



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa* L.

T E S I S

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Presenta:

Laura Isabel Méndez Sánchez

Director de Tesis

Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Co-director de Tesis

Dr. Fernando Orozco Sánchez

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México.

2017

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec y en el laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, bajo la dirección de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur y el Dr. Fernando Orozco Sánchez.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto CB-CONACyT N° 18395 e INFRA 255514. Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 586516 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131, beca mixta y beca de mujeres indígenas.

PRODUCTOS

CARTELES

Méndez-Sánchez, L.I., Sanchez-Ocampo, P.M., Capataz-Tafur, J. Germinación *in vitro* de *Gomphrena globosa* en dos medios basales de cultivo. Poster. 1° Encuentro de La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería Delegación Oaxaca. 7 y 8 Julio 2016. Tuxtepec, Oaxaca, México.

Méndez-Sánchez, L.I., Sanchez-Ocampo, P.M., Orozco-Sánchez, F., Capataz-Tafur, J. Inducción de callogenesis en hipocotilos de *Gomphrena globosa*. Poster. XVII° Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25-30 Julio 2017. Puerto Vallarta, Jalisco, México.

AGRADECIMIENTO

Una vez más no encuentro las palabras adecuadas para agradecer a mi familia por el apoyo incondicional que me han proporcionado durante este proceso.

A mi padre, madre, hermana y hermano, ellos son las personas que me motivan en cada meta propuesta. Son las personas que sin importar el tipo de situación, siempre me han mostrado su amor, apoyo y paciencia.

A mis directores de tesis, la Dra. Jacqueline y el Dr. Fernando por el apoyo y tiempo durante este proceso. Al Dr. Paul, Paul Antonio y Sra. Tercy por involucrarse en esta aventura y por ser grandes compañeros de viaje.

A mis amigos, Javier, Raquel, Xochilt y Armando que se han vuelto como mi segunda familia. A Juan Ramón, Sarahi, Ivonne, Teresa, Gustavo, Mauro, Abril por el ánimo, compañía y sugerencias. A Carolina y Juan David por la accesoria, paciencia y atención. A Laura, Guille y Aida por todas esas pláticas interminables, aventuras y consejos. Sin olvidar a los chicos del laboratorio de Bioconversiones que me hicieron sentir como en casa durante mi estancia y mis compañeros del laboratorio de CCV, porque siempre había algo nuevo de que hablar.

A la Dra. Carmen, Benjamín, Sandra, Victoria, Celia, Marichuy, Raúl y Landa que sin importar la distancia y tiempo se han mantenido atentos, y a todas aquellas personas que hicieron agradable este proceso.

Gracias

DEDICATORIA

A MIS PADRES Y MIS HERMANOS



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/059
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 25 de Septiembre de 2017

C. LAURA ISABEL MÉNDEZ SÁNCHEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo	Cátedra CONACYT-UNPA	Presidente
Dr. David Paniagua Vega	Facultad de Medicina-UANL	Vocal
Dra. Ariana A. Huerta Heredia	Cátedra CONACYT-UNPA	Secretario
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	1er Suplente
Dr. Edgar García López	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



OSADA MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



M. en C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
Vice-rector Académico
Vo. Bo. **VICE-RECTORIA ACADEMICA**

C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Directora de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/105
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 22 de Noviembre de 2017

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL

JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Laura Isabel Méndez Sánchez**, matrícula 1514010, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Producción de betalainas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa* L.**" para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Laura Isabel Méndez Sánchez
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

INDICE

.....	I
INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades de las Amaranthaceae	2
2.1.1 <i>Gomphrena globosa</i> L.	2
2.2 Metabolitos secundarios presentes en <i>G. globosa</i>	5
2.2.1 Betalaínas	5
2.2.1.1 Clasificación y biosíntesis de las betalaínas	5
2.2.1.2 Actividades biológicas de las betalaínas	9
2.2.2 Compuestos fenólicos.....	10
2.2.2.1 Clasificación y biosíntesis de fenoles.....	10
2.2.2.2 Actividades biológicas de los fenoles.....	13
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	14
2.3.1 Cultivo de callos y células en suspensión.....	15
2.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de la tribu <i>Gomphreneae</i>	17
2.4 Estrategias de producción de metabolitos en cultivo <i>in vitro</i>	18
2.4.1 Elicitación.....	18
2.4.2 Biorreactores.....	19
2.4.2.1 Tanque agitado	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos particulares	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1 Diagrama experimental.....	24
6.2 Material vegetal	25
6.3 Establecimiento de cultivo y obtención de callos friables.....	25
6.3.1 Protocolos de desinfección de semillas	25
6.3.2 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de plántulas.....	28
6.4 Establecimiento de cultivos de callos	28
6.4.1 Cinética de crecimiento	30
6.5 Células en suspensión.....	30
6.5.1 Cinética de crecimiento en matraz.....	31

6.5.2	Evaluación de cultivo en biorreactor	32
6.5.3.1	Cinética de crecimiento	33
6.5.3.2	Medición de transferencia y consumo de oxígeno en biorreactor.	33
6.5.3.2	Estimación de longitud de eddy turbulento y tamaño de agregados celulares en biorreactor.	34
6.6	Viabilidad	36
6.7	Determinación de sacarosa residual.	36
6.8	Cinética de producción	37
6.9	Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios.	37
6.9.1	Betalainas	37
6.9.2	Fenoles totales	39
6.10	Análisis estadístico	40
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1	Obtención de plántulas <i>in vitro</i>	41
7.1.1	Germinación.	41
7.2	Cultivo <i>in vitro</i> de callo	45
7.2.1	Cultivos de callos	45
7.2.1.1	Cinética de crecimiento y producción de metabolitos.....	58
7.3	Suspensiones celulares	71
7.3.1	Evaluación del cultivo de células de <i>G. globosa</i> en matraz Erlenmeyer.....	72
7.3.1.1	Cinética de crecimiento y producción de suspensiones en matraz.....	72
7.3.2	Evaluación del cultivo de células de <i>G. globosa</i> en un biorreactor de tanque agitado.	82
7.3.2.1	Cinética de crecimiento y producción	82
7.3.2.2	Consumo y transferencia de oxígeno.....	85
7.3.2.3	Eddy turbulento y agregados celulares.....	89
8.	CONCLUSIONES.....	91
9.	PERSPECTIVAS	92
10.	BIBLIOGRAFÍA	93
11.	ANEXOS	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la inflorescencia de <i>G. globosa</i>	4
Figura 2. Ruta de biosíntesis de betalaínas (continua).....	7
Figura 3. Ruta de biosíntesis de betalaínas.(continuación).....	8
Figura 4. Esquemática de las principales vías de ramificación de (poli) biosíntesis de fenol. .	11
Figura 5. Clasificación de subgrupos de callos	15
Figura 6. Biorreactor de 3 L (Applikon)	32
Figura 7. Inducción de callogénesis a partir de hipocótilos de <i>G. globosa</i>	47
Figura 8. Morfología obtenida en hipocótilos de <i>G. globosa</i> en medio B5 (continua).....	52
Figura 9. Morfología obtenida en hipocótilos de <i>G. globosa</i> en medio B5 (continuación).....	53
Figura 10. Morfología obtenida en hipocótilos de <i>G. globosa</i> en medio MS (continua).....	54
Figura 11. Morfología obtenida en hipocótilos de <i>G. globosa</i> en medio MS (continuación)...	55
Figura 12. Cinética de crecimiento de callos de <i>G. globosa</i> : tratamientos 43, 38, 36, 31, 24 y 15.	59
Figura 13. Cinética de crecimiento de callos de <i>G. globosa</i> : tratamientos 11, 05 y 02	60
Figura 14. Cultivo de callo del tratamiento 38.....	62
Figura 15 Producción de betalaínas en callos de <i>G. globosa</i> (continua).....	64
Figura 16. Producción de betalaínas en callos de <i>G. globosa</i> (continuación).....	65
Figura 17. Producción de polifenoles totales y á. ferúlico en callos de <i>G. globosa</i> (continua)	67
Figura 18. Producción de polifenoles totales y á. ferúlico en callos de <i>G. globosa</i> (continuación)	68
Figura 19. Tratamiento 43: Cinética de crecimiento y producción de betalaínas y polifenoles, consumo y viabilidad de suspensiones de <i>G. globosa</i>	73
Figura 20. Tratamiento 38: Cinética de crecimiento y producción de betalaínas y polifenoles, consumo y viabilidad de suspensiones de <i>G. globosa</i>	77
Figura 21. Cinética de crecimiento, producción de betalaínas y compuestos fenólicos, consumo y viabilidad de células de <i>G. globosa</i>	83
Figura 22. A) Porcentaje de O ₂ ; B) Consumo y transferencia de O ₂ ; C) Consumo y transferencia de O ₂ máx. de suspensiones celulares de <i>G. globosa</i> en biorreactor	86
Figura 23. Longitud de eddy turbulento y diámetro de células de <i>G. globosa</i>	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades biológicas de algunas especies del género <i>Gomphrena</i>	3
Tabla 2. Usos de <i>G. globosa</i>	4
Tabla 3. Efecto de reguladores de crecimiento en la biosíntesis de betalaínas	6
Tabla 4. Actividad biológica de las betalaínas	9
Tabla 5. Actividad antioxidante de los polifenoles	13
Tabla 6. Cultivo <i>in vitro</i> de algunas especies pertenecientes a la tribu <i>Gomphreneae</i>	17
Tabla 7. Producción de metabolitos por tipos de luz.....	19
Tabla 8. Clasificación de biorreactores	19
Tabla 9. Características de los diferentes tipos de biorreactores	20
Tabla 10. Producción de metabolitos secundarios en biorreactor	21
Tabla 11. Tratamientos de desinfección de semillas de <i>G. globosa</i> con dicloruro de mercurio	26
Tabla 12. Tratamientos de desinfección de semillas de <i>G. globosa</i> con hipoclorito de sodio ..	27
Tabla 13. Diseño del experimento para inducción de callo de <i>G. globosa</i> (continua).....	28
Tabla 14. Diseño del experimento para inducción de callo de <i>G. globosa</i> (continuación)	29
Tabla 15. Germinación de <i>G. globosa</i> con dicloruro de mercurio e hipoclorito de sodio.....	41
Tabla 16. Germinación de semillas desnudas de <i>G. globosa</i>	43
Tabla 17. Respuesta morfológica de hipocótilos de <i>G. globosa</i> (continua).	45
Tabla 18. Respuesta morfológica de hipocótilos de <i>G. globosa</i> (continuación)	46
Tabla 19. Tratamientos significativamente diferentes en la inducción de callogénesis.	48
Tabla 20. Escala de clasificación de callos de <i>G. globosa</i>	50
Tabla 21. Características morfológicas de callos de <i>G. globosa</i> (continua).....	50
Tabla 22. Características morfológicas de callos de <i>G. globosa</i> (continuación).....	51
Tabla 23. Tratamientos de callos de <i>G. globosa</i> seleccionados para subcultivo	57
Tabla 24. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para callos de <i>G. globosa</i>	61
Tabla 25. Parámetros cinéticos de suspensiones celulares de <i>G. globosa</i>	80
Tabla 26. Número de Damköhler y el consumo eficiente de oxígeno de células de <i>G. globosa</i> en biorreactor de tanque agitado.	87

ABREVIATURAS

μ : Viscosidad del cultivo (Pas)	h: Hora u horas
μ_1 : Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	HCl: Ácido clorhídrico
μL : Microlitros	HgCl ₂ : Dicloruro de mercurio
μM : Micromolar	IAA: Ácido indol-3-acético
2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	KIN: 6- furfural amino purina
ANA: Ácido naftalenacético	k_{La} : Coeficiente de transferencia de oxígeno en la interfase gas-líquido (h^{-1})
B5: Medio basal Gamborg's	L: Litro
BAP: 6-bencil amino purina	mg: Miligramos
cm: Centímetros	min: Minutos
CO ₂ *: Concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido en equilibrio con aire (kgO_2m^{-3})	mL: Mililitros
CO ₂ : Concentración de oxígeno en el medio del cultivo (kgO_2m^{-3})	mM: Milimolar
CS: Células secas	MS: Medio basal Murashige & Skoog
d: Diámetro de agitación (m)	N: Normal
D: Diámetro de impulsor (m)	n: Factor de consumo de oxígeno
d: Día o días	n_1 : Velocidad de agitación (s^{-1})
Da: Número adimensional de Damköhler modificado	NaClO: Hipoclorito de sodio
dc: Diámetro medio de agregados (m)	Ne': Número de potencia modificado para matraz (adimensional)
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo	°C: Grados centígrados
EA: Equivalentes de amarantina	OD: Porcentaje de oxígeno disuelto OD
EAG: Equivalentes de ácido gálico	OTR: Velocidad de la transferencia de oxígeno ($kgO_2m^{-3}d^{-1}$)
FRAP: Capacidad antioxidante de la reducción del ion férrico	OTR _{máx} : Velocidad de transferencia de oxígeno máxima ($kgO_2m^{-3}d^{-1}$)
g: Gramos	
GA ₃ : Ácido giberélico	

ABREVIATURAS

OUR: consumo de oxígeno ($\text{kgO}_2\text{m}^{-3}\text{d}^{-1}$)	Y p/s: Rendimiento producto-sustrato
OUR _{máx} : consumo de oxígeno máximo ($\text{kgO}_2\text{m}^{-3}\text{d}^{-1}$)	Y x/s: Rendimiento biomasa-sustrato
p/v: Peso/volumen	ϵ : Velocidad máxima de disipación de energía (W/kg)
P: Energía de alimentación (W)	ϵ_{avg} : Tasa de disipación de energía (W/kg)
PF: Peso fresco	ρ : Densidad de cultivo (kg/m^3)
Pg: Potencia gaseada (W)	l : Longitud de Eddy turbulento (m)
pH: Potencial de hidrógeno	
Po: Número de potencia (adimensional)	
PS: Peso seco	
QO ₂ : El consumo específico de oxígeno ($\text{kgO}_2\text{kgCS}^{-1}\text{d}^{-1}$)	
RCV: Reguladores de crecimiento vegetal	
Re: Número de Reynolds (adimensional)	
rpm: Revoluciones por minutos	
T: Diámetro del vaso (reactor) (m)	
TCA: Capacidad antioxidante equivalentes a Trolox	
td: Tiempo de duplicación	
\tilde{v} (dc): Velocidad entre dos puntos separados a una distancia igual a diámetro de los agregados (m/s)	
v/v: Volumen/volumen	
V _L : Volumen de trabajo (m^3)	
x: Espesor del disco del impulsor (m)	
X _v : Concentración de biomasa viva (kgCSm^{-3}).	

RESUMEN

Gomphrena globosa L. es una especie perteneciente a la familia Amaranthaceae, la cual se caracteriza por acumular compuestos bioactivos como las betalaínas y los polifenoles, que pueden ser empleados para el tratamiento de algunas enfermedades como problemas de la próstata, hipertensión y bronquitis. El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa*. Como primer paso se realizó el establecimiento de un cultivo *in vitro* de callos, en donde se evaluaron dos medios de inducción: Murashige y Skoog (MS) y Gamborg's B5 (B5) con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal. Para ello, se utilizaron los hipocótilos como explantes a partir de plántulas *in vitro* de 3-4 días de edad, observando que los tratamientos 38 y 43 en medio B5 suplementado con 2,4 D y KIN a una concentración de 1.0:0.5 mg/L y 1.0:0.02 mg/L, fueron los de mayor velocidad de crecimiento específica alcanzando 0.118 d⁻¹ y 0.146 d⁻¹, respectivamente. El tratamiento 38 obtuvo la mayor producción de polifenoles (23.53 mg EAG/g de ES) y el tratamiento 2 (medio MS suplementado con 1.0 mg/L BAP: 05 mg/L ANA) obtuvo la mayor producción de betalaínas (0.21 mg EA/g de ES). El sistema de cultivo de suspensión celular se estableció a partir del subcultivo de callos en los mismos medios de cultivo sin agente gelificante. Cuando las suspensiones celulares fueron expuestas a diferentes tipos de luz (blanca y azul) se observó que el cultivo del tratamiento 38 produjo 28.26% más de compuestos fenólicos y 21.87 % más de betalaínas en comparación al cultivo del tratamiento 43 (9.98 mg EAG/g ES y 0.125 mg EA/g ES) bajo luz blanca. Mientras que bajo luz azul el tratamiento con mayor producción de fenoles y betalaínas fue el 43 (10.64 mg EAG/g ES) y 38 (0.159 mg EA/g ES), respectivamente. Sin embargo, al cultivar las células en biorreactor, la producción de betalaínas y polifenoles disminuyó alrededor del 50%, bajo las condiciones del cultivo, posiblemente debido al estrés hidrodinámico. Este es el primer trabajo donde se evalúa la producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *G. globosa*.

ABSTRACT

Gomphrena globosa L. (Amaranthaceae) accumulates bioactive compounds such as betalains and polyphenols that can be used to treat some diseases like prostate problems, hypertension and bronchitis. The objective of this work was to study the production of betalains and phenolic compounds in cell cultures of *Gomphrena globosa*. First a callus culture was established by evaluating in inductive media Murashige and Skoog (MS) and Gamborg's B5 (B5) with different combinations of plant growth regulators. Hypocotyls were used as explants from *in vitro* seedlings (3-4 days of age), observing that treatments 38 and 43 in medium B5 supplemented with 2,4-D and KIN at a concentration of 1.0: 0.5 mg/L and 1.0: 0.02 mg/L, had the highest specific growth velocity, 0.118 d⁻¹ and 0.146 d⁻¹, respectively. Treatment 38 yielded the highest production of polyphenols (23.53 mg EAG / g of ES) and treatment 2 (MS medium supplemented with 1.0 mg / L BAP: 05 mg / L ANA), the highest production of betalains (0.21 mg EA / g of ES). The cell suspension culture system was established from the subculture of callus in the same culture media without gelling agent. When the cell suspensions were exposed to different types of light (white and blue) it was observed that the cultures of treatment 38 produced 28.26% more phenolic compounds and 21.87% more betalains compared to the cultures of treatment 43 (9.98 mg EAG / g ES and 0.125 mg EA / g ES) under white light. While under blue light the treatment with the highest production of phenols and betalains was 43 (10.64 mg EAG / g ES) and 38 (0.159 mg EA / g ES), respectively. However, when culturing the cells in bioreactor, the production of betalains and polyphenols decreased by about 50%, under the conditions of the culture, possibly due to a hydrodynamic stress. This is the first work where the production of betalains and phenolic compounds in cell cultures of *G. globosa* is evaluated.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Amaranthaceae posee más de 2400 especies (Tranam *et al.*, 2014). Esta familia ofrece una gama de metabolitos secundarios, que son empleados como sustancias activas de interés para la industria farmacéutica y pigmentos con importancia en la industria de cosméticos, alimentos y textil. Dentro de estos metabolitos se encuentran las betalaínas, que son utilizados como pigmentos en la industria. No obstante, también poseen actividades biológicas (Georgiev *et al.*, 2008). Debido a esto, se le han realizado diversos estudios en donde se evalúa la efectividad de las diferentes betalaínas e incluso en algunos casos se ha estudiado la dosis efectiva para ciertas actividades biológicas (Khan, 2016; Gandía-Herrero *et al.*, 2016). Una de las betalaínas de importancia es la gomphrenina a la que se le atribuye actividad antiinflamatoria (Lin *et al.*, 2010). Por lo anterior, se ha propuesto a *Gomphrena globosa* como una posible fuente alternativa productora de betalaínas, específicamente las gomphreninas con actividad biológica, especie perteneciente a la familia Amaranthaceae. Esta es una planta utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades antimicrobiana, anticancerígena y citotóxica (Salvador *et al.*, 2012). Sin embargo, los estudios en *G. globosa* son insuficientes, ya que existen pocos reportes de producción y obtención de betalaínas y compuestos fenólicos. Incluso no existen reportes de sistema de producción de planta silvestre, además de que la producción de plantas en campo se complica, pues *G. globosa* es un cultivo ornamental. Asimismo, existen varios factores que no permiten a las plantas la producción de metabolitos secundarios en gran cantidad. En ese sentido, es importante contar con sistemas biotecnológicos como es el cultivo *in vitro* celular, ya que permite tener un sistema sustentable de producción del sistema biológico y también obtener una mayor productividad de metabolitos secundarios. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar la producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de las Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae pertenece a la clase *Magnoliopsida* y al orden las *Caryophyllales*. Esta familia fue descrita por A. L. Jussieu en 1789 y comprende 176 géneros y 2400 especies. Entre las que se encuentran especies anuales y perenes, plantas herbáceas, arbustos y árboles (Siqueira, 1994/1995; Tranam *et al.*, 2014). Las diferentes especies tienen una amplia distribución geográfica, se pueden encontrar en zonas tropicales de América, India, África y Australia (Behera & Patnaik, 1974), en regiones subtropicales y templadas. (Siqueira, 1994/1995; Sharma, 1993). Esta familia se encuentra clasificada en cuatro tribus: *Celosieae*, *Achyrantheae*, *Braylineae* y *Gomphreneae*.

Gomphreneae es una de las tribus con investigación biotecnológica que demuestra un potencial de bioprospección de compuestos naturales bioactivos. Dentro de esta tribu se encuentran el género *Alternanthera*, *Iresine*, *Gomphrena*, entre otros (Tranam *et al.*, 2014).

2.1.1 *Gomphrena globosa* L.

El género *Gomphrena* (Amaranthaceae) abarca 120 especies. Los miembros de este género son de gran importancia en el tratamiento de enfermedades y por su valor nutritivo (Salvador *et al.*, 2012). La tabla 1, menciona algunas especies y sus actividades biológicas atribuidas.

Tabla 1. Actividades biológicas de algunas especies del género *Gomphrena*

Actividad Biológica	Especie
	<i>G. boliviana</i>
Antimicrobiana, propiedad anticancerígeno y citotóxica	<i>G. haenkeana</i> <i>G. meyeniana</i> <i>G. perennis</i> <i>G. martiana</i> <i>G. globosa</i>
Antimicrobiana, analgésico y propiedades anticancerígena	<i>G. celosioides</i>
Antimicrobiana	<i>G. pulchella</i>
Tóxico para moluscos y <i>Artemia salina</i>	<i>G. macrocephala</i>

Fuente: Salvador *et al.*, 2012

G. globosa es una planta herbácea anual con una altura aproximada de 50 cm, ramificada desde la base. Su fruto se encuentra encapsulado y la semilla es de forma ovoide de color café y lisa (Figura 1) (Rahman & Gulshana, 2014).



Figura 1. A) Planta de *G. globosa*; B) Estructura floral (Nickrent *et al.*, 2006)

G. globosa es una planta ornamental y medicinal, utilizada en América Latina y el Caribe (Ghaffar *et al.*, 2007). Uno de sus principales usos es para tratar problemas de la próstata (Lans, 2007). Sin embargo, se puede considerar como una planta multipropósito. En la tabla 2 se muestran los diferentes usos de *G. globosa*.

Tabla 2. Usos de *G. globosa*

Uso	Explante	Referencia
1. Farmacológico	Hojas	Tranam <i>et al.</i> , 2014
2. Colorante	Flores	Cai <i>et al.</i> , 2006
3. Fertilizante orgánico de azufre	Planta completa	Wang <i>et al.</i> , 2009
4. Alimento	Hojas o frutos	Radji & Kokou, 2014

2.2 Metabolitos secundarios presentes en *G. globosa*

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos producidos por las plantas para facilitar la interacción con el medio ambiente biótico y el establecimiento de mecanismos de defensa (Verpoorte *et al.*, 2002). Estos metabolitos secundarios se pueden clasificar según su ruta de biosíntesis o actividad biológica (Murthy *et al.*, 2014). Según la ruta de biosíntesis, se clasifican en tres grandes familias: a) fenólicos, b) terpenos y esteroides, c) alcaloides (Bourgaud *et al.*, 2001)

Los análisis químicos previos en *G. globosa* han demostrado la presencia de triterpenos (Dinda *et al.*, 2004), hidroxicinamamidas, flavonoides, flavonas, flavonoles, saponinas, alcaloides, cumarinas, azúcares reductores (Arcanjo *et al.*, 2010) y betacianinas (gomphrenina I y II, isogomphrenina I, II y III y Sinapoil-gomphrenina I y II) (Silva *et al.*, 2012).

2.2.1 Betalaínas

2.2.1.1 Clasificación y biosíntesis de las betalaínas

Las betalaínas se clasifican en betacianinas y betaxantinas. Las betacianinas se caracterizan por el color rojo, y las betaxantinas por el color amarillo. Dentro de las betacianinas se encuentran la betanina, amarantina, gomphrenina y bougainvilleina (Strack *et al.*, 2003). Estas solo se han reportado en las plantas de las 10 familias de las Caryophyllales, en donde se encuentra la familia Amaranthaceae (Cai *et al.*, 2005). Una ventaja de las betalaínas es que su color no depende del pH, además de ser más estable comparadas con las antocianinas (Tanaka *et al.*, 2008). Sin embargo, la producción de betacianinas en las Caryophyllales se ve ampliamente afectada por factores ambientales como es el estímulo de luz, ya que la síntesis está regulada por fitocromos (Sakuta, 2014). Otros componentes fisiológicos que afectan la biosíntesis son la oxidación, cascadas de señalización de Ca²⁺, factores de

transcripción, entre otros (Khan & Giridhar, 2015). De igual forma, los reguladores hormonales son de importancia ya que también afectan la producción de betacianinas (Tabla 3), tal es el caso del BAP (6-bencil amino purina), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), IAA (ácido indol-3-acético) (Khan & Giridhar, 2015), KIN (6- furfuril amino purina), ANA (ácido naftalenacético), GA₃ (ácido giberélico) y ácido abscísico (Sakuta, 2014).

Tabla 3. Efecto de reguladores de crecimiento en la biosíntesis de betalaínas

Regulador de crecimiento	Concentración	Planta	Respuesta	Referencia
ANA	1.0 ppm	<i>Pinguicula grandiflora</i>	Presencia de betacianina	Endress, 1976
IAA	4.5 µM	<i>Portulaca sp.</i>	Presencia de betacianina	Bhuiyan <i>et al.</i> , 2002
2,4-D	0.5 mg/L	<i>Beta vulgaris</i>	Presencia de betaxantina	Trejo-Tapia <i>et al.</i> , 2008
KIN	0.1-1.0 mg/L			
BAP	1.0 mg/L	<i>Zaleya decandra</i>	Presencia de betacianina	Radfar <i>et al.</i> , 2012
(Agua de coco 20%)				
IBA	0.5 mg/L	<i>Z. decandra</i>	Presencia de betacianina	Radfar <i>et al.</i> , 2012
KIN	1.0 mg/L			
(Agua de coco 30%)				
BAP (6-bencil amino purina), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), IAA (ácido indol-3-acético) KIN (6-furfuril amino purina), ANA (ácido naftalenacético), IBA (ácido 3-indolbutírico).				

Las betalaínas son conjugados del ácido betalámico con ciclo-dihidroxifenilalanina glucósido (Strack *et al.*, 2003). A continuación se muestra la ruta de biosíntesis de las betalaínas (Figura 2 y 3).

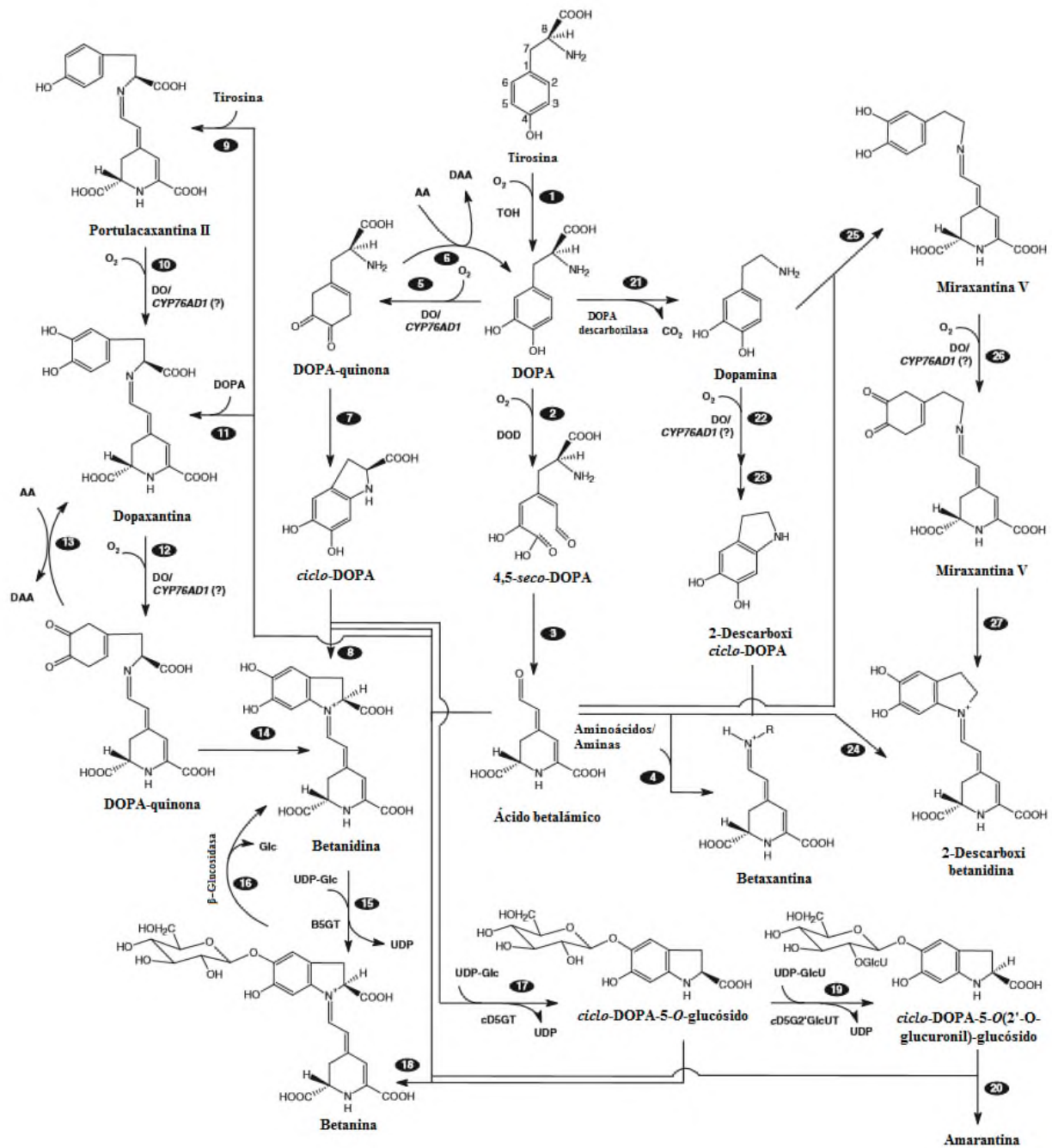


Figura 2. Ruta de biosíntesis de betaínas.

Reacciones 3, 7, 14, 23, 27 ciclación espontánea; reacciones 4, 8, 9, 11, 18, 20, 24, 25-espontánea de condensación de base de Schiff; B5GT-betanidin-5-O-glucosiltransferasa; B6GT-betanidin-6-Oglucosiltransferasa; cD5GT-ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa, cD6GT-ciclo-DOPA-6-O-glucosiltransferasa, cD5G20GlcUT-ciclo-DOPA-5-glucosa-20-O-glucuroniltransferasa, DO-difenol oxidasa; DOD-DOPA dioxigenasa; Glc-glucosa; TOH-tirosina hidroxilasa; UDP-uridina-50-difosfato (Khan, & Giridha, 2015).

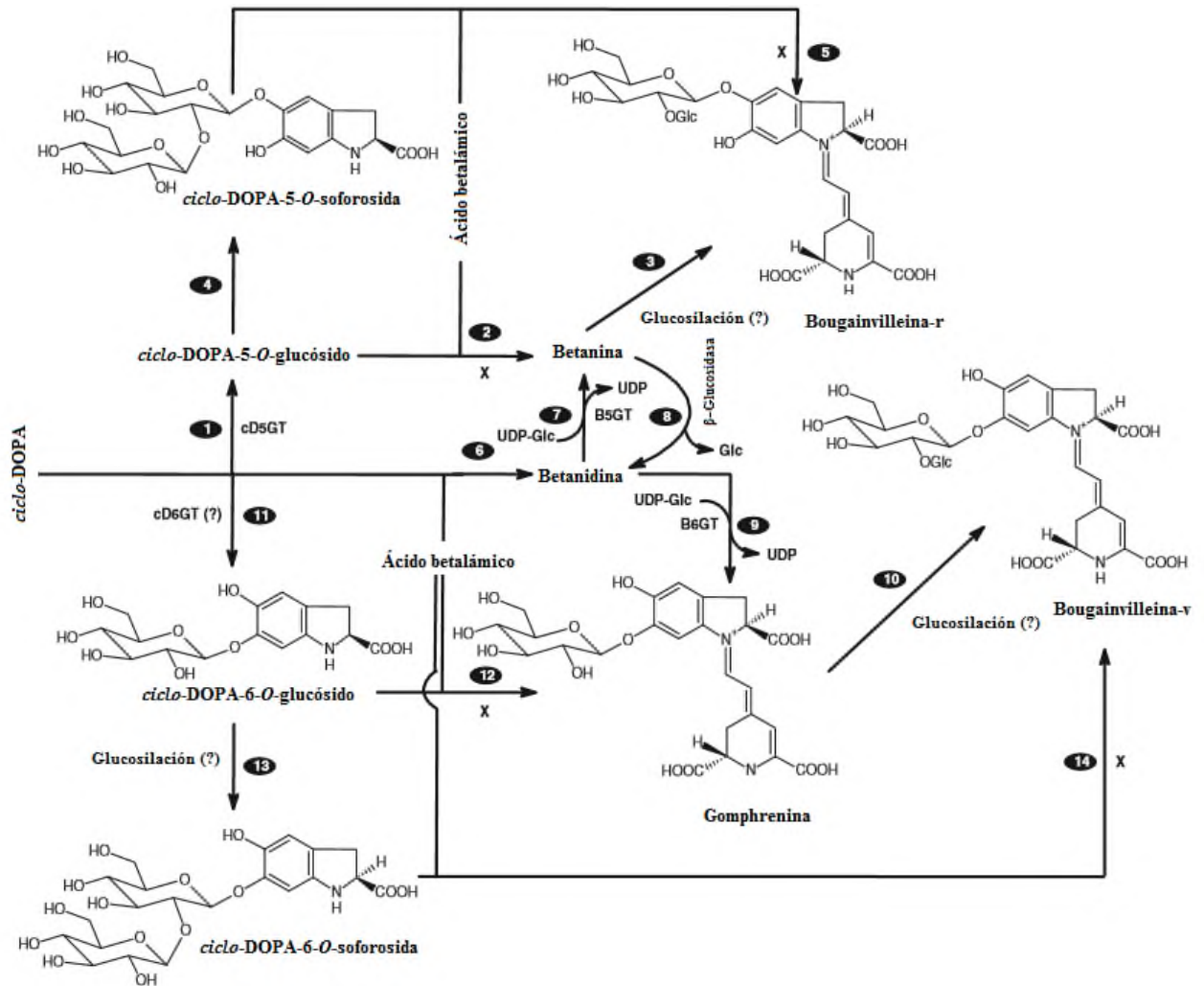


Figura 3. Ruta de biosíntesis de betalainas. X-reacciones espontáneas de condensación de base de Schiff. Para las abreviaturas, véase la Fig. 2 (Khan & Giridhar, 2015).

2.2.1.2 Actividades biológicas de las betalaínas

En los últimos años, las betalaínas han sido objeto de estudios por su importancia alimentaria, y farmacéutica. Es por ello que se han realizado diversos estudios en donde se ha evaluado su seguridad de consumo, actividades biológicas y biodisponibilidad (Khan, 2016). En la Tabla 4 se describen algunas actividades biológicas de las betalaínas.

Tabla 4. Actividad biológica de las betalaínas

Tipo de betalaína	Fuente vegetal	Actividad biológica	Modelo de estudio	Referencia
Betalaínas	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Protector de la LDL	Humanos	Tesoriere <i>et al.</i> , 2004
Betanina	<i>O. ficus-indica</i>	Anticancerígeno	Línea K562 (leucemia humana)	Sreekanth <i>et al.</i> , 2007
Gomphrenina I	<i>Basella alba</i>	Antiinflamatoria	Macrófagos murinos (RAW 264.7)	Lin <i>et al.</i> , 2010
Betanina	<i>Beta vulgaris</i>	Anticancerígeno	Ratón (pulmón)	Zhang <i>et al.</i> , 2013
Betaxantina y Betacianinas	<i>B. vulgaris</i>	Hepatoprotector	Rata	Szaefer <i>et al.</i> , 2014
Betanina	<i>B. vulgaris</i>	Impide daño al ADN Antioxidante	células HT-29 DPPH	Esatbeyoglu <i>et al.</i> , 2014

2.2.2 Compuestos fenólicos

2.2.2.1 Clasificación y biosíntesis de fenoles

Los fenoles son metabolitos secundarios de suma importancia para el crecimiento y reproducción de las plantas. La producción de compuestos fenólicos está ligada como respuesta a factores ambientales (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). En el reino vegetal se conocen más de 8 000 estructuras fenólicas, y debido a su gran diversidad y variedad de polifenoles en las plantas, existen varias clasificaciones de acuerdo a su fuente de origen, función biológica y estructura química. Por la estructura química de las agliconas se pueden dividir principalmente en tres grupos (Tsao, 2010):

- a) Ácidos fenólicos: Compuestos polifenólicos no flavonoides que son de dos tipos principales: ácidos benzoicos y derivados del ácido cinámico sobre la base de C1-C6 y columnas vertebrales C3-C6.
- b) Flavonoides: Compuestos que tienen la estructura general C6-C3-C6. En donde C6 del anillo A y B son de naturaleza fenólica. Este grupo se puede subdividir en antocianinas, flavon-3-oles, flavonas, flavanonas, chalconas y flavonoides.
- c) Amidas polifenólicas: Estos fenoles contienen N sustituyentes funcionales. Tal es el caso de la avenantramidas y capsacinoides.

Los fenoles se derivan principalmente de la vía del ácido shikímico a través de ácidos carboxílicos aromáticos-cinámico o benzoico, la biosíntesis de fenoles se muestra en la Figura 4. La capacidad de síntesis de compuestos fenólicos en las plantas ha tenido una evolución constante con la finalidad de permitirles a las plantas hacer frente a los desafíos ambientales (Cheynier *et al.*, 2013).

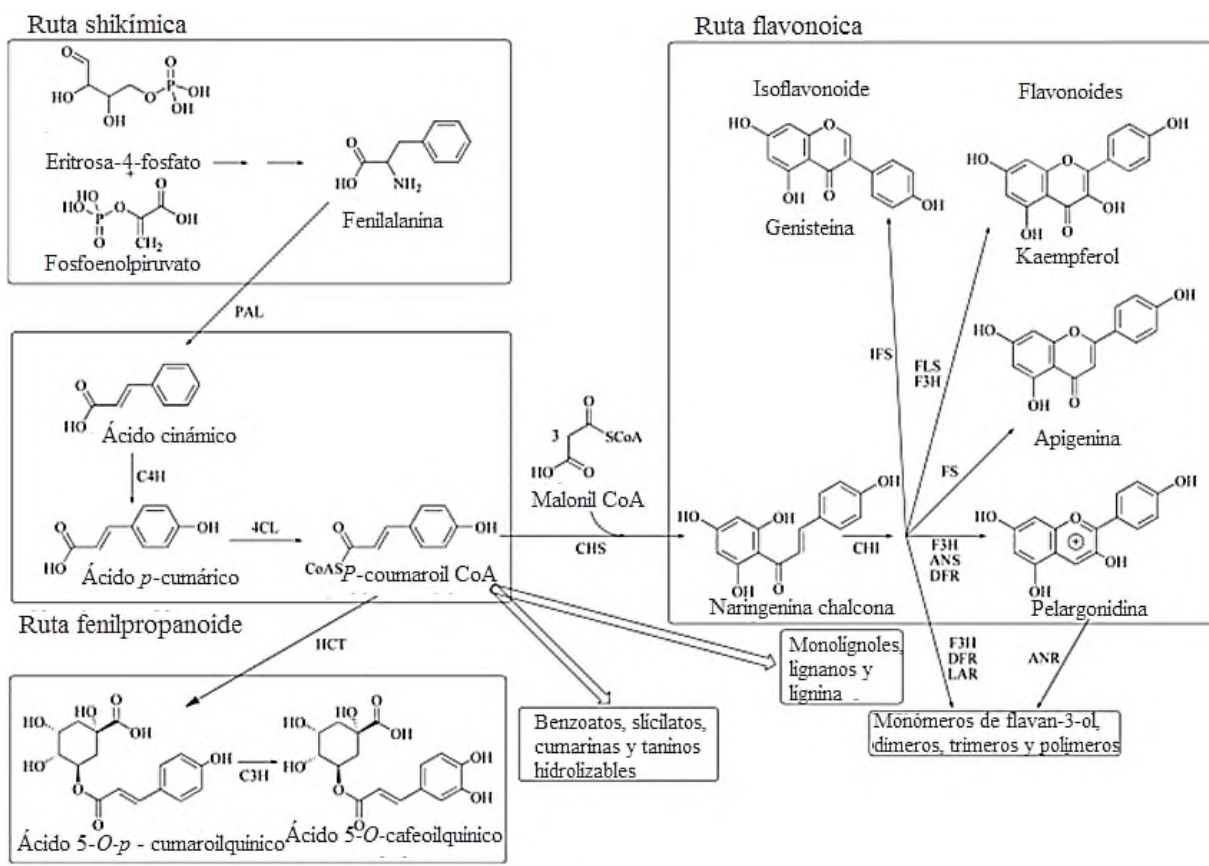


Figura 4. Esquemática de las principales vías de ramificación de (poli) biosíntesis de fenol. PAL, fenilalanina amonio-liasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; 4CL, 4-coumaroil: CoA-ligasa; HCT, hidroxicinamoil transferasa; C3H, p -cumarato-3-hidroxilasa; CHS (Cheynier *et al.*, 2013).

Ibrahim en el 2012, reporta que la producción de compuestos fenólicos en cultivo *in vitro* depende principalmente de:

- 1) Medio de cultivo. La producción de metabolitos fenólicos es el resultado del efecto de los diferentes componentes del medio.
 - a. Fuente de carbono. La concentración utilizada para estimular la producción de polifenoles, cumarinas, fenilisocumarinas, antroquinonas es de 2-3% de sacarosa. Se han realizado estudios en donde se considera al carbono como factor importante en la producción antroquinonas, fenoles y flavonoides (Baque *et al.*, 2012), al mismo tiempo el efecto en la respuesta morfológica en el cultivo, siendo el 2% uno de mayor efecto (Swamy *et al.*, 2010).

- b. **Minerales.** Para aumentar la productividad de ciertos grupos de metabolitos secundarios, las condiciones deben tener ciertas relaciones de nutrientes especialmente nitrógeno y fosforo inorgánico. La producción de compuestos fenólicos se ve afectada por el tipo y cantidad de la fuente de nitrógeno. Esto es debido a que la mayoría de los medios de cultivo contienen nitrógeno en una mezcla de NO_3^- y NH_4^+ en diferentes proporciones. De igual manera el fosforo, juega un papel importante ya que la mayoría de los metabolitos secundarios se sintetizan a través de intermediarios fosforilados. Un estudio que confirma el efecto de los minerales en los cultivos *in vitro* fue el reportado por Cui *et al.* (2010). Ellos investigaron el efecto de la producción de biomasa y el contenido de fenoles y flavonoides considerando diferentes concentraciones NO_3^- y NH_4^+ en raíces de *Hypericum perforatum*.
- 2) **Fitohormonas.** El tipo y concentración de fitohormonas en el medio de cultivo permiten la biosíntesis y la acumulación de diversos metabolitos secundarios. Sin embargo, a pesar de conocer que tienen un efecto positivo o negativo, se dificulta conocer el efecto de las auxinas y citoquininas de forma individual. Un ejemplo del efecto de las fitohormonas en la producción de fenoles y flavonoides es un estudio realizado en cultivo *in vitro* de *Hypericum rumeliacum* Boiss (Danova *et al.*, 2010).
- 3) **Luz.** La síntesis de fenoles por lo general está influenciada por la calidad e intensidad de luz. El estímulo lumínico tiene efecto sobre las enzimas de la ruta fenilpropanoide o bien por las enzimas reguladas por fitocromos, regulando la biosíntesis de diversos compuestos fenólicos. Reis *et al.* (2015), realizaron un estudio sobre el efecto de la luz sobre la producción de flavonoides en plántulas de *A. sessilis* encontrando una mayor producción en luz azul.
- 4) **Precursores.** La formación de metabolitos en el cultivo puede verse afectada por la adición de precursores o compuestos intermediarios de las rutas bioquímicas, que inducen o incrementan la producción. Ejemplo de ellos son la L-fenilalanina y L-tirosina. La L-fenilalanina tiene un efecto positivo en la acumulación de compuesto fenólico (ácido *p*-cumárico) en cultivos celulares de *Larrea divaricata* Cav (Palacio *et al.*, 2011).

5) Enzimas. La producción de fenoles, depende de las enzimas propias de su ruta metabólica. Al incrementar la actividad enzimática en la ruta de biosíntesis, esta se ve favorecida, principalmente por el grupo I de enzimas (fenilalanina amonioliasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y 4-hidroxicinamato CoA ligasa (4HCL). Un ejemplo de ello, fue la investigación realizada por Swieca *et al.* (2014) donde al aumentar la actividad PAL incremento la síntesis fenólica en brotes de lenteja.

2.2.2.2 Actividades biológicas de los fenoles

A pesar de que la producción de fenoles está relacionada con condiciones desfavorables en el cultivo (Matkowski, 2008), son de gran importancia por su actividad antioxidante. Esta actividad ha sido ampliamente estudiada en diversas plantas, entre las que se encuentran especies pertenecientes a la familia de las Amaranthaceae. En la tabla 5 se muestran algunas fuentes productoras de fenoles.

Tabla 5. Actividad antioxidante de los polifenoles

Tipo de fenol	Fuente vegetal	Material vegetal	Tipo de ensayo	Referencia
Flavonoides	<i>Stevia rebaudiana</i>	Callos	FRAP, DPPH	Tadhani <i>et al.</i> , 2007
Flavona-C-glucósidos	<i>Passiflora quadrangularis</i>	Callos	DPPH	Antognoni <i>et al.</i> , 2007
Cumarina, ácidos fenólicos y flavonoides	<i>Sarcocornia ambigua</i>	Planta silvestre	TEAC, FRAP, DPPH	Bertin <i>et al.</i> , 2012
Kaempferol 3-O-rutinoside	<i>G. globosa</i>	Planta silvestre	DPPH	Roriz <i>et al.</i> , 2014
Fenoles totales	<i>O. ficus-indica</i>	Fruto	TEAC, ORAC	Albano <i>et al.</i> , 2015

Como se observa en la tabla 5, *G. globosa* es una fuente de Kaempferol 3-*O*-rutinosido (Roriz *et al.*, 2014). Uno de los diversos polifenoles que biosintetiza, además de otros fenoles como el ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, isorhamnetina, 3,5,3',4'-tetrahidroxi-6,7-metilendioxi-flavona (Ferrerres *et al.*, 2011) y 3,5,40-trihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona y 3,5,30,40-tetrahidroxi-6,7-metilenodioxiflavona por mencionar algunos (Silva *et al.*, 2012).

Además de la actividad antioxidante reportada para los compuestos fenólicos (Tabla 5). Estos compuestos contribuyen a diversas propiedades fisiológicas como antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral y anticancerígena (Benavente-García & Castillo, 2008). Por dichas propiedades se buscan alternativas de producción en forma limpia, sustentable y continua. Un ejemplo, es el cultivo *in vitro* de ciertas especies vegetales productoras de compuestos bioactivos.

2.3 Cultivo *in vitro*

El término cultivo de tejido *in vitro* comprende, en forma amplia, un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (protoplasto, célula, tejido u órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones controladas. Los objetivos del cultivo de tejido *in vitro* son numerosos con diferente finalidad. Brevemente se puede resumir algunas aplicaciones (Mroginski & Roca, 1991):

1. Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencia afines
2. Bioconservación y producción de compuestos bioactivos
3. Incremento de la variabilidad genética
4. Obtención de plantas libres de patógenos
5. Conservación e intercambio de germoplasma
6. Propagación de plantas

2.3.1 Cultivo de callos y células en suspensión.

El cultivo de células vegetales permite el estudio básico de la bioquímica y biología molecular de las plantas. Además de los métodos disponibles para la regeneración de cultivos diferenciados (cultivos de plantas y órganos; brotes, raíces y las raíces adventicias) o cultivos indiferenciados (callos, suspensiones celulares y los protoplastos) (Mustafa *et al.*, 2011).

Para la obtención de cultivo de callos se puede iniciar a partir de un explante de una planta en un medio de soporte con condiciones adecuadas. El callo es un tejido amorfo, formado por células vegetales en proliferación de manera desorganizada. Las líneas de callos van a diferir en apariencia, color, grado de compactación y potencial morfogénético, esto dependerá del tipo de explante con el que se parte (George *et al.*, 2007). La diversidad de los callos es amplia, es por ello que se puede clasificar en subgrupos en función de sus características macroscópicas (Figura 5) (Ikeuchi *et al.*, 2013). Además se ha observado que en *Arabidopsis thaliana* cada tipo de callo expresa un perfil genético diferente (Iwase *et al.*, 2011).



Figura 5. Clasificación de subgrupos de callos (Ikeuchi *et al.*, 2013)

La formación de callo *in vitro* y en la naturaleza se puede obtener mediante (Ikeuchi *et al.*, 2013):

1. Callo formado bajo condiciones de cultivo *in vitro*.
Adición de auxinas y citocininas exógenas. Una proporción adecuada de auxinas y citocininas promueven la generación de callo. Ya que una proporción mayor de auxinas a citocininas induce raíces, mientras que a concentraciones mayores de citocininas a auxinas origina la regeneración de brotes (Skoog & Miller, 1957).
2. Callo inducido por heridas.
Este tipo de callo se ha observado en el descortezado de árboles y se cree que se genera para prevenir infecciones así como la pérdida de agua. En algunos casos el callo regenera órganos o tejidos nuevos (Stobbe *et al.*, 2002).
3. Callo inducido por patógenos.
El callo se promueve a partir de la infección de una herida en la planta por una bacteria gram negativa (*Agrobacterium tumefaciens*) (Nester *et al.*, 1984).
4. Callo genéticos inducidos por híbridos interespecíficos.
La generación de callos es resultado de cruces interespecífico de plantas híbridas (Ahuja *et al.*, 1965).

El callo formado del explante original se le llama callo primario y callo secundario al obtenido de la disección del callo primario. El subcultivo de callos se puede mantener o dar origen a cultivo de células en suspensión (George *et al.*, 2007).

El cultivo de células en suspensión se realiza en un sistema estéril, colocando un callo friable en un medio líquido estéril apropiado con agitación. La presencia de agregados celulares favorece el crecimiento celular y producción de metabolitos. La densidad del cultivo aumentará con el tiempo. Por lo tanto se debe subcultivar antes de la oxidación de la suspensión. El subcultivo se realiza normalmente al finalizar la fase logarítmica o en la primera fase estacionaria (puede ser de 1-4 semanas después de subcultivo), pero no después de la fase estacionaria tardía cuando la viabilidad celular es baja.

La desdiferenciación de la suspensión de células vegetales es ventajosa para la producción a gran escala de productos químicos finos en biorreactores y para el estudio de los procesos celulares y moleculares. Esto se debe a que las células en suspensión están relativamente homogéneas, permitiendo mayor transferencia de nutrientes (Mustafa *et al.*, 2011).

2.3.2 Cultivo *in vitro* de la tribu *Gomphreneae*.

Existen escasos estudios de cultivo *in vitro* en el género *Gomphrena*. Sin embargo, se han reportado varios estudios dentro de la tribu *Gomphreneae*. En la tabla 6 se muestra algunas de las especies reportadas en donde se ha realizado cultivo *in vitro*.

Tabla 6. Cultivo *in vitro* de algunas especies pertenecientes a la tribu *Gomphreneae*.

Especie	Explante	Cultivo obtenido	Condiciones de cultivo	Finalidad de cultivo	Referencia
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Segmentos nodales	Plántulas	MS, sacarosa, tirosina, agar	Producción de pigmentos	Kleinowski <i>et al.</i> , 2014
<i>A. brasiliana</i> , <i>A. philoxeroides</i> , <i>A. sessilis</i> , y <i>A. tenella</i>	Segmentos nodales	Plántulas	MS, sacarosa, agar e inositol	Micropropagación	Reis <i>et al.</i> , 2015
<i>A. sessilis</i>	Hojas	Callo, brotes y raíces	MS, sacarosa, 2, 4-D, BAP, IAA, IBA	Producción de pigmentos	Singh <i>et al.</i> , 2009
<i>G. macrocephala</i>	Semilla	Plántulas	MS, sacarosa y fitagel	Micropropagación	Moreira <i>et al.</i> , 2000
<i>G. globosa</i> L.	Semilla	Callo con regeneración parcial de órganos (raíz y brotes) y sin regeneración	MS, sacarosa, mio-inositol, tiamina, agar, BAP, NAA, GA ₃ .	Micropropagación	Ghaffar <i>et al.</i> , 2007

2.4 Estrategias de producción de metabolitos en cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* surgió como alternativa para la obtención de diversos compuestos vegetales. Sin embargo, en los últimos años, se han buscado nuevas estrategias que permitan un aumento en la producción de biomasa y metabolitos en los diferentes cultivos *in vitro*. La acumulación de biomasa y la síntesis de metabolitos, se puede dividir en dos etapas: la primera etapa comienza con la selección de una línea celular en donde se engloba la optimización del medio de cultivo (RCV, fuente de C y N₂) y el entorno del cultivo (temperatura, aireación, entre otros). La segunda etapa abarca las estrategias de producción: elicitación, precursores, biotransformaciones, escalado (biorreactores), entre otros. (Murthy *et al.*, 2014).

2.4.1 Elicitación

Los elicitores son moléculas que estimulan el metabolismo secundario en las plantas como mecanismo de defensa. Se pueden clasificar con base a su origen (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). Bióticos: sustancia de origen biológico. Abióticos: sustancias de origen no biológico, en su mayoría compuestos inorgánicos, como sales o factores físicos.

Los elicitores bióticos y abióticos pueden subdividirse en dos subgrupos. Los bióticos pueden ser de composición definida (ej. alginato) o de composición compleja (ej. extracto de levadura). Mientras que los elicitores abióticos pueden ser químicos (ej. metil jasmonato) o físicos (ej. luz UV) (Vasconsuelo & Boland, 2007; Giri & Zaheer, 2016). La influencia de la luz en la producción de metabolitos secundarios puede bien favorecer o disminuir la producción de éstos. Sin embargo, existen reportes donde la exposición lumínica permite mayor producción de metabolitos secundarios. En la tabla 7 se muestra el efecto de la luz en algunos cultivos.

Tabla 7. Producción de metabolitos por tipos de luz

Tipo de luz	Planta	Metabolito	Referencia
Azul	<i>G. globosa</i>	Betalaínas	Ruiz & Valadez, 1985
Fluorescente	<i>Panax ginseng</i>	Ginsenósidos	Yu <i>et al.</i> , 2005
UV	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Antocianinas	Tsurunaga <i>et al.</i> , 2013
Azul	<i>A.sessiles</i>	Flavonoides	Reis <i>et al.</i> , 2015
Azul	<i>Anoectochilus roxburghii</i>	Flavonas	Ye <i>et al.</i> , 2017

2.4.2 Biorreactores

El cultivo *in vitro* vegetal ha utilizado ciertos sistemas para la producción de metabolitos, entre los que se encuentran los biorreactores. Estos se pueden clasificar según el tipo de cultivo: células en suspensión, células inmovilizadas y reactores de biopelícula. En la tabla 8, se muestra la clasificación y el tipo de biorreactor utilizados para el crecimiento de cultivos celulares (Orozco *et al.*, 2002).

Tabla 8. Clasificación de biorreactores

Tipo de cultivo	Tipo de biorreactor
Cultivo en suspensión	Tanque agitado Columna de burbujeo Airlift
Células inmovilizadas	Lecho empacado Lecho fluidizado Burbujeo/Airlift Membrana
Reactor de biopelícula	Fibra hueca Lecho empacado Lecho fluidizado Burbujeo

Fuente: Orozco *et al.*, 2002

Una de las principales finalidades del biorreactor, es proporcionar las condiciones adecuadas que permitan mantener el cultivo celular. Entre los parámetros de bioproceso a destacar se encuentran la mezcla, transferencia de oxígeno (k_{LA}) y fuerza de corte. El modo de operación se puede clasificar en cultivo en lotes, lote repetido, lote alimentado, perfusión y continuos (Georgiev *et al.*, 2013).

El diseño y selección de un biorreactor va a depender del tipo de cultivo células, tejidos u órganos vegetales (Zhong, 2011). A continuación, en la tabla 9 se muestran las ventajas y desventajas que proporciona cada tipo de biorreactor (Georgiev *et al.*, 2014; Georgiev *et al.*, 2013; Huang & McDonald, 2012).

Tabla 9. Características de los diferentes tipos de biorreactores

Tipo de reactor	K_{La} (OTR)	Daño por agitación	Daño por aireación	Tipo de cultivo	Densidad celular	Productividad	Escala
Tanque agitado	Alto	Alto	Medio	Suspensión Raíces	Bajo Media	Media	Comercial
Columna de burbuja	Bajo	Bajo	Alto	Suspensión Raíces	Media	Bajo	Comercial
Air-lift	Medio	Bajo	Alto	Suspensión Raíces	Media	Media	Comercial
Lecho fijo	Bajo	Bajo	Bajo	Inmovilizado Inmersión	Alto	Baja Media	Piloto
Onda basculante	Medio	Bajo	Bajo	Suspensión Raíces	Media	Media	Piloto
Membrana	Bajo	Bajo	Bajo	Suspensión	Media	Alta	Piloto
Micro biorreactor	Media	Bajo	Bajo	Suspensión	Media	Media	Lab
Inmersión temporal	Medio		Media	Raíces Plántulas Embriones	Media	Media	Piloto

Fuente: Georgiev *et al.*, 2014; Georgiev *et al.*, 2013; Huang & McDonald, 2012

2.4.2.1 Tanque agitado

La selección del tipo de reactor dependerá del producto de interés. Los de tanque agitado son los más ampliamente utilizados para el cultivo de células vegetales (Weathers *et al.*, 2010). Este tipo de reactor tiene ciertas ventajas que ha permitido su uso en el cultivo de células vegetal. Entre sus ventajas se encuentran la mezcla uniforme, buena transferencia de oxígeno y disponibilidad amplia de impulsores.

Además, es importante mencionar que en la mayoría de procesos industriales se utiliza tanque agitado para la producción en masa (Georgiev & Weber, 2014).

Tabla 10. Producción de metabolitos secundarios en biorreactor

Especie	Metabolito	Utilidad	Productor
<i>Taxus spp.</i>	Paclitaxel	Anticancerígeno	Phyton Biotech, Inc
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin	Pigmento rojo, antibiótico	Mitsui chemicals, Inc.
<i>Coptis japonica</i>	Berberines	Anticancerígeno Antiinflamatorio	Mitsui chemicals, Inc.
<i>B. vulgaris</i>	Betacianinas	Pigmento rojo-violeta, Colorante de alimento y tinte	Nippon Shinyaku Co, Ltd., Kyoto, Japón
<i>Euphorbia mili</i>	Antocianinas	Colorantes textiles y zumo de frutas, vino y otras bebidas.	Nippon Paint Co., Ltd., Osaka, Japón

Fuente: Wilson & Roberts, 2012

3. JUSTIFICACIÓN

Por mucho tiempo los seres humanos han usado las plantas como fuente de fragancias, pigmentos, saborizantes y medicinal. Sin embargo, para la obtención de los metabolitos secundarios se necesitan grandes cantidades de material vegetal. Las Amaranthaceae son una familia con especies de gran interés, ya que son productoras de betalainas útiles en la industria como pigmentos. Además, presentan diversas actividades biológicas como anticarcinogénica, antiinflamatoria, hepatoprotectora y de protección a las lipoproteínas de baja densidad. De igual manera, los compuestos fenólicos son de gran importancia por su capacidad antioxidante, debido a que una sobreproducción de radicales libres puede causar lesión tisular y se ha relacionado con numerosas enfermedades como el cáncer, Parkinson, Alzheimer, infarto de miocardio y diabetes.

Lo anterior ha promovido la búsqueda de alternativas tecnológicas y fuentes productoras de betalainas y compuestos fenólicos para intentar cubrir esta necesidad. Como fuente alternativa productora de estos dos metabolitos secundarios se encuentran *Gomphrena globosa* especie perteneciente a la familia de las Amaranthaceae. No obstante, los estudios aún son escasos en cuanto producción de metabolitos en cultivo *in vitro*. De ahí el interés de contar con sistemas biotecnológicos para la eventual producción, por lo que el uso de los cultivos *in vitro* pueden generar una alternativa viable para la producción de metabolitos a gran escala.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* de *Gomphrena globosa* acumularán betalaínas y compuestos fenólicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

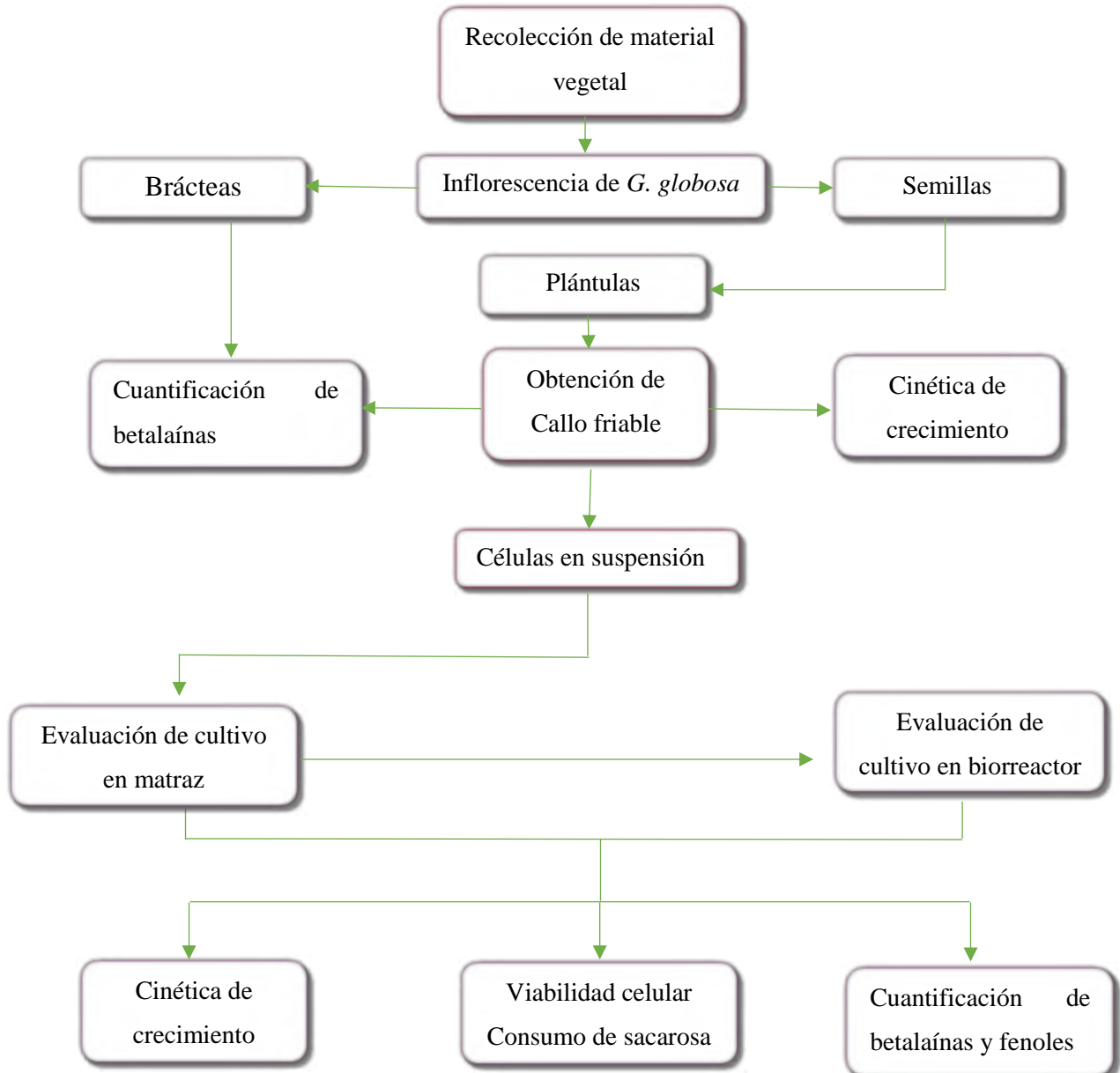
Estudiar la producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa*.

5.2 Objetivos particulares

1. Establecer el cultivo *in vitro* de callos de *G. globosa*.
2. Estudiar la cinética de crecimiento, producción de betalaínas y fenoles en cultivos de callos de *G. globosa*.
3. Establecer el cultivo *in vitro* de células de suspensión de *G. globosa*.
4. Estudiar la cinética de crecimiento, producción de betalaínas y fenoles en cultivos celulares de *G. globosa* en matraz Erlenmeyer y biorreactor de tanque agitado.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama experimental



6.2 Material vegetal

Como material vegetal inicial se utilizaron semillas de *G. globosa*, obtenidas de cultivos de Valles Centrales, Oaxaca, en la comunidad de San Jacinto Ocotlán Oaxaca, que se encuentra a una longitud de -96.705833, altitud de 16.807222 y a 1480 m sobre el nivel del mar. La colecta se realizó en el mes de noviembre del 2015.

6.3 Establecimiento de cultivo y obtención de callos friables

El establecimiento del cultivo *in vitro* de *G. globosa* se realizó a partir de semillas. Para el proceso de esterilización del material vegetal, se probaron tres protocolos de desinfección.

6.3.1 Protocolos de desinfección de semillas

Al ser *G. globosa* una planta con pocos estudios en cultivo *in vitro*, no existe un protocolo optimizado reportado para la obtención de plántulas a partir de semillas. Sin embargo, se han reportado tres tipos de desinfectante para el establecimiento del cultivo, aunque ninguno de ellos reporta el tiempo y el porcentaje de germinación. Uno de los desinfectantes es el HgCl₂ (dicloruro de mercurio) al 0.1% reportado para la generación de callos en un medio MS (Ghaffar *et al.*, 2007). El segundo desinfectante es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% (v/v) durante 5 min bajo condiciones hidropónicas (Wang *et al.*, 2009). Finalmente, el tercer agente desinfectante es el hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂) al 10% por 10 min en medio MS (Ruiz & Valadez, 1985).

Para nuestro estudio se evaluaron dos agentes desinfectantes: HgCl₂ al 0.1% e hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, debido a que son uno de los agentes con mayor uso en cultivo *in vitro* (Sen *et al.*, 2013; Mustafa *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, se evaluó el porcentaje de germinación en dos tipos de medio de cultivo (MS y B5).

Protocolo 1.

Las semillas con su cubierta fibrosa se lavaron con detergente líquido durante dos minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Después en la campana de flujo laminar se probaron diferentes tiempos de exposición a HgCl₂ al 0.1% (Tabla 11). Posteriormente, después de cada tratamiento se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Tabla 11. Tratamientos de desinfección de semillas de *G. globosa* con dicloruro de mercurio

Medio de cultivo	Exposición al HgCl ₂ (min)	Nombre del tratamiento
Murashige y Skoog	5	HM5
	10	HM10
	20	HM20
Gamborg's B5	5	HG5
	10	HG10
	20	HG20

Protocolo 2.

Las semillas con su cubierta fibrosa se lavaron con detergente líquido durante dos minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Después en la campana de flujo laminar se realizó un lavado con etanol al 98% (v/v) durante dos min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergieron en blanqueador comercial (NaClO) al 5% (v/v) y Tween-20 al 0.1% (v/v) en agitación suave a diferentes tiempos de exposición (Tabla 12). Finalmente, se realizaron 3 enjuagues a cada tratamiento con agua destilada estéril.

Tabla 12. Tratamientos de desinfección de semillas de *G. globosa* con hipoclorito de sodio

Medio de cultivo	Exposición al NaClO (min)	Nombre del tratamiento
Murashige y Skoog	5	NM5
	10	NM10
	20	NM20
Gamborg's B5	5	NG5
	10	NG10
	20	NG20

Protocolo 3.

Las semillas desnudas de *G. globosa* se sumergieron en Microdyn comercial durante 10 min, seguido de tres enjuagues en agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó una inmersión en etanol al 98% (v/v) en agua destilada estéril durante dos min, y una inmersión en antifúngico de cobre (vita plant nutrition) durante 10 min. Finalmente, se realizó un lavado con NaClO al 5% (v/v) y Tween-20 al 0.1% (v/v) en agitación suave durante 15 min. Después de cada tratamiento se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril.

6.3.2 Establecimiento del cultivo *in vitro* de plántulas

La siembra de las semillas se realizó en los dos medios basales diferentes: Gamborg's B5 (3.20 g/L) (G5893, Sigma) (Gamborg *et al.*, 1968) y Murashige-Skoog (4.40 g/L) (M6899, Sigma) (Murashige & Skoog, 1962), cada uno suplementado con sacarosa al 3% (p/v) y utilizando fitagel como agente gelificante al 0.25 % (p/v). El pH de los medios se ajustó a 5.8 antes de esterilizar. Las semillas se incubaron en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 días.

6.4 Establecimiento de cultivos de callos

La inducción de callos se realizó a partir de hipocótilos de plántulas *in vitro* de 3 y 4 días de edad. Se colocaron 5 hipocótilos de 1 cm de longitud por cada tratamiento. Cada tratamiento conto con cinco réplicas.

Se probaron dos grupos de reguladores de crecimiento: dos auxinas (ANA y 2,4-D) y dos citocininas (KIN y BAP) con cuatro concentraciones diferentes (0.02, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L), en los dos medios de germinación: Gamborg's B5 y MS. Las combinaciones y concentraciones de los reguladores para cada tipo de medio basal se obtuvieron a partir del diseño D-óptimo (Tabla 13-14).

Tabla 13. Diseño del experimento para inducción de callo de *G. globosa* (continua).

Tratamiento	Tipo de medio	Auxina	Citocinina	Concentración de auxina (mg/L)	Concentración de citocinina (mg/L)
1	B5	ANA	KIN	0.02	0.50
2	MS	ANA	BAP	0.50	1.00
3	MS	ANA	BAP	0.02	0.02
4	B5	ANA	KIN	0.10	0.10
5	MS	ANA	BAP	1.00	1.00
6	B5	ANA	KIN	1.00	1.00
7	B5	2,4-D	BAP	1.00	1.00
8	MS	2,4-D	KIN	0.10	0.50
9	B5	ANA	KIN	0.02	0.02
10	B5	ANA	BAP	0.10	1.00

n=5

Tabla 14. Diseño del experimento para inducción de callo de *G. globosa* (continuación).

Tratamiento	Tipo de medio	Auxina	Citocinina	Concentración de auxina (mg/L)	Concentración de citocinina (mg/L)
11	MS	2,4-D	KIN	1.00	1.00
12	MS	2,4-D	KIN	0.10	0.10
13	B5	2,4-D	KIN	0.10	1.00
14	MS	ANA	BAP	0.02	0.50
15	MS	2,4-D	BAP	0.50	0.02
16	MS	ANA	KIN	0.02	0.10
17	B5	ANA	BAP	0.10	0.50
18	B5	2,4-D	BAP	0.10	0.02
19	B5	ANA	KIN	1.00	0.10
20	B5	2,4-D	KIN	0.02	0.10
21	B5	ANA	KIN	0.50	0.02
22	MS	2,4-D	KIN	0.02	0.02
23	B5	ANA	BAP	0.02	1.00
24	MS	2,4-D	BAP	1.00	0.50
25	B5	ANA	BAP	1.00	0.02
26	MS	2,4-D	BAP	0.02	0.10
27	MS	2,4-D	KIN	0.02	1.00
28	MS	2,4-D	BAP	0.10	1.00
29	B5	2,4-D	KIN	0.50	1.00
30	B5	ANA	BAP	1.00	0.50
31	MS	2,4-D	KIN	0.50	0.50
32	B5	ANA	BAP	0.50	0.50
33	B5	2,4-D	BAP	0.50	0.10
34	B5	2,4-D	BAP	0.02	0.50
35	B5	ANA	BAP	0.02	0.10
36	MS	2,4-D	BAP	1.00	0.10
37	B5	2,4-D	BAP	0.10	0.10
38	B5	2,4-D	KIN	1.00	0.50
39	MS	ANA	BAP	0.10	0.10
40	MS	ANA	KIN	1.00	0.50
41	MS	ANA	KIN	0.10	0.02
42	MS	ANA	KIN	0.10	1.00
43	B5	2,4-D	KIN	1.00	0.02
44	MS	ANA	KIN	0.50	0.10
45	MS	ANA	KIN	1.00	0.02

n=5

A todos los tratamientos se les adicionó 200 μ L de anfotericina a una concentración 0.4 mg/mL, con la finalidad de tener cultivos asépticos y se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 h luz a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

El porcentaje de callogénesis se evaluó después de un mes de inducción a partir de la presencia de callo en los hipocótilos. El porcentaje se calculó a partir de la ecuación 1:

$$\text{Porcentaje de callogénesis(\%)} = \frac{\text{Longitud de cada explante que formo callo (cm)}}{\text{Longitud total del explante (1cm)}} \times 100 \quad (1)$$

6.4.1 Cinética de crecimiento

Se realizó una cinética de crecimiento de las diferentes líneas obtenidas, sembrando 1 g de callo en frascos en 20 mL de medio, por triplicado. Los tratamientos analizados tuvieron una cinética con una duración de 15 y 21 días dependiendo el caso. Se muestreó cada tercer día, las muestras se liofilizaron, hasta obtener peso seco y se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_1) en la fase exponencial.

6.5 Células en suspensión

Los cultivos en suspensión se establecieron con 2 g de peso fresco (PF) de callos, sembrados en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio, y se incubaron con agitación rotatoria a 110 rpm a 25°C y un fotoperiodo de 16 h luz. Las líneas celulares se subcultivaron cada 15 días (Monroy *et al.*, 1994; Capataz *et al.*, 2011).

6.5.1 Cinética de crecimiento en matraz

Para evaluar la cinética de crecimiento de las suspensiones celulares se sembró un total de 24 matraces Erlenmeyer con 25 mL de medio y un inóculo del 4 % (p/v) de un cultivo crecido durante 15 días en un matraz de 125 mL. Cada tercer día, se realizó la toma de muestra por triplicado para cuantificar el peso seco (PS) y la producción de betalaínas y fenoles (Monroy *et al.*, 1994; Capataz *et al.*, 2011).

Las muestras fueron filtradas al vacío a través de un papel filtro (Whatman No. 1), la biomasa se colocó en tubos de 15 mL (marca Axigen) de peso conocido y se liofilizaron durante 72 h aproximadamente. El peso seco fue obtenido por la diferencia de peso entre la muestra seca más el tubo menos el peso del tubo.

Para caracterizar el crecimiento de los cultivos, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_1) en la fase exponencial. Para esto, se construyó una gráfica de los logaritmos naturales de los valores de peso vs el tiempo de cultivo, en la región lineal se obtuvo la pendiente de la recta, la cual corresponderá a la velocidad de crecimiento (Qu *et al.*, 2011). Posteriormente fue calculado el tiempo de duplicación (td) teniendo como base la siguiente ecuación 2:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_1} \quad (2)$$

6.5.2 Evaluación de cultivo en biorreactor

Se empleó un biorreactor de vidrio de 3 L (Figura 5) de volumen nominal provisto de una tapa de acero inoxidable con multipuertos. Los puertos se emplearon para la colocación de un electrodo de pH y de oxígeno, un termopozo, una entrada de aire, un dispositivo para realizar la toma de muestra, tres baffles, y un tapón con tres entradas, donde se colocó una salida de venteo, una entrada de H_2SO_4 (0.2 M) y una entrada de NaOH (0.2 M). En la entrada de aire, en las salidas de venteo y de toma de muestra, se colocaron filtros de tamaño de poro de $0.200\ \mu\text{m}$ (POLYCAP, Whatman). Los electrodos de pH y oxígeno se conectaron a un controlador modelo (Applikon, eZ Control) con el que se realizó el registro de pH y tensión de oxígeno disuelto en el medio (TOD). Se usó un impulsor de paletas inclinadas que se colocó a 2.60 cm del fondo del tanque. La relación diámetro del impulsor/diámetro del tanque fue de 0.35. La agitación del cultivo se realizó con un motor de velocidad variable y un controlador de velocidad modelo ADI 1012 (Applikon).



Figura 6. Biorreactor de 3 L (Applikon)

6.5.3.1 Cinética de crecimiento

Al biorreactor se le adicionó un volumen de 1500 mL de medio de cultivo (utilizado para el mantenimiento de células), se inoculó con ídem 500 mL de un cultivo del tratamiento 38 SB de 15 días, cuya relación fue 4.75 g de células secas con respecto a un litro de medio. El biorreactor fue operado a 400 rpm, 0.030 vvm y $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. El pH y la tensión de oxígeno se monitorearon con electrodos durante toda la cinética de crecimiento. En los días de muestreo (cada tercer día) se tomó ídem 40 mL de cultivo durante 21 días para evaluar la biomasa, viabilidad, consumo de sacarosa, betalainas y fenoles totales.

6.5.3.2 Medición de transferencia y consumo de oxígeno en biorreactor.

Para la determinación del consumo de oxígeno (OUR, por sus siglas en inglés), se utilizó el método dinámico propuesto por Doran (1995), considerando la variación del porcentaje de oxígeno disuelto (OD) con el tiempo, $d\text{CO}_2/dt$ (sin aireación) y la concentración de biomasa (ecuación 3). El OD del cultivo se monitoreo durante la cinética, sin realizar ningún tipo de saturación en el sistema.

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = \text{OUR} = \text{QO}_2 * X_v \quad (3)$$

Siendo, QO_2 : El consumo específico de oxígeno ($\text{kgO}_2/\text{kgCS}^{-1}\text{d}^{-1}$) y X_v : La concentración de biomasa viva (kgCSm^{-3}). El consumo específico de oxígeno se obtuvo a partir de la pendiente del porcentaje de oxígeno disuelto vs tiempo. Considerando la constante de proporcionalidad entre CO_2 y OD. Mientras que el consumo máximo se calculó con base a la ecuación 4.

$$\text{OUR}_{\text{máx}} = \text{QO}_{2\text{máx}} * X_v \quad (4)$$

En cuanto a la velocidad de la transferencia de oxígeno (OTR, por sus siglas en inglés), y la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (OTR_{máx}), se calcularon con base a la ecuación cinco y seis, respectivamente, reportadas por Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, (2009).

$$OTR = k_{La} (CO_2^* - CO_2) \quad (5)$$

$$OTR \text{ max} = k_{La} * CO_2 \quad (6)$$

Donde, k_{La} es el coeficiente de transferencia de oxígeno en la interfase gas-líquido (h^{-1}), CO_2 es la concentración de oxígeno en el medio del cultivo (kgO_2m^{-3}) y CO_2^* la concentración de oxígeno en la interfase gas-líquido en equilibrio con aire (kgO_2m^{-3}). Al mismo tiempo, se calcularon el número adimensional de Damköhler modificado (Da) (Ec 7) y el factor de consumo de oxígeno (n) (Ec. 8) (Gómez *et al.*, 2006; Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy).

$$Da = \frac{OUR_{máx}}{OTR_{máx}} \quad (7)$$

$$n = \frac{OUR}{OUR_{máx}} \quad (8)$$

6.5.3.2 Estimación de longitud de eddy turbulento y tamaño de agregados celulares en biorreactor.

Para determinar la longitud de los eddy turbulentos y el tamaño de agregados en los dos sistemas se utilizaron las ecuaciones y medidas del biorreactor reportadas por Villegas-Velásquez *et al.* (2017). Primero, se estimó la viscosidad para matraz y biorreactor a partir del artículo reportado por Alvarez-Yela *et al.* (2016). Se tomó como referencia el promedio de la viscosidad aparente de suspensiones celulares de *Azadirachta indica*, *Thevetia peruviana* y *Borojo pantinoi*. Posteriormente se estimó el estrés hidrodinámico bajo un

régimen de flujo laminar para matraz que se calculó con base a las ecuaciones 9, 10 y 11 (Villegas-Velásquez *et al.*, 2017).

$$Re = \frac{(\rho n_1 d^2)}{\mu} \quad (9)$$

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0.6} + 1.5Re^{-0.2} = \frac{P}{\rho n_1^3 d^4 V l^{\frac{1}{3}}} \quad (10)$$

$$Re < 60000: \varepsilon = \varepsilon_{avg} = \frac{P}{V_L \rho} \quad (11)$$

Mientras que para biorreactor se utilizaron las siguientes ecuaciones (Villegas-Velásquez *et al.*, 2017):

$$Po = 0.78 \left(\frac{D}{T}\right)^{-0.17} \left(\frac{x}{D}\right)^{-0.14} \quad (12)$$

$$P = Po \rho n_1^3 D^5 \quad (13)$$

$$\varepsilon = \frac{Pg}{\rho D^3} \quad (14)$$

$$\varepsilon_{avg} = \frac{0.9P}{\rho V_l} \quad (15)$$

Finalmente, para la estimación de la longitud de los eddy turbulento se utilizó la ecuación 16.

$$l = \left[\frac{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)^3}{\varepsilon} \right]^{1/4} \quad (16)$$

En cuanto el tamaño de células y agregados se determinó a partir de fotografías de las suspensiones en los dos sistemas: matraz y biorreactor, usando el software ImageJ y la ecuación 17.

$$\tilde{v} (dc) = 1.57\varepsilon^{1/3}dc^{1/3} \quad (17)$$

6.6 Viabilidad

La viabilidad celular se evaluó empleando el colorante azul de Evans. Las células fueron incubadas en azul de Evans (0.25 %, Sigma-Aldrich) en una proporción de 1:2 durante 5 min. Alícuotas de la mezcla resultante se observaron al microscopio (aumento 4x y 10x) y se realizó el conteo de 500 células. Las células se clasificaron como viva si se observaron transparentes o rojas y como muertas si estaban teñidas de azul. El porcentaje de viabilidad de una muestra fue calculado basado en el número de células no teñidas (viables) en relación a las células totales (Rodríguez-Monroy & Galindo, 1999).

6.7 Determinación de sacarosa residual.

La determinación de sacarosa residual se realizó por la metodología propuesta por Dubois *et al.* (1956). La cantidad de azúcares totales se calculó utilizando una curva de calibración de sacarosa de 0 - 200 mg/L (Anexo 1).

La cuantificación de azúcares totales en las muestras del medio de cultivo se realizó diluyendo con agua hasta alcanzar concentraciones menores a 200 mg/L. Posteriormente, a 1 mL de la solución de medio se le adicionó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado al 98%. Después se dejó reposar la muestra durante 30 min y finalmente fueron leídas a una absorbancia de 490 nm.

6.8 Cinética de producción

De las muestras obtenidas de los diferentes puntos de las cinéticas de crecimiento, se tomó 40 mg de material vegetal seco para la extracción de betalaínas y 40 mg para la extracción de fenoles totales.

6.9 Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios.

6.9.1 Betalaínas

Para la cuantificación de betalaínas se evaluaron tres metodologías de extracción de brácteas de *G. globosa* silvestre y se realizó la detección por UHPLC con la finalidad de contar con un cromatograma como punto de comparación con base al tiempo de retención y espectro de cada uno de los picos detectados en comparación a lo reportado, debido a que no existen estándares comerciales disponibles.

Metodologías de extracción:

- 1) Extracción metanol-agua (40:60) de 4 g de brácteas de *G. globosa* que contenía ácido ascorbico 50 mM bajo agitación continua durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. El material vegetal se separó del extracto por filtración a través de un embudo Büchner con un disco de papel de filtro (Whatman 4). Posteriormente la muestra se liofilizó (Kugler *et al.*, 2007).
- 2) Extracción acuosa de 4 g de brácteas de *G. globosa* con 200 mL de agua durante 30 min a 400 rpm a temperatura ambiente en oscuridad. El material vegetal se separó del extracto por filtración a través de un embudo Büchner con un disco de papel de filtro (Whatman 4). Posteriormente la muestra se liofilizó (Ferrerres *et al.*, 2011).

- 3) Extracción metanólica de 4 g de brácteas de *G. globosa* con 200 mL de agua durante 30 min a 400 rpm a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se centrifugó a 1000 g/4°C/10 min. El pellet se re-extrajo con 200 mL de agua. El extracto acuoso se filtró y se purificó con cloroformo (3 x 200 mL) (Silva *et al.*, 2012).

Posteriormente, las muestras obtenidas se analizaron por UHPLC. Los análisis cromatográficos se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Ferreres *et al.* (2011) con diferentes modificaciones. Brevemente, la separación se llevó a cabo en una columna EVO C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex). La fase móvil consistió de dos solventes: ácido acético al 1% (A) y metanol (B), iniciando con 20 % B y usando un gradiente hasta obtener 50 % a los 18 min, 80 % a los 19 min y 20 % a los 20 min. Se utilizó un flujo de 0.21 mL/min con una temperatura de 40 °C y un volumen de inyección de 10 µL. La adquisición de datos espectrales se hizo en un rango de 200 a 600 nm y se capturaron los cromatogramas a 320, 340 y 536 nm. Los análisis UHPLC-DAD se llevaron a cabo en un equipo Acquity Arc (Waters) equipado con bomba cuaternaria, desgasificador, automuestreador, horno de columna y detector de arreglo de diodos. El sistema UHPLC-DAD fue controlado por el programa Empower 3 (Waters). El cromatograma obtenido se muestra en el anexo 2.

Mientras que la cuantificación por espectrofotometría se realizó por medio de las lecturas de los extractos a 536 nm. El pigmento contenido se expresó con base amarantina y se calculó usando la siguiente ecuación 18 (Silva *et al.*, 2012):

$$A_{cd} = \frac{A_{536}PMV}{\epsilon LPS} \quad (18)$$

Siendo, A_{536} : absorbancia obtenida para cada extracto, PM: peso molecular (726.6 g/mol), V: volumen de la solución del extracto, ϵ : coeficiente de absorción molar ($5.66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), L: longitud de trayectoria del celda y PS: peso seco del extracto

6.9.2 Fenoles totales

La extracción de fenoles se realizó con base a lo reportado por Silva *et al.* (2012). Para la determinación de fenoles totales, se empleó el método de Folin-Ciocalteu, que aprovecha la capacidad de los fenoles de unirse a radicales libres y de quelación de iones metálicos gracias a la estructura que poseen (anillo aromático con más de un grupo hidroxilo) (Singleton *et al.*, 1974).

La cantidad de fenoles totales se calculó utilizando una curva de calibración de ácido gálico de 0 - 1000 ppm (Anexo 3a) y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (EAG) por PS. La cuantificación de fenoles totales en los extractos se realizó en una microplaca de 96 pozos, de la siguiente forma. Primero se agregó 150 μL de agua desionizada, después se adicionó 2.5 μL de una solución de 20 mg/mL de extracto seco al cual se le agregó 10 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar durante 10 min y luego se le adicionó un volumen de 30 μL de carbonato de sodio al 20% (p/v), posteriormente se incubó a 37 °C durante 15 min, finalmente se enfrió en un baño de hielo y se leyó la absorbancia a 750 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004).

Mientras que la cuantificación de compuestos fenólicos en las muestras fue realizada por UHPLC con la metodología anteriormente descrita por Ferreres *et al.* (2011), modificada. La cuantificación de compuestos fenólicos fue realizada utilizando ácido ferúlico (0-25 ppm) (Anexo 3b)

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Design Expert 10 versión 10.0.3.1. Por otra parte, el análisis del porcentaje de inducción de callo se realizó utilizando un diseño factorial D-óptimo. El análisis estadístico para el porcentaje de germinación, velocidad de crecimiento, cuantificación de fenoles y betalaínas se utilizó el programa Minitab 17 versión 1.0.0.1. El análisis de los datos fue por un diseño completamente al azar y se realizó una prueba de Tukey, $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de plántulas *in vitro*

7.1.1 Germinación.

La germinación consiste en la expansión celular y reactivación del metabolismo de la semilla iniciando con la asimilación de agua y terminando con la elongación del eje embrionario que permite la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla (Oñate-Sánchez *et al.*, 2008). Para los ensayos realizados en este trabajo se consideró como semilla germinada aquella que presentó crecimiento de la radícula y del hipocótilo.

En la tabla 15 y 16 se muestra el porcentaje de germinación y contaminación que se obtuvo para cada protocolo de desinfección

Tabla 15. Germinación de *G. globosa* con dicloruro de mercurio e hipoclorito de sodio

Tipo de desinfectante	Tipo de medio	Tratamiento (min)	Tiempo de germinación (días)	Porcentaje de germinación (%)	Porcentaje de contaminación (%)
HgCl ₂	Murashige y Skoog	5	6	66.6±4.6 ^b	100.0±0.0
		10	7	65.3±2.3 ^b	100.0±0.0
		20	20	42.6 ^c ±8.3 ^c	100.0±0.0
	Gamborg's	5	3	93.3±2.3 ^a	100.0±0.0
		10	4	82.6±4.6 ^a	100.0±0.0
		20	15	62.6±4.6 ^b	100.0±0.0
NaClO	Murashige y Skoog	5	2	94.6±2.3 ^a	100.0±0.0
		10	2	93.3±2.3 ^a	100.0±0.0
		20	2	93.3±8.3 ^a	100.0±0.0
	Gamborg's	5	2	96.0±4.0 ^a	100.0±0.0
		10	2	94.6±2.3 ^a	100.0±0.0
		20	2	97.3±4.6 ^a	100.0±0.0

Tukey $p < 0.05$ (n=75). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra "a" el tratamiento estadísticamente diferente con mayor efecto.

Al analizar estadísticamente los porcentajes de germinación con los dos agentes desinfectantes, se obtuvo que la desinfección con NaClO permitió un mayor porcentaje de semillas germinadas en los dos medios evaluados, a diferencia del HgCl₂.

En las plántulas germinadas con el desinfectante HgCl₂ se observaron diferencias en el tamaño radicular en algunos tratamientos y el tipo de medio. Los germinados del medio Gamborg's B5 presentaron un mayor desarrollo de las raíces comparado con el medio Murashige y Skoog en el décimo día. Las raíces de las plántulas germinadas en Gamborg's B5 midieron en promedio 2 cm (tratamiento HG5 y HG10) y las del medio MS 0.7 cm aprox. (tratamientos HM5 y HM10). Mientras, los tratamientos de HG20 y HM20 presentaron un crecimiento similar con una longitud aproximada de 0.3 cm. Es decir, 6.6 veces menor que las plántulas del medio B5 y 2.3 veces menor que las del medio MS.

Al analizar la parte aérea de las plántulas, los hipocótilos de mayor longitud fueron los del medio B5 con el tratamiento HG5, midiendo en promedio 2.5 cm, seguido por el tratamiento HG10 con una longitud de 2 cm, mientras que la longitud de las plántulas del medio MS fueron 1.5 cm para el tratamiento HM5 y 1 cm para el tratamiento HM10. Para los tratamientos HG20 y HM20 se observó que la parte aérea (0.2 cm) fue 1.5 veces menor comparado con la longitud de la raíz. Las longitudes de las plántulas de *G. globosa* fueron menores que lo reportado para *Achyranthes aspera*. En este estudio reportan una longitud de 4.6 y 4 cm para plántulas provenientes de semillas tratadas con HgCl₂ al 0.1% durante 5 min y 20 min, respectivamente (Sen *et al.*, 2013), una menor longitud de las plántulas de *G. globosa*, puede deberse a la sensibilidad de la semilla al HgCl₂, este al ser un agente tóxico pudo afectar su desarrollo.

Sin embargo, el porcentaje de contaminación para los tratamientos HM5, HM10, HG5 y HG10 fue del 100%, a partir del cuarto día para los medios Gamborg's B5 y del noveno día para los medios MS.

De igual manera que la desinfección con $HgCl_2$, el porcentaje de contaminación para las semillas desinfectadas con $NaClO$ fue del 100 %. No obstante, la germinación se logró en menor tiempo y el desarrollo de las plántulas fue mayor. Las partes radiculares de las plántulas midieron alrededor de 3 cm al igual que los hipocótilos, al cuarto día de edad.

En el tercer protocolo, donde se evaluó la desinfección de las semillas sin su cubierta de fibra algodonosa con $NaClO$. Se observó un porcentaje de germinación semejante al segundo protocolo de desinfección. No obstante, el porcentaje de contaminación fue 11 veces menor, aproximadamente (Tabla 16). Mientras que el desarrollo de las plántulas fue mayor tanto en la parte radicular como en el hipocótilo. Los hipocotilos como las radículas de las plántulas germinadas en el medio Gamborg's B5 midieron de 3 a 4 cm al tercer día y para el medio MS al cuarto día después de la siembra, longitudes semejantes a lo reportado para plántulas de *A. aspera* L. (3.3-5.5 cm) desinfectadas con $NaClO$ (1-3 %) (Sen *et al.*, 2013).

Tabla 16. Germinación de semillas desnudas de *G. globosa*

Tipo de medio	Tiempo de germinación (d)	Porcentaje de germinación (%)	Porcentaje de contaminación (%)
Gamborg's B5	1	94.0±3.6 ^a	8.0±1.3
Murashige y Skoog	1	93.5±4.0 ^a	9.2±1.6

Tukey $p < 0.05$ (n=312). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra "a" el tratamiento estadísticamente diferente con mayor efecto.

El mayor porcentaje de germinación de *G. globosa* con menor tiempo de incubación fue en el medio B5 comparado con el medio MS, en los tres protocolos de desinfección. Esto probablemente se deba a que el medio B5 contiene mayor cantidad de nitrato de potasio (KNO_3). El medio Gamborg's B5 contiene 24% más de KNO_3 a diferencia del medio MS que contiene 1900 mg/L. Wambugu & Nyamongo, (2010), evaluaron la adición de KNO_3 en cultivos de *G. celosioides* obteniendo que el porcentaje de germinación aumentó un 10%. Esto quizás se deba al uso de este compuesto que tiene efectos significativos sobre la

germinación de semillas. Los nitratos, son una fuente de nitrógeno importante para muchas especies de plantas y se han utilizado para estimular la germinación de semillas latentes en muchas especies (Baskin *et al.*, 2001).

Evaluando los tres protocolos de desinfección, se observó que el método con mayor efectividad fue en el que se retiró la fibra algodonosa que cubre la semilla. Debido a que esta es una fuente de contaminación durante el establecimiento del cultivo. Además de que durante la exposición con el NaClO el proceso de desinfección se realizó un descascarillado, el cual favoreció notablemente al tiempo y porcentaje de germinación, ya que el embrión quedó expuesto al medio de cultivo, provocando así la germinación en un periodo más corto de tiempo. Esto es similar a lo reportado por el estudio en *G. celosioides* en donde obtuvieron que al escarificar la semilla aumentó un 30% el porcentaje de germinación comparado con semillas completas (Wambugu & Nyamongo, 2010). Asimismo, Sen *et al.* (2013) al realizar un estudio sobre desinfección de semillas con cáscara y descascarilladas de *A. aspera* L., obtuvo que las semillas sin cáscara exhibieron mejores resultados en porcentaje de germinación, supervivencia de explante y baja contaminación. Mientras que el desinfectante con menor porcentaje de contaminación fue el NaClO comparado con EtOH, HgCl₂ y nistatina.

7.2 Cultivo *in vitro* de callo

7.2.1 Cultivos de callos

La inducción de la callogénesis se realizó utilizando como explante hipocótilos de plántulas de 3-4 días, en diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D y ANA) y citocininas (KIN y BAP), en los dos medios basales de germinación (MS y B5). Un mes después de la inducción de callogénesis se clasificó la respuesta morfológica obtenida para cada tratamiento. En Tabla 17 y 18 se muestra la respuesta observada.

Tabla 17. Respuesta morfológica de hipocótilos de *G. globosa* (continua).

Tratamiento	Tipo de medio	Auxina	Citocinina	Concentración de auxina (mg/L)	Concentración de citocinina (mg/L)	Respuesta
1	B5	ANA	KIN	0.02	0.50	S/respuesta
2	MS	ANA	BAP	0.50	1.00	Callogénesis
3	MS	ANA	BAP	0.02	0.02	Callogénesis
4	B5	ANA	KIN	0.10	0.10	Callogénesis
5	MS	ANA	BAP	1.00	1.00	Callogénesis
6	B5	ANA	KIN	1.00	1.00	Callogénesis
7	B5	2,4-D	BAP	1.00	1.00	Callogénesis
8	MS	2,4-D	KIN	0.10	0.50	Callogénesis
9	B5	ANA	KIN	0.02	0.02	Rizogénesis
10	B5	ANA	BAP	0.10	1.00	Callogénesis
11	MS	2,4-D	KIN	1.00	1.00	Callogénesis
12	MS	2,4-D	KIN	0.10	0.10	Callogénesis
13	B5	2,4-D	KIN	0.10	1.00	Callogénesis
14	MS	ANA	BAP	0.02	0.50	Callogénesis
15	MS	2,4-D	BAP	0.50	0.02	Callogénesis
16	MS	ANA	KIN	0.02	0.10	Rizogénesis
17	B5	ANA	BAP	0.10	0.50	Callogénesis
18	B5	2,4-D	BAP	0.10	0.02	Callogénesis
19	B5	ANA	KIN	1.00	0.10	Callogénesis
20	B5	2,4-D	KIN	0.02	0.10	Callogénesis
21	B5	ANA	KIN	0.50	0.02	Callogénesis
22	MS	2,4-D	KIN	0.02	0.02	Callogénesis

Tabla 18. Respuesta morfológica de hipocótilos de *G. globosa* (continuación)

Tratamiento	Tipo de medio	Auxina	Citocinina	Concentración de auxina (mg/L)	Concentración de citocinina (mg/L)	Respuesta
23	B5	ANA	BAP	0.02	1.00	Callogénesis
24	MS	2,4-D	BAP	1.00	0.50	Callogénesis
25	B5	ANA	BAP	1.00	0.02	Callogénesis
26	MS	2,4-D	BAP	0.02	0.10	Callogénesis
27	MS	2,4-D	KIN	0.02	1.00	Callogénesis
28	MS	2,4-D	BAP	0.10	1.00	Callogénesis
29	B5	2,4-D	KIN	0.50	1.00	Callogénesis
30	B5	ANA	BAP	1.00	0.50	Callogénesis
31	MS	2,4-D	KIN	0.50	0.50	Callogénesis
32	B5	ANA	BAP	0.50	0.50	Callogénesis
33	B5	2,4-D	BAP	0.50	0.10	Callogénesis
34	B5	2,4-D	BAP	0.02	0.50	Callogénesis
35	B5	ANA	BAP	0.02	0.10	S/respuesta
36	MS	2,4-D	BAP	1.00	0.10	Callogénesis
37	B5	2,4-D	BAP	0.10	0.10	Callogénesis
38	B5	2,4-D	KIN	1.00	0.50	Callogénesis
39	MS	ANA	BAP	0.10	0.10	Callogénesis
40	MS	ANA	KIN	1.00	0.50	Callogénesis
41	MS	ANA	KIN	0.10	0.02	Callogénesis
42	MS	ANA	KIN	0.10	1.00	Rizogénesis
43	B5	2,4-D	KIN	1.00	0.02	Callogénesis Rizogénesis
44	MS	ANA	KIN	0.50	0.10	Callogénesis
45	MS	ANA	KIN	1.00	0.02	Callogénesis rizogénesis

Para cada tratamiento se consideró una n=25.

En la Figura 7 se muestra el porcentaje de callogénesis para cada uno de los tratamientos con su respectivo error estándar. Asimismo, se muestran los tratamientos estadísticamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). La agrupación estadística completa se puede observar en el anexo 4.

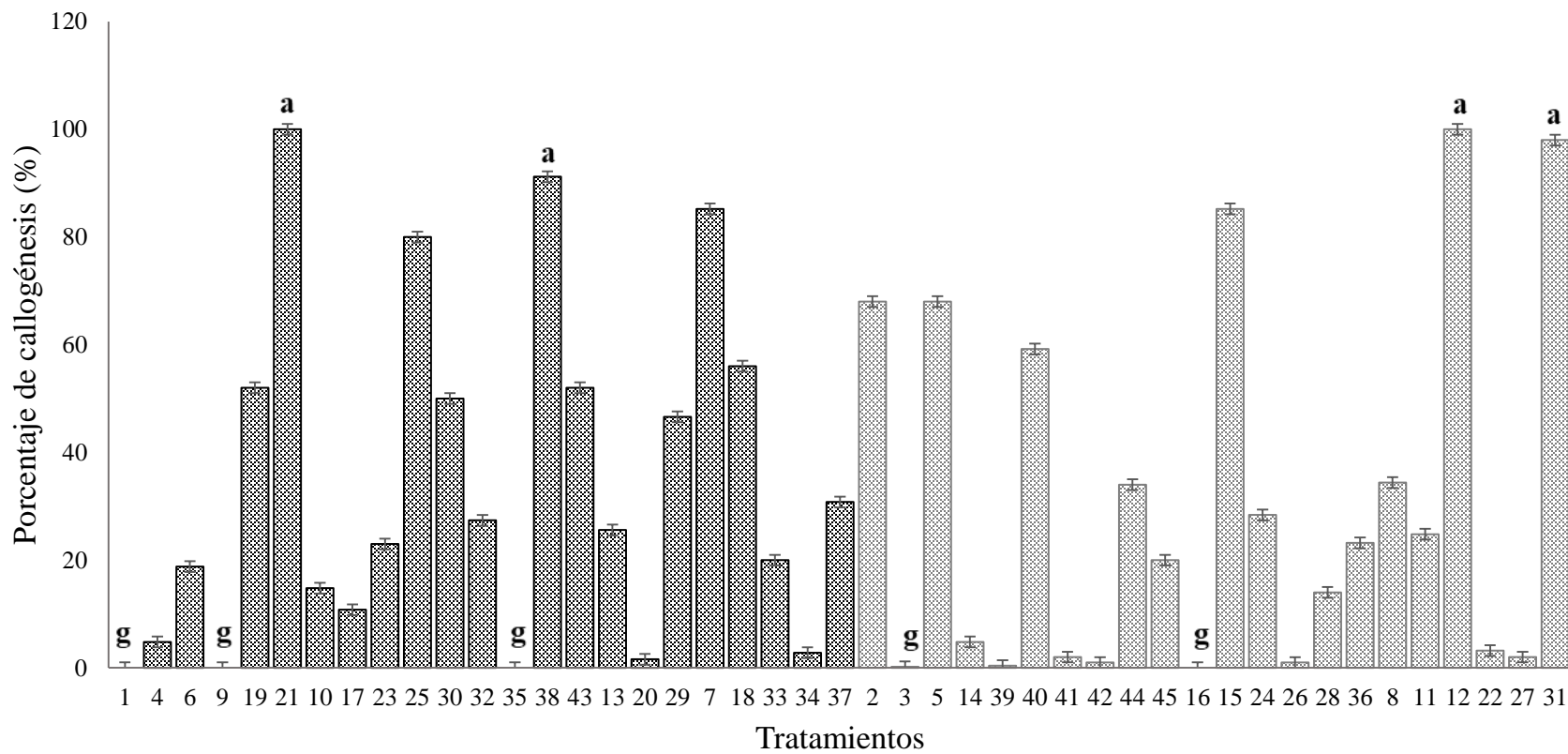


Figura 7.Inducción de calogénesis a partir de hipocótilos de *G. globosa*

(Las barras color gris oscuro corresponden a los tratamientos en el medio Gamborg's B5 y las barras color gris claro corresponden a los tratamientos en el medio MS)

Al analizar el modelo estadístico se obtuvo un valor de p de 0.33, es decir, no se encontró diferencia estadística en el diseño experimental. Los porcentajes de callogénesis son independientes del tipo de medio (Anexo 4), ya que en los dos tipos de medios se observó un alto y bajo porcentaje de callogénesis. Sin embargo, al realizar el análisis de medias, se obtuvo que existen tratamientos estadísticamente diferentes. Los mayores porcentajes de callogénesis se obtuvieron en las siguientes combinaciones: en el medio B5 suplementado con 0.50 mg/L de ANA y 0.02 mg/L de KIN (tratamiento 21) y con 1.00 mg/L 2, 4 D y 0.50 mg/L de KIN (tratamiento 38) donde se obtuvieron un 100% y 91.20% de callogénesis, respectivamente. Mientras que en el medio MS suplementado 2,4 D: KIN a 0.10 mg/L: 0.10 mg/L y 0.50 mg/L: 0.50 mg/L correspondientes a los tratamientos 12 y 31 con un 100% y 98%, respectivamente. Los tratamientos con menor porcentaje de callogénesis fueron el tratamiento uno: ANA/KIN (0.02 mg/L: 0.50 mg/L); tratamiento 9: ANA/KIN (0.02 mg/L: 0.02 mg/L) y tratamiento 35: ANA/BAP (0.02 mg/L: 0.10 mg/L) en el medio B5. Mientras que el medio MS, tratamiento 3: ANA/BAP (0.02 mg/L para ambos RCV) y tratamiento 16: ANA/KIN (0.02 mg/L: 0.10 mg/L) (Tabla 19).

Tabla 19. Tratamientos significativamente diferentes en la inducción de callogénesis.

Porcentaje de callogénesis	Tratamiento	Reguladores de crecimiento			
		2,4-D	ANA	BAP	KIN
		Concentración (mg/L)			
Alto (>90%)	12	0.10			0.10
	21		0.50		0.02
	31	0.50			0.50
	38	1.00			0.50
Bajo (<0.3%)	1		0.02		0.50
	3		0.02	0.02	
	9		0.02		0.02
	16		0.02		0.10
	35		0.02	0.10	

En los tratamientos con callogénesis mayor al 80% en los dos tipos de medio de cultivo, se encontraba presente la auxina 2,4-D. Existen estudios en algunas especies de la familia de las Amaranthaceae como: *Achyranthes aspera* (Naz & Khatoon, 2014) y *B. vulgaris* (Trejo-Tapia *et al.*, 2008) donde se han reportado altos porcentajes de callogénesis con la adición de 2,4-D. Jacobsen (1983) señala que esta auxina, es una fitohormona con alta movilidad, baja tasa de oxidación y conjugación por lo que se acumula en los tejidos, por lo tanto existe una mayor disponibilidad y por ende es más eficiente.

Si bien, la adición de ANA en el medio permitió un alto y bajo porcentaje de callogénesis, la concentración de este regulador de crecimiento marco la diferencia en el porcentaje de callogénesis en cada tratamiento. En un estudio realizado por Naz & Khatoon en 2014, reportan que la callogénesis se favorece a altas concentraciones de ANA en explantes de *A. aspera* (especie perteneciente a la familia de las Amaranthaceae). Ya que a bajas concentraciones no se estimula la callogénesis. Probablemente a esto se deba que la formación de callo en los tratamientos 1, 3, 9, 16 y 35 fue mínima.

De igual manera la adición de las citocininas (KIN y BAP) en los tratamientos, mostraron porcentajes mayores de 80% y menores del 30% en ambos medios de cultivo. Como se puede observar, la relación de un alto porcentaje de callogénesis es dependiente de la proporción de auxinas y citocininas exógenas como menciona Skoog & Miller, (1957), ya que una proporción adecuada de estos reguladores promueven la generación de callo.

Cada combinación de reguladores de crecimiento indujo la formación de callos *in vitro* con características morfológicas peculiares. En la tabla 20, se describe los parámetros que se utilizaron para clasificar los callos. La oxidación se especificó como ausencia (-) y presencia (+). Asimismo, se evaluó el tamaño y el crecimiento del callo formado en cada explante, utilizando una escala de tres niveles (Ghaffar *et al.*, 2007). Mientras que, en la tabla 21 y 22 se describen las características que se presentaron en los explantes para cada tratamiento. El tipo de callo se clasificó según la agrupación de Ikeuchi *et al.* (2013). La coloración se le

asignó teniendo como referencia al modelo de color RGB (por sus siglas en inglés de red, green, blue) que se basa en la composición del color en términos de la intensidad de los colores primarios (Gupta *et al.*, 2013) (Anexo 6).

Tabla 20. Escala de clasificación de callos de *G. globosa*

Símbolo	Tamaño	Crecimiento
+	Pequeño	Lento
++	Mediano	Medio
+++	Grande	Acelerado

Tabla 21. Características morfológicas de callos de *G. globosa* (continua)

Tratamiento	Tipo de callo	Coloración	Oxidación	Tamaño de callo	Crecimiento
1	S/respuesta	Madero intenso (DEB887)	+	-	-
2	Compacto	Rosa intenso (FF1493)	-	+++	+++
3	Compacto	Rojo violeta (C71585)	+	+	+
4	Friable	Blanco navajo (FFDEAD)	+	+	+
5	Compacto	Rosa intenso (FF1493)	-	+++	+++
6	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+	+
7	Friable	Rosa tenue (FFB6C1)	-	+++	+++
8	Friable	Maíz (FFF8DC)	-	++	++
9	Rizogénico	Blanco con rosa (FFFFFF y FF69B4)	+	-	-
10	Compacto	Rojo violeta (C71585)	+	+	+
11	Friable	Chiffon con rosa cálido (FFFACD y FF69B4)	-	+++	+++
12	Friable	Maíz (FFF8DC)	+	++	++

Para cada tratamiento se consideró una n=25.

Tabla 22. Características morfológicas de callos de *G. globosa* (continuación).

Tratamiento	Tipo de callo	Coloración	Oxidación	Tamaño de callo	Crecimiento
13	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	++	++
14	Compacto	Rojo violeta (C71585)	+	+	+
15	Friable	Blanco con amarillo (FFFFFF y FFFF00)	-	+++	+++
16	Rizogénico	Rosa cálido (FF69B4)	+	-	-
17	Compacto	Rosa cálido (FF69B4)	+	+	+
18	Friable	Blanco (FFFFFF)	-	++	++
19	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+	+
20	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+	+
21	Friable	Marfil (FFFFF0)	+	++	++
22	Compacto	Rojo violeta (C71585)	+	+	+
23	Compacto	Rojo violeta (C71585)	+	+	+
24	Friable	Marfil (FFFFF0)	+	++	++
25	Friable	Marfil con rosa cálido (FFFFF0 y C71585)	+	+	+
26	Compacto	Magenta (8B008B)	+	+	+
27	Compacto	Rosa intenso (FF1493)	+	+	+
28	Compacto	Rosa intenso (FF1493)	+	+++	+++
29	Friable	Rosa tenue (FFB6C1)	-	+++	+++
30	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+++	+++
31	Friable	Marfil con rosa cálido (FFFFF0 y C71585)	-	+++	+++
32	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+++	+++
33	Friable	Rosa tenue (FFB6C1)	-	+++	+++
34	Compacto	Rosa intenso (FF1493)	+	+	+
35	-	Madero intenso (DEB887)	+	-	-
36	Friable	Blanco con amarillo (FFFFFF y FFFF00)	-	++	++
37	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+	+
38	Friable	Marfil con rosa cálido (FFFFF0 y C71585)	+	+++	+++
39	Friable	Rosa cálido (FF69B4)	+	+	+
40	Friable	Rosa intenso (FF1493)	+	++	++
41	Friable	Marfil (FFFFF0)	+	+	+
42	Compacto y Rizogénico	Rosa cálido con amarillo verdoso (FF69B4 y ADFE2F)	+	+	+
43	Friable	Blanco (FFFFFF)	-	++	++
44	Friable	Rosa tenue (FFB6C1)	+	+	+
45	Friable y Rizogénico	Marfil con rosa cálido (FFFFF0 y C71585)	+	+	+

Para cada tratamiento se consideró una n=25.

En la escala de crecimiento se consideraron tres tipos: 1) crecimiento lento, formación de callo solo en cierta parte del explante y que mostró un desarrollo lento; 2) crecimiento medio, formación de callo en todo el explante pero no se desarrolló de forma óptima; y 3) crecimiento acelerado, aquellos callos que se formaron en todo el explante y su crecimiento fue rápido.

A continuación, se muestra la respuesta obtenida en cada tratamiento para cada tipo de medio. En la Figura 8 y 9, se puede observar las respuestas para los tratamientos en medio B5 y en la Figura 10 y 11 los tratamientos en medio MS.

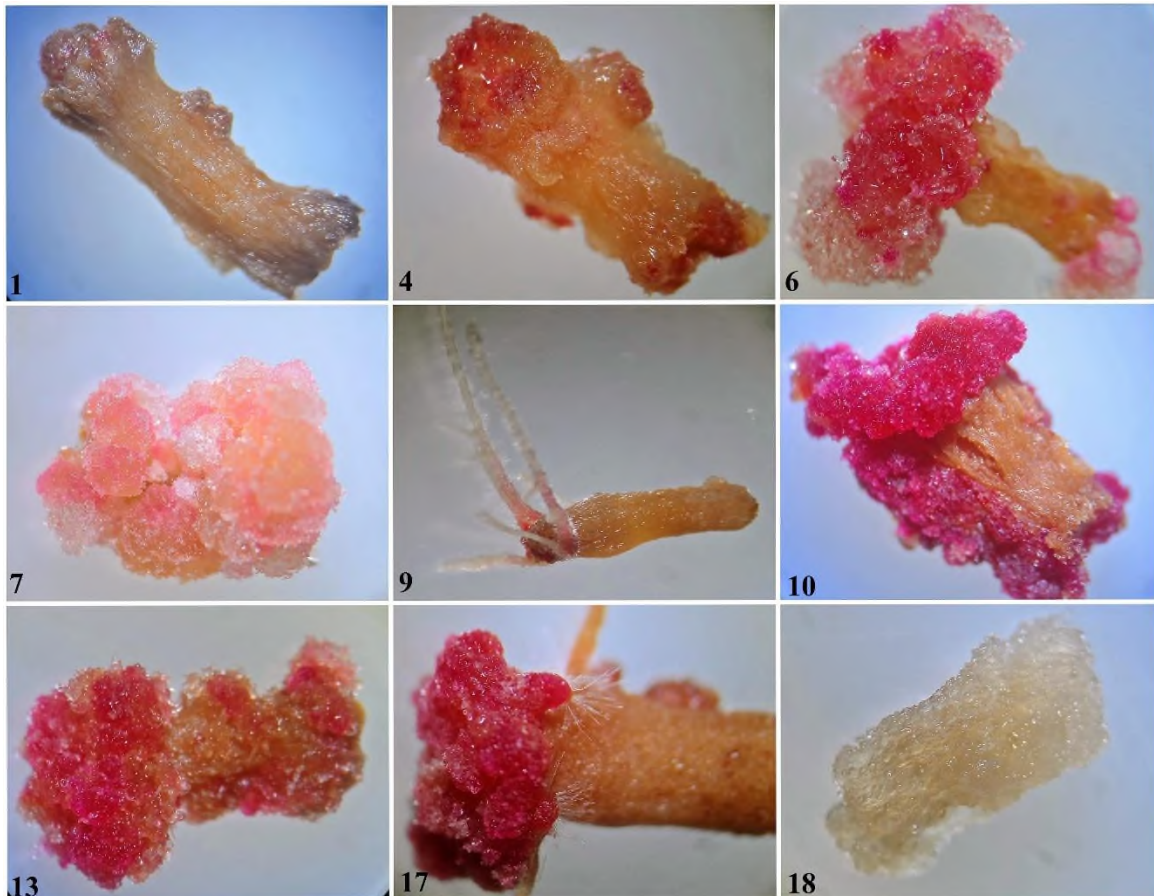


Figura 8. Morfología en callogénesis de hipocótilos de *G. globosa* en medio Gamborg's B5 (continua)

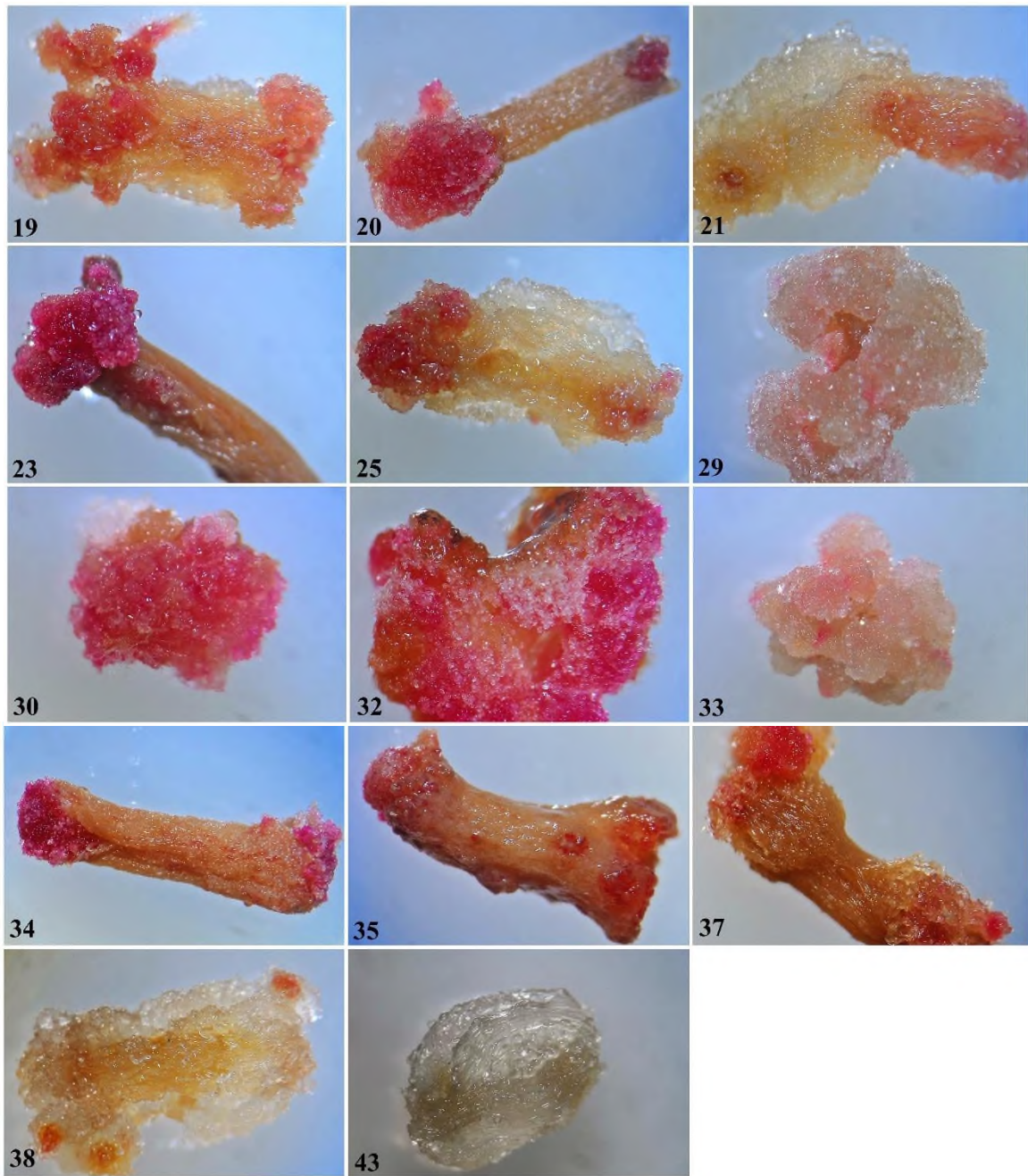


Figura 9. Morfología en callogénesis de hipocótilos de *G. globosa* en medio Gamborg's B5 (continuación)

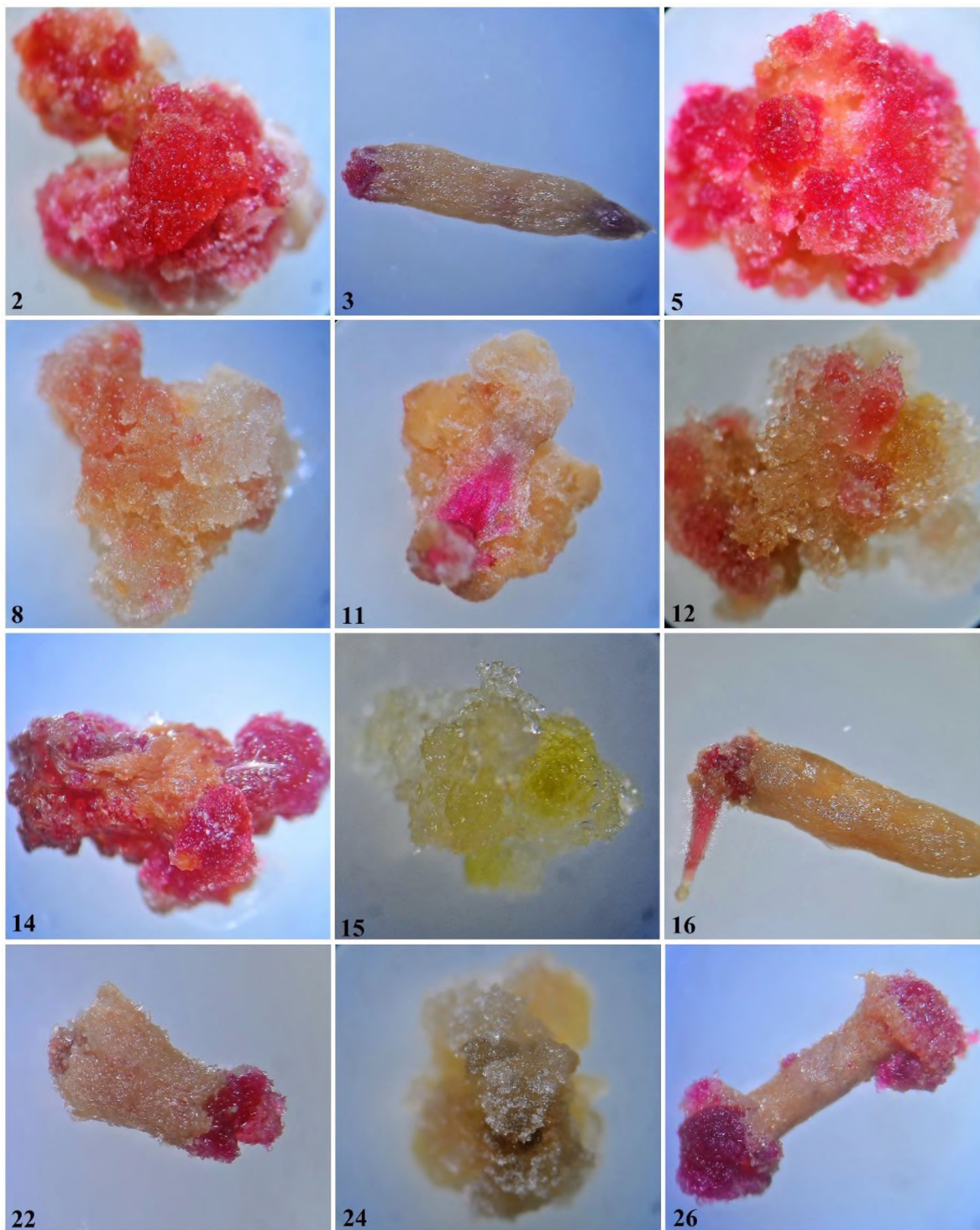


Figura 10. Morfología en callogénesis hipocótilos de *G. globosa* en medio MS (continua)

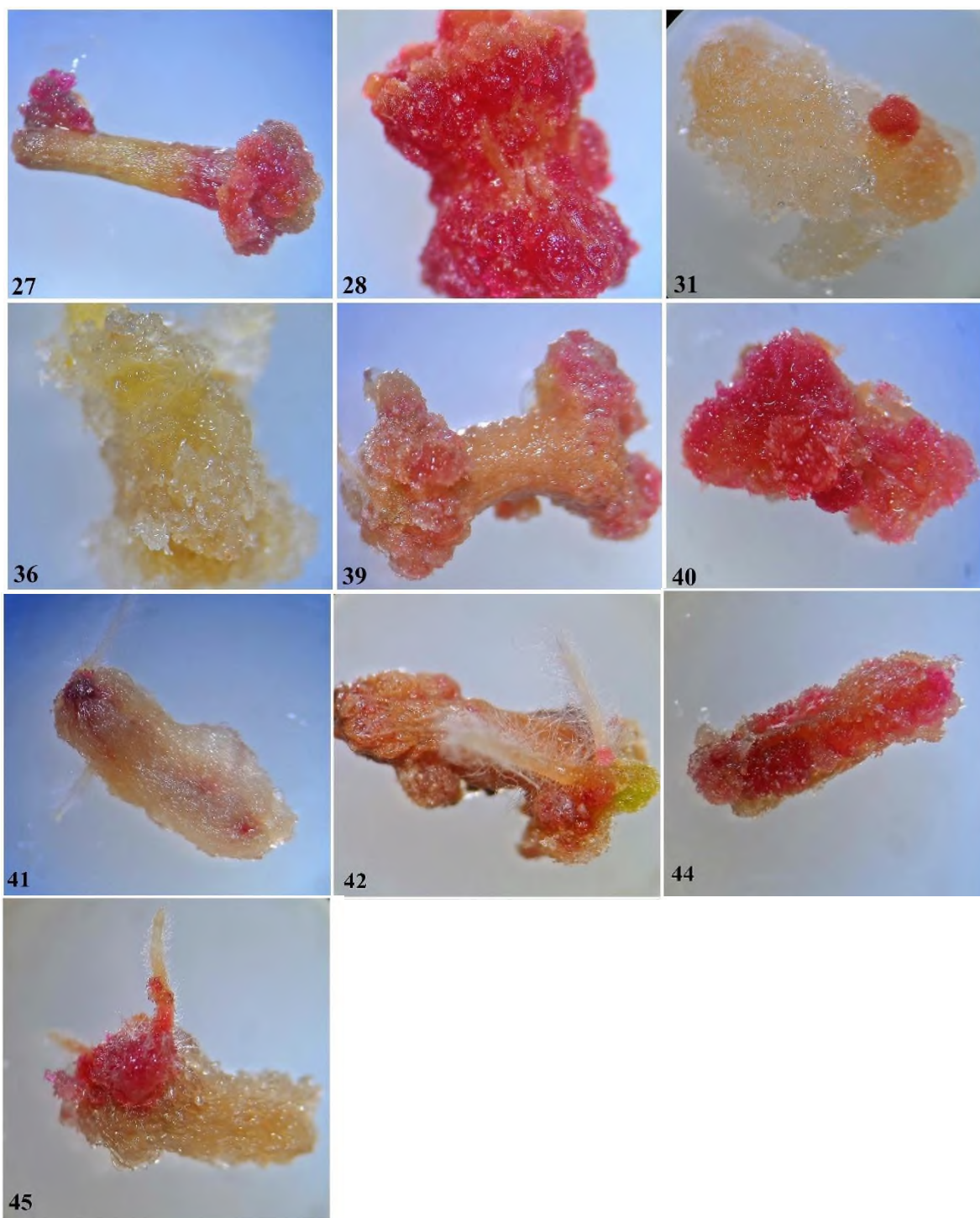


Figura 11. Morfología en callogénesis hipocótilos de *G. globosa* en medio MS (continuación).

Como se puede observar, en todos los tratamientos el callo obtenido mostró una morfología diferente, partiendo de un mismo tipo de explante para inducción y combinaciones de reguladores hormonales que se reportan para la obtención de callo (auxinas y citocininas). Sin embargo, se desconocen las interacciones a nivel molecular de estas hormonas vegetales y los factores de transcripción involucrados en la generación de callo (Ikeuchi *et al.*, 2013), así que probablemente la respuesta obtenida en cada tratamiento se puede deber a la combinación y concentración de cada hormona que desató una cascada de señalización diferente, es por ello que la respuesta obtenida fue diversa.

Ruiz y Valadez (1985) reportaron que la mejor condición para inducción de callogénesis es a partir de hipocótilos de *G. globosa* en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 0.22 mg/L de 2,4-D y 0.01 mg/L de BAP, en el cual se obtuvo el máximo contenido de betalaínas, al exponer los cultivos a luz azul. Esta combinación de RCV es igual a la utilizada en este trabajo pero a diferentes concentraciones. El diseño de experimento utilizado en este estudio generó 10 combinaciones de 2,4-D y BAP, cinco para el medio Gamborg's B5 (tratamientos: 7, 18, 33, 34, 37) y cinco para el medio MS (15, 24, 26, 28, 36). De los diez tratamientos, cuatro produjeron callos blanquesinos (tratamiento 15, 18, 24 y 36). Esto sugiere, que probablemente la fitohormona BAP esté relacionada con la coloración de los callos. Los callos inducidos con una concentración menor a 1 mg/L de BAP no presentaron coloración, tal es el caso de los tratamientos 15, 18, 24 y 36. Mientras que a concentraciones mayores se obtuvieron callos con coloración violeta, tal como lo reporta Biswas *et al.* (2013), a una concentración de 2 mg/L de BAP en un fotoperiodo de luz blanca de 16 h obtuvieron un callo con coloración violeta intenso. Por otra parte, de las diez combinaciones, siete de ellas fueron callos friables (7, 15, 18, 24, 33, 36 y 37) y tres fueron callos compactos (26, 28 y 34).

Por otro lado, comparando la callogénesis reportada por Ghaffar *et al.* (2007) a partir de semillas en medio MS suplementado con concentraciones de 0.5 a 6.0 mg/L de BAP y 0.2 a 3.0 mg/L de ANA, en el presente estudio se obtuvo callo a partir de concentraciones menores de fitohormonas. Debido a que las concentraciones evaluadas para ambos reguladores fueron de 0.02 a 1.0 mg/L. Además de que la gama de colores fue más amplia, desde rosa cálido

hasta rojo violeta al combinar BAP y ANA a diferentes concentraciones en el medio B5 (tratamientos 10, 17, 23, 25, 30 y 32) y en el medio MS (tratamientos 2, 3, 5, 14 y 39). Mientras que Ghaffar *et al.* (2007) solo obtuvieron dos tratamientos con coloración rojiza (2.0 mg/L BAP: 0.2 mg/L ANA y 4.0 mg/L BAP: 0.2 mg/L ANA), que probablemente son los tratamientos productores de betalaínas.

A partir de los resultados anteriores, se seleccionaron para el subcultivo de callos, aquellos tratamientos que cumplieran con uno de los siguientes criterios:

1. Que fueran de gran tamaño, crecimiento acelerado y que no presentará oxidación
2. Que fueran de gran tamaño, crecimiento acelerado y oxidación mínima
3. Que fueran de tamaño mediano, crecimiento medio y que no presentará oxidación
4. Que fueran de tamaño mediano, crecimiento medio y oxidación mínima

Tabla 23. Tratamientos de callos de *G. globosa* seleccionados para subcultivo

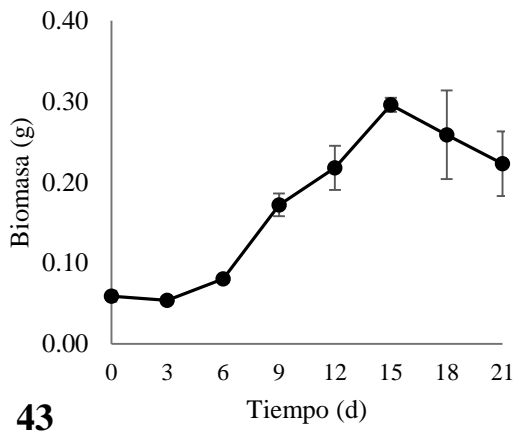
Tipo de medio	Criterio			
	1	2	3	4
	Tratamientos			
MS	2	28	8	12
	5		36	24
	11			40
	15			
	31			
B5	7	30	18	
	29	32	43	
	33	38		

Después de la primera semana del subcultivo algunos callos se vieron favorecidos en su crecimiento y apariencia (tratamientos 43, 38, 36, 31, 24, 15, 11, 05 y 02). Mientras que otros fueron afectados por la oxidación. Este es un problema muy común, debido a que la oxidación

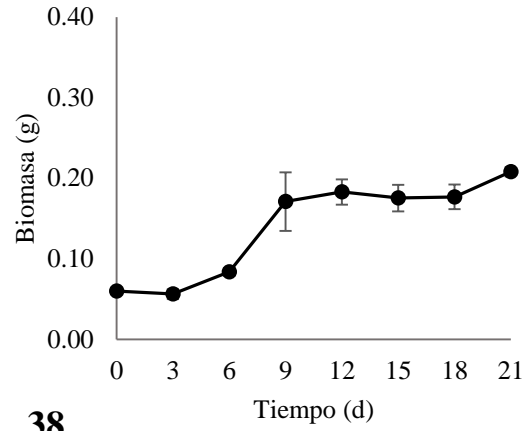
puede ser producto de niveles altos de especies reactivas de oxígeno que son producidas en diferentes organelos como: cloroplasto, mitocondria, peroxisoma, retículo endoplasmático, pared celular, apoplasto y membrana plasmática, debido a que estas moléculas forman parte de mensajeros en cascadas de señalización. Sin embargo, niveles altos generan un estrés oxidativo debido a la deficiencia en el mecanismo de defensa de la célula (Sharma *et al.*, 2012).

7.2.1.1 Cinética de crecimiento y producción de metabolitos.

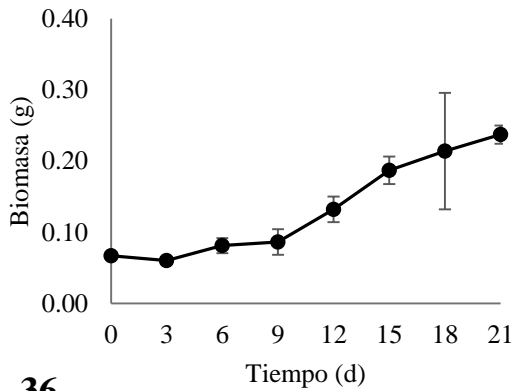
Para la selección de callos de mayor producción de metabolitos, se realizó una cinética de crecimiento en donde se cuantificó la producción de betalaínas y compuestos fenólicos. Los tratamientos candidatos fueron aquellos que presentaron mayor adaptabilidad durante los subcultivos (43, 38, 36, 31, 24, 15, 11, 05 y 02). Cabe mencionar que los tratamientos 43 y 38 son los únicos pertenecientes al medio B5 y los tratamientos 36, 31, 24, 15, 11, 05 y 02 al medio MS. A continuación se muestran las cinéticas de crecimiento y producción para cada tratamiento de callo.



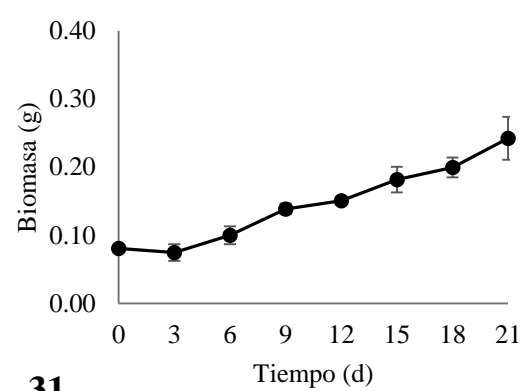
43



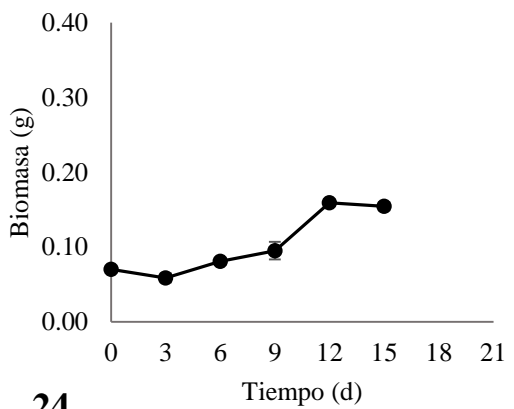
38



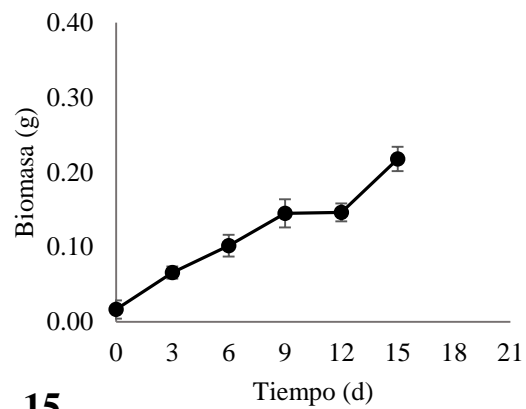
36



31



24



15

Figura 12. Cinética de crecimiento de callos de *G. globosa*: tratamientos 43, 38, 36, 31, 24 y 15.

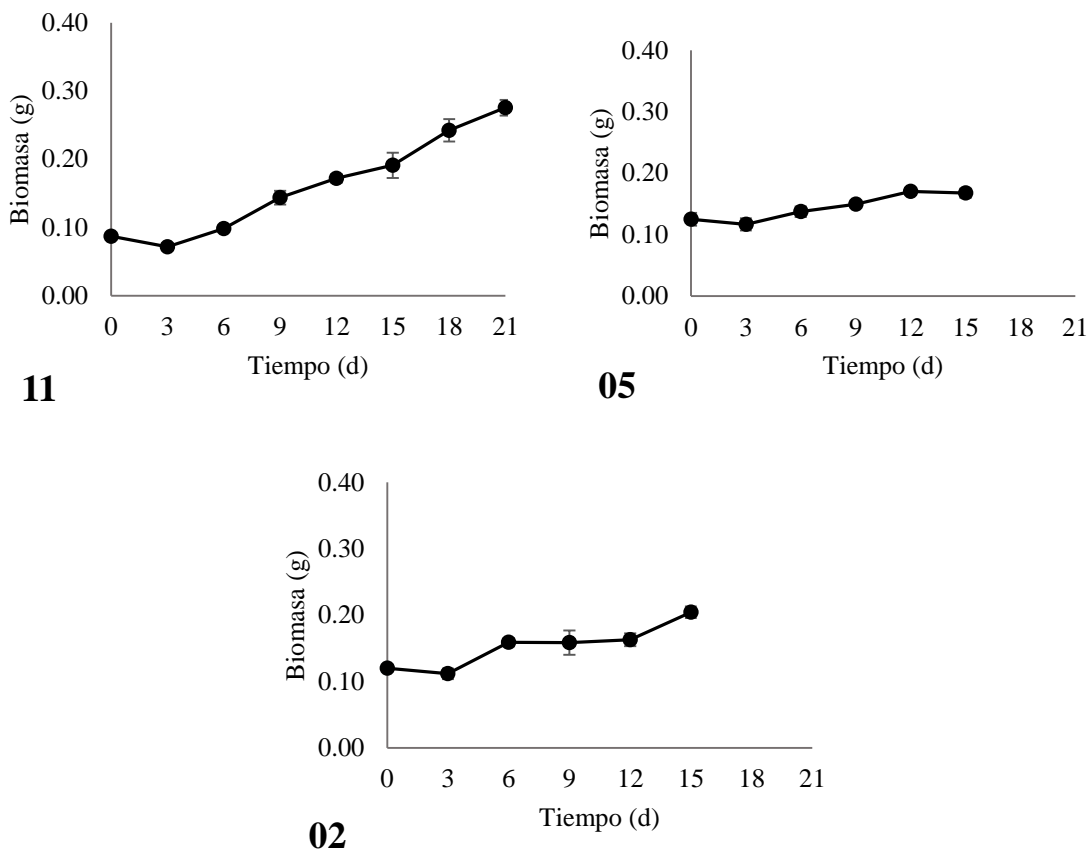


Figura 13. Cinética de crecimiento de callos de *G. globosa*: tratamientos 11, 05 y 02

El tiempo de la cinética fue de 15 y 21 días, debido a que algunos tratamientos presentaron oxidación seguido de necrosis celular, después del día 15 de inoculación (24, 15, 05 y 02), mientras que los tratamientos 43, 38, 36, 31 y 11 mostraron un cultivo aparentemente sano durante los 21 días de cinética.

Durante las cinéticas, solo se observó un perfil sigmoideal típico en los tratamientos 43, 38 y 24. Analizando las fases de la curva de crecimiento típica, en algunas líneas no se identificó la fase lag, tal es el caso de los tratamientos 38 y 15, a diferencia de los tratamientos 36, 24 y 11, que después del cuarto día de inoculación, aproximadamente, se adaptaron y comenzaron a crecer. Mientras que los cultivos 43, 31, 05 y 02 se comportaron de una manera

similar durante esta primera fase, adaptándose después del tercer día. Los tratamientos 38 y 15 al no tener dificultad de adaptación, su fase exponencial inició a partir del día tres hasta el día 15. Entrando a una fase estacionaria a partir del día 15 para el caso del tratamiento 38, este comportamiento fue semejante en el tratamiento 43. Mientras que los tratamientos 36, 31, 15 y 11 no entraron en una fase estacionaria, probablemente a que tardaron unos días más en entrar a la fase exponencial. El tratamiento 05 y 02 mostraron un comportamiento similar, aumentando su crecimiento a apartir del día tres. Sin embargo, el tratamiento 02 después del día seis aparentemente entra a fase estacionaria a diferencia del 05.

Posterior a las cinéticas de crecimiento se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_1) y el tiempo de duplicación (td) para cada tratamiento (Tabla 24).

Tabla 24. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para callos de *G. globosa*.

Tratamiento	Velocidad de crecimiento (d ⁻¹)	Tiempo de duplicación (d)
43	0.146±0.005 ^b	4.740±0.161 ^a
38	0.179±0.093 ^a	5.120±3.660 ^a
36	0.090±0.023 ^c	7.970±2.050 ^a
31	0.074±0.007 ^d	9.360±0.976 ^a
24	0.105±0.023 ^c	6.800±1.709 ^a
15	0.097±0.027 ^c	7.560±2.411 ^a
11	0.072±0.005 ^d	9.530±0.681 ^a
05	0.031±0.016 ^e	27.800±10.000 ^c
02	0.041±0.001 ^e	16.790±0.507 ^b

Tukey $p < 0.05$ (n=3). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra “a” el tratamiento con mayor efecto y la desviación estándar.

Los tratamientos con mayor velocidad de crecimiento durante la cinética fueron los del medio Gamborg’s B5 (43 y 38) comparados con los del medio MS. Estos tratamientos tenían una

combinación de 2,4-D y KIN. En caso de los tratamientos 05 y 02, estos fueron los tratamientos con mayor pigmentación de los callos durante la cinética. Sin embargo, eran callos menos friables comparados con el resto de los tratamientos y fueron los de menor crecimiento. Esto probablemente, se deba a cambios en su metabolismo secundario, que dirige los nutrientes para síntesis de metabolitos, dejando en segundo plano la cantidad de nutrientes destinados para su crecimiento. En este caso, posiblemente con el fin de contrarrestar la oxidación, puesto que, al presentarse un proceso de senescencia, los procesos anabólicos disminuyen (Watanabe *et al.*, 2013).

Este mismo fenómeno se observa en los tratamientos 43 y 38, los cuales no presentaron ningún tipo de pigmentación en los primeros días de la cinética, hasta el día 12 en donde se comenzó a notar la producción de pigmentos. Coincidiendo con lo reportado para *Zaleya decandra*, donde la biosíntesis de betalaínas ocurre entre el sexto y quinto día (Radfar *et al.*, 2012).

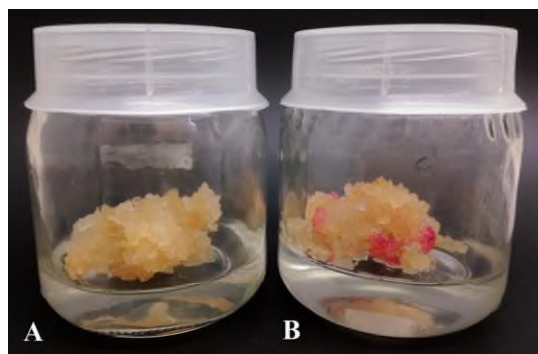


Figura 14. Cultivo de callo del tratamiento 38. A) Callo con 9 días de edad, B) Callo con 15 días de edad

Contrastando la producción de biomasa en los diferentes tratamientos, el tratamiento 11 (0.270 g) fue el de mayor producción, seguida de la línea 31, 38, 36, 43, 15, 02, 05 y 24. Siendo el tratamiento 24 el de menor producción de biomasa (0.150 g).

El tipo de crecimiento y producción de biomasa de cada tratamiento probablemente se deba a la interacción de la auxina y citocinina presentes en el medio de inoculación, debido a que la regulación del crecimiento esta mediada por diferentes factores, entre los que se encuentra la hidratación de la pared celular, que están influenciada principalmente por las auxinas (Wolf *et al.*, 2012). Además, se conoce que estas dos hormonas son inductores de la división celular en cultivos vegetales. Si bien, se sabe que en la formación del callo está involucrada la presencia de auxinas y citocininas, a pesar de que las citocininas son compuestos antagónicos para las auxinas (Schaller *et al.*, 2015). Por consiguiente, tal vez la velocidad de crecimiento de cada tratamiento esta mediada por la concentración y el tipo de citocinina presente en el medio de cultivo. De igual manera, la morfología externa de los callos se vio afectada por las combinaciones y concentraciones de fitohormonas.

De manera similar, la producción de betalaínas se vio influenciada por el tipo de regulador de crecimiento de cada tratamiento. En la Figura 15 y 16 se muestra la cuantificación durante la cinética de producción.

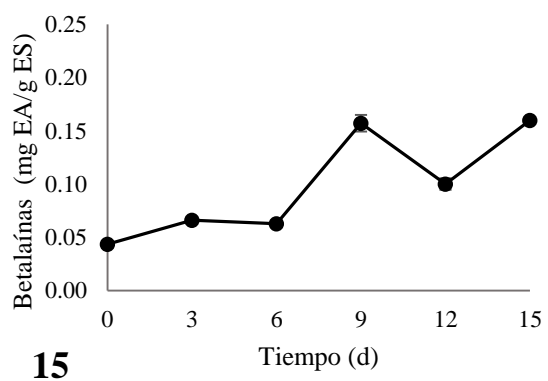
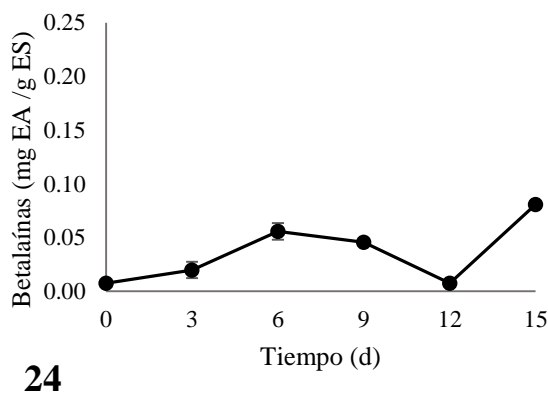
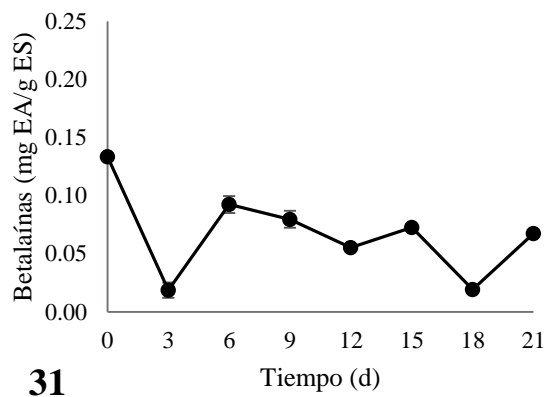
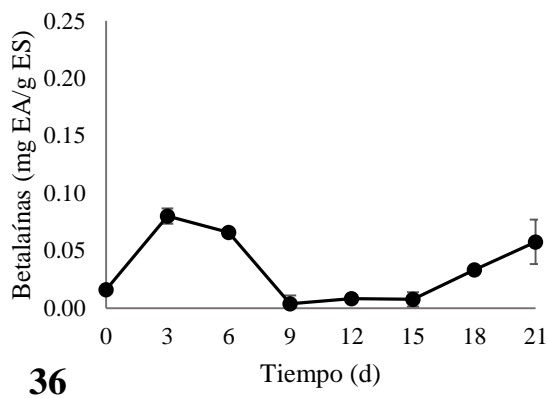
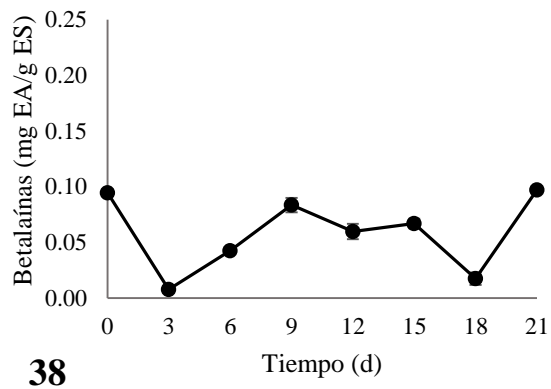
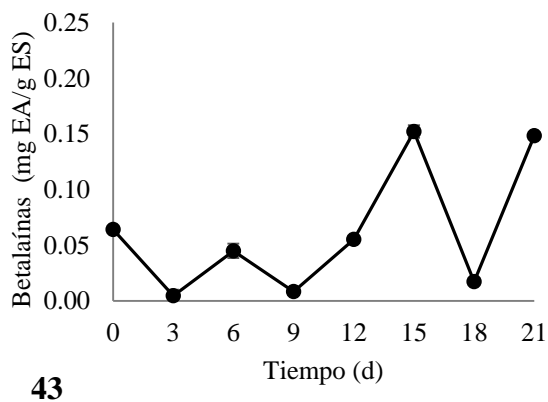


Figura 15. Producción de betalainas en callos de *G. globosa* tratamientos 43, 38, 36, 31, 24 y 15.

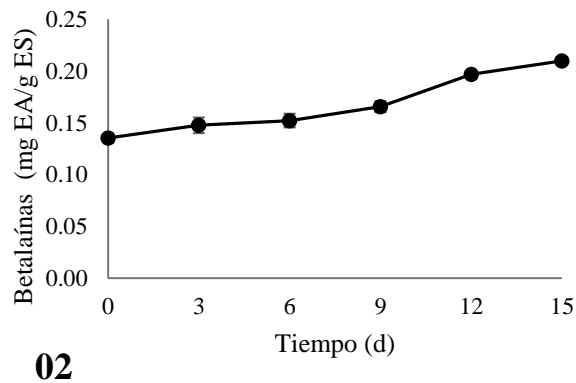
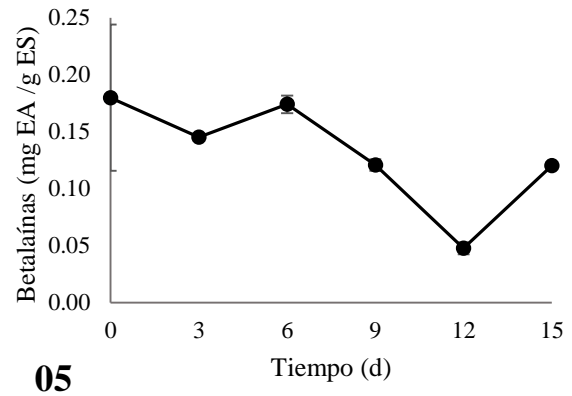
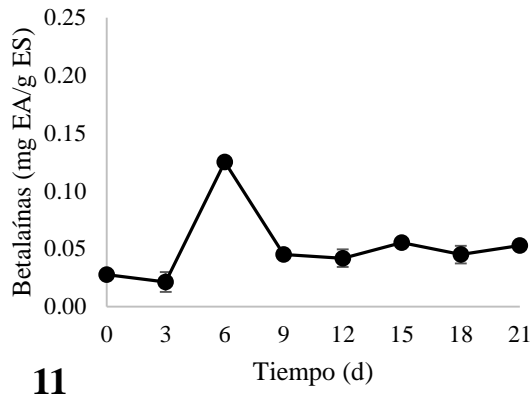


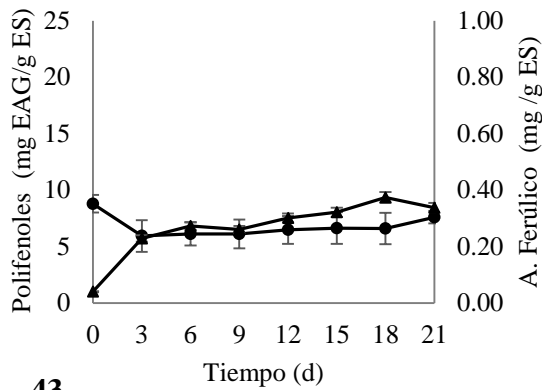
Figura 16. Producción de betalainas en callos de *G. globosa* tratamientos 11, 05 y 02.

Durante las cinéticas, el perfil de producción de pigmento, generalmente, mostró un comportamiento oscilatorio. En algunos tratamientos se observó una disminución en el segundo día de muestreo, posteriormente la producción se mantuvo y finalizó con un ligero aumento en el día 21 (tratamientos 38 y 31). Por el contrario, algunos mostraron primero un aumento en la producción, subsiguientemente disminuyó y se mantuvo al finalizar la cinética (tratamiento 11), o bien aumentó en el punto final (tratamiento 36 y 24). Otros tratamientos como el 43 y 15, tuvieron una disminución y aumento secuencial en todos los puntos. No obstante, dos tratamientos (05 y 02) mostraron una producción creciente, siendo el 02 estadísticamente el de mayor producción de betalainas con 0.210 mg EA/g ES (Anexo 7). Si

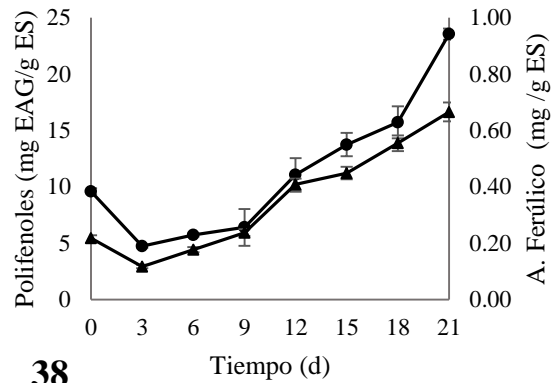
bien, el tratamiento 05 no fue el segundo más productor al finalizar su cinética, se observó que durante esta se obtuvieron concentraciones altas comparadas con los otros tratamientos, 0.179 y 0.173 mg EA/g ES, en el día cero y seis, respectivamente. Mientras que los de menor producción fueron los tratamientos 36 (0.057 mg EA/g ES) y 11 (0.052 mg EA/g ES).

La producción de betalaínas tuvo un efecto positivo dependiendo al tipo de RCV. Debido a que los tratamientos con mayor producción durante la cinética fueron aquellos que contenían en el medio BAP y ANA a una concentración de 1.0 mg/L: 05 mg/L (tratamiento 02) y 1.0 mg/L: 1.0 mg/L (tratamiento 05), aparentemente la presencia de BAP favoreció la producción de pigmento. De acuerdo a lo reportado por Ruiz & Valadez, (1985), la combinación de 2,4-D (0.22 mg/L) y BAP (0.01 mg/L) en medio MS expuesto a luz azul genera un callo friable productor de betalaínas de *G. globosa*. De igual manera, Biswas *et al.* (2013) reporta una producción de betalaínas de 0.035 mg EA/g de PF de células, en callos de *A. tricolor* en medio MS suplementado con 2.0 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de ANA en un fotoperiodo de luz blanca de 16 h. Sin embargo, existe otro estudio donde se obtuvo una producción de betalaínas a partir de modificaciones al medios de cultivo, tal es el caso reportado por De Aguiar *et al.* (2015) quienes obtuvieron una producción de 0.011 mg betalaínas totales/ mL en callos de *Pereskia aculeata* en medio MS modificado (30 mM de N_2 y una relación de 1:8 de $NH_4^+ : NO_2^-$) suplementado con 10 μ M picloram. Comparando la producción obtenida en el tratamiento 02, la concentración de betalaínas fue 1.45 y 4.18 veces menor a lo reportado por Biswas *et al.* (2013) y De Aguiar *et al.* (2015), respectivamente. Esto probablemente se debe a los diferentes tipos y concentraciones de RCV, medio de cultivo y condición lumínica empleadas.

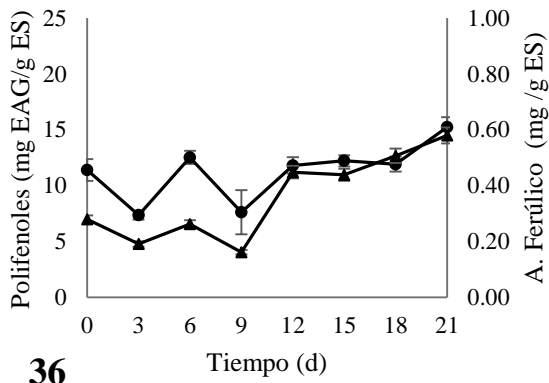
Por otro lado, la producción de polifenoles totales y de ácido ferúlico (polifenol cuantificado mayoritariamente por UHPLC) son mostrados en las Figuras 17 y 18.



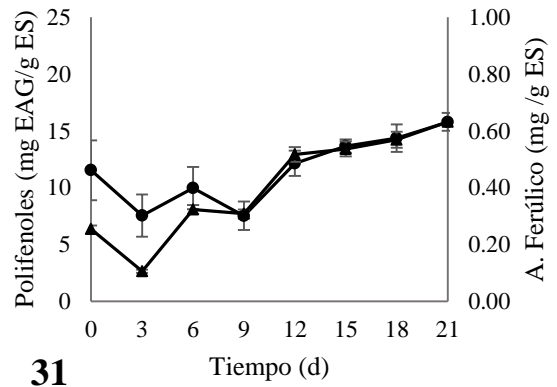
43



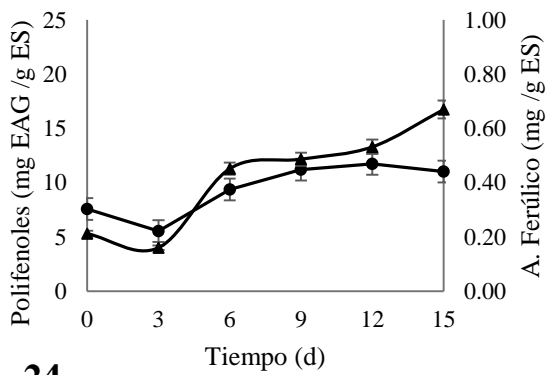
38



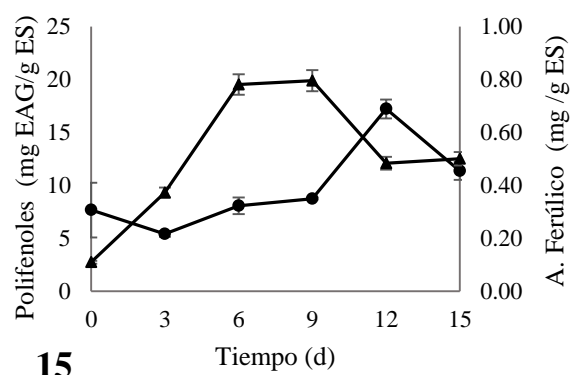
36



31



24



15

Figura 17. Producción de polifenoles totales (●) y á. ferúlico (▲) en callos de *G. globosa* en diferentes tratamientos (continua)

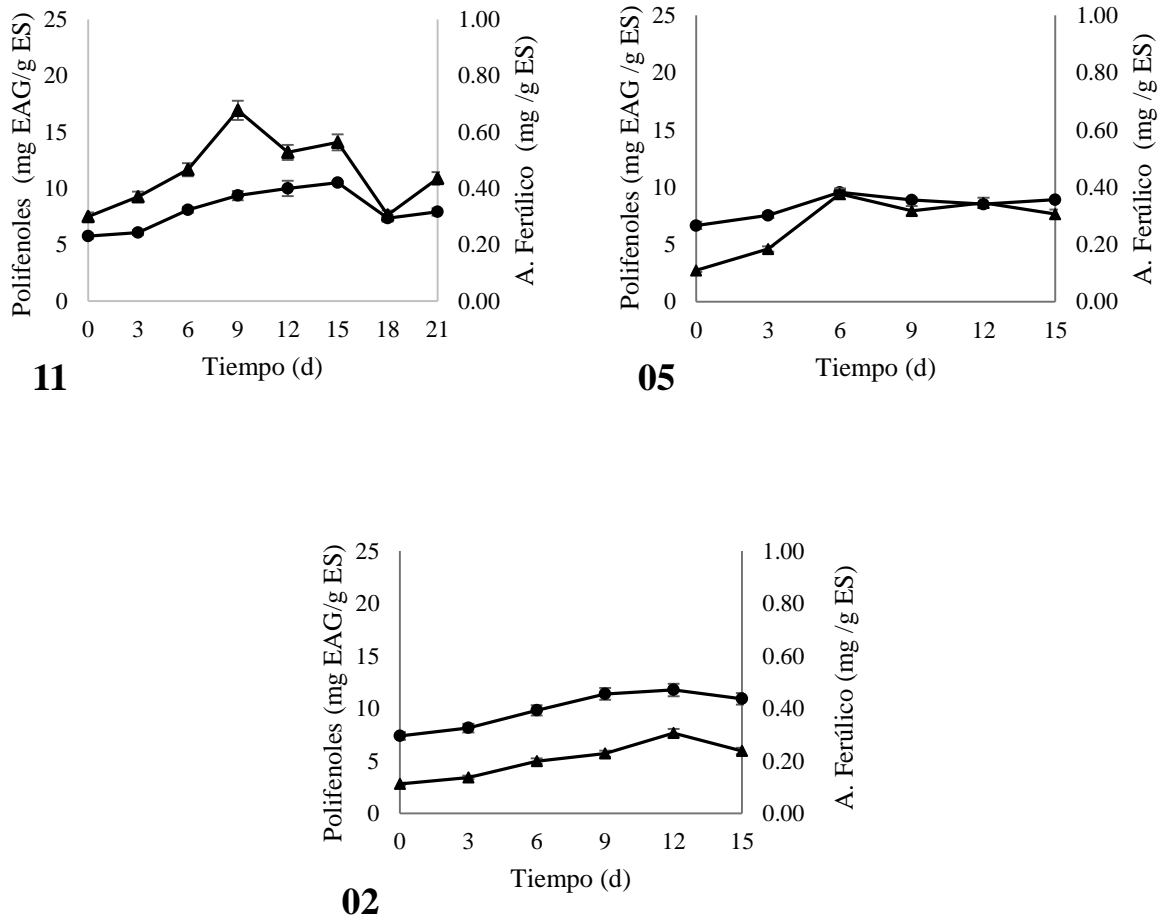


Figura 18. Producción de polifenoles totales (●) y á. ferúlico (▲) en callos de *G. globosa* en diferentes tratamientos (continuación).

De igual manera que sucedió con la acumulación de las betalaínas, se observaron diferentes perfiles en la producción de polifenoles. En la producción de compuestos fenólicos se observó que la concentración de fitohormona marcó la diferencia en los tratamientos con las mismas combinaciones de reguladores de crecimiento. El contenido de compuesto fenólicos para el tratamiento 43 y 38, fue 2.1 veces mayor para el tratamiento 38 comparado con el tratamiento 43, posiblemente a la influencia de las diferentes concentraciones de kinetina en estos tratamientos. De manera inversa ocurrió en los tratamientos 31 (0.5 mg/mL de 2,4-D y KIN) y 11 (1.0 mg/mL de 2,4-D y KIN) en el medio MS, una concentración mayor de RCV,

disminuyó la producción de compuestos fenólicos 0.99 veces, aproximadamente. Este evento también se observó en los tratamientos 05 y 02, aparentemente una concentración menor de ANA aumentó 0.22 veces la producción de polifenoles en el tratamiento 02. Los tratamientos 36, 24 y 15 fueron callos que estaban suplementados con los mismo reguladores (2,4-D/BAP) a diferentes concentraciones. Siendo el tratamiento 36 (2,4-D/BAP, 1.0 mg/L/ 0.1 mg/L) el de mayor producción (15.22 mg EAG/g ES) en el día 21. Mientras que en los tratamientos 24 (2,4-D/BAP, 1.0 mg/L/ 0.5 mg/L) y 15 (2,4-D/BAP, 0.5 mg/L/ 0.02 mg/L), su producción fue semejante en el punto final de la cinética (11.02 y 11.36 mg EAG/g ES, respectivamente). Sin embargo, en el tratamiento 15 en el día 12, su producción fue mayor (17.22 mg EAG/g ES) comparada con el tratamiento 36 en el día 21.

En general, la mayor producción con base a EAG se obtuvo en el tratamiento 38 (23.530 mg EAG/g ES), y estadísticamente diferente a los demás tratamientos (Anexo 6). La producción de compuestos fenólicos en este callo fue 33.75 veces mayor a lo reportado en plantas de *B. vulgaris* (0.677 mg GAE/g PF) (Bavec *et al.*, 2010). Pero menor a lo descrito por Oloyede *et al.* (2013), en plantas de *Celosia argentea* (193.440 mg/g ES). Sin embargo, se observó durante el análisis por UHPLC-DAD que el ácido ferúlico fue uno de los polifenoles con mayor producción en todos los tratamientos. Siendo los tratamientos 24 y 38 los de mayor producción al finalizar la cinética, 0.669 y 0.665 mg/g ES, respectivamente. Incluso su producción fue mayor a lo reportado por Silva *et al.* (2012) en inflorescencias de *G. globosa* (0.490 mg de á. ferúlico/g)

La acumulación de compuestos fenólicos de cada tratamiento probablemente se deba a la composición del medio de cultivo de cada tratamiento, ya que los nutrientes son factores que influyen en la producción de metabolitos secundarios. Un ejemplo de ello es que la presencia de ANA o 2,4-D a bajas concentraciones, permiten la acumulación de fenoles simples, cumarinas y ligninas. Sin embargo, incrementado la concentración de auxinas se puede estimular o inhibir la producción de compuestos fenólicos (Ibrahim, 2012).

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes elementos que son considerados factores estratégicos al momento de aumentar la producción de metabolitos, desde el tipo de RCV, las fuentes de nitrógeno y luz (tipo, calidad y cantidad), ya que pueden favorecer tanto la producción de biomasa como a la acumulación de metabolitos (Murthy *et al.*, 2014). Tal es el caso de las betalaínas y polifenoles ya que como se pudo observar, el tratamiento con mayor producción de compuestos fenólicos fue diferente al de betalaínas. Esto probablemente se debe a las reacciones endógenas competidoras por la síntesis de estos dos compuestos, debido a que la producción de aminoácidos aromáticos como la tirosina (Tzin & Galili, 2010), que es un precursor de la síntesis de betalaínas, se sintetizan a través de vía de shikimato, siendo esta una de las rutas productoras de compuestos fenólicos (Cheynier *et al.*, 2013).

7.3 Suspensiones celulares

Para el establecimiento de suspensiones se consideraron dos criterios. El primer criterio fue de acuerdo con la velocidad específica de crecimiento de los cultivos de callos. El segundo criterio, fue la selección de un callo friable para facilitar la disgregación en el medio líquido. Debido a que los tratamientos 43, 38, 36, 31, 15 y 11 mostraban un callo friable se procedió a la inoculación de estos en medio líquido, para la obtención de células en suspensión.

Se inocularon un total de 15 matraces Erlenmeyer de 125 mL para cada tratamiento, manteniendo una relación de 1/5 del volumen del matraz. Es decir, 25 mL de medio de cultivo y se colocaron en agitación de 110 rpm. Después de 15 días de la inoculación los callos que presentaron mayor disgregación celular fueron los tratamientos 43 y 38. Los tratamientos 36, 31, 15, y 11 tuvieron menor disgregación y presentaron un alto grado de oxidación. La baja disgregación y oxidación, probablemente se deba a que sufrieron estrés por el cambio de ambiente y/o la agitación suministrada, debido a que los cultivos sumergidos están sometidos a estrés hidrodinámico (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006).

Las células de los tratamientos 43 y 38 fueron tamizadas para obtener inóculos homogéneos. Posteriormente, estas células fueron subcultivadas en un medio fresco, inoculando el matraz con un gramo de células (PF) en 25 mL de medio.

7.3.1 Evaluación del cultivo de células de *G. globosa* en matraz Erlenmeyer

7.3.1.1 Cinética de crecimiento y producción de suspensiones en matraz

La cinética de las suspensiones celulares de los tratamientos 43 y 38 se evaluaron en dos condiciones lumínicas: luz blanca (2465 lux) y luz azul (102 lux), con base en lo reportado por Ruiz & Valadez, (1985), ya que observaron mayor producción de biomasa y de betalaínas en exposición a luz azul (80 lux). Para ello se realizó la inoculación de 24 matraces Erlenmeyer con un gramo de células (PF) en 25 mL de medio para cada tratamiento en cada condición. Teniendo un total de 48 matraces para cada tratamiento. El tiempo de la cinética evaluada fue el mismo evaluado en la cinética de callos (21 días) En la Figura 19 y 20 se muestran las curvas de crecimiento y producción de metabolitos, consumo de azúcar y la viabilidad durante la cinética, de los tratamientos 43 y 38 durante 21 días en luz blanca (43 SB- 38 SB) y azul (43SA-38 SA).

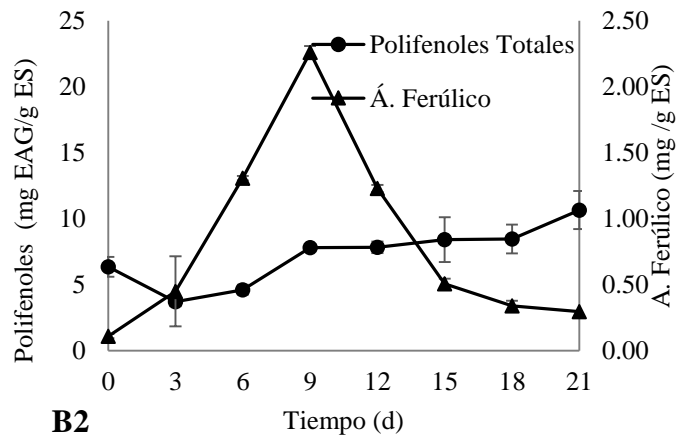
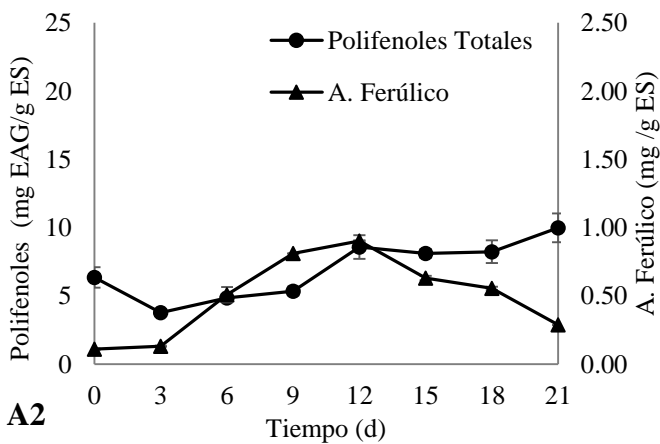
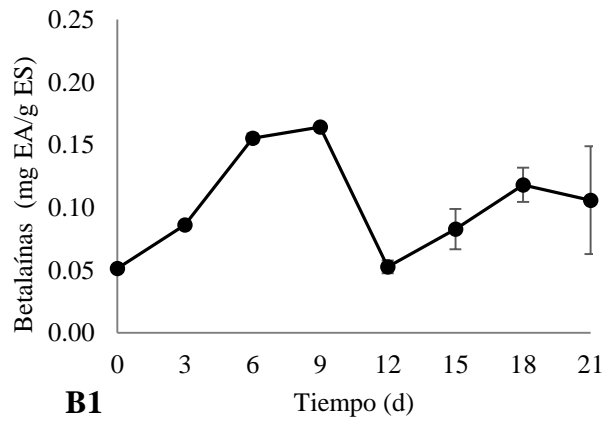
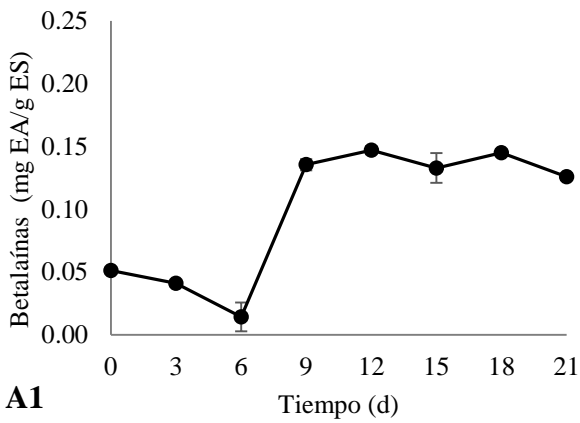
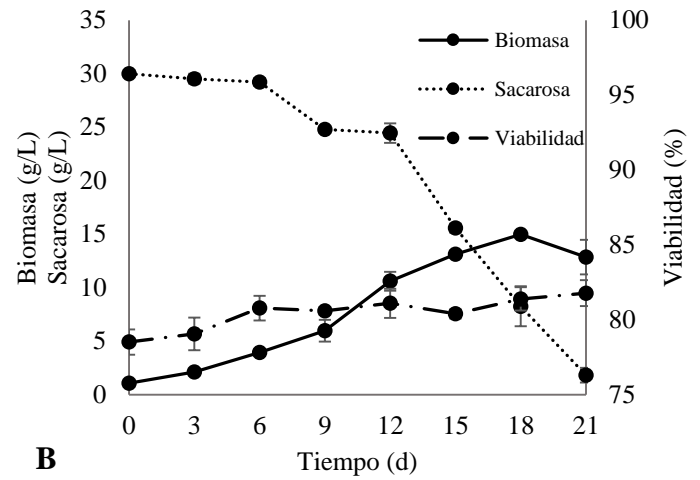
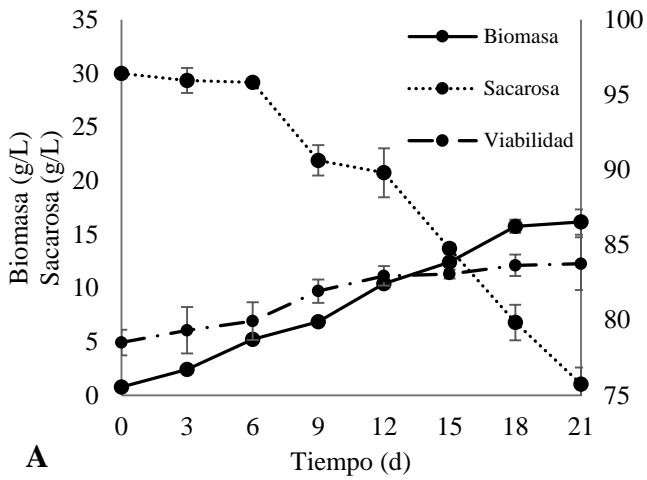


Figura 19. Tratamiento 43. Cinética de crecimiento y producción de betalaínas y polifenoles, consumo y viabilidad de suspensiones *G. globosa*. A, A1, A2) luz blanca; B, B1, B2) luz azul.

Para el tratamiento 43 en las dos condiciones lumínicas se observó una curva de crecimiento sin fase lag marcada. Iniciando un crecimiento exponencial a partir del día tres hasta el día 18 en las dos condiciones lumínicas. Sin embargo, después del día 18 en luz azul el crecimiento decayó drásticamente a diferencia del tratamiento expuesta a luz blanca que entró en fase estacionaria. Contrastando la producción de biomasa en las dos condiciones lumínicas, aparentemente la luz blanca favoreció el crecimiento, obteniendo 0.25 veces más biomasa que en luz azul al finalizar la cinética. Sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa en la cantidad de biomasa. Si bien, se ha reportado que la luz azul tiene efectos positivos sobre la producción de biomasa en las plantas como lechuga, rábano y espinaca (Davis & Burns, 2016). También existen reportes de cultivos celulares que no presentan diferencias en producción de biomasa bajo exposición de diferentes tipos de luz. Tal es el caso de suspensiones celulares de *Thevetia peruviana* que fueron cultivadas bajo diferentes tipos de luz (blanca, roja, azul, verde y amarillo), donde el tipo de luz no tuvo efecto benéfico sobre el crecimiento celular (Arias *et al.*, 2016). Es por ello, que probablemente a pesar de incidir luz azul en el tratamiento 43, no se promovió el aumento de biomasa.

Análogo al crecimiento, el perfil de consumo fue similar en 43 SB y 43 SA. Aunque, la velocidad de consumo de sacarosa en la fase exponencial fue de 0.19 y 0.36 g sacarosa/g CSd, para 43 SB y 43 SA, respectivamente. El consumo de la fuente carbono coincide con la producción de biomasa, debido a que no hubo diferencia significativa en el crecimiento por efecto de la condición lumínica, por lo tanto, quizás la sacarosa fue la única fuente de energía que propició la división celular. Arias *et al.* (2016), reporta que el crecimiento de las células de *T. peruviana* es estrictamente heterotrófico, es decir, los cultivo celulares expuestos a diferentes tipos de luz no utilizaron la luz como fuente de energía para su crecimiento. Probablemente el tratamiento 43 SB y SA asemejan esta condición.

La producción de betalaínas durante la cinética fue más estable en luz blanca comparada con la luz azul. Se observó que el tratamiento expuesto a luz blanca incrementó su producción a partir del día seis, obteniendo una producción máxima de 0.147 mg EA/g ES en el día 12,

mientras el tratamiento expuesto a luz azul produjo 0.164 mg EA/g ES en el día nueve. Se observó que después del noveno día su producción disminuyó drásticamente, a diferencia del expuesto a luz blanca en donde se mantuvo casi constante hasta los 21 días. La producción reportada por Guadarrama-Flores *et al.* (2015) en suspensiones de *Celosia argentea* (4.92 mg EA / g PS) fue 35.74 veces mayor que lo reportado en este trabajo.

De igual manera, la acumulación de fenoles fue similar en las dos condiciones lumínicas. Durante la producción de compuestos fenólicos inicialmente ambos tratamientos disminuyeron su producción, posteriormente mostraron un tendencia ascendente alcanzando una producción final de 9.98 mg EAG/g ES y 10.64 mg EAG/g ES, para 43 SB y 43 SA, respectivamente. Por otra parte, la producción de compuestos fenólicos totales en base EAG durante la cinética al igual que el crecimiento no se vio favorecida por la exposición a la luz azul, a pesar de reportarse que el estímulo lumínico tiene efecto positivo sobre la biosíntesis de diversos compuestos fenólicos (Ibrahim, 2012). Sin embargo, Nascimento *et al.* (2013) mencionan que la producción de fenoles es dependiente de cada especie, al mismo tiempo que las condiciones de cultivo y fuentes de luz (LEDs, emisores de tubos fluorescentes).

No obstante, durante la cuantificación de ácido ferúlico se observó una mayor concentración en el tratamiento expuesto a luz azul (43 SA), alcanzando un valor máximo de 2.26 mg/g ES en el día 9, coincidiendo con lo mencionado por Reis *et al.* (2015), que la elicitación con luz azul favorece la producción de compuestos fenólicos. Por lo tanto, probablemente esta intensidad de luz azul (102 lux) solo favoreció la síntesis de un tipo de polifenol, ya que la máxima producción de ácido ferúlico en luz azul es el 29% en base a los polifenoles totales en el día 9, mientras que en luz blanca solo alcanza un 10.5% en el día 12.

Comparando la producción entre el callo y suspensión del tratamiento 43 (en las dos condiciones lumínicas), la producción de betalaínas y fenoles aparentemente se vieron favorecidas al cambiar el tipo de cultivo, debido que el cultivo de callo de este mismo tratamiento produjo menor cantidad de fenoles en el día 21 (7.59 mg EAG/g ES). Mientras

que la producción de betalaínas en el cultivo de callo durante la cinética por lo general mantuvo valores por debajo de 0.06 mg EA/g ES y solo mostró dos puntos máximos en el día 15 (0.152 mg EA/g ES) y 21 (0.148 mg EA/g ES) de forma discontinua. El aumento en el contenido de betalaínas y fenoles en las suspensiones quizás se deba como respuesta al estrés por la agitación o el cambio a medio líquido, ya que los metabolitos secundarios en las plantas se producen para facilitar la interacción con el medio ambiente biótico y el establecimiento de un mecanismo de defensa (Verpoorte *et al.*, 2002).

El crecimiento, consumo y producción están relacionados fuertemente con la viabilidad celular durante la cinética. Entre mayor número de células vivas, mayor producción de biomasa, por lo tanto, debe aumentar el consumo de sustrato y producción de metabolitos. Analizando el porcentaje de viabilidad en los dos tratamientos en las dos condiciones lumínicas, se puede observar que el tratamiento en luz blanca durante la cinética aumentó su viabilidad de un 78 a 82 % aproximadamente. Mientras que la viabilidad en luz azul, osciló entre un 78 y 81 %, sin marcar un aumento en un punto determinado. Al no existir una diferencia significativa en la viabilidad, tampoco existieron grandes diferencias en la producción de biomasa y metabolitos secundarios.

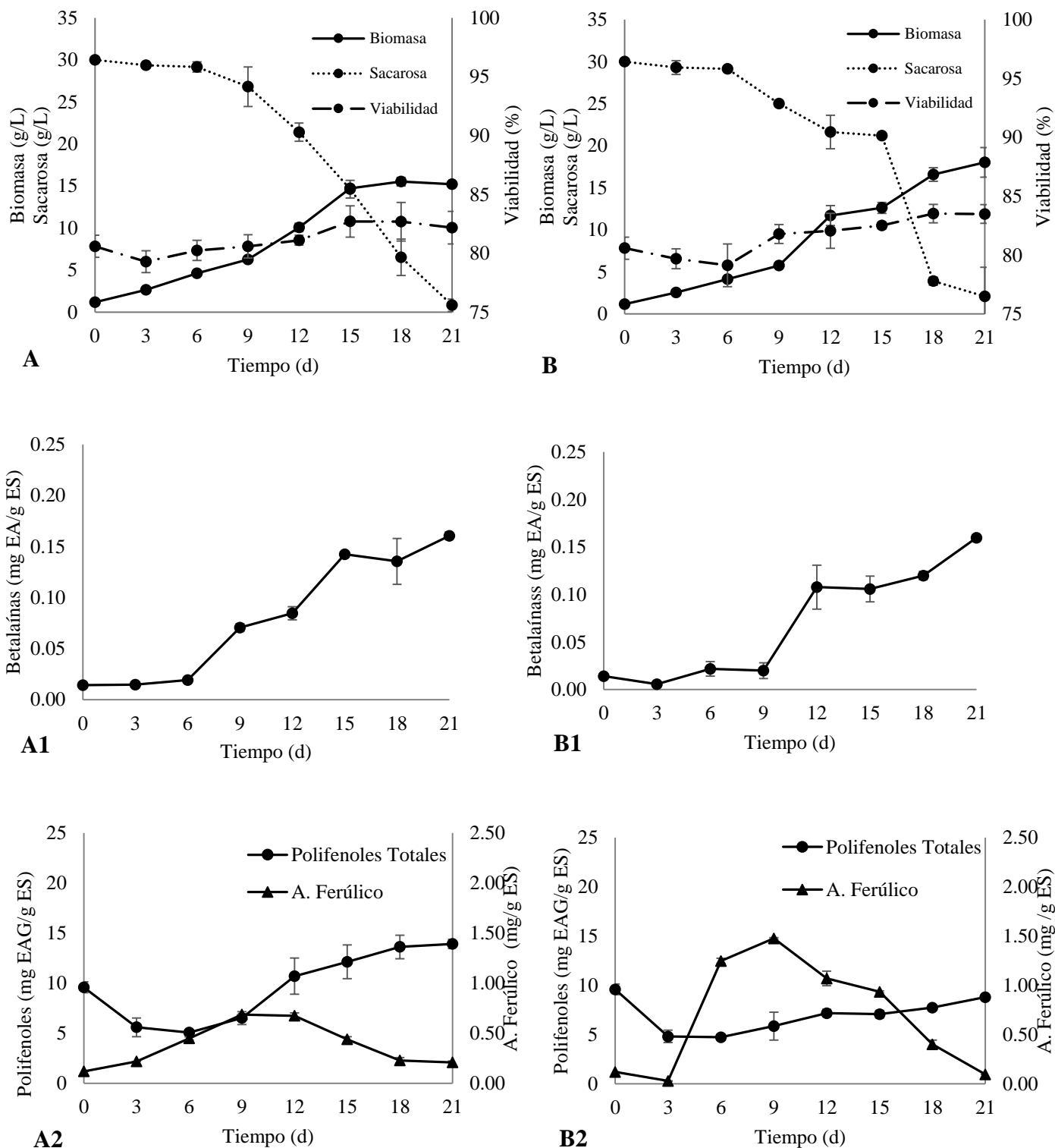


Figura 20. Tratamiento 38. Cinética de crecimiento y producción de betalainas y polifenoles, consumo y viabilidad de suspensiones de *G. globosa*. A, A1, A2) luz blanca; B, B1, B2) luz azul

El tratamiento 38 tampoco mostró la fase de adaptación, iniciando su fase exponencial desde el segundo día de muestreo. Su fase exponencial aparentemente se detuvo en el día 12 para 38 SA y 15 para 38 SB, entrando a fase estacionaria. Sin embargo, el tratamiento 38 SA, al décimo octavo día nuevamente mostró crecimiento. La producción final de biomasa, de igual manera que el tratamiento 43, tampoco presentó una diferencia estadística. Sin embargo, el tratamiento expuesto a luz azul (38 SA) generó 18.02 g/L de biomasa comparado con luz blanca (38 SB), su producción de biomasa fue de 15.22 g/L. La diferencia de biomasa probablemente se deba a la influencia de la luz. Debido a que las células vegetales tienen la capacidad de detectar señales lumínicas (cantidad, calidad, dirección y duración) puesto que la luz es un factor importante que contribuye al desarrollo múltiple de la planta por medio de fotorreceptores que regulan las cascadas de señalización en las células (Jiao *et al.*, 2007). Probablemente un cambio en los fotorreceptores (fitocromos y criptocromos) en el tratamiento 38 SA por la luz azul generó un ligero cambio en el metabolismo celular permitiendo una pequeña diferencia en la producción de biomasa. Todos los fotorreceptores son mediadores del desarrollo de las plantas dependiendo de la intensidad, calidad, dirección y duración de la luz, los fitocromos en particular son esenciales para la germinación, deetiación, alargamiento de tallo, floración, así como desarrollo vegetativo (Ouzounis *et al.*, 2015).

Con referencia a lo anterior, probablemente la luz azul fue un factor que promovió la producción de biomasa al observar que el consumo de la fuente de carbono en 38 SA fue menor que en 38 SB. La cantidad de sacarosa en el día 21 para 38 SA fue de 2.09 g/L y 0.82 g/L para 38 SB. Se puede observar que hasta el día nueve de la cinética el consumo de sacarosa fue similar. Sin embargo, el tratamiento 38 SB, posteriormente, presentó una disminución gradual hasta el día 21 a diferencia del 38 SA que mantuvo su consumo de carbono entre los días 12 y 15, de igual manera entre el día 18 y 21. No obstante, el mayor consumo de sacarosa se dio después del día 15, esto pudo ser un segundo factor que juntamente con la luz azul favoreció a la producción de biomasa en el tratamiento 38 SA. Un estudio en cultivos de *T. peruviana* bajo condiciones de luz azul a 465 nm, reporta un consumo del 44.74% menos comparada con luz amarilla, roja y blanca en el día 10 (Arias *et*

al., 2016). La evidencia con la que se cuenta hasta el momento sugiere que la luz azul a 102 lux promovió el crecimiento en este tratamiento.

Aun cuando la producción de biomasa fue ligeramente mayor en el tratamiento con luz azul, esta no favoreció la producción de betalaínas. Debido a que la concentración de betalaínas fue mayor en luz blanca. El tratamiento 38 SB alcanzó una producción de 0.160 mg EA/g ES en el día 21. Mientras que, el tratamiento expuesto a luz azul finalizó con una concentración de 0.159 mg EA/g ES. Sin embargo, la producción del tratamiento 38 SB fue 52.36 veces menor que lo reportado por Guadarrama-Flores *et al.* (2015) en suspensiones de *C. argéntea*.

En cuanto a los compuestos fenólicos, el perfil de producción de fenoles fue similar en las dos condiciones lumínicas. La concentración de fenoles al final de la cinética fue de 13.91 mg EAG/g ES (0.109 mg EAG/ml) en 38 SB, 5.11 mg EAG/g ES más que 38 SA. No obstante, la producción fue 14.84 % menor que lo reportado para derivados de ácido gálico del té verde (128 mg/L) (Del Rio *et al.*, 2004).

De igual manera que las betalaínas, los compuestos fenólicos se vieron favorecidos por la luz blanca. A pesar de los reportes que indican que la luz azul promueve la producción de metabolito secundario. Esto concuerda con lo anteriormente mencionado por Nascimento *et al.* (2013) que la producción de fenoles es dependiente de cada especie, al mismo tiempo que las condiciones de cultivo y fuentes de luz (LEDs, emisores de tubos fluorescentes). Por esta razón se puede llegar a creer que la luz blanca a esta longitud de onda (2465 lux) favoreció mayoritariamente la producción de fenoles y betalaínas comparada con la longitud de onda de luz azul utilizada. Uno de los factores ambientales más importantes para el desarrollo de las plantas es la luz, siendo la longitud de onda particularmente crítico para el crecimiento de las plantas (Jeong *et al.*, 2012).

Ahora bien, comparado la producción de los dos tipos de cultivo, tanto callo como suspensión del tratamiento 38, se pudo observar una mayor producción de betalaínas en suspensiones (38 SB y 38 SA), 0.6 veces más que en callos, aproximadamente. A diferencia de los compuestos fenólicos que fue 0.68 y 1.66 veces mayor en callos comparado 38 SB y 38 SA, respectivamente.

En cuanto a la viabilidad, ésta inició con un valor de 80.5 % para SB y SA. No obstante, en luz azul alcanzó un 83.5 %, mientras que en luz blanca se logró un valor de 82.17 %. Comparando la viabilidad del tratamiento 38 SA con 43 SB, esta fue 0.26 % menor. Al no existir una diferencia significativa, se puede decir, que la viabilidad no fue un factor que influyera en la diferencia de crecimiento y producción de metabolitos. Incluso los porcentajes de viabilidad son semejantes con suspensiones de *B. vulgaris*, los cuales oscilaron entre 70 y 80% (Capataz *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ_1), el tiempo de duplicación y rendimientos: biomasa/sustrato y producto/sustrato, en las dos condiciones de tipo de luz: azul (SA) y blanca (SB) en los tratamientos (Tabla 25).

Tabla 25. Parámetros cinéticos de suspensiones celulares de *G. globosa*.

Tratamiento	μ_1 (d ⁻¹)	Td (d)	Y x/s	Y p/s x10 ⁻⁴ (C. fenólicos)	Y p/s x10 ⁻⁶ (Betalaínas)
43 SB	0.101±0.010 ^b	6.91±0.729 ^b	0.531±0.052 ^a	1.250±0.001 ^a	2.570±0.133 ^b
43 SA	0.154±0.012 ^a	4.49±0.372 ^a	0.418±0.101 ^a	1.150±0.001 ^a	1.940±0.157 ^b
38 SB	0.140±0.002 ^a	4.95±0.076 ^a	0.481±0.007 ^a	1.140±0.004 ^a	5.020±0.501 ^a
38 SA	0.141±0.023 ^a	4.99±0.919 ^a	0.603±0.110 ^a	0.280±0.004 ^a	5.220±0.184 ^a

Tukey p < 0.05 (n=3). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra “a” el tratamiento estadísticamente diferente con mayor efecto. SB tratamientos en luz blanca y SA en luz azul.

Los tratamientos expuestos bajo condición de luz azul tuvieron un efecto opuesto en el rendimiento de biomasa y producción de metabolitos. El tratamiento 38 SA tuvo mayor rendimiento de biomasa-sustrato, es decir, el consumo de carbono fue bajo comparado a la cantidad de biomasa producida. Sin embargo, la producción de metabolitos fue baja comparada con la literatura, a pesar de que es uno de los tratamientos con mayor rendimiento de betalaínas de los cuatro tratamientos. Probablemente la energía la utilizó principalmente para crecimiento, dejando un lado la producción de metabolitos secundarios. Mientras que el tratamiento 43 SA a pesar de ser el tratamiento con mayor velocidad de crecimiento, presentó rendimientos de producción bajos, quizás al adaptarse con mayor facilidad, hizo que su etapa de crecimiento se acortará y la producción decayera con mayor rapidez. Por el contrario, los tratamientos tratados con luz blanca tuvieron rendimientos semejantes en producción de biomasa, a pesar de que el tratamiento 38 SB tuvo un tiempo de duplicación más corto que la 43 SB. La diferencia en los dos tratamientos fue notoria en la producción de betalaínas, ya que produjo aproximadamente el doble, mientras que la producción de polifenoles fue semejante.

El crecimiento de cada tratamiento en determinada condición lumínica probablemente depende a la cantidad de pigmentos fotosintéticos, debido a que el efecto de la luz en los cultivos puede depender de la cantidad de energía lumínica absorbida por los pigmentos. Ya que éstos son los encargados de la absorción de luz para alimentar las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. No obstante, un exceso puede reducir la actividad fotosintética y crecimiento (Takashashi & Badger, 2011).

Otro factor que se debe considerar para altos rendimientos de producción de metabolitos, es la edad del cultivo, con la finalidad de realizar el estudio de producción en cultivos estables. Este proceso tarda entre seis a nueve meses desde la planta hasta un cultivo de suspensión estable (Mustafa *et al.*, 2011).

7.3.2 Evaluación del cultivo de células de *G. globosa* en un biorreactor de tanque agitado.

7.3.2.1 Cinética de crecimiento y producción

Con el objetivo de realizar el primer acercamiento al perfil de crecimiento y producción de metabolitos de las células de *G. globosa* en un biorreactor de tanque agitado, se realizó la cuantificación de biomasa, consumo de azúcar, viabilidad y metabolitos del tratamiento 38 expuesta a luz blanca, debido a que mostró mayor producción biomasa y metabolitos. La cinética se realizó en un biorreactor de tanque agitado y en matraz. Además se realizó el cálculo de diferentes parámetros cinéticos como el consumo de oxígeno (OUR), consumo de oxígeno máximo (OUR_{máx}), velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), transferencia de oxígeno máximo (OTR_{máx}), el número de Damköhler (Da) y el consumo eficiente de oxígeno (η) en el biorreactor. Asimismo se calculó la longitud del eddy turbulento (l) durante la cinética y el tamaño de agregados celular.

En la siguiente figura se muestran los datos obtenidos durante la cinética de 21 días para los dos sistemas.

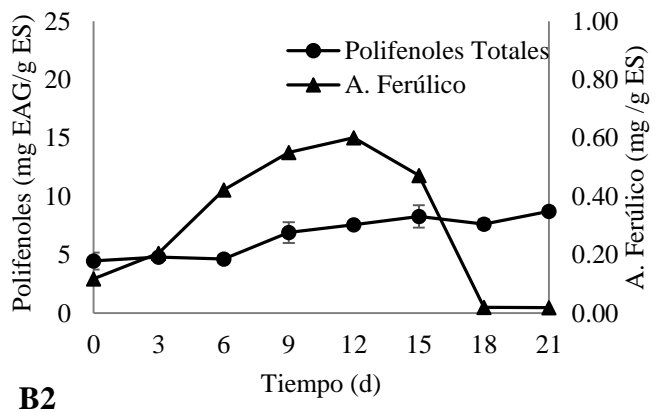
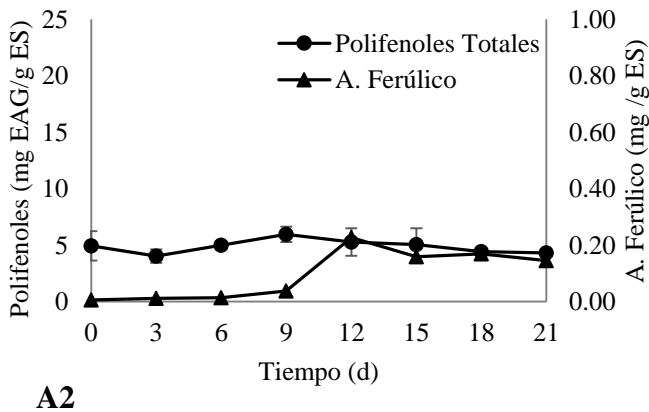
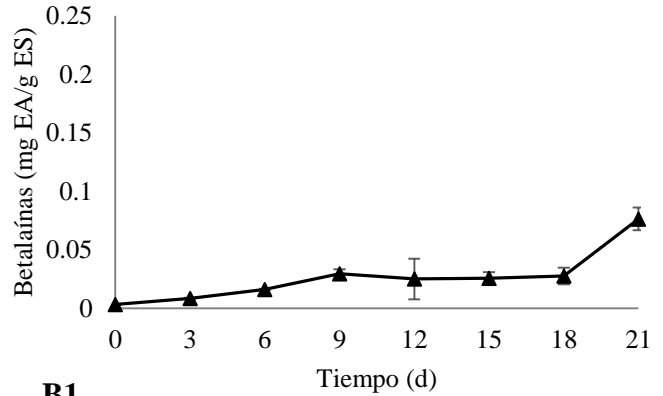
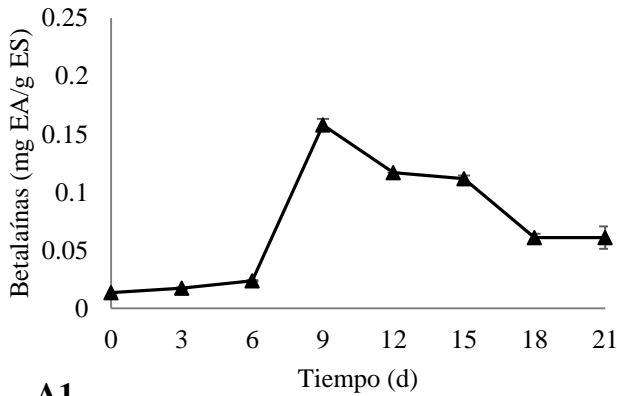
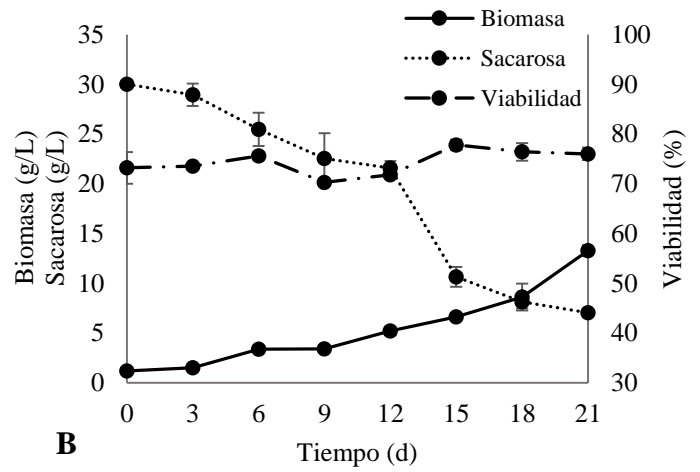
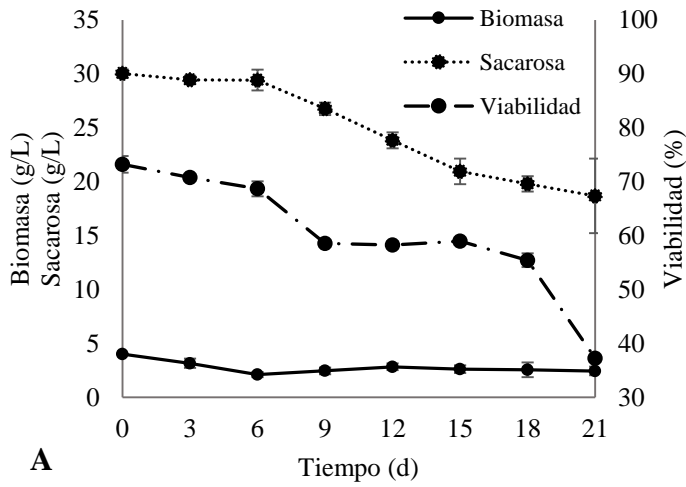


Figura 21. Cinética de crecimiento, producción de betalainas y compuestos fenólicos, consumo y viabilidad de células de *G. globosa*. A, A1 y A2) biorreactor; B, B1 y B2) matraz.

Al comparar el perfil de crecimiento de las células de *G. globosa* en los dos sistemas, se observa un mayor crecimiento en matraz. En el matraz comenzó la fase exponencial desde el segundo día de muestreo y finalizando con 13.28 g/L de biomasa. El consumo de la fuente de carbono fue mayoritario después del día nueve, día en donde la pendiente de la curva de crecimiento fue más pronunciada. Mientras que la viabilidad generalmente fue en aumento, se notó una ligera disminución entre los días seis y nueve, etapa donde el crecimiento se mantuvo. Sin embargo, aumentó después del día nueve hasta el día 12, produciéndose un efecto en la producción de biomasa y consumo de la fuente de carbono. Finalmente, la viabilidad se mantuvo hasta el día 21 de la cinética.

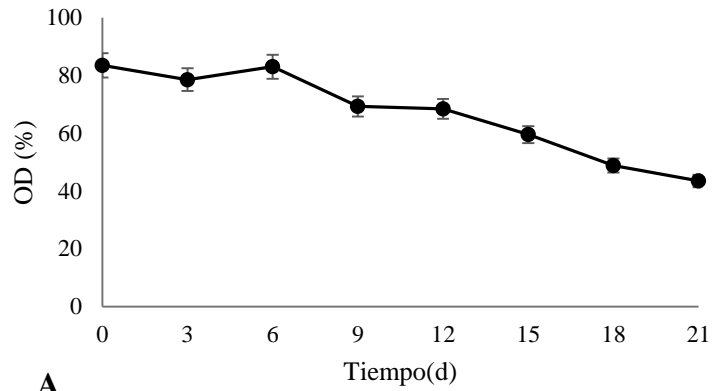
En cuanto al biorreactor, el crecimiento se vio desfavorecido, debido que su tendencia fue decreciente en función del tiempo. La población de células disminuyó notoriamente del día cero al sexto, restableciendo un crecimiento eventual entre el día 9 y 12. Sin embargo, después del día 12 volvió a disminuir, obteniendo 2.44 g/L de biomasa al finalizar la cinética. El crecimiento fue decayendo debido a que el porcentaje de viabilidad disminuyó durante la cinética. Se pudo notar que la viabilidad solo se mantuvo entre el día 9 y 12, puntos en donde la biomasa aumentó 0.15 veces. Sin embargo, posterior al día 12 fue disminuyendo aproximadamente hasta 50 % respecto al inicial. Por lo tanto, al no aumentar la población celular el consumo de la fuente de carbono fue mínimo, en la curva de consumo se puede apreciar una ligera disminución después del día 6 hasta el 15, antes y después de estos días el consumo no fue tan notorio.

En cuanto a la síntesis de metabolitos se puede observar que la producción de compuestos fenólicos fue mayor en matraz. La mayor producción de fenoles en reactor fue de 5.954 mg EAG/g ES en el día 9, mientras que en matraz la mayor concentración de fenoles fue de 8.715 mg EAG/g ES en el día 21. Sin embargo, la mayor producción de ácido ferúlico fue en el día 12 tanto en biorreactor como matraz, 0.227 y 0.600 mg/g ES, respectivamente. En cambio, la producción de betalaínas fue mayor en reactor que en matraz. Las concentraciones obtenidas fueron de 0.157 mg EA/g ES (día 9) y 0.076 mg EA/g ES (día 21) en reactor y matraz, respectivamente. No obstante, tanto la producción de betalaínas en matraz como en

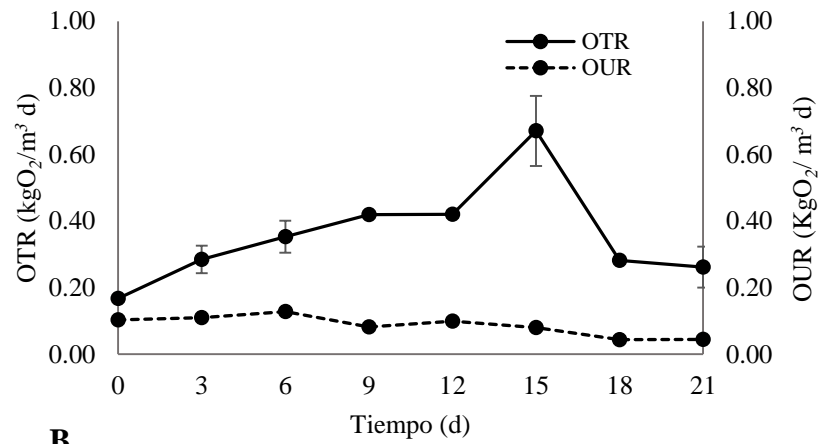
reactor fueron 99.33 % menor a lo reportado por Guadarrama-Flores *et al.* (2015) en suspensiones de *C. argentea* (4.92 mg EA/g PS), y 45 % menos para polifenoles de acuerdo al trabajo de Del Rio *et al.* (2004). Como se mencionó con anterioridad, existen diferentes variables que permiten el crecimiento óptimo del cultivo como lo es la luz, temperatura, agitación y fase gaseosa (Mustafa *et al.*, 2011).

7.3.2.2 Consumo y transferencia de oxígeno

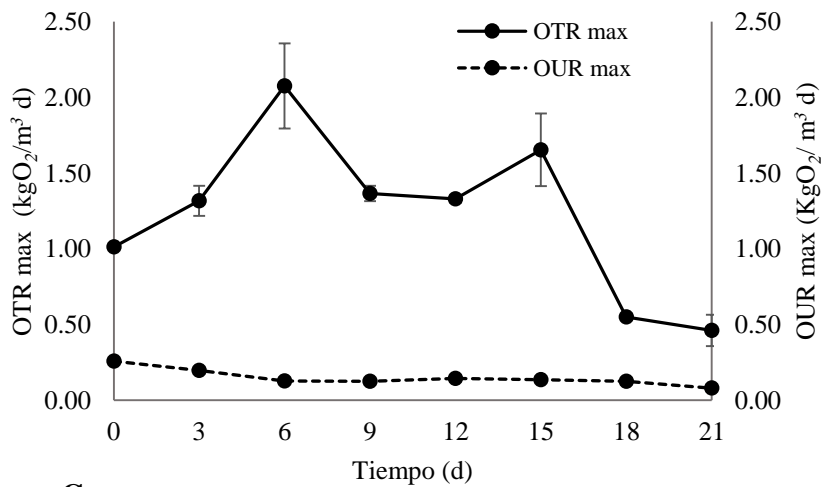
Debido a que la transferencia como el consumo de oxígeno son los factores clave para el crecimiento, que pueden afectar la evolución del bioproceso (Garcia-Ochoa *et al.*, 2010), se realizó el monitoreo del porcentaje de oxígeno disuelto (OD), la transferencia y consumo de oxígeno durante la cinética de biorreactor (Figura 22). A pesar de que los requerimientos de oxígeno en las células vegetales son bajas, el suministro de oxígeno ha demostrado tener un efecto positivo en la producción de biomasa y metabolitos secundarios en diversas especies vegetales (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Georgiev *et al.*, 2009).



A



B



C

Figura 22. A) Porcentaje de O₂; B) Consumo y transferencia de O₂; C) Consumo y transferencia de O₂ máxima de suspensiones celulares de *G. globosa* en biorreactor de tanque agitado.

Durante el monitoreo de la OTR, se pudo notar un aumento proporcional hasta el día 9, favoreciendo a la OUR hasta el día 6. Debido a que después el consumo tiende a disminuir drásticamente, restableciéndose entre el día 9 y 12. Puntos donde la producción de biomasa tiende a aumentar. Mientras que la OTR se mantiene constante en esos puntos. Posteriormente, se observa un decaimiento en la curva de consumo de igual manera que decae el crecimiento celular, mientras que la transferencia tiende a aumentar. Finalmente, las curvas de OUR y OTR en los puntos del día 18 y 21 se mantuvieron.

Sin embargo, al analizar el consumo y transferencia de oxígeno máximo (OUR_{máx} y OTR_{máx}, respectivamente), a pesar de existir en los primeros días un aumento en la velocidad de reacción bioquímica observada (OUR), la velocidad de reacción bioquímica sin resistencia la transferencia de masa (OUR_{máx}) fue disminuyendo. Del mismo modo sucede con la OTR_{máx}, después del día seis. Mientras que después del día nueve el OUR_{máx} y OTR_{máx} mantuvieron un perfil similar al OUR y OTR. Esta similitud probablemente se deba al crecimiento y producción de metabolitos durante estos puntos. Para conocer el factor limitante durante el crecimiento del sistema, se realizó el cálculo de Da y n. En la tabla 26, se muestran los valores de Da y n obtenidos durante la cinética.

Tabla 26. Número de Damköhler y el consumo eficiente de oxígeno de células de *G. globosa* en biorreactor de tanque agitado.

Tiempo (d)	Da	N
0	0.255	0.397
3	0.149	0.560
6	0.061	1.000
9	0.092	0.649
12	0.109	0.681
15	0.082	0.586
18	0.226	0.351
21	0.174	0.549

El número adimensional Damköler modificado define la relación entre la máxima velocidad posible de utilización de oxígeno y la máxima velocidad de transferencia de masa. Valores menores a uno, se deben a QO_2 bajo o porque algún factor de la ecuación de transferencia de masa es grande, es decir, la velocidad de transferencia de masa es mayor que la velocidad de reacción bioquímica (Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, 2009).

Sin embargo, en nuestro sistema al obtener valores menores de uno, se puede decir que el crecimiento no se vio limitado por oxígeno, incluso esta teoría se refuerza con los valores de n obtenidos, ya que mayoritariamente los valores fueron menores a uno, por lo que se puede señalar, que no hubo resistencia a la transferencia de masa durante la reacción bioquímica del oxígeno, excepto en el punto del día 6, donde OUR y OUR, fueron iguales. Debido al consumo específico de oxígeno máximo (QO_2 máx) obtenido durante este día. Comparado el mayor OUR obtenido con otros cultivos como suspensiones de *A. indica*, refleja un bajo consumo de oxígeno. Puesto que el valor máximo de consumo específico calculado fue de 0.088 kg O₂/kg CSd, mientras que para *A. indica* es de 0.448 kg O₂/kg CSd (Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, 2009). De esta manera, el bajo crecimiento de las células en biorreactor no se debió a una limitación por oxígeno, aunque los niveles de OD altos podrían ocasionar algún tipo de estrés por alta oferta de oxígeno u oxidación. Un estudio realizado en cultivos celulares de *Panax notoginseng* se observó que una presión parcial de oxígeno alta inhibió el crecimiento y redujo la producción de saponinas y polisacáridos de ginseng por el efecto perjudicial del estallido oxidativo. No obstante, estimulo la biosíntesis de ginsenósido (Han & Zhong, 2003).

7.3.2.3 Eddy turbulento y agregados celulares

Por otro lado, la agitación podría generar estrés hidrodinámico ocasionando una pérdida de la viabilidad, afectando el crecimiento (Busto *et al.*, 2008). Al considerar un efecto negativo en el crecimiento celular por estrés hidrodinámico, se realizó la estimación de remolinos turbulentos (Figura 23), basado en los cálculos reportados por Villegas-Velásquez *et al.* (2017).

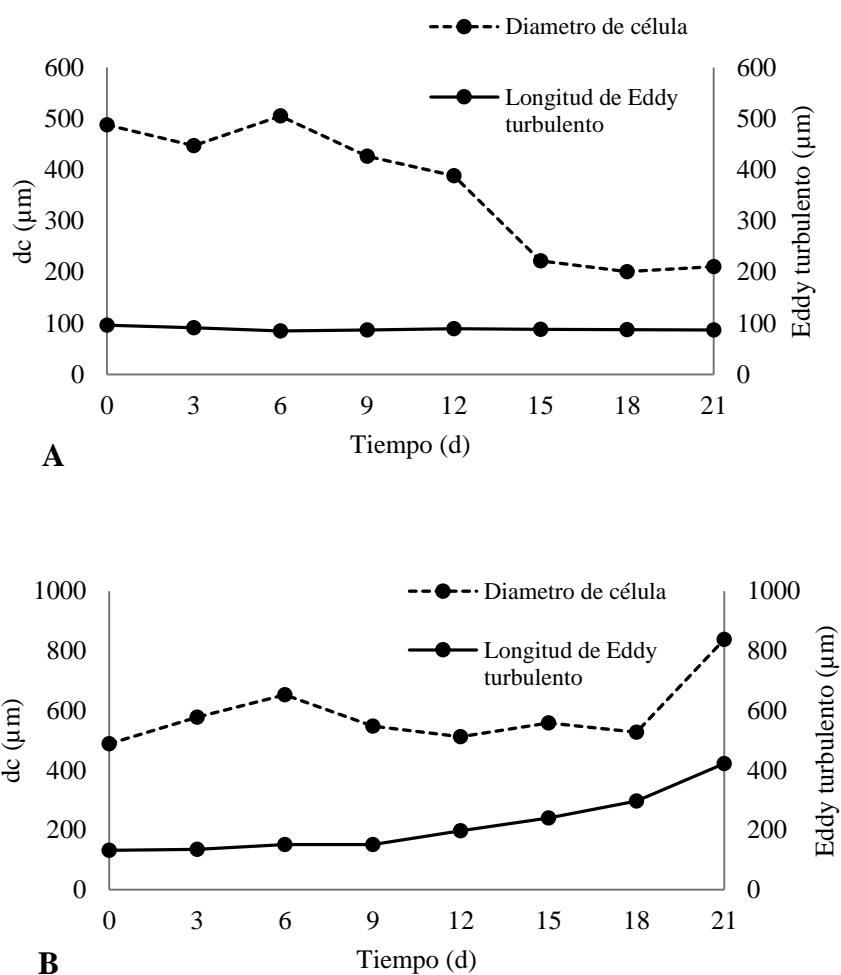


Figura 23. Longitud de eddy turbulento y diámetro de células de *G. globosa*. A) Biorreactor de tanque agitado; B) Matraz Erlenmeyer

Se puede notar que las células de *G. globosa* cultivadas en matraz son de gran tamaño (488-838 μm) comparadas con células de *A. indica* en matraz, ya que estas se encuentran aproximadamente por debajo de 100 μm (Villegas-Velásquez *et al.*, 2017). Ahora bien, se puede observar que el cultivo celular del biorreactor tuvo una disminución de tamaño en función del tiempo, observando una pendiente más pronunciada a partir del día seis. Esta disminución de tamaño de 488 hasta 201 μm puede deberse al esfuerzo de cizalla ejercido por los remolinos formados durante la agitación. La teoría de Kolmogorov propone que las especies biológicas no son afectadas por estrés dinámico de los fluidos, si su tamaño fuera menor a los remolinos más pequeños que se pueden formar en los sistemas agitados (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006). Así, al aumentar la agitación en el sistema se disminuiría el tamaño del eddy turbulento, generando pérdida de viabilidad en el cultivo (Villegas-Velásquez *et al.*, 2017). Por lo tanto, al disminuir el tamaño de eddy del matraz al biorreactor, se pudo generar un estrés por cizalla, disminuyendo la viabilidad celular, posiblemente debido a que las células se verían obligadas a disminuir su tamaño con la finalidad de disminuir el daño. A pesar de la disminución de tamaño en el día 6, esta no compensaría el daño, ya que el tamaño de los remolinos siguieron menores al de las células, afectando gradualmente la viabilidad celular.

Cabe mencionar que en este trabajo, la suspensión celular de *G. globosa* no respondió en su totalidad al estrés hidrodinámico ya que no aumentó la producción de biomasa, sin embargo, la producción de metabolitos se dio en ciertos días, probablemente como respuesta al estrés hidrodinámico. Esta respuesta también se puede apreciar en suspensión de *R. tinctorum*, que son capaces de crecer y aumentar su concentración de antraquinonas respondiendo al estrés hidrodinámico en tanques agitados a 450 rpm (Busto *et al.*, 2008).

8. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo confirmaron la presencia de betalaínas y compuestos fenólicos en los diferentes cultivos obtenidos *in vitro* de *G. globosa*.

En el establecimiento del cultivo *in vitro* de callos, no se obtuvo diferencia en el porcentaje de callogénesis en el medio MS y B5. Sin embargo, el crecimiento, morfología y producción de metabolitos secundarios van ligados a la combinación de los reguladores de crecimiento vegetal.

Las suspensiones celulares expuestas a la luz blanca obtuvieron un alto rendimiento tanto en crecimiento como en producción de betalaínas y polifenoles en el tratamiento 38. Durante la evaluación en biorreactor, el cambio en la agitación de matraz a reactor produjeron un estrés hidrodinámico a los cultivos afectando su cinética de crecimiento, sin embargo, el efecto no fue totalmente negativo en la producción de metabolitos.

Las líneas celulares estudiadas pusieron en evidencia su capacidad para producir compuestos fenólicos, principalmente ácido ferúlico en los diferentes cultivos *in vitro*. No obstante, la producción de betalaínas fue mínima y esta no fue favorecida durante el cambio de sistema de cultivo.

9. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos se sugiere:

1. Estudiar el efecto de los tipos de luz, intensidad, calidad y duración, en los cultivos de callos y suspensiones de *G. globosa*.
2. Estudiar la producción de betalaínas de los tratamientos 05 y 02 de en callos y suspensión, mediante la modificación del medio de cultivo para disminuir el grado de oxidación.
3. Modificar la longitud de onda azul y fotoperiodo en suspensiones de *G. globosa*, al mismo tiempo, evaluar diferentes concentraciones de las fuentes de nitrógeno y carbono.
4. Optimizar la producción de betalaínas y fenoles en callos y suspensiones de *G. globosa* mediante modificación de medios de cultivo, adición de elicitores y precursores.
5. Estudiar el efecto de tipo de matraz y tapón, en el consumo de oxígeno de las células de *G. globosa* para la producción de betalaínas y fenoles.
6. Modificar las condiciones de operación del biorreactor de tanque agitado para el cultivo de la suspensión 38 SB
7. Identificar de otros grupos de metabolitos en los cultivos de callos y suspensiones de *G. globosa*.
8. Evaluar actividades biológicas como citotóxica, antiinflamatoria, antimicrobiana, hipoglucemiante y antioxidante del diferentes tratamientos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja**, M.R. (1965). Genetic control of tumor formation in higher plants. *The Quarterly Review of Biology*, 40: 329–340.
- Albano**, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., & Blando, F. (2015). Betalains, phenols and antioxidant capacity in Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) Genotypes. *Antioxidants*, 4(2), 269-280
- Alvarez-Yela**, A. C., Chiquiza-Montaño, L. N., Hoyos, R., & Orozco-Sánchez, F. (2016). Rheology and mixing analysis of plant cell cultures (*Azadirachta indica*, *Borojoa patinoi* and *Thevetia peruviana*) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 18-25.
- Antognoni**, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., & Biondi, S. (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, 78(5), 345-352
- Arias**, J. P., Zapata, K., Rojano, B., & Arias, M. (2016). Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 87-91.
- Arcanjo**, D. D. R., de Oliveira Sena, I. V., de Albuquerque, A. C. M., Neto, B. M., Santana, L. C. L. R., Silva, N. C. B., & dos Santos Soares, M. J. (2011). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and cardiovascular effects of *Gomphrena globosa* L.(Amaranthaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 2006-2010.
- Baque**, M. A., Elgirban, A., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2012). Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta physiologiae plantarum*, 34(2), 405-415.
- Baskin**, C. C., Milberg, P., Andersson, L., & Baskin, J. M. (2001). Seed dormancy-breaking and germination requirements of *Drosera anglica*, an insectivorous species of the Northern Hemisphere. *Acta Oecologica*, 22(1), 1-8.
- Bavec**, M., Turinek, M., Grobelnik-Mlakar, S., Slatnar, A., & Bavec, F. (2010). Influence of industrial and alternative farming systems on contents of sugars, organic acids, total phenolic content, and the antioxidant activity of red beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* Rote Kugel). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(22), 11825-11831.
- Behera**, B., & Patnaik, S. N. (1974). Cytotaxonomic studies in the family Amaranthaceae. *Cytologia*, 39(1), 121-131.
- Benavente-García**, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory, activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205.
- Bertin**, R. L., Gonzaga, L. V., Borges, G. D. S. C., Azevedo, M. S., Maltez, H. F., Heller, M., & Fett, R. (2014). Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 55, 404-411

- Bhuiyan**, M. N. H., Murakami, K., & Adachi, T. (2002). Variation in betalain content and factors affecting the biosynthesis in *Portulaca sp.*'Jewel'cell cultures. *Plant Biotechnology*, 19(5), 369-376.
- Biswas**, M., Das, S. S., & Dey, S. (2013). Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant. *Food Science and Biotechnology*, 22(1), 1-8.
- Bourgaud**, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Busto**, V. D., Rodríguez-Talou, J., Giulietti, A. M., & Merchuk, J. C. (2008). Effect of shear stress on anthraquinones production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnology progress*, 24(1), 175-181.
- Cai**, Y.Z., Xing J, Sun, M., Corke, H. (2006). Rapid identification of betacyanins from *Amaranthus tricolor*, *Gomphrena globosa*, and *Hylocereus polyrhizus* by matrix-assisted laser desorption/ionisation quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometry (MALDI-QIT-TOF MS). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 54(18):6520–6
- Cai**, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 370-376.
- Capataz-Tafur**, J., Trejo-Tapia, G., Rodríguez-Monroy, M., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2011). Arabinogalactan proteins are involved in cell aggregation of cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(1), 169-177.
- Chaovanalikit**, A., & Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Food Chemistry and Toxicology*, 69, 67–72
- Chattopadhyay**, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., & Bisaria, V. S. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(3), 138-149.
- Cheynier**, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20.
- Cui**, X. H., Murthy, H. N., Wu, C. H., & Paek, K. Y. (2010). Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(5), 437-444.
- Danova**, K., Čellárová, E., Macková, A., Daxnerová, Z., & Kapchina-Toteva, V. (2010). In vitro culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(5), 422-429.
- Davis**, P. A., & Burns, C. (2016). Photobiology in protected horticulture. *Food and Energy Security*, 5(4), 223-238.
- De Aguiar Lage**, D., da Silva Tirado, M., Vanicore, S. R., de Carvalho Sabino, K. C., & Albarello, N. (2015). Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(2), 341-350.

- Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E., Brighenti, F., & Crozier, A. (2004).** HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(10), 2807-2815.
- Dinda, B., Gosh, B., Arima, S., Sato, N., & Harigaya, Y. (2004).** Phytochemical investigation of *Gomphrena globosa* aerial parts. *Indian Journal of Chemistry. Sect. B: Organic chemistry*, 43(10), 2223-7.
- Doran Pauline. (1995).** Bioprocess engineering principles. London: Academic press.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Endress, R. (1976).** Betacyan-akkumulation in kallus von *Portulaca grandiflora* var. JR unter dem einfluß von phytohormonen und Cu²⁺-ionen auf unterschiedlichen grundmedien. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 169(1), 87-98.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., & Rimbach, G. (2014).** Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology*, 73, 119-126.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2011).** Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(22), 3441-3446.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010).** Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289-307.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2016).** Biological activities of plant pigments betalains. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(6), 937-945.
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2007).** Plant propagation by tissue culture. The Netherlands. Springer Science & Business Media.
- Georgiev, M. I., & Weber, J. (2014).** Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnology Letters*, 36(7), 1359-1367.
- Georgiev, M. I., Eibl, R., & Zhong, J. J. (2013).** Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3787-3800.
- Georgiev, M. I., Weber, J., & Maciuk, A. (2009).** Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 809-823.
- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., & Pavlov, A. (2008).** Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581-593.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014).** Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621.

- Ghaffar, I., Ali, B., & Hasnain, S.** (2007). Effect of different hormonal combinations on regeneration of callus of *Gomphrena globosa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(20), 3708-3712.
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N.** (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5(31), 6697-6703.
- Giri, C. C., & Zaheer, M.** (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(1), 1-18.
- Gomez, E., Santos, V. E., Alcon, A., & Garcia-Ochoa, F.** (2006). Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: Effect on growth and BDS capability. *Chemical engineering science*, 61(14), 4595-4604.
- Guadarrama-Flores, B., Rodríguez-Monroy, M., Cruz-Sosa, F., García-Carmona, F., & Gandía-Herrero, F.** (2015). Production of dihydroxylated betalains and dopamine in cell suspension cultures of *celosia argentea* var. Plumosa. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(10), 2741-2749.
- Gupta, S. D., Ibaraki, Y., & Pattanayak, A. K.** (2013). Development of a digital image analysis method for real-time estimation of chlorophyll content in micropropagated potato plants. *Plant biotechnology reports*, 7(1), 91-97.
- Han, J., & Zhong, J.J.** (2003). Effects of oxygen partial pressure on cell growth and ginsenoside and polysaccharide production in high density cell cultures of *Panax notoginseng*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(3), 498-503.
- Huang, T. K., & McDonald, K. A.** (2012). Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology advances*, 30(2), 398-409.
- Ibrahim, R. K.** (2012). Regulation of synthesis of phenolics. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 4, 77-95.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A.** (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, 25(9), 3159-3173.
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T. & Ohme-Takagi, M.** (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 21(6), 508-514.
- Jacobsen, H.J.** 1983. Biochemical mechanism of plant hormone. In: Handbook of Plant Cell Culture. (Eds.): Evans, D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada, Mac Millan, pp. 672-695
- Jeong, S. W., Park, S., Jin, J. S., Seo, O. N., Kim, G. S., Kim, Y. H., & Shin, S. C.** (2012). Influences of four different light-emitting diode lights on flowering and polyphenol variations in the leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(39), 9793-9800.
- Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W.** (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), 217-230
- Khan, M. I.** (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 316-330.

- Khan, M. I., & Giridhar, P. (2015).** Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, *117*, 267-295.
- Kleinowski, A. M., Brandão, I. R., Einhardt, A. M., Ribeiro, M. V., Peters, J. A., & Braga, E. J. B. (2014).** Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *57*(2), 253-260.
- Kugler, F., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007).** Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MS n. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *387*(2), 637-648.
- Lans, C. (2007).** Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *3*(1), 1.
- Lin, S. M., Lin, B. H., Hsieh, W. M., Ko, H. J., Liu, C. D., Chen, L. G., & Chiou, R. Y. Y. (2010).** Structural identification and bioactivities of red-violet pigments present in *Basella alba* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(19), 10364-10372.
- Matkowski, A. (2008).** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants—a review. *Biotechnology advances*, *26*(6), 548-560.
- Monroy, M. R., Aparicio, A. J., Ortíz, G. D., & Jiménez, G. S. (1994).** Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnology Letters*, *16*(8), 853-858.
- Moreira, M. F., Appezzato-da-Glória, B., & Zaidan, L. B. (2000).** Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *43*(2), 221-227.
- Mroginski, L. A., and Roca, W. M. (1991).** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones (19-40). Cali, Colombia. Eds. Roca, WM & Mroginski, LA.
- Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014).** Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *118*(1), 1-16.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.
- Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. (2011).** Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature protocols*, *6*(6), 715-742.
- Nascimento, L., Leal-Costa, M. V., Coutinho, M. A., Moreira, N. D. S., Lage, C. L., Barbi, N. D. S., & Tavares, E. S. (2013).** Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) *Person* (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. *Photochemistry and photobiology*, *89*(2), 391-399.
- Naz, S., & Khatoun, K. (2014).** The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. *Pakistan Journal of Botany*, *46*(6), 2203-2207.

Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M., and Yanofsky, M.F. (1984). Crown gall: A molecular and physiological analysis. *Annu. Rev. Plant Physiology*, 35: 387–413.

Nickrent, D.L., Costea, M., Barcelona, J.F., Pelsler, P.B., & Nixon, K. (2006) *PhytoImages* . Disponible en: <http://www.phytoimages.siu.edu>

Oloyede, F.M., Oloyede, F. A., Andobuotor, E. M. (2013). Effect of Plant Maturity on the Antioxidant Profile of *Amaranthus cruentus* L. and *Celosia Argentea* L. *Bull. Env. Pharmacology. Life Sciences*, 2, 18-21.

Orozco-Sánchez, F., Hoyos-Sánchez, R., Arias-Zabala, M.E. (2002) Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios, *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 55(1):1473–1495

Orozco-Sánchez, F., & Rodríguez Monroy, M. (2009) Efecto de la oferta de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de terpenoides con células de *Azadirachta indica* en un biorreactor (Doctorado en ciencias de desarrollo de productos biótico). Instituto politécnico nacional, centro de desarrollo de productos bióticos, Yautepec, Morelos, México.

Oñate-Sánchez, L., Barrero Sicilia, C., Rueda Romero, P., Vicente Carbajosa, J., y Carbonero Zalduegui, P. (2008). El gen DOFG4 de *Arabidopsis* participa en la regulación de la germinación de la semilla mediada por ABA. En: XI simposio sobre Metabolismo y modo de acción de fitohormonas. Madrid España ISBN 978-84-7401-201-9.

Ouzounis, T., Rosenqvist, E., y Ottosen, CO (2015). Efectos espectrales de la luz artificial sobre la fisiología de la planta y el metabolismo secundario: una revisión. *HortScience* , 50 (8), 1128-1135.

Palacio, L., Cantero, J. J., Cusidó, R., & Goleniowski, M. (2011). Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. plant cell cultures and effect of precursor feeding. *Process biochemistry*, 46(1), 418-422.

Qu, J., Zhang, W., & Yu, X. (2011). A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(2), 261-269.

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

Radji, R., & Kokou, K. (2014). Distribution of the horticultural plants in togo according to decorative parts and medicinal value. *Pakistan Journal of Science*, 66(3).

Rahman, A. M., & Gulshana, M. I. A. (2014). Taxonomy and medicinal uses on Amaranthaceae family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2(2), 54-59.

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.

Reis, A., Kleinowski, A. M., Klein, F. R. S., Telles, R. T., do Amarante, L., & Braga, E. J. B. (2015). Light quality on the *in vitro* growth and production of pigments in the genus *Alternanthera*. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 18(5), 349-357.

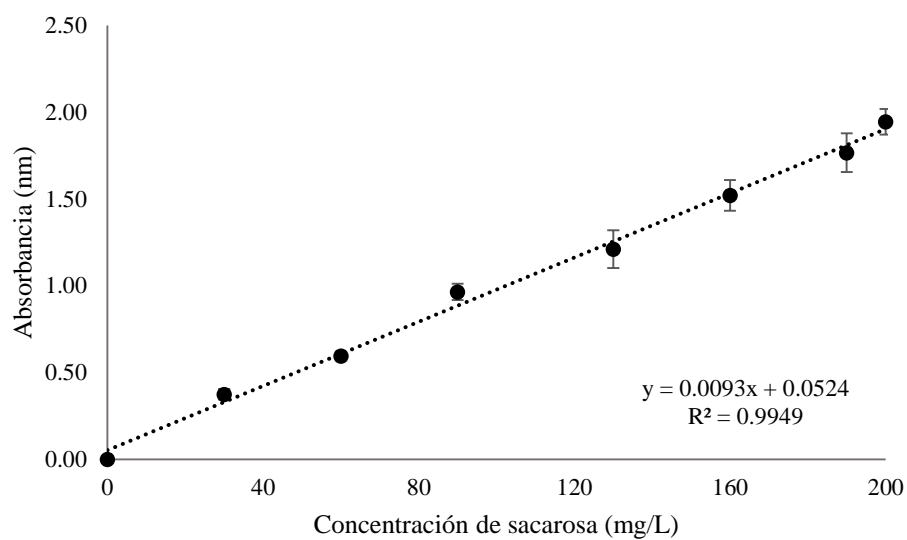
- Rodríguez-Monroy, M., & Galindo, E. (1999)** Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme Microbiology Technology* 24:687–693
- Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2014).** *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62, 684-693
- Ruiz, A. Q., & Valadez, J. M. (1985).** Effects of different growth factors on *Gomphrena globosa* callus tissue. *Journal of Natural Products*, 48(6), 976-980.
- Sakuta, M. (2014).** Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant biotechnology reports*, 8(1), 37-48.
- Salvador, M. J., Andreatza, N. L., Pascoal, A. C., Pereira, P. S., França, S. C., Zucchi, O. L., & Dias, D. A. (2012).** Bioactive Chemical Constituents and Biotechnological Production of Secondary Metabolites in Amaranthaceae Plants, Gomphreneae Tribe. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*, 124.
- Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2015).** The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27(1), 44-63
- Sharma, O.P. (1993).** Plant Taxonomy. Tata Mc Graw Hill Publishing Co. Ltd. New Delhi, India. pp. 312-318.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012).** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26.
- Sen, M. K., Jamal, M. A. H. M., & Nasrin, S. (2013).** Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured in vitro. *Environmental and Experimental Biology*, 11, 119-123.
- Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A. & Andrade, P. B. (2012).** Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food chemistry*, 135(2), 756-763.
- Singh, A., Kandasamy, T., & Odhav, B. (2009).** In vitro propagation of *Alternanthera sessilis* (sessile joyweed), a famine food plant. *African Journal of Biotechnology*, 8(21).
- Singleton, V., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R. (1974).** Analysis of total Phenols and other oxidation substrates and Antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. 14. Polyphenols and flavonoids. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178
- Siqueira, J.C. (1995).** Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. *Pesquisa Botânica.*; 45: 5-21.
- Skoog, F., & Miller, C.O. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118–130.
- Sreekanth, D., Arunasree, M. K., Roy, K. R., Reddy, T. C., Reddy, G. V., & Reddanna, P. (2007).** Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine*, 14(11), 739-746.

- Stobbe**, H., Schmitt, U., Eckstein, D., and Dujesiefken, D. (2002). Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia sp.*). *Annals of Botany*, 89: 773–782.
- Strack**, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269.
- Swamy**, M. K., Sudipta, K. M., Balasubramanya, S., & Anuradha, M. (2010). Effect of different carbon sources on in vitro morphogenetic response of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). *Journal of Phytology*, 2(8), 11-17.
- Swieca**, M., Sęczyk, Ł., & Gawlik-Dziki, U. (2014). Elicitation and precursor feeding as tools for the improvement of the phenolic content and antioxidant activity of lentil sprouts. *Food chemistry*, 161, 288-295.
- Tadhani**, M. B., Patel, V. H., & Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3), 323-329.
- Takashashi**, S., & Badger, M.R. (2011). Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage *Trends in plant science*, 16(1), 53-60.
- Tanaka**, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733-749.
- Tesoriere**, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 391-395.
- Tranam**, A. Y., Ilyas, M. M., & Begum, N. T. (2014). Biological Potential and Phytopharmacological Screening of *Gomphrena* Species. *International Journal of Pharma Research and Review*, 3(1), 58-66.
- Trejo-Tapia**, G., Balcazar-Aguilar, J. B., Martínez-Bonfil, B., Salcedo-Morales, G., Jaramillo-Flores, M., Arenas-Ocampo, M. L., & Jiménez-Aparicio, A. (2008). Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 32-36.
- Trujillo-Roldán**, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2006). El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(3), 269-280.
- Tsao**, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tsurunaga**, Y., Takahashi, T., Katsube, T., Kudo, A., Kuramitsu, O., Ishiwata, M., & Matsumoto, S. (2013). Effects of UV-B irradiation on the levels of anthocyanin, rutin and radical scavenging activity of buckwheat sprouts. *Food chemistry*, 141(1), 552-556.
- Tzin**, V., & Galili, G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular plant*, 3(6), 956-972.
- Villegas-Velásquez**, S., Martínez-Mira, A. D., Hoyos, R., Rojano, B., & Orozco-Sánchez, F. (2017). Hydrodynamic stress and limonoid production in *Azadirachta indica* cell culture. *Biochemical Engineering Journal*, 122, 75-84.
- Vasconsuelo**, A., & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875.

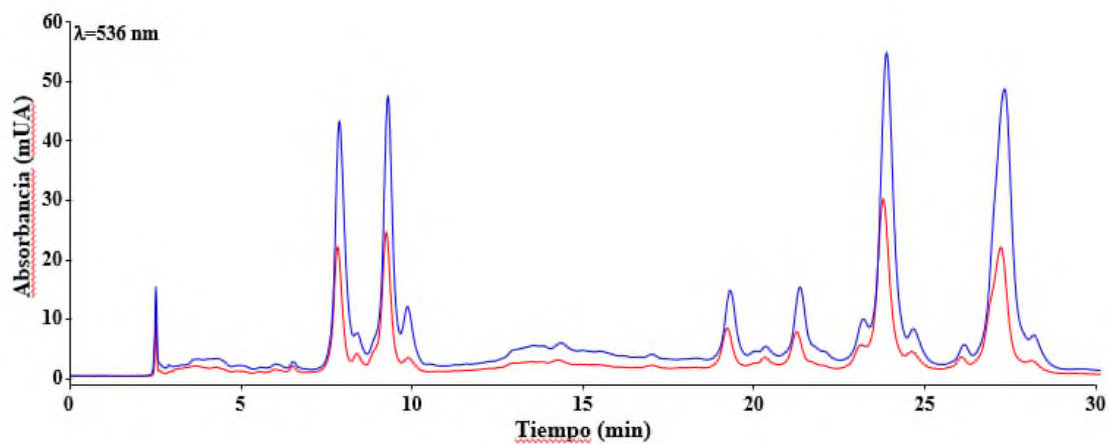
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002)** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1:13–25
- Wambugu, P. W., & Nyamongo, D. O. (2010).** Seed Dormancy and Germination Testing Protocol for Various Economically Useful Plant Species in the Amaranthaceae Family. *Journal of New Seeds*, 11(4), 412-421.
- Wang, M. Y., Wu, L. H., & Zhang, J. (2009).** Impacts of root sulfate deprivation on growth and elements concentration of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) under hydroponic condition. *Plant, Soil and Environment*, 55(11), 484-493.
- Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., & Hoefgen, R. (2013).** Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant physiology*, 162(3), 1290-1310.
- Weathers, P. J., Towler, M. J., & Xu, J. (2010).** Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1339-1351.
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012).** Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant biotechnology journal*, 10(3), 249-268.
- Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H. (2012).** Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 63, 381-407.
- Ye, S., Shao, Q., Xu, M., Li, S., Wu, M., Tan, X., & Su, L. (2017).** Effects of Light Quality on Morphology, Enzyme Activities, and Bioactive Compound Contents in *Anoectochilus roxburghii*. *Frontiers in Plant Science*, 8
- Yu, K. W., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2005).** Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 53-56.
- Zhang, Q., Pan, J., Wang, Y., Lubet, R., & You, M. (2013).** Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate-and benzo (a) pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Molecular carcinogenesis*, 52(9), 686-691.
- Zhong, J.J. (2011)** Bioreactor Engineering. In: Murray M-Y (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, vol. 2. Elsevier, pp. 165–177

11. ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar de sacarosa



Anexo 2. Cromatograma de betalaínas

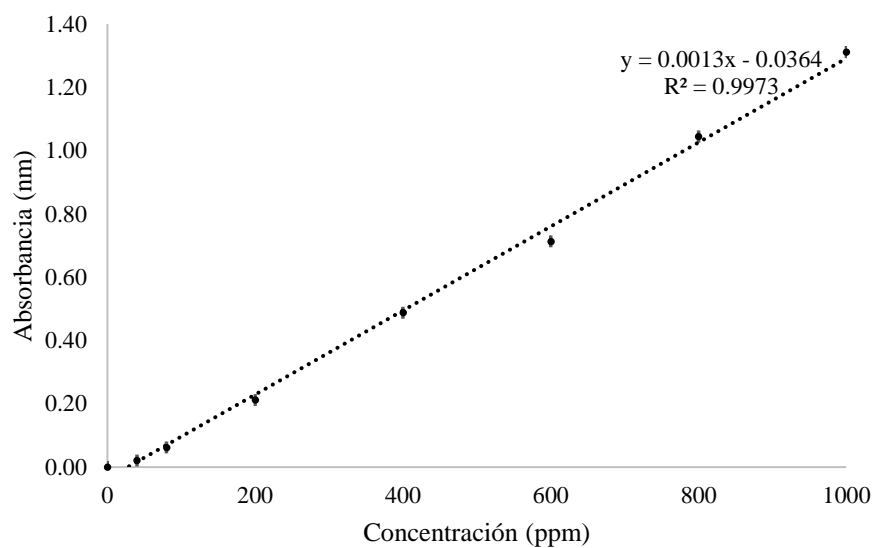


De las extracciones de betalaínas a partir de las brácteas de flores silvestres, se obtuvieron los siguientes cromatogramas para la metodología reportada por Ferreres *et al.* (2011) (línea roja) y Silva *et al.* (2012) (línea azul).

Los primeros dos picos continuos corresponden a gomphrenin I e isogomphrenin I, para el tercer y cuarto pico que se observan al minuto 19 y 21 aproximadamente pertenecen a gomphrenin II y sinapoly-gomphrenin I y finalmente los dos últimos picos, gomphrenin III e isogomphrenin III respectivamente.

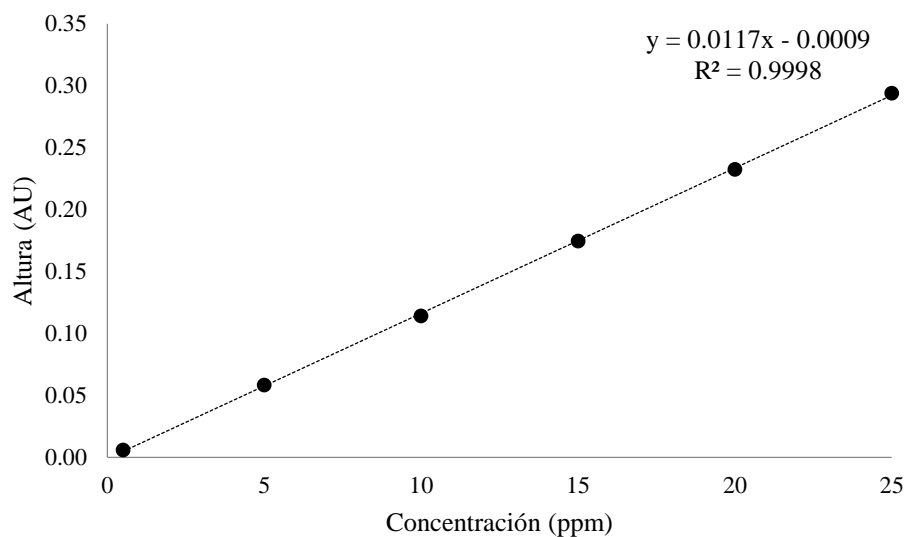
Anexo 3. Compuestos fenólicos

Anexo 3a. Curva estándar de ácido gálico.

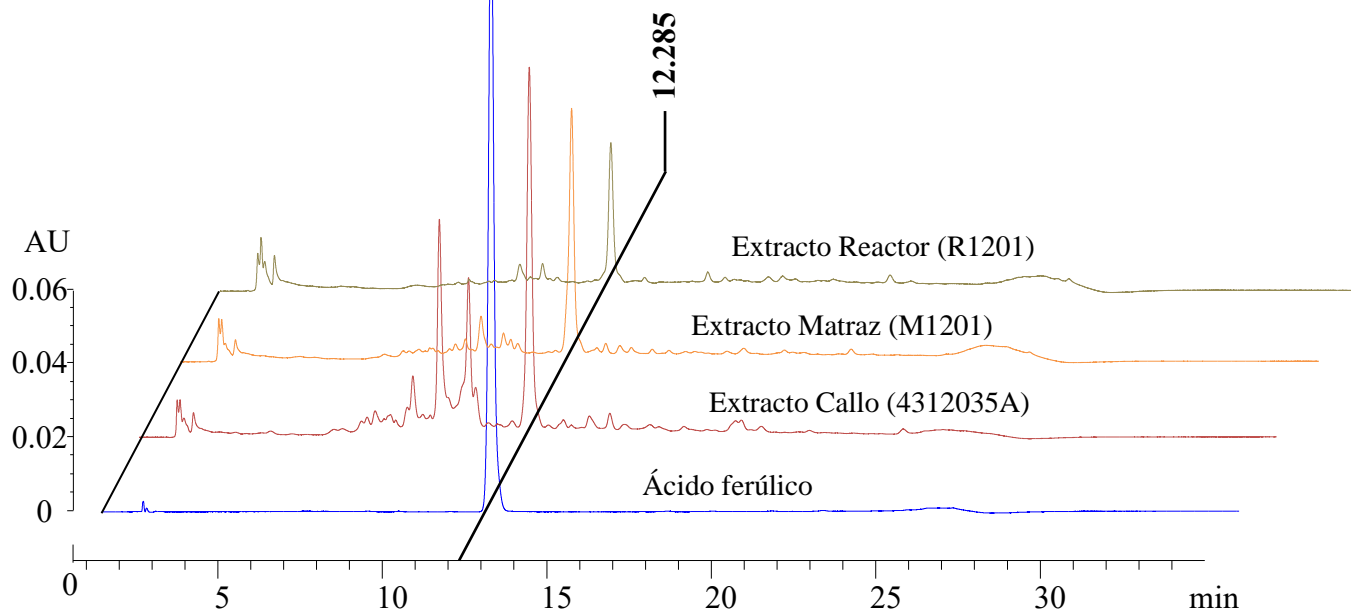


Anexo 3b:

Curva estándar de ácido ferúlico



Cromatograma de ácido ferúlico



Anexo 4. Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	CM	Valor de F	Valor de p
Modelo	43	45 971.1	1 069.10	5.32	0.333
Lineal	9	9 579.1	1 064.34	5.32	0.326
Interacción de 2 términos	30	17 682.9	589.43	2.93	0.436
Interacción de 3 términos	4	2 126.9	531.73	2.65	0.428
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustada)			
14.1724	99.56%	80. 86%			

Agrupación de Tukey

Corrida	N	Media	Agrupación
12	5	100.0	A
21	5	100.0	A
31	5	98.00	A
38	5	91.20	A
15	5	85.20	A B
7	5	85.20	A B
25	5	80.0	A B C
5	5	68.0	A B C D
2	5	68.0	A B C D
40	5	59.2	A B C D E
18	5	56.0	A B C D E F
43	5	52.0	A B C D E F G
19	5	52.0	A B C D E F G
30	5	50.00	A B C D E F G
29	5	46.6	A B C D E F G
8	5	34.4	B C D E F G
44	5	34.0	B C D E F G
37	5	30.80	B C D E F G
24	5	28.4	C D E F G
32	5	27.40	C D E F G
13	5	25.6	C D E F G
11	5	24.80	C D E F G
36	5	23.20	D E F G
23	5	23.00	D E F G
45	5	20.00	D E F G
33	5	20.0	D E F G
6	5	18.80	D E F G
10	5	14.80	D E F G
28	5	14.00	D E F G
17	5	10.80	E F G
14	5	4.80	E F G
4	5	4.80	E F G
22	5	3.20	F G
34	5	2.80	F G
27	5	2.00	F G
41	5	2.00	F G
20	5	1.60	F G
26	5	1.000	F G
42	5	1.000	F G
39	5	0.400	F G
3	5	0.200	G
16	5	0.000000	G
35	5	0.000000	G
9	5	0.000000	G
1	5	0.000000	G

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

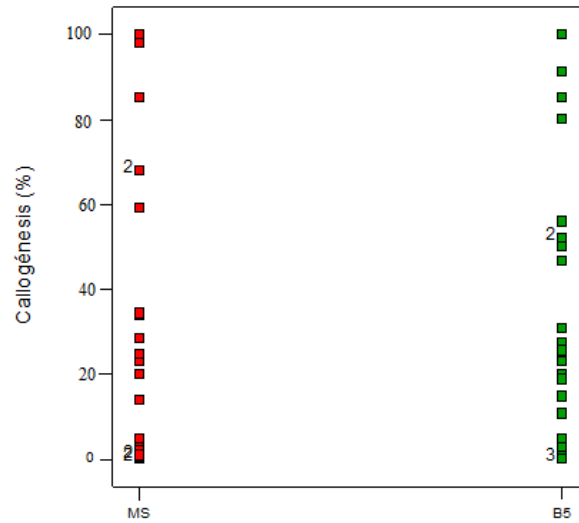
Anexo 5. Graficas de comparaciones de factores experimentales

Tipo de medio

Design-Expert® Software

Correlation: Undefined
Color points by level of
A:Tipo de medio

■ MS
■ B5



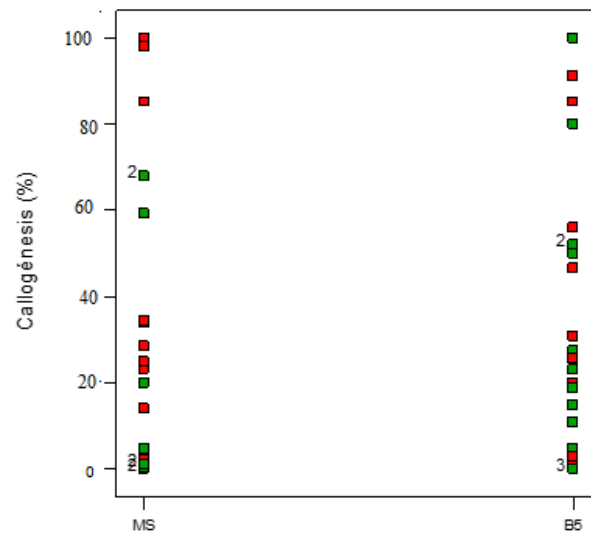
A:Tipo de medio

Tipo de Auxina

Design-Expert® Software

Correlation: Undefined
Color points by level of
B:Auxina

■ 2,4-D
■ ANA



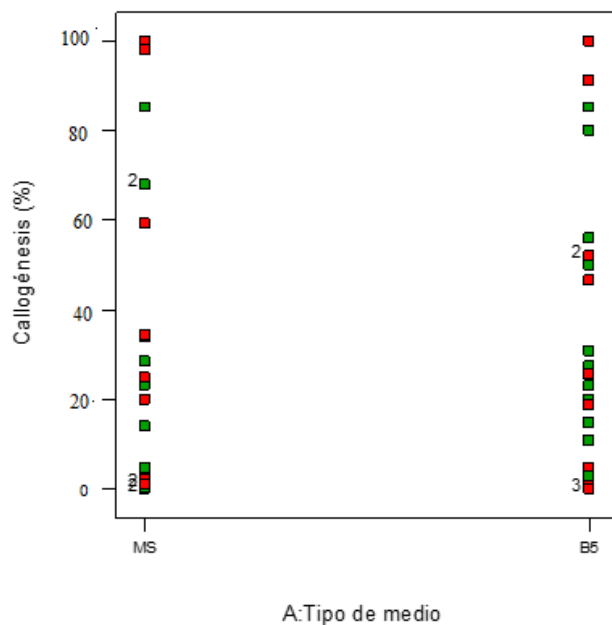
A:Tipo de medio

Tipo de Citocinina

Design-Expert® Software

Correlation: Undefined
Color points by level of
C:Citocinina

■ KIN
■ BAP

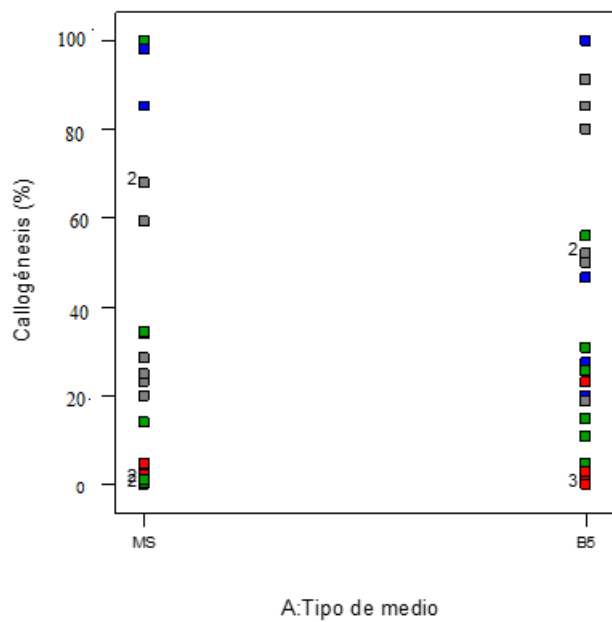


Concentración de Auxina

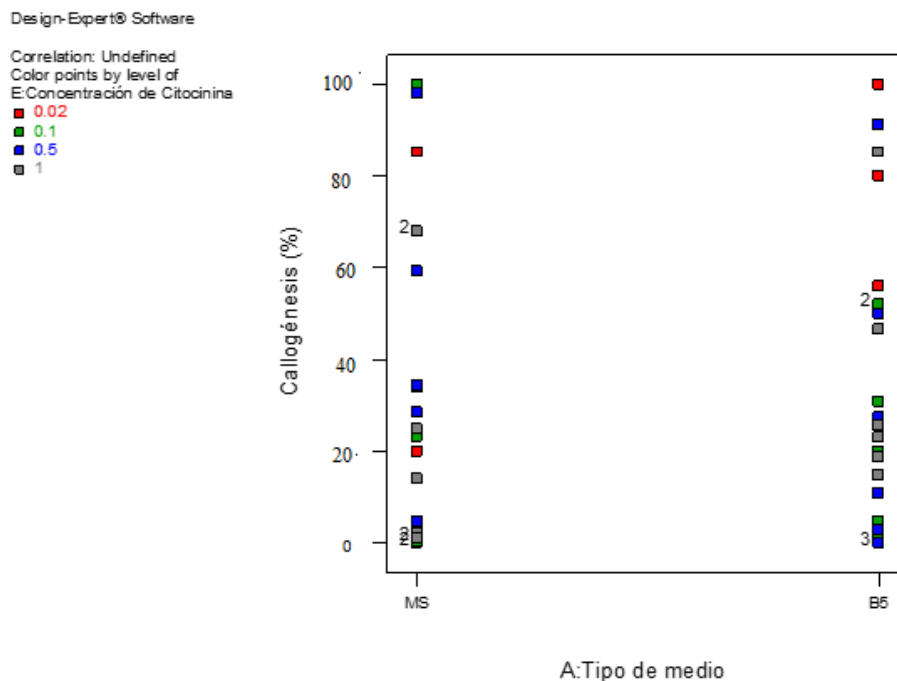
Design-Expert® Software

Correlation: Undefined
Color points by level of
D:Concentración de Auxina

■ 0.02
■ 0.1
■ 0.5
■ 1



Concentración de Citocinina



Anexo 6. Sistemas de color RGB

Nombre HTML	Código hex R G B	Valores R G B	Valores H S L	Valores H S V
Colores rosas				
MistyRose	FFE4E1	255 228 225	6° 100% 94%	6° 12% 100%
Pink	FFC0CB	255 192 203	350° 100% 88%	350° 24% 100%
LightPink	FFB6C1	255 182 193	351° 100% 86%	351° 28% 100%
HotPink	FF69B4	255 105 180	330° 100% 71%	330° 58% 100%
RosyBrown	BC8F8F	188 143 143	0° 25% 65%	0° 24% 74%
PaleVioletRed	DB7093	219 112 147	340° 60% 65%	340° 49% 86%
DeepPink	FF1493	255 20 147	328° 100% 54%	328° 92% 100%
MediumVioletRed	C71585	199 21 133	322° 81% 43%	322° 90% 78%
Colores violetas y púrpuras				
Thistle	D8BFD8	216 191 216	300° 24% 80%	300° 11% 85%
Plum	DDA0DD	221 160 221	300° 47% 75%	300° 27% 87%
Violet	EE82EE	238 130 238	300° 76% 72%	300° 46% 93%
Orchid	DA70D6	218 112 214	302° 59% 65%	302° 48% 86%
Fuchsia / Magenta	FF00FF	255 0 255	300° 100% 50%	300° 100% 100%
MediumPurple	9370DB	147 112 219	260° 60% 65%	260° 49% 86%
MediumOrchid	BA55D3	186 85 211	288° 59% 58%	288° 60% 83%
MediumSlateBlue	7B68EE	123 104 238	249° 80% 67%	249° 57% 93%
SlateBlue	6A5ACD	106 90 205	248° 53% 58%	248° 55% 80%
BlueViolet	8A2BE2	138 43 226	271° 76% 53%	271° 81% 89%
DarkViolet	9400D3	148 0 211	282° 100% 41%	282° 100% 82%
DarkOrchid	9932CC	153 50 204	280° 61% 50%	280° 76% 81%
DarkMagenta	8B008B	139 0 139	300° 100% 27%	300° 100% 54%

Colores blancos				
White	FFFFFF	255 255 255	—° 0% 100%	—° 0% 100%
WhiteSmoke	F5F5F5	245 245 245	—° 0% 96%	—° 0% 96%
Snow	FFFAFA	255 250 250	0° 2% 100%	0° 0% 100%
Seashell	FFF5EE	255 245 238	25° 100% 97%	25° 6% 100%
Linen	FAF0E6	250 240 230	30° 67% 94%	30° 8% 98%
AntiqueWhite	FAEBD7	250 235 215	34° 78% 91%	34° 14% 98%
OldLace	FDF5E6	253 245 230	39° 85% 95%	39° 9% 99%
FloralWhite	FFFAF0	255 250 240	40° 100% 97%	40° 6% 100%
Ivory	FFFFF0	255 255 240	60° 100% 97%	60° 6% 100%
Colores amarillos				
LightYellow	FFFFE0	255 255 224	60° 100% 94%	60° 12% 100%
Cornsilk	FFF8DC	255 248 220	48° 100% 93%	48° 14% 100%
LemonChiffon	FFFACD	255 250 205	54° 100% 90%	54° 20% 100%
LightGoldenrodYellow	FAFAD2	250 250 210	60° 80% 90%	60° 16% 98%
PaleGoldenrod	EEE8AA	238 232 170	55° 67% 80%	55° 29% 93%
Khaki	F0E68C	240 230 140	54° 77% 75%	54° 41% 94%
Yellow	FFFF00	255 255 0	60° 100% 50%	60° 100% 100%
Gold	FFD700	255 215 0	51° 100% 50%	51° 100% 100%
DarkKhaki	BDB76B	189 183 107	56° 38% 58%	56° 43% 74%

Anexo 7. Análisis de medias de producción en callos *in vitro*

Comparaciones en parejas de Tukey para polifenoles

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
38	3	24.044	A
31	3	16.121	B
36	3	15.556	B
15	3	11.608	C
24	3	11.262	C
02	3	11.1718	C
05	3	9.095	C D
11	3	8.095	D
43	3	7.762	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Comparaciones en parejas de Tukey para betalaínas

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
02	2	0.21000	A
15	2	0.159500	B
43	2	0.148500	B C
05	2	0.12000	C D
38	2	0.09700	D E
24	2	0.08050	E F
31	2	0.06700	E F
36	2	0.0580	F
11	2	0.05300	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 7. Análisis de medias de producción de suspensiones celulares

Comparaciones en parejas de Tukey para polifenoles

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
38 SB	3	14.210	A
43SA	3	10.88	A B
43 SB	3	10.20	A B
38 SA	3	8.992	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones en parejas de Tukey para betalaínas

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
43SA	2	0.16045	A
38 SA	2	0.15980	A
43 SB	2	0.12580	A
38 SB	2	0.1059	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.