

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE  
DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO*  
DE *Agastache mexicana*

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A  
M. en B. GABRIELA CARMONA CASTRO

CODIRECCION DE TESIS:  
DRA. IRENE PEREA ARANGO  
DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

CUERNAVACA, MORELOS

2015-2019

ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	6
NOMENCLATURA	7

RESUMEN

ABSTRACT

## **CAPITULO I**

### **LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**

1. Introducción	8
1.2 Producción de Compuestos Bioactivos a Partir de Plantas Medicinales	10
1.3 Antecedentes generales de plantas del género <i>Agastache</i> y sus compuestos bioactivos	12
1.3.1 Actividad farmacológica en el género <i>Agastache</i>	13
1.4 Aplicación de la Biotecnología Vegetal para la Producción Compuestos Bioactivos	14
1.5 Referencias bibliográficas	16

## **CAPITULO II**

### **IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TILIANINA DURANTE LAS ETAPAS VEGETATIVA Y DE FLORACION DE *Agastache mexicana***

2.1. Introducción	12
2.2 Variación del Contenido de Compuestos Bioactivos en el Género <i>Agastache</i>	13
2.2.1 Química, propiedades y funciones de los flavonoides	15
2.3 <i>Agastache mexicana</i>	16
2.3.1 Compuestos aislados de <i>Agastache mexicana</i>	17
2.4 Tilianina	18
2.4.1 Producción de tilianina	22
2.4.2 Tilianina, propiedad industrial, patentes relevantes	22
2.5 Factores que afectan el contenido de metabolitos secundarios en las plantas	23

2.6 La cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC): una técnica cromatográfica para el análisis fotoquímico de especies con potencial farmacológico	24
2.7 Técnicas cromatográficas utilizadas en el género <i>Agastache</i> para la extracción y análisis de compuestos bioactivos	25
2.8 Justificación	26
2.9. Hipótesis	26
2.10. Objetivos	26
2.11. Objetivo General	26
2.11.1 Objetivos específicos	26
2.12. Materiales y métodos	28
2.12.1 Material vegetal y datos climatológicos del sitio de colecta	28
2.12.2 Preparación de extractos y estándares	28
2.12.4 Método de Identificación por HPTLC	29
2.13 Resultados	30
2.13.3 Análisis de los Datos climatológicos en las dos épocas de colecta	35
2.14 Discusion del CAPITULO II	36
2.15 Conclusiones del CAPITULO II	37
2.16 Perspectivas del CAPITULO II	38
2.7. Referencias del CAPITULO II	38

### **CAPITULO III**

#### **CULTIVOS *IN VITRO* DE *A. mexicana*, UNA ALTERNATIVA BIOTECNOLOGICA PARA LA PRODUCCIÓN DE TILIANINA A PARTIR CULTIVOS DIFERENCIADOS E INDIFERENCIADOS**

3.1. Introducción	49
3.2. Hipótesis	51
3.3. Objetivos	51
3.3.1 Objetivo General	51
3.3.2. Objetivos específicos	51

---

3.4. Estrategia Experimental	52
3.5. Materiales y métodos	52
3.5.1 Material vegetal	52
3.5.2 Medios de cultivo	52
3.5.3 Germinación y Obtención de plántulas axénicas	52
3.5.4 Efecto de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP en el desarrollo morfológico	53
3.5.5 Endurecimiento y aclimatización de plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	55
3.5.6 Calogénesis	56
3.5.7 Establecimiento de Cultivos de Células en Suspensión	57
3.5.7.1 Selección de líneas celulares	58
3.5.7.2 Cinéticas de crecimiento	58
3.5.7.3 Determinación de PF y PS	58
3.5.7.4 Determinación del pH	59
3.5.7.5 Determinación del consumo de la fuente de Carbono	59
3.5.7.6 Determinación de Viabilidad celular	59
3.5.8 Inducción de raíces adventicias	59
3.6 Preparación de extractos	62
3.7 Cuantificación de tilianina por HPLC	62
3.8 Análisis mediante HPTLC	62
3.9 Resultados y discusión	62
3.9.1 Germinación y obtención de plantulas axenicas	63
3.9.2 Efecto de los reguladores en la inducción de callos y regeneración de brotes para la micropropagación de <i>A. mexicana</i>	65
3.9.3 Aclimatación de plántulas generadas <i>in vitro</i>	66
3.9.4 Establecimiento de Cultivo de Células en Suspensión	69
3.9.4.1 Cinéticas de crecimiento	72
3.9.5 Cultivo de Raíces Adventicias	79
3.9.6. Identificación de tilianina, ácido ursólico y oleanólico por HPTLC	81
3.9.7 Producción de tilianina en callos, células, raíces y brotes generados en los diferentes tratamientos	84

---

3.9.8 Determinación del contenido de tilianina	84
3.10 Conclusiones del CAPITULO III	87
3.7. Referencias del CAPITULO III	87

## **CAPITULO IV**

### **DETERMINACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE Y VASORRELAJANTE EN CULTIVOS IN VITRO Y PLANTAS SILVESTRES DE *A. mexicana***

4.1 Introducción	92
4.2. Hipótesis	93
4.3. Objetivos	93
4.3.1 Objetivo General	93
4.3.2 Objetivos específicos	93
4.4. Materiales y métodos	94
4.4.1 Material vegetal	94
4.4.2 Preparación de extractos	94
4.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante y vasorrelajante en plántulas de <i>A. mexicana</i>	95
4.4.4.1 Radical ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)	95
4.4.4.2 Poder reductor de hierro (III) o FRAP	95
4.4.4.3 Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	96
4.5 Determinación del efecto vasorrelajante en extractos de plántulas obtenidas <i>in vitro</i>	97
4.5.1 Animales	97
4.5.2 Reactivos	97
4.5.3 Obtención del tejido	97
4.5.4 Sistema de registro	97
4.5.5 Análisis estadístico	97
4.6 Resultados	98

---

4.6.1 Actividad antioxidante en plántulas de <i>A. mexicana</i> y su efecto vasorrelajante.	100
4.6.2 Efecto Vasorrelajante de los extractos metanólicos en los anillos de aorta con presencia de endotelio	102
4.7 Discusión del CAPITULO IV	104
4.8 Referencias del CAPITULO IV	105

<b>INDICE DE FIGURAS</b>		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	Compuestos derivados de plantas su producción y su uso terapéutico	
<b>Figura 2.</b>	Esquema general de la metodológica para el establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i>	11
<b>Figura 3.</b>	Estructura de tilianina	14
<b>Figura 4.</b>	Proceso de la desinfección de semillas de plantas silvestres de <i>A. mexicana</i>	15

### **INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b>	Compuestos derivados de plantas su producción y su uso terapéutico	8
<b>Tabla 2.</b>	Tratamientos con las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP en medio MS0 para la inducción de brotes en explantes de segmentos nodales y hojas de <i>A. mexicana</i>	9
<b>Tabla 3.</b>	Efecto de las concentraciones de los reguladores de crecimiento en explantes de segmento nodal para la regeneración de <i>A. mexicana</i>	14
<b>Tabla 4.</b>	Efecto de las concentraciones de los reguladores de crecimiento en explantes de hojas para la regeneración de <i>A. mexicana</i>	16

## NOMENCLATURA

<b>ABS</b>	Absorbancia
<b>Gly</b>	Glicina
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>ml</b>	Mililitros
<b>min</b>	Minutos
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mm</b>	Milímetros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RPM</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micromolar
<b><sup>13</sup>C</b>	Carbono
<b>RCV</b>	Regulador de Crecimiento vegetal
<b>MS</b>	Medio Murashige and Skoog

## CAPITULO I

### LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

#### 1.1 INTRODUCCION

Los flavonoides derivados de plantas tienen importantes actividades biológicas, como: antioxidante, cardioprotector, hepatoprotector, antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético y antihiperlipidémico, entre otras, debido a estas propiedades son utilizados para tratar una amplia variedad de enfermedades crónicas degenerativas (Kumar y Pandey, 2013; Babu y Gilber, 2013; Madrigal-Santillán *et al.*, 2013).

La tilianina es un flavonoide tipo flavona, sus actividades antiinflamatorias, vasorrelajantes y antiaterogénicas lo describen como un agente antihipertensivo (Hernández-Abreu *et al.*, 2009; Hernández-Abreu *et al.*, 2011; García-Díaz *et al.*, 2016) que contribuye a controlar enfermedades como la hipertensión arterial o la diabetes. Ambas enfermedades tienen una elevada prevalencia a nivel mundial y representan importantes factores de riesgo cardiovascular (Groop *et al.*, 2014; ISSM 2015; OMS, 2016). *Agastache mexicana* es una planta utilizada en la medicina tradicional para tratar la hipertensión, la ansiedad y otras enfermedades relacionadas; hasta ahora es la especie vegetal reportada como mayor productora de tilianina (8 mg/g de peso seco), por ello es considerada un candidato idóneo para la obtención de esta flavona (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010; Hernández-Abreu *et al.*, 2011; González-Trujano *et al.*, 2012, Zielinska *et al.*, 2014; García-Díaz *et al.*, 2016). Actualmente, la producción de tilianina a partir de *A. mexicana* está limitada, pues la variación estacional y diversos factores ambientales influyen en la obtención del material vegetal, debido a que su cultivo se realiza en pequeñas parcelas o traspatios y esto impide la homogeneidad del producto y en un futuro la comercialización de este compuesto (Estrada 1995; SAGARPA 2012; Cesáreo J. 2008; Juárez *et al.*, 2013). Una alternativa para la producción de flavonoides es mediante la Cano Asseleih 1997 síntesis química (Babii *et al.*, 2018) o a través del uso de cultivos vegetales, específicamente, cultivos de células en suspensión u órganos (Bharati *et al.*, 2014), los cuales han sido reconocidos como posibles opciones para reemplazar plantas completas como fuentes de compuestos bioactivos, con el fin de producirse a nivel industrial (Huang *et al.*, 2012; <http://www.rootec.com>).



El presente proyecto de investigación contribuye al desarrollo de un sistema de producción continua de tilianina, en él se desarrollaron protocolos para la micropropagación *in vitro*, el establecimiento de cultivos de células en suspensión y raíces adventicias de *A. mexicana*, los cuales permitieron obtener extractos metanólicos a partir del material vegetal seco; estos presentaron actividad vasorrelajante y antioxidante que se correlaciona con la presencia de tilianina, y otros metabolitos secundarios identificados en esta investigación. Así mismo, los cultivos *in vitro* generados permiten el estudio de los factores que afectan la producción de tilianina y otros compuestos de interés para los sectores farmacéutico, cosmético, alimentario y agropecuario.

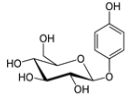
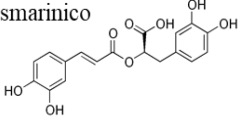
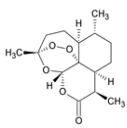
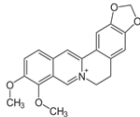
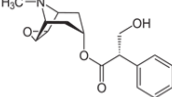
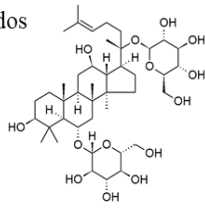
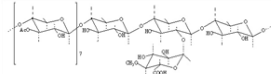
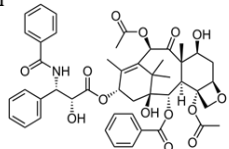
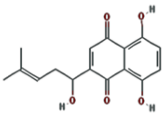
## 1.2 Producción de Compuestos Bioactivos a Partir de Plantas Medicinales

En las últimas décadas las plantas medicinales han demostrado su valor histórico como fuente de compuestos con potencial terapéutico (Kinghorn *et al.*, 2011; Newman y Cragg, 2012), los recientes avances tecnológicos y las tendencias de investigación refuerzan su uso etnofarmacológico para la obtención de nuevos fármacos terapéuticos (Fabricant y Farnsworth, 2001; Atanasov *et al.*, 2015).

La amplia diversidad química de las plantas (Cragg y Newman, 2013) producto de su metabolismo secundario, permite contar con moléculas con una gran complejidad química con mayor cantidad de anillos y centros quirales, así como un mayor número de receptores y donantes de enlaces H del tipo Lipinski, (Lipinski *et al.*, 2012, Klebe, 2009; Feher y Schmidt, 2003; Koehn y Carter, 2005; Lee y Schneider, 2001; Ortholand and Ganesan *et al.*, 2004) lo que le confiere actividades biológicas selectivas debido a afinidades de los enlaces por proteínas específicas y relevantes en su función biológica (Clardy y Walsh, 2004; Koehn y Carter, 2005), debido a ello los costos de producir medicamentos activos por vía oral suele ser mucho más bajo que la mayoría de los compuestos producidos a la fecha a partir de síntesis química (Ortholand y Ganesan, 2004).

Los compuestos derivados de plantas son generalmente moléculas capaces de ser absorbidas y metabolizadas por el cuerpo (Lahana, 1999; Myers, 1997). La diversidad química de los compuestos bioactivos permiten clasificarlos en 4 grandes grupos: alcaloides como la escopolamina y atropina, glucósidos como por ejemplo la digoxina, terpenos como artemisina y el taxol, por último, los fenilpropanoides teniendo como ejemplo a el ácido rosmarínico. Dentro de los fenilpropanoides tenemos a los flavonoides, estos tienen importantes actividades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antimutagénicas, cardioprotectoras, entre otras (Babu and Gilbert, 2013; Kumar and Pandey, 2013); por lo que son utilizados para tratar una variedad de enfermedades crónico degenerativas.

**Tabla 1.** Compuestos derivados de plantas, su producción y su uso terapéutico.

Compuesto (estructura química)	Especie de planta (referencia)	Nombre comercial (año de introducción)	Firma industrial	Indicación (mecanismo de acción)
 <p>Arbutina</p>	<i>Catharanthus roseus</i> (Inomata <i>et al.</i> , 2007)	Arbutina (2009)	Mitsui Chemical Inc (Japón)	Previene la formación de melanina (Inhibe a la tirosinasa)
 <p>Acido rosmarinico</p>	<i>Coleus brumei</i> (Ulbrich <i>et al.</i> , 1995)	Acido rosmarinico (1998)	A. Natterman and Cie GmbH (Alemania)	Antioxidante (atrapa radicales libres)
 <p>Artemisina</p>	<i>Artemisia annua</i> L. (Klayman <i>et al.</i> , 1984)	Artemisina (1987)	Yet Sanofi (Italia)	Tratamiento de la malaria (formación de radicales)
 <p>Berberina</p>	<i>Captus japonica</i> (Fujita <i>et al.</i> , 1988)	Berberine	Mitsui Chemical Inc (Japón)	Antiarrítmico (decrece la producción de ATP)
 <p>Escopolamina</p>	<i>Duboisia myoporoides</i> (Deno <i>et al.</i> , 1987)	Hioscina	Sumitomo Chemical Co Ltd (Japón)	Antiespasmódico y sedante (Depresor del sistema nervioso)
 <p>Gingenosidos</p>	<i>Panax ginseng</i> (Asaka <i>et al.</i> , 1993)	Ginseng	Nitto Denko Corporation (Japón)	Antiinflamatorio (acción sobre interleucinas 1β)
 <p>Polisacaridos de echinacea</p>	<i>Echinacea purpurea</i> (Liu <i>et al.</i> , 2006)	Echinacea	Diversa (Alemania)	Antiinflamatorio, Inmunoestimulante
 <p>Paclitaxel</p>	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt. (Wani <i>et al.</i> , 1971)	Taxol (1993), Abraxanec (2005), Nanoxelc (2007).	Phyton Biotech (USA), Samyang Genex (Corea)	Anticancerígeno (inhibidor mitótico)
 <p>Shikonina</p>	<i>Lythospermom erythorom</i> (Fujita <i>et al.</i> , 1988)		Mitsui Chemical Inc (Japón)	Anticancerígeno Antimicrobiano

Fuentes: Newman y Cragg, 2012; Atanasov *et al.*, 2015

### 1.3 Antecedentes generales de plantas del género *Agastache* y sus compuestos bioactivos

Las plantas del género *Agastache* comprenden 22 especies de planta aromáticas perennes, que pertenecen a la familia de las Lamiaceas (Fuentes-Granados *et al.*, 1998), de las cuales *A. urticifolia*, *A. occidentalis*, *A. parvifolia*, *A. cusickii*, *A. rugosa* y *A. scrophulariifolia* son las más estudiadas (Zilienska *et al.*, 2014). Son conocidas de forma general como “hisopo gigante”, utilizadas como fuente de aceites esenciales, drogas, especias, nectaríferas en la apicultura o como ornamentales, siendo este último el uso más común ([www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)- consultado el 1 de enero del 2019). Sus estudios se centran en el área fitoquímica y farmacológica lo que soporta y le da validez a su uso dentro de la medicina tradicional (Zilienska *et al.*, 2014). El perfil fitoquímico de estas especies es similar y consta de 2 clases principales: fenilpropanoides y terpenoides; dentro de los compuestos fenólicos se encuentran aquellos derivados del ácido cafeico tales como ácido rosmarínico y algunas flavonas como acetina, tilianina, agastachosidos y agastachin una rara flavona malonil dimerica (Itokawa *et al.*, 1981; Ganeva *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995, 2002, 2007, 2008; Kim *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2008, Hernández-Abreu *et al.*, 2009, 2011, 2013; González-Trujano *et al.*, 2012). También se han encontrado dos compuestos únicos de tipo lignano: agastenol y agastinol (Lee *et al.*, 1995, 2002). Entre los terpenoides se incluyen aquellos del tipo oleanano como el ácido maslinico, ácido oleanolico y la  $\beta$ -amirina, los de tipo ursano como el ácido ursolico, ácido corosolico y el  $\alpha$ -amirina; algunos esteroides y novedosos diterpenos encontrados en las raíces de *Agastache rugosa* de coloración roja tipo abietano como agastaquinona, agastol (Lee *et al.*, 1995), oxidados como dehydroagastol, isoagastol (Han *et al.*, 1987; Zou and Cong 1991) agastona y metilagastanol (Lee *et al.*, 1994). Estas raíces también contienen diferentes triterpenos carboxilados e hidroxilados de tipo oleanano como el ácido maslinico, ácido oleanolico, 3-O acetil oleanolico aldehído, y de tipo ursano como el ácido corosolico y los esteroides sitosterol y daucosterol (Han *et al.*, 1987; Zou and Cong 1991; Estrada-Reyes *et al.*, 2004). El ácido ursolico ha sido aislado de partes aéreas de *A. mexicana* (Verano *et al.*, 2013).  $\beta$ -amirina y  $\alpha$ -amirina fueron aislados de partes aéreas de *A. foeniculum* junto con numerosos esteroides como el campesterol, campestanol, sitosterol, estigmasterol, estigmastanol (Ganeva *et al.*, 1994; Zou and Cong, 1991). Dentro del género *Agastache* resalta la presencia ubicua de terpenoides pentacíclicos y esteroides, sin embargo, a la fecha no se documentan datos cualitativos ni cuantitativos de ello.

La mayoría de las especies de *Agastache* contienen también aceites esenciales tales como estragol, metileugenol, pulegona, mentona, isomentona y espatulenol (Svoboda *et al.*, 1995; Estrada-Reyes *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2009; Skakovskii *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Los contenidos de los aceites esenciales dependen del tiempo de cosecha y las condiciones ambientales durante el cultivo, el porcentaje más alto obtenido en *A. mexicana* y *A. rugosa* fue durante la etapa inicial de desarrollo, para el caso de *A. foeniculum* fue durante el periodo de floración. *A. rugosa* y *A. scrophulariifolia* crecen y generan un mayor rendimiento de aceite esencial a temperaturas más frías durante el verano, contrariamente *A. foeniculum* y *A. urticifolia* que prefieren condiciones más calidas para su desarrollo y floración produciendo solo muy poca cantidad de aceites esenciales (Svoboda *et al.*, 1995; Omidbaigi and Mahmoodi, 2010; Omidbaigi *et al.*, 2008; Omidbaigi and Sefidkon, 2004; Suchorska-Tropito and Pioro-Jabrucka 2004; Rudik *et al.*, 2013).

### **1.3.1 Actividad farmacológica en el género *Agastache*.**

Solo en 3 especies de las 22 de este género han sido ampliamente estudiadas en cuanto a su actividad farmacológica: *A. rugosa*, *A. mexicana*, y *A. foeniculum*, siendo la primera la más estudiada debido a sus múltiples usos en la medicina tradicional china (Holmes *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013).

La actividad *in vitro* e *in vivo* de diversos extractos o compuestos individuales de especies incluyen antimicrobianos, antivirales y antimutagenicos, así como la actividad citotóxica en líneas de células cancerígenas, antiaterogenico, antioxidante y biocida en plagas de productos alimenticios (Cano Asseleih *et al.*, 1997; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010; González-Trujano *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2004; Shin and Kang 2003; Ownagh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Ishitsuka *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 1999, 2001; Guo *et al.*, 2011). Sus efectos cardiovasculares y antiinflamatorio son ampliamente estudiados en dos especies en particular *A. rugosa* y *A. mexicana*, donde tilianina es utilizada de forma aislada o como marcador fitoquímico en extractos o fracciones, de los cuales mantienen un efecto positivo en las primeras etapas de aterosclerosis (Hong *et al.*, 2001) y un efecto vasorrelajante e hipotensor en los extractos de *A. mexicana* (Hernández-Abreu *et al.*, 2009,2011,2013).

#### **1.4 Aplicación de la Biotecnología Vegetal para la Producción Compuestos Bioactivos**

La búsqueda de alternativas que permitan la producción de compuestos bioactivos puros para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos conduce al desarrollo de sistemas biotecnológicos alternativos. Una forma es mediante las técnicas de cultivo de tejidos y células vegetales (CCV). El concepto de cultivo de células y tejidos vegetales es amplio y se puede definir como la técnica de crecer células, órganos, protoplastos, embriones, tejidos o plántulas, en condiciones controladas *in vitro*. Su aplicación abarca tres principales aspectos: la producción de compuestos bioactivos, micropropagación y la realización de estudios genéticos, fisiológicos, bioquímicos y de patología de las células vegetales (Zhong *et al.*, 2001).

Totipotencialidad y plasticidad son conceptos básicos para el CCV ya que las plantas tienen la capacidad (totipotencia) de iniciar la división celular de casi cualquier tejido y lograr una regeneración total de tejidos, órganos o de un organismo completo. Este fenómeno sucede debido a que las plantas pueden, con el estímulo adecuado, expresar el potencial genético total de la planta madre (Fehér *et al.*, 2015; Verdeil *et al.*, 2007).

Para iniciar un CCV es necesario contar con material vegetal de la especie seleccionada y a partir de este obtener brotes, callos (conjunto de células vegetales no diferenciadas que crecen formando agregados amorfos), células o raíces los cuales se desarrollan en un medio de cultivo apropiado previamente seleccionado y provienen de órganos o tejidos diferenciados de la planta en estudio. Para inducir y mantener esta “desdiferenciación” es necesario manipular los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) del medio de cultivo. (Chawla *et al.*, 2011; Altman *et al.*, 2019)

Los RCV son moléculas que a bajas concentraciones regulan procesos fisiológicos en las plantas de manera natural, los cuales actúan como mensajeros químicos regulando no solo su crecimiento y desarrollo si no también su respuesta a señales ambientales. Este es un punto crítico en el establecimiento de un cultivo *in vitro* y su éxito dependerá de la fuente del explante, así como del tipo y concentración de RCV utilizados (Dixon, 1995), los cuales se aplican de forma exógena siendo utilizados auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico entre otros, dependiendo del tipo de respuesta que se quiera obtener.

Las auxinas como citocininas son necesarias para la generación de tejidos diferenciados y/o desdiferenciados, esto se debe a que existe una interacción que controla estos procesos, por lo que es importante determinar un balance adecuado entre auxinas/citocininas, que resulta específico de acuerdo al tipo de especie que se estudia (Phillips and Garda, 2019).

Los cultivos de brotes, callos, células y/o raíces son una alternativa para la producción de compuestos con actividad biológica (Bourgaud *et al.*, 2001). Para iniciar estos cultivos se utilizan medios que les permitan la organogénesis vía directa o indirecta, la proliferación de biomasa y la producción de compuesto de interés, se pueden transferir a medio líquido en agitación constante para continuar con su crecimiento e incluso escalar a biorreactores industriales.

A pesar de las ventajas de la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* vegetales, solo unos pocos compuestos bioactivos han sido producidos a escala comercial. La farmacéutica Pfizer fue una de las pioneras en obtener una patente en el cultivo de tejidos vegetales (Lombardino., 2000), Mitsui Petrochemical Co también consideraron estos procesos con el fin de comercializar sus productos: shikonina y berberina, los cuales a pesar de contar con propiedades medicinales antiinflamatoria y antimicrobiana no fueron un caso de éxito (Fujita *et al.*, 1985). Contrariamente Phyton Inc en colaboración con Bristol Myers Squibb desarrollan un proceso mediante el uso de células en suspensión para la producción de Paclitaxel (taxol®) un anticancerígeno que fue aprobado para uso clínico contra el cáncer de ovario en 1992 y contra el cáncer de mama en 1994. Sus ventas anuales de más de \$1 mil millones USA, se reparten entre un número significativo de empresas (Stafford *et al.*, 1998; Cragg y Newman., 2013). Ácido rosmarínico, artemisina, escopolamina, gíngenosidos y polisacáridos de echinacea, también han sido del interés de las industrias ya que en muchos casos se obtienen ventajosamente en los cultivos vegetales (Stafford *et al.*, 1998; Rao y Ravishankar, 2002; Newman y Cragg, 2012).

## 1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., & Rollinger, J. M. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
2. Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(11), 1777-1789.
3. Bharati, A. J., & Bansal, Y. K. 2014. In vitro production of flavonoids: A review. *WJPPS*, 3(6), 508-533.
4. Cragg, G. M., & Newman, D. J. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
5. Dixon, R. A., & Pasinetti, G. M. 2010. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*, 154(2), 453-457.
6. Estrada L.E. 1995. Cultivo de Plantas Medicinales. Una urgencia latinoamericana. En. Estrada (Ed). *Plantas Medicinales de México*. 2ª Ed. UACH. México
7. FUJITA, Y. 1985. Production of plant pigments by plant tissue and cell culture. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 43(11), 1003-1012.
8. García-Díaz JA, Navarrete-Vázquez G, García-Jiménez S, Hidalgo-Figueroa S, Almanza-Pérez JC, Alarcón-Aguilar FJ, Gómez-Zamudio J, Cruz M, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2016. Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. Jul 26;83:667-675. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07
9. González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. 2012. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med*. 2012 May;78(8):793-6. doi: 10.1055/s-0031-1298416.
10. Groop L. L. Pociot F. 2014. Genetics of diabetes- are we missing the genes or the disease? *Mol. Cell Endocrinol*. 382 (2014) 726-739.
11. Kinghorn, A.D., Pan, L., Fletcher, J.N., Chai, H., 2011. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod*. 74, 1539–1555.
12. Kumar, S., & Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
13. Hernández-Abreu O, Durán-Gómez L, Best-Brown R, Villalobos-Molina R, Rivera-Leyva J, Estrada-Soto S. 2011. Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *J Ethnopharmacol*. 2011 Nov 18;138(2):487-91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.
14. Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol*. 2009 Jul 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016



15. Huang, T. K., & McDonald, K. A. 2012. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology advances*, 30(2), 398-409.
16. Lahana, R. 1999. How many leads from HTS. 447-448.
17. Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Cruz-Jaime, S., del Carmen Valadez-Vega, M., Sumaya-Martínez, M. T., Pérez-Ávila, K. G., & Morales-González, J. A. 2013. The chemoprevention of chronic degenerative disease through dietary antioxidants: progress, promise and evidences. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*. InTech.
18. Myers, P. L. 1997. Will combinatorial chemistry deliver real medicines. *Current opinion in biotechnology*, 8(6), 701-707.
19. Newman, D. J., & Cragg, G. M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
20. Ortholand, J. Y., & Ganesan, A. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current opinion in chemical biology*, 8(3), 271-280.
21. Stafford, A. M., Pazoles, C. J., Siegel, S., & Yeh, L. A. 1998. Plant cell culture: a vehicle for drug delivery. *Advances in drug discovery techniques*. CRC Press, New York
22. Zielińska, S., & Matkowski, A. (2014). Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry reviews*, 13(2), 391-416.
23. OMS 2016. Informe mundial sobre la diabetes 2016. www.WHO/NMH/NVI/16.3
24. ISSM 2015 Informe sobre la salud de los mexicanos 2015. Secretaria de salud, México. www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dedss/issm2015.html
25. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SAGARPA). Agricultura protegida 2012 [Consultado 2012 agosto 17]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura-Protegida2012.aspx>
26. Juárez Rosete, C. R., Aguilar Castillo, J. A. Juárez Rosete, M. E., Bugarin Montoya, R., Juárez Lopez, P., & Cruz Crespo, E. L. I. A. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación.
27. Cesario, J. C. 2008. Tecnología de producción de plantas medicinales y aromáticas. SAGARPA-INIFAP
28. Cano Asseleih L (1997) Flora medicinal de Veracruz. I. Inventario Etnobotánico. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico
29. Babii, C., Mihalache, G., Bahrin, L. G., Neagu, A. N., Gostin, I., Mihai, C. T., ... & Stefan, M. 2018. A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action. *PLoS one*, 13(4), e0194898.
30. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
31. Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 69-75.
32. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 4-17.

33. Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(3), 206.
34. Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6185-6205.
35. Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*, 7(2), 66-76.
36. Zhong, J. J. (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In *Plant cells* (pp. 1-26). Springer, Berlin, Heidelberg.
37. Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
38. Verdeil, J. L., Alemanno, L., Niemenak, N., & Tranbarger, T. J. (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?. *Trends in plant science*, 12(6), 245-252.
39. Altman, A. Plant tissue culture and biotechnology: perspectives in the history and prospects of the International Association of Plant Biotechnology (IAPB).2019 In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-5.
40. Chawla, H. (2011). *Introduction to Plant Biotechnology (3/e)*. CRC Press
41. Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3), 242-257.
42. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
43. Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
44. Lombardino, J. G. (2000). A brief history of Pfizer Central Research. *Bull. Hist. Chem*, 25(10).
45. Klebe, G. (2000). Recent developments in structure-based drug design. *Journal of Molecular Medicine*, 78(5), 269-281
46. Feher, M., & Schmidt, J. M. (2003). Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43(1), 218-227.
47. Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4(3), 206.
48. Lee, M. L., & Schneider, G. (2001). Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *Journal of combinatorial chemistry*, 3(3), 284-289.
49. Lee, M. L., & Schneider, G. (2001). Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *Journal of combinatorial chemistry*, 3(3), 284-289.
50. Ortholand, J. Y., & Ganesan, A. (2004). Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current opinion in chemical biology*, 8(3), 271-2
-



## CAPITULO II

### **IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TILIANINA DURANTE LAS ETAPAS VEGETATIVA Y DE FLORACION DE *Agastache mexicana***

#### **2.1 INTRODUCCION**

*Agastache mexicana* subsp. *mexicana* es una hierba perenne aromática y medicinal de la familia Lamiaceae. La especie crece naturalmente en el eje volcánico transversal del centro de México, y florece entre los meses de septiembre a diciembre (Bye *et al.* 1995). En México *A. mexicana* se recolecta en hábitats de bosques silvestres y se cultiva en huertos familiares. La infusión o maceración en agua, e incluso en etanol, de sus partes aéreas o solo de las inflorescencias se utiliza principalmente para el tratamiento del insomnio, la ansiedad y la hipertensión. Además, la medicina popular lo recomienda para el tratamiento del asma, los síntomas reumáticos y las afecciones gastrointestinales como el dolor de estómago (Ventura-Martínez *et al.*, 2017). En experimentos farmacológicos, el extracto metanólico de las partes aéreas de la planta tuvo una actividad vasorrelajante (Hernández-Abreu *et al.* 2009; 2011), lo que avalan el uso de *A. mexicana* como alternativa a la medicina convencional en el tratamiento de enfermedades del sistema cardiovascular. Los extractos metanólicos e hidroalcohólicos de esta planta son fuente importante de metabolitos secundarios bioactivos, como la tilianina, apigenina, acetina, quercetina, ácido ursólico y ácido oleanólico, por lo que *A. mexicana* puede servir de base para el desarrollo de fitomedicamentos. Sin embargo, la calidad intrínseca de los compuestos bioactivos para la producción de medicamentos basados en hierbas medicinales, constituye un gran desafío, debido a que el contenido de los metabolitos secundarios puede variar durante el desarrollo de la planta y depende del ambiente y las condiciones de cultivo. En este contexto, el propósito del capítulo es presentar los resultados del análisis de la variación del contenido de los flavonoides y terpenos bioactivos antes mencionados, en diferentes partes de la planta en su etapa vegetativa y de floración.

## 2.2 Variación del Contenido de Compuestos Bioactivos en el Género *Agastache*

Las plantas del género *Agastache* comprenden 22 especies de planta aromáticas perennes, que pertenecen a la familia de las Lamiaceas (Fuentes-Granados *et al.*, 1998), de las cuales *A. urticifolia*, *A. occidentalis*, *A. parvifolia*, *A. cusickii*, *A. rugosa* y *A. scrophulariifolia* son las más estudiadas (Zielinska *et al.*, 2014). Estas especies son conocidas, de forma general como “hisopo gigante” y son utilizadas como fuente de aceites esenciales, drogas, especias, nectaríferas en la apicultura o como ornamentales, siendo este último el uso más común ([www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)- consultado el 1 de enero del 2019). El perfil fitoquímico de estas especies es similar y consta de 2 clases principales: fenilpropanoides y terpenoides; dentro de los compuestos fenólicos se encuentran aquellos derivados del ácido cafeico, tales como, el ácido rosmarínico y algunas flavonas, como: acacetina, tilianina, agastachosidos y agastachina; una rara flavona malonil dimérica (Itokawa *et al.*, 1981; Ganeva *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995, 2002, 2007, 2008; Kim *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2008, Hernández-Abreu *et al.*, 2009, 2011, 2013; González-Trujano *et al.*, 2012). También se han encontrado dos compuestos únicos de tipo lignano: agastenol y agastinol (Lee *et al.*, 1995, 2002). Entre los terpenoides se incluyen aquellos del tipo oleanano como el ácido máslínico, ácido oleanólico y la  $\beta$ -amirina, los de tipo ursano como el ácido ursólico, ácido corosólico y el  $\alpha$ -amirina; algunos esteroides y novedosos diterpenos encontrados en las raíces de *Agastache rugosa* de coloración roja tipo abietano como agastaquinona y agastol (Lee *et al.*, 1995), oxidados como dehydroagastol, isoagastol (Han *et al.*, 1987; Zou y Cong 1991), agastona y metilagastanol (Lee *et al.*, 1994). Las raíces contienen diferentes triterpenos carboxilados e hidroxilados de tipo oleanano como el ácido máslínico, ácido oleanólico y 3-O acetil oleanólico aldehído, además de ácido corosólico, sitosterol y daucosterol (Han *et al.*, 1987; Zou y Cong 1991; Estrada-Reyes *et al.*, 2004). El ácido ursólico ha sido aislado de partes aéreas de *A. mexicana* (Verano *et al.*, 2013). La  $\beta$ -amirina y  $\alpha$ -amirina fueron aislados de partes aéreas de *A. foeniculum* junto con numerosos esteroides como el campesterol, campestanol, sitosterol, estigmasterol, estigmastanol (Ganeva *et al.*, 1994; Zou y Cong, 1991).

Dentro del género *Agastache* resalta la presencia ubicua de terpenoides pentacíclicos y esteroides, sin embargo, a la fecha no se documentan datos cualitativos ni cuantitativos de ello.

La mayoría de las especies de *Agastache* contienen también aceites esenciales, tales como: estragol, metileugenol, pulegona, mentona, isomentona y espatulenol (Svoboda *et al.*, 1995; Estrada-Reyes *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2009; Skakovskii *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Los contenidos de los aceites esenciales dependen del tiempo de cosecha y las condiciones ambientales durante el cultivo, el porcentaje más alto obtenido en *A. mexicana* y *A. rugosa* fue durante la etapa inicial de desarrollo, sin embargo, en el caso de *A. foeniculum* el máximo contenido se detectó durante el periodo de floración. *A. rugosa* y *A. scrophulariifolia* son especies que crecen y generan un mayor rendimiento de aceite esencial a temperaturas más frías, contrariamente *A. foeniculum* y *A. urticifolia* prefieren condiciones más cálidas para su desarrollo y floración, produciendo solo muy poca cantidad de aceites esenciales (Svoboda *et al.*, 1995; Omidbaigi y Mahmoodi, 2010; Omidbaigi *et al.*, 2008; Omidbaigi y Sefidkon, 2004; Suchorska-Tropito y Pioro-Jabrucka, 2004; Rudik *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Flavonoides y terpenos identificados en *Agastache*.

FENILPROPANOIDES	TERPENOS	ACEITES ESCENCIALES	LIGNANOS
Ácido cafeico	Ácido maslínico**	Estragol	Agastenol
Ácido rosmarínico	Ácido oleanólico**	Metil eugenol	Agastinol
Acacetina*	$\beta$ -amirina**	Pulegona	
Tilianina*	Ac ursólico***	Mentona	
Agastachosidos*	Ac corosolico***	Isomentona	
Agastachina*	$\alpha$ -amirina***	espatulenol	

Flavonas\*; Derivados de la serie del Oleano\*\*; Derivados del ursano\*\*\*.

### 2.2.1 Química, propiedades y funciones de los flavonoides

Los flavonoides son sustancias biológicamente activas con actividades antivirales antibacteriales, anticancerosas, antiinflamatorias, antialérgica, vasodilatadora, anticancerígena, antioxidante y adicionalmente, se ha demostrado que los flavonoides inhiben la peroxidación lipídica, agregación plaquetaria, apoptosis, pueden modular enzimas y receptores celulares, por mencionar solo algunas (Tapas *et al.*, 2008; Benavente-García y Castillo, 2008; Cook y Samman, 1996; Nijveldt *et al.*, 2001). En la naturaleza se encuentran en gran diversidad de especies vegetales, desde musgos hasta angiospermas (Iwashina *et al.*, 2000 Saunders *et al.*, 1976), los cuales están involucrados en una amplia gama de funciones, como en la pigmentación de las flores, frutos y semillas para atraer polinizadores y dispersores de semillas, en la protección contra la luz ultravioleta, en la defensa de las plantas contra microorganismos patógenos, en la germinación del polen y en la activación de señales moleculares entre plantas y microorganismos. Hasta la última década se habían descrito más de 6,000 flavonoides (Marais *et al.*, 2001; Panche *et al.*, 2016; Dixon y Pasinetti, 2010).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, a nivel celular son localizados en estructuras cloroplásticas y mantienen un flujo dinámico en toda la planta (Zhao *et al.*, 2015; Agati *et al.*, 2012; Scheid *et al.*, 2004;). Su estructura básica 2-fenil-benzo- $\gamma$ -pireno (anillos A, C y B) que difieren en el arreglo de grupos hidroxilo, metoxi y cadenas glicosídicas (glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa o arabinosa) en la posición 3 o 7 de la molécula dando origen a flavonas, flavonoles y flavanonas; los cuales destacan farmacológicamente ya que presentan baja toxicidad e interactúan con enzimas como las ciclooxigenasas y fosfodiesterasas entre otras (Kumar *et al.*, 2013). Dentro de sus propiedades químicas destacan su solubilidad en compuestos polares como agua y etanol, su carácter fenólico le permite la absorción en la región ultravioleta y el espectro visible, debido a la presencia de sus estructuras aromáticas conjugadas (Mabry *et al.*, 2012).

### 2.3 *Agastache mexicana*

*Agastache mexicana* (Kunth) E.F. Linton & Epling (sinonimia: *Cedronella mexicana* (Kunth) Benth) es endémica de México y pertenece a la familia Lamiaceae. Es una herbácea de ciclo anual, aromática; de tallos cuadrados y erectos, llega a medir desde 45 a 150 cm. Tiene hojas dentadas y lanceoladas. Sus inflorescencias se desarrollan de 15 a 20, sus flores son bilabiadas y tubulares, que van del color rojo intenso a púrpura. Cada flor contiene una núcula elipsoidal a ovoide, la cual contiene un embrión. Crece en los bosques de pino-encino de forma silvestre y es cultivada en huertos familiares. *A. mexicana* se distribuye principalmente en los estados de Michoacán, Guerrero, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México y Morelos (Santillan-Ramírez, 2008).



Es conocida dentro de la medicina tradicional como: toronjil morado, tlahuehuetl, toronjil mexicano, olotillo, abejera y melisa. En el estado de Morelos se usa como antiespasmódico, ansiolítico, para problemas de digestión, dolor de cabeza, vómito, piquete de alacrán, mal de ojo, presión elevada, entre otros (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007).

**Figura 1** *Agastache mexicana* especie endémica de México, espécimen depositado en el herbario de la UAEM, voucher No 35766.

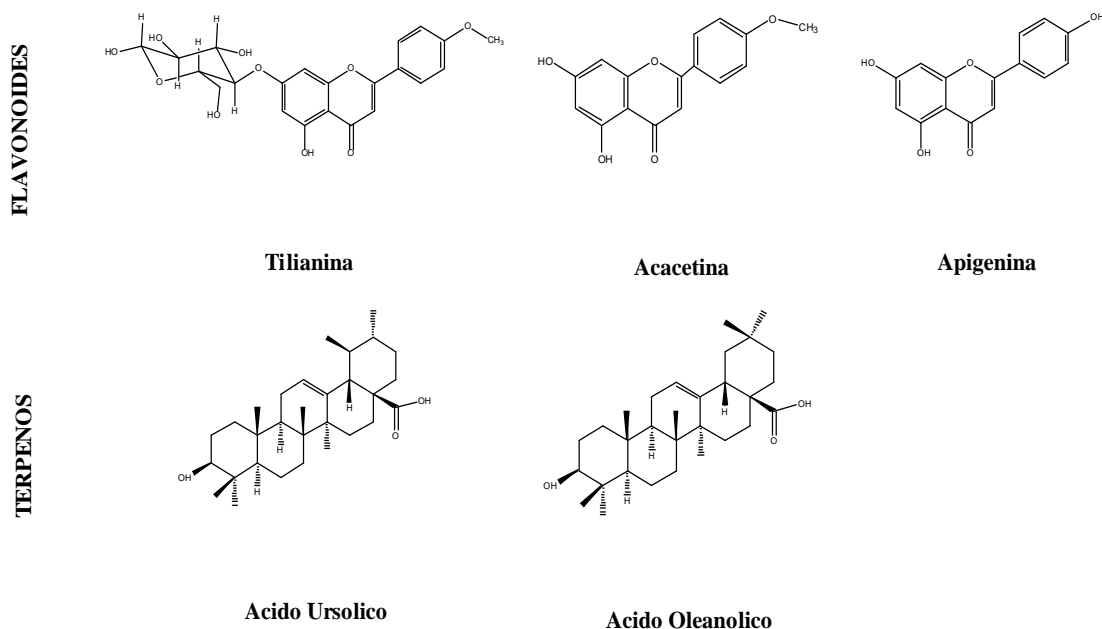


### 2.3.1 Compuestos aislados de *Agastache mexicana*

Los diversos estudios fitoquímicos revelan compuestos clasificados en dos grupos principales: compuestos volátiles como aceites esenciales y no volátiles como fenilpropanoides y terpenoides. Monoterpenos como el camfeno- $\beta$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol, furfural, citronelal y mentona se obtienen con un rendimiento de 1.45% v/w en peso seco (Svoboda *et al.*, 1995), metil chavicol, linanol y D-limoneno son encontrados como compuestos mayoritarios en sus aceites esenciales, los cuales son extraídos a partir de técnicas de hidrodestilación con solventes orgánicos como hexano, etanol, acetato de etilo y agua (Santiago *et al.*, 2005, González-Trujano *et al.*, 2012, Estrada-Reyes *et al.*, 2014), estos son producidos en mayor cantidad durante la fase de floración y decrecen en la fase de senescencia (Svoboda *et al.*, 1995). También presenta compuestos no volátiles como el terpeno denominado pulegona, y los flavonoides como apigenina, luteolina, diosmetina y tilianina (Lara y Márquez, 1996; Fuentes-Granados *et al.*, 1998). En extractos metanólicos de plantas silvestres de *A. mexicana*, la tilianina es considerada uno de los compuestos mayoritarios en esta especie (Hernández-Abreu *et al.*, 2009; Hernández-Abreu *et al.*, 2011). Estudios recientes confirman que otros compuestos como acacetina, apigenina, ácido ursólico y oleanólico también se encuentran presentes en esta especie (Cruz Torres comunicación personal; mayo de 2018 Facultad de Farmacia, UAEM).

**Tabla 2.** Compuestos activos identificados en *A. mexicana*

Parte de la Planta	Extracto/Compuesto activo	Efecto	Autor
Parte aérea (Hoja, Tallo, Flor)	Extractos metanólicos/tilianina,	Antihipertensivo (vasorrelajante)	Hernández-Abreu <i>et al.</i> , 2009, 2011, 2012.
Hojas	Extractos acuosos	Reduce fiebre, síntomas premenstruales.	Cano Asseleih <i>et al.</i> , 1997.
Hojas	Extractos acuosos	Antidepresivo y ansiogénico	Molina-Hernández <i>et al.</i> , 2000.
Planta completa	Extractos acuosos	Vasoactivo, antioxidante	Ibarra-Alvarado <i>et al.</i> , 2010.
Inflorescencias	Ácido ursólico, acacetina	Espasmolítico y antinociceptivo	González-Trujano <i>et al.</i> , 2012.
Parte aérea (Hoja, Tallo, Flor)	Ácido ursólico	Antinociceptivo	Verano <i>et al.</i> , 2013.

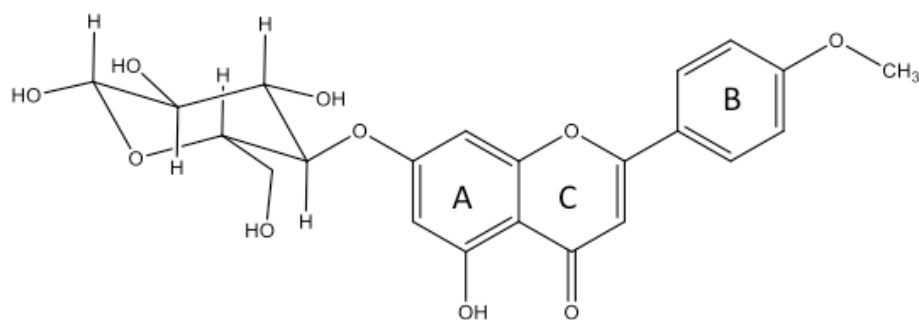


**Figura 2** Flavonoides y terpenos, aislados de plantas colectadas en campo de *A. mexicana* en donde en su estructura se observan los anillos característicos en cada familia de compuestos. Fuentes: Pubchem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Los químicos de productos naturales y los médicos tienen gran interés en tilianina debido a sus importantes actividades biológicas como antiaterogénico, antiinflamatorio y sus efectos antihipertensivos y vasorelajantes (Hong *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2006; Hernández-Abreu *et al.*, 2009).

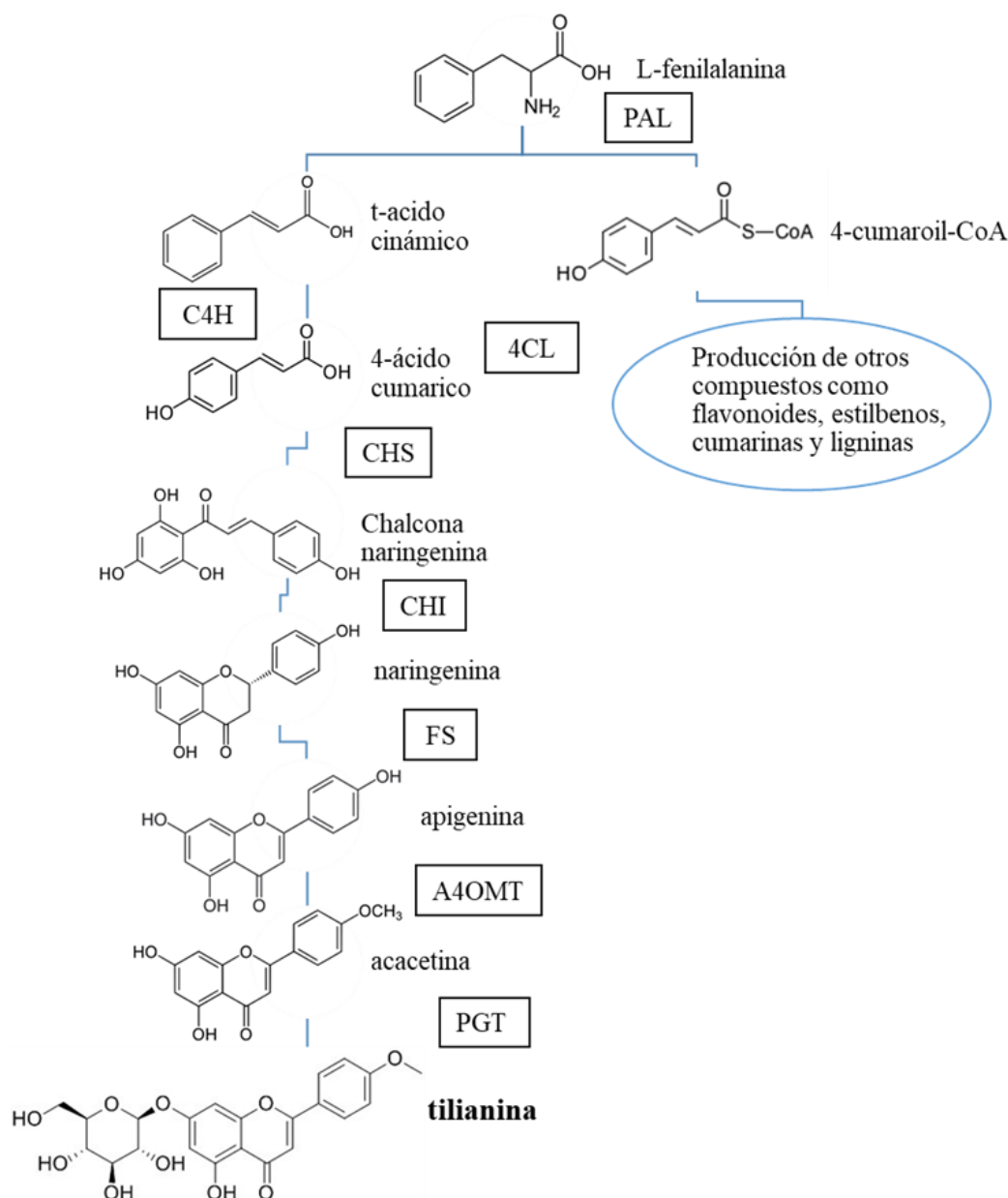
## 2.4 Tilianina

La tilianina es una flavona glicosilada en la posición 7 del anillo A (Figura 2) conocida como 7-O-glicosido de acacetina, su fórmula molecular es  $C_{22}H_{22}O_{10}$ , de acuerdo a su estructura química tiene la capacidad de donar 5 puentes de H y aceptar 10 (NCBI, Pubchem; 2018), lo cual favorece su polaridad y le permite ser soluble solo en solventes orgánicos (e.g. agua, metanol); la glicosilación le proporciona una mayor solubilización en agua (Medic-Sarc *et al.*, 2008).



**Figura 3** Estructura de tilianina donde se muestran los anillos A, B y C de la flavona y la glicosilación en la posición 7 del anillo A.

Siendo un fenilpropanoide se sintetiza a partir de la ruta del ácido shikímico y del mevalonato, estas reacciones son catalizadas por enzimas como la fenilamonioliasa (PAL) y las chalconas isomerasa y sintasa (Pham *et al.*, 2012). Esta ruta biosintética se muestra en la Figura 3, donde en la reacción I. el aminoácido L-fenilalanina es el compuesto iniciador para la biosíntesis, el cual es transformado a 4-cumaroil-CoA por la acción de 3 enzimas: la enzima fenil amonio-liasa (PAL), cinnamato 4-hidroxilasa (C4H) y la 4-cumurato: CoA ligasa (4CL). En la reacción II La chalcona sintasa (CHS) es un catalizador en la reacción de condensación de 4-cumaroil-CoA y 3 moléculas de malonil CoA mediante una isomerización para producir la chalcona naringenina. En la reacción III la chalcona isomerasa (CHI) convierte la chalcona naringenina a naringenina mediante una estereoisomerización específica. La reacción IV esta catalizada por la flavona sintasa (FS) quien desatura a la naringenina para derivar a la molécula apigenina. Posteriormente en la siguiente reacción (V) la enzima 4-O-metiltransferasa (A4OMT) transfiere un grupo metilo a apigenina para producir acetina. En la reacción final (VI) una glucosiltransferasa (GT) transfiere una glucosa a la molécula de acetina para sintetizar tilianina como producto terminal.



**Figura 4** Ruta biosintética propuesta para el flavonoide Tilianina. Enzimas: PAL, fenilalanina amonioliasa; C4H, cinamato 4 hidroxilasa; 4CL, 4-cumaroil-CoA ligasa; CHS, chalcona sintasa; CHI chalcona isomerasa; FS, flavona sintasa; A4OMT, apigenin 4-O-metil transferasa; GT, glucosil transferasa. Adaptado de Pham *et al.*, 2012.

Dentro de las actividades biológicas reportadas para tilianina se conocen sus efectos sedantes y anti-convulsivos (Zielinska & Matkowski 2014; Gálvez *et al.*, 2015), además se ha documentado que ejerce un efecto antidiabético, antihiperlipidémico y antiinflamatorio (García-Díaz *et al.*, 2016) así

como sus efectos terapéuticos contra la angina de pecho y la isquemia de tipo miocárdico (Gálvez *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2016).

Estudios previos realizados por el grupo de investigación del Dr. Estrada Soto mostraron de manera funcional que la tilianina aislada de *A. mexicana* presenta un efecto vasorrelajante a través de la producción de óxido nítrico y por apertura de canales de potasio, además de un efecto antihipertensivo sostenido en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), sin afectar la frecuencia cardíaca. Además, tilianina es un flavonoide no tóxico de interés por su alto rendimiento de extracción en *A. mexicana*, superior al 0.25% del peso total (Hernández-Abreu *et al.*, 2009, 2011, 2013).

Por otro lado, en el 2011 se reportó el desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), en fase normal, para la cuantificación de tilianina en diferentes extractos de *A. mexicana*. El método presentó linealidad, exactitud y selectividad para la cuantificación de tilianina (metabolito secundario mayoritario de *A. mexicana*). Se determinó que la tilianina se encuentra en mayor concentración en el extracto metanólico obtenido vía maceración, lo cual representa una aportación importante en el control de calidad de esta especie vegetal para fines de estandarización de un fitofármaco que contenga tilianina y su producción a nivel industrial (Hernández-Abreu *et al.*, 2011).

### 2.4.1 Producción de tilianina

La tilianina es producida en especies de lamiaceas como *Dracocephalum moldavica* (cabeza de dragón azul o toronjil azul), *Agastache rugosa* (menta coreana), *Agastache mexicana subespecie xocolotziana* (toronjil blanco), *Prunella vulgaris* (consuelda) y *Pogostemon cablin* (patchouli). La producción a gran escala de tilianina es difícil de obtener (5mg= USD 472/ \$9227.60 MN Co. ChemFaces <http://www.chemfaces.com/> 2018) debido a que solo se produce en algunas plantas cuyo contenido es bajo (Zielinska y Matkowski, 2014), presenta dificultades para su obtención mediante síntesis química debido a sus múltiples anillos y centros quirales (Cui *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Por lo tanto, es necesario desarrollar un esquema eficiente y práctico para la producción de tilianina.

### 2.4.2 Tilianina, propiedad industrial, patentes relevantes

Dentro del estado del arte, existen al menos nueve patentes sobre el desarrollo de métodos para la extracción eficiente de tilianina y el desarrollo de fórmulas para el cuidado de la piel que contienen este compuesto. En la tabla 3 se observa el número de registro con la fecha de publicación, el nombre de la patente, así como una breve descripción de la misma.

**Tabla 3.** Patentes relacionadas con tilianina.

Registro	Nombre la patente	Inventión
CN102860982 (A) 2013-01-09 CN102860982 (B) 2014-08-20	Microemulsión compuesta de tilianina	Describe una composición de microemulsión que contiene tilianina, un emulsionante (aceite y agua), puede aumentar en gran medida la solubilidad de la tilianina.
CN101781345 (A) 2010-07-21 CN101781345 (B) 2012-07-04	Método para la preparación de tilianina	La tilianina preparada por el método tiene alta pureza y alto rendimiento (99% y 76.3%).
US2008081081 (A1) 2008-04-03 US7534456 (B2) 2009-05-19	Un extracto de <i>Agastache rugosa</i> que contiene tilianina, que tiene actividad anti-inflamatoria y anti-aterogénica	Se obtiene, por separación-purificación para prevención y tratamiento de aterosclerosis relacionada con las respuestas inflamatorias y la enfermedad en el sistema circulatorio.
KR20080049352 (A) 2008-06-04 KR100851489 (B1) 2008-08-08	Una composición cosmética que contiene tilianina o acetina	Para el envejecimiento, se prepara mediante hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática de un extracto de <i>Teucrium veronicoides</i> .
KR100807645 (B1) 2008-02-28	Composición del tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales y el método de preparación.	Comprende un extracto alcohólico de <i>A. rugosa</i> (tilianina, acetina o agastachosida). Un método para preparar la composición comprende las etapas de: (a) extracción con agua o alcohol a 90-100 grados durante 3-7 horas; (b) filtrar el extracto; (c) concentrar el filtrado bajo presión reducida; y (d) liofilizar el concentrado.

Fuentes: tomado de la base de datos de Wipo y Espacenet, 2018. (<http://www.wipo.int/portal/es/>  
<https://worldwide.espacenet.com/>)

## 2.5 Factores que afectan el contenido de metabolitos secundarios en las plantas

Los metabolitos secundarios desempeñan un papel relevante en la adaptación de las plantas a su entorno, y representan una fuente importante de compuestos bioactivos para la generación de productos farmacéuticos, sin embargo, la calidad de producción y acumulación no es intrínseca (Akula and Ravinshankar, 2011; Berini *et al.*, 2018; Neugart *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

Se conoce que los factores ambientales tales como: temperatura, humedad, intensidad luminosa, el suministro de agua, los minerales y el CO<sub>2</sub> influyen en el crecimiento de la planta, así como en la producción de compuestos bioactivos (Neugart *et al.*, 2018; Prinsloo and Nogemane, 2018).

En especies de Lamiaceae como *Thymus algeriensis* y *Rosmarinus officinalis* la producción de aceites esenciales se incrementa del 0.59 al 1.08% con la precipitación pluvial, la velocidad del viento y la higrometría, sin embargo, tiene un efecto negativo la aridez y la disminución de la humedad relativa (Mehalaine y Chenchouni, 2019).

La temperatura y la radiación tienen un efecto importante en la concentración de flavonoides, en especies de Brassicaceae (coles) se ha observado que a bajas temperaturas, los derivados de quercetina incrementan su concentración (Schmidt *et al.*, 2010), esta respuesta se debe a la inhibición de la reparación enzimática, lo que también genera mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno (Nybarkken *et al.*, 2012). La concentración de flavonoides tiene una respuesta específica a cambios en la temperatura y el efecto de la radiación (Neugart *et al.*, 2012; Neugart *et al.*, 2018). Bajas temperaturas generan una mayor concentración de glucósidos de quercetina y kaempferol y la exposición a elevados niveles de radiación los condiciona como marcadores de radiación UV-B en especies de Brassicaceae. Se sabe que la radiación UV-B y la temperatura mejoran la síntesis del anillo B polihidroxilado de flavonoides como quercetina (Neugart *et al.*, 2018).

Las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo en diversas especies vegetales, así como, las condiciones climatológicas y edáficas del suelo pueden afectar la producción de compuestos bioactivos, por lo que, se siguen una serie de procedimientos en la colecta de diferentes plantas medicinales. Las especies de *Panax ginseng* son colectadas cuando incrementan la producción de saponinas en verano, durante el mes de junio se colecta *Calendula officinalis* debido a que en esta época aumenta la producción de flavonoides (Russo *et al.*, 2015).

En *Agastache mexicana* es muy poco lo que se conoce sobre los factores que afectan la acumulación de los metabolitos secundarios, en esta especie los compuestos presentes son clasificados en dos grupos principales: compuestos volátiles como aceites esenciales y no volátiles como fenilpropanoides y terpenoides. Dentro de los estudios químicos destacan los compuestos alcanos (nonano); los monoterpenos: camfeno- $\beta$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol, furfural, citronelal y mentona con un rendimiento de 1.45% v/w en peso seco (Svoboda *et al.*, 1995). Los cuales son extraídos a partir de técnicas de hidrodestilación con solventes orgánicos como hexano, etanol, acetato de etilo y agua (Estrada-Reyes *et al.*, 2004, Santiago *et al.*, 2005). Los aceites esenciales son producidos en mayor cantidad durante la fase de floración y decrecen en la fase de senescencia (Svoboda *et al.*, 1995). También presenta compuestos no volátiles como el terpeno denominado pulegona, y los flavonoides como apigenina, luteolina, diosmetina y tilianina (Tabla 1) (Lara y Márquez, 1996, Fuentes-Granados *et al.*, 1998).

## **2.6 La cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC): una técnica cromatográfica para el análisis fotoquímico de especies con potencial farmacológico**

El control de calidad y el análisis cuantitativo de los flavonoides en los fitomedicamentos es de gran importancia. Una de las técnicas más empleadas para el análisis de extractos vegetales es la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Comparada con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de gases (GC) esta técnica es menos costosa. La HPTLC mantiene el mismo sistema de separación; dos fases en donde el compuesto se adhiere a la fase estacionaria y migra a una distancia inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria. La cuantificación de compuestos en la cromatografía planar se realiza a través de densitometría con el empleo de sistemas de análisis de imágenes, donde los instrumentos comerciales están integrados a una cámara digital o un scanner convencional, para obtener la imagen de la placa y realizar el análisis cuantitativo o cualitativo mediante un programa de análisis de imágenes, sin la necesidad de comprar instrumentos comerciales (Popovic *et al.*, 2014). Debido a varias ventajas, como la rapidez, la menor cantidad de muestra y un residuo de disolvente extremadamente limitado, el HPTLC es muy empleado para la determinación de compuestos farmacológicamente interesantes en matrices biológicas, como plantas, hojas, flores y formulaciones herbales (Booker *et al.*, 2017; [www.camag.com](http://www.camag.com)).



## **2.7 Técnicas cromatográficas utilizadas en el género *Agastache* para la extracción y análisis de compuestos bioactivos**

En *A. mexicana*, el análisis de compuestos fenólicos se ha realizado a través del empleo de HPLC en fase reversa, usando columnas de sílice C18 eluidas con acetonitrilo/ agua o mezclas de metanol/ agua, con detección fotométrica. Algunos compuestos aislados como el ácido rosmarínico, acetina, tilianina, agastachosido, linarina y agastachina fueron identificados por métodos de rutina como son la espectroscopia de RMN UV/VIS, infrarrojo y espectrometría de masas (Lee *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999; Itokawa *et al.*, 1981; Hernández-Abreu *et al.*, 2009). La purificación de los compuestos se realizó mediante extracción líquido-líquido y posteriormente se utilizó una columna cromatográfica de gel de sílice con diferentes disolventes, algunos pasos de purificación se llevaron a cabo por HPLC preparativa de fase reversa utilizando la fase estacionaria C18, gel de sílice o Sephadex LH-20 (Kim *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1995, 2002; Estrada-Reyes *et al.*, 2004). A la fecha, no se encontraron estudios de este género en el desarrollo de técnicas mediante HPTLC.

## 2.8 JUSTIFICACIÓN

Si bien los avances en investigación y posibles aplicaciones de la tilianina en la promoción de la salud y la prevención de enfermedades son alentadores, es necesario garantizar una fuente continua de material vegetal para la extracción de esta flavona. Dentro de las especies vegetales, *Agastache mexicana* es reconocida como potencial fuente promisoría de tilianina, sin embargo, es bien conocido que la producción de metabolitos secundarios en las plantas está estimulado por un ambiente estresante, y puede variar sustancialmente durante las diferentes etapas de desarrollo. Debido a que, hasta la fecha, no se ha dedicado ningún esfuerzo, al estudio de la variación del contenido de tilianina y ni de los compuestos apigenina, acacetina, ácido ursólico y ácido oleanólico en plantas de *A. mexicana*, en este capítulo se presenta el análisis químico de plantas colectadas en campo en dos épocas diferentes: etapa vegetativa y de floración.

## 2.9. HIPÓTESIS

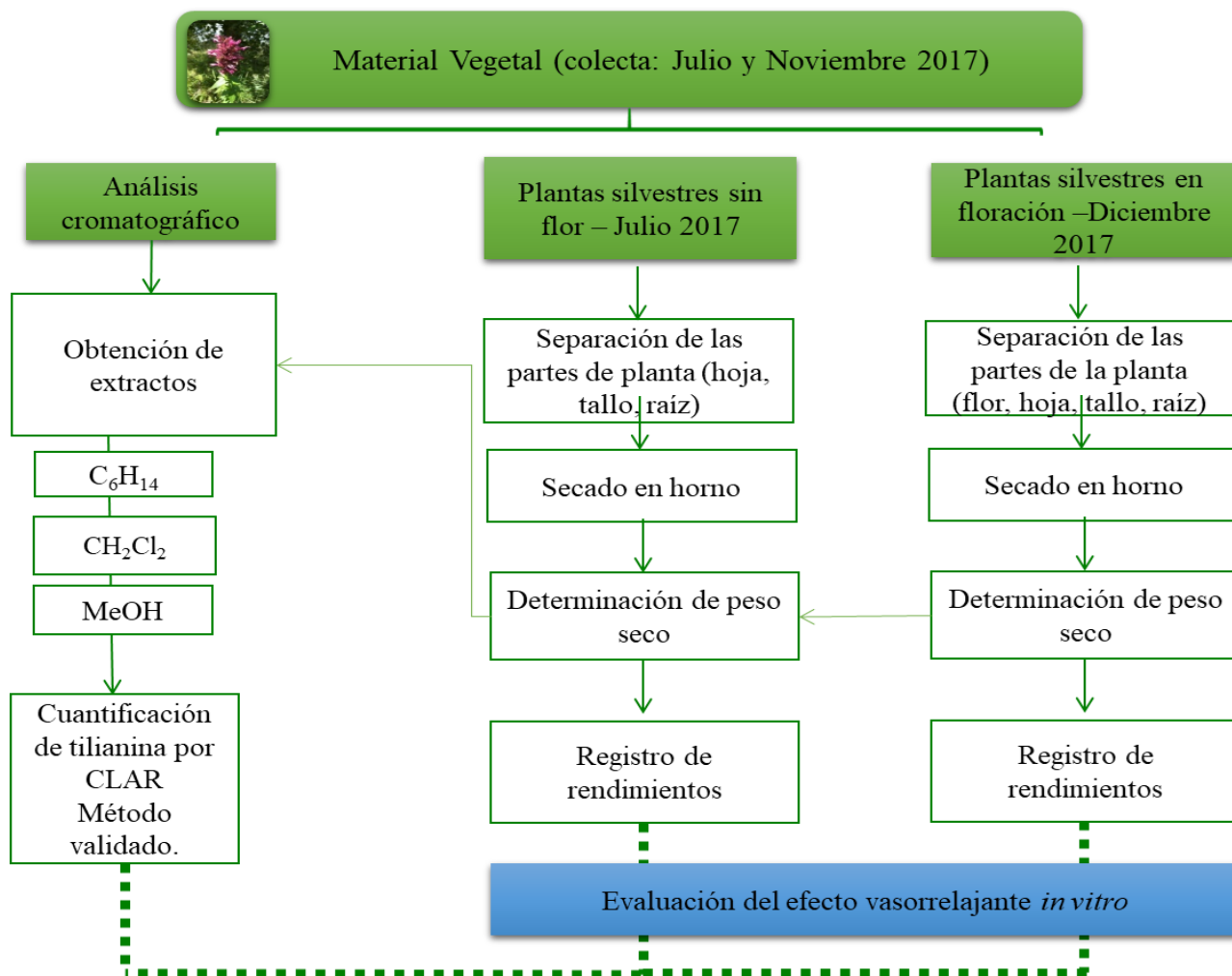
La concentración de tilianina y el contenido de apigenina, acacetina, ácido ursólico y ácido oleanólico en *A. mexicana* presenta variaciones que dependen de la etapa de desarrollo en que la planta es colectada.

## 2.10 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el contenido de tilianina y la presencia de otros compuestos bioactivos en plantas silvestres de *A. mexicana* en etapas vegetativa y de floración.

## 2.11 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Identificar por medio de HPTLC flavonoides y terpenos en extractos metanólicos de hoja, tallo, raíz e inflorescencias en plantas colectadas en dos épocas diferentes del año.
- ❖ Determinar el efecto de la etapa de desarrollo en el contenido de tilianina en las diferentes partes de la planta.



**Figura 4.** Estrategia metodológica para el análisis cromatográfico de diferentes partes de la planta silvestre de *A. mexicana* colectada en dos etapas: Vegetativa y Floración

## 2.12 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.12.1 Material vegetal y datos climatológicos del sitio de colecta

Para el desarrollo de esta tesis se colectaron plantas completas de *A. mexicana* en el municipio de Tlalnepantla, Morelos, México (19° 06'6.65" N y 98° 55'49.03" O) a una altitud de 2823 m.s.n.m, en los meses de julio y diciembre 2017. El material fue identificado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Botánica Estructural del CEIB-UAEM y una muestra (No.26.336 y No 35766) fue depositada en Herbario HUMO del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

Los datos climatológicos se obtuvieron de las estaciones climatológicas del Parque Izta-popo ubicadas en los límites del estado de México y Morelos en el año 2017, estos datos se solicitaron a la Red de mediciones y sistema de dirección técnica del Organismo de Cuenca Balsas. (CONAGUA Morelos, 2018).

### 2.12.2 Preparación de extractos y estándares

Las plantas de *A. mexicana* fueron colocadas en un horno de convección Binder FD-115® a 35°C durante 72 horas, el material vegetal seco y molido fue sometido a una maceración discontinua y progresiva con hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) durante 72 horas por cada disolvente. Cada maceración es filtrada y los extractos obtenidos fueron concentrados al vacío en un rotaevaporador (Buchi Heating R-210®) a 40°C y 80 revoluciones por minuto (Hernández-Abreu *et al.*, 2009). El rendimiento de los extractos se obtuvo a partir del peso seco del extracto y el peso seco total del material vegetal, se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = (\text{g Peso seco del extracto} / \text{g Peso seco total de material vegetal}) \times 100$$

El estándar de tilianina se preparó disolviendo 10 mg tilianina aislada de *A. mexicana* en 1 ml de metanol, de igual forma para acacetina y apigenina. Los ácidos ursólico y oleanólico se prepararon a una concentración de 1 mg/ml. Los extractos de hoja, tallo, raíz y flor se prepararon en stocks de 5 mg / ml.

### 2.12.4 Método de Identificación por HPTLC

La cromatografía se realizó en placas de gel de sílice 60 F254 (10 cm x 10 cm; espesor de 0,25 mm; Merck®), en la placa fueron aplicados 3 µl (30 µg) de estos estándares usando el aplicador automático Linomat. CAMAG®. En el caso de la cuantificación de tilianina las concentraciones utilizadas fueron de 10,20,40, 60, 80 y 100 µg.

Los extractos y los estándares se colocaron en forma de manchas en una placa de TLC de gel de sílice 60F254 (Merck®, Darmstadt, Alemania). La placa se secó al aire y luego se desarrolló el proceso de separación utilizando el sistema de solvente diclorometano: metanol (95: 5 v / v) como fase móvil en una cámara de vidrio CAMAG® de doble canal previamente saturada con vapor de fase móvil durante 20 min con el fin de observar los diferentes compuestos presentes en los extractos (terpenoides y flavonoides). Para la cuantificación de tilianina se utilizó el sistema de disolvente acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26 v / v) como fase móvil. Después de desarrollar la placa, se analizó con el Scanner 4 (CAMAG®, Suiza) a 254 y 366 nm mediante el software WinCATS® 4. El frente de retención (Rf) se analizó de acuerdo a la distancia recorrida por el compuesto en la placa en relación a la distancia recorrida por el eluyente mediante la siguiente ecuación:

$$R_f = X / Y$$

Donde X= distancia recorrida por el compuesto mm

Y= distancia recorrida por el eluyente mm

## 2.13 RESULTADOS

### 2.13.1 Obtención de extractos y rendimientos

En la Tabla 4 se muestra el rendimiento de los extractos de diferente polaridad obtenidos de plantas colectadas en dos épocas del año. Los mayores valores de rendimiento observados para todos los extractos se presentan en los tejidos colectados en la etapa de floración, con excepción del extracto metanólico de tallo de plantas en etapa vegetativa. Los extractos obtenidos a partir de las muestras de inflorescencias fueron los que alcanzaron los máximos valores de rendimiento, para el extracto hexánico fue de 24.91%, diclorometano el 20.96% y metanólico de 17.59%.

**TABLA 4.** Rendimiento de los extractos obtenidos a partir de plantas colectadas en etapa vegetativa y de floración\*

HOJA				
EXTRACTO	VEGETATIVA		FLORACIÓN	
	Peso (g)	Rendimiento (%)	Peso (g)	Rendimiento (%)
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0.15	1.87	4.02	<b>13.68</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.23	2.89	0.34	1.15
MeOH	0.28	<b>3.52</b>	1.75	5.96

TALLO				
EXTRACTO	VEGETATIVA		FLORACIÓN	
	Peso (g)	Rendimiento (%)	Peso (g)	Rendimiento (%)
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0.0379	1.00	0.48	1.48
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0566	1.49	2.52	<b>7.82</b>
MeOH	0.0948	<b>2.49</b>	0.54	1.69

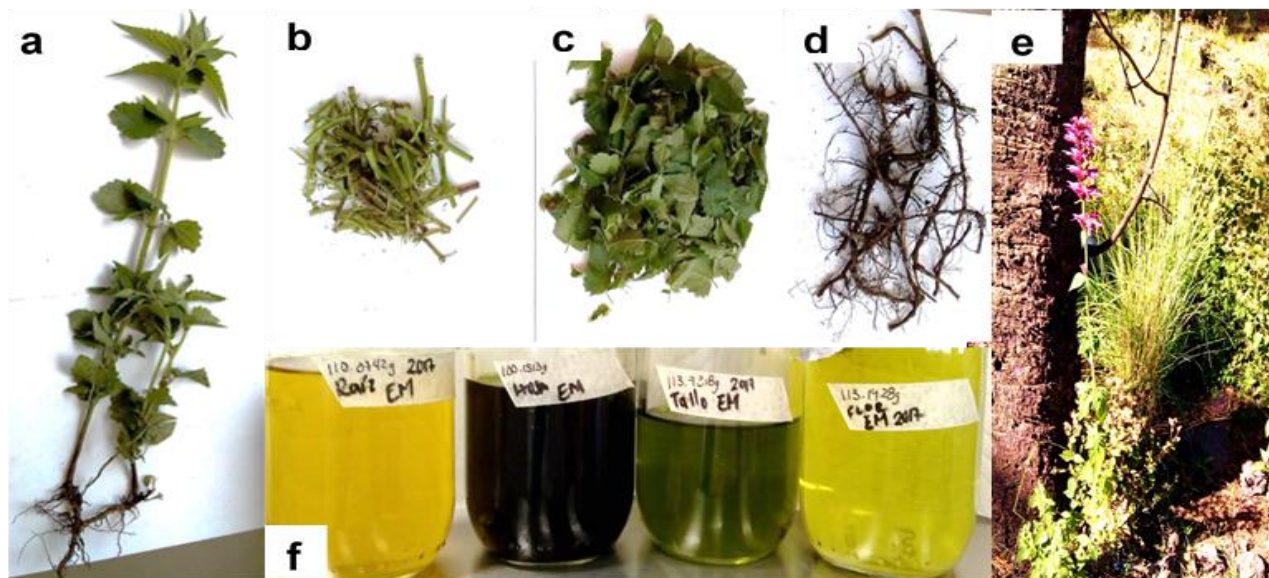
RAIZ				
EXTRACTO	VEGETATIVA		FLORACIÓN	
	Peso (g)	Rendimiento (%)	Peso (g)	Rendimiento (%)
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0.0292	0.39	1.33	<b>4.18</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0394	<b>0.52</b>	0.42	1.30
MeOH	0.0014	0.02	0.85	2.66

INFLORESCENCIA		
EXTRACTO	Peso (g)	Rendimiento (%)
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	1.53	<b>24.91</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.29	20.96
MeOH	1.08	17.59

\* La colecta de la etapa vegetativa y de floración fue realizada en julio y diciembre del 2017, respectivamente.

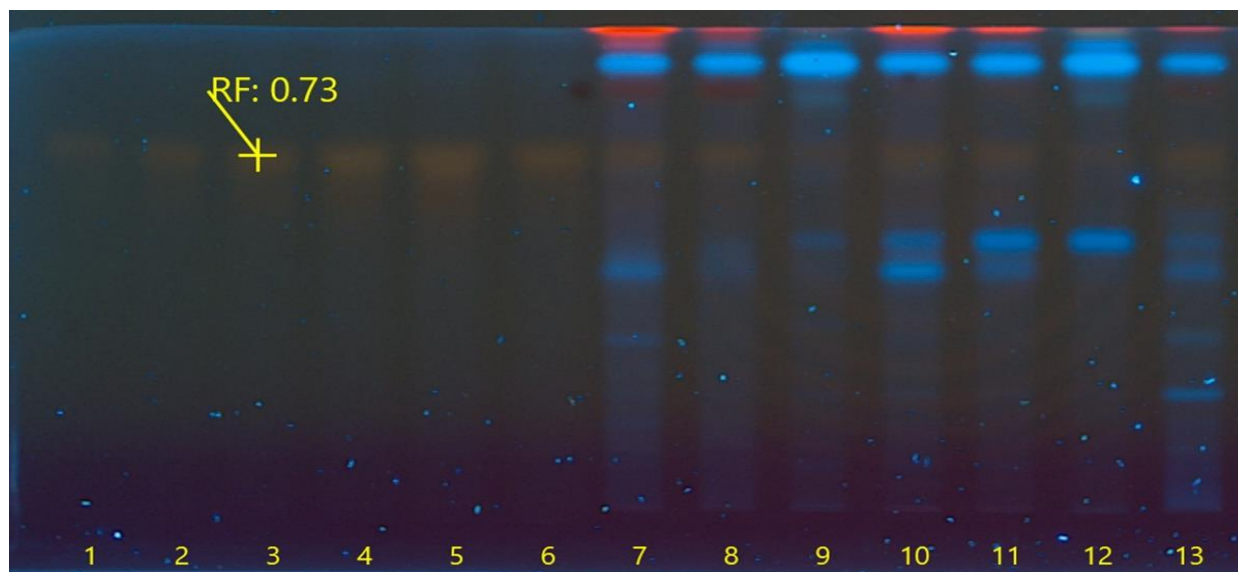
Los extractos metanólicos obtenidos de las inflorescencias, hojas, tallos y raíces de plantas silvestres fueron de diferente coloración (figura 4). El color se atribuye a la presencia de diferentes compuestos en cada uno de ellos.



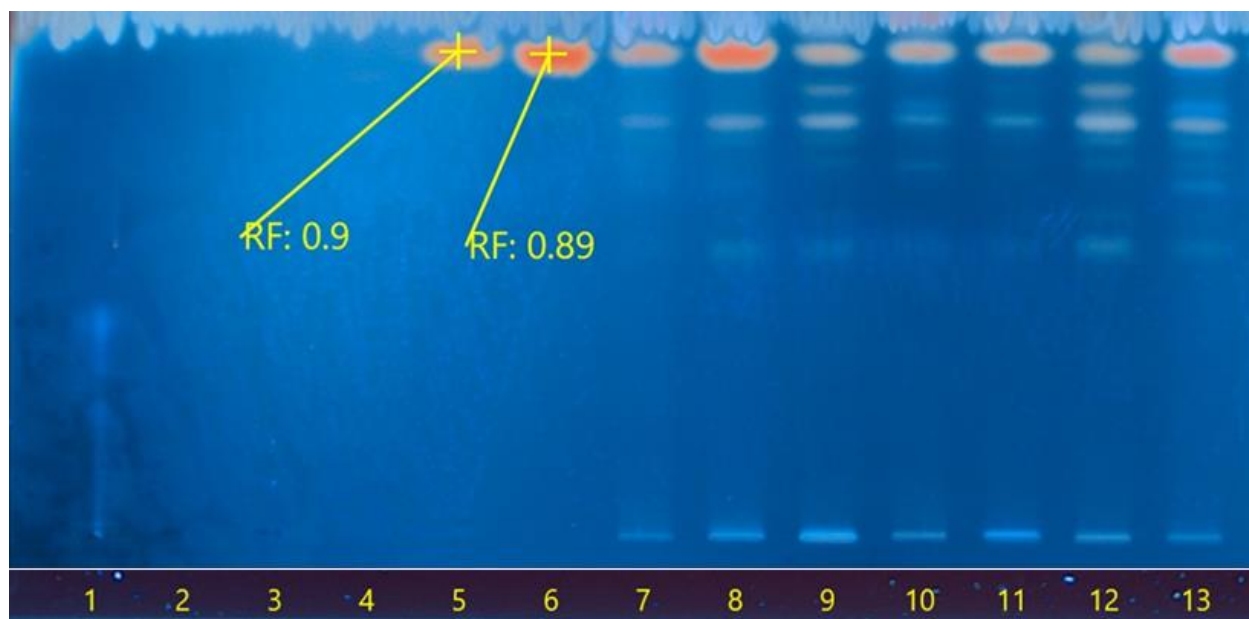
**Figura 4.** Material vegetal y extractos de *A. mexicana*. a) Planta en etapa vegetativa colectada en junio 2017; b) tallos; c) hojas; d) raíces; e) Planta en etapa floración colectada en diciembre 2017; f) extractos metanólicos de hoja, tallo, raíz y flor de plantas colectadas en campo.

### 2.13.2 Análisis Cromatográfico

El método por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) resultó eficaz para la identificación de flavonas y terpenos presentes en los extractos metanólicos de *A. mexicana*, la fase móvil compuesta de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26 v / v) es altamente selectiva no solo para tilianina sino también para acetina y apigenina (Figura 5). En el caso de los terpenos, la fase móvil con diclorometano: metanol (95: 5 v / v) nos permitió identificar a el ácido ursólico y el ácido oleanólico (Figura 6). En la tabla 5 se presentan los valores de los Rf de los flavonoides y terpenos identificados. La confirmación de la identidad de estos compuestos se realizó a través de un análisis espectral comparativo de los picos de la cromatografía de los estándares y extractos, a una longitud de onda 254 y 366 nm (Figura 7).



**Figura 5.** Cromatoplatea de HPTLC de los extractos metanólicos de diferentes partes de la planta silvestre de *A. mexicana*. revelada con UV sin derivatizar **1-6)** Tilianina a concentraciones de 10, 20,40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$  **7)** HOJA eVEGETATIVA **8)** TALLO eVEGETATIVA **9)** RAIZ eVEGETATIVA **10)** HOJA eFLORACIÓN **11)** TALLO eFLORACIÓN **12)** RAIZ eFLORACIÓN **13)** FLOR eFLORACION donde e=ETAPA

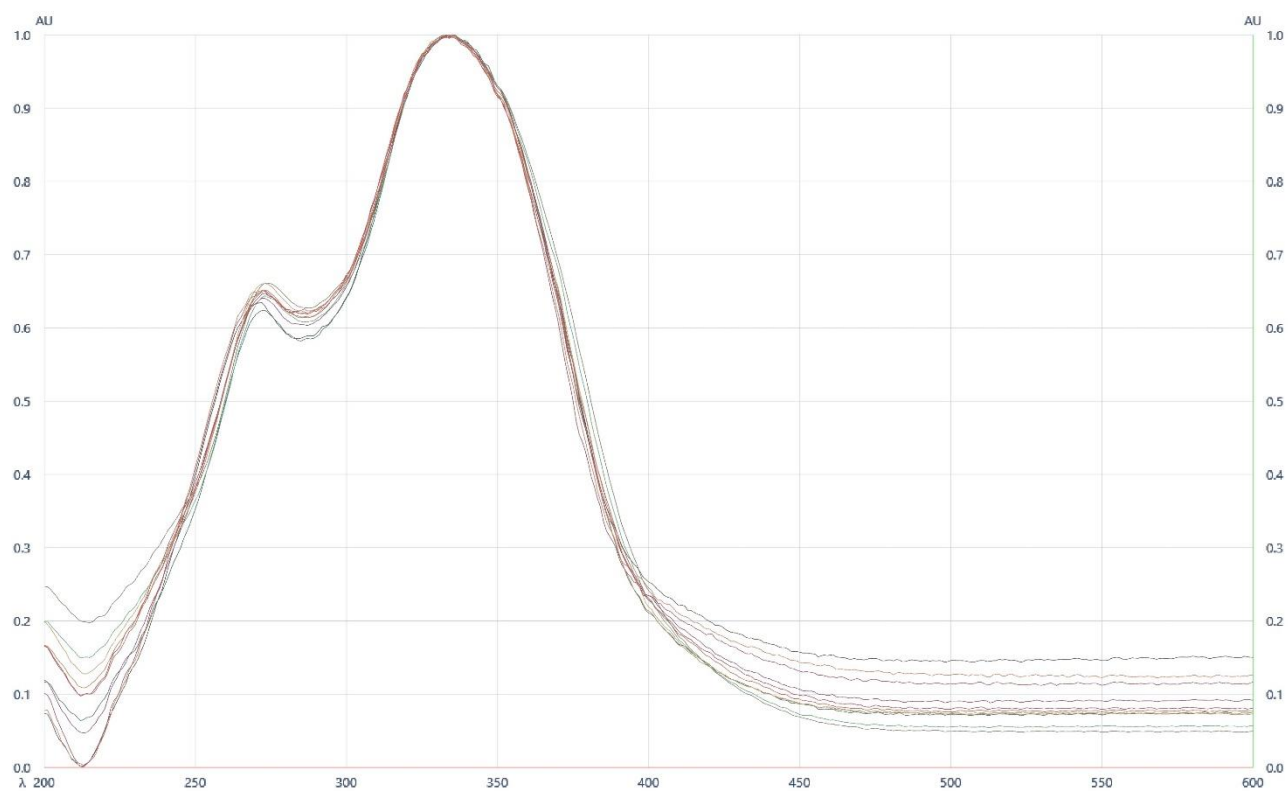


**Figura 6.** Cromatoplatea de HPTLC de los extractos metanólicos de diferentes partes de la planta silvestre de *A. mexicana*. derivatizada con sulfato sérico amoniacal. Fase móvil diclorometano: metanol (95: 5 v / v). En todos los extractos se observa una banda similar que corresponde a los ácidos ursólico y oleanólico. **1)** estándar tilianina **2)** acetina **3)** apigenina **4)** quercetina **5)** ácido ursólico **6)** ácido oleanólico **7)** HOJA eVEGETATIVA **8)** TALLO eVEGETATIVA **9)** RAIZ eVEGETATIVA **10)** HOJA eFLORACIÓN **11)** TALLO eFLORACIÓN **12)** RAIZ eFLORACIÓN **13)** FLOR eFLORACIÓN, donde e=ETAPA



**Tabla 5.** Valor del Rf en los compuestos activos identificados en *A. mexicana*

COMPUESTOS ACTIVOS	Valor Rf
Tilianina	0.728 ± 0.050
Acacetina	0.610 ± 0.020
Apigenina	0.762 ± 0.020
Ácido oleanólico	0.901 ± 0.020
Ácido ursólico	0.890 ± 0.030



**Figura 7.** Espectros a 366 nm de los extractos metanólicos de hoja, tallo, raíz y flor de planta silvestre de *A. mexicana* versus tilianina.

La determinación de la concentración de los compuestos fenólicos y terpenos en diferentes partes de la planta silvestre de *A. mexicana* produce un perfil similar de compuestos durante ambas etapas de desarrollo, en las que se detectó la presencia de tilianina, acetina, apigenina, ácido ursólico y ácido olenólico en todas las partes de la planta (Figura 5 y 6). El máximo contenido de tilianina de  $6.46 \pm 1.12$  mg /g de peso seco se detectó en la etapa vegetativa y el mínimo  $1.72 \pm 0.10$  mg /g de peso seco en la raíz. Encontramos que esta especie acumula menos tilianina durante la etapa de floración, en la cual las hojas producen  $0.67 \pm 0.11$  mg de tilianina /g de peso seco de material vegetal. y la mayor acumulación se observó en las inflorescencias con  $3.50 \pm 0.38$  mg / g de peso seco (Tabla 5).

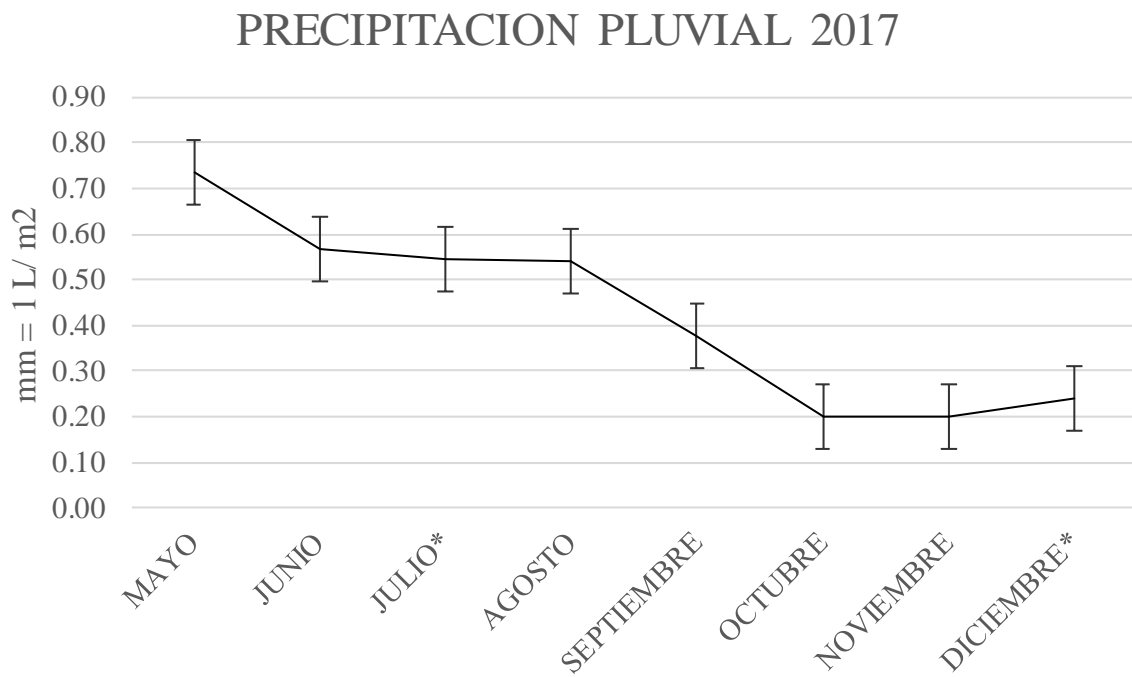
**Tabla 6.** Variación en la presencia de compuesto bioactivos y contenido de tilianina en la etapa vegetativa y de floración.

Etapa de desarrollo	Promedio temperatura/ mes*	Promedio de precipitación/ mes*	Muestra	Compuestos identificados	Contenido de tilianina (mg/g de Peso Seco)
VEGETATIVA	$8.74 \pm 2.80$ °C Junio	0.059 mm	Hoja	TN, AC, AP, AU, AO	$6.46 \pm 1.12$
			Tallo	TN, AC, AP, AU, AO	$2.64 \pm 0.37$
			Raíz	TN, AU, AO	$1.72 \pm 0.10$
FLORACIÓN	$6.92 \pm 4.19$ °C Diciembre	0.046 mm	Flor	TN, AC, AP, AU, AO	$3.50 \pm 0.38$
			Hoja	TN, AC, AP, AU, AO	$0.67 \pm 0.11$
			Tallo	TN, AP, AU, AO	$0.36 \pm 0.04$
			Raíz	TN	$0.58 \pm 0.05$

TN: Tilianina, AC: acetina, AP: apigenina, AU: ácido ursólico, AO: ácido olenólico. \*mes de colecta en el municipio de Tlalnepantla, Morelos, México.

**2.13.3 Análisis de los Datos climatológicos en las dos épocas de colecta**

Los datos proporcionados por la CONAGUA indican un incremento de la humedad entre los meses de mayo y agosto del 2017, alcanzando un promedio máximo en el mes de mayo con 0.70 mm de lluvia. Las precipitaciones fueron mínimas entre octubre y diciembre (Grafico 1)



**Grafica 1.** Datos de precipitación anual durante el 2017, donde Julio\* (etapa vegetativa) y Diciembre\* (etapa de floración) son las épocas de colecta de plantas silvestres de *A. mexicana*.

## 2.14 DISCUSIÓN DEL CAPITULO II

Muchas plantas medicinales son ricas en metabolitos secundarios que pueden ser subdivididos en varios grupos dependiendo de su estructura química y propiedades funcionales: carotenoides y clorofilas, glucosinolatos, terpenos, compuestos fenólicos (polifenoles), ácido fítico, fitoestrógenos, fitoesteroles, inhibidores de la proteasa, saponinas, y compuestos azufrados (Neugart *et al.* 2018). La composición del contenido químico de las plantas varía sustancialmente durante las etapas de desarrollo (Çirak *et al.* 2007). Varios son los factores que influyen en la producción y concentración de los metabolitos secundarios, estos incluyen 1) las condiciones ecológicas del hábitat, principalmente los factores climáticos y edáficos, que controlan la fisiología y el metabolismo de la planta, así como, las interacciones biológicas intraspecificas; y 2) las variaciones geográficas y genéticas (Berini *et al.* 2018; Mehalaine y Chenchouni 2019). Es por ello que, a lo largo de las últimas décadas, han incrementado las investigaciones sobre la variación de los metabolitos secundarios a través de la ontogenia de diversas plantas. En el presente estudio se detectó la producción de tilianina, apigenina, acetina, ácido ursólico y ácido oleanólico, tanto en la etapa vegetativa como de floración de *A. mexicana*. Sin embargo, algunos compuestos como el ácido ursólico y el ácido oleanólico no fueron detectados en las raíces de las plantas en floración. Esto puede ser debido a la baja tasa de biosíntesis en la raíz durante la etapa de floración, que puede deberse a la inactivación parcial de las enzimas necesarias para la biosíntesis de estos compuestos. De hecho, en estudios anteriores realizados en la familia Lamiaceae, Chen *et al.* (2003) reportaron que las concentraciones de ácido ursólico y ácido rosmarínico aumentaron durante el desarrollo de la planta y alcanzaron sus máximos durante la etapa de floración. Igualmente, se observó la mayor concentración de estos compuestos en las flores de *Prunus vulgaris*, *Hypericum pruinatum* y *Boerhavia diffusa* (Chen *et al.* 2012).

La producción de tilianina depende de la selección del material vegetal, por lo tanto, es importante conocer el tiempo de cosecha para asegurar la homogeneidad de la materia prima, y así, cubrir con los requerimientos esenciales de seguridad y eficacia para la generación de productos médicos o cosméticos. En *A. mexicana* los valores máximos de tilianina ( $6.46 \pm 1.12$  mg/ g PS) se presentaron en las hojas de las plantas en etapa vegetativa, contrario a lo que se esperaba, ya que en la medicina tradicional las inflorescencias son la parte de la planta más recurrida. Es posible que además de la etapa de desarrollo, los cambios en la cantidad y periodicidad de las precipitaciones pluviales influyan en la concentración de la tilianina. En otras especies se ha observado esta tendencia, Berini *et al.*, (2018) reportaron como la precipitación influye en la concentración de glicósidos cianogénico en especies maderables.

La diferencia en la producción de tilianina en las diversas partes de la planta sugiere que la síntesis está regulada de manera específica por el tipo de tejido, así como por los factores abióticos a los que está sometida la planta, los cuales podría ser factores regulables en condiciones *in vitro*, lo que impulsa a la implementación de estrategias biotecnológicas como el cultivo de células y tejidos para la producción de tilianina y otros compuestos de manera controlada. Finalmente, la identificación de los constituyentes de la materia prima, ya sea plantas de campo o de cultivos *in vitro* se puede realizar mediante técnicas cromatográficas como HPTLC, por su rapidez y mayor sensibilidad comparado con otros sistemas.

### **2.15 CONCLUSIONES DEL CAPITULO II**

Los extractos evaluados presentan similitud en los perfiles de los compuestos fenólicos y triterpenos identificados en las partes aéreas de *A. mexicana* en etapa vegetativa y de floración.

La etapa vegetativa podría ser elegida como el tiempo óptimo de cosecha de la materia prima, ya que en ella se producen las más altas concentraciones de tilianina, y se encuentran presentes los demás compuestos bioactivos evaluados.

### **2.16 PERSPECTIVAS DEL CAPITULO II**

Para el desarrollo de fitomedicamentos o extractos estandarizados a base de *A. mexicana* es necesario, un estudio más detallado de la variación de la composición y concentración de los compuestos, durante todas sus etapas fenológicas, que garanticen la calidad de la materia prima.

## 2.17 REFERENCIAS CAPITULO II

1. Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
2. Berini, J. L., Brockman, S. A., Hegeman, A. D., Reich, P. B., Muthukrishnan, R., Montgomery, R. A., & Forester, J. D. (2018). Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Frontiers in plant science*, 9
3. Bye, R., Linares, E., & Estrada, E. (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico. In *Phytochemistry of medicinal plants* (pp. 65-82). Springer, Boston, MA.
4. Chen, Y., Zhu, Z., Guo, Q., Zhang, L., & Zhang, X. (2012). Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. *Biological Research*, 45(2), 171-175
5. Chen, S. Q., Dong, C. M., Zheng, X. K., Dong, S. L., Wang, L., & Feng, W. S. (2003). The quantitative variety of rosmarinic acid in *Rabdosia rubescens* from different harvesting time. *J Henan Univ Chin Med*, 18, 28-30.
6. Çirak, C., Radušienė, J., Ivanauskas, L., & Janulis, V. (2007). Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum organifolium* during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 197-203.
7. Cui, P., Dou, T. Y., Li, S. Y., Lu, J. X., Zou, L. W., Wang, P., ... & Ge, G. B. (2016). Highly selective and efficient biotransformation of linarin to produce tilianin by naringinase. *Biotechnology letters*, 38(8), 1367-1373.
8. Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O. A., Dorantes-Barrón, A. M., Heinze, G., Aguilar, J. M., & Martínez-Vázquez, M. (2014). Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of ethnopharmacology*, 153(1), 98-110.
9. Fuentes-Granados R G, Widrlechner M P, Wilson L A (1998). An overview of *Agastache* research. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 6: 69-97.
10. García-Díaz JA, Navarrete-Vázquez G, García-Jiménez S, Hidalgo-Figueroa S, Almanza-Pérez JC, Alarcón-Aguilar FJ, Gómez-Zamudio J, Cruz M, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. (2016). Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 26(83),667-675. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.023.
11. Gálvez, J., Estrada-Reyes, R., Benítez-King, G., Araujo, G., Orozco, S., Fernández-Mas, R., ... & Calixto, E. (2015). Involvement of the GABAergic system in the neuroprotective and sedative effects of acacetin 7-O-glucoside in rodents. *Restorative neurology and neuroscience*, 33(5), 683-700.
12. González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. (2012). Spasmolytic and antinociceptive

- activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med.* 78(8):793-6. doi: 10.1055/s-0031-1298416.
- 13.
  14. Hernández-Abreu O, Torres-Piedra M, García-Jiménez S, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, Montes S, Rembao D, Estrada-Soto S. (2012). Dose-dependent antihypertensive
  15. determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*. *J Ethnopharmacol.* Mar 7;146(1):187-91. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.029.
  16. Hernández-Abreu O, Durán-Gómez L, Best-Brown R, Villalobos-Molina R, Rivera-Leyva J, Estrada-Soto S. (2011). Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *J Ethnopharmacol.* 18;138(2):487-91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.
  17. Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. (2009). Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol.* 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016.
  18. Hong JH, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, Oh GT. 2001. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Lett.* 495:142–147
  19. Mehalaine, S., & Chenchouni, H. (2019). Effect of Climatic Factors on Essential Oil Accumulation in Two Lamiaceae Species from Algerian Semiarid Lands. In *Exploring the Nexus of Geoecology, Geography, Geoarcheology and Geotourism: Advances and Applications for Sustainable Development in Environmental Sciences and Agroforestry Research* (pp. 57-60). Springer, Cham.
  20. Neugart, S., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Klopsch, R., Wiesner-Reinhold, M., & Schreiner, M. (2018). The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia horticultrae*, 233, 460-478.
  21. Neugart, S., Kläring, H. P., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L. W., & Krumbein, A. (2012). The effect of temperature and radiation on flavonol aglycones and flavonol glycosides of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chemistry*, 133(4), 1456-1465.
  22. Nybakken, L., Horkka, R., Julkunen-Tiitto, R., 2012. Combined enhancements of temperature and UVB influence growth and phenolics in clones of the sexually dimorphic *Salix myrsinifolia*. *Physiol. Plant.* 145, 551–564
  23. Monroy- Ortíz, Castillo-España. 2007. Plantas medicinales del estado de Morelos. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2da Edición. Pag. 405. ISBN 968-878-277-7.
  24. Prinsloo, G., & Nogemane, N. (2018). The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. *Phytochemistry reviews*, 17(4), 889-902
  - 25.
  26. Santiago R, Rojas I, Arvizu G, Muñoz D, Perez D, Sucilla M. 2005. Caracterización del potencial fitotóxico de *Agastache mexicana* (Kunth) Lint et Epling. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. Universidad Simon Bolivar. Año 4 No 4 Dic 2005.
  27. Schmidt, S., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L.W., Krumbein, A., 2010. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 119, 1293–1299.

28. Suchorska-Tropiło K, Pio'ro-Jabrucka E .2004. Morphological, developmental and chemical analysis of the chosen *Agastache* species. *Ann Warsaw Univ Life Sci SGGW Horticult Landsc Architect* 25:25–31.
29. Svoboda KP, Gough J, Hampson J. 1995. Analysis of the essential oils of some *Agastache* species grown in Scotland from various seed sources. *Flavour Fragr J* 1995; 10:139–145. doi: 10.1002/ffj.2730100305.
30. Ventura-Martínez, R., Rodríguez, R., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Déciga-Campos, M., & Gómez, C. (2017). Spasmogenic and spasmolytic activities of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* methanolic extracts on the guinea pig ileum. *Journal of ethnopharmacology*, 196, 58-65.
31. Verano J, González-Trujano ME, Déciga-Campos M, Ventura-Martínez R, Pellicer F. 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol Biochem Behav*. Sep; 110:255-64. doi: 10.1016/j.pbb.2013.07.020.
32. Xu H, Kim YK, Jin X. 2008. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugose* Kuntze. *J Med Plants Res*;2(9):237–241
33. Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
34. Zielińska, S., & Matkowski, A. (2014). Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry reviews*, 13(2), 391-416.
51. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae/Agastache/>
52. Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., & Rollinger, J. M. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
53. Bharati, A. J., & Bansal, Y. K. 2014. In vitro production of flavonoids: A review. *WJPPS*, 3(6), 508-533.
54. COFEPRIS 2009. Marco regulatorio de medicamentos biotecnológicos biocomparables en México. Art 222 Biss. [www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx)
55. Corkidi, G., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. 2008. Análisis digital de imágenes para la caracterización microscópica de parámetros críticos en la producción fermentativa de metabolitos secundarios. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 75.
56. Cui, P., Dou, T. Y., Li, S. Y., Lu, J. X., Zou, L. W., Wang, P., ... & Ge, G. B. 2016. Highly selective and efficient biotransformation of linarin to produce tilianin by naringinase. *Biotechnology letters*, 38(8), 1367-1373.
57. Chapuis T, Barriguete J, Cheron P, Hernández M, Vieyra A, García-Viveros M, 2006. Hipertensión arterial: diagnóstico y tratamiento. *Boletín Práctica Médica Efectiva* 4:8
58. Debnath M, Malik C P, Bisen P S, 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7: 33-49.
59. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
60. EMA 2006. EMA Committee on Herbal Medicinal Products (HMCP): Guideline on Good Agricultural and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin.



1. Estrada-Reyes R, López-Rubalcava C, Ferreyra-Cruz OA, Dorantes-Barrón AM, Heinze G, Moreno Aguilar J, Martínez-Vázquez M. 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *J Ethnopharmacol.* Jan 21. pii: S0378-8741(14)00007-5. doi: 10.1016/j.jep.2013.12.057.
2. Espacenet. Acceso libre a cerca de 1 millón de patentes, 2017. <https://worldwide.espacenet.com/>
3. Fuentes-Granados R G, Widrlechner M P, Wilson L A 1998. An overview of *Agastache* research. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 6: 69-97.
4. Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. 2008. Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(3), 347-353.
5. Fujita, Y. 1988. Industrial production of shikonin and berberine. *Applications of plant cell and tissue culture*, 137, 228-238.
6. Groop L. Pociot F. 2014. Genetics of diabetes- are we missing the genes or the disease? *Mol. Cell Endocrinol.* 382 (2014) 726-739.
7. García-Díaz JA, Navarrete-Vázquez G, García-Jiménez S, Hidalgo-Figueroa S, Almanza-Pérez JC, Alarcón-Aguilar FJ, Gómez-Zamudio J, Cruz M, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2016. Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* Jul 26;83:667-675. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.023.
8. Gálvez, J., Estrada-Reyes, R., Benítez-King, G., Araujo, G., Orozco, S., Fernández-Mas, R., ... & Calixto, E. 2015. Involvement of the GABAergic system in the neuroprotective and sedative effects of acacetin 7-O-glucoside in rodents. *Restorative neurology and neuroscience*, 33(5), 683-700.
9. García Hernandez, V. 2016. Establecimiento de cultivos en suspensión de *Lopezia racemosa* Cav. Tesis
10. González-Ramírez A, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz Francisco J. 2012. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2012 Aug 1;142(3):700-5. doi: 10.1016/j.jep.2012.05.044.
11. González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. 2012. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med.* 2012 May;78(8):793-6. doi: 10.1055/s-0031-1298416.
12. Gu HF, Chen RY, Sun YH, Liu F. 2004. Studies on chemical constituents from herb of *Dracocephalum moldavica*. *China J. Chin. Mater. Med.*, 29: 232-234.
13. Harold Lint and Carl Epling. 1945. A *Revision of Agastache*, *American Midland Naturalist*, Vol. 33, No. 1, pp. 207-230
14. Havenith H., Raven N., Di Fiore S., Fischer R., Schillberg S. 2014. Image-based analysis of cell-specific productivity for plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 117, 393-399. 10.1007/s11240-014-0448-x
15. Hernández-Abreu O, Torres-Piedra M, García-Jiménez S, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, Montes S, Rembao D, Estrada-Soto S. 2012. Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*. *J Ethnopharmacol.* Mar 7;146(1):187-91. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.029.
16. Hernández-Abreu O, Durán-Gómez L, Best-Brown R, Villalobos-Molina R,

- Rivera-Leyva J, Estrada-Soto S. 2011.** Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *J Ethnopharmacol.* 2011 Nov 18;138(2):487-91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.
- 17. Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. 2009.** Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol.* 2009 Jul 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016.
- 18. Hong JH, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, Oh GT. 2001.** Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Lett* 495:142–147
- 19. Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. 1997.** Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 39-52.
- 20. Kinghorn, A.D., Pan, L., Fletcher, J.N., Chai, H., 2011.** The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod.* 74, 1539–1555.
- 21. Karuppusamy, S. 2009.** A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
- 22. M Cusidó, R., Palazon, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C., & Piñol, M. T. 2002.** Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of taxusmedia. *Biotechnology progress*, 18(3), 418-423.
- 23. Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Mornar, A., & Maleš, Ž. 2008.** Application of TLC in the isolation and analysis of flavonoids. In *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press; Taylor & Francis Group.
- 24. Monroy- Ortíz, Castillo-España. 2007.** Plantas medicinales del estado de Morelos. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2da Edición. Pag. 405. ISBN 968-878-277-7.
- 25. Mühlbach, H. P. 1998.** Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology annual review*, 4, 113-176.
- 26. Murashige, T., & Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- 27. Nam KW, Kim J, Hong JJ. 2005.** Inhibition of cytokine-induced I $\kappa$ B kinase activation as a mechanism contributing to the anti-atherogenic activity of tilianin in hyperlipidemic mice. *Atherosclerosis*. 2005;180:27–30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.022.
- 28. Namdeo, A. G. 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 69.
- 29. Newman, D. J., & Cragg, G. M. 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- 30. Nicasio-Torres, M., Meckes-Fischer, M., Aguilar-Santamaría, L., Garduño-Ramírez, M. L., Chávez-Ávila, V. M., & Cruz-Sosa, F. 2012.** Production of

- chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta physiologiae plantarum*, 34(1), 307-316.
31. **Osuna, L., Tapia, N., Cusidó, R., Palazón, J., Bonfill, M., Zamilpa, A., ... & Cruz-Sosa, F. 2015.** Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). *Acta physiologiae plantarum*, 37(10), 199.
  32. **Osuna, L. Aguilar, A. Tapia, M. E. 2013.** Plantas Medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. 1ª. Edic. Universidad de Barcelona Pag. 16
  33. **OMS 2014.** Informe mundial sobre la situación mundial de las ENT 2014. www.WHO/NMH/NVI/15.1
  34. **Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. 2016.** Saffron: a promising natural medicine in the treatment of metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
  35. **Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. 2002.** Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
  36. **Ramachandra Rao, S., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. 2002.** Biotransformation of Digitoxin in Cell Cultures of *Capsicum frutescens* in the Presence of  $\beta$ -cyclodextrin. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(2), 137-143.
  37. **Salisbury, F. B., Campbell, W. F., Carman, J. G., Bingham, G. E., Bubenheim, D. L., Yendler, B., ... & Podolsky, I. 2003.** Plant growth during the greenhouse II experiment on the Mir orbital station. *Advances in Space Research*, 31(1), 221-227.
  38. **Sandhar HK., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., and Sharma P. A 2011.** Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011; 1(1):25-4.
  39. **Sánchez-Recillas A, Mantecón-Reyes P, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2014.** Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pac J Trop Med*. Mar;7(3):179-83. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60017-1.
  40. **Santiago R, Rojas I, Arvizu G, Muñoz D, Perez D, Sucilla M. 2005.** Caracterización del potencial fitotóxico de Agastache Mexicana (Kunth) Lint et Epling. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. Universidad Simon Bolivar. Año 4 No 4 Dic 2005.
  41. **Sanders, R. W. 1987.** Taxonomy of Agastache section *Brittonastrum* (Lamiaceae-Nepeteae) Systematic Botany Monographs 15:1-92.
  42. **Suchorska-Tropilo K, Pio'ro-Jabrucka E .2004.** Morphological, developmental and chemical analysis of the chosen Agastache species. *Ann Warsaw Univ Life Sci SGGW Horticult Landsc Architect* 25:25–31
  43. **Svoboda KP, Gough J, Hampson J. 1995.** Analysis of the essential oils of some *Agastache* species grown in Scotland from various seed sources. *Flavour Fragr J*. 1995;10:139–145. doi: 10.1002/ffj.2730100305.
  44. **Taiz, L., Taiz, E., Zeiger, E., Uhart, S. A. E., Uhart, H. E. S. A., Echeverría, H. E., & SOLANICH, F. P. 2006.** Fisiología vegetal/Plant physiology (No. 581.1). Universitat Jaume I.
  45. **Tejavathi, D.H., Indira, M.N. 2011.** *In vitro* regeneration of multiple shoots from the nodal explants of *Drymaria cordata* (L.) Wild. Ex. Roem. and Schult. *The Bioscan*, 6(4): 657-660.

46. Trejo-Tapia, G. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
47. Tuan PA, Park WT, Xu H. 2012. Accumulation of tilianin and rosmarinic acid and expression of phenylpropanoid biosynthetic genes in *Agastache rugosa*. *J Agric Food Chem*. 2012;60:5945–5951. doi: 10.1021/jf300833m.
48. Verano J, González-Trujano ME, Déciga-Campos M, Ventura-Martínez R, Pellicer F. 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol Biochem Behav*. Sep;110:255-64. doi: 10.1016/j.pbb.2013.07.020.
49. Versalita s. Vanneste, j. Friml. 2009. *Auxin: a trigger for change in plant development*. *Cell* 136 (6): 1005–1016; PMID 19303845; doi 10.1016/j.cell.2009.03.
50. WHO 2003. WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP).
51. Wang JG. 2010. GC-MS Analysis of chemical composition of volatile oil from *Agastache rugosa*. *Food Sci* 2010-08. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTALSPKX201008052.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALSPKX201008052.htm).
52. Xu H, Kim YK, Jin X. 2008. Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *J Med Plants Res*;2(9):237–241
53. Yue, W., Ming, Q. L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C. J., Han, T., & Qin, L. P. 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 215-232.
54. Zielińska S and Matkowski A. 2014. Phytochemistry and bioactivity of aromatic an medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). Department of Pharmaceutical Biology and Botany, Medical University of Wrocław, Borowska 211, 50-556.
55. Estrada L.E. 1995. Cultivo de Plantas Medicinales. Una urgencia latinoamericana. En. Estrada (Ed). *Plantas Medicinales de México*. 2ª Ed. UACH. México
56. Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(11), 1777-1789.
57. Kumar, S., & Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
58. Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Cruz-Jaime, S., del Carmen Valadez-Vega, M., Sumaya-Martínez, M. T., Pérez-Ávila, K. G., & Morales-González, J. A. 2013. The chemoprevention of chronic degenerative disease through dietary antioxidants: progress, promise and evidences. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*. InTech.
59. Huang, T. K., & McDonald, K. A. 2012. Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology advances*, 30(2), 398-409.
60. Ulbrich, B., Wiesner, W., & Arens, H. 1985. Large-Scale Production of Rosmarinic Acid from Plant Cell Cultures of *Coleus blumei* Benth. In *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (pp. 293-303). Springer, Berlin, Heidelberg.

61. **Inomata, S., Yokoyama, M., Seto, S., & Yanagi, M. 1991.** High-level production of arbutin from hydroquinone in suspension cultures of *Catharanthus roseus* plant cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(3), 315-319.
62. **van Staden, E., Zazimalova, E., George, E.F. 2008** Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J. (Eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture*, (3rd edition). 1: 205–226. Springer, Background, Dordrecht, Netherlands.
63. **Verpoorte, R. 1998.** Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232-238.
64. **Stafford, A. M., Pazoles, C. J., Siegel, S., & Yeh, L. A. 1998.** Plant cell culture: a vehicle for drug delivery. *Advances in drug discovery techniques*. CRC Press, New York.
65. **Lahana, R. 1999.** How many leads from HTS?. 447-448.
66. **Harvey, A. 2000.** Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*, 5(7), 294-300.
67. **Cragg, G. M., & Newman, D. J. 2013.** Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
68. **Myers, P. L. 1997.** Will combinatorial chemistry deliver real medicines?. *Current opinion in biotechnology*, 8(6), 701-707.
69. **Ortholand, J. Y., & Ganesan, A. 2004.** Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current opinion in chemical biology*, 8(3), 271-280.
70. **Asaka, I., Ii, I., Hirotani, M., Asada, Y., & Furuya, T. 1993.** Production of ginsenoside saponins by culturing ginseng (*Panax ginseng*) embryogenic tissues in bioreactors. *Biotechnology letters*, 15(12), 1259-1264.
71. **Deno, H., Yamagata, H., Emoto, T., Yoshioka, T., Yamada, Y., & Fujita, Y. 1987.** Scopolamine production by root cultures of *Duboisia myoporoides*: II. Establishment of a hairy root culture by infection with *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of plant physiology*, 131(3-4), 315-323.
72. **Liu, C. Z., Abbasi, B. H., Gao, M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. 2006.** Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22), 8456-8460.
73. **Fujita, Y. 1988.** Industrial production of shikonin and berberine. *Applications of plant cell and tissue culture*, 137, 228-238.
74. **FUJITA, Y. 1985.** Production of plant pigments by plant tissue and cell culture. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 43(11), 1003-1012.
75. **Kayani, H. A., Khan, S., Naz, S. H. E. E. B. A., & Chaudhary, M. I. (2013).** Micropropagation of *Agastache anisata* using nodal segments as explants and cytotoxic activity of its methanolic extracts. *Pak J Bot*, 45(6), 2105-2109.
76. **Zielińska, S., & Matkowski, A. (2014).** Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry reviews*, 13(2), 391-416.
77. **Zielińska, S., Piątczak, E., Kalemba, D., & Matkowski, A. (2011).** Influence of plant growth regulators on volatiles produced by in vitro grown shoots of *Agastache rugosa* (Fischer & CA Meyer) O. Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(1), 161.

78. Polivanova, O. B., & Cherednichenko, M. Y. (2017). Introduction to in vitro Culture and Micropropagation of two *Agastache* species-*Agastache urticifolia* and *Agastache scrophulariifolia*. *for Sustainable Development in Environmental Sciences and Agroforestry Research* (pp. 57-60). Springer, Cham.
79. Moharami, L., Hosseini, B., Ravandi, E. G., & Jafari, M. (2014). Effects of plant growth regulators and explant types on in vitro direct plant regeneration of *Agastache foeniculum*, an important medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(6), 707-711.
80. EGGER, Janet N. *Agastache* plant named 'Raspberry Summer'. U.S. Patent Application No 12/150,185, 29 Sept. 2009.
81. EGGER, Janet N. *Agastache* plant named 'TNAGAPDB'. U.S. Patent Application No 15/330,802, 6 Feb. 2018.
82. EGGER, Janet N. *Agastache* plant named 'Cotton Candy'. U.S. Patent Application No 12/383,649, 11 Mayo 2010.
83. EGGER, Janet N. *Agastache* plant named 'Summer Glow'. U.S. Patent Application No 12/383,648, 4 Mayo 2010.
84. Stefanache, C., Danila, D., Gille, E., Necula, R., & Falticeanu, M. (2012). Contribution to the study of the polyphenolic compounds of *Agastache rugosa* Kuntze plants in in vitro and conventional cultures. In *Proceedings of the Seventh Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, (Proceedings of the 7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia, 27-31 May, 2012* (pp. 74-80). Institute for Medicinal Plant
85. Mehalaine, S., & Chenchouni, H. (2019). Effect of Climatic Factors on Essential Oil Accumulation in Two Lamiaceae Species from Algerian Semiarid Lands. In *Exploring the Nexus of Geoecology, Geography, Geoarcheology and Geotourism: Advances and Applications*
86. Mercado-Mancera, G., Troyo-Diéguez, E., Aguirre-Gómez, A., Murillo-Amador, B., Beltrán-Morales, L. F., & García-Hernández, J. L. (2010). Calibración y aplicación del índice de aridez de De Martonne para el análisis del déficit hídrico como estimador de la aridez y desertificación en zona áridas. *Universidad y ciencia*, 26(1), 51-64
87. Neugart, S., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Klopsch, R., Wiesner-Reinhold, M., & Schreiner, M. (2018). The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia horticultrae*, 233, 460-478.
88. Krumbein, A., Saeger-Fink, H., Schonhof, I., 2007. Changes in quercetin and kaempferol concentrations during broccoli head ontogeny in three broccoli cultivars. *J. Appl. Bot. Food Qual.-Angewandte Botanik* 81, 136–139.
89. Nybakken, L., Horkka, R., Julkunen-Tiitto, R., 2012. Combined enhancements of temperature and UVB influence growth and phenolics in clones of the sexually dimorphic *Salix myrsinifolia*. *Physiol. Plant.* 145, 551–564
90. Neugart, S., Kläring, H.-P., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L.W., Krumbein, A., 2012a. The effect of temperature and radiation on flavonol aglycones and flavonol glycosides of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 133, 1456–1465.
91. Neubauer, C., Heitmann, B., Müller, C., 2014. Biofumigation potential of Brassicaceae cultivars to *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 140, 341–352.
92. Neugart, S., Kläring, H.-P., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L.W., Krumbein, A., 2012a. The effect of temperature and radiation on flavonol

- aglycones and flavonolglycosides of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 133, 1456–1465.
- 93.** Schmidt, S., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L.W., Krumbein, A., 2010a. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 119, 1293–1299.
- 94.** Berini, J. L., Brockman, S. A., Hegeman, A. D., Reich, P. B., Muthukrishnan, R., Montgomery, R. A., & Forester, J. D. (2018). Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Frontiers in plant science*, 9.
- 95.** Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- 96.** Prinsloo, G., & Nogemane, N. (2018). The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. *Phytochemistry reviews*, 17(4), 889-902
- 97.** Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731..
- 98.** Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76.
- 99.** Saunders, J. A., & McClure, J. W. (1976). The distribution of flavonoids in chloroplasts of twenty five species of vascular plants. *Phytochemistry*, 15(5), 809-810.
- 100.** Scheidt, H. A., Pampel, A., Nissler, L., Gebhardt, R., & Huster, D. (2004). Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1663(1-2), 97-107.
- 101.** Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287-299.
- 102.** Zhao, J. (2015). Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in plant science*, 20(9), 576-585.
- 103.** Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- 104.** Mabry, T., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (2012). *The systematic identification of flavonoids*. Springer Science & Business Media.

### CAPITULO III

#### **CULTIVOS *IN VITRO* DE *A. mexicana*, UNA ALTERNATIVA BIOTECNOLOGICA PARA LA PRODUCCIÓN DE TILIANINA A PARTIR CULTIVOS DIFERENCIADOS E INDIFERENCIADOS.**

##### **3.1. Introducción**

Una excelente alternativa para la producción a gran escala de compuestos bioactivos es mediante el cultivo de tejidos vegetales, ofrecen una forma efectiva de aprovechamiento sostenible y como estrategia de conservación de las plantas medicinales (Xing *et al.*, 2018; Khan y Bibi, 2012; Rout *et al.*, 2000). Este enfoque proporciona varias ventajas en la producción de compuestos con actividad farmacológica entre las que destacan: poca o nula variación estacional, rendimientos más elevados, un menor tiempo de producción y la conservación de la especie (Sarkate *et al.*, 2017). Además, la biomasa *in vitro* podría ser una mejor fuente de flavonas que las plantas cultivadas o colectadas en el campo (Kwiecień *et al.*, 2018).

Las auxinas y citocininas son reguladores del crecimiento de las plantas (PGR) que juegan un papel importante en el proceso morfogénico de los cultivos *in vitro*. Los PGR promueven diferentes respuestas fisiológicas y bioquímicas, que conducen a la producción de tejido (como callos), órganos (como brotes) o plantas enteras. Las alteraciones en el tipo y concentración de auxinas o citocininas, así como la relación auxina / citocinina, tienen fuertes efectos sobre el proceso morfogénico y la producción metabólica (Amoo y Van Staden 2013, Pourebad *et al.*, 2015) debido al contenido endógeno y la biodisponibilidad de los PGR, la edad fisiológica del explante, así como la especie de estudio (Martín *et al.*, 2015). A la fecha, varios informes confirman la influencia de las auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y las citocininas como la 6-benzoaminopurina BAP en la producción de metabolitos secundarios *in vitro* (Tepe *et al.*, 2007; Masaumain *et al.*, 2011; de Sousa-Machado *et al.*, 2018). Sin embargo, pocos estudios han determinado el efecto de los reguladores en la producción de compuestos activos en el género *Agastache* (Lee *et al.*, 2008).



*A. mexicana* por su uso en la medicina tradicional y sus propiedades farmacológicas, es un candidato idóneo para la obtención de flavonas como tilianina (Hernández-Abreu *et al.*, 2009) sin embargo no habian sido objeto de estudios biotecnológicos debido a que solo se reportan algunas especies como *A. rugosa* y *A. foeniculum*, los cuales centraron su estudio en el desarrollo de protocolos de micropropagación y la biosíntesis de compuestos volátiles en células y tejidos (Kim *et al.*, 2013; Moharami *et al.*, 2014). Hasta ahora no se había encontrado un sistema de producción de tilianina con una calidad intrínseca, pues el insuficiente suministro de material vegetal, la variación estacional y diversos factores ambientales no permiten la homogenización del producto y en un futuro la comercialización de este compuesto.

El objetivo de este trabajo fue investigar la producción de tilianina en los procesos morfogénicos de los cultivos *in vitro* (callos, células, raíces, brotes y plántulas completas) de *A. mexicana*, comparándolas contra la producción en plantas silvestres, donde los resultados del proceso morfogénico constituyen una alternativa promisoría en la producción de tilianina y otros compuestos bioactivos.

### **3.2. Hipótesis**

El proceso morfogénico de los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* es promovido por las auxinas 2,4-D, ANA y las citocinina BAP y KN, estos reguladores de crecimiento favorecen la callogénesis, y organogénesis de brotes y raíces adventicias.

El contenido de tilianina depende de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, igual que del grado de diferenciación celular o tisular del material vegetal.

### **3.3. Objetivos**

#### **3.3.1 Objetivo General**

Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la callogénesis y organogénesis de brotes y raíces adventicias de *A. mexicana*. Así como, en la producción de tilianina en los cultivos *in vitro* generados.

#### **3.3.2 Objetivos específicos**

3.4.2.1 Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D, ANA, KIN y BAP en la generación de callos, células y raíces de cultivos *in vitro* de *A. mexicana*.

3.4.2.2 Comparar la producción de tilianina en callos, células, raíces y plantas generadas *in vitro* mediante cromatografía líquida de alta resolución versus plantas de *A. mexicana* colectadas en campo.

### 3.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este trabajo se presenta en el siguiente diagrama de la figura 1.

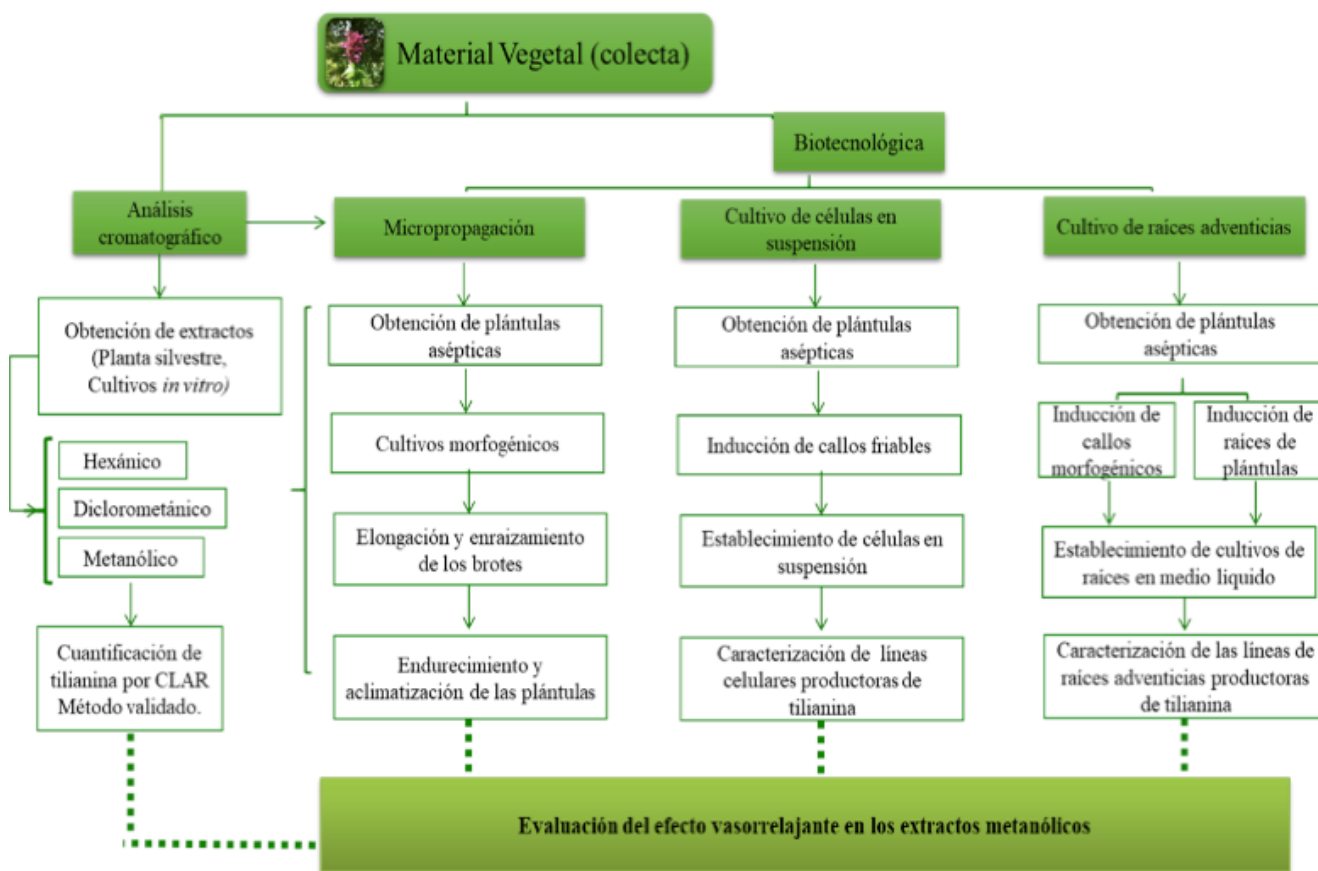


Figura 1. Estrategia metodológica para el desarrollo del presente trabajo.

### 3.5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.5.1 Material vegetal

Se colectaron plantas completas de *A. mexicana* en el municipio de Tlalnepantla Morelos, México (19° 06'6.65" N y 98° 55'49.03" O) a una altitud de 2823 m.s.n.m, en los meses de junio y diciembre 2017. El material fue identificado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Botánica Estructural del CEIB-UAEM y una muestra (No.26.336 y No 35766) fue depositado en Herbario HUMO del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

### 3.5.2 Medios de cultivo

A continuación, se describen los medios de cultivos utilizados para la germinación y micropropagación *in vitro* de *A. mexicana*. Todos los medios fueron ajustados a un pH de  $5.7 \pm 0.1$  y se sometieron a un proceso de esterilización en autoclave por 21 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  ( $1\text{kg}/\text{cm}$  de presión).

#### Medio AA

Agar Agua al 3%, para su preparación se usó agar bacteriológico BIOXON® y agua destilada.

#### Medio MS0

Medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa, mio-inositol (0.1g/L), 1.06g/L de 2-N-Morfolino ácido etanosulfónico sal hemisodio (MES) como amortiguador y Polivinilpirrolidina (PVP) como antioxidante. Se agregó 3g/L de Phytigel® (Sigma) como gelificante.

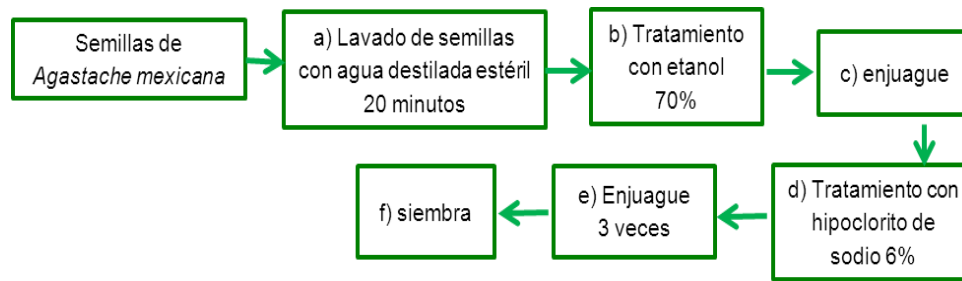
#### Medio MS75

Medio basal MS0 modificado al 75% de sus macro y micronutrientes, complementado con 30 g/L sacarosa como fuente de carbono y 3g/L de Phytigel® (Sigma).

### 3.5.3 Germinación y obtención de plantulas axénicas

Para los ensayos de germinación se seleccionaron semillas de color café oscuro. Previo al proceso de desinfección, un grupo de 200 semillas fueron escarificadas con la ayuda de una lija del número 00. La desinfección se realizó siguiendo el procedimiento presentado en la figura 2.

Para la desinfección de semillas se siguió el procedimiento presentado en la figura 2.



**Figura 2.** Proceso para la desinfección de semillas de *A. mexicana*.

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar marca VECO®. Para la germinación se utilizaron semillas desinfectadas escarificadas y no escarificadas las cuales fueron colocadas en cajas Petri que contenían 20 ml del medio AA, se colocaron 10 semillas por cada caja, utilizándose un total de 200 semillas escarificadas y 200 semillas no escarificadas. Estas semillas se mantuvieron bajo condiciones controladas de cultivo (25°C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad) durante 31 días. La germinación se registró diariamente teniendo como criterio la emergencia de la radícula. Se determinó el porcentaje de germinación, así como las diferencias entre medias de las semillas escarificadas y no escarificadas (ANOVA).

### 3.5.4 Efecto de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP en el desarrollo morfológico

Explantos de hojas y segmentos nodales se seleccionaron de plántulas de 4 semanas de edad. Los explantes se cultivaron en medio MS0 adicionado con diferentes concentraciones de 2,4D y BAP, más un control (tabla 1). El ensayo se mantuvo en condiciones de fotoperiodo (16/8h) a 25°C por 4 semanas. Al finalizar esta etapa se evaluó la inducción de callos y brotes a partir de los explantes. Para la callogénesis se determinó la textura, color, peso fresco y seco del callo por tratamiento. En el proceso de organogénesis se estableció el número de brotes por explante, número de hojas, longitud, peso fresco y peso seco del brote.

Para cada tratamiento se utilizan 3 frascos tipo “gerber” con medio de cultivo y 3 explantes como unidad experimental. El ensayo fue completamente al azar con una factorial de 2 x 8 niveles (concentraciones) producto de dos tipos de explantes y 16 combinaciones hormonales más 1 control negativo (tabla 2). Los resultados se evaluaron de acuerdo a un ANOVA factorial y posteriormente con el método de Tuckey empleando el software Statistics V10.

**Tabla 1.** Tratamientos con las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP en medio MS0 para la inducción de brotes en explantes de segmentos nodales y hoja de *A. mexicana*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento vegetal (mg/l)	
	2,4D	BAP
M0	0	0
M1	0	0.1
M2	0.1	0.1
M3	0.3	0.1
M4	1	0.1
M5	0	0.5
M6	0.1	0.5
M7	0.3	0.5
M8	1	0.5
M9	0	1
M10	0.1	1
M11	0.3	1
M12	1	1
M13	0	1.5
M14	0.1	1.5
M15	0.3	1.5
M16	1	1.5

### 3.5.5 Endurecimiento y aclimatización de plántulas obtenidas *in vitro*

Las plantas generadas, fueron transferidas a medio MS75 sin reguladores de crecimiento y estos cultivos durante 4 semanas se mantuvieron bajo las condiciones controladas ya descritas. Cuando las plántulas alcanzaron los 6 cm de altura, fueron transferidas a frascos grandes (10 cm de altura por 3 cm de diámetro) que contenía 20 ml de medio MS75, y se mantuvieron en iguales condiciones de cultivo durante 12 semanas.

Después de este tiempo las plantas fueron transferidas a frascos más grandes que contenían una mezcla fina de sustrato comercial estéril Sunshine® (70-80% de turba canadiense Esfagnacea, vermiculita, piedra caliza yeso y agente humectante). Los frascos se taparon con plástico “kleenpack” durante una semana, posteriormente se cambió el plástico y se colocó una bolsa de polietileno transparente teniendo cuidado de mantener húmedo el interior de la bolsa. Después de 1 semana se retiró la bolsa de plástico y las plántulas continuaron en el cuarto de cultivo 1 semana adicional. Posteriormente fueron transferidas a una maceta (10 cm de diámetro por 7.5 cm de altura) que contenía tierra estéril. Estas plantas se trasladaron al invernadero bajo condiciones controladas de temperatura ( $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), pared húmeda y riego por aspersión a una intensidad luminosa de 100 Lux (intensidad de luz de invernadero).

### 3.5.6 Callogénesis

Para la inducción de callo se utilizaron explantes de hoja (8-10 mm) de plántulas de 4 semanas, que se colocaron en frascos tipo “gerber” con medio MS0 que contenía 2,4-D y KIN (6-furfuril amino purina) en diferentes combinaciones (Tabla 2). Como control se colocaron frascos con explantes sin RCV.

Para cada tratamiento se utilizan 3 frascos tipo “gerber” con medio de cultivo y 3 explantes como unidad experimental. Todos los frascos se mantuvieron en cuarto de cultivo a  $25^{\circ}\text{C}$  en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento se registró la respuesta morfogénica, textura de callo, así como peso fresco (PF) y peso seco (PS) obtenido a las 4 semanas de cultivo. El ensayo fue completamente al azar producto de 12 combinaciones hormonales más 1 control negativo (tabla 1). Los resultados se evaluaron de acuerdo a un ANOVA y posteriormente con el método de Tuckey empleando el software Statistics V10.

**Tabla 2.** Tratamientos con las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y KIN en medio MS0 para la inducción de callos en explantes de hoja de plantulas de cultivo *in vitro* *A. mexicana*.

Tratamientos	RCV (mg/l)	
	2,4D	KIN
M0	0	0
M1	1	0.1
M2	1.5	0.1
M3	2	0.1
M4	1	0.2
M5	1.5	0.2
M6	2	0.2
M7	1	0.3
M8	1.5	0.3
M9	2	0.3
M10	1	0.5
M11	1.5	0.5
M12	2	0.5

### 3.5.7 Establecimiento de Cultivos de Células en Suspensión

El cultivo de células en suspensión de *A. mexicana* fue iniciado colocando 1 g de callos friables, en 50 ml de medio líquido MS0 contenido en matraces Erlenmeyer con deflectores de 250 ml. El cultivo fue incubado en un agitador orbital (LabTech Mod. LSI-1005R) a 110 rpm y 25 °C durante 4 semanas, en agitación constante en obscuridad, con el fin de disgregar los callos y multiplicar las células libres.



Se evaluó el desarrollo de las suspensiones celulares registrando disgregación del callo y crecimiento durante el establecimiento de las suspensiones. La biomasa celular se filtró en condiciones de esterilidad cada 3 semanas y fue subcultivada en medio líquido MS0 nuevo bajo las mismas condiciones de cultivo.

#### **3.5.7.1 Selección de líneas celulares**

Con el fin establecer un cultivo celular homogéneo las células en suspensión fueron filtradas, seleccionadas y resembradas en 4 frascos con medio MS0 semisólido. Después 3 semanas se generaron callos friables, estos fueron cultivados en medio MS0 líquido, de los cuales derivaron las 4 primeras líneas y mediante la técnica de pipeteo (Mustafa *et al.*; 2011) fueron inoculados matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio líquido nuevo, de los cuales se obtuvieron nuevas líneas celulares. Este procedimiento se repitió durante 8 semanas para obtener una cantidad adecuada de biomasa que nos permitió desarrollar las cinéticas de crecimiento.

#### **3.5.7.2 Cinéticas de crecimiento**

La cinética de crecimiento fue tipo lote ( $n=3$ ), en donde los parámetros cinéticos de crecimiento determinados fueron: 1) La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada a través del logaritmo de los pesos secos de las biomásas determinadas durante la fase exponencial de crecimiento. 2) El tiempo de duplicación ( $t_d$ ) que se determinó mediante la ecuación  $t_d = \ln 2 / \mu$  y 3) El índice de crecimiento que se obtiene calculando la biomasa máxima obtenida menos el inóculo entre el inóculo. Los parámetros de medición se realizaron mediante el registro del peso fresco (PF) y peso seco (PS) (Kieran *et al.* 1997, Muhlbae, 1998; Nicasio *et al.*, 2012), cada 3 días durante 45 días (15 puntos).

#### **3.5.7.3 Determinación de PF y PS**

Las células en suspensión de cada matraz fueron filtradas al vacío en embudo Buchner (sobre papel filtro Whatman No 1). La biomasa recuperada se lavó con agua destilada estéril para eliminar los residuos del medio; después se determinó el PF, la biomasa obtenida fue colocada en una estufa de secado y convección (Binder modelo FED 115-UL) a 35°C durante 72 horas y se determinó el PS. El medio filtrado se recuperó para medir los parámetros de pH y consumo de la fuente de carbono

mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Con la biomasa seca se realizaron extractos que se utilizaron para identificar y cuantificar el contenido de tilianina.

#### **3.5.7.4 Determinación del pH**

La determinación del pH en las suspensiones celulares fue registrada con un potenciómetro estándar calibrado con amortiguadores de referencia (pH 4 y 7), directamente en el medio posterior al filtrado celular. Los valores fueron promediados aritméticamente y se calculó la desviación estándar de los datos.

#### **3.5.7.5 Determinación del consumo de la fuente de Carbono**

La concentración de azúcares totales en los sobrenadantes de los medios de cultivo se determinó utilizando la técnica de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). En tubos de ensayo de 10 ml donde se colocaron 990  $\mu$ l de agua y 10  $\mu$ l de muestra, posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ l de fenol al 5%, y para generar la reacción se le adicionó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Debido a que la reacción es exotérmica se debe dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para determinar la concentración de azúcares en las muestras se generó una curva con concentraciones conocidas de sacarosa partiendo de una concentración de 10 mM hasta 2.5 mM y se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro marca (Genesys 10s UV-VIS) a 490 nm. El análisis se realizó por triplicado para cada muestra a lo largo de la cinética y los datos se calcularon por medio de la siguiente ecuación:  $(\frac{a_m * G}{a_c})D$  Donde:  $a_m$ = absorbancia de la muestra,  $G$ = gramos de glucosa control,  $a_c$ = absorbancia del control y  $D$ = Dilución de la muestra utilizada.

#### **3.5.7.6 Determinación de Viabilidad celular**

Durante el establecimiento de las suspensiones celulares se determinó la viabilidad celular mediante dos técnicas, la técnica de diacetato de fluoresceína (FDA) (Wildholm, 1972) y el método de Smith *et al.*, (1990) el cual utiliza azul de Evans.

Para la técnica de FDA, se prepara el reactivo (5 mg de FDA / 1 ml de acetona almacenada a 4°C) y se toman 100  $\mu$ l del stock de FDA que se adicionan a 5 ml de agua destilada.

De esta dilución se toman 50 µl y se mezcla con 50 µl de suspensión celular (v/v), se deja reposar durante 60 segundos, se homogeniza y se toman 100 µl colocándose sobre un portaobjetos limpio, se observa en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF) con el objetivo 10x. Esta técnica solo se utilizó para confirmar la supervivencia de las células (cualitativa).

El método de Smith se realizó tomando una muestra de 500 µl de las suspensiones celulares más el colorante azul de Evans al 2% (p/v) en una proporción 1:1, se mezcla suavemente y se deja reaccionar durante 3 minutos. Se toman 100 µl de la muestra y se colocan sobre un portaobjetos más cubreobjeto evitando la formación de burbujas, se observa al microscopio óptico con el objetivo 10X, se toman las fotos y se analizan mediante el programa “Image J” (Collins, 2007). Las células viables son de color blanco y las células no viables son teñidas de azul, se contabilizan y el porcentaje de viabilidad es el resultado del número de células viables entre el número total de células por 100.

$$\text{Viabilidad celular} = (\text{n}^\circ \text{ de células viables} / \text{n}^\circ \text{ total de células}) \times 100$$

### 3.5.8 Inducción de raíces adventicias

El cultivo de raíces adventicias de *A. mexicana*, fue iniciado mediante dos metodologías, una directa generada a partir a raíces de plántula crecida en condiciones *in vitro* y otra indirecta que se generó a partir de callos rizogénicos iniciados de explantes de hoja.

La línea I se obtuvo de raíces aisladas de callos rizogénicos generados a partir de explantes de hoja, que se colocaron en medio MS0 adicionado con diferentes combinaciones de ANA y KIN (Tabla 3), más un control negativo. Para cada tratamiento se utilizan 3 explantes por frasco tipo “gerber” con sus 3 repeticiones. Los cultivos se mantuvieron durante cuatro semanas, en un cuarto a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. En la evaluación y registro se consideró la respuesta morfogénica, peso fresco (PF) y peso seco (PS). El ensayo fue completamente al azar, producto de 8 combinaciones hormonales más un control negativo (tabla 3). Las raíces fueron subcultivadas cada 3 semanas transfiriendo 1 g de peso fresco a medio nuevo, la composición del medio corresponde al tratamiento que dio origen al callo rizogénico.

La biomasa seca y el medio de cultivo fueron analizados para identificar y cuantificar el contenido de tilianina. Los resultados se evaluaron de acuerdo a un ANOVA y posteriormente con el método de Tuckey empleando el software Statistics V10.

**Tabla 3.** Tratamientos con las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento ANA y KIN en medio MS0 para la inducción de raíces en explantes de hoja de plántulas de cultivo *in vitro* *A. mexicana*.

Tratamientos	RCV (mg/l)	
	ANA	KIN
M0	0	0
M1	0.5	0
M2	2.0	0
M3	0	0.1
M4	0.5	0.1
M5	2.0	0.1
M6	0	0.5
M7	0.5	0.5
M8	2.0	0.5

La línea II se generó de explantes de raíces de plántulas germinadas *in vitro*, las cuales se colocaron en medio líquido MS0 adicionado con 2 mg/L de la auxina ANA. Se generaron cultivos en condiciones de obscuridad, incubados en un agitador orbital (LabTech Mod. LSI-1005R) a 110 rpm durante 4 semanas. Posteriormente se realizaron subcultivos cada 3 semanas bajo las mismas condiciones. En este caso solo se determinó el peso fresco (PF) y peso seco (PS) en cada subcultivo.

### 3.6 Preparación de extractos

La biomasa obtenida de callos, células, raíces adventicias y plantulas fueron colocadas en un horno de convección Binder FD-115® a 35°C durante 72 horas, el material seco y molido fue sometido a una maceración discontinua y progresiva con tres tipos de disolventes como son: hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) durante 72 horas por cada disolvente. Posteriormente cada maceración es filtrada y los extractos obtenidos fueron concentrados al vacío en un rotaevaporador (Buchi Heating R-210®) a 40° C y 80 revoluciones por minuto (Hernández-Abreu *et al.*, 2009).

### 3.7 Cuantificación de tilianina por HPLC

La tilianina que se obtuvo en los extractos metanólicos de callos, células, raíces adventicias y plantulas se cuantifico mediante la técnica de cromatografía liquida de alta resolución. Los experimentos se llevan a cabo en un equipo de la Serie de PerkinElmer Sistema 200®, con un detector UV-VIS, una columna Zorbax C18 de 4,6 mm x 250 mm Agilent® y el software Total Chrom® para la obtención de datos. La fase móvil consiste en metanol-agua en una proporción 61:39 (v/v) a un flujo de 0.7 ml/min, una longitud de onda de 260 nm. Como estándar se utiliza tilianina aislada de *A. mexicana* la cual fue obtenida por precipitación del extracto metanólico adicionando acetato de etilo, la pureza (>95%) fue confirmada previamente mediante NMR <sup>13</sup>C (Hernández-Abreu *et al.*, 2009). Para el establecimiento de la curva de calibración, se prepararon diferentes concentraciones de tilianina (5, 10, 20, 30, 50 y 75 µg/mL) con el fin de evaluar la selectividad en las muestras (Hernández-Abreu *et al.*, 2011). La inyección se realiza con un *loop* de 20 µL. Se determinaron las áreas de los picos a una longitud de onda de 260 nm.

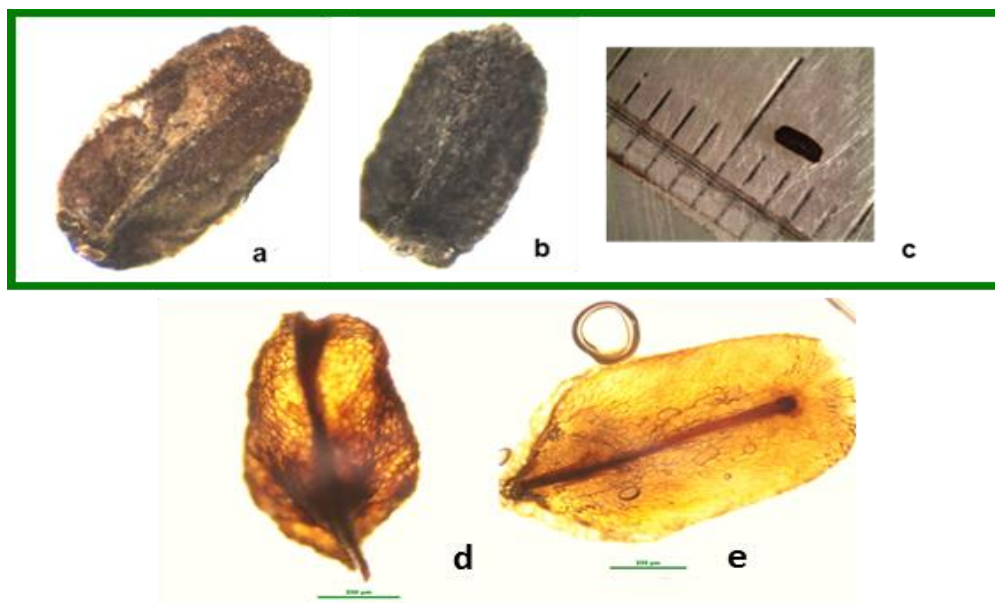
### 3.8 Analisis mediante HPTLC

Con el fin de analizar una mayor cantidad de muestras en un corto tiempo se utilizo HPTLC bajo las mismas condiciones mencionadas en el capitulo II en este caso solo se anexaron los extractos de los cultivos *in vitro*: plantulas, callos, celulas y raíces a concentraciones de 5 mg/ml.

### 3.9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

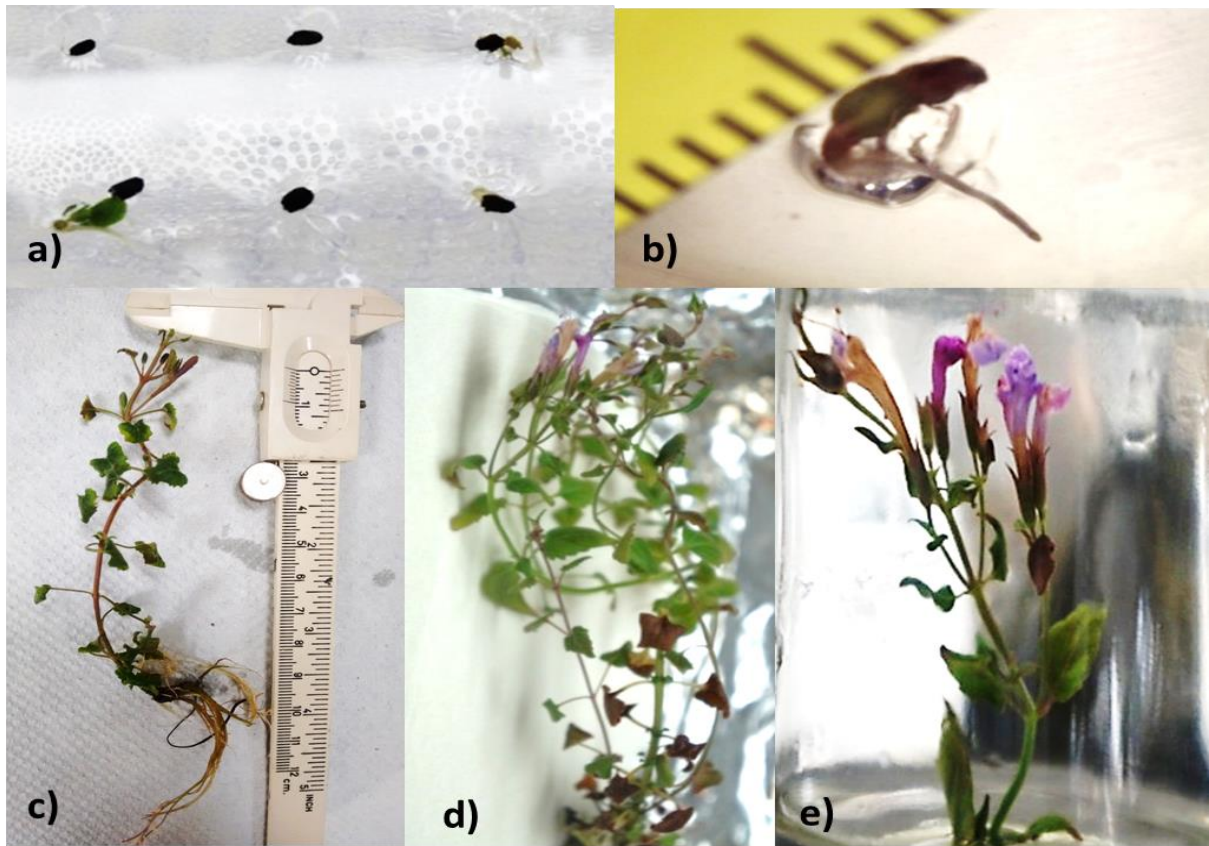
#### 3.9.1 GERMINACIÓN Y LA OBTENCIÓN DE PLANTAS AXÉNICAS

A continuación, se presentan las características de las semillas colectadas de *A. mexicana*: semillas de coloración café claro a oscuro, en forma elipsoidal a ovoide de 1.5 a 2.0 mm de largo (Figura 3); la semilla se encuentra dentro del fruto denominado esquizocarpo, el cual está rodeado de un cáliz persistente, formado por una núcula seca con tricomas en el ápice.



**Figura 3.** Semillas de plantas silvestres de *A. mexicana*. **a) b) y c)** Frutos de forma ovalada que miden 1.5 mm. **d) y e)** semilla sin esquizocarpo. Microfotografías: Elizabeth Hernández 2017.

El porcentaje de germinación que se obtuvo de las semillas de *A. mexicana* fue del 69% para las escarificadas y del 50% para las no escarificadas. El registro durante 31 días de observación, muestra que a los 9 días inicia la germinación y termina entre los 15 a 21 días. En la figura 4 se observa en la semilla aparición de la radícula y las inflorescencias generadas posterior a 24 semanas. El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas en los dos tratamientos.



**Figura 4.** Germinación de plántulas de *A mexicana*. **a)** semillas sembradas en agar al 3% **b)** Emergencia radicular entre el 5 y 6° día, microfotografía 100X **c)** Plantas completas con 12 a 14 cm de altura **d y e)** Plantas completas posterior a 24 semanas de cultivo las cuales presentaron inflorescencias.

### **3.9.2 EFECTO DE LOS REGULADORES EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y REGENERACIÓN DE BROTES PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE *A. mexicana*.**

El efecto de 2,4-D y BAP en segmentos nodales y explantes de hojas derivados de plántulas *in vitro* fue analizado, observándose una respuesta positiva en la formación de callos y la proliferación de brotes.

Los explantes de hoja solo generaron callos y los explantes de segmentos nodales dan una respuesta positiva al proceso de brotación. En el control (explantes sin reguladores de crecimiento) no se observa ninguna respuesta y su coloración verde se tornó marrón a partir de la semana 3 del ensayo. En explantes de hojas se genera un 90% de callo, donde predominan los callos de color verde oscuro y de textura compacta cuando es utilizado BAP a concentraciones entre 0.1 a 1 mg/L, la textura friable solo se presenta en la combinación de 0.5 mg/L BAP y 1.5 mg/L 2,4-D. El efecto de los reguladores en la inducción de callos y la proliferación de brotes a partir de segmentos nodales se presenta en la Tabla 4. En los segmentos nodales, se logró la formación de callo en todos los tratamientos después de dos semanas de incubación, 66.7 a 100% de los explantes son capaces de producir callo de coloración verde clara, principalmente con una textura compacta (Figura 5e). Para la formación de callos siempre se necesitó la presencia de 2,4-D, en los tratamientos que solo tienen BAP (M1, M5, M9 y M13) no hubo formación de callos, lo que sugiere que el explante no contiene suficientes auxinas para desencadenar la callogénesis.



**Tabla 4.** Efecto de las concentraciones de los reguladores de crecimiento en brotación mediante explantes de segmentos nodales de *A. Mexicana* cultivados durante 4 semanas en medio Murashige y Skoog (1962).

Tratamientos	RCV (mg/l)		Explantes de Segmentos nodales					
	D	BA P	Respuesta morfogéni ca	Brotos por explan te Media ±DE	Longit ud de brote (mm)	Núme ro de hojas Media ±DE	Textu re de callo	Col or de call o
<b>M0</b>	0	0	SR					
<b>M1</b>	0	0.1	Brotos	0,67 ± 0,50 <b>c</b>	1,89 ± 0,14 <b>d</b>	4,00 ± 4,12 <b>c</b>	SR	SR
<b>M2</b>	0.1	0.1	Brotos/cal lo	1,78 ± 0,83 <b>b</b>	5,56 ± 0,44 <b>c</b>	15,33 ±12,3 <b>7 a</b>	CC	VC
<b>M3</b>	0.3	0.1	Brotos	0,22 ± 0,44 <b>d</b>	1,22 ± 0,24 <b>d</b>	0,67 ± 1,41 <b>e</b>	SR	SR
<b>M4</b>	1	0.1	Brotos/cal lo	0,22 ± 0,44 <b>d</b>	0,44 ± 0,09 <b>e</b>	0,67 ± 1,32 <b>e</b>	CC	VC
<b>M5</b>	0	0.5	Brotos	2,33 ± 0,71 <b>a</b>	8,56 ± 1,55 <b>b</b>	18,44 ± 5,34 <b>a</b>	SR	SR
<b>M6</b>	0.1	0.5	Brotos/cal lo	0,89 ± 0,33 <b>c</b>	2,22 ± 0,11 <b>d</b>	6,22 ± 2,91 <b>c</b>	CC	VC
<b>M7</b>	0.3	0.5	Brotos/cal lo	0,33 ± 0,50 <b>c</b>	0,78 ± 0,12 <b>e</b>	1,11 ± 2,03 <b>d</b>	CC	VC
<b>M8</b>	1	0.5	Brotos/cal lo	0,89 ± 0,60 <b>c</b>	2,28 ± 0,12 <b>d</b>	2,00 ± 1,66 <b>d</b>	CC	VC
<b>M9</b>	0	1	Brotos	0,11 ± 0,33 <b>d</b>	0,33 ± 0,11 <b>e</b>	0,44 ± 1,33 <b>e</b>	SR	SR
<b>M10</b>	0.1	1	Brotos/cal lo	2,11 ± 1,05 <b>a</b>	12,89 ± 0,31 <b>a</b>	12,89 ± 9,28 <b>a</b>	CC	VO
<b>M11</b>	0.3	1	Brotos/cal lo	1,00 ± 0,87 <b>b</b>	1,33 ± 0,13 <b>d</b>	2,89 ± 3,33 <b>d</b>	CC	VO
<b>M12</b>	1	1	Brotos/cal lo	0,33 ± 0,50 <b>d</b>	0,67 ± 0,10 <b>e</b>	0,67 ± 1,00 <b>e</b>	CC	VC
<b>M13</b>	0	1.5	Brotos	2,33 ± 1,00 <b>a</b>	11,56 ± 0,15 <b>a</b>	15,22 ±12,2 <b>0 a</b>	SR	SR
<b>M14</b>	0.1	1.5	Brotos/cal lo	1,56 ± 0,53 <b>b</b>	5,22 ± 0,23 <b>b</b>	9,22 ± 5,14 <b>b</b>	FC	VC
<b>M15</b>	0.3	1.5	Brotos/cal lo	0,89 ± 0,33 <b>c</b>	2,22 ± 0,11 <b>d</b>	1,78 ± 0,67 <b>d</b>	CC	VO
<b>M16</b>	1	1.5	Brotos/cal lo	0,22 ± 0,44 <b>d</b>	0,56 ± 0,11 <b>e</b>	0,44 ± 0,88 <b>e</b>	CC	VO

RCV: reguladores de crecimiento vegetal, PS: peso seco, V: verde, VO: verde oscuro, VC: verde claro, CO: café obscuro. CC: compacto, FC: friable SR: sin respuesta; ND: no determinado. Los datos se expresan como la media ± del error estándar DE. La media del número de brotes seguido de las mismas letras dentro de una misma columna no es significativamente diferente (p<0.05) según la prueba no paramétrica Kruskal-Walis y Mann-Whitney. Los valores de brotación generados son significativamente diferentes del control usando un test de chi cuadrado.

La aplicación de auxinas permite la callogénesis al acelerar la división celular, facilitando el inicio y crecimiento del callo *in vitro* (Phua *et al.*, 2018). El efecto de inducción de callos del 2,4-D puede atribuirse a su capacidad para elevar las auxinas endógenas (Sané *et al.*, 2012) y la hipermetilación del ADN que conduce a células diferenciadas a la desdiferenciación e involucra la división celular (George *et al.*, 2008). Además, los efectos de la auxina en el explante concuerdan con informes previos en las especies relacionadas *A. rugosa* y *A. anisata* (Kim *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2008; Kayani *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2016). El desarrollo del brote se observó a los 5 días de cultivo en todos los tratamientos, el tratamiento con 0.5 mg / L de BAP resultó ser el más efectivo para la producción de brotes y hojas, con un promedio de  $7 \pm 1.0$  brotes/ explante y  $18.44 \pm 5.34$  hojas (Tabla 4).

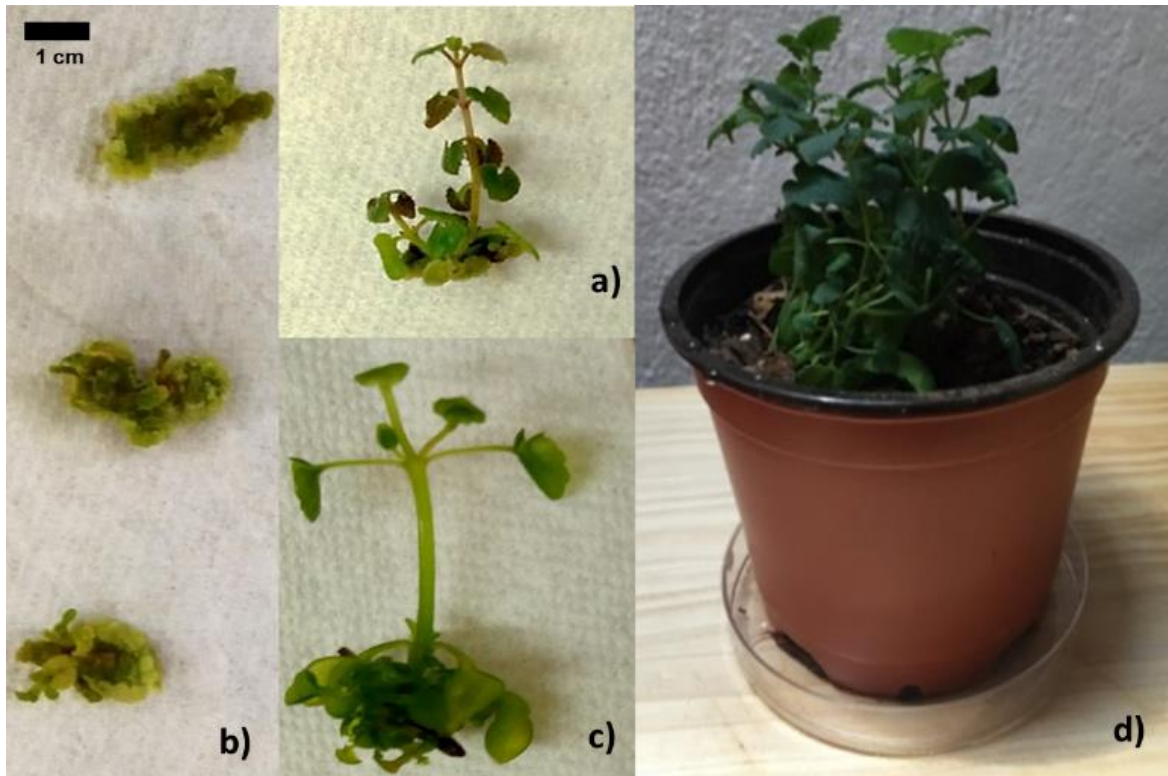
Sin embargo, con el aumento de la concentración de BAP, se inhibió el alargamiento del brote y las hojas mostraron síntomas de hiperhidratación (Figura 5c). Esto concuerda con lo observado en las especies *Lantana camara* (Veraplakorn *et al.*, 2016), *Chlorophytum borivilianum* (Ashraf *et al.*, 2014) y *Oryza sativa* (Meguro y Sato; 2014), donde la inducción y la multiplicación de los brotes es efectiva, siendo menos favorable en la elongación. Se ha demostrado que BAP induce retraso en el crecimiento e hiperhidricidad en muchas especies en forma dependiente de la concentración (Vinoth y Ravindhran 2015; Zribi *et al.*, 2015).

La plántula con mayor longitud está dada en los tratamientos que contienen 0.5, 1.0 y 1.5 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de 2,4-D (Tabla 1), esta elongación se ve favorecida ya que la combinación de estos reguladores permite el crecimiento de los brotes. Como sucede en las otras especies de lamiaceas el BAP favorece la formación de brotes (Machado *et al.*, 2011; Al-Bakhit *et al.*, 2007; Swamy *et al.*, 2014). Esta citocinina, individualmente o en combinación con auxina, se usó con éxito para la regeneración y multiplicación de brotes en *A. rugosa* (Zielinska *et al.*, 2011) y *A. foeniculum* (Moharami *et al.*, 2014).

### **3.9.3 Aclimatación de plántulas generadas *in vitro***

Las plántulas enraizadas *in vitro* a partir de explantes nodales fueron transplantadas de manera exitosa. Después de un período de 14 días, estas se transfirieron a macetas en el invernadero donde su crecimiento y desarrollo fue favorable e inclusive florecieron (Figura 5d).

Aproximadamente el 33% de las plántulas enraizadas se establecieron con éxito en el suelo.



**Figura 5.** Ensayo de brotación *in vitro* para la propagación de *A. mexicana*, donde 2,4-D y BAP ejercen una respuesta morfogénica a partir de explantes de hoja y segmentos nodales **a)** control **b)** brotación generada en la primer semana **c)** brotación posterior a 2 semanas **d)** plántulas generadas después de 4 semanas de cultivo **e)** callos y brotes **f)** Planta completa de *A. mexicana* generada a partir de cultivo *in vitro*.

### 3.9.4 Establecimiento de Cultivo de Células en Suspensión

El cultivo de células en suspensión se desarrolla a partir de callos, donde la característica principal es que sean friables (alta capacidad para disgregarse), se inoculan en un medio de cultivo líquido y se colocan en agitación. Es recomendable iniciar el cultivo con una densidad del inóculo alta y seleccionando periódicamente los agregados más pequeños hasta lograr una suspensión homogénea.

En los callos, se considera que una línea es “estable”, cuando los parámetros de crecimiento y producción de biomasa son reproducibles, es decir, presentan el mismo comportamiento a través del tiempo (Kieran *et al.*, 1997). Como sistema de producción de compuestos bioactivos los cultivos de células en suspensión poseen ventajas frente a la planta completa como son: ciclos cortos de producción, un ambiente controlado y la ausencia de contaminantes bióticos y abióticos (Havenith *et al.*, 2014).

Las combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y KIN empleadas en este estudio estimularon el desarrollo de callos en explantes de hoja obtenidos de plántulas de un mes de edad. (Tabla 6). Los callos formados con 2,4-D y KIN después de cuatro semanas de cultivo presentaron una coloración de amarillo claro a una crema translúcida (Figura 6), la literatura nos dice que un callo puede tener variedad de colores, aspectos y diferentes grados de compactación entre otras características debido a que sus células están en constante mitosis y no tienen diferenciación, esto es resultado de la respuesta a la estimulación con auxinas y citocininas (Taiz & Zeiger, 2006).

**Tabla 4.** Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de 2,4-D y KIN en la formación de callos a partir de explantes de hoja de plántulas de *A. mexicana*.

Tratamientos	RCV (mg/l)		Explantos de hoja			
	2,4-D	KIN	Respuesta morfológica	Peso Fresco Media $\pm$ DE	Peso Seco Media $\pm$ DE	Texture de callo
<b>M0</b>	0	0	SR	SR	SR	SR
<b>M1</b>	1	0.1	CALLO	1.9 $\pm$ 1.45	0.889 $\pm$ 0.98	CC
<b>M2</b>	1.5	0.1	CALLO	2.5 $\pm$ 0.57	0.6279 $\pm$ 0.28	CC
<b>M3</b>	2	0.1	CALLO	1.8 $\pm$ 1.21	0.6681 $\pm$ 1.60	CC
<b>M4</b>	1	0.2	CALLO	2.4 $\pm$ 0.83	0.5509 $\pm$ 1.25	CF
<b>M5</b>	1.5	0.2	CALLO	1.5 $\pm$ 0.49	0.4081 $\pm$ 0.62	CC
<b>M6</b>	2	0.2	CALLO	2.7 $\pm$ 0.90	0.7565 $\pm$ 0.55	CC
<b>M7</b>	1	0.3	CALLO	1.1 $\pm$ 1.11	0.394 $\pm$ 0.99	CF
<b>M8</b>	1.5	0.3	CALLO	1.2 $\pm$ 0.88	0.3923 $\pm$ 1.30	CF
<b>M9</b>	2	0.3	CALLO	0.2 $\pm$ 0.28	0.0895 $\pm$ 1.67	CF
<b>M10</b>	1	0.5	CALLO	1.7 $\pm$ 0.94	0.4028 $\pm$ 0.34	CC
<b>M11</b>	1.5	0.5	CALLO	2.0 $\pm$ 0.99	0.5403 $\pm$ 0.48	CC
<b>M12</b>	2	0.5	CALLO	1.0 $\pm$ 1.16	0.3274 $\pm$ 0.87	CC

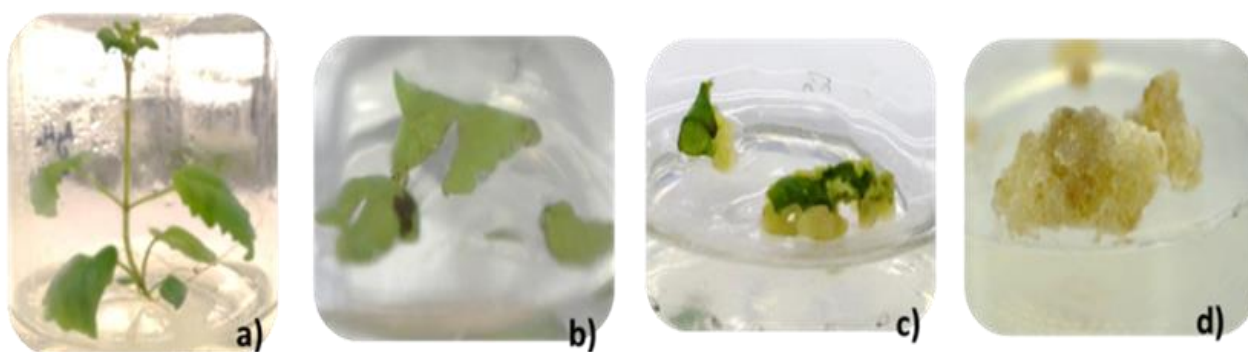
RCV: reguladores de crecimiento vegetal, PS: peso seco. CC: compacto, FC: friable SR: sin respuesta; ND: no determinado. Los datos se expresan como la media  $\pm$  del error estándar DE. La media del PF seguido de las mismas letras dentro de una misma columna no es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) Tuckey. Los valores de PF y PS generados son significativamente diferentes del control usando un test de chi cuadrado

En los explantes sembrados en el medio M0 (tratamiento control: medio MS0 sin reguladores de crecimiento) no se observó la formación de callo, a partir de la primera semana de cultivo la coloración verde del explante se tornó marrón, y no se observó señales de crecimiento en las siguientes semanas (Figura 5). La respuesta más clara de los explantes al proceso de callogénesis fue registrada entre la tercera y cuarta semana, similar a lo reportado en la especie *A. rugosa* (Kim *et al.*, 2001).

La formación de callo compacto fue favorecida sobre la formación de callo friable, generando también otras respuestas como la formación de brotes y raíces, esta diversidad de respuestas puede generarse debido a la aplicación exógena de auxinas y citocininas, sin embargo también es necesario considerar las concentraciones endógenas que contiene nuestra especie de estudio, hay evidencias de que los RCV y el tipo de explante utilizados dirigen una respuesta organogénica positiva (Roca, 1991., Raven, 1992., Billiard, 1995; Morimoto *et al.*, 1994, Santos-Gomez *et al.*, 2003). Conceptos sobre como las auxinas están implicadas en el crecimiento y diferenciación celular, o como afectan la etapa de transcripción (Versalita *et al.*, 2009), son poco conocidos para nuestra especie de estudio, sin embargo observamos que la formación de callos friables para *A. mexicana* son favorecidas con la auxina 2,4-D y la citocinina KIN, de las cuales se han documentado para especies de la familia de las lamiaceas, pero no para *A. mexicana* (Georges *et al.*, 1993, Raha *et al.*, 2003, Fatima *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008).

El tratamiento que generó una mejor respuesta para la formación de callo friable fue la combinación de 2,4-D a una concentración de 1 mg/L con KIN a 0.3 mg/L (Tabla 6), la formación de este callo friable se observó entre el sexto y noveno día de cultivo.

Los callos formados con los diferentes tratamientos se mantuvieron friables, al ser subcultivados cada 4 semanas en medio MS0 adicionado con 2 mg/L de 2,4-D e incubados en condiciones de oscuridad a 25°C.



**Figura 6.** Inducción de callos a partir de explantes de hoja de *A. mexicana* a) Plántula de 20 días de *A. mexicana* b) Explante de hoja día 1 c) Formación de callo día 9 d) Callo formado en el día 30.

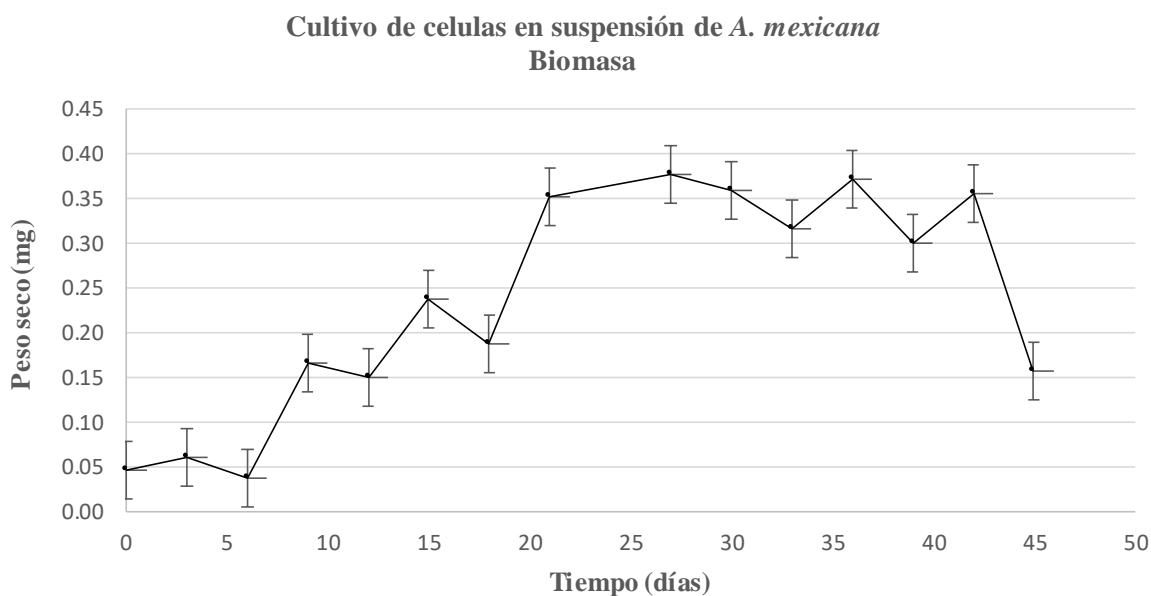
En la figura 6 se observan un matraz recién inoculado con callos friables (figura 6a) y las células libres de forma isodiamétrica y en algunos campos pequeños agregados celulares, en general las células no diferenciadas no se separan después de la división y forman agregados multicelulares de diferente forma y tamaño (Meyer *et al.*, 2002). Estos agregados en algunas especies son empleados como estrategia para la síntesis y acumulación de compuestos químicos derivados del metabolismo secundario en los cultivos *in vitro*, esta estrategia junto con otras como la selección de líneas celulares, elicitación y adición de precursores son una alternativa para facilitar bioprocesos *in vitro* (Trejo-Tapia *et al.*, 2002). Los cultivos celulares crecieron hasta alcanzar  $198.7 \pm 0.086$  g/L de biomasa fresca en 15 días sin embargo a los 18 días se tornaron de color café, indicando un posible proceso de fenolización y muerte similar a lo observado en cultivos de *A. rugosa* (Kim *et al.*, 2002).

#### **3.9.4.1 Cinéticas de crecimiento**

La cinética de crecimiento de las suspensiones de *A. mexicana* se llevó a cabo durante un periodo de 45 días. La fase de adaptación se realiza en los primeros 5 días, posteriormente se inicia la fase de crecimiento logarítmico donde se obtiene la biomasa máxima a los 21 días, a partir del día 42 se observa una caída en el crecimiento celular (grafica 1), lo cual se debe a que cuando alcanza el máximo número de células se produce una lisis y muerte debido a la disminución de los constituyentes del medio. Este comportamiento es típico para suspensiones celulares vegetales (Karuppusamy *et al.*, 2009).

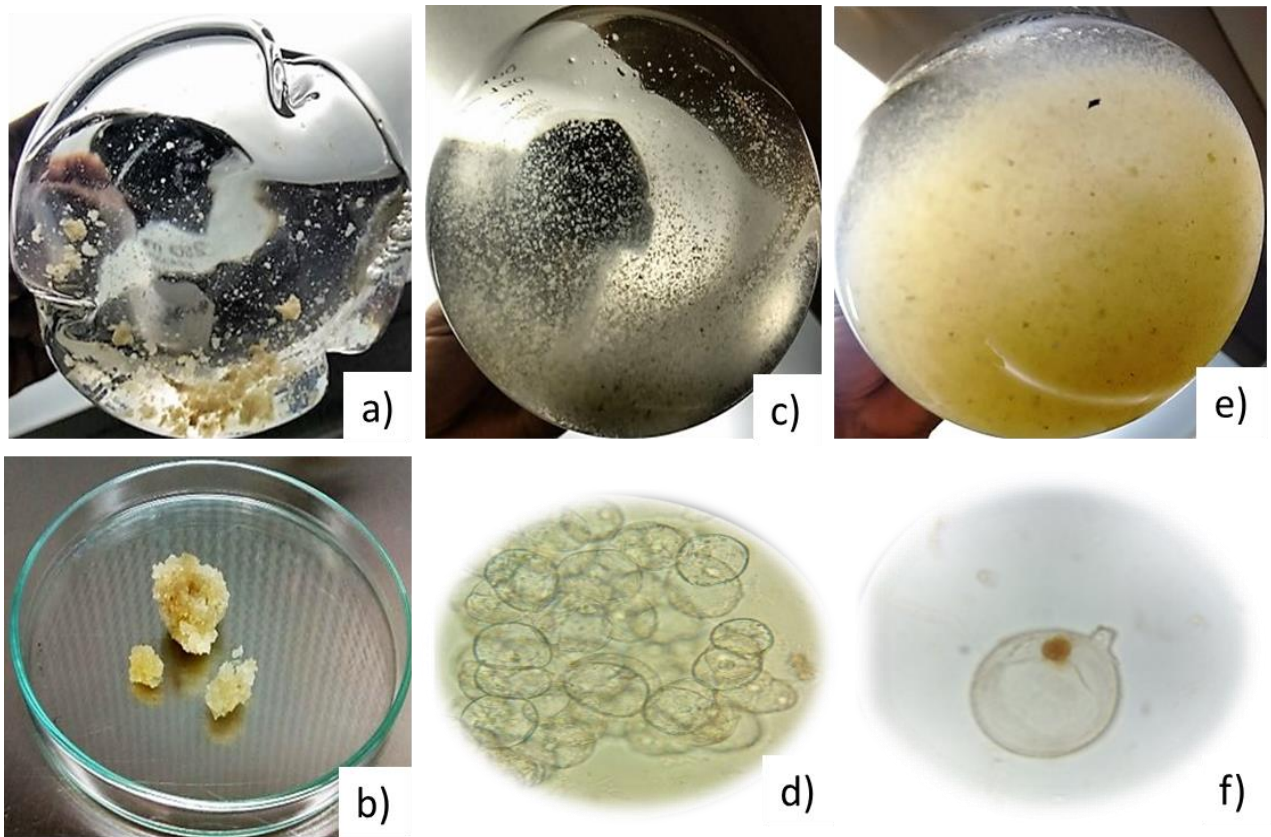
**Tabla 5.** Valores logarítmicos de PF y PS obtenidos de la cinética de suspensiones celulares de *A. mexicana* realizada en un periodo de 45 días.

Tiempo (Días)	Peso Fresco (g)	Peso Fresco (mg)	Peso Seco (mg)	Log10 Peso Fresco (g)	Log10 Peso Seco (mg)
0	1	1000±0.43	15.7±0.01	3.00	1.20
3	1.04	1040±0.18	32.9±0.02	3.02	1.52
6	1.31	1310±0.80	58.7±0.03	3.12	1.77
9	1.37	1370±1.25	71.5±0.06	3.14	1.85
12	1.42	1420±3.52	77.2±0.09	3.15	1.89
15	1.42	1420±2.37	80.3±0.06	3.15	1.90
18	1.49	1490±4.62	89.5±0.08	3.17	1.95
21	1.53	1530±1.98	91±0.10	3.18	1.96
24	1.77	1770±4.60	92.2±0.43	3.25	1.96
27	2.14	2140±2.20	130±0.20	3.33	2.11
30	2.24	2240±4.44	142±0.08	3.35	2.15
33	2.21	2210±1.97	146.8±0.10	3.34	2.17
36	2.12	2120±3.00	135.4±0.08	3.33	2.13
39	1.82	1820±4.25	118.8±0.11	3.26	2.07
42	1.64	1640±2.79	115.1±0.13	3.21	2.06
45	1.32	1320±1.25	103.4±0.14	3.12	2.01



**Grafica 1.** Células en suspensión de *A. mexicana*. donde se observa el crecimiento celular, del día 1 al 5 es la fase de adaptación, a partir del día 5 las células se multiplican (fase crecimiento), la fase exponencial se observa de los días 20 al 30 y al día 42 las células empiezan a morir.

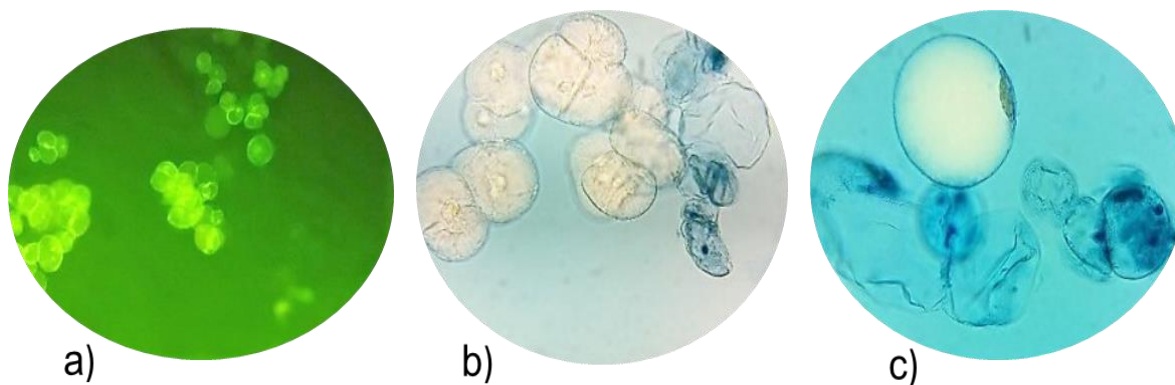




**Figura 7.** Suspensiones celulares de *A. mexicana* **a)** Suspensiones celulares iniciadas a partir de callo friable de *A. mexicana* **b)** Callo friable que se obtuvo a partir de explantes de hoja **c)** Células en suspensión a los 11 días de cultivo posterior a la fase de establecimiento **d y e)** Fotomicrografía (10X) de suspensiones celulares a los 4 días de cultivo en donde se observan agregados celulares. **f)** Fotomicrografía (100X) de célula de forma isodiamétrica.

La viabilidad celular se evaluó durante el establecimiento de los cultivos celulares empleando FDA, este es un colorante no polar que atraviesa la membrana y es hidrolizado por las esterasas presentes en la membrana celular produciendo fluorescencia, lo que permite identificar a las células viables (Corkidi *et al.*, 2008). Para determinar la viabilidad durante la cinética se utilizó Azul de Evans (Loyola y Vázquez, 2006), este da una coloración azul a las células inviables, porque logra entrar al interior, las células viables se observan de color blanco (Figura 8c).

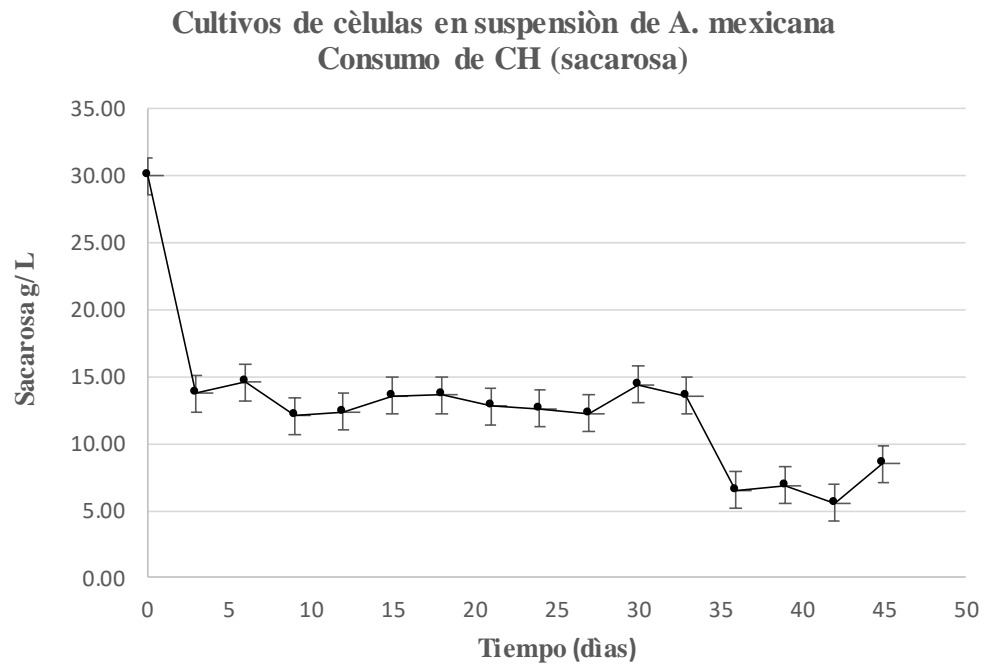
En las cinéticas la viabilidad celular fue de un 88% a los 11 días de cultivo, disminuyendo a 42% en el día 21 días a los 42 días las células se lisan y mueren (Figura 8c).



**Figura 8.** Células en suspensión de *A. mexicana*. **a)** Células a los 4 días de cultivo, técnica de inclusión con diacetato de fluoresceína, fotomicrografía (10X) **c)** Fotomicrografía (40X) de células de *A. mexicana* a los 11 días de cultivo, donde se observa la tinción de una célula viables (blanca) y una no viable (azul). **d)** Células en suspensión a los 21 días de cultivo teñidas con azul de Evans.

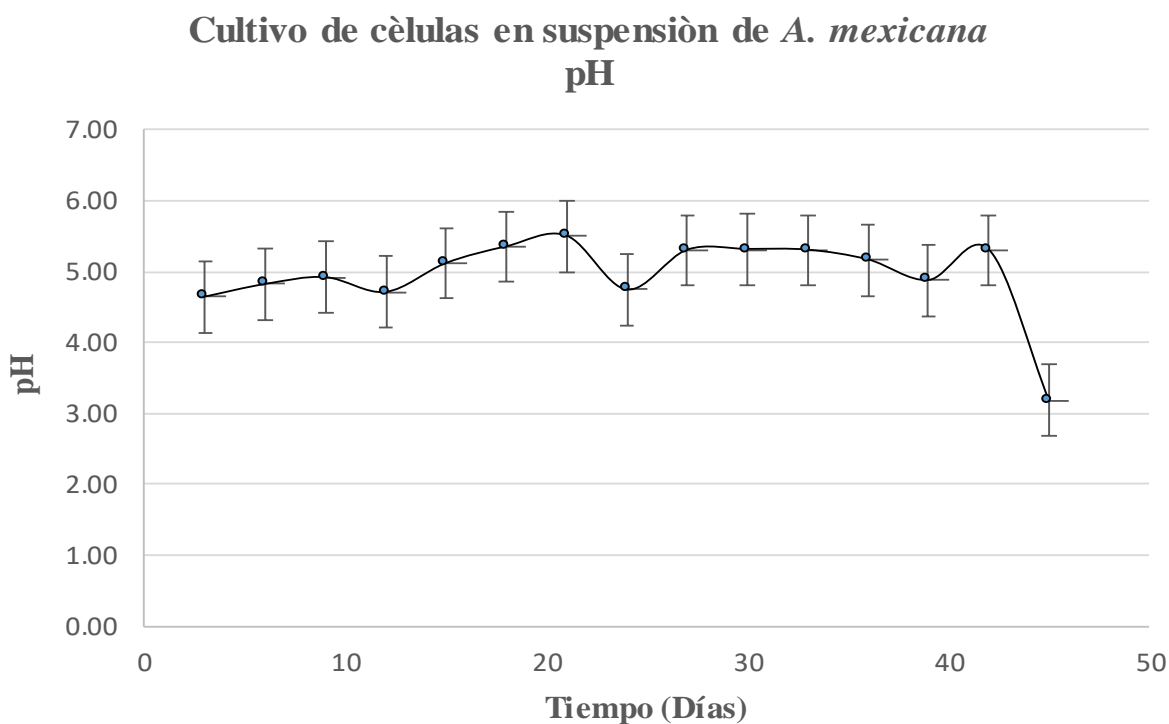
La biomasa máxima se obtiene a los 21 días, a partir del día 42 se observa una caída en el crecimiento celular, el medio se tornó oscuro y la viabilidad celular decrece; este comportamiento se dice es típico para suspensiones celulares vegetales (Karuppusamy *et al.*, 2009).

La fuente de carbono (sacarosa) se mantiene 32 días y posteriormente se observa una disminución de esta (Grafica 1) por lo que se determina que el consumo de la fuente de carbono está en función del crecimiento celular. El consumo total es de 59.53 % de los carbohidratos totales presentes en el medio de cultivo.



**Grafica 2.** Gráfica del consumo de la fuente de carbono en la cinética de células en suspensión de *A. mexicana* durante 45 días.

Se sabe que los cultivos celulares pueden estresarse debido a factores de cambios en el pH, temperatura e intensidad luminosa, liberando especies reactivas de oxígeno (ROS por *reactive oxygen species*) y provocarles la muerte (Benavides *et al.*, 2002). La opción para evitar este estrés fue utilizar polivinilpirrolidina (PVP), lo que disminuyó la oxidación y permitió la adaptación al medio de cultivo, como se observa en la gráfica 5, en donde el pH se mantiene entre 4.65 y 5.50.



**Grafica 3.** Gráfica de pH en células en suspensión de *A. mexicana* durante 45 días.

Los resultados de los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 6, en donde la biomasa máxima se obtiene a los 21 días, a partir del día 42 se observa una caída en el crecimiento celular, el medio se tornó oscuro y la viabilidad celular decrece; este comportamiento se dice es típico para suspensiones celulares vegetales (Karuppusamy *et al.*, 2009). Los parámetros cinéticos de crecimiento están dados en función de la biomasa máxima que fue de 146.8 mg PS/L, el tiempo de duplicación calculado es de 6.7 g/día y la velocidad específica de crecimiento de 4.65 mg/min o 6.7 g. d<sup>-1</sup>.

**Tabla 6.** Parámetros de la cinética de crecimiento de células en suspensión de *A. mexicana*.

Biomasa máxima (mg/L)	Índice de crecimiento	Tiempo de duplicación (g/día)	$\mu$ Velocidad específica de crecimiento (mg/min)
146.8	0.85	6.7	4.65

### 3.9.5 Cultivo de Raíces Adventicias

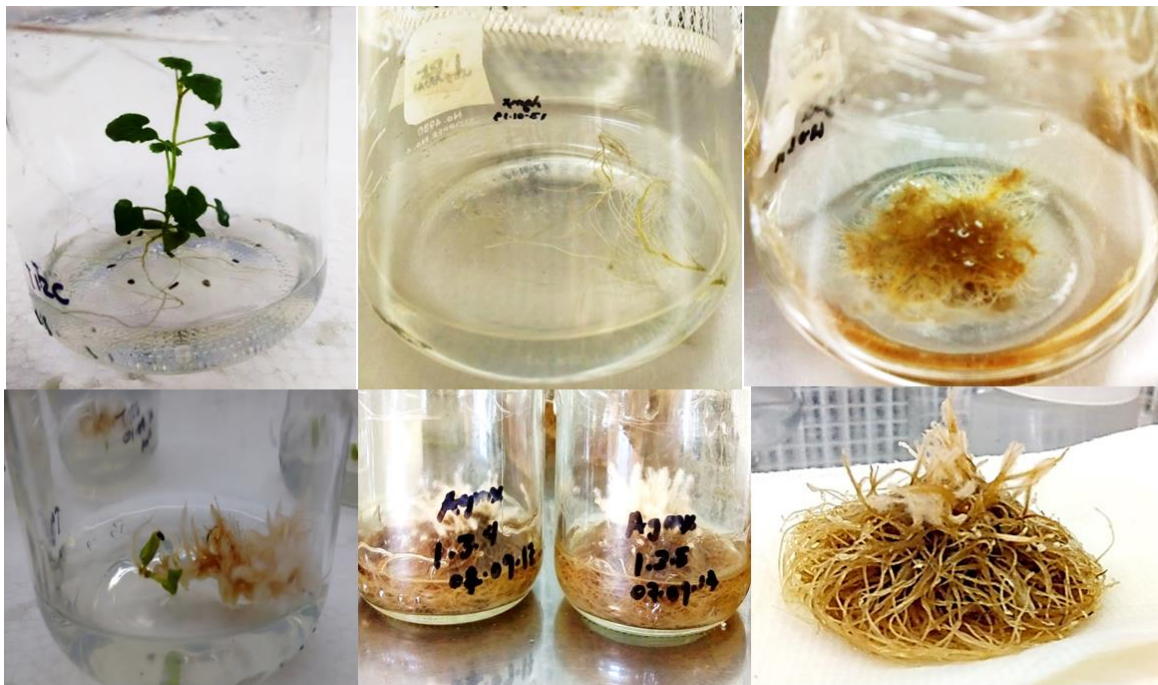
La inducción de raíces adventicias se ha realizado con éxito en muchas especies de plantas. Su cultivo es un medio eficaz para la producción de biomasa, debido a su rápida tasa de crecimiento y producción estable de metabolitos (Wu *et al.* 2006; Murthy *et al.* 2008), sin la necesidad de usar transgenes como ocurre con los cultivos de raíces pilosas o *hairy roots*.

**Tabla 7.** Efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de raíces adventicias a partir de explantes de hoja de plantulas de *A. mexicana* cultivados durante 4 semanas en medio MS0.

Tratamiento	Regulador de Crecimiento		Respuesta morfológica	Peso Fresco* g/L	Peso Seco* g/L
	ANA	KIN			
M0	0	0	SR	ND	ND
M1	0.5	0	Raíz adventicia	3.0 ± 5.13b	1.03 ± 1.8b
M2	2.0	0	Raíz adventicia	3.5 ± 6.05a	2.48 ± 5.4a
M3	0	0.1	SR		
M4	0.5	0.1	Callo	0.9 ± 1.09c	0.31 ± 0.91
M5	2.0	0.1	Raíz adventicia	3.0 ± 5.13b	1.03 ± 3.1b
M6	0	0.5	SR		
M7	0.5	0.5	Callo	3.0 ± 5.13b	1.03 ± 2.1b
M8	2.0	0.5	Callo	3.7 ± 1.96a	0.63 ± 0.22c

SR: sin respuesta; ND: no determinado. \*Los datos se expresan como la media ± del error estándar. La media del PF seguido de las mismas letras dentro de una misma columna no es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) Tuckey. Los valores de PF y PS generados son significativamente diferentes del control usando un test de chi cuadrado.

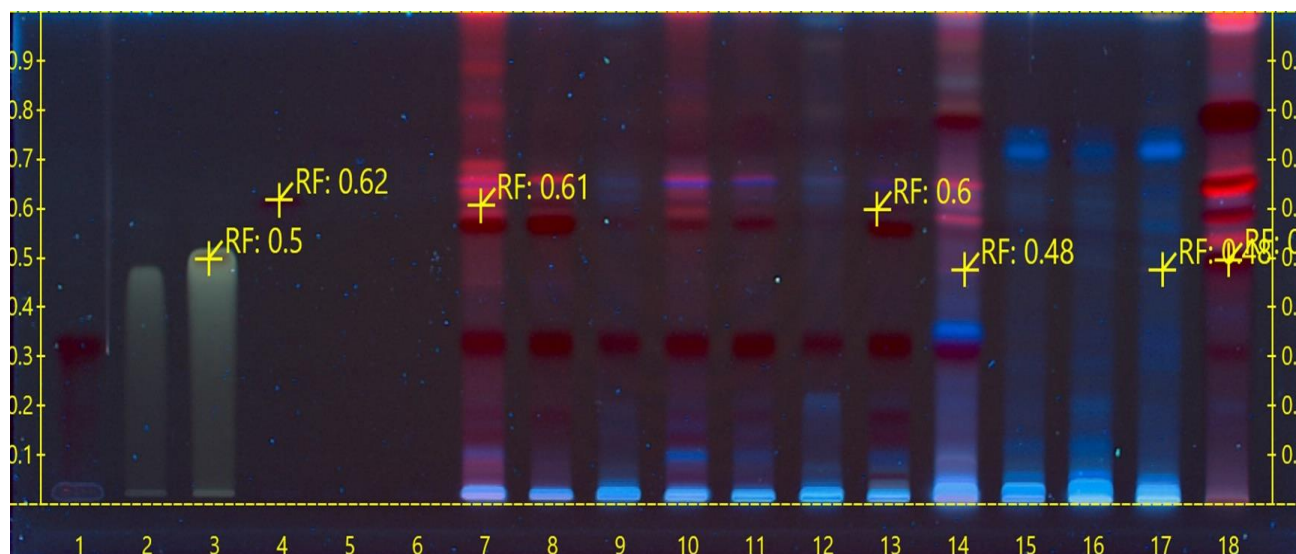
Dos líneas de raíces adventicias de *A. mexicana* fueron inducidas a partir de explantes de hoja y raíces de plántulas germinadas *in vitro*. Ambas líneas presentaron un rápido crecimiento logrando triplicar su peso a los 15 días de cultivo ( $1 \text{ a } 3.2 \pm 0.45 \text{ g}$  de peso fresco). En la figura 9 observamos los cultivos de raíces adventicias vistas en microscopio estereoscópico (35X). Es necesario evaluar los parámetros cinéticos de estos cultivos con el fin de observar su comportamiento y hacerlo más eficiente.



**Figura 9.** Cultivo de dos líneas (LI y LII) de raíces adventicias de plántulas de *A. mexicana* inducidas con ANA a 2mg/ml a) Plantulas de *A. mexicana* y su raíz cultivadas en medio MS b) LII de raíces en medio MS líquido c) LII de raíces a los 9 días de cultivo d) LI de raíces obtenidas de explantes de hoja a los 15 días de cultivo e) Cultivo de LII los 25 días de cultivo d) Raíces adventicias cosechadas a los 30 días de cultivo.

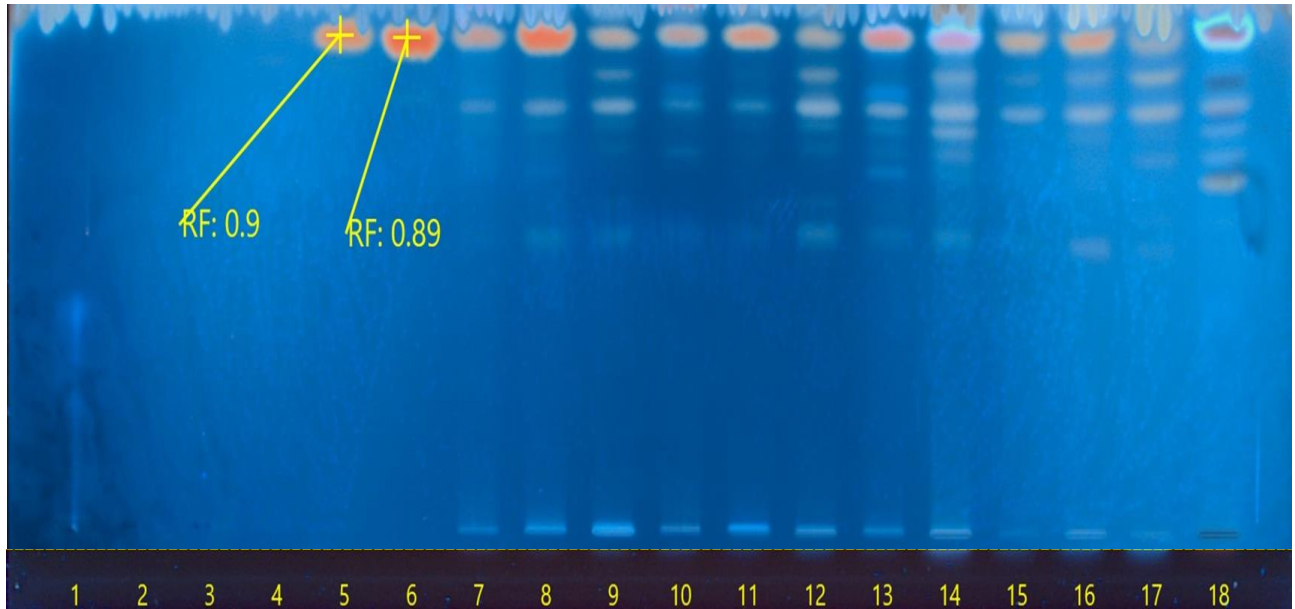
### 3.9.6. IDENTIFICACIÓN DE TILIANINA, ACIDO URSOLICO Y OLEANOLICO POR HPTLC

Mediante cromatografía en capa fina se observó que tilianina está presente en plantas silvestre de *A. mexicana* excepto en callos, células y raíz de los cultivos *in vitro*. Se observó que otros compuestos están presentes como es el caso del ácido ursólico y acetina (Figura 11).

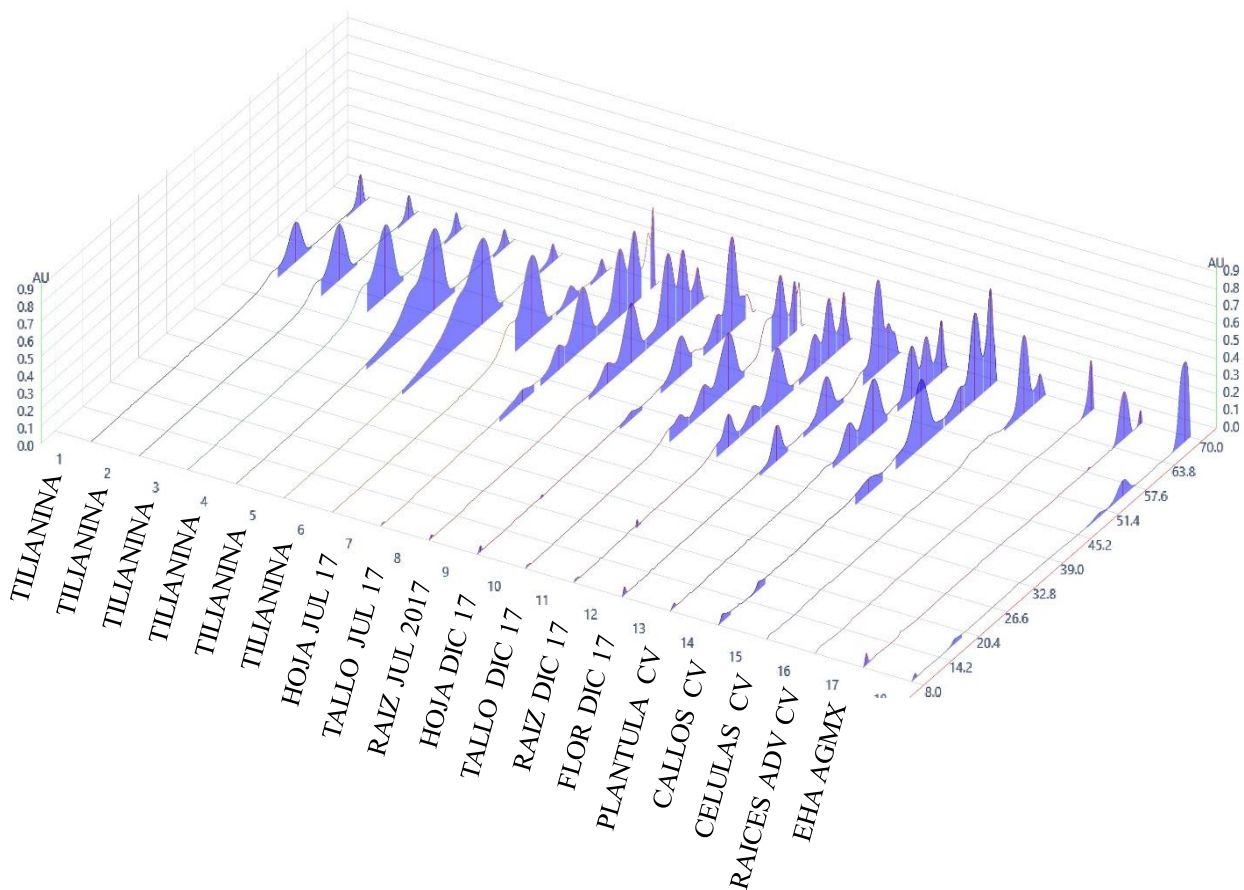


**Figura 10.** Cromatoplaqa de HPTLC de los extractos metanólicos de diferentes partes de la planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. mexicana*. revelada con UV sin derivatizar . **1)** estándar tilianina **2)** acetina **3)** apigenina **4)** quercetina **5)** ácido ursólico **6)** ácido oleanólico **7)** HOJA eVEGETATIVA **8)** TALLO eVEGETATIVA **9)** RAIZ eVEGETATIVA **10)** HOJA eFLORACIÓN **11)** TALLO eFLORACIÓN **12)** RAIZ eFLORACIÓN **13)** FLOR eFLORACION **14)** Plantula CV **15)** Callos CV **16)** Celulas de CV **17)** Raices adventicias CV **18)** Extracto hidroalcoholico de partes aéreas de plantas silvestres. donde e=ETAPA y CV= cultivo *in vitro*





**Figura 11.** Cromatoplaça de HPTLC de los extractos metanólicos de diferentes partes de la planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. mexicana*. derivatizada con sulfato sérico amoniacal. Fase móvil diclorometano: metanol (95: 5 v / v). En todos los extractos se observa una banda similar que corresponde a los ácidos ursólico y oleanólico. **1)** estándar tilianina **2)** acetina **3)** apigenina **4)** quercetina **5)** ácido ursólico **6)** ácido oleanólico **7)** HOJA eVEGETATIVA **8)** TALLO eVEGETATIVA **9)** RAIZ eVEGETATIVA **10)** HOJA eFLORACIÓN **11)** TALLO eFLORACIÓN **12)** RAIZ eFLORACIÓN **13)** FLOR eFLORACIÓN, **14)** Plantula CV **15)** Callos CV **16)** Celulas de CV **17)** Raices adventicias CV **18)** Extracto hidroalcoholico de partes aéreas de plantas silvestres. donde e=ETAPA y CV= cultivo *in vitro*



**Figura 12.** Densitometria de los extractos metanólicos de hoja, tallo, raíz y flor de planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. mexicana* y tilianina en diferentes concentraciones (10, 20,40, 60, 80 y 100 µg/ml)

### 3.9.7 Producción de tilianina en callos, células, raíces y brotes generados en los diferentes tratamientos

Los callos y brotes obtenidos de los diferentes tratamientos son capaces de mantener la producción de tilianina. En brotes tilianina se produce a concentraciones que van desde  $0.01 \pm 0.00$  mg tilianina/g mat vegetal seco hasta  $4.45 \pm 0.01$  mg tilianina/g mat vegetal seco. En el tratamiento con BAP a concentración de 0.1 mg/L la producción de tilianina es menor ( $0.01 \pm 0.00$  mg tilianina/g mat vegetal seco), BAP a concentraciones de 0.5 mg/L genera  $4.45 \pm 0.01$  mg tilianina/g mat vegetal seco la mayor producción

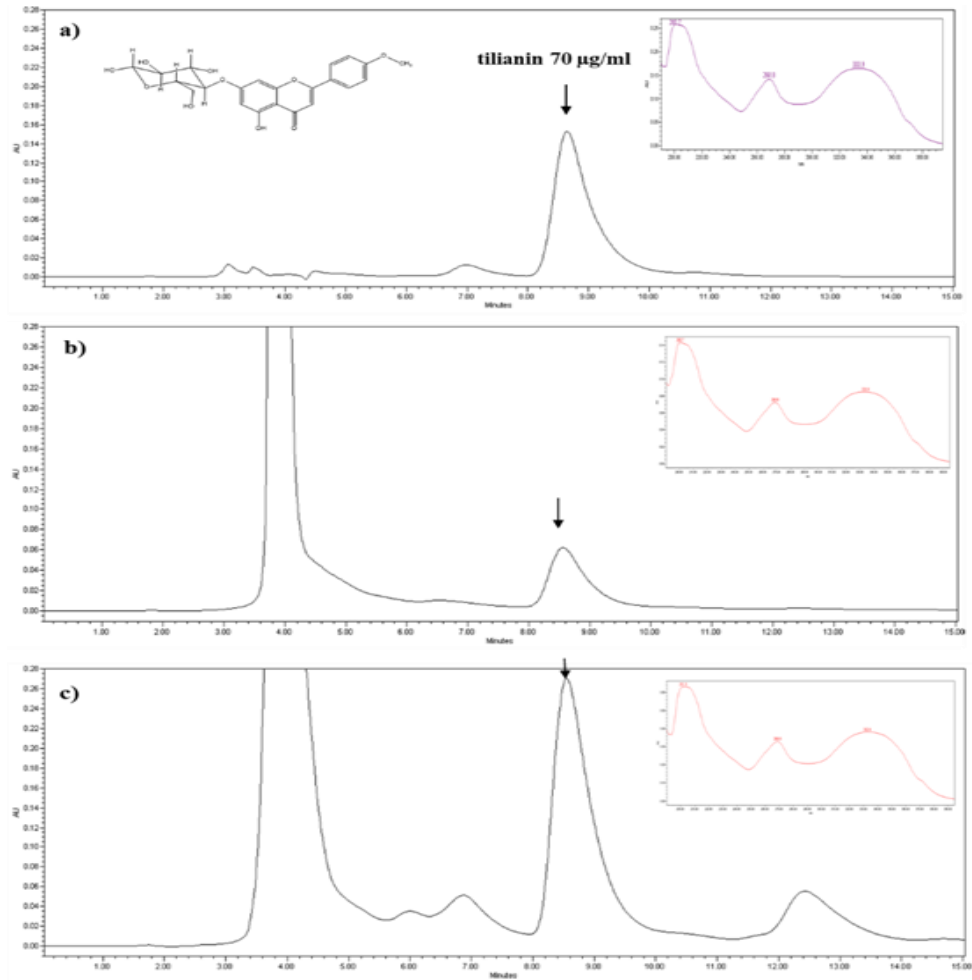
**Tabla 8.** El efecto de los diferentes tratamientos y la acumulación de tilianina (mg/g PS) en brotes de cultivo *in vitro* de *A. mexicana*. Los datos se expresan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos.

Tratamientos	Extractos metanolicos de los diferentes tratamientos	
		mg tilianin/g PS
M1	0.1 mg/L BAP	$0.01 \pm 0.000$
M2	0.1 mg/L BAP+ 0.1 mg/L 2,4-D	$0.20 \pm 0.0037$
M3	0.1 mg/L BAP+ 0.3 mg/L 2,4-D	$3.77 \pm 0.266$
M4	0.1 mg/L BAP+ 1 mg/L 2,4-D	$0.34 \pm 0.0016$
M5	0.5 mg/L BAP	$4.45 \pm 0.0126$
M6	0.5 mg/L BAP+ 0.1 mg/L 2,4-D	$1.46 \pm 0.0046$
M7	0.5 mg/L BAP+ 0.3 mg/L 2,4-D	$1.73 \pm 0.0075$
M8	0.5 mg/L BAP+ 1 mg/L 2,4-D	$1.21 \pm 0.0042$
M9	1.0 mg/L BAP	$1.91 \pm 0.0145$
M10	1.0 mg/L BAP+ 0.1 mg/L 2,4-D	$3.67 \pm 0.0152$
M11	1.0 mg/L BAP+ 0.3 mg/L 2,4-D	$0.47 \pm 0.0031$
M12	1.0 mg/L BAP+ 1 mg/L 2,4-D	$0.06 \pm 0.0011$
M13	1.5 mg/L BAP	$2.35 \pm 0.0088$
M14	1.5 mg/L BAP+ 0.1 mg/L 2,4-D	$0.61 \pm 0.0045$
M15	1.5 mg/L BAP+ 0.3 mg/L 2,4-D	$0.51 \pm 0.0068$
M16	1.5 mg/L BAP+ 1 mg/L 2,4-D	$0.37 \pm 0.0042$

### 3.9.8 Determinación del contenido de tilianina

La concentración de tilianina en callos y diferentes órganos *in vitro* de *A. mexicana* se determinó mediante HPLC. El contenido de tilianina para los brotes de *A. mexicana* fue de  $4.45 \pm 0.01$  mg de tilianina / g DW, en raíces  $13.35 \pm 0.11$  mg de tilianina / g DW y en callo de  $2.01 \pm 0.06$  mg de tilianina / g DW. La diferencia en la producción de tilianina entre cultivos *in vitro* diferenciados e indiferenciados sugiere que la síntesis está regulada de manera específica por el tipo de tejido y la organogénesis podría ser un factor regulador clave que estimula la producción de tilianina *in vitro*. En los brotes producidos, la aplicación de 2,4-D y BAP afectó la acumulación de tilianina (Tabla 3) y el contenido más alto de tilianina se obtuvo en 0.5 mg / L de BAP ( $4.45 \pm 0.01$  mg de tilianina / g DW). En muchas investigaciones se observa que las auxinas pueden tener interacciones sinérgicas, antagónicas y aditivas con citocininas en múltiples niveles (Nordström *et al.*, 2004), lo que sugiere una compleja red de interacciones de señales involucradas en respuestas morfológicas y metabólicas.

El contenido de tilianina en el género *Agastache* cultivadas en el campo ha sido previamente informado por Tuan *et al.*, 2012 alcanzando en *A. rugosa*  $6.33 \mu\text{g} / \text{g DW}$  ( $0.00633 \text{ g} / \text{g DW}$ ) en flores, y de menor concentración en otros órganos de la planta silvestre  $2.18 \mu\text{g} / \text{g DW}$  ( $0.00218 \text{ g} / \text{g DW}$ ) en hojas,  $0.49 \mu\text{g} / \text{g DW}$  ( $0.0049 \text{ g} / \text{g DW}$ ) en tallos, y  $0.14 \mu\text{g} / \text{g DW}$  ( $0.00014 \text{ g} / \text{g DW}$ ) en raíces. A la fecha la producción más representativa de tilianina es en nuestra especie de estudio *A. Mexicana*  $8 \text{ mg} / \text{g DW}$  (Hernández-Abreu *et al.*, 2011) observándose que la presencia de este compuesto es mayor en los cultivos diferenciados.



**Figura 10.** Cromatogramas de los extractos metanólicos de cultivos *in vitro* de *A. mexicana*. **a)** Estándar de tilianina **b)** Brotos; **c)** plántulas de cultivo *in vitro*.

### **3.10 Conclusiones**

La producción de tilianina es afectada por el proceso morfogénico del cultivo *in vitro*, en tejidos diferenciados (brotes, plántulas y raíces), se acumula en mayor concentración que en cultivos indiferenciados (callos y células). La producción de tilianina es similar y en algunos casos superior a los detectados en las plantas colectadas en campo, confirmando la utilidad de esta herramienta biotecnológica para la producción de compuestos bioactivos. Además, la proyección a gran escala sería una propuesta muy interesante para la producción e identificación de otras moléculas con actividad biológica que pueden ser utilizados en el control de enfermedades como la hipertensión.



## REFERENCIAS

1. Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Rollinger, J. M. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
2. Bharati, A. J., & Bansal, Y. K. 2014. In vitro production of flavonoids: A review. *WJPPS*, 3(6), 508-533.
3. COFEPRIS 2009. Marco regulatorio de medicamentos biotecnológicos biocomparables en México. Art 222 Biss. [www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx)
4. Corkidi, G., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. 2008. Análisis digital de imágenes para la caracterización microscópica de parámetros críticos en la producción fermentativa de metabolitos secundarios. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 75.
5. Cui, P., Dou, T. Y., Li, S. Y., Lu, J. X., Zou, L. W., Wang, P., ... & Ge, G. B. 2016. Highly selective and efficient biotransformation of linarin to produce tilianin by naringinase. *Biotechnology letters*, 38(8), 1367-1373.
6. Chapuis T, Barriguete J, Cheron P, Hernández M, Vieyra A, García-Viveros M, 2006. Hipertensión arterial: diagnóstico y tratamiento. *Boletín Práctica Médica Efectiva* 4:8.
7. Debnath M, Malik C P, Bisen P S, 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7: 33-49.
8. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
9. EMA 2006. EMA Committee on Herbal Medicinal Products (HMCP): Guideline on Good Agricultural and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin.
10. Estrada-Reyes R, López-Rubalcava C, Ferreyra-Cruz OA, Dorantes-Barrón AM, Heinze G, Moreno Aguilar J, Martínez-Vázquez M. 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *J Ethnopharmacol*. Jan 21. pii: S0378-8741(14)00007-5. doi: 10.1016/j.jep.2013.12.057.
11. Espacenet. Acceso libre a cerca de 1 millón de patentes, 2017. <https://worldwide.espacenet.com/>
12. Fuentes-Granados R G, Widrlechner M P, Wilson L A 1998. An overview of *Agastache* research. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 6: 69-97.
13. Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. 2008. Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(3), 347-353.
14. Groop L, Pociot F. 2014. Genetics of diabetes-are we missing the genes or the disease? *Mol. Cell Endocrinol*. 382 (2014) 726-739.
15. García-Díaz JA, Navarrete-Vázquez G, García-Jiménez S, Hidalgo-Figueroa S, Almanza-Pérez JC, Alarcón-Aguilar FJ, Gómez-Zamudio J, Cruz M, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2016. Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. Jul 26;83:667-675. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.023.
16. Gálvez, J., Estrada-Reyes, R., Benítez-King, G., Araujo, G., Orozco, S., Fernández-Mas, R., ... & Calixto, E. 2015. Involvement of the GABAergic system in the neuroprotective and sedative effects of acacetin 7-O-glucoside in rodents. *Restorative neurology and neuroscience*, 33(5), 683-700.
17. García Hernandez, V. 2016. Establecimiento de cultivos en suspensión de *Lopezia racemosa* Cav. Tesis
18. González-Ramírez A, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz Francisco J. 2012. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2012 Aug 1;142(3):700-5. doi: 10.1016/j.jep.2012.05.044.
19. González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. 2012. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med*. 2012 May;78(8):793-6. doi: 10.1055/s-0031-1298416.
20. Gu HF, Chen RY, Sun YH, Liu F. 2004. Studies on chemical constituents from herb of *Dracocephalum moldavica*. *China J. Chin. Mater. Med.*, 29: 232-234.



21. **Harold Lint and Carl Epling.1945.** *A Revision of Agastache*, American Midland Naturalist, Vol. 33, No. 1, pp. 207–230
22. **Havenith H., Raven N., Di Fiore S., Fischer R., Schillberg S. 2014.** Image-based analysis of cell-specific productivity for plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 117, 393–399. doi:10.1007/s11240-014-0448-x
23. **Hernández-Abreu O, Torres-Piedra M, García-Jiménez S, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, Montes S, Rembao D, Estrada-Soto S. 2012.** Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*. *J Ethnopharmacol.* Mar 7;146(1):187-91. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.029.
24. **Hernández-Abreu O, Durán-Gómez L, Best-Brown R, Villalobos-Molina R, Rivera-Leyva J, Estrada-Soto S. 2011.** Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *J Ethnopharmacol.* 2011 Nov 18;138(2):487-91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.
25. **Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. 2009.** Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol.* 2009 Jul 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016.
26. **Hong JH, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, Oh GT. 2001.** Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Lett* 495:142–147
27. **Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. 1997.** Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 39-52.
28. **Kinghorn, A.D., Pan, L., Fletcher, J.N., Chai, H., 2011.** The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod.* 74, 1539–1555.
29. **Karuppusamy, S. 2009.** A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
30. **M Cusidó, R., Palazon, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C., & Piñol, M. T. 2002.** Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of taxusmedia. *Biotechnology progress*, 18(3), 418-423.
31. **Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Mornar, A., & Maleš, Ž. 2008.** Application of TLC in the isolation and analysis of flavonoids. In *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press; Taylor & Francis Group.
32. **Monroy- Ortíz, Castillo-España. 2007.** Plantas medicinales del estado de Morelos. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2da Edición. Pag. 405. ISBN 968-878-277-7.
33. **Mühlbach, H. P. 1998.** Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology annual review*, 4, 113-176.
34. **Murashige, T., & Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
35. **Nam KW, Kim J, Hong JJ. 2005.** Inhibition of cytokine-induced I $\kappa$ B kinase activation as a mechanism contributing to the anti-atherogenic activity of tilianin in hyperlipidemic mice. *Atherosclerosis*. 2005; 180:27–30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.022.
36. **Namdeo, A. G. 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 69.
37. **Newman, D. J., & Cragg, G. M. 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.

38. Nicasio-Torres, M., Meckes-Fischer, M., Aguilar-Santamaría, L., Garduño-Ramírez, M. L., Chávez-Ávila, V. M., & Cruz-Sosa, F. 2012. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta physiologiae plantarum*, 34(1), 307-316.
39. Osuna, L., Tapia, N., Cusidó, R., Palazón, J., Bonfill, M., Zamilpa, A., ... & Cruz-Sosa, F. 2015. Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). *Acta physiologiae plantarum*, 37(10), 199.
40. Osuna, L. Aguilar, A. Tapia, M. E. 2013. Plantas Medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. 1ª. Edic. Universidad de Barcelona Pag. 16
41. OMS 2014. Informe mundial sobre la situación mundial de las ENT 2014. www.WHO/NMH/NVI/15.1
42. Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. 2016. Saffron: a promising natural medicine in the treatment of metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
43. Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
44. Ramachandra Rao, S., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. 2002. Biotransformation of Digitoxin in Cell Cultures of *Capsicum frutescens* in the Presence of  $\beta$ -cyclodextrin. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(2), 137-143.
45. Salisbury, F. B., Campbell, W. F., Carman, J. G., Bingham, G. E., Bubenheim, D. L., Yendler, B., ... & Podolsky, I. 2003. Plant growth during the greenhouse II experiment on the Mir orbital station. *Advances in Space Research*, 31(1), 221-227.
46. Sandhar HK., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., and Sharma P. A 2011. Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011; 1(1):25-4.
47. Sánchez-Recillas A, Mantecón-Reyes P, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2014. Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pac J Trop Med*. Mar;7(3):179-83. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60017-1.
48. Santiago R, Rojas I, Arvizu G, Muñoz D, Perez D, Sucilla M. 2005. Caracterización del potencial fitotóxico de Agastache Mexicana (Kunth) Lint et Epling. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. Universidad Simon Bolivar. Año 4 No 4 Dic 2005.
49. Sanders, R. W. 1987. Taxonomy of Agastache section *Brittonastrum* (Lamiacea-Nepeteae) *Systematic Botany Monographs* 15:1-92.
50. Suchorska-Tropilo K, Pio'ro-Jabrucka E .2004. Morphological, developmental and chemical analysis of the chosen Agastache species. *Ann Warsaw Univ Life Sci SGGW Horticult Landsc Architect* 25:25-31
51. Svoboda KP, Gough J, Hampson J. 1995. Analysis of the essential oils of some Agastache species grown in Scotland from various seed sources. *Flavour Fragr J*. 1995;10:139-145. doi: 10.1002/ffj.2730100305.
52. Taiz, L., Taiz, E., Zeiger, E., Uhart, S. A. E., Uhart, H. E. S. A., Echeverría, H. E., & SOLANICH, F. P. 2006. Fisiología vegetal/Plant physiology (No. 581.1). Universitat Jaume I.
53. Trejo-Tapia, G. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
54. Tuan PA, Park WT, Xu H. 2012. Accumulation of tilianin and rosmarinic acid and expression of phenylpropanoid biosynthetic genes in *Agastacherugosa*. *J Agric Food Chem*. 2012; 60:5945-5951. doi: 10.1021/jf300833m.
55. Verano J, González-Trujano ME, Déciga-Campos M, Ventura-Martínez R, Pellicer F. 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol Biochem*

- 
- Behav. Sep; 110:255-64. doi: 10.1016/j.pbb.2013.07.020.
56. **Versalita s. Vanneste, j. Friml. 2009.** *Auxin: a trigger for change in plant development.* Cell 136 (6): 1005–1016; PMID 19303845; doi 10.1016/j.cell.2009.03.
57. **WHO 2003.** WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP).
58. **Wang JG. 2010.** GC-MS Analysis of chemical composition of volatile oil from *Agastache rugosa*. Food Sci 2010-08. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTALSPKX201008052.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALSPKX201008052.htm).
59. **Xu H, Kim YK, Jin X, et al., 2008.** Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugose* Kuntze. J Med Plants Res;2(9):237–241
60. **Yue, W., Ming, Q. L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C. J., Han, T., & Qin, L. P. 2016.** Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 215-232.
61. **Zielińska S and Matkowski A. 2014.** Phytochemistry and bioactivity of aromatic an medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). Department of Pharmaceutical Biology and Botany, Medical University of Wrocław, Borowska 211, 50-556.

## CAPITULO IV

### DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE Y VASORRELAJANTE EN CULTIVOS *IN VITRO* Y PLANTAS SILVESTRES DE *A. mexicana*.

#### 4.1. Introducción

##### 4.1.1 Actividad antioxidante y vasorrelajante en plantas silvestres de *A. mexicana*.

La hipertensión arterial es una enfermedad asociada a aterosclerosis y enfermedades coronarias, donde la disfunción endotelial es el primer evento desencadenante en esta fisiopatología (Vanhoutte, 2003). La disfunción endotelial esta caracterizada por la vasodilatación dependiente de endotelio y el estrés oxidativo; el primer efecto está mediado por el óxido nítrico (NO) (Gutiérrez *et al.*, 2013; Rajendran *et al.*, 2013). El NO es un factor de relajación derivado del endotelio, es un radical libre producido por el oxígeno y la L-arginina a través de la NO sintasa endotelial (eNOS) (Bigalke *et al.*, 2012; Picker, 2013; Feher *et al.*, 2014). Diversos estudios demuestran que el aumento de la vasorrelajación y la reducción de la producción endógena de especies reactivas de oxígeno mejoran la función endotelial y, por lo tanto, reducen el riesgo cardiovascular (Pérez-Vizcaino *et al.*, 2006). Extractos de plantas medicinales como *Psittacanthus calyculatus*, *Dracocephalum moldavica*, *A. mexicana* entre otras, incrementan la vasorrelajacion y reducen la producción endógena de especies reactivas de oxígeno reduciendo el riesgo cardiovascular (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006; Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010).

Especies del género *Agastache* contienen una variedad de polifenoles donde la evidencia actual sugiere que estos compuestos contribuyen significativamente al tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares debido a sus propiedades antioxidantes y vasorrelajantes (Katalinic *et al.*, 200; Halliwell *et al.*, 2005).

En extractos acuosos de *A. mexicana* se observó que los compuestos fenólicos y flavonoides como hesperitina y quercetina entre otros confieren actividad antioxidante ejerciendo una IC50 de 502.3±1.0 µg/ml en DPPH y de 926.9 µmol Trolox/g extracto (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010).

Los extractos acuosos poseen un efecto vasodilatador cuando han sido probados en aorta de rata siendo dependiente de la concentración ( $EC_{50} 233.7 \pm 45.7 \mu\text{g/ml}$ ) y en extractos metanólicos este efecto incrementa debido a la presencia de flavonas como tilianina (Hernández-Abreu *et al.*, 2009).

Tilianina aislada de un extracto metanólico de *A. mexicana* mostró un efecto vasorrelajante relajante por la vía de NO / cGMP y la apertura del canal de potasio en ensayos realizados con anillos aorticos de ratas y también mostró una disminución significativa en la presión arterial sistólica y presión arterial diastólica en ratas espontáneamente hipertensas (Hernández-Abreu *et al.*, 2009). Los efectos antihipertensivos y vasorelaxantes de la tilianina aislada de *Agastache mexicana* están mediados por la vía NO / cGMP y la apertura del canal de potasio (Hernández-Abreu *et al.*, 2009; Hernández-Abreu *et al.*, 2013).

A la fecha no existen reportes de actividad antioxidante y vasorrelajante en los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* por lo que en el presente trabajo de investigación se evalúan los extractos de plantas de cultivo *in vitro* frente a extractos de plantas silvestres.

## **4.2. Hipótesis**

Los extractos obtenidos de cultivos *in vitro* tendrán un efecto antioxidante y vasorrelajante similar al determinado en los extractos de plantas silvestres

## **4.3. Objetivos**

### **4.3.1 Objetivo General**

Determinar el efecto máximo ( $E_{max}$ ) y la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de las actividades antioxidante y vasorrelajante en extractos de cultivos *in vitro* y de plantas silvestres.

### **4.3.2 Objetivos específicos**

4.3.2.3 Evaluar los efectos antioxidantes y vasorrelajantes en extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y planta silvestre.

#### **4.4. Materiales y métodos**

##### **4.4.1 Material vegetal**

Para el desarrollo de esta tesis se colectaron plantas completas de *A. mexicana* en el municipio de Tlalnepantla Morelos, México (19° 06'6.65" N y 98° 55'49.03" O) a una altitud de 2823 m.s.n.m, en los meses de marzo y noviembre 2015. El material fue identificado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Botánica Estructural del CEIB-UAEM y una muestra (No.26.336 y No 35766) fue depositado en Herbario HUMO del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

##### **4.4.2 Preparación de extractos**

Las plantas de *A. mexicana* fueron colocadas en un horno de convección Binder FD-115® a 35°C durante 72 horas, el material seco y molido fue sometido a una maceración discontinua y progresiva con tres tipos de disolventes como son: hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y metanol (CH<sub>3</sub>OH) durante 72 horas por cada disolvente. Posteriormente cada maceración es filtrada y los extractos obtenidos fueron concentrados al vacío en un rotaevaporador (Buchi Heating R-210®) a 40° C y 80 revoluciones por minuto (Hernández-Abreu *et al.*, 2009).

##### **4.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante y vasorrelajante en plántulas de *A. mexicana***

###### **4.4.4.1 Radical ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)**

El radical ABTS<sup>•+</sup> presenta la característica de reaccionar y reducirse por la presencia de moléculas capaces de donar hidrógeno o electrones, reacción que produce un cambio en coloración de la solución ABTS<sup>+</sup>, la cual puede ser detectada por espectrofotometría para la cuantificación de actividad antirradicalaria. El método ABTS es aplicable para el estudio de antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes plasmáticos, entre otros. El radical ABTS<sup>•+</sup>, a diferencia de otros radicales como el DPPH<sup>•</sup>, presenta una mayor flexibilidad para su utilización a diferentes niveles de pH, así como la propiedad de disolverse en soluciones acuosas y orgánicas (Re *et al.*, 1999).

La actividad neutralizante del radical ABTS fue registrada utilizando la metodología reportada por Ozturk *et al.*, en 2011. Para este método se elaboró una solución acuosa de ABTS con persulfato de

potasio, después de 12 h de incubación bajo condiciones de oscuridad. Posteriormente la solución resultante se diluye en metanol hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 734 nm (Re et al., 1999). La solución de ABTS se utilizó a una concentración 1:1 para todos los extractos (1 mg de extracto/ ml metanol), tomando 0.950 mL de solución de ABTS con diferentes cantidades de muestra (0.025, 0.050 y 0.100 mL). Transcurridos 30 min se lee la absorbancia a 734 nm y la capacidad antioxidante se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición ABTS} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}}] \times 100.$$

Dónde:  $A_{\text{blanco}}$  = Absorbancia del blanco;  $A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra.

Todos los datos se registran como media  $\pm$  DE.

#### 4.4.4.2 Poder reductor de hierro (III) o FRAP

Este método se basa en la reducción del complejo de la tripiridil-triazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido (Benzie & Strain, 1996). Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000), a los 4 minutos muchos compuestos todavía no habían acabado de reaccionar. Los resultados se expresan en equivalente Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/L}$ ).

Los valores del poder reductor de ion férrico se obtuvieron de acuerdo al método reportado por Lui *et al.*, en 1982. Para el reactivo FRAP se utilizan tres soluciones (A, B y C): **A**- 50 ml de acetato de sodio 300 mM (0.8 ml de ácido acético y 49.2 ml de agua) a pH a 3.6. **B**- 5 ml de una solución de 2,4,6 tripiridil-s-triazina- ferroso (TPTZ 10 Mm), diluida en 5 ml de ácido clorhídrico 40 mM. **C**- 5 ml de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 20 mM utilizando agua como disolvente. Para preparar el reactivo FRAP se disuelve una mezcla de 10 ml de la solución A. 1 ml de la solución B y 1 ml de la solución C la cual es calentada en baño maría a 37 °C por 10 min. Se toman alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  de cada extracto (1 mg de extracto/ mL metanol) y se colocan en tubos de ensayo de 10 ml por triplicado. Se adicionan 25  $\mu\text{l}$  de metanol y 950  $\mu\text{l}$  de la solución FRAP recién preparada y caliente (37°C) incubándose durante 30 minutos en agitación constante. Las absorbancias son leídas a 593 nm en un espectrómetro Genesys® 10S UV-Vis. Se utiliza un blanco y una curva estándar de ácido gálico (EAG) con 10 puntos como referencia (0.125- 1.25 mg). Los resultados se expresan en mg de EAG por ml de extracto (mg EAG/ ml de muestra). Todos los datos se registran como media  $\pm$  DE.

#### 4.4.4.3 Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

La molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazil ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil; DPPH) es un radical libre muy estable debido a que presenta una propiedad estructural que permite la deslocalización de un electrón libre. Esta característica impide su dimerización como en el caso de otros radicales libres. La deslocalización de dicho electrón permite al DPPH la adquisición de un color violeta profundo, con una absorbancia en solución etanólica de 517 nm. De igual forma, que el método ABTS, la solución DPPH• al colocarse en contacto con sustratos o moléculas donadoras de electrones e hidrógeno permiten el regreso del radical a su forma reducida, la cual es acompañada de la pérdida de coloración (Blois *et al.*, 1958).

La actividad de neutralización de radicales se determinó utilizando el DPPH en el método descrito por Fukumoto and Mazza 2000. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de ensayo de 10 ml, en los cuales se colocaron 25, 50 y 100  $\mu$ l de cada extracto (1 mg de extracto/ mL metanol) y 950  $\mu$ l de solución de DPPH (0.15 mM en metanol). El control negativo contenía todos los reactivos excepto los extractos. Los controles contenían todos los reactivos de reacción excepto los extractos o sustancias de control positivo (Trolox y butilhidroxitolueno (BHT)). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en obscuridad, se registraron las absorbancias a una longitud de 517 nm ya que la decoloración puede ser medida por espectrometría. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición DPPH} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}}] \times 100$$

Dónde:  $A_{\text{blanco}}$  = Absorbancia del blanco.       $A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra.

Las actividades de eliminación de radicales se expresaron como la concentración media inhibitoria (IC50) del radical. Esta se calcula mediante un algoritmo de regresión no lineal a partir de la curva de inhibición de la concentración.

La prueba DPPH presenta algunas desventajas que puede subestimar la capacidad antirradicalaria de un compuesto, por ejemplo: que su reacción puede ser lenta o ausente para varios antioxidantes, que la reacción cinética con antioxidantes no es lineal para la concentración de DPPH y que la reacción de DPPH con algunas estructuras fenólicas no puede ser completada hasta el equilibrio (Gregoris *et al.*, 2013).



#### **4.5 Determinación del efecto vasorrelajante en extractos de plántulas obtenidas *in vitro***

Los ensayos se llevaron a cabo en la facultad de farmacia en el laboratorio de farmacognosia en colaboración y la asesoría técnica del M en Farmacia Luis Arias Duran y el Dr Samuel Estrada.

##### **4.5.1 Animales**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar entre 250 y 300g de peso alimentadas con Purina Chow y mantenidas en dentro del bioterio en la Facultad de farmacia de la UAEM.

##### **4.5.2 Reactivos**

Se utilizaron extractos metanólicos obtenidos a partir de cultivo *in vitro* de *A. mexicana* propagadas con el fin de observar si se mantiene su actividad. Para la determinación del mecanismo de acción del extracto más activo se utilizaron: isoproterenol, cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), L- Nitroarginina Metil Éster (L-NAME) y 1H-(1,2,4) oxadiazol (4,3) quinoxalin-1-one (ODQ). Como control positivo se utilizo carbacol.

##### **4.5.3 Obtención del tejido**

Los roedores fueron sacrificados por sobredosis de éter etílico, posteriormente se realizó una disección a nivel de tórax con la finalidad de aislar la aorta. A continuación, la arteria se limpió del tejido conectivo adyacente y mucosidad, finalmente se cortaron los anillos de aproximadamente 3 mm de longitud, los cuales fueron colocados en una cámara de incubación con 10 ml de solución de Krebs (NaCl, 118mM; KCl, 4.7 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0 mM; EDTA, 0.026 mM; glucosa, 11.1 mM y CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM) constantemente burbujeando con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

##### **4.5.4 Sistema de registro**

Para determinar el efecto relajante de los extractos, así como de los controles, se utilizó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. En este sistema, el tejido en estudio (anillos de aorta) se sujetó a la parte inferior de la cámara y a un transductor de fuerza isométrico modelo Grass FT03 de 6 canales. Para esto se monitoreo con el programa Acknowledge (BIOPAC, CA, USA).

#### **4.5.5 Análisis estadístico**

Todos los datos del ensayo de brotación, fueron sometidos a análisis estadístico utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis no paramétrico (distribución libre). Los porcentajes calculados de la formación de callos se compararon con la prueba de chi-cuadrado (Statistics ver. 10; Statsoft Tulsa OK). Las significancias estadísticas de las diferencias entre los tratamientos se consideraron significativos en  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos en el efecto vasorelajante y el mecanismo de acción de los extractos obtenidos se expresaron como la media de X animales  $\pm$  EEM. Las gráficas de concentración–respuesta se elaboraron haciendo uso del programa GraphPad Prism 5, estableciendo una diferencia estadística significativa entre las medias de  $p < 0.05$  mediante una t- de student (usando el EEM) y ANOVA de dos vías, prueba post hoc Bonferroni (usando la SD).

## 4.6 Resultados

### 4.6.1 Actividad antioxidante en plántulas de *A. mexicana* y su efecto vasorrelajante.

Para determinar el efecto antioxidante fueron utilizados extractos hexánicos, diclorometánicos y metanólicos de plantas generadas en cultivo *in vitro* como se muestra en la Tabla 1. Todos los extractos son capaces de bloquear los radicales en ensayos con DPPH y FRAP, siendo mas potente el extracto metanolico con una IC<sub>50</sub> de 55.96 µg/ml y 2.75 µmol EAG/25µl de extracto, seguido del extracto diclorometanico y hexanico. Estos resultados se deben a que los disolventes son capaces de extraer compuestos de diferente polaridad, siendo los metanólicos los que atrapan mas polifenoles y ejercen una actividad antioxidante mayor. Al comparar el resultado del extracto acuoso de planta silvestre con nuestros resultados se observa que la actividad antioxidante es menor (502.3 µg/ml).

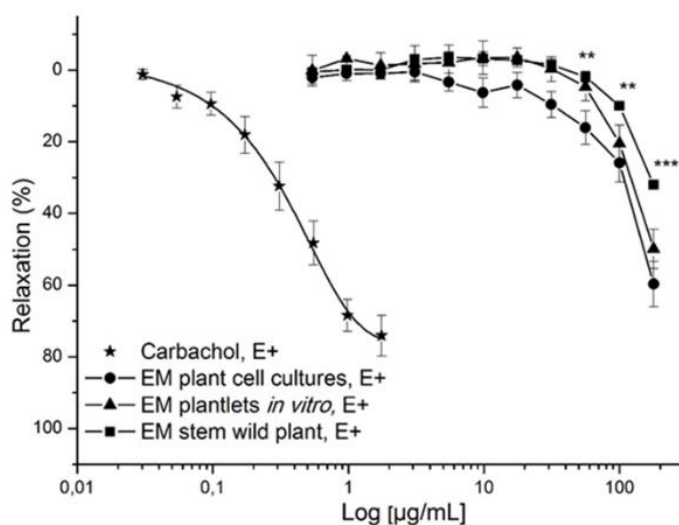
**Tabla 1.** Efecto de la capacidad antioxidante en extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de plantas de *A. mexicana* regenerada *in vitro*.

Extractos de plantas de cultivo <i>in vitro</i>	ABT % Capacidad antioxidante	ABT IC <sub>50</sub> (µg/mL)	DPPH % Capacidad antioxidante	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	FRAP (µmol EAG /25µ l extracto)
Extracto Hexánico 25 µl	24,63±0,65		7,58±0,15		
Extracto Hexánico 50 µl	38,06±0,15	74,48	11,13±0,43	269,99	0,28±0,02
Extracto Hexánico 100 µl	62,79±2,04		20,50±0,46		
Extracto Diclorometánico 25 µl	26,37±0,71		1,66±0,22		
Extracto Diclorometánico 50 µl	42,64±2,27		10,37±0,19	198,94	0,23±0,01
Extracto Diclorometánico 100 µl	62,24±0,98	72,37	22,59±0,57		
Extracto Metanólico 25 µl	45,77±5,75		26,42±0,14		
Extracto Metanólico 50 µl	79,15±5,75		46,59±0,92	55,96	2,75±1,41
Extracto Metanólico 100 µl	99,72±0,27	21,49	82,24±0,50		
<i>A. mexicana</i> (extracto acuoso) Ibarra-Alvarado <i>et al.</i> , 2010				502.3±1.0	Nd

ABT: 2,2-azinobis- [3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico], DPPH: 1,1-difenil2-picrilhidracil, IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria al 50%, FRAP: Poder oxidante reductor del hierro, EAG: Equivalentes de ácido gálico.

#### 4.6.2 Efecto Vasorrelajante de los extractos metanólicos en los anillos de aorta con presencia de endotelio

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto vasorrelajante de los extractos metanólicos se observan en la Figura 1, en la cual se muestra que todos los extractos poseen una acción vasorrelajante sobre la contracción inducida por la NA (0.1  $\mu$ M) de forma dependiente de la concentración. Además, los extractos de callos ( $E_{max} = 59.64 \pm 6.30$  y  $EC_{50} = 105.43 \pm 5.27 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) y plántulas *in vitro* ( $E_{max} = 49.88.0 \pm 5.42$  y  $EC_{50} = 108.30 \pm 5.08 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) fueron más activos que los extractos de planta silvestre ( $E_{max} = 31.96 \pm 0.85$  y  $EC_{50} = 113.72 \pm 1.18 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Todos los extractos fueron menos potentes que el control positivo (carbacol).



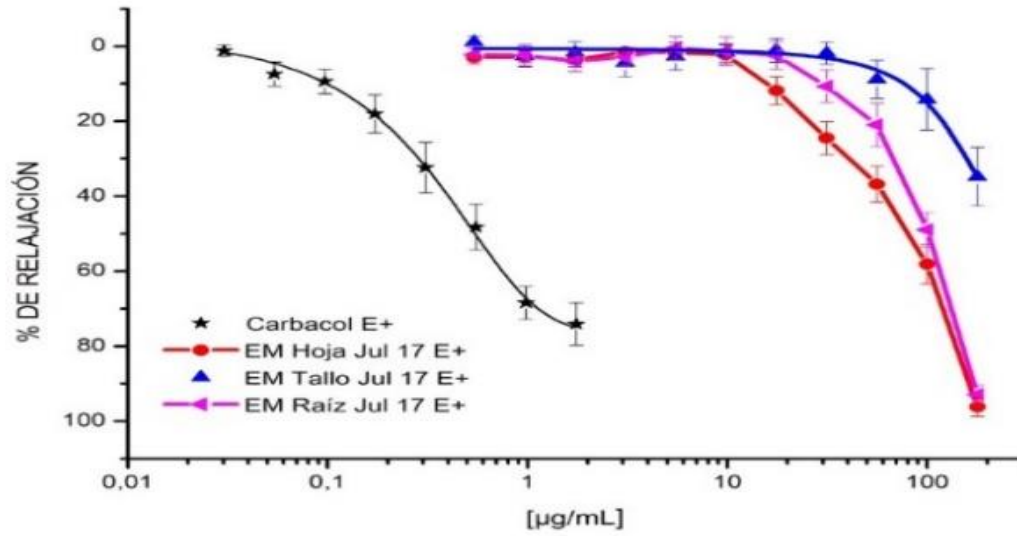
**Figura 1. Efecto relajante de los extractos metanólicos de *A. mexicana* en anillos de aorta de rata pre-contráidos con NA (0.1mM) en presencia de endotelio. Los resultados se expresan como la media de SEM de 6 experimentos ( $p < 0.05$  vs control).**

En un trabajo anterior el extracto metanólico de *A. mexicana* indujo un efecto vasorrelajante significativo dependiente parcialmente del endotelio y su efecto esta mediado parcialmente por la presencia de tilianina (Hernández-Abreu *et al.*, 2011). También se demostró que el efecto vasorrelajante mostrado en los extractos orgánicos y acuosos de *A. mexicana* estaba directamente relacionado con la concentración de tilianina y que el efecto vasorrelajante dependiente de endotelio en el extracto metanólico podría estar relacionado con el óxido nítrico

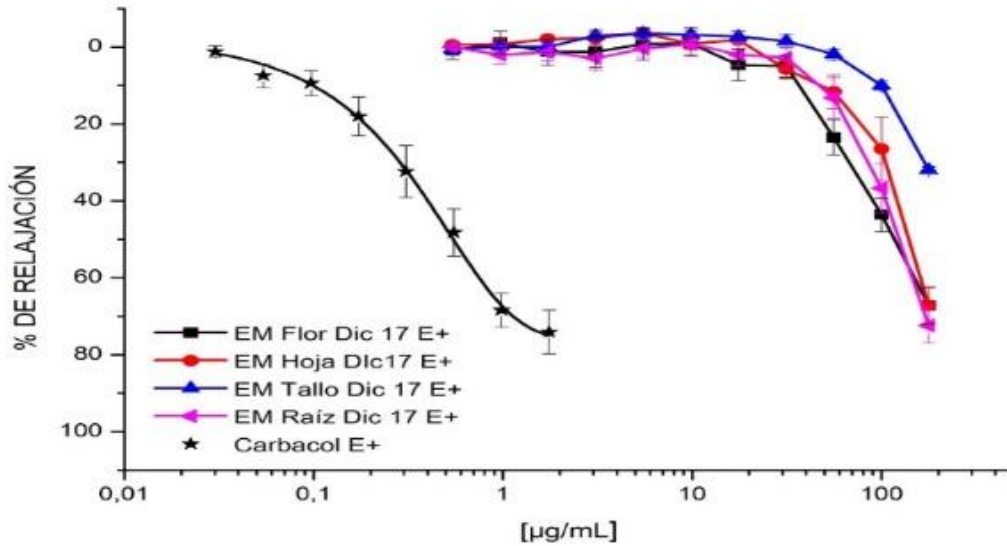
(NO), la prostaglandina PGI<sub>3</sub>, el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF) y el sulfuro de hidrogeno (H<sub>2</sub>S). Estos antecedentes indicaron que el extracto metanólico y tilianina indujeron su efecto vasorrelajante por la producción de NO, activando la enzima guanilil ciclasa para producir GMPc un segundo mensajero responsable de la relajación del musculo liso. Este hallazgo es relevante para el desarrollo de nuevos fármacos con un nuevo mecanismo de acción, que permitirá establecer mejores tratamientos para pacientes con hipertensión arterial. Sin embargo, en el estudio actual observamos que el extracto metanolico de callo muestra un menor contenido de tilianina y produce un mejor efecto vasorrelajante comparados con los extractos de planta silvestre y las plántulas de cultivo *in vitro*. Esta última observación está relacionada con la presencia de otros compuestos que probablemente solo se producen en los cultivos *in vitro* debido a las diferentes condiciones en las que fueron cultivados comparados con la planta silvestre. Por lo que es importante la realización de otros experimentos para conocer el tipo de compuestos que están presentes en cada extracto.

**Tabla 2.** Determinación del Efecto máx. y la concentración efectiva media de los extractos metanólicos de planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. mexicana* colectados en dos etapas vegetativa y floración.

Extractos metanolicos de <i>A. mexicana</i>	Época/tiempo de colecta	Parte o cultivo utilizado	E <sub>max</sub> %	CE <sub>50</sub> µg/mL
Planta silvestre	Etapa vegetativa	Hoja	96.14 ± 2.51	79.90 ± 5.23
		Tallo	34.78 ± 7.83	102.89 ± 8.17
		Raíz	92.86 ± 2.45	95.61 ± 4.66
	Etapa floración	Flor	67.16 ± 4.84	78.00 ± 4.40
		Hoja	67.18 ± 4.62	109.01 ± 5.35
		Tallo	31.96 ± 0.85	113.72 ± 1.18
Cultivos <i>in vitro</i>	4 semanas	Plántula completa	37.00 ± 3.64	82.64 ± 4.82
	3 semanas	Células en suspensión	59.64 ± 6.30	105.43 ± 5.27
	4 semanas	Raíces adventicias	59.64 ± 6.30	105.43 ± 5.27



**Figura 2. Efecto relajante de los extractos metanólicos de *A. mexicana* en anillos de aorta de rata pre-contraídos con NA (0.1mM) en presencia de endotelio. Los resultados se expresan como la media de SEM de 6 experimentos ( $p < 0.05$  vs control).**



**Figura 3. Efecto relajante de los extractos metanólicos de *A. mexicana* en anillos de aorta de rata pre-contraídos con NA (0.1mM) en presencia de endotelio. Los resultados se expresan como la media de SEM de 6 experimentos ( $p < 0.05$  vs control).**

#### 4.7 Discusión

Existen varios estudios que indican que algunas semillas requieren de luz blanca para germinar (Flores *et al.*, 2006; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2008), lo cual puede estar asociado al tamaño y morfología de la semilla (Milberg *et al.* 2000). Muchas semillas no germinan, aunque las condiciones ambientales sean favorables y cuando esto sucede se dice que están en estado de latencia o dormancia (Salisbury *et al.*, 2003). Una de las causas más comunes es la impermeabilidad de la cubierta seminal (Raven *et al.*, 1999). Se observó que la semilla de *A. mexicana* se encuentra dentro de la núcula la cual le sirve de protección sin embargo estas características le impiden tener permeabilidad e intercambio de oxígeno y agua afectando la germinación. Las características de la semilla en plantas de *A. mexicana* no habían sido descritas anteriormente ya que su cultivo en pequeñas parcelas y traspatios, solo es mediante esquejes y no por semillas (SAGARPA, 2000); por lo que es conveniente desarrollar más experimentos que permitan obtener una germinación mucho más eficiente, lo cual complementara el estudio de esta especie.

Es importante mencionar que la inducción para la brotación de *A. mexicana* depende de la combinación y concentración de auxinas y citocininas, de las cuales se han documentado para especies de la familia de las lamiaceas, pero no para *A. mexicana* (Georges *et al.*, 1993, Raha *et al.*, 2003, Fatima *et al.*, 2009). Existen reportes relativos en donde se relaciona la combinación de auxinas y citocininas como en el caso de *A. anisata* (Kayani *et al.*, 2013), en la que son utilizadas BAP y Kinetina. La auxina de baja concentración combinada con la citoquinina a menudo ayuda al desarrollo de brotes en los explantes (Tejavathi y Indira, 2011).

Las citoquininas pueden mostrar actividad inhibitoria sobre la elongación de las yemas axilares a pesar de promover su proliferación (Van Staden *et al.*, 2008).

En el caso de *A. mexicana* se utilizan los reguladores 2,4-D y BAP, se observó que la concentración incrementada de auxinas como 2,4-D influye en la producción de tilianina.

Los extractos metanolicos de plantas micropropagadas de *A. mexicana* indican que es capaz de mantener actividades como la antioxidante y vasorrelajante bajo condiciones de cultivo *in vitro*.



#### 4.8 REFERENCIAS

1. **Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., & Rollinger, J. M. 2015.** Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
2. **Bharati, A. J., & Bansal, Y. K. 2014.** In vitro production of flavonoids: A review. *WJPPS*, 3(6), 508-533.
3. **COFEPRIS 2009.** Marco regulatorio de medicamentos biotecnológicos biocomparables en México. Art 222 Biss. [www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx)
4. **Corkidi, G., Serrano-Carreón, L., & Galindo, E. 2008.** Análisis digital de imágenes para la caracterización microscópica de parámetros críticos en la producción fermentativa de metabolitos secundarios. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 75.
5. **Cui, P., Dou, T. Y., Li, S. Y., Lu, J. X., Zou, L. W., Wang, P., ... & Ge, G. B. 2016.** Highly selective and efficient biotransformation of linarin to produce tilianin by naringinase. *Biotechnology letters*, 38(8), 1367-1373.
6. **Chapuis T, Barriguete J, Cheron P, Hernández M, Vieyra A, García-Viveros M, 2006.** Hipertensión arterial: diagnóstico y tratamiento. *Boletín Práctica Médica Efectiva* 4:8.
7. **Debnath M, Malik C P, Bisen P S, 2006.** Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7: 33-49.
8. **DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
9. **EMA 2006.** EMA Committee on Herbal Medicinal Products (HMCP): Guideline on Good Agricultural and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin.
10. **Estrada-Reyes R, López-Rubalcava C, Ferreyra-Cruz OA, Dorantes-Barrón AM, Heinze G, Moreno Aguilar J, Martínez-Vázquez M. 2014.** Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *J Ethnopharmacol*. Jan 21. pii: S0378-8741(14)00007-5. doi: 10.1016/j.jep.2013.12.057.
11. **Espacenet.** Acceso libre a cerca de 1 millón de patentes, 2017. <https://worldwide.espacenet.com/>
12. **Fuentes-Granados R G, Widrlechner M P, Wilson L A 1998.** An overview of *Agastache* research. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 6: 69-97.
13. **Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. 2008.** Propagación in vitro de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(3), 347-353.
14. **Fujita, Y. 1988.** Industrial production of shikonin and berberine. *Applications of plant cell and tissue culture*, 137, 228-238.
15. **Groop L. Pociot F. 2014.** Genetics of diabetes- are we missing the genes or the disease? *Mol. Cell Endocrinol*. 382 (2014) 726-739.
16. **García-Díaz JA, Navarrete-Vázquez G, García-Jiménez S, Hidalgo-Figueroa S, Almanza-Pérez JC, Alarcón-Aguilar FJ, Gómez-Zamudio J, Cruz M, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2016.** Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. Jul 26;83:667-675. doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.023.
17. **Gálvez, J., Estrada-Reyes, R., Benítez-King, G., Araujo, G., Orozco, S., Fernández-Mas, R., ... & Calixto, E. 2015.** Involvement of the GABAergic system in the neuroprotective and sedative effects of acacetin 7-O-glucoside in rodents. *Restorative neurology and neuroscience*, 33(5), 683-700.
18. **García Hernandez, V. 2016.** Establecimiento de cultivos en suspensión de *Lopezia racemosa Cav.* Tesis
19. **González-Ramírez A, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz Francisco J. 2012.** Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2012 Aug 1;142(3):700-5. doi: 10.1016/j.jep.2012.05.044.
20. **González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. 2012.** Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med*. 2012 May;78(8):793-6. doi: 10.1055/s-0031-1298416.
21. **Gu HF, Chen RY, Sun YH, Liu F. 2004.** Studies on chemical constituents from herb of *Dracocephalum moldavica*. *China J. Chin. Mater. Med.*, 29: 232-234.
22. **Harold Lint and Carl Epling.1945.** *A Revision of Agastache*, American Midland Naturalist, Vol. 33, No. 1, pp. 207-230
23. **Havenith H., Raven N., Di Fiore S., Fischer R., Schillberg S. 2014.** Image-based analysis of cell-specific productivity for plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 117, 393-399. 10.1007/s11240-014-0448-x
24. **Hernández-Abreu O, Torres-Piedra M, García-Jiménez S, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, Montes S, Rembao D, Estrada-Soto S. 2012.** Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache mexicana*. *J Ethnopharmacol*. Mar 7;146(1):187-91. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.029.

25. **Hernández-Abreu O, Durán-Gómez L, Best-Brown R, Villalobos-Molina R, Rivera-Leyva J, Estrada-Soto S. 2011.** Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect. *J Ethnopharmacol.* 2011 Nov 18;138(2):487-91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.
26. **Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. 2009.** Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol.* 2009 Jul 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016.
27. **Hong JH, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, Oh GT. 2001.** Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Lett* 495:142–147
28. **Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. 1997.** Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 39-52.
29. **Kinghorn, A.D., Pan, L., Fletcher, J.N., Chai, H., 2011.** The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod.* 74, 1539–1555.
30. **Karuppusamy, S. 2009.** A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
31. **M Cusidó, R., Palazon, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C., & Piñol, M. T. 2002.** Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of taxusmedia. *Biotechnology progress*, 18(3), 418-423.
32. **Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Mornar, A., & Maleš, Ž. 2008.** Application of TLC in the isolation and analysis of flavonoids. In *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press; Taylor & Francis Group.
33. **Monroy- Ortíz, Castillo-España. 2007.** Plantas medicinales del estado de Morelos. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2da Edición. Pag. 405. ISBN 968-878-277-7.
34. **Mühlbach, H. P. 1998.** Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology annual review*, 4, 113-176.
35. **Murashige, T., & Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
36. **Nam KW, Kim J, Hong JJ. 2005.** Inhibition of cytokine-induced IκB kinase activation as a mechanism contributing to the anti-atherogenic activity of tilianin in hyperlipidemic mice. *Atherosclerosis*. 2005;180:27–30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.022.
37. **Namdeo, A. G. 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 69.
38. **Newman, D. J., & Cragg, G. M. 2012.** Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
39. **Nicasio-Torres, M., Meckes-Fischer, M., Aguilar-Santamaría, L., Garduño-Ramírez, M. L., Chávez-Ávila, V. M., & Cruz-Sosa, F. 2012.** Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta physiologiae plantarum*, 34(1), 307-316.
40. **Osuna, L., Tapia, N., Cusidó, R., Palazón, J., Bonfill, M., Zamilpa, A., ... & Cruz-Sosa, F. 2015.** Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). *Acta physiologiae plantarum*, 37(10), 199.
41. **Osuna, L. Aguilar, A. Tapia, M. E. 2013.** Plantas Medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. 1ª. Edic. Universidad de Barcelona Pag. 16
42. **OMS 2014.** Informe mundial sobre la situación mundial de las ENT 2014. www.WHO/NMH/NVI/15.1
43. **Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. 2016.** Saffron: a promising natural medicine in the treatment of metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
44. **Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. 2002.** Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
45. **Ramachandra Rao, S., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. 2002.** Biotransformation of Digitoxin in Cell Cultures of *Capsicum frutescens* in the Presence of β-cyclodextrin. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(2), 137-143.
46. **Salisbury, F. B., Campbell, W. F., Carman, J. G., Bingham, G. E., Bubenheim, D. L., Yendler, B., ... & Podolsky, I. 2003.** Plant growth during the greenhouse II experiment on the Mir orbital station. *Advances in Space Research*, 31(1), 221-227.
47. **Sandhar HK., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., and Sharma P. A 2011.** Review of Phytochemistry and

- Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011; 1(1):25-4.
48. **Sánchez-Recillas A, Mantecón-Reyes P, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Estrada-Soto S. 2014.** Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pac J Trop Med*. Mar;7(3):179-83. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60017-1.
  49. **Santiago R, Rojas I, Arvizu G, Muñoz D, Perez D, Sucilla M. 2005.** Caracterización del potencial fitotóxico de *Agastache Mexicana* (Kunth) Lint et Epling. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. Universidad Simon Bolivar. Año 4 No 4 Dic 2005.
  50. **Sanders, R. W. 1987.** Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae-Nepeteae) *Systematic Botany Monographs* 15:1-92.
  51. **Suchorska-Tropilo K, Pio'ro-Jabrucka E .2004.** Morphological, developmental and chemical analysis of the chosen *Agastache* species. *Ann Warsaw Univ Life Sci SGGW Horticult Landsc Architect* 25:25–31
  52. **Svoboda KP, Gough J, Hampson J. 1995.** Analysis of the essential oils of some *Agastache* species grown in Scotland from various seed sources. *Flavour Fragr J*. 1995;10:139–145. doi: 10.1002/ffj.2730100305.
  53. **Taiz, L., Taiz, E., Zeiger, E., Uhart, S. A. E., Uhart, H. E. S. A., Echeverría, H. E., & SOLANICH, F. P. 2006.** Fisiología vegetal/Plant physiology (No. 581.1). *Universitat Jaume I*.
  54. **Tejavathi, D.H., Indira, M.N. 2011.** *In vitro* regeneration of multiple shoots from the nodal explants of *Drymaria cordata* (L.) Wild. Ex. Roem. and Schult. *The Bioscan*, 6(4): 657-660.
  55. **Trejo-Tapia, G. 2007.** La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
  56. **Tuan PA, Park WT, Xu H. 2012.** Accumulation of tilianin and rosmarinic acid and expression of phenylpropanoid biosynthetic genes in *Agastacherugosa*. *J Agric Food Chem*. 2012;60:5945–5951. doi: 10.1021/jf300833m.
  57. **Verano J, González-Trujano ME, Déciga-Campos M, Ventura-Martínez R, Pellicer F. 2013.** Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol Biochem Behav*. Sep;110:255-64. doi: 10.1016/j.pbb.2013.07.020.
  58. **Versalita s. Vanneste, j. Friml. 2009.** *Auxin: a trigger for change in plant development*. *Cell* 136 (6): 1005–1016; PMID 19303845; doi 10.1016/j.cell.2009.03.
  59. **WHO 2003.** WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP).
  60. **Wang JG. 2010.** GC-MS Analysis of chemical composition of volatile oil from *Agastache rugosa*. *Food Sci* 2010-08. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTALSPKX201008052.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALSPKX201008052.htm).
  61. **Xu H, Kim YK, Jin X. 2008.** Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *J Med Plants Res*;2(9):237–241
  62. **Yue, W., Ming, Q. L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C. J., Han, T., & Qin, L. P. 2016.** Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 215-232.
  63. **Zielińska S and Matkowski A. 2014.** Phytochemistry and bioactivity of aromatic an medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). Department of Pharmaceutical Biology and Botany, Medical University of Wrocław, Borowska 211, 50-556.
  64. **Estrada L.E. 1995.** Cultivo de Plantas Medicinales. Una urgencia latinoamericana. En. Estrada (Ed). *Plantas Medicinales de México*. 2ª Ed. UACH. México
  65. **Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. 2013.** Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(11), 1777-1789.
  66. **Kumar, S., & Pandey, A. K. 2013.** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
  67. **Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Cruz-Jaime, S., del Carmen Valadez-Vega, M., Sumaya-Martínez, M. T., Pérez-Ávila, K. G., & Morales-González, J. A. 2013.** The chemoprevention of chronic degenerative disease through dietary antioxidants: progress, promise and evidences. In *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*. InTech.
  68. **Huang, T. K., & McDonald, K. A. 2012.** Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology advances*, 30(2), 398-409.
  69. **Ulbrich, B., Wiesner, W., & Arens, H. 1985.** Large-Scale Production of Rosmarinic Acid from Plant Cell Cultures of *Coleus blumei* Benth. In *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (pp. 293-303). Springer, Berlin, Heidelberg.

70. **Inomata, S., Yokoyama, M., Seto, S., & Yanagi, M. 1991.** High-level production of arbutin from hydroquinone in suspension cultures of *Catharanthus roseus* plant cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(3), 315-319.
71. **van Staden, E., Zazimalova, E., George, E.F. 2008** Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J. (Eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture*, (3rd edition). 1: 205–226. Springer, Bachelard, Dordrecht, Netherlands.
72. **Verpoorte, R. 1998.** Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232-238.
73. **Stafford, A. M., Pazoles, C. J., Siegel, S., & Yeh, L. A. 1998.** Plant cell culture: a vehicle for drug delivery. *Advances in drug discovery techniques*. CRC Press, New York.
74. **Lahana, R. 1999.** How many leads from HTS?. 447-448.
75. **Harvey, A. 2000.** Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*, 5(7), 294-300.
76. **Cragg, G. M., & Newman, D. J. 2013.** Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
77. **Myers, P. L. 1997.** Will combinatorial chemistry deliver real medicines?. *Current opinion in biotechnology*, 8(6), 701-707.
78. **Ortholand, J. Y., & Ganesan, A. 2004.** Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current opinion in chemical biology*, 8(3), 271-280.
79. **Asaka, I., Ii, I., Hirotsu, M., Asada, Y., & Furuya, T. 1993.** Production of ginsenoside saponins by culturing ginseng (*Panax ginseng*) embryogenic tissues in bioreactors. *Biotechnology letters*, 15(12), 1259-1264.
80. **Deno, H., Yamagata, H., Emoto, T., Yoshioka, T., Yamada, Y., & Fujita, Y. 1987.** Scopolamine production by root cultures of *Duboisia myoporoides*: II. Establishment of a hairy root culture by infection with *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of plant physiology*, 131(3-4), 315-323.
81. **Liu, C. Z., Abbasi, B. H., Gao, M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. 2006.** Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22), 8456-8460.
82. **Fujita, Y. 1988.** Industrial production of shikonin and berberine. *Applications of plant cell and tissue culture*, 137, 228-238.
83. **FUJITA, Y. 1985.** Production of plant pigments by plant tissue and cell culture. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 43(11), 1003-1012.
84. **Kayani, H. A., Khan, S., Naz, S. H. E. E. B. A., & Chaudhary, M. I. (2013).** Micropropagation of *Agastache anisata* using nodal segments as explants and cytotoxic activity of its methanolic extracts. *Pak J Bot*, 45(6), 2105-2109.
85. **Zielińska, S., & Matkowski, A. (2014).** Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochemistry reviews*, 13(2), 391-416.
86. **Zielińska, S., Piątczak, E., Kalemba, D., & Matkowski, A. (2011).** Influence of plant growth regulators on volatiles produced by in vitro grown shoots of *Agastache rugosa* (Fischer & CA Meyer) O. Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(1), 161.
87. **Polivanova, O. B., & Cherednichenko, M. Y. (2017).** Introduction to in vitro Culture and Micropropagation of two *Agastache* species-*Agastache urticifolia* and *Agastache scrophulariifolia*.
88. **Moharami, L., Hosseini, B., Ravandi, E. G., & Jafari, M. (2014).** Effects of plant growth regulators and explant types on in vitro direct plant regeneration of *Agastache foeniculum*, an important medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(6), 707-711.
89. **EGGER, Janet N.** *Agastache plant named 'Raspberry Summer'*. U.S. Patent Application No 12/150,185, 29 Sept. 2009.
90. **EGGER, Janet N.** *Agastache plant named 'TNAGAPDB'*. U.S. Patent Application No 15/330,802, 6 Feb. 2018.
91. **EGGER, Janet N.** *Agastache plant named 'Cotton Candy'*. U.S. Patent Application No 12/383,649, 11 Mayo 2010.
92. **EGGER, Janet N.** *Agastache plant named 'Summer Glow'*. U.S. Patent Application No 12/383,648, 4 Mayo 2010.
93. **Stefanache, C., Danila, D., Gille, E., Necula, R., & Falticeanu, M. (2012).** Contribution to the study of the polyphenolic compounds of *Agastache rugosa* Kuntze plants in vitro and conventional cultures. In *Proceedings of the Seventh Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, (Proceedings of the 7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia, 27-31 May, 2012 (pp. 74-80). Institute for Medicinal Plant Research and Association for Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (AMAPSEEC).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)  
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)  
Dr. Mario Rodríguez Monroy  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz  
Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. BRENDA HILDÉLIZA CAMACHO DIAZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Susana Valencia Díaz

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

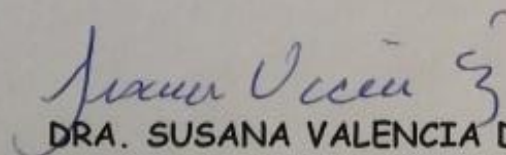
Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. SUSANA VALENCIA DIAZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)  
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)  
Dr. Mario Rodríguez Monroy  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz  
Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Susana Valencia Díaz

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Susana Valencia Díaz

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)  
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)  
Dr. Mario Rodríguez Monroy  
Dra. Susana Valencia Díaz  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz  
Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

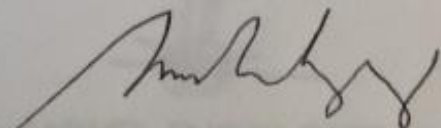
Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DR. MARIO RODRIGUEZ MONROY



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 5 Junio 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Susana Valencia Díaz

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Dra. Brenda Hildeliza Camacho Díaz

Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Tesis: PRODUCCIÓN DE TILIANINA Y ACTIVIDAD VASORRELAJANTE DE PLANTAS SILVESTRES Y CULTIVOS *IN VITRO* DE *Agastache mexicana*

Alumno que la presenta a revisión: GABRIELA CARMONA CASTRO

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA