $\mu\text{L}$  de la solución del reactivo MTT (1:10; v/v), previamente filtrada (0.22  $\mu\text{m}$ ), se agitaron a 600 rpm x 1min, y finalmente se incubaron durante 4 h a 37°C en la incubadora de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se disolvieron los cristales con 150  $\mu\text{L}$  de alcohol isopropílico acidificado, pipeteando 2-3 veces por pozo, iniciando con los pozos control. Finalmente, la placa se dejó reposar por 10 minutos y se procedió a su lectura espectrofotométrica a 570 nm en un lector de multiplacas Epoch (Biotek, Estados Unidos).

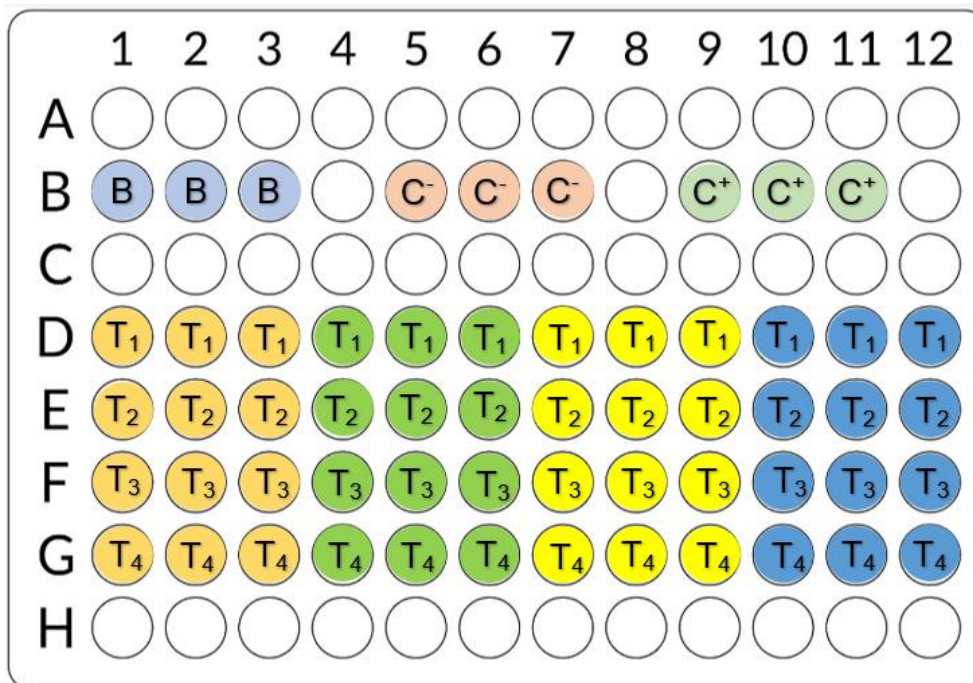


Figura 16. Diagrama de carga de multiplaca de 86 pozos. Blanco (B), Control negativo (C<sup>-</sup>), Control positivo (C<sup>+</sup>). T<sub>1</sub>: 1  $\mu\text{g/mL}$ , T<sub>2</sub>: 5  $\mu\text{g/mL}$ , T<sub>3</sub>: 10  $\mu\text{g/mL}$ , y T<sub>4</sub>: 50  $\mu\text{g/mL}$ . Extractos: ■ Guanajuato Callo, ■ Querétaro Callo, ■ Guanajuato Silvestre, ■ Querétaro Silvestre.

## 6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Todos los experimentos y determinaciones fueron realizados por triplicado, los datos resultantes fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se hizo empleando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MATERIAL VEGETAL

Los especímenes colectados fueron identificados como *V. farnesiana* (L.) Wight & Arn. Un ejemplar se quedó resguardado en el Herbario Medicinal del IMSS, pasando a formar parte de la colección de dicho herbario. Se le asignó el número de registro 16997 (Fig. 17).

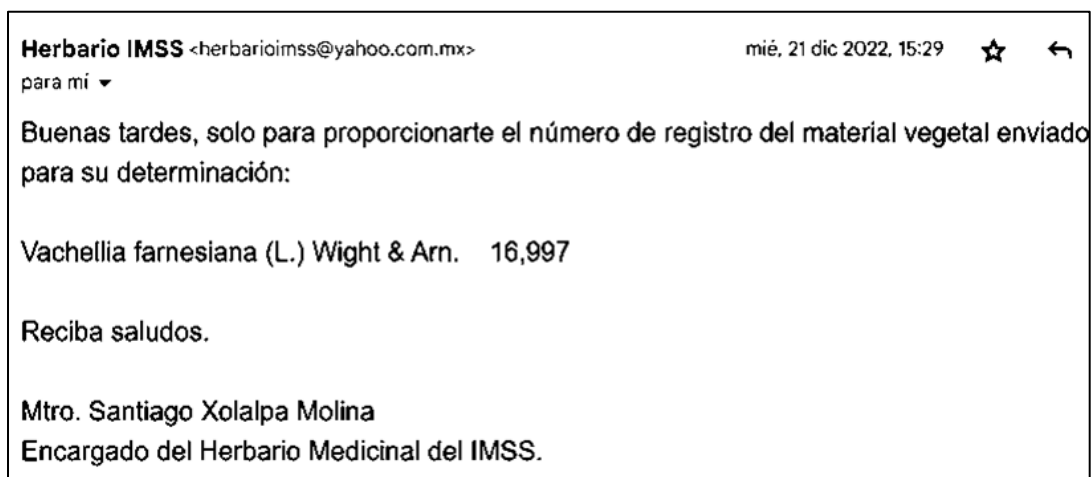


Figura 17. Comprobante de identificación y registro del material vegetal proporcionado por el Herbario Medicinal del IMSS.

### 7.2 GERMINACIÓN *IN VITRO*

Se ha reportado en diversos estudios que las semillas de las plantas leguminosas registran un porcentaje de germinación por debajo del 10% cuando no se aplica algún tipo de escarificación (152). En el presente trabajo se lograron establecer cultivos asépticos de semillas de *V. farnesiana*, obteniéndose una germinación mayor al 85% para ambos sitios de colecta, dicho resultado se vio influenciado directamente por la utilización de una escarificación química con ácido sulfúrico concentrado (existen ciertos tipos de semillas que poseen una cubierta impermeable al agua, lo cual impide la



absorción de este componente indispensable para que comience el proceso de germinación).

A los 5 días de incubación de los cultivos se pudo observar la emergencia de la radícula y de los cotiledones, a los 15 días ya se contaba con plántulas totalmente desarrolladas (Fig. 18), las mismas que fueron utilizadas como fuente de explantes para la inducción de callogénesis.

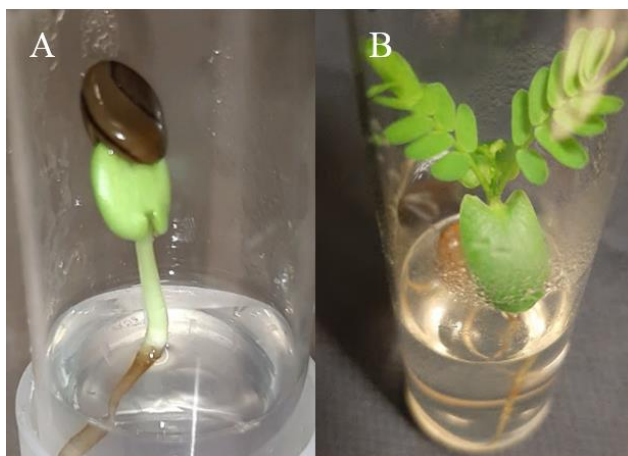


Figura 18. Plántulas de *V. farnesiana* obtenidas *in vitro* A) 5 días de cultivo y B) 15 días de cultivo.

## 7.3 INDUCCIÓN DE CALLO

### 7.3.1 Variedad Guanajuato

En todos los explantes evaluados se presentó formación de callo, sin embargo, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inducción respecto al tipo de explante utilizado (Fig. 19), siendo la hoja y el hipocótilo los explantes con un mayor porcentaje de inducción (92.5% y 85% respectivamente), mientras que la raíz fue el explante con los porcentajes de inducción más bajos (65.6%) (Hoja = Hipocótilo  $\geq$  Cotiledón > Raíz).

En lo que respecta al efecto del regulador de crecimiento utilizado, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inducción de callo con respecto a la citocinina utilizada (BAP=KIN > CONTROL), no obstante, se pudo observar que los cultivos suplementados con BAP contenían una mayor cantidad de callo producido, destacando las hojas, este explante presentó formación de callo en casi toda su superficie, siendo el tratamiento B<sub>4.64</sub>D<sub>13.57</sub>, donde prácticamente la totalidad del explante



se transformó en callo, teniendo este una apariencia friable con una coloración amarillo-verdosa (Fig. 20).

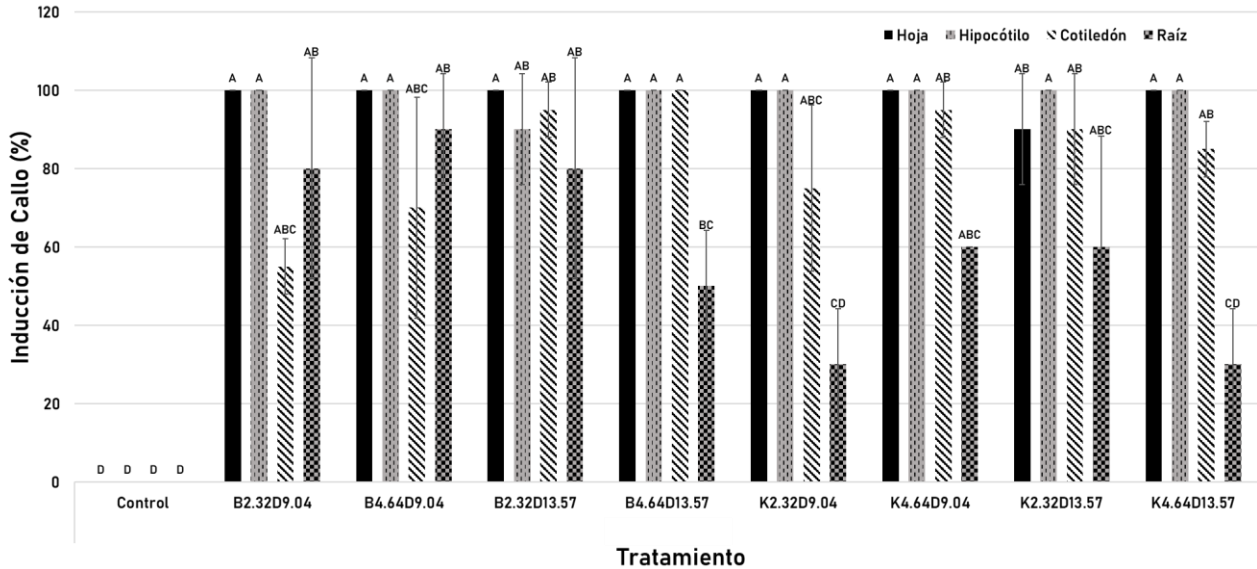


Figura 19. Porcentaje de inducción de callo en diferentes explantes de plántulas de *Vachellia farnesiana* derivadas de semillas provenientes de *Guanajuato*; tratadas con diferentes combinaciones de RCV. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Barras con distinta letra muestran diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

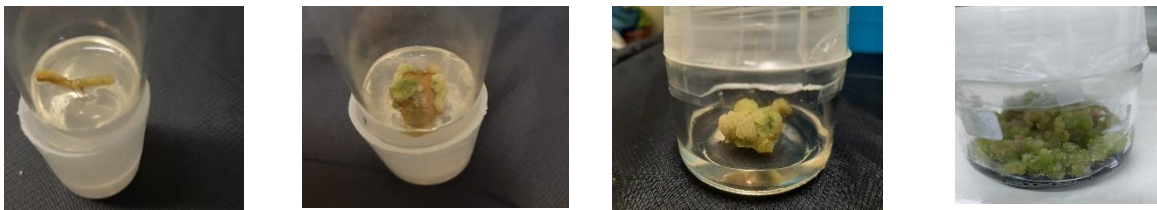


Figura 19. Cultivos de callos a partir de explantes de (a) Raíz, (b) Cotiledón, (c) Hipocótilo y (d) Hoja de *V. farnesiana* del sitio de distribución Guanajuato.

### 7.3.2 Variedad Querétaro

Se observó formación de callo en todos los explantes evaluados, no encontrándose diferencias significativas en el porcentaje de inducción con respecto al tipo de explante y citocinina utilizada (Fig. 21), sin embargo, igual a lo observado con la variedad de

Guanajuato, si se encontraron diferencias morfológicas en los callos obtenidos, siendo nuevamente las hojas los explantes que produjeron la mayor cantidad de callo (Fig. 22), además de ser abundante, tenía apariencia friable y de color amarillo verdoso, estas características se presentaron nuevamente en los cultivos que contenían BAP, para este caso en particular el tratamiento B<sub>2.32</sub>D<sub>13.57</sub> fue el que presentó la mayor formación de callo.

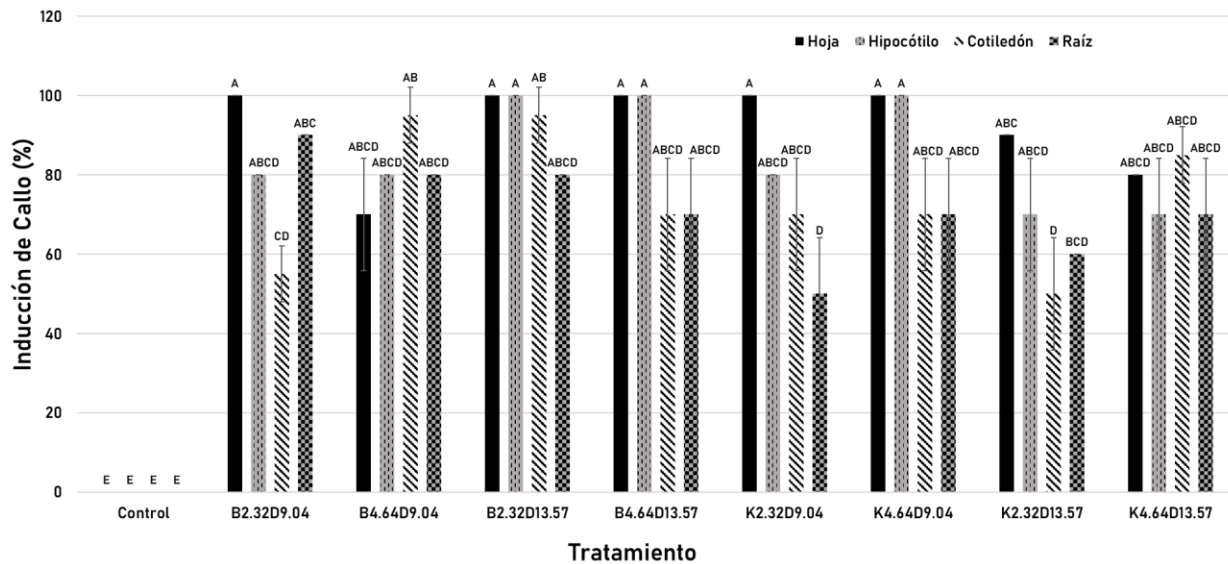


Figura 20. Porcentaje de inducción de callo en diferentes explantes de plántulas de *Vachellia farnesiana* derivadas de semillas provenientes de Querétaro; tratadas con diferentes combinaciones de RCV. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Barras con distinta letra muestran diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



Figura 21. Cultivos de callos a partir de explantes de (a) Raíz, (b) Cotiledón, (c) Hipocótilo y (d) Hoja de *V. farnesiana* del sitio de distribución Querétaro.

Los resultados obtenidos para la inducción de callo aquí reportados, son similares a los registrados para otras especies del género *Acacia*, donde también las hojas resultaron ser el explante con la mayor formación de callo, en este sentido, Gantait *et al.*, 2018 (153)

describen como las hojas de las diferentes especies de *Acacia* son los tipos de explantes que favorecen la mayor producción de callo.

En el presente trabajo la utilización de hojas como explante dio como resultado frecuencias de formación de callo del 100% para ambas variedades, esto en el medio de cultivo suplementado con BAP (4.64  $\mu\text{M}$ ) + 2,4-D (13.57  $\mu\text{M}$ ) para la variedad de Guanajuato y con BAP (2.32  $\mu\text{M}$ ) + 2,4-D (13.57  $\mu\text{M}$ ) para la de Querétaro, estos valores son más altos que los reportados para embriones cigóticos inmaduros de *V. farnesiana* (90%) (140), destacando que en este trabajo se logró la inducción de callo con la citocinina KIN. Por otra parte, Vengadesan *et al.*, 2002 (141) obtuvieron un 100% de callogenesis en *A. sinuata* donde se indujo la formación de callo a partir de explantes de hoja sembrados en medio MS suplementado con 2,4-D (4,52 mM) y BAP (2,22 mM). Por su parte Dhabhai y Batra, 2010 (142), lograron establecer cultivos de callo en *A. nilótica* a partir de explantes de nódulo cotiledonario en medio MS, suplementado con 2,4 D (0.4 mg/L) y BAP (0.2 mg/L).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, así como los reportados en la literatura indican que los reguladores del crecimiento vegetal utilizados con mayor frecuencia para la inducción de callo en plantas leguminosas son la auxina 2,4-D y la citocinina BAP, sin embargo, los resultados obtenidos en todos los casos parecen estar condicionados por el tipo de explante y la especie bajo estudio, destacando en este contexto los explantes foliares (hojas), el tejido que forma las hojas tiene una mayor capacidad de desdiferenciación, debido a que es un órgano fotosintético y está altamente especializada para la captura de luz y la fotosíntesis. Tiene una alta tasa metabólica y contiene células con cloroplastos (154), además tanto la hoja como el hipocótilo contienen células meristemáticas, que son células indiferenciadas capaces de dividirse y generar diferentes tipos de tejidos (155).

## 7.4 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES

La prueba cualitativa de Dragendorf arrojó resultados positivos para la presencia de alcaloides en los extractos de hoja y callo, esto para ambos sitios de colecta. Con respecto a la determinación del contenido, se encontró que las hojas de Querétaro muestran un significativamente mayor contenido de alcaloides ( $339.6 \pm 21$  mgEA/g

extracto seco). Este contenido de alcaloides presentes en las hojas, resulto ser 1.83 veces mayor que el encontrado en los cultivos de callo ( $163.18 \pm 34$  mgEA/g ES) (Fig. 29). Por otra parte, es de destacar que el análisis del contenido de alcaloides tomando la zona de colecta como variable, no presento diferencias (Fig. 23).

Los resultados encontrados en el presente trabajo son similares a lo reportado por Spartzak, et al., 2015 (156), donde los extractos de hoja de *Phyllanthus glaucus* contenían una concentración del alcaloide securinina 3.5 veces mayor (13.02 mg/g PS.) que los brotes producidos en cultivos *in vitro* (3.56 mg/g PS). Mientras que Robins et al. 1987 (157), reportan que las células en suspensión de *Cinchona pubescens* mantuvieron la capacidad de síntesis del alcaloide quinina, aunque en menor proporción que la concentración determinada en la corteza de especímenes adultos. Mientras que Abd'quadri-Abojukoro et al. (2022) (158) reportan contenidos de alcaloides en extractos de hojas de *A. nilotica* ( $132.36 \pm 2$ , mgEA/g), siendo menores a lo observado en el presente trabajo, incluso en lo determinado en los extractos de callo, para ambas zonas de distribución.

También se ha reportado que el ácido salicílico como elicitador produce un aumento en los rendimientos de 10-hidroxicamptotecina de hasta 25 veces en cultivos en suspensión de *C. acuminata* (115). Por otro lado, para la producción de alcaloides de la vinka se han utilizado cultivos en suspensión de *C. roseus* y mediante la radiación UV-B como elicitador abiótico se ha logrado aumentar la concentración de catarantina y vindolina, en 3 y 12 veces, respectivamente (100).

El mayor contenido de alcaloides determinado en las hojas con respecto a lo mostrado en los cultivos de callo puede deberse a la falta de diferenciación celular en los cultivos *in vitro* (7). Las células al diferenciarse adquieren una especialización para la biosíntesis y acumulación de metabolitos, lo que se asocia, entre otras cosas, a la presencia de orgánulos específicos para este fin, como las vacuolas (159).

En la literatura también podemos encontrar trabajos donde se reporta un mayor contenido de metabolitos en los cultivos *in vitro* con respecto a la biomasa de especímenes silvestres, de invernaderos o viveros, tal es el caso del ensayo realizado por Namdeo, Priya, y Bhosale (2012) (160) , donde el contenido máximo de camptotecina

(0.0768 % p/p) se encontró en plantas completas *in vitro* en comparación con las plantas de *Ophiorrhiza mungos* cultivadas *ex vitro* (0.0030 % p/p).

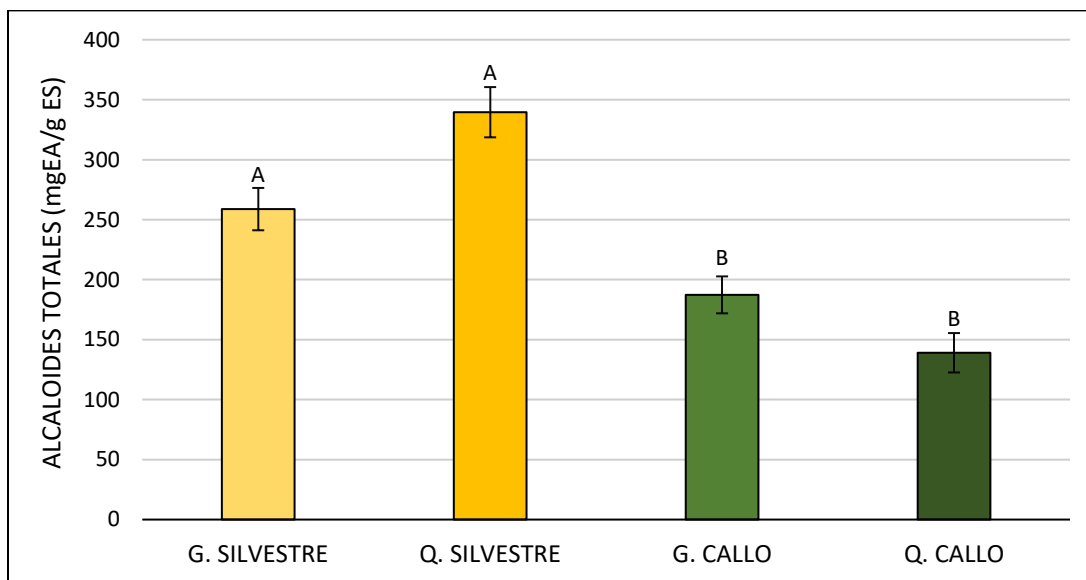


Figura 22. Contenido de alcaloides totales en extractos clorofórmicos de hojas y callos de *V. farnesiana* de dos zonas de distribución. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Barras con distinta letra muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

No obstante, de que se obtuvo menor contenido de alcaloides en la biomasa generada *in vitro* que en la recolectada de vida silvestre, es destacable que los cultivos de callo mantienen la capacidad de síntesis de este tipo de compuestos. Lo que hace que en este cultivo puedan implementarse técnicas de elicitación, lo que posibilita incrementar la producción de alcaloides en la biomasa generada mediante el cultivo *in vitro*. Se ha reportado que el ácido salicílico como elicitor produce un aumento de 25 veces en los rendimientos de 10-hidroxicamptotecina en cultivos en suspensión de *C. acuminata* (115). Así mismo, para la producción de alcaloides de la vinka se han utilizado cultivos en suspensión de *C. roseus* y mediante la radiación UV-B durante 5 minutos como elicitor abiótico se ha logrado aumentar la concentración de catarantina y vindolina en 3 y 12 veces respectivamente (100). Se ha reportado que este tipo de metabolitos, son los responsables de la actividad citotóxica en muchas especies como lo son *C. roseus* (161), *C. acuminata* (162) y *Ochrosia elliptica* (163).

## 7.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

La prueba del cloruro férrico arrojó resultados positivos para la presencia de fenoles en los extractos de hoja y de callo de ambos sitios de distribución. Por otro lado, la determinación cuantitativa de dichos metabolitos demostró que las hojas de Querétaro muestran el significativamente mayor contenido de fenoles totales ( $158.41 \pm 13$  mg EAG/g ES) (Fig. 24). Este contenido de compuestos fenólicos fue 2.16 veces mayor que la encontrada en los cultivos de callo ( $64.01 \pm 3$  mg EAG/g ES).

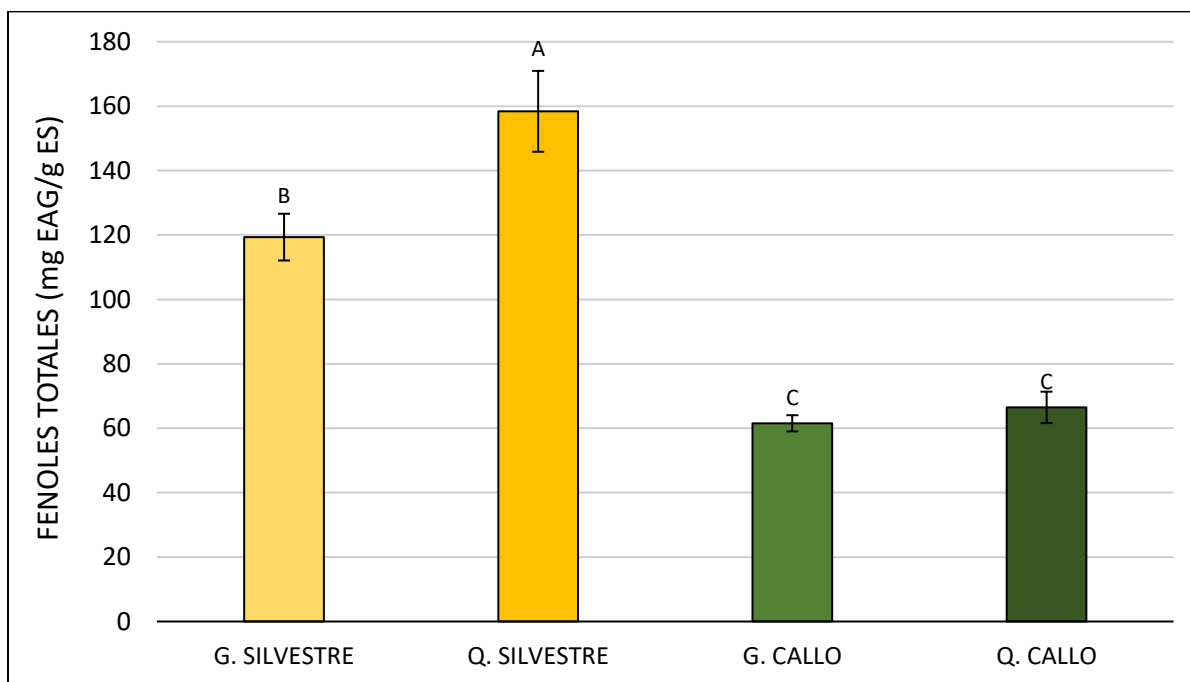


Figura 23. Contenido de fenoles totales en extractos clorofórmicos de hojas y callos de *V. farnesiana* de dos zonas de distribución. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Barras con distinta letra muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Es importante mencionar que, para el callo generado, no se observaron diferencias en el contenido de fenólicos totales respecto a la zona de distribución, mientras que para las hojas de especímenes adultos sí hay diferencias respecto a la zona de distribución (Fig. 24).

La mayor concentración del contenido de fenoles totales en extractos de especímenes adultos de vida silvestre en comparación con los extractos de cultivo *in vitro* puede atribuirse a las complejas interacciones entre las plantas y su entorno, las plantas que crecen en la vida silvestre a menudo están expuestas a una gama más amplia de factores estresantes ambientales, como la competencia con otras especies, cambios en la

disponibilidad de agua y luz solar, y la presencia de herbívoros y patógenos. Estos factores pueden inducir una mayor producción de fenoles como mecanismo de defensa, además, los polímeros formados a partir de compuestos fenólicos vegetales en la pared celular brindan soporte estructural y forman barreras para evitar la pérdida de humedad y la invasión de patógenos (164).

Dentro de este contexto, la variabilidad en cuanto al contenido de fenoles por sitio de distribución en especímenes adultos se debe a una serie de factores, incluyendo las condiciones ambientales y los factores genéticos, debido a que, al ser compuestos secundarios producidos por las plantas como una respuesta a las condiciones ambientales adversas, como la radiación solar intensa, las temperaturas extremas, la disponibilidad de agua y los ataques de patógenos. Estas condiciones pueden variar de un lugar a otro, o incluso recolectadas en diferentes estaciones del año, lo que podría influir en la producción de fenoles y, por lo tanto, en su concentración en las hojas. Además, la composición química de las plantas está influenciada por su material genético. Incluso dentro de una misma especie, puede haber variabilidad genética entre diferentes individuos. Algunos individuos pueden tener una mayor capacidad para producir fenoles en respuesta a factores ambientales, mientras que otros pueden tener una respuesta más limitada. (165).

Esta variabilidad se reduce ampliamente en el cultivo de tejidos, sin embargo, la concentración de fenoles totales puede ser menor en los cultivos de tejidos vegetales, por lo que, para aumentar la concentración de fenoles totales en los cultivos de tejidos vegetales, se pueden aplicar diferentes estrategias, estas incluyen exponer las plantas a estrés abiótico controlado, modificar la composición del medio de cultivo añadiendo precursores o inductores de la síntesis de fenoles, utilizar elicitores bióticos para desencadenar respuestas de defensa en las plantas y emplear la manipulación genética para aumentar la producción de fenoles (166).

Los resultados aquí presentados son similares a los reportadas por Gabr, *et al.*, 2018 (167) en donde se determinó el contenido de fenoles totales de extractos de hojas y vainas de diferentes especies del género *Acacia* recolectadas en Bilbeis, Egipto. Entre las cuales se encuentra *A. farnesiana* con concentraciones de que varían entre  $63.2 \pm 2.3$  a  $247.9 \pm 3.5$  mg EAG/g ES, en extractos de hojas recolectadas en diferentes



estaciones del año. Por otra parte las concentraciones obtenidas en la presente investigación resultaron ser menores que las reportadas por Ramli, *et al.*, 2011 (168), donde el contenido de fenoles totales en extracto de hojas de *A. farnesiana* fue  $209,78 \pm 3$  mg EAG/g ES.

La presencia de fenoles en los tejidos silvestres y los generados *in vitro* resulta de nuestro particular interés, dado que se ha encontrado que entre otros metabolitos secundarios, los fenoles presentes en *V. farnesiana* (169), son los responsables de la actividad citotóxica de dicha especie.

## 7.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRITERPENOS TOTALES

Mediante la prueba de Liebermann–Burchard se determinó la presencia de triterpenos en todos los extractos. En lo que respecta a la determinación cuantitativa, se encontró que los callos generados de la variedad de Guanajuato mostraron el significativamente mayor contenido de triterpenos totales ( $381.46 \pm 22$  mgEAU/g ES), resultando este contenido de triterpenos 1.63 veces mayor que el contenido registrado para las hojas provenientes de especímenes adultos ( $225.9 \pm 25$  mgEAU/g ES) (Fig. 25). Por otra parte, es de destacar que el contenido de triterpenos no es significativamente diferente con respecto a la zona de colecta (Fig. 25).

Los resultados encontrados en la presente investigación son similares a los reportadas por Taniguch, *et al.* (2002) (170), donde la cantidad total de triterpenos aislados en el callo de *Eriobotrya japonica* alcanzó los 50 mg/g PS. En particular se reporta que el contenido de ácido ursólico y ácido oleanólico fue menor en los tejidos del callo que en las hojas de la planta de vida silvestre, mientras que el contenido de los triterpenos: ácido corosólico y el ácido maslínico fue mayor los tejidos del callo (6.3 y 5.6 mg/g PS respectivamente) que en las hojas de la planta de vida silvestre (0.8 y 4.6 mg/g PS respectivamente). También se ha reportado un rendimiento de 3.1% de ácido betulínico, 1.88% de ácido oleanólico y 4.12% de ácido ursólico por gramo de peso seco a partir de extractos de cultivos de callo de *Lantana camara*, mientras que las hojas de la planta madre, utilizadas como control, mostraron ausencia total de ácido betulínico, y las



cantidades de ácidos oleanólico y ursólico presentes en ellas fueron sólo marginalmente superiores a las encontradas en cultivos *in vitro* (171).

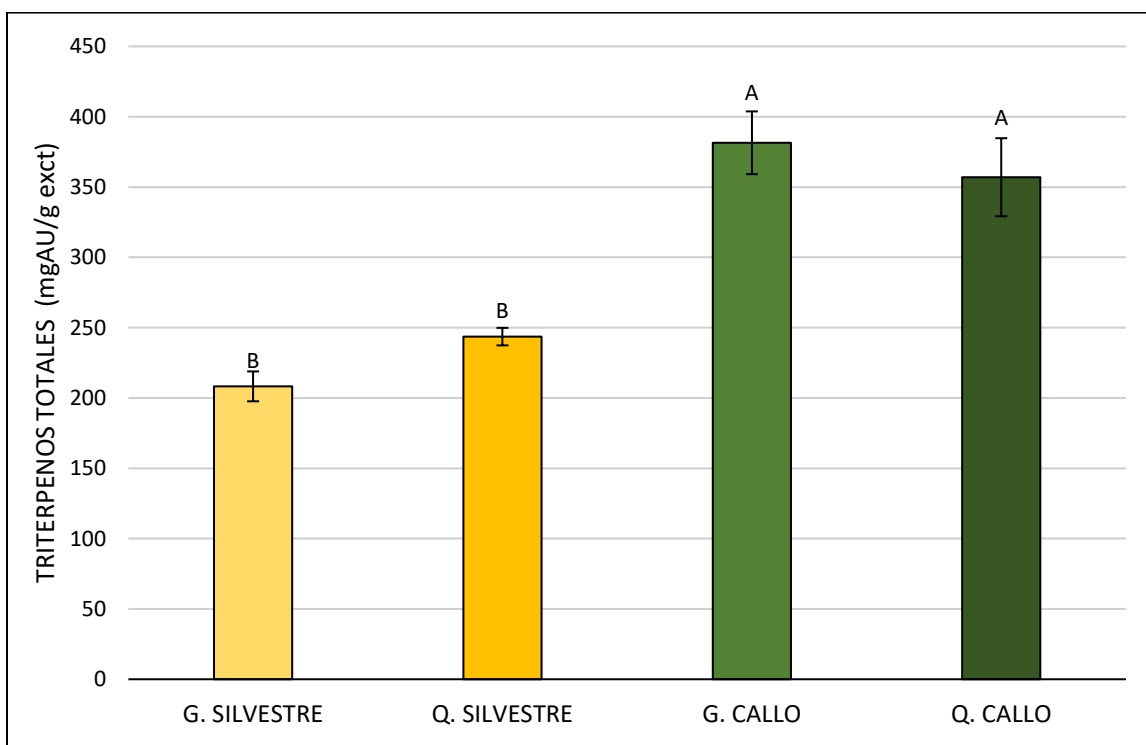


Figura 24. Contenido de triterpenos totales en extractos clorofórmicos de hojas y callos de *V. farnesiana* de dos zonas de distribución. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Barras con distinta letra muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

El mayor contenido de triterpenos totales encontrado en los cultivos de callo con respecto a lo determinado en las hojas, se debe a que estos compuestos forman parte de procesos celulares independientes de la especialización del tejido (172) y sobre todo debido a que son moléculas que forman parte integral de la membrana celular, al existir una mayor tasa de multiplicación que en las plantas de vida silvestre, también hay una mayor síntesis de este tipo de compuestos para satisfacer las necesidades del conjunto de células que forman el callo (173). Se ha reportado que este tipo de metabolitos, son los responsables de la actividad citotóxica en *V. farnesiana* (174), por lo que el hecho de que se tenga una mayor concentración en los cultivos de callo que en las hojas de ejemplares adultos es prometedor para la producción controlada de este tipo de metabolitos mediante el cultivo *in vitro*, sin embargo, es necesario realizar un fraccionamiento de los extractos para la elucidación de las moléculas específicas que

están produciendo la biomasa generada *in vitro* y así determinar si estos compuestos en específico son los responsables de la actividad citotóxica.

## 7.7 BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD

De manera generalizada, la viabilidad de las células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de los extractos de hoja y callo de los dos sitios de distribución, mostró una tendencia de disminución de la proliferación celular a las 48 y 72 horas con respecto al grupo control (sin extracto), encontrándose un menor porcentaje de viabilidad en 72 horas que en 48 horas de exposición, debido a que la actividad citotóxica depende del tiempo de exposición al compuesto o los compuestos bioactivos. También se utilizó como control positivo al paclitaxel (4.27 ng/mL), teniendo una viabilidad celular ante esta concentración del  $57.83 \pm 3.77$  % para las 48 horas de exposición al fármaco y de  $46.15 \pm 5.16$  % para las 72 horas de exposición.

Cabe destacar que se observó un efecto peculiar en la concentración más baja (5 µg/mL) de los extractos de callo, para los dos sitios de colecta, encontrándose un aumento de la viabilidad celular a las 48 h ( $118 \pm 1.6$  %), paradójicamente se produjo un mayor crecimiento que el grupo control (Fig. 5 B-D). Este comportamiento se denomina hormesis y es una respuesta adaptativa de las células y organismos a un impulso de estrés moderado causado por el efecto citotóxico del extracto a bajas concentraciones (175). Para el resto de las concentraciones evaluadas (10-100 µg/mL) bajo los dos tiempos de exposición, se observa un comportamiento dosis-dependiente, resultando en una viabilidad inversamente proporcional a la concentración del extracto, encontrándose un porcentaje de viabilidad menor a las 72 h (74.64 a 28.35 %).

(Fig. 26A-D). Mientras que, por el tipo de tejido (hojas vs callos), hay una menor viabilidad celular ( $28.67 \pm 1.64$  %) con los extractos de hoja sin importar la zona de distribución.

Con los datos de viabilidad celular, se calcularon las IC<sub>50</sub> para los diferentes extractos, encontrándose valores de IC<sub>50</sub> ≤ 150 µg/mL. Siendo el extracto de hojas de ejemplares adultos de Querétaro con la significativamente menor IC<sub>50</sub> ( $28.83 \pm 1.49$  µg/mL). Respecto al tipo de tejido vegetal, se observaron diferencias significativas, siendo los extractos de hoja con los valores de IC<sub>50</sub> menores (28-32 µg/mL), mientras que, por el sitio de distribución, se encontró que Querétaro posee valores menores de IC<sub>50</sub> (28-43

µg/mL), y finalmente, respecto al tiempo de exposición, a las 72 horas se observaron los valores menores de IC<sub>50</sub>, siendo hasta 3.35 veces menores a lo determinado para las 48 horas (Tab. 3). Debido a la complejidad del extracto no es posible asegurar que tipo de metabolito secundario tiene este efecto citotóxico, sin embargo, se puede encontrar una relación entre el alto contenido de alcaloides y fenoles totales en hojas y que en este tejido se encontraron valores de IC<sub>50</sub> menores. Por lo que se puede atribuir la bioactividad citotóxica a este tipo de metabolitos.

Tabla 3. Concentración inhibitoria media de los extractos clorofórmicos de hoja y callo de *Vachellia farnesiana* de dos sitios de distribución, bajo dos tiempos de exposición.

Tejido	Sitio de distribución	IC <sub>50</sub> 48 h (µg/mL)	IC <sub>50</sub> 72 h (µg/mL)
Hoja	Querétaro	88.47 ± 1.23 <sup>d</sup>	28.83 ± 1.49 <sup>c</sup>
	Guanajuato	109.7 ± 0.86 <sup>c</sup>	32.74 ± 1.40 <sup>c</sup>
Callo	Querétaro	125.1 ± 1.11 <sup>b</sup>	43.97 ± 1.88 <sup>b</sup>
	Guanajuato	150.4 ± 0.86 <sup>a</sup>	66.35 ± 1.41 <sup>a</sup>

Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. Letras distintas en columnas muestran diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey (p≤0.05).

Es importante recordar, que de acuerdo con el American National Cancer Institute (NCI), valores de IC<sub>50</sub> menores a 30 µg/mL para extractos vegetales, se pueden considerar como extractos crudos prometedores para la purificación en la obtención de nuevos quimioterapéuticos (81). En este sentido, Ayoub, *et al.* (2014) (82), consideran que concentraciones de hasta 100 µg/mL de extracto, pueden ser considerados como citotóxicos, siempre y cuando se sometan a un fraccionamiento el extracto e identificando y separando a los compuestos con dicha bioactividad.

Los resultados sobre citotoxicidad aquí reportados, son similares a los reportadas por Twilley, *et al.* (2017) (176), donde se encontró una IC<sub>50</sub> de 54,40 ± 2,00 µg/mL en extractos de hojas de *A. mellifera*, inclusive, en esta misma investigación se encontró una IC<sub>50</sub> mayor a la encontrada en el presente trabajo (185,00 ± 0,40 µg/mL); estos resultados fueron observados al probar ambas concentraciones de los extractos durante

72 horas contra una línea celular HeLa. Así mismo, se ha reportado que el ácido betulínico, un triterpeno aislado mediante fraccionamiento del extracto de la raíz de *V. farnesiana* mostro una  $IC_{50}$  de  $1.70 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$  contra la línea celular A549 (174), sin embargo, al tratarse de un compuesto aislado, la concentración inhibitoria media es mucho menor, pues, la cantidad necesaria para inducir un efecto citotóxico contra la línea celular cancerosa es menor.

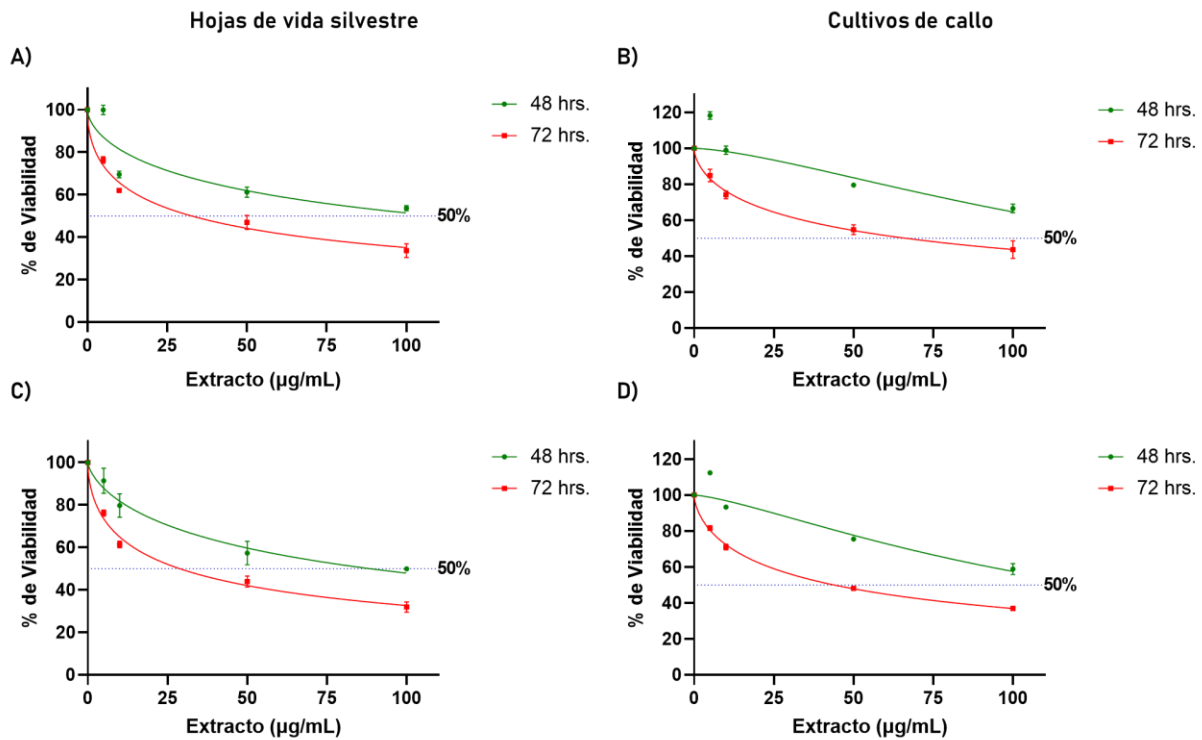


Figura 25. Figura 5. Curvas dosis-respuesta de la viabilidad de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de los extractos, derivadas de dos sitios de distribución y dos tipos de tejido. A) G-hoja silvestre, B) G- cultivos de callo, C) Q-hoja silvestre, D) Q-cultivos de callo. Los datos representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS

## 8. CONCLUSIONES

- Se estableció el cultivo aséptico de las semillas de *V. farnesiana*, empleando escarificación química con ácido sulfúrico concentrado, obteniéndose una germinación mayor a 85 % para las semillas de ambos sitios de colecta.
- El tipo de explante y RCV tienen influencia en la inducción de callo, siendo las hojas donde se produce una mayor cantidad de callo friable y abundante bajo los RCV 4.64  $\mu\text{M}$  de BAP + 13.57  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 2.32  $\mu\text{M}$  de BAP + 13.57  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, para la variedad de Guanajuato y Querétaro, respectivamente.
- El contenido de alcaloides y fenoles totales en la biomasa proveniente de la planta madre es significativamente mayor que la concentración en la biomasa generada *in vitro*. Mientras que el contenido de triterpenos totales en la biomasa proveniente de la planta madre es significativamente menor que la concentración en la biomasa generada *in vitro*.
- Los extractos de las cuatro fuentes de material vegetal mostraron citotoxicidad, siendo significativamente mayor la reducción en la viabilidad celular ante los extractos obtenidos a partir de hojas de ejemplares adultos para ambos sitios de colecta, determinándose una  $\text{IC}_{50}$  de 32.74  $\mu\text{g/mL}$  para Guanajuato y de 28.83  $\mu\text{g/mL}$  para Querétaro, a las 72 horas de exposición, lo que permitiría clasificar a los extractos como citotóxicos de acuerdo con el criterio del NCI. Por otro lado, si bien la concentración mostrada por los extractos obtenidos a partir de la biomasa producida *in vitro* fue mayor al criterio propuesto por el NCI, es posible considerarlos como citotóxicos una vez fraccionado el extracto e identificando los compuestos con dicha bioactividad.

## 9. PERSPECTIVAS

- Establecer las condiciones para el cultivo en suspensión y evaluar diferentes elicitores para incrementar la producción de metabolitos secundarios con potencial actividad citotóxica.
- Realizar un fraccionamiento biodirigido mediante cromatografía en columna y determinar el contenido de fenoles, alcaloides y triterpenos totales en cada una de las fracciones obtenidas.
- Evaluar la actividad citotóxica mediante el ensayo de viabilidad celular MTT con las fracciones.
- Identificar y cuantificar mediante TLC y HPLC los compuestos que se encuentren en las fracciones que hayan demostrado citotoxicidad.

## 10. REFERENCIAS

1. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. noviembre de 2012;12(11):767-75.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. 2021;149(4):778-89.
3. Shynu M, P. Gupta K, Saini M. Antineoplastic Potential of Medicinal Plants. *Recent Patents on Biotechnology*. 1 de agosto de 2011;5(2):85-94.
4. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 27 de marzo de 2020;83(3):770-803.
5. Yue W, Ming Q liang, Lin B, Rahman K, Zheng CJ, Han T, et al. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3 de marzo de 2016;36(2):215-32.
6. Bhojwani SS, Dantu PK. Tissue and Cell Culture. En: Bhojwani SS, Dantu PK, editores. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* [Internet]. India: Springer; 2013 [citado 31 de octubre de 2021]. p. 39-50. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_4)
7. Revutska A, Belava V, Golubenko A, Taran N, Chen M. Plant secondary metabolites as bioactive substances for innovative biotechnologies. *E3S Web Conf*. 2021;280:07014.
8. Wilken D, Jiménez González E, Hohe A, Jordan M, Gomez Kosky R, Schmeda Hirschmann G, et al. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W, editores. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2005 [citado 2 de noviembre de 2021]. p. 525-37. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_39](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_39)
9. Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, Abdel-Salam EM, Qahtan AA, et al. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*. junio de 2018;9(6):309.
10. Efferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*. 1 de febrero de 2019;5(1):50-9.



11. Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. enero de 2004 [citado 25 de febrero de 2022]; Disponible en: <https://scholars.tari.gov.tw/handle/123456789/16106>
12. Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villarreal MaL. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 1 de enero de 1998;59(3):173-7.
13. Hartwell JL. Plants used against cancer. A survey. [Continued.]. *Lloydia*. 1970;33:97-194.
14. Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr*. 1 de marzo de 2009;89(3):905-12.
15. Qi F, Yan Q, Zheng Z, Liu J, Chen Y, Zhang G. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. *J BUON*. abril de 2018;23(2):346-52.
16. Lin AS, Lin CR, Du YC, Lübken T, Chiang MY, Chen IH, et al. Acasiane A and B and Farnesirane A and B, Diterpene Derivatives From the Roots of *Acacia farnesiana*. *Planta Med*. febrero de 2009;75(3):256-61.
17. Mingning Q, Jie L, Yongxia S, Rong G, Baoyu Z, Jianjun L. Diosmetin Induces Apoptosis by Downregulating AKT Phosphorylation via P53 Activation in Human Renal Carcinoma ACHN Cells. *Protein & Peptide Letters*. 30 de septiembre de 2020;27(10):1022-8.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
19. Hölzel M, Bovier A, Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer*. mayo de 2013;13(5):365-76.
20. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 25 de febrero de 2010;29(8):1093-102.
21. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*. 25 de marzo de 2011;331(6024):1565-70.
22. Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*. 1 de febrero de 2019;54(2):407-19.

23. GLOBOCAN. Cancer today [Internet]. [citado 30 de octubre de 2021]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
24. CP W, E W, BW S. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention [Internet]. [citado 3 de abril de 2022]. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-Cancer-Research-For-Cancer-Prevention-2020>
25. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. *Journal of Nucleic Acids*. 21 de noviembre de 2010;2010:e543531.
26. Peters GJ. Novel Developments in the Use of Antimetabolites. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 4 de abril de 2014;33(4-6):358-74.
27. Venkatesh P, Kasi A. Anthracycline. 2020 [citado 30 de octubre de 2021]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538187>
28. Tremont A, Lu J, Cole JT. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *Ochsner Journal*. 21 de diciembre de 2017;17(4):405-11.
29. Seca AML, Pinto DCGA. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2018;19(1):263.
30. Flores RAG, Guerra RST, Guerra PT, Padilla CR. Impact of biotechnology in immunology. *Med Univer*. 2008;10(39):92-101.
31. OECD. OECD Factbook 2013: Economic, Environmental and Social Statistics [Internet]. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2018 [citado 26 de julio de 2022]. Disponible en: [https://www.oecd-ilibrary.org/economics/oecd-factbook-2013\\_factbook-2013-en](https://www.oecd-ilibrary.org/economics/oecd-factbook-2013_factbook-2013-en)
32. Muñoz E. Biotecnología, sociedad y economía: una visión personal. *Arbor*. 30 de agosto de 2014;190(768):a147-a147.
33. DaSilva EJ. The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind. *Electronic Journal of Biotechnology*. diciembre de 2004;7(3):01-2.
34. Cowan CW, Watson PJ, Benco NL, editores. *The Origins of agriculture: an international perspective*. Washington: Smithsonian Institution Press; 1992. 224 p. (Smithsonian series in archaeological inquiry).
35. Demirci F. *Natural Products Isolation, 2nd Edition (Methods in Biotechnology, Vol. 20)* Edited by S. D. Sarker (University of Ulster), Z. Latif (Molecular Nature Limited), and A. I. Gray (University of Strathclyde). Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006. xii + 515 pp. 15.5 x 23.5 cm. \$135.00. ISBN 1-58829-447-1 (Hardcover). eISBN 1-59259-955-9 (e-book). *J Nat Prod*. 1 de abril de 2007;70(4):712-712.

36. Renneberg R, Berkling V, Lorocho V. Green Biotechnology. En 2017. p. 233-79.
37. Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. En: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, editores. Plant Cell Culture Protocols [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [citado 26 de julio de 2022]. p. 3-13. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
38. Phillips GC, Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. In Vitro CellDevBiol-Plant. 1 de junio de 2019;55(3):242-57.
39. Sudheer WN, Praveen N, Al-Khayri JM, Jain SM. Chapter 3 - Role of plant tissue culture medium components. En: Chandra Rai A, Kumar A, Modi A, Singh M, editores. Advances in Plant Tissue Culture [Internet]. Academic Press; 2022 [citado 28 de julio de 2022]. p. 51-83. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323907958000126>
40. George EF, Hall MA, Klerk GJD. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. En: George EF, Hall MA, Klerk GJD, editores. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1 The Background [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [citado 28 de julio de 2022]. p. 65-113. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3)
41. Suárez Padrón IE. Cultivo de Tejidos Vegetales [Internet]. Ed. Fondo Editorial Universidad de Córdoba; 2020 [citado 3 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
42. Rademacher W. Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. J Plant Growth Regul. 1 de diciembre de 2015;34(4):845-72.
43. Geiss G, Gutierrez L, Bellini C. Adventitious root formation: new insights and perspective. En Blackwell Publishing; 2009 [citado 29 de diciembre de 2022]. p. 127-56. Disponible en: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-118602>
44. George EF, Hall MA, Klerk GJD. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: George EF, Hall MA, Klerk GJD, editores. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1 The Background [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [citado 29 de diciembre de 2022]. p. 175-204. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_5)
45. Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryam, Rafay M, et al. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences. 2013;13(4):539-47.
46. Vijayalakshmi U, Shourie A. Remedial effect of ascorbic acid and citric acid on oxidative browning of *Glycyrrhiza glabra* callus cultures. BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology [Internet]. 2016 [citado 29 de agosto de 2022];97(3). Disponible en:

<http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-80c76898-b29d-47f2-85e1-4b17964f36f9>

47. Yam TW, Ernst R, Arditti J, Nair H, Weatherhead MA. Charcoal in orchid seed germination and tissue culture media: a review. *Lindleyana*. 1990;5(4):256-65.
48. Verde D dos SV, Mendes MI de S, Souza A da S, Pinto CR, Nobre LVC, Melo JE dos S, et al. Ácido ascórbico e polivinilpirrolidona no cultivo in vitro de *Dioscorea* spp. *Research, Society and Development*. 22 de julio de 2021;10(9):e10510917812-e10510917812.
49. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 1 de enero de 2015;9:293-304.
50. Panchawat S, Ameta C. Medicinal Importance of Plant Metabolites. En: *Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2021 [citado 30 de octubre de 2021]. p. 1-19. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119640929.ch1>
51. Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 2011;3(2):232-49.
52. Avalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*. 2009;2(3).
53. Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. Chapter 11 - Terpenoids. En: Badal S, Delgoda R, editores. *Pharmacognosy* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [citado 31 de octubre de 2021]. p. 233-66. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021040000111>
54. Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*. 1 de abril de 2016;82:9-22.
55. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. John Wiley & Sons; 2008. 387 p.
56. Ahmed E, Arshad M, Khan MZ, Amjad MS, Sadaf HM, Riaz I, et al. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J Pharmacogn Phytochem*. 2017;6(2):205-14.
57. Hegnauer R. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*. 1 de enero de 1988;27(8):2423-7.
58. Roy A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *International Journal of Plant Biotechnology*. 1 de septiembre de 2017;3:1-9.

59. Eagleson M, 1945-. Concise encyclopedia chemistry [Internet]. Walter de Gruyter; 1994 [citado 1 de noviembre de 2021]. Disponible en: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Concise+encyclopedia+chemistry&author=Eagleson%2C+Mary&publication\\_year=1994](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Concise+encyclopedia+chemistry&author=Eagleson%2C+Mary&publication_year=1994)
60. Jez JM. Structural biology of plant sulfur metabolism: from sulfate to glutathione. *Journal of Experimental Botany*. 19 de agosto de 2019;70(16):4089-103.
61. Chan KX, Phua SY, Van Breusegem F. Secondary sulfur metabolism in cellular signalling and oxidative stress responses. *Journal of Experimental Botany*. 19 de agosto de 2019;70(16):4237-50.
62. Moons A. Regulatory and Functional Interactions of Plant Growth Regulators and Plant Glutathione S-Transferases (GSTs). En: Litwack G, editor. *Vitamins & Hormones* [Internet]. Academic Press; 2005 [citado 2 de noviembre de 2021]. p. 155-202. (Plant Hormones; vol. 72). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672905720057>
63. Hu L, Shen X, Jiang H, Lou L, Ding H, Shao Y, et al. Vinblastine derivatives, their preparation, use and pharmaceutical compositions comprising the said derivatives [Internet]. US8168647B2, 2012 [citado 30 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US8168647B2/en>
64. Silva JS, Moura MD, Oliveira RAG, Diniz MFF, Barbosa-Filho JM. Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine*. 1 de enero de 2003;10(2):221-32.
65. Zhang R, Alushin GM, Brown A, Nogales E. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell*. 13 de agosto de 2015;162(4):849-59.
66. Mitchison TJ. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. *MBoC*. 1 de enero de 2012;23(1):1-6.
67. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 de septiembre de 2018;28(17):2816-26.
68. Lorence A, Nessler CL. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*. 1 de octubre de 2004;65(20):2735-49.
69. Stiborová M, Černá V, Moserová M, Mrízová I, Arlt VM, Frei E. The Anticancer Drug Ellipticine Activated with Cytochrome P450 Mediates DNA Damage Determining Its Pharmacological Efficiencies: Studies with Rats, Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRN<sup>TM</sup>) Mice and Pure Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2015;16(1):284-306.

70. Dalton LK, Demerac S, Elmes BC, Loder JW, Swan JM, Teitei T. Synthesis of the tumour-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-methoxyellipticine, and related pyrido[4,3-b]carbazoles. *Aust J Chem.* 1967;20(12):2715-27.
71. Centelles JJ, Imperial S. Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Offarm: farmacia y sociedad.* 2010;29(4 (JUL-AGO)):68-75.
72. Alqahtani FY, Aleanizy FS, El Tahir E, Alkahtani HM, AlQuadeib BT. Chapter Three - Paclitaxel. En: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 17 de noviembre de 2022]. p. 205-38. (Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology; vol. 44). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871512518300165>
73. Walum E, Hedander J, Garberg P. Research perspectives for pre-screening alternatives to animal experimentation: On the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large sets of chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1 de septiembre de 2005;207(2, Supplement):393-7.
74. Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. En: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editores. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [citado 20 de noviembre de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>
75. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 1 de noviembre de 2016;17(14):1213-21.
76. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity.* abril de 2005;73(4):1907-16.
77. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2 de noviembre de 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
78. Khatibi S, Taban ZF, Roushandeh AM. In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Portulaca oleracea Ethanolic Extracton on HeLa Cell Line. *Gene Cell Tissue* [Internet]. 2017 [citado 5 de junio de 2023];4(1). Disponible en: <https://brieflands.com/articles/gct-13301.html#abstract>
79. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 6 de enero de 2018;2018(6):pdb.prot095497.



80. Rezadoost MH, Kumleh HH, Ghasempour A. Cytotoxicity and apoptosis induction in breast cancer, skin cancer and glioblastoma cells by plant extracts. *Mol Biol Rep.* 1 de octubre de 2019;46(5):5131-42.
81. Boik J. Natural compounds in cancer therapy. *Natural compounds in cancer therapy* [Internet]. 2001 [citado 10 de abril de 2023]; Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013083846>
82. Ayoub IM, El-Shazly M, Lu MC, Singab ANB. Antimicrobial and cytotoxic activities of the crude extracts of *Dietes bicolor* leaves, flowers and rhizomes. *South African Journal of Botany.* 1 de noviembre de 2014;95:97-101.
83. Garcia-Oliveira P, Otero P, Pereira AG, Chamorro F, Carpena M, Echave J, et al. Status and Challenges of Plant-Anticancer Compounds in Cancer Treatment. *Pharmaceuticals.* febrero de 2021;14(2):157.
84. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *International Journal of Cancer.* 2007;121(10):2225-32.
85. Nöthlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *American Journal of Epidemiology.* 15 de octubre de 2007;166(8):924-31.
86. Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, Ahn SM, Kwon SS, Lee KH, et al. Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules.* abril de 2011;16(4):3338-44.
87. Guo Y, Zhu H, Weng M, Wang C, Sun L. Chemopreventive effect of Betulinic acid via mTOR -Caspases/Bcl2/Bax apoptotic signaling in pancreatic cancer. *BMC Complement Med Ther.* 8 de junio de 2020;20(1):178.
88. Gheorgheosu D, Duicu O, Dehelean C, Soica C, Muntean D. Betulinic acid as a potent and complex antitumor phytochemical: a minireview. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(7):936-45.
89. Soica C, Danciu C, Savoiu-Balint G, Borcan F, Ambrus R, Zupko I, et al. Betulinic Acid in Complex with a Gamma-Cyclodextrin Derivative Decreases Proliferation and in Vivo Tumor Development of Non-Metastatic and Metastatic B164A5 Cells. *Int J Mol Sci.* 9 de mayo de 2014;15(5):8235-55.
90. Mukherjee R, Kumar V, Srivastava SK, Agarwal SK, Burman AC. Betulinic Acid Derivatives as Anticancer Agents: Structure Activity Relationship. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents).* 1 de mayo de 2006;6(3):271-9.
91. Circioban D, Ledeti A, Vlase G, Moaca A, Ledeti I, Farcas C, et al. Thermal degradation, kinetic analysis and evaluation of biological activity on human



- melanoma for artemisinin. *J Therm Anal Calorim.* 1 de octubre de 2018;134(1):741-8.
92. Wong YK, Xu C, Kalesh KA, He Y, Lin Q, Wong WSF, et al. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Medicinal Research Reviews.* 2017;37(6):1492-517.
  93. Slezakova S, Ruda-Kucerova J. Anticancer Activity of Artemisinin and its Derivatives. *Anticancer Research.* 1 de noviembre de 2017;37(11):5995-6003.
  94. Kong LY, Tan RX. Artemisinin, a miracle of traditional Chinese medicine. *Nat Prod Rep.* 19 de noviembre de 2015;32(12):1617-21.
  95. Wilken D, Jiménez González E, Hohe A, Jordan M, Gomez Kosky R, Schmeda Hirschmann G, et al. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W, editores. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2005 [citado 5 de junio de 2023]. p. 525-37. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_39](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_39)
  96. Narayani M, Srivastava S. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochem Rev.* 1 de diciembre de 2017;16(6):1227-52.
  97. Arora K, Rai MK, Sharma AK. Tissue culture mediated biotechnological interventions in medicinal trees: recent progress. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 1 de agosto de 2022;150(2):267-87.
  98. Jha AK, Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology.* 1 de enero de 2022;119:579-91.
  99. Marchev AS, Yordanova ZP, Georgiev MI. Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology.* 18 de mayo de 2020;40(4):443-58.
  100. Ramani S, Jayabaskaran C. Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *J Mol Signal.* 25 de abril de 2008;3:9.
  101. Cai Z, Kastell A, Speiser C, Smetanska I. Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability. *Appl Biochem Biotechnol.* septiembre de 2013;171(2):330-40.
  102. Barrales-Cureño HJ, Ramos Valdivia AC, Soto Hernández M. Increased Production of Taxoids in Suspension Cultures of *Taxus globosa* after Elicitation. *Future Pharmacology.* marzo de 2022;2(1):45-54.

103. Yousef GG, Seigler DS, Grusak MA, Rogers RB, Knight CTG, Kraft TFB, et al. Biosynthesis and Characterization of <sup>14</sup>C-Enriched Flavonoid Fractions from Plant Cell Suspension Cultures. *J Agric Food Chem*. 1 de marzo de 2004;52(5):1138-45.
104. Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y, Aziz SGG. Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomed Pharmacother*. octubre de 2018;106:239-46.
105. Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*. 17 de diciembre de 1997;59(1):39-52.
106. Sottomayor M, Lopes Cardoso I, Pereira LG, Ros Barceló A. Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry Reviews*. 1 de enero de 2004;3(1):159-71.
107. Rathore P, Roy A, Karnatak H. Modelling the vulnerability of *Taxus wallichiana* to climate change scenarios in South East Asia. *Ecological Indicators*. 1 de julio de 2019;102:199-207.
108. Changxing L, Galani S, Hassan F ul, Rashid Z, Naveed M, Fang D, et al. Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 de diciembre de 2020;132:110918.
109. Kadkade P. Formation of podophyllotoxins by *Podophyllum peltatum* tissue cultures. *Naturwissenschaften* 1981; 68(9): 481-2.
110. Rahnamaie-Tajadod R, Loke KK, Goh HH, Mohd Noor N. Differential Gene Expression Analysis in Polygonum minus Leaf Upon 24 hours of Methyl Jasmonate Elicitation. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:109.
111. van Fürden B, Humburg A, Fuss E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*. 1 de julio de 2005;24(5):312-7.
112. Dučaiová Z, Petruřová V, Repčák M. Salicylic acid regulates secondary metabolites content in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biologia*. 1 de octubre de 2013;68(5):904-9.
113. Rezaei A, Ghanati F, Behmanesh M, Mokhtari-Dizaji M. Ultrasound-Potentiated Salicylic Acid-Induced Physiological Effects and Production of Taxol in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Cell Culture. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 1 de noviembre de 2011;37(11):1938-47.
114. Martin KP, Zhang CL, Hembrom ME, Slater A, Madassery J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an

- anticancer drug) and rapid propagation. *Plant Biotechnol Rep.* 1 de junio de 2008;2(2):163-9.
115. Pi Y, Jiang K, Hou R, Gong Y, Lin J, Sun X, et al. Examination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* plant and cell culture, and the affected yields under several cell culture treatments. *Biocell.* diciembre de 2010;34(3):139-43.
116. Wilson P. New combinations in the genus *Vachellia* (Fabaceae: Mimosoideae) from Australia. *Telopea.* 27 de abril de 2006;11:233-44.
117. Maslin BR, Miller JT, Seigler DS. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Aust Systematic Bot.* 2003;16(1):1-18.
118. Seigler DS. Phytochemistry of *Acacia*—sensu lato. *Biochemical Systematics and Ecology.* 1 de agosto de 2003;31(8):845-73.
119. Batiha GES, Akhtar N, Alsayegh AA, Abusudah WF, Almohmadi NH, Shaheen HM, et al. Bioactive Compounds, Pharmacological Actions, and Pharmacokinetics of Genus *Acacia*. *Molecules.* enero de 2022;27(21):7340.
120. Atiya A, Majrashi T, Akhtar S, Khan AA, Asiri AMS, Al-Zahrana HJ, et al. The value of Genus *Acacia* in arid and semi-arid environments for the treatment of chronic inflammatory diseases. *Phytomedicine Plus.* 1 de agosto de 2022;2(3):100315.
121. Adhikari D, Rangra NK. Antimicrobial activities of *Acacia* genus: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2 de enero de 2023;13(2):45.
122. Alain KY, Tamfu AN, Kucukaydin S, Ceylan O, Cokou Pascal AD, Félicien A, et al. Phenolic profiles, antioxidant, anti-quorum sensing, antibiofilm and enzyme inhibitory activities of selected *Acacia* species collected from Benin. *LWT.* 15 de diciembre de 2022;171:114162.
123. Zubair M, Azeem M, Mumtaz R, Younas M, Adrees M, Zubair E, et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Acacia nilotica* and their anticancer, antidiabetic and antioxidant efficacy. *Environmental Pollution.* 1 de julio de 2022;304:119249.
124. Barapatre A, Meena AS, Mekala S, Das A, Jha H. In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 1 de mayo de 2016;86:443-53.
125. Mutai C, Abatis D, Vagias C, Moreau D, Roussakis C, Roussis V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry.* 1 de abril de 2004;65(8):1159-64.

126. Ganamé HT, Karanga Y, Tapsoba I, Dicato M, Diederich MF, Cerella C, et al. Phytochemical Screening and Antioxidant and Cytotoxic Effects of *Acacia macrostachya*. *Plants*. julio de 2021;10(7):1353.
127. Parrotta JA. The role of plantation forests in rehabilitating degraded tropical ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 1 de julio de 1992;41(2):115-33.
128. Clarke HD, Seigler DS, Ebinger JE. *Acacia farnesiana* (Fabaceae: Mimosoideae) and Related Species from Mexico, the Southwestern U.S., and the Caribbean. *Systematic Botany*. 1989;14(4):549-64.
129. Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 1 de noviembre de 2011;6(11):1720-31.
130. Gouvea D, Gobbo-Neto L, Lopes N. The Influence of Biotic and Abiotic Factors on the Production of Secondary Metabolites in Medicinal Plants. En: *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*. 2012. p. 419-52.
131. Vengadesan G, Ganapathi A, Amutha S, Selvaraj N. In vitro propagation of *Acacia* species—a review. *Plant Science*. 1 de octubre de 2002;163(4):663-71.
132. Claudia DP, Mario CH, Arturo NO, Omar Noel MC, Antonio NC, Teresa RA, et al. Phenolic Compounds in Organic and Aqueous Extracts from *Acacia farnesiana* Pods Analyzed by ULPS-ESI-Q-oo/TOF-MS. In Vitro Antioxidant Activity and Anti-Inflammatory Response in CD-1 Mice. *Molecules*. septiembre de 2018;23(9):2386.
133. Wang YL, Liu HF, Shi XJ, Wang Y. Antiproliferative activity of Farnesol in HeLa cervical cancer cells is mediated via apoptosis induction, loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and PI3K/Akt signalling pathway. *J BUON*. junio de 2018;23(3):752-7.
134. Morales-Domínguez JF, de León DCSD, Garcidueñas-Piña C, Pérez-Molphe-Balch E. Germination, *in vitro* propagation and soil acclimatization of *Acacia farnesiana* and *Prosopis laevigata*. *South African Journal of Botany*. 1 de agosto de 2019;124:345-9.
135. Mittal A, Agarwal R, Gupta SC. In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* — a leguminous tree. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 1 de octubre de 1989;19(1):65-70.
136. Torres LA, Suarez IE, Gatti K. Propagación in vitro de acacia mangium willd. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 1 de julio de 2013;11(1):81-7.

137. Rathore JS, Rai MK, Shekhawat NS. Induction of somatic embryogenesis in gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd]. *Physiol Mol Biol Plants*. octubre de 2012;18(4):387-92.
138. Kaur K, Kant U. Clonal propagation of *Acacia catechu* Willd. by shoot tip culture. *Plant Growth Regulation*. 1 de julio de 2000;31(3):143-5.
139. Al-Joboury K. In vitro propagation of *Acacia farnesiana*. *Journal of Scientific Research and Advances*. 1 de enero de 2012;23:29-34.
140. Ortiz BOC, Reyes MEP, Balch EPM. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A. schaffneri*. *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 1 de julio de 2000;36(4):268-72.
141. Vengadesan G, Ganapathi A, Anbazhagan VR, Anand RP. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 1 de enero de 2002;38(1):52-7.
142. Dhabhai K, Batra A. Hormonal regulation impact on regeneration of *Acacia nilotica* L. a nitrogen fixing tree. *World Applied Sciences Journal*. 2010;11(9):1148-53.
143. Morales-Domínguez JF, de León DCSD, Garcidueñas-Piña C, Pérez-Molphe-Balch E. Germination, in vitro propagation and soil acclimatization of *Acacia farnesiana* and *Prosopis laevigata*. *South African Journal of Botany*. 1 de agosto de 2019;124:345-9.
144. Villarreal Garza JA, Rocha Estrada A, Cárdenas-Ávila ML, Moreno Limón S, González Álvarez M, Vargas López V. Caracterización morfológica, viabilidad y germinación de semillas de mezquite y huizache en el noreste de México. *Phyton (Buenos Aires)*. diciembre de 2013;82(2):169-74.
145. Wall ME, Wani MC, Brown DM, Fullas F, Olwald JB, Josephson FF, et al. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*. noviembre de 1996;3(3):281-5.
146. Coy Barrera CA, Parra J, Cuca Suarez LE. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Elementos*. 2014;4(4):31-9.
147. Bermejo de Zaa A de los Á, Pereira Cabrera S, Cintra Jorge ML, Morales Torres G. Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. octubre de 2014;13(5):670-80.
148. Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J Pharm Sci*. 1 de enero de 2008;32:17-20.

149. ZhongPing Y, XinChen S, DongMing L, ShaoFu W, JiGuang C, YueHong Z. A study on ultrasonic-assisted extraction of total triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* leaves. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*. 2010;32(2):373-7.
150. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1 de enero de 1965;16(3):144-58.
151. Freschney RI. Culture of Animal Cells: a manual of basic technique. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*. 2005;642-642.
152. Villarreal Garza JA, Rocha Estrada A, Cárdenas-Ávila ML, Moreno Limón S, González Álvarez M, Vargas López V. Caracterización morfométrica, viabilidad y germinación de semillas de mezquite y huizache en el noreste de México. *Phyton (Buenos Aires)*. diciembre de 2013;82(2):169-74.
153. Gantait S, Kundu S, Das PK. Acacia: An exclusive survey on *in vitro* propagation. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 1 de abril de 2018;17(2):163-77.
154. Takemori NK, Marschner R, Quoirin M, Bona C, Zanette F. Anatomical study of *Racosperma* (ex-*Acacia*) mangium tissues cultured *in vitro*. *Braz arch biol technol [Internet]*. 7 de octubre de 2010 [citado 5 de julio de 2023];43. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/babt/a/YjdVpYPfvVkVBPxw34X4PXv/?lang=en>
155. Yun BW, Yan Z, Amir R, Hong S, Jin YW, Lee EK, et al. Plant natural products: history, limitations and the potential of cambial meristematic cells. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1 de enero de 2012;28(1):47-60.
156. Spzarak B, Dybowski F, Krauze-Baranowska M. Analysis of Securinega-type alkaloids from *Phyllanthus glaucus* biomass. *Phytochemistry Letters*. 1 de marzo de 2015;11:353-7.
157. Robins RJ, Hanley AB, Richards SR, Fenwick GR, Rhodes MJC. Uncharacteristic alkaloid synthesis by suspension cultures of *Cinchona pubescens* fed with L-tryptophan. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 1 de enero de 1987;9(1):49-59.
158. Abd'quadri-Abojukoro AN, Nkadimeng SM, McGaw LJ, Nsahlai IV. Phytochemical composition and cytotoxicity of ethanolic extracts of some selected plants. *Journal of Applied Animal Research*. 31 de diciembre de 2022;50(1):656-65.
159. N. Shitan, K. Yazaki. Accumulation and Membrane Transport of Plant Alkaloids. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 1 de agosto de 2007;8(4):244-52.
160. Namdeo AG, Priya T, Bhosale BB. Micropropagation and production of camptothecin form *in vitro* plants of *Ophiorrhiza mungos*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1 de febrero de 2012;2(2, Supplement):S662-6.



161. Mistry V, Darji S, Tiwari P, Sharma A. Engineering *Catharanthus roseus* monoterpenoid indole alkaloid pathway in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 de abril de 2022;106(7):2337-47.
162. Dayan A. *Camptotheca acuminata*: The source of the anti-cancer drugs, camptothecin, topotecan and irinotecan. En: *Modern Medicines from Plants*. CRC Press; 2023.
163. El-shiekh RA, Al-Mahdy DA, Hifnawy MS, Abdel-sattar EA. Pharmacognostical study of *Ochrosia elliptica* Labill. (Apocynaceae). *J App Pharm Sci*. 8 de mayo de 2019;9,(5):049-57.
164. Lewis NG. Plant Phenolics. En: *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press; 1993.
165. Josipović A, Sudar R, Sudarić A, Jurković V, Matoša Kočar M, Markulj Kulundžić A. Total phenolic and total flavonoid content variability of soybean genotypes in eastern Croatia. *Croatian journal of food science and technology*. 20 de diciembre de 2016;8(2):60-5.
166. Koutroumpi SK. Elicitation, A Mechanistic Approach to Change the Metabolic Pathway of Plants to Produce Pharmacological Important Compounds in *In-vitro* Cell Cultures. *GJES*. 12 de julio de 2021;8(1):1-7.
167. Gabr S, Nikles S, Pferschy Wenzig EM, Ardjomand-Woelkart K, Hathout RM, El-Ahmady S, et al. Characterization and optimization of phenolics extracts from *Acacia* species in relevance to their anti-inflammatory activity. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1 de junio de 2018;78:21-30.
168. Ramli S, Harada K ichi, Ruangrunsi N. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Leaves Ethanolic Extract. *Pharmacognosy Journal*. 1 de julio de 2011;3(23):50-8.
169. Qiu M, Liu J, Su Y, Guo R, Zhao B, Liu J. Diosmetin Induces Apoptosis by Downregulating AKT Phosphorylation via P53 Activation in Human Renal Carcinoma ACHN Cells. *Protein and Peptide Letters*. 1 de octubre de 2020;27(10):1022-8.
170. Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, Takamatsu Y, Ito H, Hatano T, et al. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*. 1 de febrero de 2002;59(3):315-23.
171. Srivastava P, Chaturvedi R. Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids—betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid—in cell cultures of *Lantana camara* L. *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 1 de diciembre de 2010;46(6):549-57.
172. Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants. En: Dutta NN, Hammar F, Haralampidis K, Karanth NG, König A, Krishna SH, et al., editores. *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation*



[Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2002 [citado 27 de noviembre de 2022]. p. 31-49. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/3-540-44604-4\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-44604-4_2)

173. Noushahi HA, Khan AH, Noushahi UF, Hussain M, Javed T, Zafar M, et al. Biosynthetic pathways of triterpenoids and strategies to improve their Biosynthetic Efficiency. *Plant Growth Regul.* 1 de julio de 2022;97(3):439-54.
174. Lin AS, Lin CR, Du YC, Lübken T, Chiang MY, Chen IH, et al. Acasiane A and B and Farnesirane A and B, Diterpene Derivatives from the Roots of *Acacia farnesiana*. *Planta Med.* febrero de 2009;75(3):256-61.
175. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* enero de 2008;7(1):1-7.
176. Twilley D, Langhansová L, Palaniswamy D, Lall N. Evaluation of traditionally used medicinal plants for anticancer, antioxidant, anti-inflammatory and anti-viral (HPV-1) activity. *South African Journal of Botany.* 1 de septiembre de 2017;112:494-500.
177. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* 1 de febrero de 2005;89(2):191-8.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog MS (1962).

<b>MEDIO MS SUPLEMENTADO CON VITAMINAS Y ANTIOXIDANTES</b>		
<b>Componentes</b>	<b>Solución stock (mg)</b>	<b>Concentración en el medio de cultivo (mg/L)</b>
<b>Macronutrientes</b>	<b>10 X</b>	<b>100 mL/L</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16500	<b>1650</b>
KNO <sub>3</sub>	19000	<b>1900</b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4400	<b>440</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3700	<b>370</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1700	<b>170</b>
<b>Micronutrientes</b>	<b>100 X</b>	<b>10 mL/L</b>
KI	83	<b>0.83</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	<b>6.2</b>
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2230	<b>22.3</b>

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860	<b>8.6</b>
NaMoO <sub>5</sub> .2H <sub>2</sub> O	25	<b>0.25</b>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2.5	<b>0.03</b>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.5	<b>0.03</b>
<b>Fe-EDTA</b>	<b>20 X</b>	<b>5 mL/L</b>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	745	<b>37.3</b>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	557	<b>27.8</b>
<b>Vitaminas</b>	<b>100 X</b>	<b>1 mL/L</b>
Ácido nicotínico	50	<b>0.50</b>
Piridoxina-HCl	50	<b>0.50</b>
Tiamina-HCl	10	<b>0.10</b>
Glicina	200	<b>2.0</b>
Mioinositol	10000	<b>100</b>

<b>Antioxidantes</b>	<b>Concentración en el medio de cultivo (mg/L)</b>
Ácido cítrico	<b>100</b>
Ácido ascórbico	<b>150</b>
Polivinilpirrolidona (PVP)	<b>500</b>

## Anexo 2. Formulación y preparación de solución stock de macronutrientes MS x 10

Para obtener un litro de dicha solución, llénese un matraz Erlenmeyer de 2 litros con 500 mililitros de agua destilada. A continuación, añádase cada uno de sus componentes uno a uno, disolviéndose totalmente antes de añadir el siguiente:

Sustancia	Peso (en gramos)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5
$\text{KNO}_3$	19.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7

Para finalizar, bastará con verter el contenido en un matraz aforado de un litro, aforar con agua destilada, trasladar la solución a su recipiente definitivo; de preferencia de vidrio ámbar y agitarlo.

Esta solución debe guardarse a 4°C.

### **Anexo 3. Formulación y preparación de solución stock de micronutrientes MS x 100**

Para obtener un litro de dicha solución: llenar un matraz Erlenmeyer de un litro con 500 mililitros de agua destilada. A continuación, añadir cada uno de los componentes uno a uno, disolviéndose totalmente antes de añadir el siguiente:

<b>Sustancia</b>	<b>Peso (en miligramos)</b>
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	2230.0
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	860.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620.0
KI	83.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	25.0
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	2.5
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	2.5

Para terminar, proceder del mismo modo que con la solución STOCK de Macronutrientes; especificada en el Anexo 2. Esta solución también debe almacenarse a 4°C.

#### **Anexo 4. formulación y preparación de solución stock de hierro MS x 200**

Para obtener 100 mililitros de dicha solución deben seguirse los pasos siguientes:

1. Calentar aproximadamente 50 mililitros de agua destilada en una parrilla eléctrica.
2. Cuando el agua esté templada, añadir 556 miligramos de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
3. Una vez que se haya disuelto el producto anterior, agregar 744 miligramos de  $\text{NaEDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ .
4. A continuación, añadir una lenteja de  $\text{NaOH}$ .
5. Ya disueltos todos los componentes, verter el contenido en un matraz aforado de 100 mililitros, aforar con agua destilada, trasladar la solución a su envase definitivo; de vidrio color ámbar, y etiquetar debidamente.

Esta solución se almacena a 4° C.

## **Anexo 5. Formulación y preparación de solución stock de vitaminas y myo-inositol MS x 200**

Para obtener 100 mililitros de dicha solución, llenar un matraz Erlenmeyer de 100 mililitros con aproximadamente 50 mililitros de agua destilada y añadir uno a uno, hasta su total disolución, los componentes presentados a continuación:

<b>Sustancia</b>	<b>Peso (en miligramos)</b>
Myo-inositol	<b>2000.0</b>
Ácido nicotínico	<b>10.0</b>
Piridoxina •HCl	<b>10.0</b>
Tiamina •HCl	<b>2.0</b>
Glicina	<b>40.0</b>

A continuación, verter el contenido en un matraz aforado de 100 mililitros, aforar con agua destilada, llenar el recipiente definitivo con la solución; de vidrio color ámbar, y etiquetarlo correctamente.

La solución Stock de Vitaminas debe almacenarse a 4° C.



## **Anexo 6. Formulación y preparación del medio de cultivo MS base sin RCV (en agua destilada, para un litro)**

Para obtener un litro de este medio de cultivo, disolver uno a uno los componentes especificados en aproximadamente 500 mililitros de agua destilada colocada en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, excepto por el Phytigel.

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>	Es
Solución STOCK de Macronutrientes MS x 10 (Anexo 2)	<b>100 mL</b>	
Solución STOCK de Micronutrientes MS x 100 (Anexo 3)	<b>1 mL</b>	
Solución STOCK de Vitaminas y Myo- inositol MS x 200 (Anexo 5)	<b>1 mL</b>	
Solución STOCK de Hierro MS x 200 (Anexo 4)	<b>5 mL</b>	
Sacarosa	<b>30 g</b>	
Ácido cítrico	<b>100 mg</b>	
Ácido ascórbico	<b>150 mg</b>	
Polivinilpirrolidona (PVP)	<b>500 mg</b>	
Phytigel	<b>2.7 g</b>	

importante establecer el pH del medio entre 5.7 y 5.8.

Después de establecer el pH, se vierte el contenido en un matraz aforado de un litro se afora con agua destilada. Posteriormente, se regresa el volumen aforado al matraz Erlenmeyer de 2 litros y se calienta en parrilla eléctrica en continua agitación, simultáneamente se añade el Phytigel.

Después de dos minutos de ebullición del medio, que deberá tener una apariencia transparente, se retira del calor y se vierte en los recipientes definitivos, que posteriormente se deberán esterilizar en autoclave.

### **Anexo 7. Formulación y preparación del Reactivo de Dragendorff:**

En un matraz Erlenmeyer de 125mL disolver 8g de nitrato de bismuto pentahidratado con 20mL de ácido nítrico (cuya densidad sea de 1.18 g/mL, al 30%). En otro matraz colocar 27.2g de yoduro de potasio con 50mL de agua. Mezclar las dos soluciones y dejarlas en reposo durante al menos 24 horas.

### **Anexo 8. Procedimiento para el ensayo de Liebermann- Burchard**

Esta reacción se realiza agregando cada uno de los reactivos que se describen a continuación: Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1ml de cloroformo. Se adiciona 1ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo se dejan correr 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:

1. Rosado- azul, muy rápido.
2. Verde intenso, visible, aunque rápido.
3. Verde oscuro- negro, final de la reacción.

Esta reacción también se emplea para diferenciar las estructuras esteroidales de las triterpénicas, las primeras producen coloraciones que van desde azul a azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

## **Anexo 9. Formulación y preparación de solución del buffer de fosfatos (pH 4.7) y la solución de Verde de Bromocresol (BCG)**

1. Solución de verde de bromocresol: se pesaron 68.9 mg de verde de bromocresol (BCG) y se mezclaron con 3 mL de una solución de NaOH 2M, hasta que esté completamente disuelto. La solución se lleva a un volumen de 1000 mL.
2. Solución de ácido cítrico 0.2 mol/L: se pesaron 42.02 g de ácido cítrico monohidratado y se disolvieron en agua destilada. Se llevaron a un volumen de 1L.
3. Solución de buffer de fosfato ácido de sodio a pH 4.7: se pesaron 71.6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y se disolvieron en agua destilada aforando a un litro, y se ajustó el pH con la solución 0.2 mol/L de ácido cítrico hasta llegar a un pH de 4.7.

## **Anexo 10. Curva de calibración con atropina para la cuantificación de alcaloides totales**

La cuantificación de alcaloides presentes en los extractos se realizó mediante la reacción con verde de bromocresol (BCG) (148).

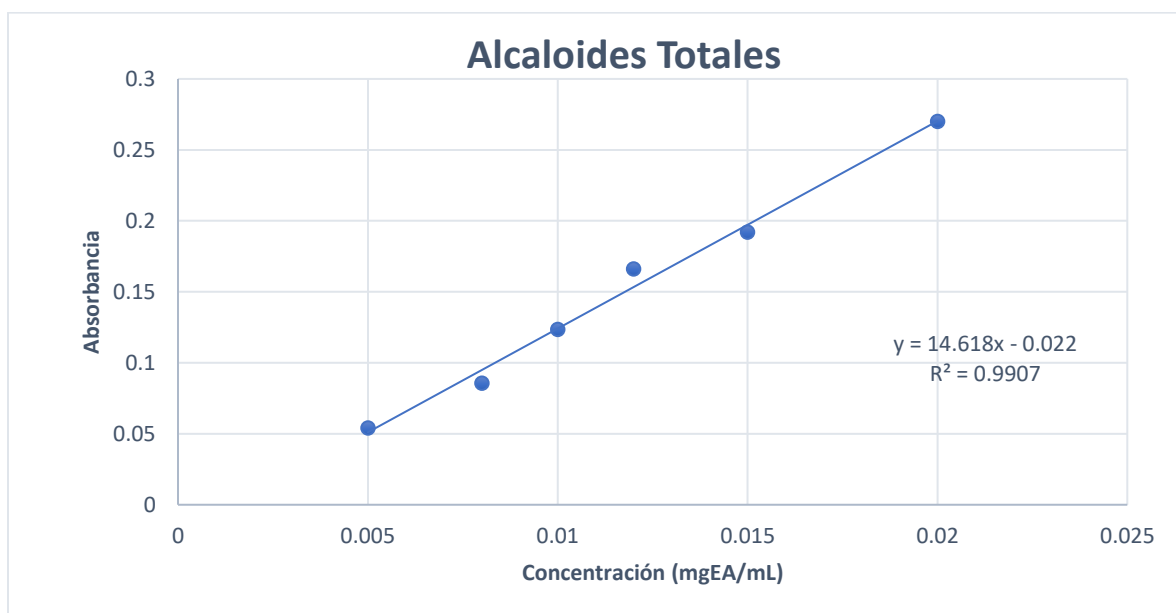
A partir de un vial de atropina (1 mg/mL) (PISA FARMACEUTICA), se preparó una dilución con agua destilada, llevando la disolución a 10 mL. Teniendo una concentración final de 0.1 mg/mL de Atropina.

<b>No. De muestra</b>	<b>Concentración de atropina (mg/ml)</b>	<b>Solución de 0.1 mg/ml de atropina (ml)</b>
<b>BLANCO</b>	0	0
<b>1</b>	0.005	0.5
<b>2</b>	0,008	0.8
<b>3</b>	0,01	1.0
<b>4</b>	0,012	1.2
<b>5</b>	0,015	1.5
<b>6</b>	0.02	2.0

Para la preparación de la curva de calibración se siguió la siguiente secuencia:

- 1.- Agregar el volumen ( $\mu\text{L}$ ) de la concentración correspondiente de la solución de atropina y agua en un embudo de separación.
- 2.- Después, agregar 5 mL de una solución de buffer de fosfatos (pH 4.7) y 5 mL de una solución de BCG. (Anexo 7)
- 3.- Se agregan diferentes volúmenes de cloroformo (1, 2, 3 y 4 mL) y en cada alícuota agregada se extrae la fase orgánica mediante agitación.
- 4.- Los extractos se recolectan en un matraz volumétrico de 10 ml y posteriormente se ajusta el volumen con cloroformo.
- 5.- La absorbancia del complejo en cloroformo se mide a 470 nm contra blanco de preparado de igual forma, pero sin atropina.

Para la cuantificación de alcaloides en las muestras de *V. farnesiana*, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto clorofórmico de la planta y se realizó el mismo procedimiento que para la obtención de la curva de calibración.



La ecuación resultante del modelo lineal fue utilizada para el cálculo del contenido de alcaloides.

$$\text{mg equivalentes de atropina (mgEA/mL)} = ((\text{ABS} + b) / m) * \text{FD}$$

Donde:

ABS: Absorbancia

b: ordenada al origen

m: pendiente

FD: factor de dilución.

## Anexo 11. Curva de calibración con ácido ursólico para la determinación de triterpenos

La cuantificación de triterpenos presentes en los extractos se realizó por la reacción con Vainillina (149).

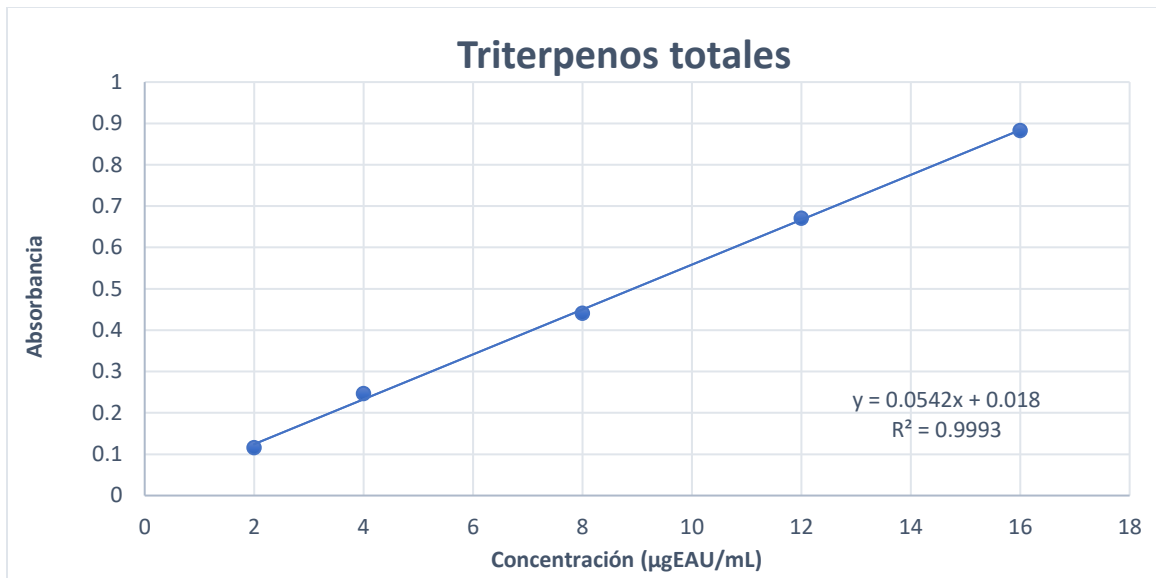
Se prepara una solución con ácido ursólico y metanol, llevando la disolución a 10 mL. Teniendo una concentración final de 0.2 mg/mL de ácido ursólico.

No. De muestra	Concentración de ácido ursólico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Solución de 0.2 mg/ml de ácido ursólico (ml)
<b>BLANCO</b>	0	0
<b>1</b>	2	0,1
<b>2</b>	4	0,2
<b>3</b>	8	0,4
<b>4</b>	12	0,6
<b>5</b>	16	0,8

Para la obtención de la curva de calibración se siguió el siguiente procedimiento:

- 1.- Agregar el volumen ( $\mu\text{L}$ ) de la concentración correspondiente de la solución de ácido ursólico en un tubo de ensayo.
- 2.- Se agrega 1 mL ácido sulfúrico y 400  $\mu\text{L}$  de una solución de vainillina-ácido acético glacial (5%) a la muestra del extracto. La mezcla de reacción se incuba a 70°C durante 35 min.
- 4.- Posteriormente, se agregan 5 ml con ácido acético glacial y se recolecta la mezcla en un matraz volumétrico de 10 ml y se ajusta el volumen con ácido acético glacial.
- 5.- Finalmente se mide la absorbancia de la mezcla a 547 nm contra un blanco preparado de igual forma, pero sin ácido ursólico.

Para la cuantificación de triterpenos en las muestras de *V. farnesiana*, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto clorofórmico y se realizó el mismo procedimiento aplicado para la obtención de la curva de calibración.



La ecuación resultante del modelo lineal fue utilizada para el cálculo del contenido de triterpenos totales.

$$\text{mg equivalentes de ácido ursólico } (\mu\text{gEAU/mL}) = ((\text{ABS} + b) / m) * \text{FD}$$

Donde:

ABS: Absorbancia

b: ordenada al origen

m: pendiente

FD: factor de dilución



## Anexo 12. Curva de calibración con ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles presentes en los extractos se realizó mediante la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (177).

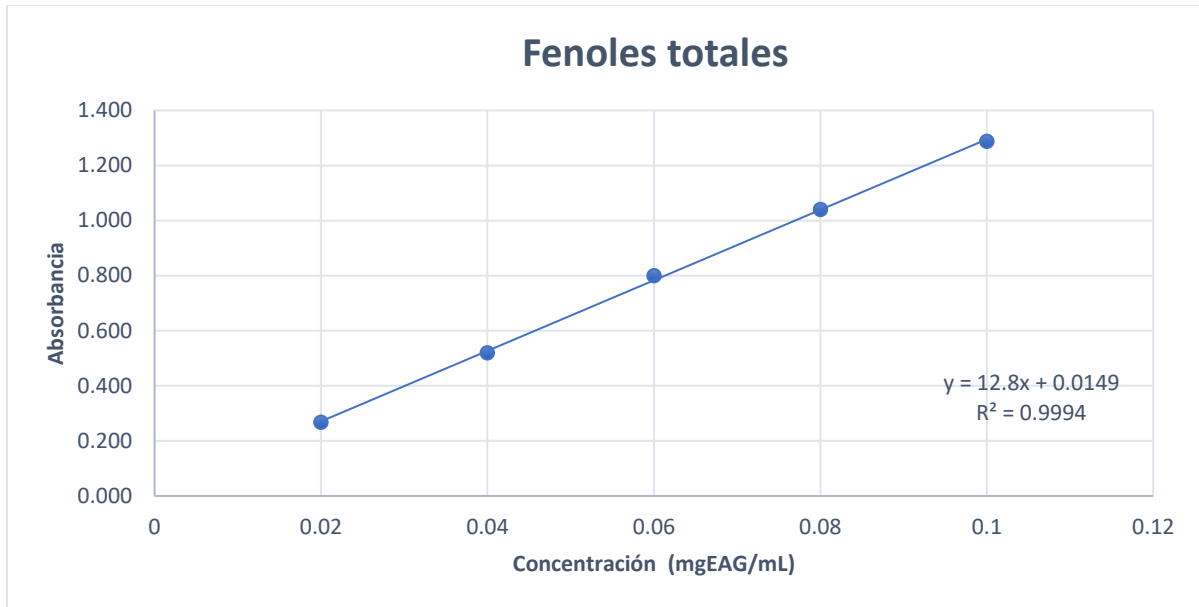
Se prepara una solución con ácido gálico y agua destilada, llevando la disolución a 10 mL. Teniendo una concentración final de 0.1 mg/mL de Ácido gálico.

No. De embudo	Concentración de ácido gálico (mg/ml)	Solución de 0.1 mg/ml de ácido gálico (µl)	Agua destilada (µl)
<b>BLANCO</b>	0	0	200
<b>1</b>	0.02	40	160
<b>2</b>	0.04	80	120
<b>3</b>	0.06	120	80
<b>4</b>	0.08	160	40
<b>5</b>	0.1	200	0

Para la obtención de la curva de calibración se siguen los siguientes pasos:

1. Agregar el volumen (µL) de la concentración correspondiente de ácido gálico y agua en un tubo de ensayo.
2. Añadir 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu.
3. Homogeneizar con ayuda de vórtex y reposar por 8 min en oscuridad.
4. Colocar 200 µL de carbonato de sodio anhidro al 14% (p/v) y 1500 µL de agua destilada a cada tubo.
5. Homogeneizar con vórtex.
6. Dejar reposar en oscuridad a temperatura ambiente por una hora.
7. Leer la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro UV-VIS.

Para la determinación en las muestras, se tomó una alícuota de 200 µL del extracto obtenido y se realizó el mismo procedimiento seguido para los puntos de la curva de calibración.



La ecuación resultante del modelo lineal fue utilizada para el cálculo del contenido de fenoles totales.

mg equivalentes de Ácido gálico (mgEAG/mL) =  $((ABS + b)/m) * FD$

Donde

ABS: Absorbancia

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD = factor de dilución

## Anexo 13. Presentación de cartel en el XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

# AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ  
"La Ingeniería Química,  
la Sostenibilidad y la Economía Circular"

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

## RECONOCIMIENTO

a:

**Juan Orozco-Villafuerte, Leticia Buendía-González, Francisco Cruz-Sosa, José Alejandro Domínguez-Colín**

**Por la presentación del trabajo en modalidad cartel:**

**CALLOGÉNESIS IN VITRO A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES DE *Vachellia farnesiana*.**

ID: 159

XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Puerto Vallarta, Jal., México. 23 al 26 de agosto de 2022



---

Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz  
PRESIDENTE DE LA AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR



---

Dr. Tomás Viveros García  
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO