



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC**

**“Evaluación del efecto de la L-tirosina en la producción de betalainas,
flavonoides y fenoles en raíces adventicias *in vitro* de *Gomphrena globosa*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

ATZIN ADOLFINA MORENO CUEVAS

Director: Dra. Jacqueline Capataz Tafur

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

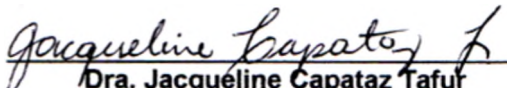
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

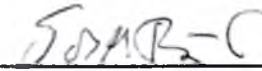
En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 25 de junio de 2019 a las 10 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Evaluación del efecto de la L-tirosina en la producción de betalainas, flavonoides y fenoles en raíces adventicias *in vitro* de *Gomphrena globosa* L.**" presentada por la alumna **Atzin Adolfinia Moreno Cuevas**, con número de matrícula 130904802, aspirante al título de **Licenciatura**.

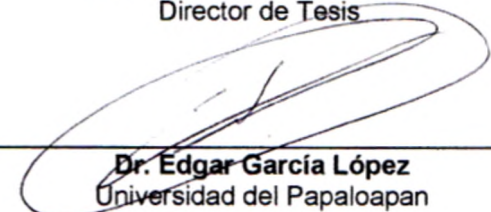
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 25 de junio de 2019

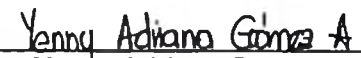
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

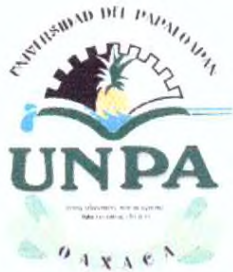

Dr. Julián Mario Peña Castro
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar García López
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Omar Viñas Bravo
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Investigadora Cátedras-Conacyt
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Revisora de Tesis


Dr. Enrique Villalobos Amador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de junio de 2019
Oficio No. JCIB/026/06/2019

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Atzin Adolfinia Moreno Cuevas** titulado "**Evaluación del efecto de la L-tirosina en la producción de betalainas, flavonoides y fenoles en raíces adventicias *in vitro* de *Gomphrena globosa* L.**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidente: Dr. Enrique Villalobos Amador
Vocal: Dr. Julián Mario Peña Castro
Secretario: Dr. Edgar García López
Primer Suplente: Dr. Omar Viñas Bravo
Segundo Suplente: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa.



Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú*



JEFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo. M.C. Néctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

VICE-RECTORIA
ACADEMICA

c.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Atzin Adolfinia Moreno Cuevas, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido culminada sin ayuda de mis padres: *Hilario Moreno* y *Luz del Carmen Cuevas Valdivieso*, a quienes dedico cada una de estas hojas que suman años de sacrificios, paciencia, esfuerzo y sobre todo confianza.

Al igual que a mis hermanas: *Amalinalli* y *Aketzalli*, quienes me alentaban de forma indirecta (consejos y casi siempre regaños), y a Liam quien me recuerda cada que lo visito, que no debo dejar de ser una persona feliz y de disfrutar de la vida.

A mis amigos *Alondra*, *Lucina*, *Marilyn*, *Fernando*, *Obed*, *Daniela*, *Asbel*, *Armando* y *Betzayda* por hacer esta estancia aún más divertida, dentro y fuera de la universidad.

Al Dr. *Paul M. Sánchez Ocampo* quien se convirtió en un amigo, además de apoyarme en las cuestiones de laboratorio y darnos interminables *tips* para nuestra vida diaria.

A *Manuel O.*, por escucharme en mis constantes quejas y frustraciones, y brindarme de su cariño y apoyo moral en esta etapa.

A los proyectos Ciencia Básica CONACyT N° 18395 y Cátedra CONACyT N° 3212.

Y a la *Dra. Jacqueline Capataz Tafur* quien me brindo en todo momento su atención, apoyo y servicio, fungiendo como asesora de tiempo completo en esta tesis. Mi mayor respeto y admiración hacia usted. Siempre le estaré agradecida.

*Agradecimiento especial a Jean-Benoît Dunkel, por ser la más grande fuente inspiracional en los momentos más oscuros de este proceso artístico y a cada uno de los que componen la Universidad del Papaloapan, mi segunda casa.

DEDICATORIA

A todos los que aportaron con mi crecimiento personal y académico, sin duda alguna esta hoja no sería lo suficiente para mencionarlos, pero sin ellos, hubiera sido quizá más largo o tedioso este proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	1
2.1 Importancia y aplicaciones en la industria del cultivo <i>in vitro</i> de plantas	1
2.1.2 Cultivo de raíces <i>in vitro</i>	4
2.2 Generalidades de <i>Gomphrena globosa</i> L.....	7
2.2.1 Fenoles, flavonoides y betalainas.....	8
2.2.2 PAL, TAL y Tirosinasa	16
2.2.3 Estudios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i>	19
2.3 Análisis de Expresión Metabólica en Sistemas Vegetales.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPOTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo Principal	23
5.2 Objetivos Secundarios	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1 Material vegetal.....	24
6.2 Alimentación de precursor L- tirosina	24
6.3 Crecimiento celular.....	24
6.3.2 Peso fresco (PF) y peso seco (PS).....	25
6.3.3 Rendimientos.....	25
6.4 Extracción y actividad TIR, TAL y PAL.....	25
6.4.1 Actividad tirosinasa (TIR).....	26
6.4.2 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL).....	26
6.4.3 Actividad tirosina amonio liasa (TAL)	27

6.5 Extracción y cuantificación de metabolitos	28
6.5.1 Fenoles	28
6.5.2 Flavonoides.....	29
6.5.3 Betalaínas	29
6.6 Análisis estadístico.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1 Cinética de crecimiento y de producción de fenoles, flavonoides y betalaínas en cultivos de raíces adventicias de <i>Gomphrena globosa</i>	31
7.2 Efecto de la L-tirosina sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de raíces.....	33
7.3 Efecto de la L-tirosina en la producción de metabolitos secundarios.....	37
7.3.1 Betalaínas	38
7.3.2 Flavonoides.....	40
7.2.3 Fenoles	41
7.4 Efecto de la L-tirosina en la actividad específica de PAL, TAL y tirosinasa	42
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47
11. ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>L. erythrorhizon</i> como material de partida de productos cosméticos. Tomada de Renneberg, 2017.....	3
Figura 2. Morfología de <i>G. globosa</i>	7
Figura 3. Estructuras representativas de betalainas.....	9
Figura 4. Ruta de biosíntesis de betalainas. AA, ácido ascórbico, DAA, ácido dehidroascórbico. 10	
Figura 6. Biosíntesis de compuestos fenólicos. Tomado de Lin <i>et al.</i> , 2016.....	13
Figura 7. Estructuras de los principales subgrupos de flavonoides.. ..	14
Figura 8. Ruta de biosíntesis de flavonoides.. ..	15
Figura 9. Ruta metabólica propuesta para <i>G. globosa</i>	18
Figura 10. Cinética de crecimiento y producción de compuestos bioactivos de las raíces de <i>G. globosa</i> en medio B5, suplementadas con 49.3 µM de IBA.. ..	32
Figura 11. Fotografías de los cultivos de raíces adventicias de <i>G. globosa</i> tratadas con <i>L</i> -tirosina cosechadas en los diferentes días de cultivo.	35
Figura 12. Cinética de crecimiento de raíces adventicias de <i>G. globosa</i> tratadas con <i>L</i> - tirosina.. ..	36
Figura 13. Cinética de producción de betalainas en raíces de <i>G. globosa</i> tratadas con <i>L</i> -tirosina.. ..	39
Figura 14. Producción de flavonoides en cultivos de raíces de <i>G. globosa</i>	40
Figura 15. Producción de fenoles en cultivos de raíces de <i>G. globosa</i> .).....	41
Figura 16. Actividad A. TYR, B. TAL y C. PAL en raíces adventicias tratadas con <i>L</i> -tirosina.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Empresas dedicadas a la obtención de metabolitos a partir de cultivo de células y tejidos.	3
Tabla 2. Especies que han sido establecidas en cultivo <i>in vitro</i> de raíces adventicias	5
Tabla 3. Propiedades medicinales de <i>G. globosa</i>	7
Tabla 4. Actividad Farmacológica en <i>G. globosa</i>	8
Tabla 5. Actividad biológica de betalaínas.....	11
Tabla 6. Velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y rendimiento de biomasa en cultivo de raíces de <i>G. globosa</i>	37
Tabla 7. Rendimientos de compuestos en cultivos de raíces de <i>G. globosa</i> tratados con L-tirosina.....	42

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados	mL: mililitros
4CL: 4- cumaroato CoA ligasa	mM: milimolar
AlCl ₃ : tricloruro de aluminio	MS: medio basal Musahige &Skoog
BS: medio basal Gamborg's	N: normalidad
BSA: albumina de suero bovino	Na ₂ CO ₃ : carbonato de sodio
C3H: 4- cumaroato 3- hidroxilasa	NaNO ₂ : nitrito de sodio
C4H: cinamato 4- hidroxilasa	NaOH: hidróxido de sodio
CCR: cinamoil CoA reductasa	p/v: peso/ volumen
DTT: ditioneitol	PAL: fenilalanina amonio liasa
EA: equivalentes de amarantina	PF: peso fresco
EAG: equivalentes de ácido gálico	pH: potencial de hidrógeno
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	PS: peso seco
EQ: equivalentes de quercetina	PVPP: polivinilpolipirrolidona
ES: extracto seco	rpm: revoluciones por minutos
g: gramos	TAL: tirosina amonio liasa
h: horas	TDZ: thidiazurón
HCl: ácido clorhídrico	td: Tiempo de duplicación
HQT: hidroxicinamoil CoA: quinato	TIR: tirosinasa
hidroxicinamoil transferasa	Y p/x: rendimiento producto/ biomasa
IBA: ácido indol butírico	Y x/s: rendimiento biomasa/ sustrato
KCl: cloruro de potasio	μ: Velocidad específica de crecimiento
L: litro	μL: microlitro
mg: miligramos	μM: micromolar
min: minutos	

RESUMEN

Gomphrena globosa es una planta ornamental que produce compuestos de interés comercial como: betalainas, fenoles y flavonoides. Algunos estudios sugieren que las especies de la familia Amaranthaceae forman estos metabolitos por medio de la ruta del shikimato y son sintetizados por las enzimas tirosinasa (TIR), fenilalanina y tirosina amonio liasa (PAL y TAL), a partir de la tirosina. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la L-tirosina en la producción de betalainas, flavonoides y fenoles y en las actividades enzimáticas PAL, TAL y TIR de raíces adventicias *in vitro* de *Gomphrena globosa*. Para ello, se suministró el precursor L- tirosina (Tyr) a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75 y 100 μM) a un cultivo de raíces adventicias de *G. globosa* con la finalidad de evaluar la producción de los metabolitos y actividades enzimáticas antes mencionadas. Se alcanzó una producción máxima de betalainas de 9.9 mg EA/g ES en el día 30 de cultivo en la condición Tyr25 μM , mientras que para flavonoides se obtuvo 12.36 mg EQ/g ES el día 21 con Tyr100 μM . Para los compuestos fenólicos se observó una concentración de 48 mg EAG/g ES con Tyr50 μM al día 30. Por último se observó una disminución en las actividades enzimáticas PAL y TAL a las 72 h respecto a los demás días de la cinética, entre tanto la actividad TIR aumento en el mismo tiempo al después de añadir el precursor tirosina. Este trabajo sugiere que la concentración de tirosina estimula la producción específica de metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Gomphrena globosa is an ornamental plant that produces mainly betalains, phenols and flavonoids, compounds of commercial interest. Some studies suggest that the species of the Amaranthaceae family form these metabolites by means of the shikimate pathway and are mediated by the tyrosinase (TYR) enzymes, and phenylalanine and tyrosine ammonium lyase (PAL and TAL), from tyrosine. The aim of the present work was to study the effect of L-tyrosine in the production of betalains, flavonoids and phenols and in the enzymatic activities PAL, TAL and TYR in adventitious roots *in vitro* of *Gomphrena globosa*. To this end, the L-tyrosine (Tyr) precursor was supplied at different concentrations (0, 25, 50, 75 and 100 μ M) to a culture of adventitious roots of *G. globosa* with the purpose of evaluating the production of metabolites and activities enzymatic enzymes mentioned above. A maximum production of betalains of 9.9 mg EA / g ES was reached on day 30 of culture in the Tyr25 μ M condition, while for flavonoids, 12.36 mg EQ / g ES was obtained on day 21 with Tyr100 μ M. In the case of phenolic compounds, a concentration of 48 mg EAG / g ES was observed with Tyr50 μ M at day 30. Finally, a decrease in PAL and TAL enzymatic activities was observed at 72 h compared to the other days, meanwhile the TYR activity increased at the same time by adding the tyrosine precursor. This work suggests that the concentration of tyrosine stimulates the specific production of secondary metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una de las principales fuentes de compuestos bioactivos de interés farmacológico (Newman & Cragg, 2016) y alimenticio (FDA, 2018). Particularmente, *Gomphrena globosa* es una especie que produce mayoritariamente betalaínas, fenoles y flavonoides (Ferrerres *et al.*, 2011), compuestos a los cuales se atribuye la actividad antioxidante, (Silva *et al.*, 2012; Sharma & Grewal, 2014), actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de piel y mama (Latha & Rajendran, 2013; Aguilar, 2018), de reducción de la presión arterial sanguínea (Arcanjo *et al.*, 2011) y como aditivos en alimentos (Stintzing & Carle, 2007).

Las betalaínas, fenoles y flavonoides son compuestos derivados del metabolismo de la L-tirosina a través de enzimas como la tirosinasa (TIR), la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la tirosina amonio liasa (TAL) (Ferrerres *et al.*, 2011; KEGG, 2019). Una estrategia biotecnológica para incrementar la producción de metabolitos secundarios, es la alimentación de precursores en cultivo *in vitro*, que permiten analizar el flujo metabólico mediante la adición de intermediarios que se encuentran en de la ruta de interés (Oksman-Caldentey *et al.*, 2004). En plantas del orden de las Cariofilales como *Althernatera philoxeroides*, la adición de 75µM de L-tirosina, resultó en el incremento del 6% de betacianinas (Ribeiro *et al.*, 2017). Ouyang *et al.* (2005) reportaron que a concentraciones menores a 100 µM de tirosina se favoreció el crecimiento y la síntesis de glucósidos feniletanoides (PeG) en *Cistanche desertícola*.

En los cultivos de callos, suspensiones y de raíces adventicias *in vitro* de *G. globosa* se ha demostrado la producción betacianinas y compuestos fenólicos (Méndez, 2017; Martínez, 2019), por lo que son una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos y para el estudio de precursores que influyen en las vías de biosíntesis (Świeca *et al.*, 2014). Por lo que en este trabajo se determinó el efecto de diferentes concentraciones del precursor L-tirosina, sobre la acumulación de betalaínas, fenoles y flavonoides y las actividades enzimáticas de TIR, PAL y TAL en cultivos *in vitro* de raíces adventicias de *G. globosa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia y aplicaciones en la industria del cultivo *in vitro* de plantas

El metabolismo de las plantas es fuente de productos naturales con amplio espectro de aplicaciones, tan solo en los últimos 30 años, más del 50% de los medicamentos aprobados provinieron de plantas (Newman & Cragg, 2016), y al menos 28 fármacos vitales para la ONU fueron de origen vegetal (Rates, 2001; Veeresham, 2012). Sin embargo en la búsqueda de nuevos compuestos, tanto las especies vegetales, como su ecosistema se ven severamente afectados cuando no existe un control para su explotación.

Una alternativa a las técnicas tradicionales de obtención de metabolitos secundarios es el cultivo *in vitro*, una herramienta que permite obtener compuestos bioactivos como enzimas, fármacos, proteínas, pigmentos y agentes insecticidas con aplicación en la agricultura, textiles, alimentos, farmacéutica y cosmética, siendo capaz de seleccionar, multiplicar y conservar tanto genotipos como fenotipos de interés biológico, además de añadir calidad y homogeneidad a los procesos de extracción de compuestos (Wilson *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2012).

El cultivo *in vitro* surge de la totipotencia que tienen las plantas, una particularidad que les confiere la habilidad de regenerarse en plantas completas a partir de una única célula. Así a partir del cultivo de diferentes explantes (hojas, tallos, meristemos, etc.), se pueden obtener cultivos de células vegetales en suspensión, así como tejidos que se organizan para formar órganos en un ambiente estéril provisto de los requerimientos nutricionales necesarios. Para realizar esta tarea hay que tener en cuenta varios aspectos como: el tipo de medio de cultivo, el tipo de explante, el fotoperiodo y el balance de hormonas de crecimiento vegetal que permitan la desdiferenciación (Tripathi & Tripathi, 2003). Por último considerar que la línea de cultivo de células o tejidos vegetales debe de estar previamente establecida en un periodo no mayor o igual a 6 meses (Mustafa *et al.*, 2011).

Las líneas de cultivo vegetal han sido capaces de producir metabolitos con efectos benéficos para la salud, por ejemplo, suspensiones celulares de *Catharanthus roseous* han permitido

extraer ajmalicina, compuesto alcaloide utilizado para tratar enfermedades respiratorias y regular el flujo sanguíneo (Zenk, 1977; Jaleel *et al.*, 2007). En el tratamiento de enfermedades como el cáncer, el Placitaxel® y derivados del mismo producto fueron extraídas de suspensiones celulares del genero *Taxus* (Tabata, 2004), además pigmentos como betalainas, fragancias como el geraniol y pesticidas como la azaridactina son extraídos a partir de cultivos *in vitro* (Mulder-Krieger *et al.*, 1988; Prakash *et al.*, 2002; Gengatharan *et al.*, 2015).

Una vez establecidas las condiciones en nivel matraz, se procede al escalamiento en biorreactor, que brinda ventajas como el monitoreo automático, la selección, y el control de parámetros para aumentar la producción de compuestos (Murthy *et al.*, 2014). Los biorreactores han sido aplicados para obtener grandes cantidades de biomasa y metabolitos. Altas cantidades de ginsenosidos (8.09 ± 0.30 mg/g PS) han sido extraídos a partir de raíces cultivadas en reactores tipo balón de 10 L en medio suplementado con $24.6 \mu\text{M}$ de IBA (Paek *et al.*, 2009), así como raíces de *Morinda citrifolia* escaladas en reactores pilotos de 500L para obtener antroquinonas con propiedades antiinflamatorias, antifúngicas y antibacteriales (Baque *et al.*, 2014).

Los tejidos y células de especies vegetales han servido para extraer y sintetizar compuestos de interés a nivel industrial, empresas como Mitsui Petrochemical Industries Ltd., a través de raíces de *Lithospermum erythrorhizon* se dedican a la extracción de shikonina, un pigmento natural que sirve de materia prima para la cosmética KANEBO, encargado de comercializarlo en forma de bio-labial (Figura 1), un producto de la biotecnología que fue un éxito comercial en Japón en 1985, ya que además de ser un producto de origen natural, se le atribuye propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, tan solo en la primera semana se vendieron 2 millones de unidades por un precio de 3500¥ (\$625 MXN) por pieza (Renneberg, 2016).



Figura 1. *L. erythrorhizon* como material de partida de productos cosméticos. Tomada de Renneberg, 2016.

Otro caso de éxito es la compañía Japan Tobacco Inc., dedicada a la obtención de nicotina a partir de células de tabaco para producir cigarrillos (Japan Tobacco Inc., 2018), con una utilidad operativa de 3,219 millones de dólares en 2017. Otros ejemplos de industrias dedicadas a la extracción de metabolitos secundarios a partir del cultivo de células y tejidos vegetales se enlistan en el Tabla 1.

Tabla 1. Empresas dedicadas a la obtención de metabolitos a partir de cultivo de células y tejidos.

País	Compuesto	Aplicación	Especie	Cultivo	Empresa	Referencia
E.U.	Placitaxel	Anti-cancerígeno	<i>Taxus</i>	Célula	Phyton Catalytic	Zhong, 2002.
Korea	Placitaxel	Anti-cancerígeno	<i>Taxus</i>	Célula	Samyang Genex	Zhong, 2002.
Japón	TP-S Polisacárido	Agua micelar (cosmética)	<i>Polianthes tuberosa L.</i>	Célula	Kao Corporation	Zhong, 2013.
Japón	Gingenósido	Aditivo de alimentos	<i>Panax ginseng</i>	Célula	Nitto Denko Corporation	Sharma <i>et al.</i> , 2014.
Japón	Shikonina	Labiales (cosmética)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Raíz	Mitsui Petrochemical Industries Ltd	Renneberg, 2016.
Japón	Nicotina	Cigarrillos	<i>Nicotiana tabacum</i>	Célula	Japan Tobacco Inc.	Japan Tobacco Inc, 2018.
Alemania	Placitaxel	Anti-cancerígeno	<i>Taxus chinensis v. marei</i>	Célula	Phyton Biotech	Phyton Biotech, 2019.
Francia	Antocianinas	Cuidado de la piel Cosmética	<i>Camelia japónica</i>	Célula	Sederma	Croda personal care, 2019

Elaboración propia

2.1.2 Cultivo de raíces *in vitro*

En la actualidad se buscan cultivos vegetales con características sobresalientes como alta frecuencia regenerativa, mayor producción de biomasa y mayor acumulación de metabolitos de interés, para obtener un material vegetal estable, tal es el caso de los cultivos de raíces adventicias, *in vivo* es un órgano que da soporte a la parte aérea de la planta anclándose a la tierra, proporcionando nutrientes esenciales como agua y minerales, además de ser un sitio donde se acumulan compuestos del metabolismo secundario (Flores *et al.*, 1987).

Los cultivos *in vitro* de raíces pueden formarse por dos vías: organogénesis directa y organogénesis indirecta a través de callos que posteriormente se convierten a raíces. Las ventajas que tienen las raíces cultivadas *in vitro* frente a otros sistemas son la falta de geotropismo, la estabilidad genética y la casi o nula dependencia de hormonas de crecimiento en los medios de cultivo (Langhansova *et al.*, 2005).

El establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces de *Catharanthus roseus*, *Panax ginseng* y *Camptotheca acuminata* ha permitido la extracción de compuestos como vinblastina, ginsenósidos y camptotecina (Sivakumar, 2006). Además, metabolitos como el sulforafano, compuesto que reduce el riesgo de desarrollar cáncer, con un costo en el mercado de 72€/5 mg (Liang *et al.*, 2005), antocianinas, que sirven como aditivos en alimentos (Betsui *et al.*, 2004), inmunoestimulantes como el ácido cafeíco (Jeong *et al.*, 2009), antifúngicos como la hipericina (Cui *et al.*, 2010) y pigmentos como las betalaínas, son extraídos de cultivo de raíces adventicias *in vitro*, al igual que los enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas especies que han sido establecidas en cultivo *in vitro* de raíces adventicias

Especie	Explante	Medio	Metabolitos	Usos	Referencia
<i>Hypericum perforatum</i>	Hoja y tallo	MS + vitaminas B5 + 0.46 µM KIN + 4.92 µM IBA	Flavonoles, naftodiantronas, floroglucinoles y xantonas	Actividad antidepresiva, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y hepatoprotectora.	Cui <i>et al.</i> , 2010
<i>Aloe vera</i>	Hoja	B5 + 2.68 µM ANA + 0.88 µM BAP	Áloe-emodina	Antiinflamatorias y contra la toxicidad genética	Lee <i>et al.</i> , 2011
<i>Eurycoma longifolia</i>	Hoja	MS + 16.11 µM ANA	Quasinoideos y alcaloides	Anti-malaria, anti-úlceras, antimicrobiana y citotóxica.	Hussein <i>et al.</i> , 2012
<i>Artemisia vulgaris</i>	Hoja y raíz	MS 11.14 µM AIA + 4.92 µM IBA	Coumarinas, sesquiterpeno lactonas, aceite volátiles e inulina	Diabetes, trastornos hepáticos, epilepsia y psiconeurosis, depresión, irritabilidad, insomnio y ansiedad por estrés.	Sujatha & Kumari 2012
<i>Andrographis paniculata</i>	Hoja	MS + 2.68 µM ANA	Andrografólido	Inmunoestimulante, antiinflamatorio, anti-fertilidad, protector del hígado, anti-VIH y estimulación de la secreción biliar	Sharma <i>et al.</i> , 2013
<i>Prunella vulgaris</i> L.	Hoja	MS + 4.43 µM BA + 2.68 µM ANA	Fenoles y flavonoides	Anti-VIH, antiinflamatorio, antitumoral, antiviral, estimulante del sistema inmunológico y producción de linfocitos T y citoquinas	Fazal <i>et al.</i> , 2014
<i>Passiflora pohlii</i> Mast.	Tallo y raíz	MS + 2.85 µM AIA	Flavonoides, alcaloides, polifenoles y saponinas	Ansiolíticos, sedantes, analgésicos, antiinflamatorios, anti-hiperglucémicos y antioxidantes	Simão <i>et al.</i> , 2016
<i>Stevia rebaudiana</i>	Hoja	MS + 2.68 µM ANA	Glucósidos de steviol	Edulcorante	Idrees <i>et al.</i> , 2018
<i>Allamanda cathartica</i> L.	Nodo	1/2 MS + 0.5 µM IBA	Iridoides glicosidados	Antioxidante, y actividades citotóxicas.	Khanam <i>et al.</i> , 2018
<i>Polygonum multiflorum</i>	Hoja y Raíz	MS + 4.92 µM IBA	Flavonoides y fenoles	antioxidantes y purgantes, canas prematuras, pérdida de cabello y calvicie, en la producción de tintes para el cabello y potentes tónicos renales, y como ingrediente en medicamentos antienvjecimiento	Ho <i>et al.</i> , 2019
<i>Talinum paniculatum</i> G.	Brotes	MS + 10 µM IBA	Saponinas	Estrogénico, anti-fertilidad, antibacteriano, anti-fúngico	Faizal & Sari, 2019

Elaboración propia

2.2 Generalidades de *Gomphrena globosa* L.

G. globosa o siempre viva es una planta anual ornamental perteneciente al orden de las Cariofilales (Figura 2) (Rahman, 2014). Generalmente es consumida en forma de té (Ervital ©, 2019; DragonTeaHouse™, 2019), resultado de la cocción de sus brácteas y/o la planta completa, ya que se le atribuye una amplia gama de propiedades medicinales (Neamsuvan *et al.*, 2016) (Tabla 3.) y actividades biológicas, entre las que resaltan la actividad antioxidante, hipotensiva y analgésica (Tabla 4.) (Hamiduzzaman, 2014).

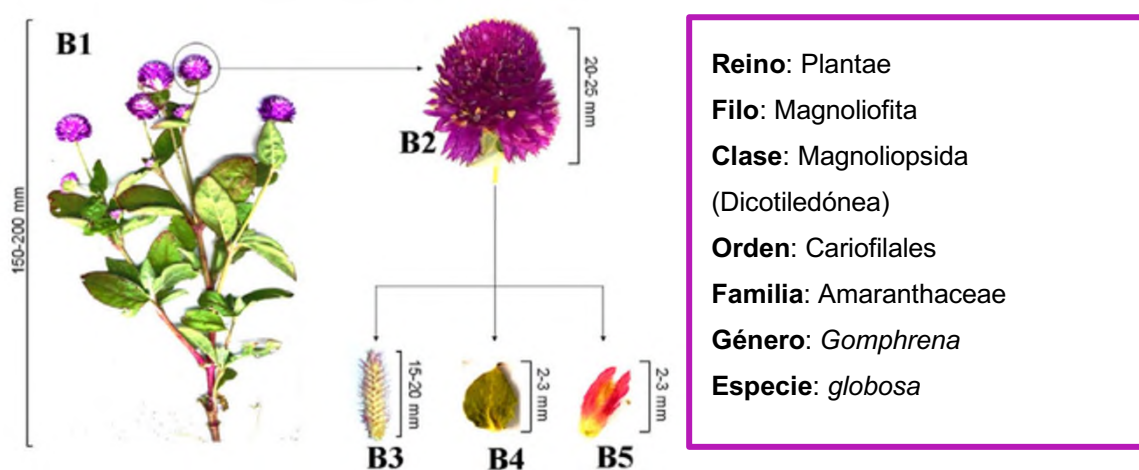


Figura 2. Morfología de *G. globosa*: B1. Planta completa con inflorescencias; B2. Inflorescencia; B3. Cabeza de la inflorescencia sin las brácteas; B4. Amplificación de una hoja de la inflorescencia tipo bráctea B5. Flores y brácteas. Tomado de Roriz *et al.*, (2018); Charles Darwin Foundation (2019).

Tabla 3. Propiedades medicinales de *G. globosa*

Parte de la planta	Enfermedad	Referencia
Flor	Sangrado de nariz	Gupta <i>et al.</i> , 1979.
Hojas, Flor	Diabetes, ictericia, hipertensión, problemas del riñón, cálculos biliares, enfriamiento, problemas urinarios, colesterol alto, diabetes	Lans, 2006.
Flor	Problemas de la próstata	Lans, 2007.
Hojas	Coagulante de sangre	Tarnam <i>et al.</i> , 2014.
Flor	Problemas gastrointestinales, Cáncer colon-rectal	Neamsuvan <i>et al.</i> , 2016.

Elaboración propia

Tabla 4. Actividad Farmacológica en *G. globosa*

Actividad	Parte de la Planta	Extracto	Referencia
Hipotensiva- Cardiovascular	Hojas	Etanol	Arcanjo <i>et al.</i> , 2011.
Antioxidante, Antiinflamatoria	Flor	Acuoso	Silva <i>et al.</i> , 2012.
Antimicrobial, antioxidante, citotóxica	Planta Completa	Hexano, cloroformo	Hamiduzzaman & Zafrul, 2012.
Citotóxica (Cáncer de Piel)	Parte Aérea	Cloroformo	Latha <i>et al.</i> , 2013.
Analgésica	Planta Completa	Metanol	Hamiduzzaman, 2013.
Antidiarreica	Planta Completa	Metanol	Hamiduzzaman, 2014.
Antioxidante	Flor	Metanol	Sharma & Grewal 2014.
Antimicrobial	Flor	<i>n</i> -butanol	Kusmiati, Priadi, & Rahayu 2017.

Elaboración propia

Dichas actividades biológicas se relacionan directamente con los metabolitos sintetizados en *G. globosa*, siendo mayoritarios los compuestos fenólicos, flavonoides y betalaínas. Silva *et al.* (2012) aislaron 24 compuestos fenólicos y 8 betacianinas, siendo el kaempferol 6-*O*-hexósido, el flavonoide mayoritario, mientras que la isogomprenina III represento el 47% de las betacianinas extraídas, grupo exclusivo que se produce específicamente en el género *Gomphrena*. Roriz *et al.* (2014) reportaron una mayor concentración de flavonoides y de betacianinas solo en las muestras comerciales de *G. globosa* a diferencia de *Pterospartum tridentatum* y *Cymbopogon citratus* suministradas por la empresa Ervital®.

2.2.1 Fenoles, flavonoides y betalaínas

2.2.1.1 Betalaínas

Las betalaínas son pigmentos que se producen solamente en el orden de las Cariofilales, sustituyendo a las antocianinas, otra clase de pigmentos que se encuentran en la mayoría de las plantas (Polturak & Aharoni, 2018), contienen nitrógeno en su estructura y se sintetizan a través de la ruta del ácido shikímico. La Figura 4., representa un esquema general de biosíntesis de betalaínas con las enzimas y metabolitos claves.

Las betalaínas provienen de la biosíntesis de tirosina para formar 3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina (*L*-DOPA) por medio de enzimas con actividad tirosina hidroxilasa (TIR) (Figura 4 [1]), y algunas relacionadas al citocromo P450 (CYP76AD1, CYP76AD5 o CYP76AD6), en otras especies se ha reportado a la enzima polifenol oxidasa (PPO) como catalizador de este paso (Brockington *et al.*, 2015; Gandía- Herrero *et al.*, 2005). Posteriormente por acción de DOPA 4,5-dioxigenasa se forma 4,5-seco-DOPA (Figura 4 [2]), al romper el anillo de *L*-DOPA que es condensado de manera espontánea para formar el ácido betalámico (Figura 4 [3]), precursora de todas las betalaínas, que a su vez con las enzimas correspondientes se transforma en betacianinas (roja-violeta) o betaxantinas (naranja-amarillo) (Figura 3) (Gandía-Herrero, 2013).

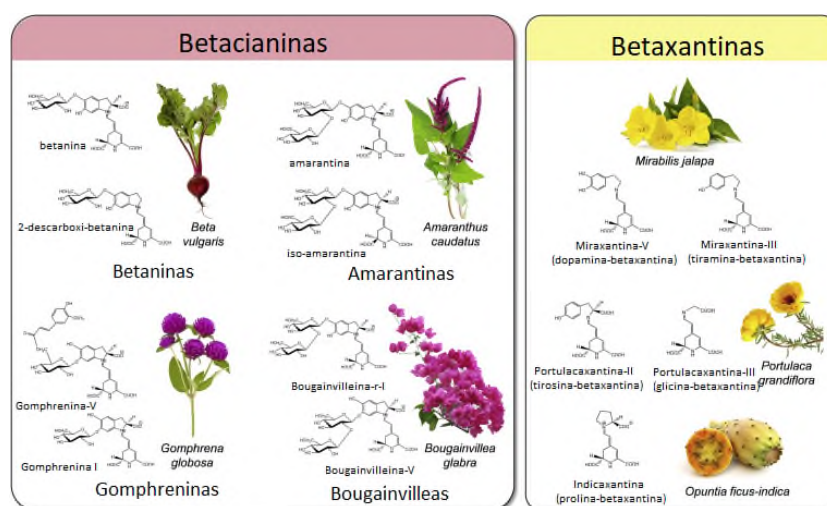


Figura 3. Estructuras representativas de betalaínas. Tomado de Polturak & Aharoni (2018)

En la formación de betacianinas se proponen al menos 3 rutas de biosíntesis. La ruta A basada en la formación de *ciclo*-DOPA a partir de DOPA (Figura 4 [5 y 7]) (DOPA oxidasa o PPO) para después conjugarse al ácido betalámico para formar betacianinas, la ruta B donde azúcares se unen a la molécula *ciclo*-DOPA por acción de glucosil transferasas (Figura 4 [21]) seguido de una reacción espontánea con el ácido betalámico para formar betanina (Figura 4 [22]) y la ruta C, en la cual por medio del citocromo P450 se forma *ciclo*-DOPA, que posteriormente se conjuga con el ácido betalámico para formar betacianinas como la amarantina y la gomphrenina (Figura 3.)

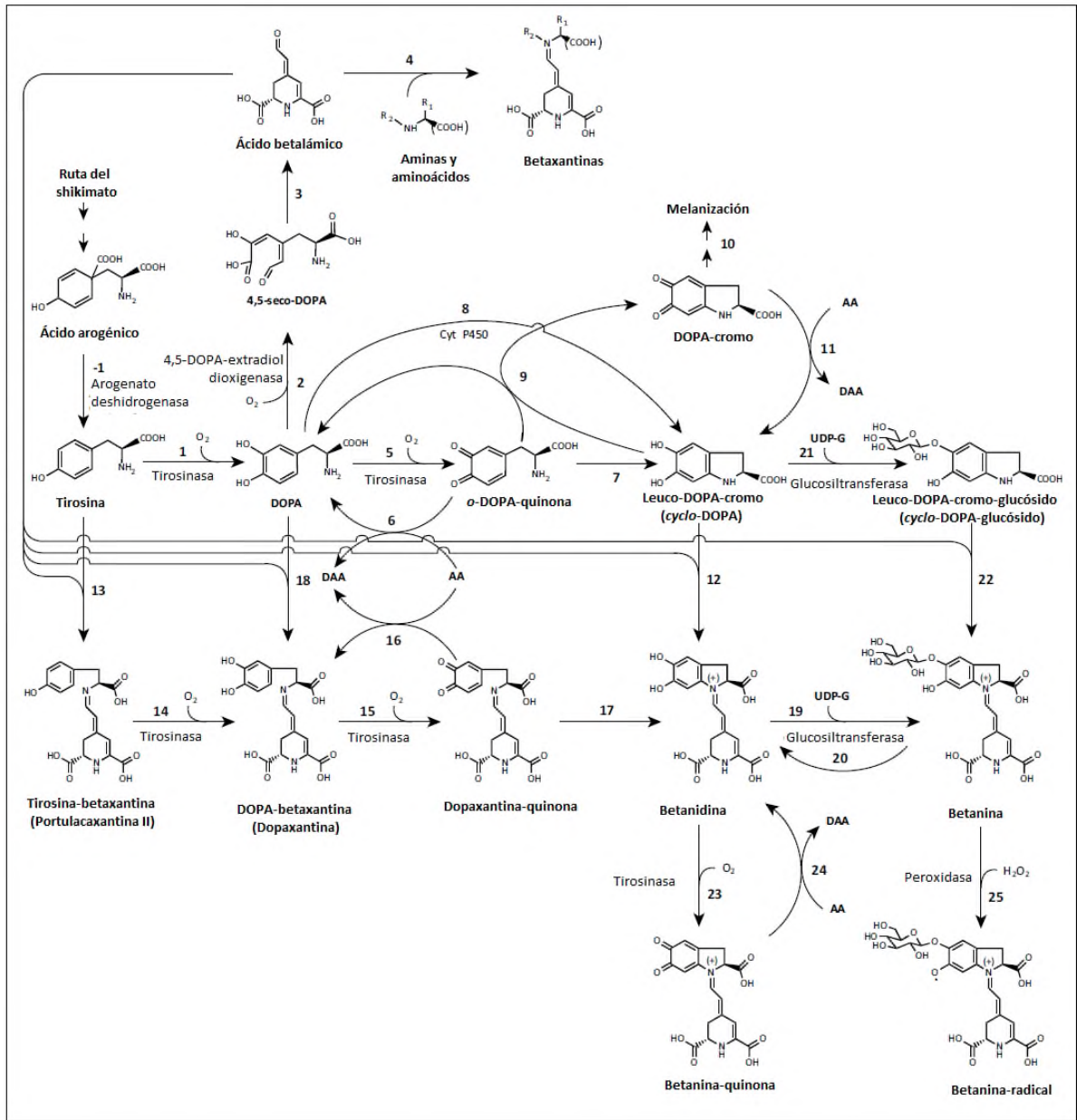


Figura 4. Ruta de biosíntesis de betalainas. AA, ácido ascórbico, DAA, ácido dehidroascórbico. Los números encima de las flechas indican la reacción. Tomado de Gandía-Herrero & García-Carmona (2013)

(Tanaka *et al.*, 2008). En cuanto a las betaxantinas su síntesis se da de forma espontánea al conjugarse el inmonio de ácido betalámico con aminas y aminoácidos (Figura 4 [4]) (Gandía-Herrero, 2013).

En cuanto a su aplicaciones, la expresión heteróloga de betalainas posibilita la introducción de nuevas variedades ornamentales, el aumento de propiedades biológicas, como la actividad

antioxidante y la resistencia frente a patógenos, pudiendo ser utilizada en el futuro para proteger y mejorar cultivos de importancia económica (Polturak *et al.*, 2017).

A su vez, por la amplia estabilidad a rangos de pH, las betalaínas están aprobadas para su consumo por la Food & Drugs Administration (FDA), desde 1967 y se han implementado en alimentos como helados, sprays y jugos (Roriz *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2005; Wruss *et al.*, 2015), además de ser moléculas bioactivas con beneficio a la salud humana ya que poseen alta capacidad antioxidante, la cual ha sido ligada con la prevención de envejecimiento prematuro y enfermedades degenerativas (Azeredo, 2009). En la Tabla 5 se enlistan las propiedades atribuidas a las betalaínas.

Tabla 5. Actividad biológica de betalaínas

Betalaína	Fuente vegetal	Actividad	Modelo de estudio	Referencia
Betalaína	<i>Beta vulgaris</i>	Antioxidante y Peroxidación lipídica	Metamioglobina (Tipo 1) del músculo esquelético equino, lipoxigenasa-I de soja, citocromo c (del corazón del caballo)	Kanner <i>et al.</i> , 2001
Betacianinas y betaxantinas	37 especies Amaranthaceas	Antioxidante	DDPH	Cai <i>et al.</i> , 2003
Betacianinas	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Antioxidante y Anti-proliferativa	ABTS,DDPH; Línea celular de meloma B16F10	Wu <i>et al.</i> , 2006
Betanina	<i>O. ficus indica</i>	Anti-cancerígeno	Línea de leucemia humana K562	Sreekanth <i>et al.</i> , 2007
Gomphrenina I	<i>Basella alba</i>	Anti-inflamatoria	Macrófago murino (RAW 264.7)	Lin <i>et al.</i> , 2010
Betanina	<i>Beta vulgaris</i>	Anti-cancerígeno	Ratón	Zhang <i>et al.</i> , 2013
Betacianinas y betaxantinas	<i>Beta vulgaris</i> & <i>Lamphranthus productos</i>	Antioxidante, lipoxigenasa y ciclooxigenasa	ABTS, lipooxigenasa-I de soja	Vidal <i>et al.</i> , 2014

Elaboración propia

2.2.1.3 Fenoles

Los compuestos fenólicos son una de las familias que conforman el metabolismo secundario de las plantas, además de los terpenos y alcaloides (Bourgaud *et al.*, 2011). Se caracterizan por tener anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos (Boudet, 2007), que van desde monofenoles como el ácido cumárico, precursor de polifenoles como el kaempferol y quercetina, compuestos aislados en *G. globosa* (Silva *et al.*, 2012).

Biológicamente los fenoles brindan soporte estructural a la pared celular, atraen a polinizadores que distribuyen sus semillas (Bolser *et al.*, 2013) y se relacionan a las respuestas de defensa frente al ataque de patógenos, produciendo compuestos que interactúan antagónicamente (Kubalt, 2016).

Los fenoles se clasifican en 3 grupos: Los C_6 que contienen un anillo de carbono, los C_6-C_n que además del anillo de carbono, contienen uno o más carbonos en su estructura, y los $C_6-C_n-C_6$ un esqueleto completo que contiene dos anillos de benceno ligados a la cadena de carbono (Figura 5) (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019).

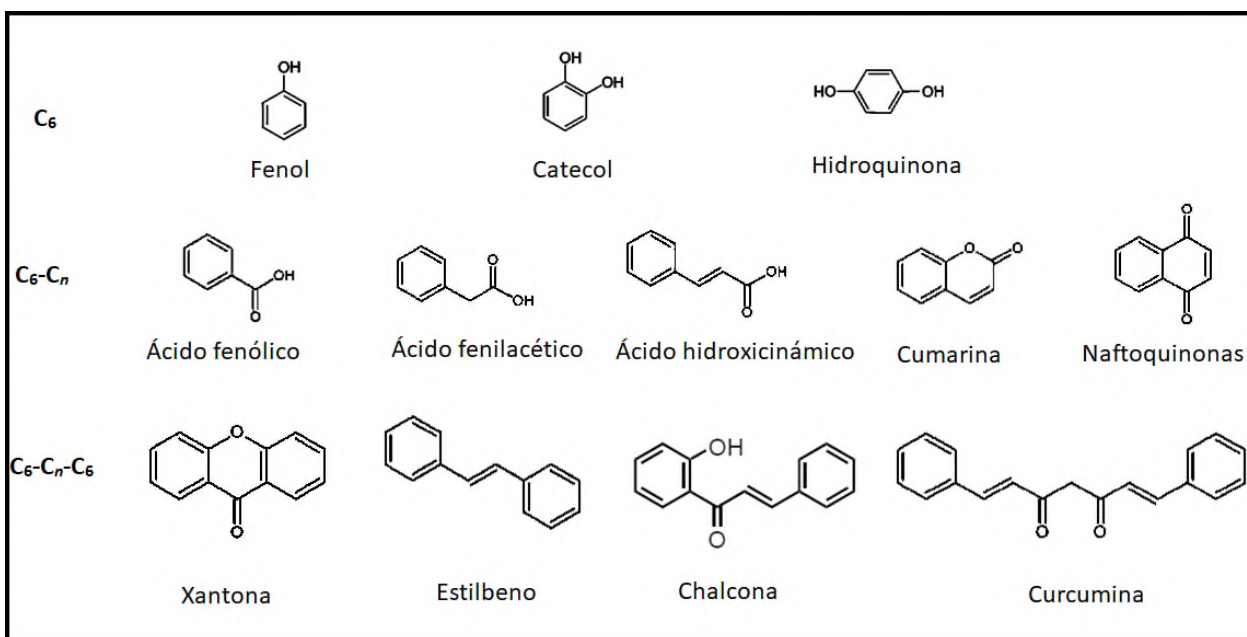


Figura 5. Clasificación y ejemplos de compuestos fenólicos. Tomado y modificado de Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019.

Los compuestos fenólicos se sintetizan por dos vías (Figura 6), a través de la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato (PPP). En la PPP, la glucosa-6-fosfato se transforma en ribulosa-5-fosfato por la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH). A su vez la ribulosa-5-fosfato se convierte a ribosa-5-fosfato, que es oxidada a eritrosa-4-fosfato, junto el fosfoenolpiruvato proveniente de la glucólisis reaccionan para generar compuestos fenólicos (Lin *et al.*, 2016). Posteriormente a partir de la ruta del shikimato por medio de la fenilalanina y tirosina, enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), ácido cinámico 4- hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato CoA-ligasa (C4L) (Tohge *et al.*, 2013; Goleniowski *et al.*, 2013) se producen fenilpropanoides, precursores de las ligninas y los flavonoides.

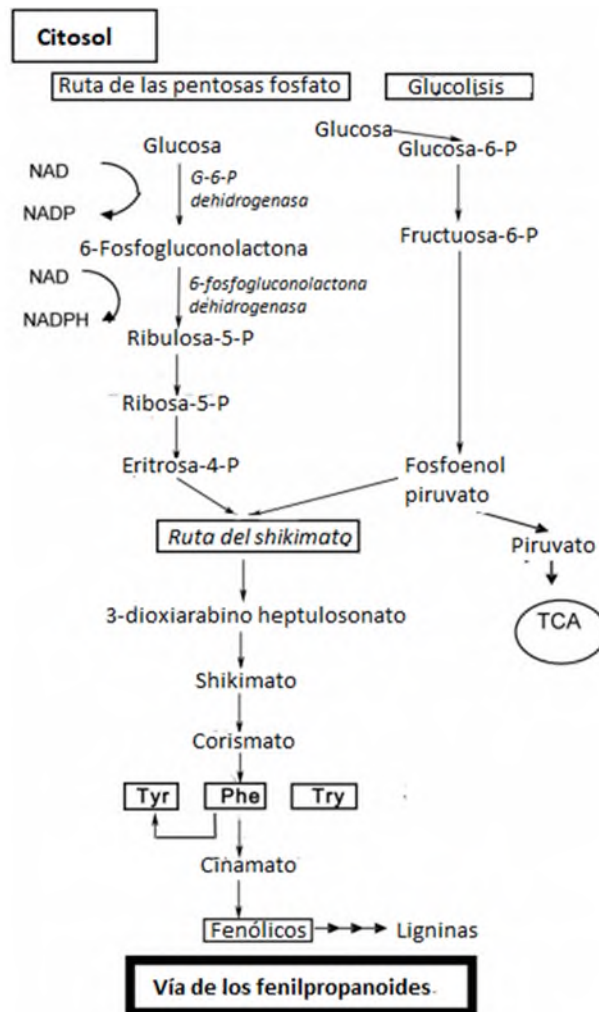


Figura 6. Biosíntesis de compuestos fenólicos. Tomado de Lin *et al.*, 2016

2.2.1.2 Flavonoides

Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides son uno de los grupos mejor estudiados y mayormente distribuidas en todas las plantas. Se caracterizan por tener una estructura química de 3 anillos ($C_6-C_3-C_6$), y se clasifican en 6 grandes subgrupos (Figura 7): chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas, taninos condensados y auronas (Falcone *et al.*, 2012).

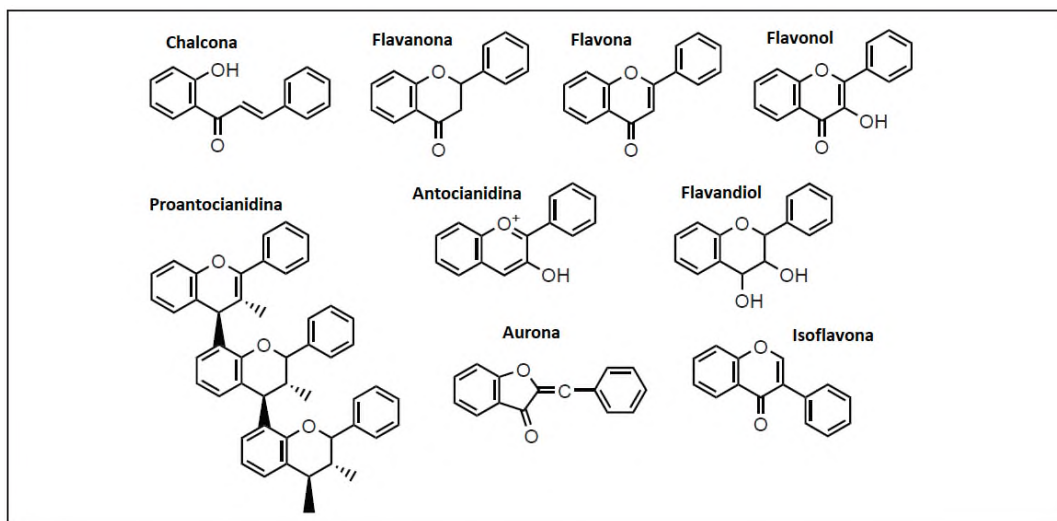


Figura 7. Estructuras de los principales subgrupos de flavonoides. Tomado de Falcone *et al.*, 2012.

Biologicamente los flavonoides ayudan a las plantas a vivir en suelos ricos en metales como el aluminio, también les ofrecen protección frente a rayos UV y patógenos, están implicados en los procesos de nodulación, transporte de auxinas y fertilidad (Winkel-Shirley, 2002; Agati *et al.*, 2012), además de ser fuente de pigmentos naturales como las antocianinas.

Cabe resaltar que los flavonoides al poseer actividad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antidiabética, hepaprotectora y antiulcera, se consideran compuestos nutracéticos, ya que agregados en forma de aditivos a los alimentos, previenen y benefician la salud humana (Lin & Weng, 2006; Tapas *et al.*, 2008).

Los flavonoides se sintetizan por medio de los fenilpropanoides, y se da por la conversión de la fenilalanina a ácido *trans*-cinámico por medio de la fenilalanina amonio liasa (PAL), que a su vez

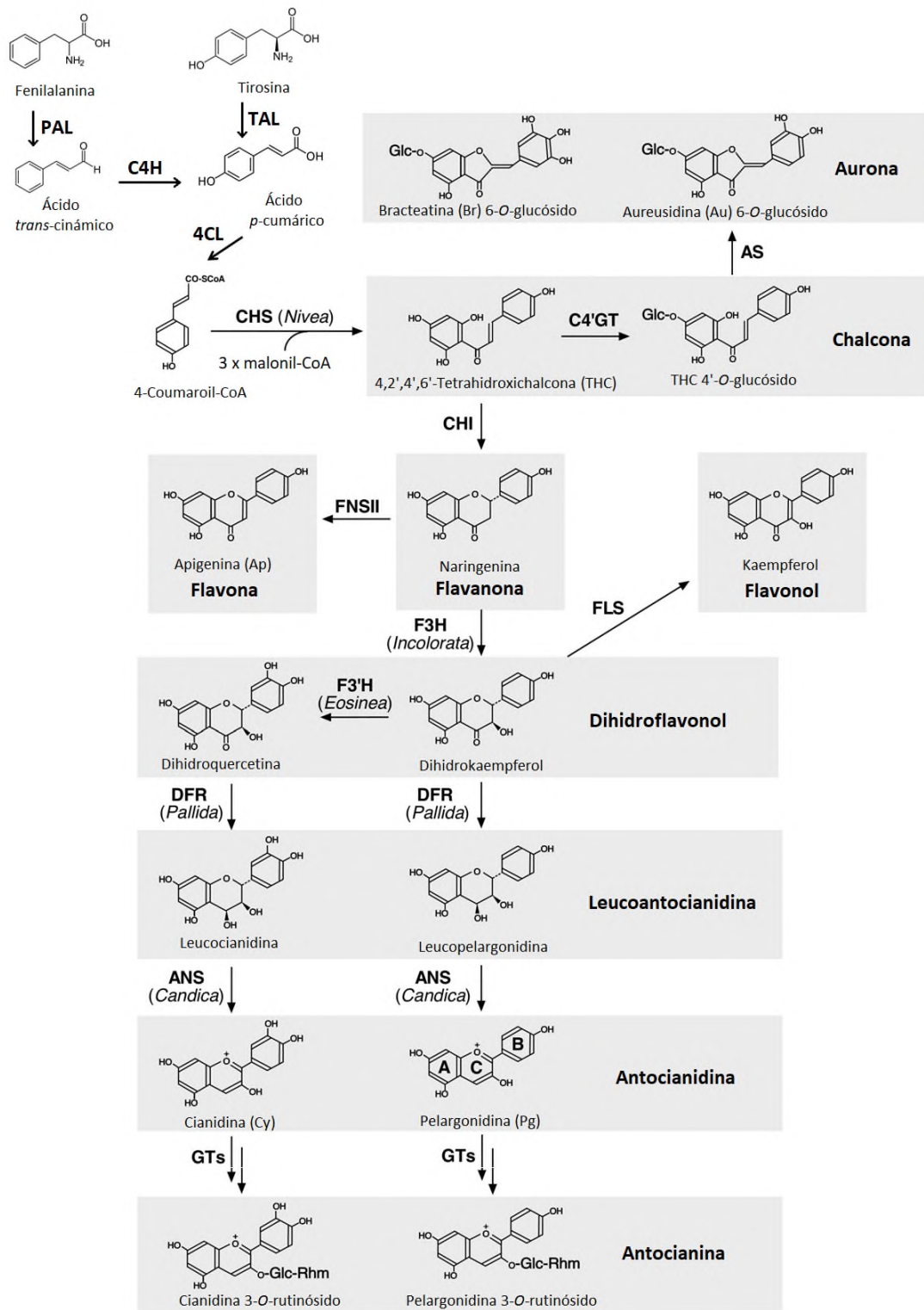


Figura 8. Ruta de biosíntesis de flavonoides. PAL, fenilalanina amonio liasa, TAL, tirosina amonio liasa, C4H, cinamato-4-hidroxilasa, 4CL, 4-cumarato CoA-ligasa, CHS, chalcona sintasa; C4'GT, chalcona 4'-glucosiltransferasa; AS, aureusidina sintasa; CHI, chalcona isomerasa; FNSII, flavona sintasa II; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; GTs, glucosiltransferasas; FLS, flavonol sintasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa. Modificado de Drago, 2007; Petrusa *et al.*, 2013 Fujino *et al.*, 2018.

-se transforma en ácido *p*-cumárico por la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), no obstante el ácido *p*-cumárico puede ser directamente obtenido a partir de la L-tirosina por medio de la enzima tirosina amonio liasa (TAL). Posteriormente el ácido *p*-cumárico por la 4-cumarato CoA-ligasa (4CL) es transformado en 4-cumaroil-CoA, producto final de la ruta de los fenilpropanoides e inicial de la ruta de los flavonoides (Figura 8) (Drago, 2007; Petrusa *et al.*, 2013).

A partir de 3 moléculas de coumaroil-CoA y una de 4-cumaroil-CoA por medio de la enzima chalcona sintasa (CHS) se forma una chalcona (4,2',4',6-tetrahidroxichalcona, THC) que junto con la chalcona isomerasa (CHI) producen naringenina (Figura 8), que a su vez puede ser transformada a apigenina por acción de la flavona sintasa II (FNSII) o por la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) transformarse a dihidrokaempferol, que puede ser sustrato de enzimas como la flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) o flavonol sintasa (FLS), para dar respectivamente dihidroquercetina o kaempferol (Figura 8). Estos dos últimos compuestos por acción de la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) son transformados a compuestos inestables de color (leucocianidina y leucopelargonidina), que se oxidan por antocianidina sintasas para dar cianidina y pelargonidina, pigmentos estables, que a su vez por glicosiltransferasas se transforman en los pigmentos mayormente distribuidos en plantas, las antocianinas (Drago, 2007; Petrusa *et al.*, 2013). Sin embargo en las especies pertenecientes al orden de las Cariofilales como *G. globosa*, las betalaínas sustituyen a las antocianinas, por lo que es imposible encontrar ambos metabolitos en la misma especie (Stafford, 1994).

2.2.2 PAL, TAL y Tirosinasa

Particularmente las enzimas PAL, TAL y tirosinasa, juegan un rol importante en el metabolismo secundario de las plantas (Mehta & Bhavnarayana, 1981; Mayer, 2006) y en la especie *G. globosa* estas enzimas son clave para la producción de betalaínas, flavonoides y fenoles como se muestra en la Figura 9.

La enzima fenilalanina amonio liasa, PAL (E.C.4.3.1.24) cataliza una reacción donde la fenilalanina se desamina para formar ion amonio y ácido *trans*- cinámico (Koukol *et al.*, 1961).

Esta enzima es de suma importancia ya que a partir de ella se sintetizan compuestos del metabolismo secundario, como ligninas, metabolitos de defensa frente a patógenos y de fotoprotección (Cass *et al.*, 2015).

PAL se ha detectado en varias especies vegetales y en algunos casos se ha encontrado que la tirosina actúa como sustrato de la enzima, siendo en la mayoría de los casos menos activa (Hyun *et al.*, 2011).

Los niveles de actividad PAL fluctúan de acuerdo a la edad del cultivo, tipo de tejido, órgano, etapa de desarrollo y puede verse afectada bajo estímulos como: luz, daño mecánico, infección, radiación UV, reguladores de crecimiento, fuente de carbono, donde en muchos casos se ha observado el incremento de compuestos fenólicos como flavonoides, fenilpropanoides y ligninas (Camm *et al.*, 1973)

Por su parte TAL (E.C.4.3.1.23), muchas veces considerada una enzima bifuncional (PTAL), ya que la fenilalanina puede actuar como sustrato, cataliza la formación directa de ácido *p*-cumárico a partir de tirosina, a diferencia de PAL que requiere de la enzima CH4 para adicionar el grupo hidroxilo a su estructura. Este paso es fundamental ya que como se mencionó anteriormente, a partir de estas enzimas se forman los flavonoides.

Por último la tirosinasa, perteneciente al grupo de las polifenol oxidasas (PPO's) (E.C.1.14.18.1), es una enzima que contiene tanto actividad monofenol monooxigenasa como actividad difenol oxidasa (Van Gelder *et al.*, 1997); además de estar involucrada en la síntesis de melaninas y en la oxidación de frutos, también es la enzima clave para la formación de betalainas en plantas del orden Cariofilales (Gandía- Herrero *et al.*, 2005; Gandía- Herrero *et al.*, 2007; Gandía- Herrero *et al.*, 2013).

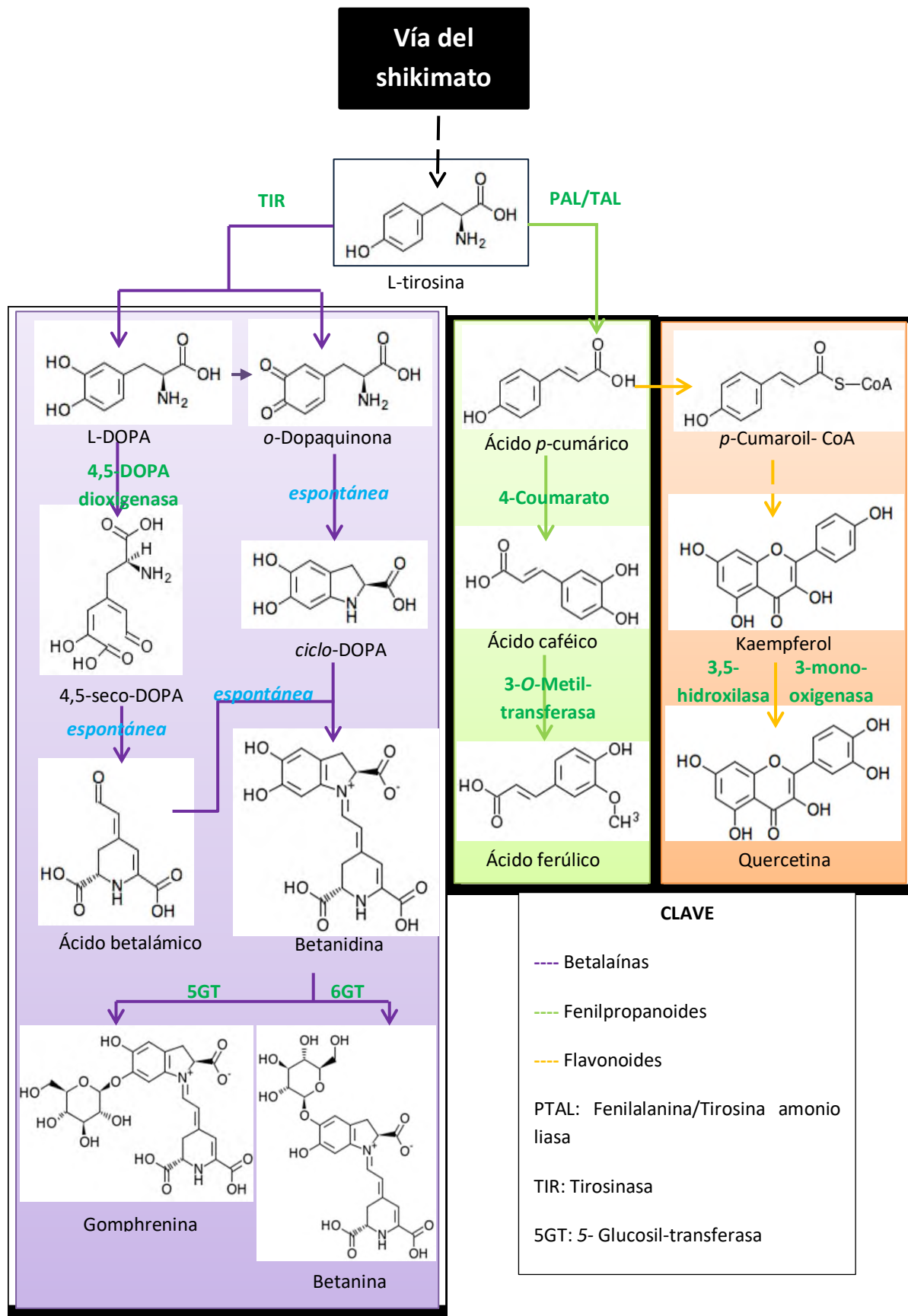


Figura 9. Ruta metabólica propuesta para *G. globosa*. Tomado del Kyoto Encyclopedia of Genes & Genomes (KEGG) pathway database, (2019); Silva *et al.*, 2017.

2.2.3 Estudios de cultivo *in vitro* de *Gomphrena globosa*

En el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, se han establecido cultivos de callos, raíces transformadas, plántulas y raíces adventicias para la producción de compuestos fenólicos y betalaínas a partir de la especie *Gomphrena globosa*, y se ha encontrado que la elicitación con metil jasmonato (MejA) a 25 μM favorece la acumulación de compuestos fenólicos después de las 6 y 18 h de elicitación, además se propusieron dos juegos de oligonucleótidos para dos enzimas que participan en la formación de compuestos fenólicos: la cumarato 3- hidroxilasa (C3H) y hidroxicinamoil CoA: quinato hidroxicinamoil transferasa (HQT), enzimas que amplificaron de manera específica en un *screening* inicial en plántulas (Urdiana, 2019).

A su vez Cohetero (2019) reportó la transformación genética de *G. globosa* por 2 cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (K599 y AR4), obteniendo así un cultivo de raíces pilosas o “*hairy roots*”, resultado de la infección de plántulas *in vitro*. La mayor producción de compuestos fenólicos y flavonoides se reportó en la cepa K599, comparado con la plántula *in vitro*, sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios de caracterización que nos permitan conocer la línea de cultivo.

Por su parte Méndez (2017) estableció un sistema de células en suspensión para el escalamiento en biorreactor, y observó que las condiciones no favorecieron el crecimiento del cultivo, por lo cual se propuso el establecimiento de raíces adventicias, que pueden ser llevadas a biorreactor. De esta forma, Martínez (2019) estableció el cultivo de raíces en medio líquido (B5), libre de reguladores y posteriormente evaluó el efecto de los medios MS y B5, obteniendo un mayor crecimiento y pigmentación en el medio B5, además adicionó la auxina ácido indol butírico (IBA) en concentraciones de 9.9, 24.6 y 49.3 μM , y encontró la mayor concentración de biomasa y compuestos fenólicos con IBA 9.9 μM , mientras que en el tratamiento control se alcanzó la mayor concentración de flavonoides, la mayor concentración de betalaínas se obtuvieron al adicionar 49.3 μM de IBA. Por último en este mismo experimento se evaluaron las concentraciones de sacarosa en la producción de metabolitos, usando los tratamientos IBA 9.9 μM e IBA 49.3 μM como referencia, y se encontró la mayor concentración de biomasa con 40

g/L de sacarosa, mientras que para los compuestos fenólicos se observó la mayor acumulación con 50 g/L de sacarosa, y para flavonoides y betalaínas se vio favorecida su concentración en el control, con 30 g/L de sacarosa.

2.3 Análisis de Expresión Metabólica en Sistemas Vegetales

Algunas técnicas encaminadas a la acumulación de metabolitos secundarios son: la elicitación, la permeabilización celular y la alimentación de precursores o “precursor feeding” (Guillon *et al.*, 2006).

2.3.1 Precursor feeding y efecto de la tirosina en sistemas vegetales

La alimentación de precursores es una herramienta basada en la adición de un precursor exógeno en el medio de cultivo que permite el mejoramiento en la acumulación de algún compuesto donde la productividad esté limitada (Moreno *et al.*, 1993; El-Sayed & Verpoorte, 2002; Silvestrini *et al.*, 2002). En algunos casos, se han añadido aminoácidos o compuestos específicos que se encuentren dentro de la ruta metabólica de interés.

Masoumian *et al.* (2011) agregaron de forma individual a callos de *Hydrocotyle bonariensis*, los aminoácidos prolina, fenilalanina, glutamina y el flavonoide naringenina, con el fin de incrementar la producción total de flavonoides, encontraron que con 18 μ M de fenilalanina, hubo un aumento del 23% en la cuantificación de flavonoides comparado con el control. En suspensiones celulares de *Cataranthus roseus* se alimentaron precursores de la ruta de los alcaloides indólicos como el triptófano, triptamina, geraniol, 10-hydroxigeraniol y loganina para estudiar la acumulación de alcaloides, y se observó que la adición de triptófano ayudaba a incrementar la acumulación de metabolitos de la ruta mencionada, mientras que no se lograron ver efectos significativos con los demás precursores (Morgan & Shanks, 2000). Por su parte Jaisi & Panichayupakaranant (2017), añadieron el precursor L- alanina al cultivo de raíces de *Plumbago indica*, lo que permitió un aumento en la producción del flavonoide plumbagina

(14.4 mg/g PS) después de las 36 h de alimentación del aminoácido en el medio comparado con el control que no fue tratado (1.6 mg/g PS).

La L- tirosina es uno de los tres aminoácidos aromáticos que provienen de la ruta del shikimato y está presente en las proteínas de todos los organismos, sin embargo, la tirosina solo se produce en bacterias, hongos y plantas, y en estas últimas es utilizado como precursor de metabolitos como ligninas, betalainas, ácido rosmárico y morfina (Schenck & Maeda, 2018).

Sobre la adición del precursor tirosina en la producción de betalainas fenoles y flavonoides se encontró que la adición de 75 μ M mejoró la producción de betalainas en 22.8% y se observó un incremento 5 veces mayor en la expresión del gen betanidina 5-O-glucosiltransferasa (5GT), enzima implicada en la síntesis de betacianina (Ribeiro *et al.*, 2017). De la misma forma Fadzliana *et al.* (2017), lograron aumentar (1.7 veces) la acumulación de betacianinas en callos de *Hylocereus polyrhizus* tratados con 110 μ M de tirosina más 2 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 4 mg/L de thidiazurón (TDZ). Mientras que para la producción de compuestos fenólicos y flavonoides, Ouyang *et al.* (2005) concluyeron que concentraciones menores a 100 μ M de tirosina favorecieron el crecimiento y la síntesis de glucósidos feniletanoides (PeG) en *Cistanche desertícola*, mientras que la adición de 100 μ M de tirosina a brotes de *Chenopodium quinoa* no tuvo un efecto significativo sobre la producción de fenilpropanoides, ya que los resultados se asemejaron al control. Sin embargo para la especie *G. globosa*, no se encontraron hasta el momento estudios directos sobre la producción de metabolitos secundarios en y el uso de precursores.

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas son una fuente indispensable de productos como, fármacos, alimentos, colorantes, aditivos, etc., que mejoran la calidad de vida. Dichos metabolitos dependen de las condiciones de la fuente de origen como la ubicación geográfica del cultivo, características del cultivo, tiempo de cosecha y factores abióticos, resultando en la inestabilidad de los productos finales para las industrias que se dedican a la comercialización de ellos. El cultivo *in vitro* de plantas es una herramienta que responde a esta problemática al ofrecer la fácil manipulación de los cultivos, además de posibilitar su escalamiento a nivel industrial, muestra de ello, empresas como Nitto Denko Corporation y Croda Personal Care se dedican actualmente a la extracción de compuestos bioactivos por medio del cultivo de células y tejidos *in vitro*. Particularmente *Gomphrena globosa*, es una especie que se cultiva en el Laboratorio de Cultivo de Células y Vegetales de la Universidad del Papaloapan en forma de raíces *in vitro*, ya que por medio de estudios previos se han establecido las condiciones para producir principalmente fenoles, flavonoides y betalaínas, compuestos que presentan aplicaciones en la industria de los alimentos, además de conferir efectos benéficos para la salud humana como actividad analgésica, antioxidante, citotóxica, antioxidante y antiinflamatoria, no obstante hacen falta estudios que permitan aumentar la productividad del cultivo

La adición de precursores en los cultivos *in vitro* es una de las estrategias que ha permitido aumentar la producción de metabolitos secundarios y la actividad de enzimas claves en diferentes especies vegetales. Por lo cual resulta importante comprender el efecto de la L-tirosina, aminoácido clave de la producción de fenoles, flavonoides y betalaínas así como las enzimas PAL, TAL y TIR, involucradas en la biosíntesis de dichos metabolitos.

4. HIPOTESIS

La adición del precursor L-tirosina en forma exógena a raíces cultivadas *in vitro* de *G. globosa* incrementará la producción de betalainas, flavonoides y fenoles.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Principal

Estudiar el efecto de la L-tirosina en la producción de betalainas, flavonoides y fenoles en raíces adventicias *in vitro* de *G. globosa*.

5.2 Objetivos Secundarios

- Caracterizar la cinética de crecimiento raíces *in vitro* de *G. globosa*.
- Evaluar el efecto de la concentración de la L- tirosina sobre el crecimiento y producción de fenoles, flavonoides y betalainas.
- Evaluar el efecto de la concentración de la L- tirosina sobre las actividades enzimáticas PAL, TAL y TIR.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material vegetal

El cultivo de raíces adventicias de *G. globosa*, fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, y fueron subcultivadas según la metodología establecida por Martínez (2018). Se inocularon 1 g de raíces de 21 días de edad en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contuvieron 25 mL de medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y 30 g/L de sacarosa, adicionado con 49.3 μM de IBA. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 110 rpm en cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, la resiembra del cultivo se realizó cada 21 días en el medio descrito anteriormente.

6.2 Alimentación de precursor L- tirosina

Se adicionó L-tirosina (Sigma Aldrich) en el medio de cultivo a concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 μM desde el día 0 de cultivo. Para ello, se preparó un stock de 10 mM de Tyr en agua destilada, debido a la baja solubilidad del compuesto, 0.48 g L⁻¹ a 25 °C, se agregó NaOH 1 N (Ribeiro *et al.*, 2016).

6.3 Crecimiento celular

Para caracterizar el crecimiento de los cultivos, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial, a partir de los logaritmos naturales de los valores de peso contra el tiempo de cultivo, donde la pendiente de la región lineal correspondió a la velocidad de crecimiento (Qu *et al.*, 2011). Posteriormente se calculó el tiempo de duplicación (t_d) teniendo como base la siguiente ecuación (Doran, 1995):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1)$$

Además se determinó el consumo total de sacarosa por la metodología de Dubois (1956). Para ello, a un 1 mL de muestra se le adicionó 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₃)

concentrado, se dejó incubado por 30 min en baño de hielo y posteriormente se leyeron las absorbancias a 490 nm. Para elaborar la curva de calibración se utilizó como referencia sacarosa en concentraciones de 0 - 200 mg/L (Anexo 1).

6.3.1 Peso fresco (PF) y peso seco (PS)

Para la cuantificación del peso fresco y seco, la biomasa fue separada del medio del cultivo mediante filtración al vacío sobre papel Whatman Nº 2 previamente pre-pesado (peso constante), tomado así el peso fresco en una balanza analítica cada tercer día del cultivo. Para la determinación del peso seco las muestras fueron liofilizadas hasta sequedad (Labconco Freezone 4.5) y finalmente pesadas en una balanza analítica.

6.3.2 Rendimientos

Se calculó el rendimiento sustrato/biomasa con base al consumo de sacarosa y la biomasa en peso seco ($Y_{X/S}$):

$$Y\left(\frac{X}{S}\right) = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{biomasa_{final} - biomasa_{inicial}}{sustrato_{inicial} - sustrato_{final}} \quad (2)$$

Al igual que el rendimiento producto/biomasa ($Y_{P/X}$), siendo el producto (P) igual a la concentración máxima de betalaínas, flavonoides o compuestos fenólicos en gramos de peso seco.

$$Y\left(\frac{P}{X}\right) = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{producto_{máximo} - producto_{inicial}}{biomasa_{final} - biomasa_{inicial}} \quad (3)$$

6.4 Extracción y actividad TIR, TAL y PAL

Posteriora la extracción enzimática como se detallan a continuación, se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976) usando 100 µL de extracto y 1000 µL de reactivo de Bradford por 10 min, seguido de la lectura en espectrofotómetro

UV/Vis a 590 nm. La curva de calibración se elaboró usando albumina sérica bovina (BSA) como estándar (Anexo 2).

6.4.1 Actividad tirosinasa (TIR)

La extracción y ensayo de la tirosinasa fueron realizadas con base a las metodologías de Steiner (1999) y Duckworth (1970) con ligeras modificaciones. 250 mg de material fresco homogenizado en nitrógeno líquido, se resuspendió en 50 mM de buffer fosfato, pH 6.5, que contenía 50 mM NaCl, 20 mM ascorbato de sodio y 0.1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), posteriormente la muestra fue centrifugada a 10,000 rpm a 4 °C por 30 min. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su análisis.

La actividad tirosinasa se determinó en un mezcla de reacción (3 mL) que contenía buffer fosfato de potasio a 50 mM, pH 6.5, agua desionizada y 1 mM de tirosina. La formación de L-DOPAquinona se monitoreó a 280nm después de 2.30 min.

Los cálculos correspondientes a la actividad volumétrica de la tirosinasa se realizaron de la siguiente manera.

$$\text{Unidades/mL de enzima} = \frac{(\Delta A_{280\text{nm}}/\text{min de prueba} - (\Delta A_{280\text{nm}}/\text{min de Blanco}))}{(0.001)(0.1)} \quad (4)$$

Donde 0.001= el cambio en $\Delta A_{280\text{nm}}$ /minuto por unidad de tirosinasa a pH 6.5 a 25 °C en 3 mL de reacción y 0.1= Volumen (mL) de enzima usada.

La actividad específica se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades de TIR /mg de proteína} = \frac{\text{unidades/mL de enzima}}{\text{mg de proteína/mL de enzima}} \quad (5)$$

6.4.2 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

La extracción enzimática de PAL se llevó a cabo por la metodología de Yan (2006). A partir de 200 mg de raíces frescas homogenizado en nitrógeno líquido con 50 mM buffer Tris-HCl, pH 8.0

que incluía 4 mM ditioneitol (DTT), 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 1% de PVPP, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm por 30 min, se recuperó el sobrenadante para su análisis.

La actividad PAL se cuantificó registrando la formación de *trans*-cinamato a 270 nm. Para ello, se prepararon dos soluciones, la solución (A): solución amortiguadora Tris-HCl a 150 mM pH 8.5 y la solución (B): solución A con 3 mM de fenilalanina (Sigma P-2126). Se mezclaron 2 mL de la solución B con 900 µL de agua desionizada y se agregaron 100 µL de extracto enzimático dejándolo incubar por 3 min a 30 °C. Como blanco se utilizó 100 µL de buffer Tris- HCl pH 8.5 (Hodgins, 1970; Havir, 1971).

Los cálculos correspondientes a la actividad volumétrica de PAL se realizaron de la siguiente manera.

$$\text{Unidades/mL de enzima} = \frac{(\Delta A_{270\text{nm}}/\text{min de prueba} - (\Delta A_{270\text{nm}}/\text{min del blanco}) (3)}{(119.73)(0.1)} \quad (6)$$

Donde 3.0= Volumen total de reacción, 19.73= Coeficiente de extinción milimolar de *trans*-cinamato a 270 nm y 0.1= Volumen (mL) de enzima usada.

La actividad específica se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades de PAL/mg de proteína} = \frac{\text{unidades/mL de enzima}}{\text{mg de proteína/mL de enzima}} \quad (7)$$

6.4.3 Actividad tirosina amonio liasa (TAL)

Para la extracción de la enzima TAL se utilizó la misma metodología de la enzima de PAL ya mencionada. La actividad TAL se cuantificó siguiendo la formación de ácido *p*-cumárico a 286 nm. La mezcla de reacción consistió de 50 µL buffer Tris-HCl a 150 mM, pH 8.5, adicionado con 2

mL de tirosina 3 mM, 950 μ L de agua desionizada y 50 μ L de extracto (100 μ L de buffer Tris- HCl pH 8.5 para el blanco), fue incubado por 1 min a 30°C,

Los cálculos correspondientes a la actividad volumétrica TAL se realizaron de la siguiente manera.

$$\text{Unidades/mL de enzima} = \frac{(\Delta A_{286\text{nm}}/\text{min de prueba} - (\Delta A_{286\text{nm}}/\text{min del blanco}) (3)}{(18.5)(0.05)} \quad (8)$$

Donde 3.0= Volumen total del ensayo, 18.5= Coeficiente de extinción milimolar del ácido *p*-cumárico a 286 nm y 0.05= Volumen (mL) de enzima usada.

La actividad específica se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades de TAL/mg de proteína} = \frac{\text{unidades/mL de enzima}}{\text{mg de proteína/mL de enzima}} \quad (9)$$

6.5 Extracción y cuantificación de metabolitos

6.5.1 Fenoles

La extracción de fenoles se llevó a cabo utilizando la metodología de Silva *et al.*, (2012) con algunas modificaciones. Se utilizaron raíces de *G. globosa* liofilizadas, las cuales fueron suspendidas en 200 mL de agua destilada y colocadas en sonicador por 30 min y 40 °C en oscuridad, posteriormente se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C. Por último el sobrenadante se liofilizó hasta peso constante.

Para la cuantificación de fenoles, fueron adicionados 2.5 μ L de extracto (15 mg/mL) a 150 μ L de agua desionizada más 10 μ L de reactivo de Folin- Ciocalteu (Sigma Aldrich), la muestra se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 37 °C por 15 min, después se añadió 30 μ L de Na₂CO₃ al 20% (p/v) y se colocó en baño frío de hielo por 15 min. Como referencia para la curva de calibración se utilizó ácido gálico en concentraciones de 0 a 1000 μ g/mL (Anexo 3). Las lecturas se llevaron a cabo a 750 nm y los resultados se expresaron

en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES) (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004).

6.5.2 Flavonoides

La extracción de flavonoides se llevó a cabo con la metodología propuesta por Silva *et al.*, (2012) anteriormente descrita para fenoles.

Para la cuantificación de flavonoides se tomaron 10.5 μL de extracto a una concentración de 15 mg/mL, al cual se adicionó 10.5 μL de NaNO_2 al 5 %, posteriormente a esta muestra se añadieron 10.5 μL de AlCl_3 al 10 % y se aforó a un volumen de 350 μL con agua desionizada para leer las absorbancias a 490 nm. Se utilizó quercetina a una concentración de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para realizar la curva de calibración (Anexo 4). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/g PS) (Enayat *et al.*, 2009).

6.5.3 Betaláinas

Se siguió la metodología reportada por Silva *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Cuatro gramos de raíces de *G. globosa* se extrajeron en 200 mL de agua estéril por 30 min a 40 °C en sonicador, seguidamente se centrifugaron a 10,000 rpm a 4 °C por 10 minutos. El extracto se purificó en cloroformo haciendo 3 lavados seguidos con 200 mL de cloroformo.

La cuantificación del extracto de betaláinas por espectrometría UV-Vis se siguió a 536 nm. Los resultados se expresaron en mg de amarantina/100g de acuerdo a la siguiente ecuación (Silva *et al.*, 2012):

$$A_{\text{cd}} = \frac{A_{536} \text{PMV}}{\epsilon \text{LPS}} \quad (10)$$

Dónde: A_{536} es la absorbancia del extracto a 536 nm, PM= peso molecular de la amarantina (726.6 g/mol), V= Volumen del extracto, ϵ = coeficiente de extinción molar de la amarantina ($5.66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), L= Longitud de trayectoria de la celda, PS= Peso seco del extracto.

6.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y para el análisis de datos se usó una ANOVA de una vía con un diseño completamente al azar utilizando una prueba Tukey considerando a $p < 0.05$ como estadísticamente significativo usando el programa estadístico Minitab 17 versión 1.0.0.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cinética de crecimiento y de producción de fenoles, flavonoides y betalaínas en cultivos de raíces adventicias de *Gomphrena globosa*.

La Figura 10 muestra la cinética de crecimiento y producción de compuestos de las raíces *in vitro* de *G. globosa*. Se obtuvo una biomasa máxima de 24.51 g PS/L en el día 27 del cultivo coincidiendo con el consumo total de la fuente de sustrato, con una la velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.10 días⁻¹ y un tiempo de duplicación (td) de 6.82 días, (Figura 10A). Estos valores de biomasa, fueron diferentes a los reportados por Martínez (2019) quien alcanzó una biomasa máxima de 18.18 g/L, con una μ 0.037días⁻¹ y un td de 18.58 días.

En cuanto a la acumulación de metabolitos, las betalaínas mostraron dos picos máximos de acumulación, de 7.64 mg EA/g ES al día 6, debido a que procedían de una línea pigmentada, y en el día 24 donde se cuantificó la mayor cantidad de betalaínas (8.18 mg EA/g ES), al final de la fase estacionaria (Figura 10B). En el caso de los flavonoides (Figura 10C) se observaron al menos 3 puntos máximos de acumulación en los días 6, 18 y 27, siendo el máximo el día 27 (5.66 mg EQ/g ES). Por su parte la mayor acumulación de compuestos fenólicos se vio reflejada al día 6 con una concentración de 43.20 mg EAG/g ES, seguido de una caída hasta el día 15, posteriormente los compuestos fenólicos comenzaron a acumularse hasta el final del cultivo (Figura 10D). La producción de betalaínas, compuestos fenólicos, y flavonoides fueron 1.6, 3.0 y 11.8 veces mayor a lo reportado por Martínez (2019), respectivamente.

Se obtuvo un rendimiento de biomasa-sustrato ($Y_{X/S}$) de 0.96 g/g, mientras que para los rendimientos ($Y_{P/S}$) de betalaínas, flavonoides y compuestos se obtuvieron: 1.24, 2.06 y 1.19 x 10⁻⁴ respectivamente.

Las diferencias obtenidas en este trabajo en relación al de Martínez (2019) probablemente fueron debidas al tamaño del inóculo, la edad de la línea de raíces empleada y a la posible adaptación de la raíces de *G. globosa* a las condiciones de cultivos como consecuencia de sus resiembras periódicas y al medio de cultivo (Marconi *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2014).

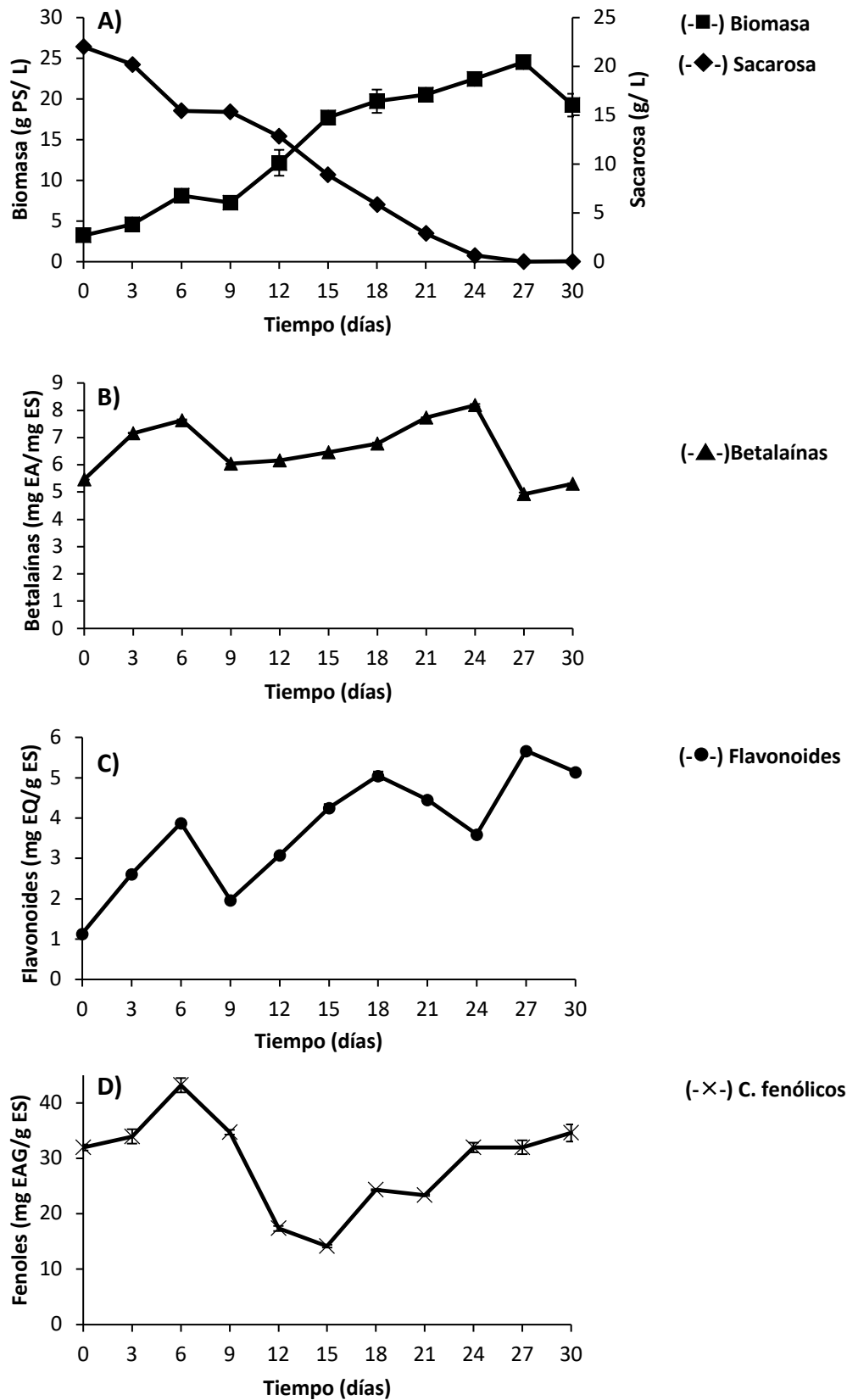


Figura 10. Cinética de crecimiento y producción de compuestos bioactivos de las raíces de *G. globosa* en medio B5, suplementadas con 49.3 μ M de IBA. Las barras de error representan el promedio \pm error estándar (n=3).

7.2 Efecto de la L-tirosina sobre el crecimiento *in vitro* de raíces

El efecto del precursor L-tirosina en el crecimiento de las raíces de *G. globosa* se muestra en la Figura 11 y 12.

En la Figura 11 se muestra el cambio en la pigmentación de las raíces de *G. globosa*. Entre los días 0 al 21 se observó poca o nula pigmentación de la raíz. Al finalizar el tiempo del cultivo (día 30), las raíces se caracterizaron por presentar una coloración agrisulca (FF666), siendo los cultivos de Tyr25 μ M los más pigmentados y el tratamiento control el menos pigmentado. La respuesta de pigmentación observada concuerda con lo reportado por Reis *et al.* (2017) en callos de *Alternanthera brasiliana*, quienes observaron la máxima acumulación de pigmento después de 30 días de cultivo y diferentes coloraciones rosáceas bajo diferentes hormonas de crecimiento vegetal como cinetina (KIN), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y benciladenina (BA).

La biomasa disminuyó con las diferentes concentraciones de L-tirosina (Figura 12). La acumulación máxima de biomasa fue de 20.30 g P.S/L en el día 18 en el cultivo control (Figura 12A). Estos resultados corroboraron los de Silva *et al.* (2005), quienes encontraron que la adición de L-tirosina a 10 μ M en el cultivo *in vitro* de *Althernathera brasiliana* disminuye la producción de biomasa. La rizogénesis de *A. tenella* fue significativamente diferente con la presencia de L-tirosina en el medio de cultivo y a 75 μ M fue considerada tóxica para los cultivos (Kleinowski *et al.*, 2014).

En cultivos de *A. euchroma* se ha observado que la adición de precursores puede ser benéfica. Por ejemplo, la adición de fenilalanina, incrementó 12 veces la biomasa comparado al control, al usar concentraciones de 10 μ M o 100 μ M (Sykłowska-Baranek, 2012), en otros casos el efecto puede ser perjudicial al inhibir el crecimiento celular, como lo reportaron en cultivos de *Cistanche deserticola* a concentraciones de 5000 μ M de tirosina (Gao-Sheng, 2014).

A diferencia de Sykłowska-Baranek (2012), que observó un efecto del precursor sobre el crecimiento del cultivo después del día 28, en suspensiones celulares de *Arnebia euchroma*

tratadas con 10, 100 y 1000 μM de fenilalanina, en nuestro caso, se observaron perfiles cinéticos característicos para cada tratamiento, aún cuando en ambos casos se haya añadido previamente el precursor (día 0), mientras que en suspensiones de *C. roseus* la adición de precursores al tercer día de cultivo significó en la disminución de biomasa después de dos días adicionar alcaloides como precursores en el cultivo (El-Sayed & Verpoorte, 2002).

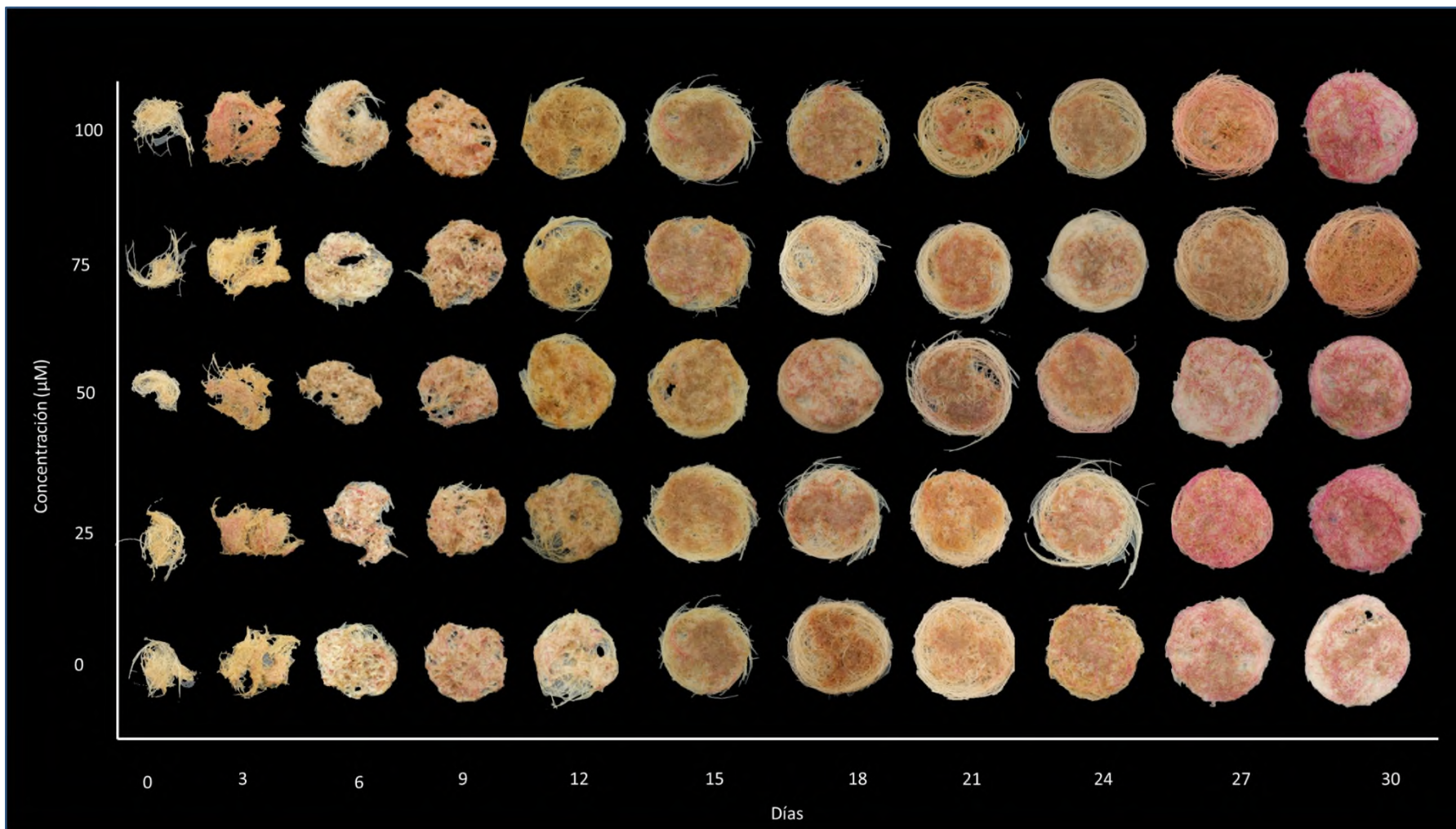


Figura 11. Fotografías de los cultivos de raíces adventicias de *G. globosa* tratadas con *L*-tirosina cosechadas en los diferentes días de cultivo.

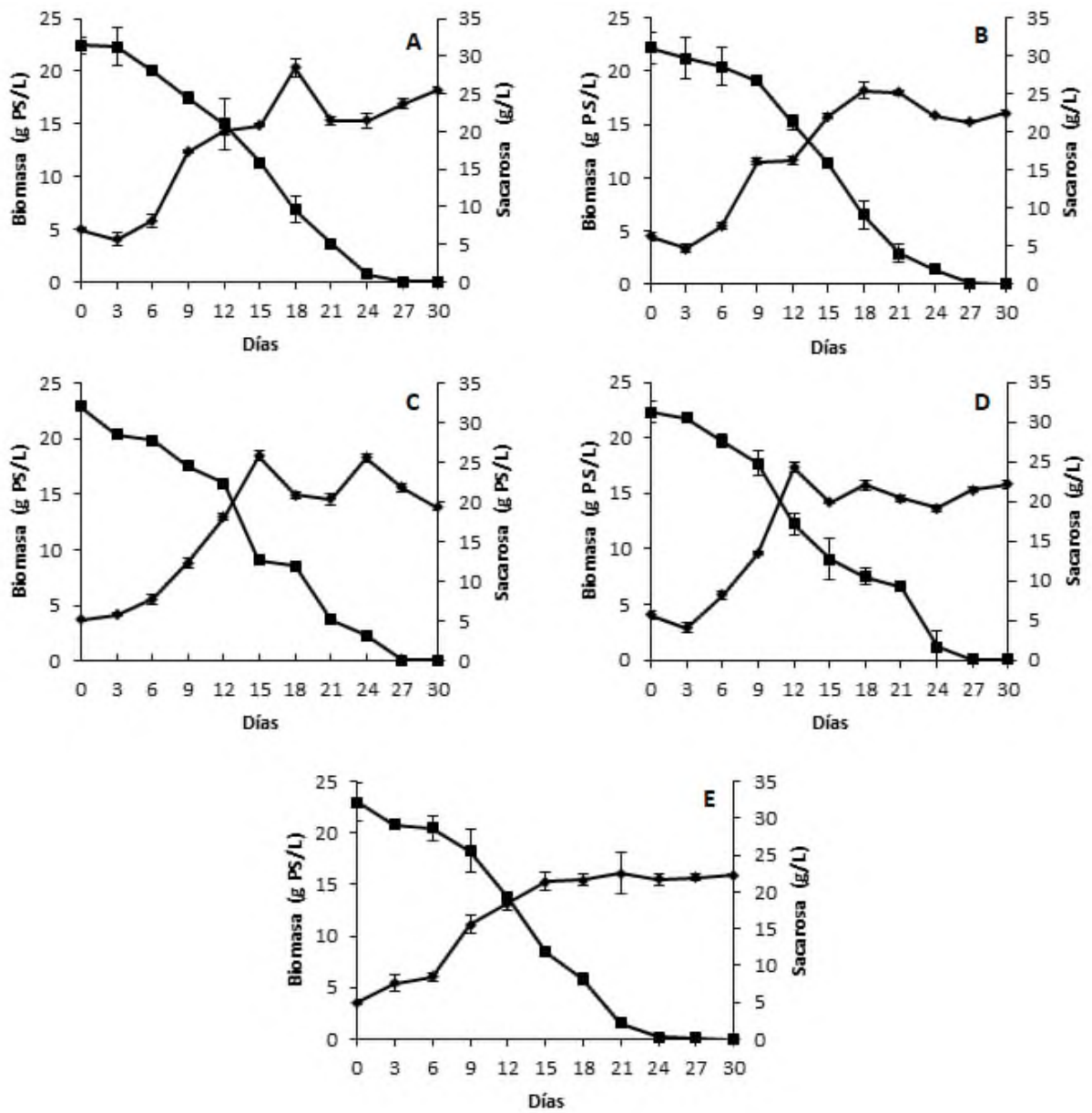


Figura 12. Cinética de crecimiento de raíces adventicias de *G. globosa* tratadas con A. 0 µM, B. 25, µM C) 50, µM D. 75 µM y E. 100 µM de L- tirosina. (-■-) Biomasa, (-◆-) Sacarosa. Las barras de error representan el promedio ± error estándar (n =3).

En la Tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td), rendimiento ($Y_{x/s}$) para cada uno de los tratamientos. Se observó que los tratamientos con tirosina a 25 y 75 μM presentaron las mayores μ (0.197-0.207 días^{-1}) y menores td (3.408-3.543 días) de los cultivos de raíces y fueron estadísticamente significativos en comparación a los demás tratamientos y al control. Mientras que para el tratamiento Tyr100 μM se observó un tiempo de duplicación mayor (10 días) en comparación con el control (4 días).

Tabla 6. Velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y rendimiento de biomasa en cultivo de raíces de *G. globosa*

Tratamiento	μ (días^{-1})	td (días)	$Y \left(\frac{X}{S} \right)$
Control	0.174 \pm 0.059 ^{ab}	4.282 \pm 1.387 ^a	0.422 \pm 0.024 ^a
25 μM	0.208 \pm 0.040 ^a	3.408 \pm 0.680 ^a	0.374 \pm 0.051 ^{ab}
50 μM	0.132 \pm 0.006 ^{ab}	5.223 \pm 0.269 ^{ab}	0.317 \pm 0.005 ^b
75 μM	0.197 \pm 0.026 ^a	3.543 \pm 0.439 ^a	0.375 \pm 0.025 ^{ab}
100 μM	0.080 \pm 0.049 ^b	10.653 \pm 4.891 ^b	0.384 \pm 0.055 ^{ab}

μ : velocidad específica de crecimiento, td: tiempo de duplicación, $Y_{x/s}$: rendimiento biomasa-sustrato. 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.

7.3 Efecto de la L-tirosina en la producción de metabolitos secundarios

La L-tirosina participa como intermediario en las rutas de producción de los betalainas, flavonoides y fenilpropanoides (compuestos fenólicos), por lo que se evaluó el efecto de la adicción de dicho precursor a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75, 100 μM). Los resultados obtenidos se observan en las Figuras 13, 14 y 15.

7.3.1 Betalaínas

La producción de betalaínas fue máxima (9.90 mg EA/g ES) con Tyr25 μ M al final de la cinética (día 30), siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos, con un incremento 1.94 veces mayor a Tyr75 μ M, condición que tuvo la menor producción de compuesto (5.09 mg EA/g ES) y 1.86 veces mayor al control (5.29 mg EA/g ES) (Figura 13).

Como se muestra en la Figura 13, bajo la condición control se presentó disminución en la producción de las betalaínas entre el día 3 y 9, esta condición probablemente es atribuida a la acumulación de tirosina al inicio del cultivo como reporta Kishima *et al.* (1991), en pétalos de *Portulaca grandiflora*.

En este trabajo, se alcanzó la máxima producción de betalaínas al final de cultivo (día 30) en todos los tratamientos, similar a lo reportado por Reis *et al.* (2017) quienes lograron la máxima acumulación de betalaínas en callos de *A. brasiliiana* a los 30 días de cultivo en medios tratados con hormonas con una producción de 0.19 g de amarantina/g P.S. En frutos de *Opuntia stricta* la adición de 1000 μ M de tirosina incremento en un 17% el contenido de betalaínas (Castellar *et al.*, 2012). Pavlov *et al.*, (2005) reportaron que en cultivo de raíces pilosas de *Beta vulgaris* que la producción de betalaínas se incrementó en cuanto se consumió la sacarosa del medio, esto sucedió a partir de día 27.

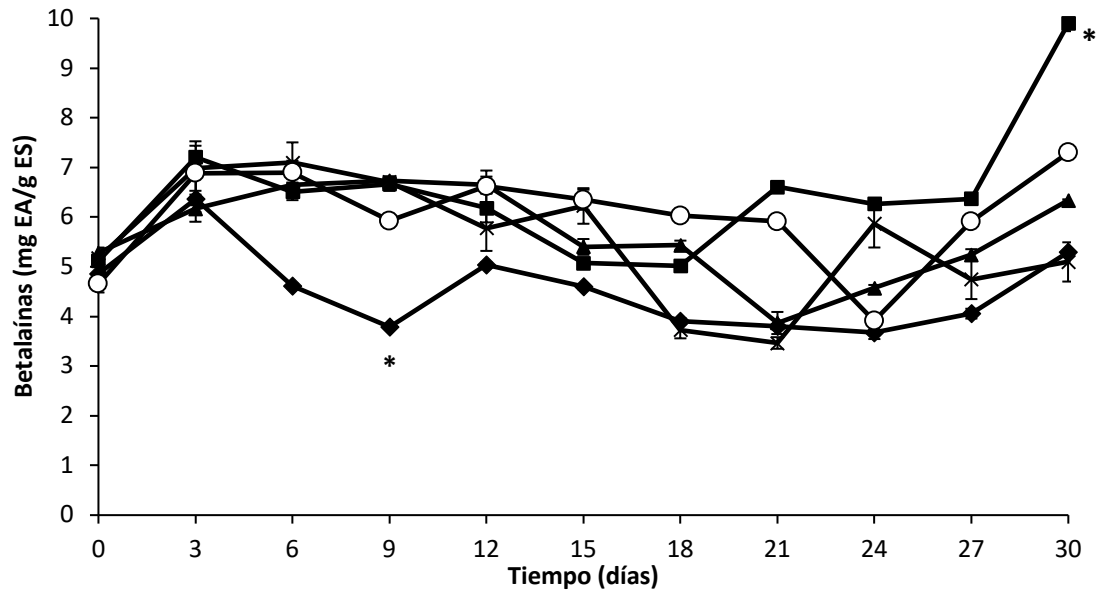


Figura 13. Cinética de producción de betalainas en raíces de *G. globosa* tratadas con L-tirosina. (◆) Control, (■) Tyr25 μ M, (▲) Tyr50 μ M, (×) Tyr75 μ M, (○) Tyr100 μ M. Las barras de error representan el promedio \pm error estándar (n =3).

En cuanto el rendimiento del producto se encontró que en cultivos de *Alternanthera*, la adición de Tyr75 μ M incrementó el rendimiento de betalainas en un 22.8% (Ribeiro *et al.*, 2016) mientras que en callos de *Chenopodium rubrum* L. se logró un aumento del 1% de betalainas, adicionando 100 y 1000 μ M de tirosina (Berlin *et al.*, 1986). De igual manera Fadzliana *et al.* (2017) reportó un efecto sinérgico cuando adicionó 110 μ M de tirosina a callos en medio MS suplementado con 2 mg/L ANA y 4 mg/L de TDZ, resultando el incremento de 1.7 veces más que el tratamiento con reguladores de crecimiento. Comparando la producción de betalainas con otros autores, la producción alcanzada en este trabajo al adicionar Tyr25 μ M fue 4.71 veces mayor que lo reportado por Méndez (2017) en cultivo de callos y 1.59 veces mayor que Martínez (2019) en cultivo de raíces adventicias de *G. globosa* tratadas sin precursor.

7.3.2 Flavonoides

La producción de flavonoides mostró un comportamiento fluctuante en todos los tratamientos (Figura 14) con picos máximos en los días 6, 12, 18, 21, 24 y 30, correspondientes mayoritariamente a Tyr100 μ M y Tyr50 μ M.

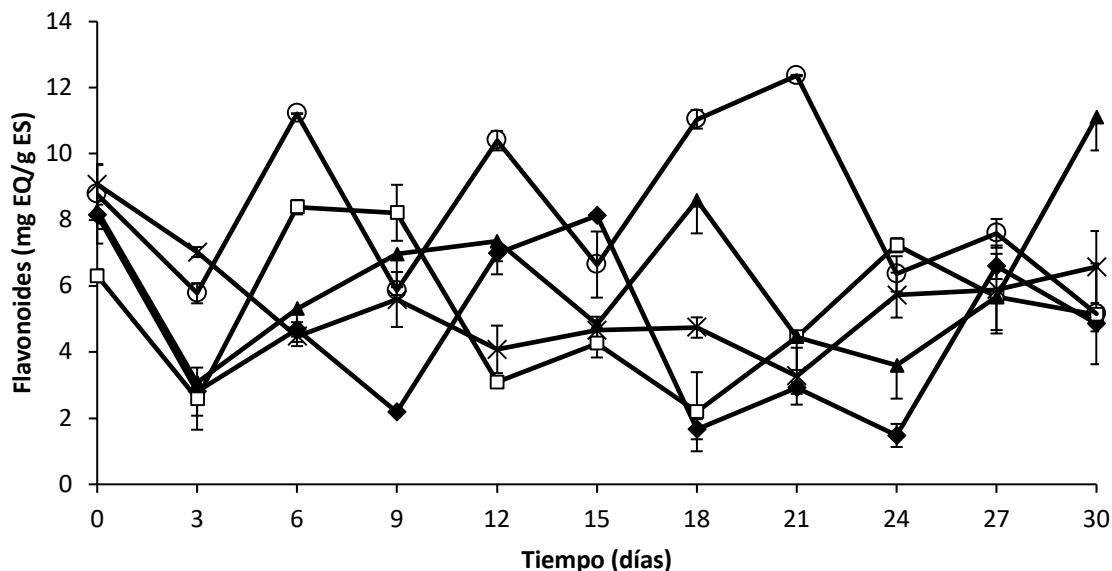


Figura 14. Producción de flavonoides en cultivos de raíces de *G. globosa*. (-◆-) Control, (-■-) Tyr25 μ M, (-▲-) Tyr50 μ M, (-×-) Tyr75 μ M, (-○-) Tyr100 μ M. Las barras de error representan el promedio \pm error estándar (n=3).

La producción máxima fue de 12.36 mg EQ/g ES con Tyr100 μ M en el día 21 siendo 3.1 veces mayor al control, estos resultados además fueron 25 veces mayor a lo reportado en raíces transformadas (Cohetero, 2019) y en raíces adventicias tratadas con 50 g/L de sacarosa de *G. globosa* (Martínez, 2019).

Masoumian *et al.*, (2011) reportaron una producción de flavonoides de 11.43 ± 0.12 mg/g PS en callos tratados con 18 μ M de fenilalanina, una cantidad mayor a la reportada en este trabajo al término de la cinética, no obstante las concentraciones administradas a raíces de *G. globosa* fueron mayores y la influencia del precursor pudo haber repercutido de forma directa en la producción de compuestos. El comportamiento independiente de los tratamientos pudo

deberse a factores como la concentración y el tiempo de adición del precursor (Morgan & Shanks, 2000; Jaisi & Panichayupakaranant, 2017; Kleinowski *et al.*, 2014).

7.2.3 Fenoles

En la Figura 15 se observó que el tratamiento control tuvo un incremento del 46% en la acumulación de fenoles y fue 1.57 veces mayor que Tyr25 μ M al día 21, no obstante las cuantificaciones mostraron los mayores valores al término de la cinética, Tyr50 μ M resultó ser el tratamiento con más compuestos fenólicos (48 mg EAG/g ES) seguido de Tyr100 μ M, Tyr25 μ M y Tyr75 μ M con concentraciones de 34.58, 34.44 y 30.91 mg EAG/g ES respectivamente. La acumulación más baja de fenoles fue observada en el control (13.77 mg EAG/g ES), siendo 3.48 veces menor que el cultivo adicionado con 50 μ M de tirosina.

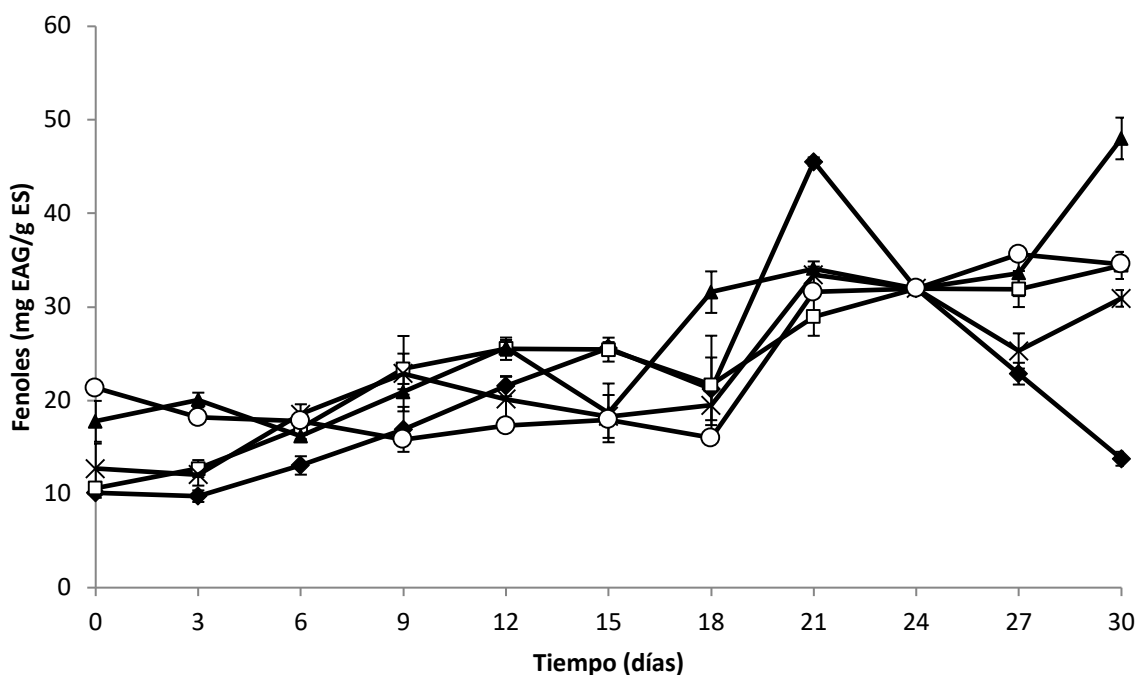


Figura 15. Producción de fenoles en cultivos de raíces de *G. globosa*. (-◆-) Control, (-■-) Tyr 25 μ M, (-▲-) Tyr 50 μ M, (-×-) Tyr 75 μ M, (-○-) Tyr 100 μ M. Las barras de error representan el promedio \pm error estándar (n =3).

En este trabajo se reportó que la acumulación de compuestos fenólicos con Tyr50 μ M fue 1.96 veces mayor a lo reportado por Cohetero (2019) tomando en cuenta que dicho estudio se

realizó en raíces transformadas de *G. globosa* y 1.80 veces mayor en raíces tratadas con 9.9 μM de IBA suplementadas con 50 g/L de sacarosa (Martínez, 2019).

En la Tabla 7 se muestran los rendimientos de los compuestos a diferentes concentraciones de L-tirosina. El máximo rendimiento de producto-biomasa ($Y_{p/x}$) fue para la producción de betalaínas con Tyr25 μM (6.2×10^{-3} g/g).

Tabla 7. Rendimientos de compuestos en cultivos de raíces de *G. globosa* tratados con L-tirosina

Tratamiento	$Y(p/x)$ Betalaínas ($\times 10^{-3}$, g/g)	$Y(p/x)$ Flavonoides ($\times 10^{-5}$, g/g)	$Y(p/x)$ C. fenólicos ($\times 10^{-4}$, g/g)
Control	4.0 ± 0.0005^c	-1.8208 ± 0.1140^{bc}	1.385 ± 0.0018^b
Tyr25 μM	6.2 ± 0.0010^a	-68.2083 ± 0.5512^b	7.230 ± 0.0567^{ab}
Tyr50 μM	1.9 ± 0.0006^{bc}	-1.8770 ± 0.1908^{bc}	14.8900 ± 0.0178^a
Tyr75 μM	4.0 ± 0.0011^c	-2.5858 ± 0.5112^c	7.654 ± 0.0237^{ab}
Tyr100 μM	3.2 ± 0.0004^b	1.453 ± 0.0543^a	5.311 ± 0.0218^b

$Y_{p/x}$: rendimiento producto-biomasa. 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.

7.4 Efecto de la L-tirosina en la actividad específica de PAL, TAL y tirosinasa

Se ha reportado que un incremento de las actividades enzimáticas después de la adición de precursores y/o elicitores algunas veces puede favorecer la producción de metabolitos secundarios (Zhao & Zhou 2010). Ya que las estructuras de los compuestos de nuestro interés derivan de precursores como la L-tirosina y que este intermediario es sustrato de las enzimas fenilalanina y tirosina amonio liasa y tirosinasa (PAL, TAL y TIR) se procedió a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de tirosina en la actividad específica de dichas enzimas como se muestran en la Figura 16.

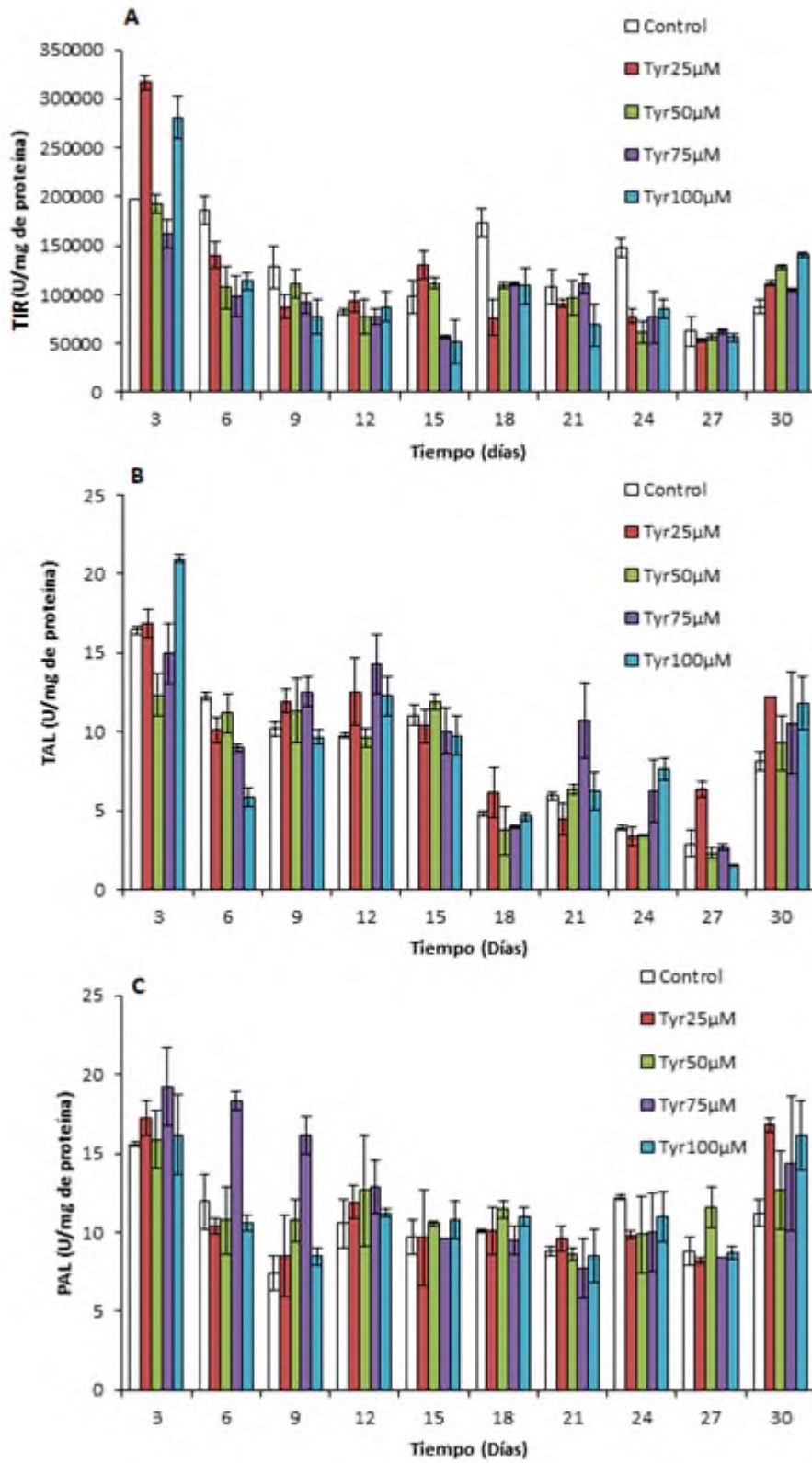


Figura 16. Actividad A. TIR, B. TAL y C. PAL en raíces adventicias tratadas con L-tirosina. (-□-) Control, (-■-) Tyr25 μM, (-■-) Tyr50 μM, (-■-) Tyr75 μM, (-■-) Tyr100 μM. Las barras de error representan el promedio ± error estándar (n=3).

La adición de L-tirosina indujo un incremento de las actividades enzimáticas de PAL, TAL y TIR y alcanzaron un máximo (19.27, 20.95 y 23724.54 U/mg de proteína, respectivamente) a las 72 h (día 3) después del tratamiento, luego de esto disminuyeron. Se ha demostrado que en otras especies el uso de precursores incrementa las actividades entre las 24 y 72 h de ser adicionado y muchas veces corresponde a la producción de metabolitos secundarios (Sui et al., 2019). Khan et al. (2003) reportaron un aumento de las actividades PAL y TAL a las 36 h después de añadir quitosano y notaron un incremento en el contenido total de fenoles. En raíces pilosas de *Silybum marianum* se encontró que la mayor producción de silimarina (flavonoide) fue al añadir 100 μ M de fenilalanina después 72 h de añadir el precursor al cultivo, además de observarse el incremento de PAL en todos los tratamientos (Rahimi et al., 2011).

En este trabajo no se logró correlacionar una respuesta en los cultivos de *G. globosa* tratados con tirosina y la producción de flavonoides y/o compuestos fenólicos sobre las actividades PAL, TAL y TIR, probablemente por las siguientes razones: Las raíces sufrieron un estrés por corte correspondiente al subcultivo, donde las enzimas PAL y TAL están implicadas en las vías de señalización fenólica (Dixon & Paiva, 1995; López- Gálvez, 1996), las enzimas PAL, TAL y TIR comprenden una amplia variedad de sustratos y rutas metabólicas para la formación de compuestos como fenilpropanoides, melanocitos, alcaloides y ligninas (Cabanes et al., 1987; Louie et al., 2006; Vogt, 2010; Kilgore et al., 2016), para este último metabolito, Barros et al. (2016) concluyeron que la tirosina es el sustrato preferente de la enzima PTAL para sintetizarla y no la fenilalanina como se creía anteriormente. Quizás por esta razón el efecto de la tirosina no se vio reflejada en la cuantificación de flavonoides o compuestos fenólicos en este trabajo y tal vez su impacto se localizó en otra clase de compuesto que seguía la ruta metabólica de los fenilpropanoides (Gao-Sheng et al., 2014). También se ha señalado que factores como la luz, RCV, heridas y la localización en tejido específico inducen la actividad TIR, PAL y TAL (Jones 1984; Parvez et al., 1997; Wang et al., 2007). Pese a lo anteriormente señalado, se hallaron resultados similares a los de este trabajo en suspensiones celulares de *A. euchroma*, donde la adición de 10 o 100 μ M de fenilalanina para la producción de pigmentos no coincidía con la actividad PAL en una cinética de 32 días (Sykłowska-Baranek et al., 2012).

8. CONCLUSIONES

- La adición del precursor tirosina, afectó de manera positiva el crecimiento de las raíces adventicias *in vitro*.
- Se logró aumentar la producción de betalaínas, flavonoides y fenoles con la adición del precursor L – tirosina en cultivos de raíces adventicias de *G. globosa*.
- Las actividades de las enzimas PAL, TAL y TIR fue máxima a las 72 h después de añadir el precursor tirosina en a diferencia de los demás días de cultivo.

9. PERSPECTIVAS

- Cuantificar metabolitos específicos como la L-tirosina, L-DOPA, ácido caféico, ácido betalámico, kaempferol y/o quercetina, para realizar un análisis de flujo metabólico.
- Evaluar precursores y tiempos de adición diferentes a los establecidos en este trabajo.
- Usar herramientas moleculares para analizar las expresiones de genes relacionados con la acumulación de compuestos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
2. Aguilar, J. J. (2018). Actividad citotóxica y antioxidante de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de cáncer en Oaxaca. (Tesis de licenciatura). Universidad del Papaloapan, México.
3. 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, 2006-2010.
4. Azeredo, H. M. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2365-2376.
5. Baque, A., Murthy, H. N., & Paek, K. Y. (2014). Adventitious root culture of *Morinda citrifolia* in bioreactors for production of bioactive compounds. In *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* (pp. 185-222). Springer, Dordrecht.
6. Berlin, J., Sieg, S., Strack, D., Bokern, M., & Harms, H. (1986). Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 163-174.
7. Betsui, F., Tanaka-Nishikawa, N., & Shimomura, K. (2004). Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. *Plant Biotechnology*, 21, 387-391.
8. Blair, S., & Madrigal, B. (2005). Siempre viva, *Gomphrena globosa* L. En *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana*. (pp. 20-23). Universidad de Antioquia.
9. Bolser, J. A., Alan, R. R., Smith, A. D., Li, L., Seeram, N. P., & McWilliams, S. R. (2013). Birds select fruits with more anthocyanins and phenolic compounds during autumn migration. *The Wilson Journal of Ornithology*, 125, 97-108.
10. Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722-2735.
11. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839-851.

12. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
13. Brockington, S. F., Yang, Y., Gandia-Herrero, F., Covshoff, S., Hibberd, J. M., Sage, R. F. & Smith, S. A. (2015). Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist*, 207, 1170-1180.
14. Cabanes, J., García-Cánovas, F., Lozano, J., & Garcia-Carmona, F. (1987). A kinetic study of the melanization pathway between *L*-tyrosine and dopachrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 923, 187-195.
15. Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294.
16. Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2005). HPLC characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 454-460.
17. Camm, E. L., & Towers, G. N. (1973). Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, 12, 961-973.
18. Cass, C. L., Peraldi, A., Dowd, P. F., Mottiar, Y., Santoro, N., Karlen, S. D., Bukhman, Y. V., Foster, C. E., Thrower, N., Bruno, L. C., Moskvina, O. V., Johnson, E. T., Willhoit, M. E., Phutane, M., Ralph, J., Mansfield, S. D., Nicholson, P. & Sedbrook, J. C. (2015). Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. *Journal of Experimental Botany*, 66, 4317-4335.
19. Castañeda, J. L., & Quintero, A. (1991). Regulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC 4.3. 1.5.) activity by light in *Gomphrena globosa* tissue culture. *Phyton*, 52, 151-154
20. Castellar, M. R., Solano, F., & Obón, J. M. (2012). Betacyanin and other antioxidants production during growth of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 337-343.
21. Chaovanalikit, A., & Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 69, 67-72.
22. Charles Darwin Foundation. (2019). Lista de especies de Galápagos: *Gomphrena globosa* L. Bruselas, Bélgica. Recuperado de <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=1122>

23. Cohetero, F. (2019). Transformación genética de *Gomphrena globosa* L. mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (Tesis de Licenciatura). Universidad del Papaloapan, México.
24. Cui, X. H., Chakrabarty, D., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, 101, 4708-4716.
25. Doran, P. M., & García Labiano, F. J. (1995). Homogeneous reactions. In *Bioprocess Engineering Principles* (p. 278). Academic Press
26. Drago Serrano, M. E. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4).
27. DragonTeaHouse™ (2019). *Gomphrena globosa*. Hong Kong, China. *Dragon Tea House*. Recuperado de <https://dragonteahouse.biz/gomphrena-globosa-globe-amarant-dried-floral-tea-50g/>
28. 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, 350-356.
29. Duckworth, H. W., & Coleman, J. E. (1970). Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 1613-1625.
30. El-Sayed, M., & Verpoorte, R. (2002). Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 265-270.
31. Enayat, S., & Banerjee, S. (2009). Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chemistry*, 116, 23-28.
32. Ervital©. (2019). *Infusão Princesa*. Castro Daire, Portugal. *Ervitalk*. Recuperado de <http://www.ervital.pt/product/infusao-princesa>
33. Fadzliana, N. A. F., Rogayah, S., Shahrudin, N. A., & Janna, O. A. (2017). Addition of L-tyrosine to improve betalain production in red pitaya callus. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 40, 521-532
34. Faizal, A., & Sari, A. V. (2019). Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. *African Journal of Biotechnology*, 18, 130-135.
35. Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.

36. Fazal, H., Abbasi, B. H., & Ahmad, N. (2014). Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174, 2086-2095.
37. FDA. (2018) Fact sheet: FDA at a glance. New Hampshire, EU. FDA.gov. Recuperado de <https://www.fda.gov.htm>
38. 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, 3441-3446.
39. Flores, H. E., Hoy, M. W., & Pickard, J. J. (1987). Secondary metabolites from root cultures. *Trends in Biotechnology*, 5, 64-69.
40. Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
41. Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18, 334-343.
42. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2005). Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *Planta*, 222, 307-318.
43. Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & Garcia-Carmona, F. (2007). Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1546-1551.
44. Gao-Sheng, H. U., Jing-Ming, J. I. A., & Kim, D. H. (2014). Effects of feeding tyrosine and phenylalanine on the accumulation of phenylethanoid glycosides to *Cistanche deserticola* cell suspension culture. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12, 367-372.
45. Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 645-649.
46. Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., & Palazón, J. (2013). Phenolic acids. En *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, (pp. 1951-1973). Springer, Berlin, Heidelberg.

47. Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., & Gantet, P. (2006). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 341-346.
48. Gupta, M. P., Arias, T. D., Correa, M., & Lamba, S. S. (1979). Ethnopharmacognostic observations on Panamanian medicinal plants. Part I. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 17, 115-130.
49. Hamiduzzaman, M. (2013). Significant hypoglycemic activity from *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae) in mice model. *Universal Journal of Pharmacy*, 2, 68-72.
50. Hamiduzzaman, M. (2014). Evaluation of anti-diarrheal activity of *Gomphrena globosa* (L) in animal model. *ASA University Review*, 8, 219-223.
51. Hamiduzzaman, M., & Azam, A. Z. (2012). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Gomphrena globosa* (L.). *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 15, 183-185.
52. Havir, E. A., & Hanson, K. R. (1970). [72a] l-phenylalanine ammonia-lyase (potato tubers). En *Methods in Enzymology* (pp. 575-581). Academic Press.
53. Ho, T. T., Jeong, C. S., Lee, H., & Park, S. Y. (2019). Effect of explant type and genotype on the accumulation of bioactive compounds in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137, 115–124.
54. Hodgins, D. S. (1971). Yeast phenylalanine ammonia-lyase purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 2977-2985.
55. Hussain, M. S., Fareed, S., Saba Ansari, M., Rahman, A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4, 10.
56. Hussein, S., Ling, A. P. K., Ng, T. H., Rusli, I., & Paek, K. Y. (2012). Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant, *Eurycoma longifolia*. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7026-35.
57. Hyun, M. W., Yun, Y. H., Kim, J. Y., & Kim, S. H. (2011). Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology*, 39, 257-265.
58. Idrees, M., Sania, B., Hafsa, B., Kumari, S., Khan, H., Fazal, H., Ahmad, I., Akbar, F., Ahmad, N., Ali, S., & Ahmad, N. (2018). Spectral lights trigger biomass accumulation and production

- of antioxidant secondary metabolites in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Comptes rendus biologiques*, 341, 334-342.
59. Jaisi, A., & Panichayupakaranant, P. (2017). Enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root cultures by L-alanine feeding and *in situ* adsorption. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129, 53-60.
 60. Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Sankari, S., & Panneerselvam, R. (2007). Paclitaxel enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Process Biochemistry*, 42, 1566-1570.
 61. Japan Tobacco Inc. (2018). 2017 Earnings Report. Recuperado de: <https://www.jti.com/sites/default/files/jt-group-2018-financial-results-2019-forecast.pdf>
 62. Jeong, J. A., Wu, C. H., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2009). Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 91-98.
 63. Jones, D. H. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23, 1349-1359.
 64. Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49, 5178-5185.
 65. Khan, W., Prithviraj, B., & Smith, D. L. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160, 859-863.
 66. Khanam, M. N., Anis, M., & Ahmad, S. (2018). Establishment of adventitious root cultures of *Allamanda cathartica* L. for the production of iridoid glycosides and its identification using HPTLC MS. *Industrial Crops and Products*, 125, 198-206.
 67. Kilgore, M. B., Holland, C. K., Jez, J. M., & Kutchan, T. M. (2016). Identification of a noroxomaritidine reductase with Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis related activities. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 16740-16752.
 68. Koukol, J., & Conn, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 2692-2698.
 69. Kubalt, K. (2016). The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences*, 80, 97-108.

70. Kusmiati, K., Priadi, D., & Rahayu, R. K. (2017). Antibacterial activity test, evaluation of pharmacognosy and phytochemical screening of some extracts of globe amaranth (*Gomphrena globosa*). *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 6, 27-33.
71. Langhansova, L., Marsik, P., & Vanek, T. (2005). Production of saponins from *Panax ginseng* suspension and adventitious root cultures. *Biologia Plantarum*, 49, 463-465.
72. Lans, C. (2007). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 13.
73. Lans, C. A. (2006). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 45.
74. Latha, S. T., & Rajendran, N. N. (2013). Apoptosis effect of isolated phenolic secoiridoid glucoside from aerial parts of *Gomphrena globosa* in A-431cell lines. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 3829-3839.
75. Lee, Y. S., Yang, T. J., Park, S. U., Baek, J. H., Wu, S., & Lim, K. B. (2011). Induction and Proliferation of Adventitious Roots from *Aloe vera* Leaf Tissues for *in vitro* production of Aloe-emodin. *Plant Omics*, 4, 190.
76. Liang, H., Yuan, Q., & Xiao, Q. (2005). Purification of sulforaphane from *Brassica oleracea* seed meal using low-pressure column chromatography. *Journal of Chromatography B*, 828, 91-96.
77. Lin, J. K., & Weng, M. S. (2006). Flavonoids as nutraceuticals. In *The science of flavonoids* (pp. 213-238). Springer, New York, NY.
78. 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, 10364-10372.
79. Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018). Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 335-351.
80. Louie, G. V., Bowman, M. E., Moffitt, M. C., Baiga, T. J., Moore, B. S., & Noel, J. P. (2006). Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chemistry & Biology*, 13(12), 1327-1338.
81. Marais, J. P., Deavours, B., Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2006). The stereochemistry of flavonoids. In *The science of flavonoids* (pp. 1-46). Springer, New York, NY.

82. Marconi, P. L., Setten, L. M., Cálcena, E. N., Alvarez, M. A., & Pitta-Alvarez, S. I. (2008). Changes in growth and tropane alkaloid production in long-term culture of hairy roots of *Brugmansia candida*. *Journal of Integrative Biosciences*, 3, 38-44.
83. Martínez, J. C (2019). Cultivo *in vitro* de raíces adventicias de *Gomphrena globosa* para la producción de betalaínas y compuestos fenólicos. (Tesis de Maestría). Universidad del Papaloapan, México.
84. Masoumian, M., Arbakariya, A., Syahida, A., & Maziah, M. (2011). Effect of precursors on flavonoid production by *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. *African Journal of Biotechnology*, 10, 6021-6029.
85. Mehta, P. M., & Bhavnarayana, K. (1981). Role of phenylalanine and tyrosine ammonia lyase enzymes in the pigmentation during development of brinjal fruit. *Proceedings: Plant Sciences*, 90, 293-297.
86. Méndez L. I. (2017). Producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa* L. (Tesis de Maestría). Universidad del Papaloapan, México.
87. Moreno, P. R. H., Van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (1993). Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, 12, 702-705.
88. Morgan, J. A., & Shanks, J. V. (2000). Determination of metabolic rate-limitations by precursor feeding in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Journal of Biotechnology*, 79, 137-145.
89. Mulder-Krieger, T. H., Verpoorte, R., Svendsen, A. B., & Scheffer, J. J. C. (1988). Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13, 85-154.
90. 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 (PCTOC)*, 118, 1-16.
91. Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6, 715.
92. Neamsuvan, O., Phumchareon, T., Bunphan, W., & Kaosaeng, W. (2016). Plant materials for gastrointestinal diseases used in Chawang District, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 179-187.

93. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
94. Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R., & Bo, S. H. (2012). Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 2526-2539.
95. Ouyang, J., Wang, X. D., Zhao, B., & Wang, Y. C. (2005). Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola*. *Process Biochemistry*, 40, 3480-3484.
96. Paek, K. Y., Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Zhong, J. J. (2009). Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. In *Biotechnology in China I* (pp. 151-176). Springer, Berlin, Heidelberg.
97. 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.
98. Pandey, P., Kaur, R., Singh, S., Chattopadhyay, S. K., Srivastava, S. K., & Banerjee, S. (2014). Long-term stability in biomass and production of terpene indole alkaloids by hairy root culture of *Rauvolfia serpentina* and cost approximation to endorse commercial realism. *Biotechnology Letters*, 36, 1523-1528.
99. Parvez, M. M., Wakabayashi, K., Hoson, T., & Kamisaka, S. (1997). White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. *Physiologia Plantarum*, 99, 39-48.
100. Pavlov, A., Georgiev, V., & Ilieva, M. (2005). Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture. *Process Biochemistry*, 40, 1531-1533.
101. Pennazio, S., Appiano, A., & Redolfi, P. (1979). Changes occurring in *Gomphrena globosa* leaves in advance of the appearance of tomato bushy stunt virus necrotic local lesions. *Physiological Plant Pathology*, 15, 177-182.
102. Petrusa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., & Vianello, A. (2013). Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 14950-14973.
103. Phyton Biotech®, (2019). Phyton Biotech: *Plaxitaxel*. Ahrensburg, Germany. Recuperado de <https://phytonbiotech.com/apis/paclitaxel/>

104. Polturak, G., & Aharoni, A. (2018). "La Vie En Rose": Biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments. *Molecular Plant*, 11, 7-22.
105. Polturak, G., Grossman, N., Vela-Corcia, D., Dong, Y., Nudel, A., Pliner, M., Levy, M., Rogachev, I., & Aharoni, A. (2017). Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 9062-9067.
106. Prakash, G., Bhojwani, S. S., & Srivastava, A. K. (2002). Production of azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7, 185-193.
107. Rahimi, S., Hasanloo, T., Najafi, F., & Khavari-Nejad, R. A. (2011). Enhancement of silymarin accumulation using precursor feeding in *Silybum marianum* hairy root cultures. *Plant Omics*, 4, 34.
108. Rahman, A. H. M. M., & Gulshana, M. I. A. (2014). Taxonomy and medicinal uses on amaranthaceae family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2, 54-59.
109. Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
110. Reis, A., Kleinowski, A. M., Klein, F. R. S., Souza, R. T. T. D., Amarante, L. D., & Braga, E. J. B. (2017). Callus induction and betacyanin quantification by HPLC/MS-MS in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. *Hoehnea*, 44, 90-95.
111. Renneberg, R., Berkling, V., & Loroeh, V. (2016). Green biotechnology. In *Biotechnology for beginners* (pp. 245-246). Academic Press.
112. Ribeiro, M. V., Benitez, L. C., Marini, N., Kleinowski, A. M., Brandão, I. R., da Maia, L. C., & Braga, E. J. B. (2017). Expressão de gene da síntese de betacianina em *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. sob elicitación por NaCl e tirosina. *Revista da Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp*, 13, 472-486.
113. Roriz, C. L., Barreira, J. C., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2018). *Gomphrena globosa* L. as a novel source of food-grade betacyanins: Incorporation in ice-cream and comparison with beet-root extracts and commercial betalains. *LWT*, 92, 101-107.
114. 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.

115. Schenck, C. A., & Maeda, H. A. (2018). Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*, 149, 82-102.
116. Sharma, P., Sharma, S., Yadav, S., Srivastava, A., Purohit, I., & Shrivastava, N. (2014). Plant derived bioactive molecules: culture vessels to bioreactors. In *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* (pp. 47-60). Springer, Dordrecht.
117. Sharma, S. N., Jha, Z., & Sinha, R. K. (2013). Establishment of in vitro adventitious root cultures and analysis of andrographolide in *Andrographis paniculata*. *Natural Product Communications*, 8, 1045-1047.
118. Sharma, S., & Grewal, R. K. (2014). *In vitro* studies on the antioxidant activities of extracts from the flowers of *Gomphrena globosa*. *International Journal Pharma and Bio Sciences* 5, 457-465.
119. 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, 756-763.
120. Silvestrini, A., Pasqua, G., Botta, B., Monacelli, B., van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (2002). Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 749-753.
121. Simão, M. J., Fonseca, E., Garcia, R., Mansur, E., & Pacheco, G. (2016). Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflorapohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124, 419-430.
122. Sivakumar, G. (2006). Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1, 1419-1427.
123. Sivakumar, G., Krishnamurthy, K. V., Hao, J., & Paek, K. Y. (2004). Colchicine production in *Gloriosa superba* calluses by feeding precursors. *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 499-502.
124. 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, 739-746.

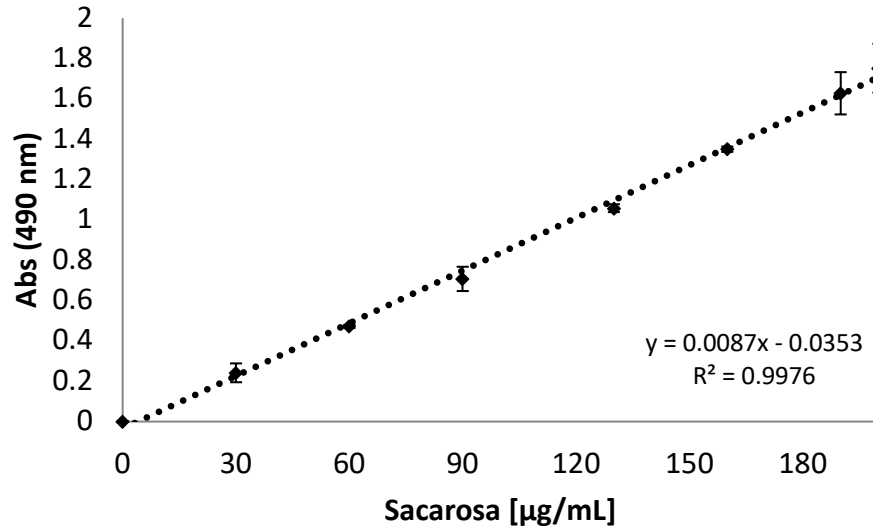
125. Stafford, H. A. (1994). Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science*, 101, 91-98.
126. Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H., & Strack, D. (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208, 114-124.
127. Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 514-525.
128. Stobiecki, M., & Kachlicki, P. (2006). Isolation and identification of flavonoids. In *The science of flavonoids* (pp. 47-69). Springer, New York, NY.
129. Sui, Z., Luo, J., Yao, R., Huang, C., Zhao, Y., & Kong, L. (2019). Functional characterization and correlation analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in coumarin biosynthesis from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Phytochemistry*, 158, 35-45.
130. Sujatha, G., & Ranjitha Kumari, B. D. (2012). Establishment of fast growing in vitro root culture system in *Artemisia vulgaris*. *Journal of Agricultural Technology*, 8, 1779-1790.
131. Świeca, 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.
132. Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M. R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., & Chinou, I. (2012). Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48, 555-564.
133. Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. In *Biomanufacturing* (pp. 1-23). Springer, Berlin, Heidelberg.
134. Takahashi Y, Hitaka Y, Kino-Oka M, Taya M, Tone S (2001) Evaluation of growth property of red beet hairy roots depending on condition of inocula and its application to culture control with fuzzy logic theory. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 121–127
135. Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54, 733-749.
136. Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099.

137. Tarnam, Y. A., Ilyas, M. M., & Begum, T. N. (2014). Biological potential and phytopharmacological screening of *Gomphrena* species. *International Journal of Pharma Research and Review*, 3, 58-66.
138. Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., & Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 62.
139. Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 243-253.
140. Urdiana S. C. (2019). Evaluación del efecto elicitor del metil jasmonato sobre la producción de fenilpropanoides en plántulas *in vitro* de *Gomphrena globosa* y estudio *in silico* de enzimas clave de su síntesis (Tesis de Maestría). Universidad del Papaloapan, México.
141. Van Gelder, C. W., Flurkey, W. H., & Wichers, H. J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.
142. Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 3, 200–201.
143. Vidal, P. J., López-Nicolás, J. M., Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2014). Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chemistry*, 154, 246-254.
144. Vieira, C. C. J., Mercier, H., Chu, E. P., & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (1994). *Gomphrena* species (globe amaranth): *In vitro* culture and production of secondary metabolites. In *Medicinal and Aromatic Plants VII* (pp. 257-270). Springer Berlin Heidelberg.
145. Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20.
146. Wang, C. Q., Song, H., Gong, X. Z., Hu, Q. G., Liu, F., & Wang, B. S. (2007). Correlation of tyrosinase activity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. *Plant science*, 173, 487-494.
147. 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, 249-268.
148. Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.
149. Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstorfer, P., Müller, U., Höglinger, O. & Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products

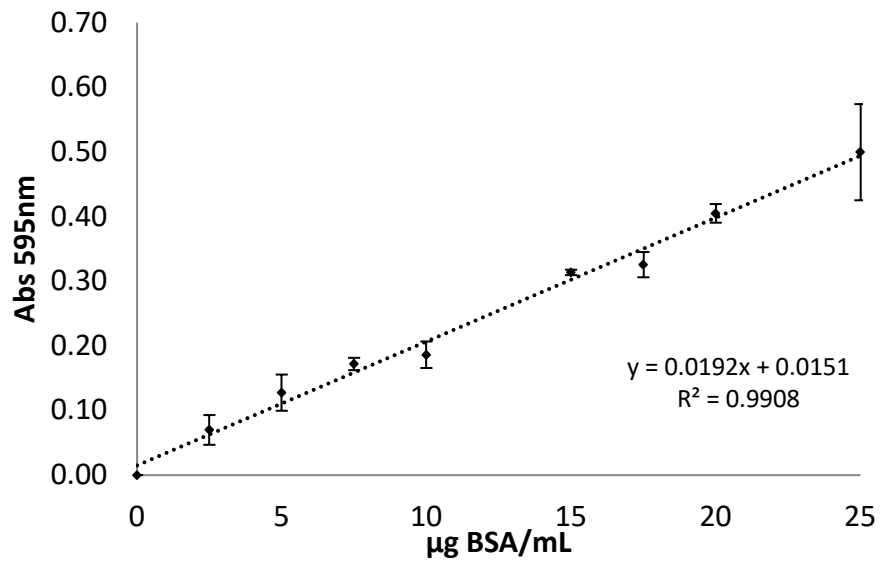
- and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42, 46-55.
150. Wu, L. C., Hsu, H. W., Chen, Y. C., Chiu, C. C., Lin, Y. I., & Ho, J. A. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95, 319-327.
151. Yan, Q., Shi, M., Ng, J., & Wu, J. Y. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 70, 853-858.
152. Zenk, M. H., El-Shagi, H., Arens, H., Stöckigt, J., Weiler, E. W., & Deus, B. (1977). Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* (pp. 27-43). Springer, Berlin, Heidelberg.
153. 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, 686-691.
154. Zhong, J. J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 591-599.
155. Zhong, J. J. (2013). Cell-free biosystems for biomanufacturing. In *Future trends in biotechnology* (pp. 89-119). Heidelberg: Springer.

11. ANEXOS

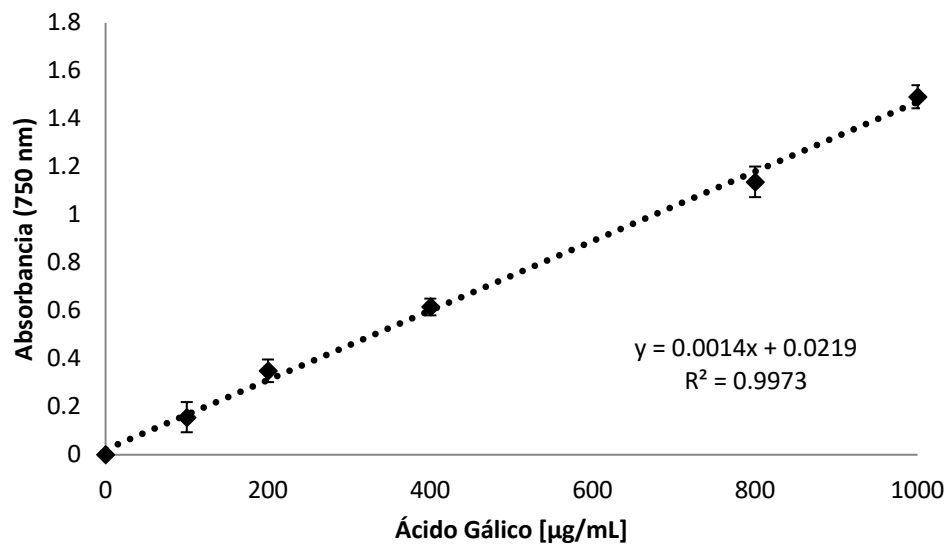
Anexo 1. Curva estándar de sacarosa



Anexo 2. Curva estándar de proteínas totales



Anexo 2. Curva estándar de ácido gálico



Anexo 4. Curva estándar de quercetina

