



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**CENTRO DE INVESTIAGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

“Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA

**Mariana Sánchez Ramos**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER**

**CUERNAVACA, MORELOS 2019**

---

---

**Esta tesis fue desarrollada en:**

Laboratorio 321 de Biomoléculas del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ-UAEM), dirigido por la Dra. Laura Patricia Alvarez Berber.



Centro de Investigaciones Químicas

Laboratorio de Farmacología y electrofísica de la Facultad de Medicina de la UAEM, bajo la dirección del Dr. Juan José Acevedo Fernández.



Laboratorio 13 de Inmunidad Innata de la Facultad de Farmacia (UAEM), bajo la dirección de la Dra. Judith González Christen.



Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UAM-I, dirigido por el Dr. Francisco Cruz Sosa.



Este trabajo fue financiado por el CONACyT con número de beca 252140 y el laboratorio nacional LANEM mediante el proyecto 294406.



**Jurado revisor:**

Dr. Juan José Acevedo Fernández (Facultad de Medicina, UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB-UAEM)

Dra. María Luis Villarreal Ortega (CEIB-UAEM)

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (CIQ-UAEM)

Dr. Manases González Cortazar (CIBIS-IMSS)

Dr. Antonio Bernabé Antonio (UdG)

Dr. Francisco Cruz Sosa (UAM-I)

Este trabajo generó la siguiente publicación:

“Establishment and phytochemical analysis of a callus culture from *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) and its anti-inflammatory activity”

Parte de los resultados se presentaron en los foros:

"Producción de metabolitos secundarios antiinflamatorios y cicatrizantes mediante cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión de *Ageratina pichinchensis*" (Simposium 5 del Doctorado en Ciencias Naturales, CEIB-UAEM)

“Producción de metabolitos antiinflamatorios en cultivos de callos y células en suspensión de *Ageratina pichinchensis*” (14<sup>va</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, Cuernavaca Morelos)

“Establecimiento de un cultivo de callos, análisis fitoquímico de biomasa de *Ageratina pichinchensis* y evaluación de actividad anti-inflamatoria *in vitro*” (52° Congreso Mexicano de Química, Puerto Vallarta Jalisco)

## **DEDICATORIAS**

Este trabajo es dedicado a Dios, simplemente por la bendición de estar viva y poner en mi camino a seres de luz que han amenizado mi estancia en cada lugar donde he tenido el privilegio de trabajar.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi primer agradecimiento es para la maestra Silvia Marquina Bahena, por ser la persona que fomentó mi crecimiento académico y creyó en mí sin dudarlo. Por ser exigente, incrédula y disciplinada, no cabe duda de que ese carácter y fuerza de voluntad fueron ingredientes dispensables para la realización de este proyecto.

A la doctora Laura Alvarez Berber por brindarme un espacio en su laboratorio e incubadora de profesionistas con miras a la ciencia, su apoyo en este proyecto me permitió realizar los objetivos de la mejor manera y por su puesto que el aprendizaje de vida que me aportó es invaluable, muchas gracias por todo doctora.

Agradezco al doctor Antonio Bernabé Antonio por su dedicación, interés y guía en la realización de este proyecto, sencillamente todo el éxito de los resultados en el área de biotecnología fue labrado por usted.

Al doctor Juan José Acevedo Fernández agradezco su contribución en el crecimiento de este trabajo y por darme un espacio para trabajar en su laboratorio, sin sus aportaciones este proyecto no tendría todas las vertientes que ahora puedo ver.

A Elizabeth Negrete por su apoyo técnico y apoyo moral en la realización de las evaluaciones biológicas de este proyecto.

Índice general	Página
Resumen	
Abstract	
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Familia Asteraceae.....	5
2.2 Estudios científicos de <i>Ageratina pichinchensis</i> .....	7
2.3 Producción de metabolitos secundarios por las plantas.....	10
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales.....	13
2.4.1 Medio de cultivo.....	14
2.4.1.1 Macronutrientes.....	14
2.4.1.2 Micronutrientes.....	15
2.4.1.3 Vitaminas.....	15
2.4.1.4 Hormonas.....	16
2.4.2 Establecimiento de células en suspensión.....	17
2.4.2.1 Cinética de crecimiento celular.....	19
2.5 Metabolitos secundarios producidos mediante cultivos <i>in vitro</i> de la familia Asteraceae.....	22
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	28
6. Metodología.....	30
6.1 Material vegetal.....	31
6.2 Estudio biotecnológico.....	31
6.2.1 Inducción a callo friable.....	31
6.2.2 Crecimiento de células en matraz.....	33
6.2.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión.....	33
6.2.4 Viabilidad celular.....	33
6.2.5 Determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico.....	34
6.3 Estudio fitoquímico.....	35

6.3.1	Obtención de extractos orgánicos de callos y células en suspensión.....	35
6.3.2	Obtención de extractos de planta silvestre.....	35
6.3.3	Purificación y caracterización química de metabolitos secundarios de cultivos <i>in vitro</i> y planta silvestre.....	35
6.4	Evaluaciones de las actividades biológicas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	37
6.4.1	Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> .....	37
6.4.2	Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> .....	38
6.4.2.1	Cultivo de macrófagos en frascos de 75 cm <sup>2</sup> .....	38
6.4.2.2	Viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7.....	39
6.4.2.3	Tratamiento de macrófagos con compuestos y LPS.....	39
6.4.2.4	Determinación de óxido nítrico (NO) en RAW 264.7.....	39
6.4.2.5	Determinación de la concentración de IL-6 en RAW 264.7.....	40
6.4.2.6	cultivo de células RAW-Blue.....	40
6.4.2.7	Tratamiento de los macrófagos RAW-Blue.....	40
6.4.2.8	Determinación de la activación de NF-kB en RAW-Blue..	41
6.4.3	Actividad cicatrizante <i>in vivo</i> .....	41
7.	Resultados y discusión.....	43
7.1	Estudio biotecnológico.....	44
7.1.1	Germinación de semillas de <i>A. pichinchensis</i> bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	44
7.1.2	Inducción a callo friable de <i>A. pichinchensis</i> .....	45
7.1.3	Comparación del perfil metabólico de los callos de los diferentes tratamientos de <i>A. pichinchensis</i> .....	47
7.1.4	Selección de la concentración apropiada para la inducción a callo friable de la combinación de los RCV ANA y KIN.....	47
7.1.5	Crecimiento de células en matraz.....	50
7.1.6	Determinación de parámetros cinéticos del cultivo de células en suspensión.....	51
7.2	Estudio fitoquímico de las partes aéreas de <i>A. pichinchensis</i> .....	55



7.2.1 Estudio fitoquímico de cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> .....	65
7.3 Estudio biológico de extractos y compuestos puros derivados de cultivos <i>in vitro</i> y planta silvestre de <i>A. pichinchensis</i> .....	73
7.3.1 Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de extractos y compuestos puros de cultivos <i>in vitro</i> (callos y células en suspensión) y planta silvestre de <i>A. pichinchensis</i> .....	73
7.3.2 Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> .....	75
7.3.2.1 Viabilidad celular.....	75
7.3.2.2 Efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS.....	76
7.3.3 Actividad cicatrizante <i>in vivo</i> .....	78
7.4 Cuantificación de compuestos bioactivos en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> .....	82
8. Conclusiones.....	91
9. Perspectivas.....	94
10. Bibliografía.....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Tratamientos seleccionados para la inducción a callo friable.....	32
2. Efecto de compuestos puros derivados de planta silvestre y cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> sobre la viabilidad de células RAW 264.7 e inhibición de células RAW 264.7 estimuladas con LPS.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 <i>Ageratina pichinchensis</i> cultivada en su hábitat natural.....	2
2 Metabolismo primario y secundario de plantas.....	12
3 Establecimiento de cultivos de células en suspensión a partir de plántulas cultivadas <i>in vitro</i> .....	18
4 Representación esquemática de los sistemas de cultivo de suspensiones celulares vegetales.....	19
5 Fases del crecimiento celular.....	20
6 Semillas de <i>A. pichinchensis</i> germinadas bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	48
7 Efecto de los RCV sobre la inducción a callo de <i>A. pichinchensis</i> después de 20 días.....	49
8 Efecto de los RCV sobre la friabilidad de los callos de <i>A. pichinchensis</i> .....	50
9 Cromatoplaqueta del perfil metabólico de los tratamientos 1-6.....	51
10 ANOVA de las respuestas morfogénicas de los explantes de hoja de <i>A. pichinchensis</i> a las combinaciones de ANA y KIN.....	52
11 Respuestas morfogénicas de los RCV ANA y KIN.....	52
12 Disgregación de callos en medio líquido.....	54
13 Cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>A. pichinchensis</i> .....	55
14 Perfil metabólico de la cinética de crecimiento de <i>A. pichinchensis</i> .....	56
15 Viabilidad celular durante el crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>A. pichinchensis</i> .....	56
16 Células teñidas con Azul de Evans (40X).....	57
17 Compuestos aislados de partes aéreas de <i>A. pichinchensis</i> .....	58
18 Esqueleto base (benzopirano) de los compuestos <b>14-16</b> y <b>18</b> .....	60

19	Grupo funcionales y patrón de sustitución observados para los compuestos <b>8</b> , <b>15</b> y <b>16</b> .....	60
20	Señales características del O-metilencecalinol ( <b>14</b> ) y encecalinol ( <b>7</b> ).....	61
21	Señales características de hidrógenos geminales (A) del eudesmano ( <b>10</b> ) y las correspondientes a ladiprenilacetona ( <b>12</b> ).....	62
22	Señales del sistema aromático y de las cetonas $\alpha,\beta$ -insaturada ( <b>17</b> ) y saturada ( <b>6</b> ).....	63
23	Sistema aromático con patrón de sustitución 1, 3,4-trisustituido.....	63
24	Señales para protones base de oxígeno acoplados.....	64
25	Correlación H-H de protones base de oxígeno.....	65
26	Correlación HMBC de los hidrógenos H-2 y H-3 con los sustituyentes en el benzodihidrofurano.....	66
27	Señales asignadas a bencenos 1,4-di y pentasustituidos.....	67
28	Señales de carbono que evidencian al fragmento polihidroxilado (glucosa)...	67
29	Correlaciones heteronucleares H-C (tres enlaces) para el compuesto ( <b>5</b> ).....	68
30	Compuestos aislados de cultivos de callos y células en suspensión.....	69
31	Señales que indican la existencia de protones geminales y de un grupo acetato.....	72
32	Señales para protones vinílicos del benzopirano ( <b>21</b> ).....	71
33	Señales que identifican a hidrógenos de un sistema aromático, de doble enlace no conjugado y base de oxígeno.....	72
34	Correlaciones H-H de los hidrógenos base de oxígeno del dihidrofurano e hidrógenos geminales.....	73
35	Correlaciones HMBC de los grupos isopropeno y acilo en el benzodihidrofurano ( <b>22</b> ).....	74
36	Biosíntesis de benzodihidrofurano.....	75
37	Efecto inhibitorio de extractos de planta silvestre y cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> sobre edema inducido por TPA en ratones (1 mg/oreja).....	76

38	Efecto inhibitorio de compuestos puros de planta silvestre y cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> sobre edema inducido por TPA en ratones (1 mg/oreja).....	77
39	Efecto de los compuestos derivados de planta silvestre y cultivos <i>in vitro</i> sobre la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.....	79
40	Efecto del compuesto <b>19</b> sobre IL-6 y el factor nuclear (NF)- $\kappa\beta$ .....	80
41	Efecto del compuesto <b>22</b> sobre citosinas proinflamatorias y el factor nuclear (NF)- $\kappa\beta$ .....	80
42	Efecto de extractos de planta silvestre <i>A. pichinchensis</i> sobre el cierre de herida.....	81
43	Efecto de extractos de planta silvestre <i>A. pichinchensis</i> sobre la evolución del cierre de herida.....	82
44	Efecto de los compuestos <b>5</b> , <b>12</b> y <b>19</b> sobre el cierre de herida.....	83
45	Efecto de compuestos <b>5</b> , <b>12</b> y <b>19</b> sobre la evolución del cierre de la herida.....	83
46	Efecto cicatrizante de extractos de cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> .....	84
47	Efecto de extractos de cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. pichinchensis</i> sobre el cierre de la herida.....	84
48	Efecto del compuesto ( <b>22</b> ) derivados de callos y células en suspensión de <i>A. pichinchensis</i> sobre el cierre de la herida.....	85
49	Patrón de fragmentación y curva estándar del compuesto <b>22</b> .....	86
50	Patrón de fragmentación y curva estándar del compuesto <b>26</b> .....	87
51	Identificación del compuesto <b>22</b> en el extracto de callos.....	88
52	Identificación del compuesto <b>26</b> en el extracto de callos.....	88
53	Patrón de fragmentación y curva estándar del compuesto <b>22</b> y <b>26</b> .....	89
54	Cinética de crecimiento de células en suspensión de <i>A. pichinchensis</i> y producción de los compuestos <b>22</b> y <b>26</b> .....	90
55	Compuestos identificados en los cultivos de células en suspensión previamente aislados en plata silvestre de <i>A. pichinchensis</i> .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

## RESUMEN

*Ageratina pichinchensis* es una planta medicinal utilizada en el estado de Morelos como antifúngica, cicatrizante y gastroprotectiva, cuenta con estudios científicos que han validado sus usos populares. Estos efectos biológicos hacen que la planta sea una fuente importante de compuestos bioactivos, lo que ha conducido a considerar esta especie en peligro de extinción debido al interés de los colectores de hierbas y plantas medicinales. En atención a este problema, se requiere generar sistemas sustentables para la obtención de los compuestos bioactivos, en este sentido la biotecnología vegetal mediante el cultivo de tejidos y células en suspensión ha brindado alternativas viables para la obtención de metabolitos secundarios.

En este proyecto se establecieron cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión productores de compuestos antiinflamatorios y cicatrizantes de la especie *A. pichinchensis*, para ello se utilizaron semillas colectadas en el campo donde crece la planta, después del proceso de desinfección se sembraron bajo condiciones de esterilidad en medio de cultivo MS y se incubaron bajo condiciones controladas de luz y temperatura ( $25\pm 2$  °C y 16 h luz/8 h oscuridad), transcurridas 72 h de incubación se logró una germinación del 98% y posteriormente fueron transferidas a frascos de vidrio tipo Gerber con el mismo medio de cultivo. Se utilizaron hojas de plántulas de un mes de edad como fuente de explante y se expusieron en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal [KIN ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) con: ANA, 2,4-D y picloram ( $0.1$  y  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  para cada RCV)]. Se monitoreó la respuesta morfogénica durante 30 días y se determinó por gravimetría la friabilidad de los callos obtenidos y el perfil metabólico a partir de sus extractos orgánicos en AcOEt y MeOH, los resultados mostraron que la combinación que mejor respuesta presentó fue KIN con ANA, por lo que se llevó a cabo un segundo abanico hormonal en el que se utilizaron 4 niveles de concentración con ambos RCV ( $0.0$ ,  $0.1$ ,  $1.0$  y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), los resultados mostraron la inducción de tres respuestas morfogénicas (callo, callo/raíz, raíz) encontrándose que el tratamiento más apropiado para inducir a callos friables fue KIN ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ANA ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Las células en suspensión se establecieron a partir de callos friables de 20 días de edad, para ello se cultivaron 5 g de callos frescos en 50 mL de medio de cultivo líquido

contenido en matraz Erlenmeyer de 250 mL, su cinética de crecimiento mostró un comportamiento sigmoideo con una fase de latencia durante los primeros 4 días, la fase exponencial implicó los días 4-16 obteniendo la acumulación de biomasa máxima el día 16 ( $13.28 \pm 0.4855$  g/L), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de  $0.2303$  días<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) fue de 3.01 días, en los días 18 y 20 se observó la fase estacionaria y a partir del día 22 la fase de muerte, el perfil metabólico de los puntos de la cinética mostró que la producción de compuestos sucede durante toda la cinética, sin embargo la acumulación de metabolitos ocurrió el día 18 (fase estacionaria).

Se identificaron 11 compuestos en los cultivos *in vitro* de callos, mismos que fueron reproducidos por los cultivos de células en suspensión, dos de estos compuestos (uno de tipo benzofurano y un triterpeno) presentaron importante efecto antiinflamatorio, mientras que el benzofurano además presentó efecto cicatrizante, por lo tanto, los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión son sistemas viables para la producción de compuestos bioactivos. Cabe señalar que se identificó por primera vez el efecto antiinflamatorio del compuesto benzofurano y podría considerarse un agente antiinflamatorio debido a que tiene el potencial de inhibir la activación de NF- $\beta$ , NO, IL-6 y la secreción de TNF, es decir suprime la expresión de los genes diana NF- $\beta$  como la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la vía proinflamatoria.

Respecto al estudio fitoquímico de la planta silvestre se identificaron 13 compuestos, de los cuales el compuesto de tipo flavonoide mostró un efecto importante como antiinflamatorio y su benzocromeno y acetofenona promovieron la cicatrización en heridas de ratones de 2 mm, este resultado sugiere que la especie *A. pichinchensis* produce compuestos antiinflamatorios y cicatrizantes al igual que sus cultivos *in vitro*.



## ABSTRACT

*Ageratina pichinchensis* is a medicinal plant used in the state of Morelos as antifungal, healing and gastroprotective, has scientific studies that have validated its popular uses. These biological effects make the plant an important source of bioactive compounds, which has led to consider this species in danger of extinction due to the interest of the collectors of herbs and medicinal plants. In response to this problem, it is necessary to generate sustainable systems for obtaining bioactive compounds, in this sense plant biotechnology through the cultivation of tissues and cells in suspension has provided viable alternatives for obtaining secondary metabolites.

In this project, *in vitro* cultures of callus and cells in suspension producing anti-inflammatory and cicatrizing compounds of the species *A. pichinchensis* were established. For this, seeds collected in the field where the plant grows were used, after the disinfection process they were sown under conditions of sterility in MS culture medium and were incubated under controlled conditions of light and temperature ( $25 \pm 2$  ° C and 16 h light / 8 h dark), after 72 h of incubation a germination of 98% was achieved and subsequently they were transferred to Gerber type glass jars with the same culture medium. One-month-old seedling leaves were used as a source of explant and were exposed in MS medium supplemented with different combinations of plant growth regulators [KIN ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) with: ANA, 2,4-D and picloram ( $0.1$  and  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  for each RCV)]. The morphogenetic response was monitored for 30 days and the friability of the corns obtained and the metabolic profile from their organic extracts in AcOEt and MeOH were determined by gravimetry, the results showed that the combination that presented the best response was KIN with ANA, What was done was a second hormonal range in which 4 levels of concentration were used with both RCV ( $0.0$ ,  $0.1$ ,  $1.0$  and  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), the results showed the induction of three morphogenetic responses (callus, callus / root, root) found that the most appropriate treatment to induce friable calluses was KIN ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and ANA ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Suspended cells were established from friable calluses of 20 days of age, for which 5 g of fresh calli were cultured in 50 mL of liquid culture medium contained in 250 mL Erlenmeyer flask, their growth kinetics showed sigmoidal behavior with a latency phase during the first 4 days, the exponential phase involved days 4-16 obtaining the maximum

biomass accumulation on day 16 ( $13.28 \pm 0.4855$  g / L), the specific growth rate ( $\mu$ ) was  $0.2303$  days<sup>-1</sup> and the doubling time (td) was 3.01 days, on days 18 and 20 the stationary phase was observed and from day 22 the death phase, the metabolic profile of the kinetic points showed that the production of compounds happen throughout the kinetics, however the accumulation of metabolites occurred on day 18 (stationary phase).

Eleven compounds were identified in the *in vitro* cultures of callus, which were reproduced by cell cultures in suspension, two of these compounds (one of the benzofuran and one triterpene type) had an important anti-inflammatory effect, while benzofuran also had a cicatrising effect, therefore, *in vitro* cultures of callus and cells in suspension are viable systems for the production of bioactive compounds. It should be noted that the anti-inflammatory effect of the benzofuran compound was identified for the first time and could be considered an anti-inflammatory agent because it has the potential to inhibit the activation of NF- $\beta$ , NO, IL-6 and TNF secretion, ie it suppresses the expression of the NF- $\beta$  target genes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the proinflammatory pathway.

Regarding the phytochemical study of the wild plant, 13 compounds were identified, of which the flavonoid-type compound showed an important anti-inflammatory effect and its benzocromen and acetophenone promoted wound healing in 2-mm mice, this result suggests that species *A. pichinchensis* produces anti-inflammatory and healing compounds as well as its *in vitro* cultures.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Las plantas son fuente de múltiples metabolitos secundarios de importancia comercial ampliamente requeridos por la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria, entre otras (Karuppusamy, 2009; Bhalla et al., 2005); cada año se reportan nuevas moléculas obtenidas de plantas y la mayoría presentan actividades biológicas implicadas en diferentes patologías, así mismo incrementa la demanda de productos naturales provenientes de plantas dada la limitación de los procesos de obtención de medicamentos basados en la síntesis química (Verportee 1998; Sajc et al., 2000). Sin embargo, su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad de la planta, el clima, la época del año, tipo de suelo y humedad; además, debido a las dificultades del cultivo y las bajas concentraciones en las que se encuentran estos compuestos en la planta, la obtención de los metabolitos secundarios bioactivos por cultivo en el campo puede resultar económicamente no viable, aunado a lo anterior, muchas especies vegetales se encuentran en peligro de extinción debido a los problemas ambientales provocados por el hombre y a la sobreexplotación de las fuentes naturales (Vanisree y Tsay, 2007). Además, la biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a periodos de estrés, por ejemplo, algunos compuestos son necesarios para la interacción de la planta con el medio ambiente (como protección frente a depredadores, patógenos o estrés ambiental) o están relacionadas con la maquinaria reproductiva de la planta (atracción de insectos para promover la polinización) (Croteau et al., 2000; Sepúlveda et al., 2003; Wink 2003).

Debido a lo anterior, es necesario producir compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no dependan de las condiciones climáticas, sanitarias, políticas de la región de producción u otras. En este contexto, las estrategias de la biotecnología vegetal, particularmente el cultivo de tejidos y células en suspensión constituyen una alternativa para la producción de metabolitos secundarios de interés medicinal, esta técnica permite generar sistemas controlados, constantes e independientes de la época del año, factores climáticos y geográficos, la producción de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, siendo un sistema ventajoso en comparación con la extracción química de la planta completa (Mulabagal y Tsay, 2004; Pichersky y Gang, 2000).

Aunque se han reportado cultivos *in vitro* de tejidos vegetales de numerosas

---

plantas para la producción de compuestos bioactivos, la mayoría de las especies vegetales siguen siendo fuente directa de obtención de muchos metabolitos secundarios, por lo tanto, es necesario establecer sistemas sostenibles como lo son los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión.

La medicina tradicional mexicana es una de las más ricas del mundo y sólo el 5% de sus especies vegetales se ha estudiado científicamente (Ocegueda et al., 2005), de las cuales se cuenta con muy pocos cultivos *in vitro*. Una de las especies más utilizadas es *Ageratina pichinchensis*, popularmente conocida como “Axihuitl” en el municipio de Tepoztlán en el estado de Morelos, donde es utilizada en la medicina tradicional mexicana como cicatrizante, antifúngica y para la gastritis. Su uso empírico ha sido validado científicamente y se ha demostrado que biosintetiza compuestos de tipo benzocromeno, benzofurano, esteroides y flavonoides glicosilados como metabolitos secundarios mayoritarios (Aguilar-Guadarrama et al., 2009; Ríos et al., 2003; Romero-Cerecero et al., 2013). Inclusive, cuenta con una patente basada en un extracto hexánico enriquecido con el compuesto que promueve la actividad biológica, además se han realizado estudios clínicos que respaldan su uso popular; a pesar de lo anteriormente mencionado, *A. pichinchensis* no cuenta con estudios biotecnológicos dirigidos hacia la producción controlada y constante de los compuestos de interés, debido a lo anterior el objetivo de este proyecto es establecer cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión productores de compuestos bioactivos y con ello contribuir al desarrollo de alternativas viables para la producción de metabolitos secundarios de especies de la medicina tradicional mexicana.

---

## **2. ANTECEDENTES**

---

## 2.1 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae constituye el grupo vegetal más diverso de las plantas vasculares y comprende más de 1700 géneros que incluyen entre 24 000 y 30 000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en Antártida y el hinterland de Groenlandia, su distribución es prácticamente cosmopolita y es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats desde el nivel del mar hasta el límite altitudinal de la vegetación (Bremer, 1994; Smith et al., 2004; Rzedowski, 1972; Villaseñor 1993; Villaseñor et al., 2004). Presentan amplia variación en cuanto formas de vida, estructura floral, mecanismos de polinización y dispersión de semillas. Sus miembros son fácilmente reconocidos por sus inflorescencias dispuestas en capítulos, cáliz modificado en un vilano, estambres singenesios y el ovario ínfero bicarpelar que deriva en una cipsela (Villaseñor, 1993; Bremer, 1994).

Entre los géneros más estudiados de la familia Asteraceae se encuentra *Ageratina* ps. y comprende cerca de 1200 especies distribuidas en regiones templadas y subtropicales de América, Europa, África y Asia (Bremer, 1994; Katinas et al., 2007; Funk et al., 2009; Villaseñor, 2018), en el caso particular de México se cuenta con el registro de 361 géneros y 3 012 especies (Villaseñor 2003; Villaseñor et al., 2007); es decir la concentración más cuantiosa de este grupo de plantas de todos los países del mundo (Ortíz et al., 1998; Villaseñor et al., 2004).

La familia Asteraceae ocupa un lugar preponderante en la flora de México, contribuye a la riqueza florística de nuestro país (Villaseñor, 1993), están registradas 3 005 especies nativas distribuidas en 392 géneros, el 66% de las especies restringe su área al territorio nacional, y los registros incrementan anualmente debido a la exploración de áreas que hasta ahora habían sido poco estudiadas (Villaseñor, 2018).

Varias especies de este género han sido estudiadas por su actividad bactericida, antifúngica, antiviral, analgésica, citotóxica, antiinflamatoria y antipirética, para el tratamiento de la malaria, úlceras gástricas y fiebre (Velasco et al., 2006; Lima, et al., 2015; Muñoz et al., 2016; del Barrio et al., 2011; Cáceres, et al., 1995; Navarro-García, et al., 2003; Habtemariam 1998; García et al., 2011 a,b; Sasikumar et al., 2005; Blair et al., 2002;

---

Gupta et al., 2002). A este género se le han realizado estudios fitoquímicos, encontrándose más de 146 metabolitos secundarios en diferentes especies entre ellos: terpenoides, lactonas terpénicas y diterpenoides (aceite “esencial”), flavonoides glicosilados y no glicosilados, alcaloides pirrolizidínicos (cancerígenos) y compuestos poliacetilénicos (Fang, et al., 1988; García et al., 2011; Silva-Sánchez et al., 2017; Clavin, et al., 2007). La enorme diferencia en la composición química de los extractos de cada una de las especies de *Ageratina* se debe a las condiciones de los sitios de recolección de las plantas, aunque muchas especies comparten compuestos similares dentro del mismo género e incluso de la misma familia Asteraceae (Maia et al., 2002; Zhang et al., 2008).

Una de las especies de *Ageratina* que cuenta con importantes estudios científicos es *A. pichinchensis* y se le refiere con las sinonimias: “*Eupatorium aschembornianum*”, “*Ageratina aschemborniana*” y “*Eupatorium aschemborniana*”. Esta especie vegetal es popularmente conocida como “Axihuitl”, “hoja de agua” y “hierba de agua” en los municipios de Tepoztlán, Huitzilac y Amatlán en el estado de Morelos, donde se utiliza tradicionalmente para la curación de heridas, gastritis y como antifúngica. Se le describe como un arbusto de hasta 1.5 metros de altura, tallo erguido muy ramificado, cilíndrico, café amarillento, a veces rojizo o ligeramente pubescente (Monroy y Castillo, 2007).



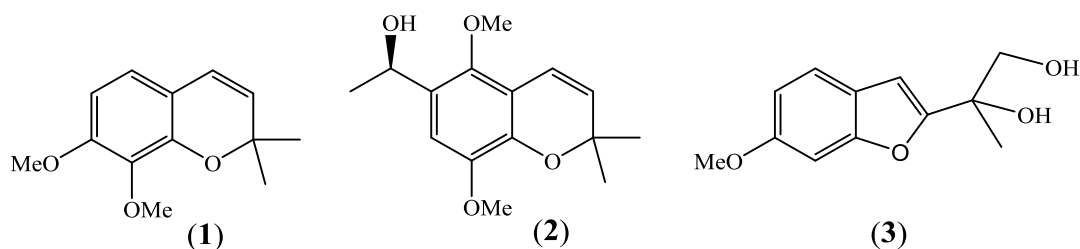
**Figura 1.** *Ageratina pichinchensis* cultivada en su hábitat natural.



---

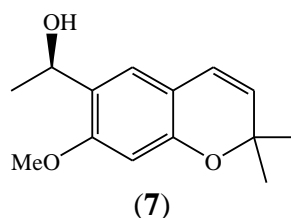
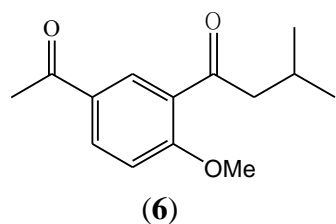
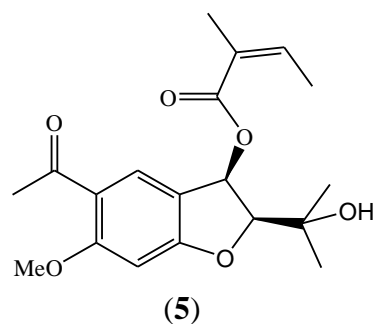
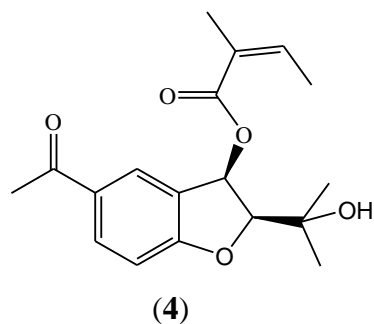
## 2.2 Estudios científicos de *Ageratina pichinchensis*

El primer estudio de *A. pichinchensis* reportó el aislamiento y caracterización de dos cromenos (eupatoriocromeno A y B (**1** y **2**)) y un dihidrobenzofurano (**3**) derivados de un extracto de petróleo de hojas y flores, estos compuestos presentaron actividad insecticida (Gómez et al., 1982; Murray, 1985).



Navarro et al., en 2003 reportaron que los extractos hexánicos y etanólicos de las partes aéreas de *A. pichinchensis* presentaron actividad antifúngica significativa contra los dermatofitos *Trychophyton mentagrophytes* y *Trychophyton rubrum* y el hongo no dermatofito *Aspergillus niger*. A partir del extracto hexánico se aislaron y caracterizaron los compuestos:

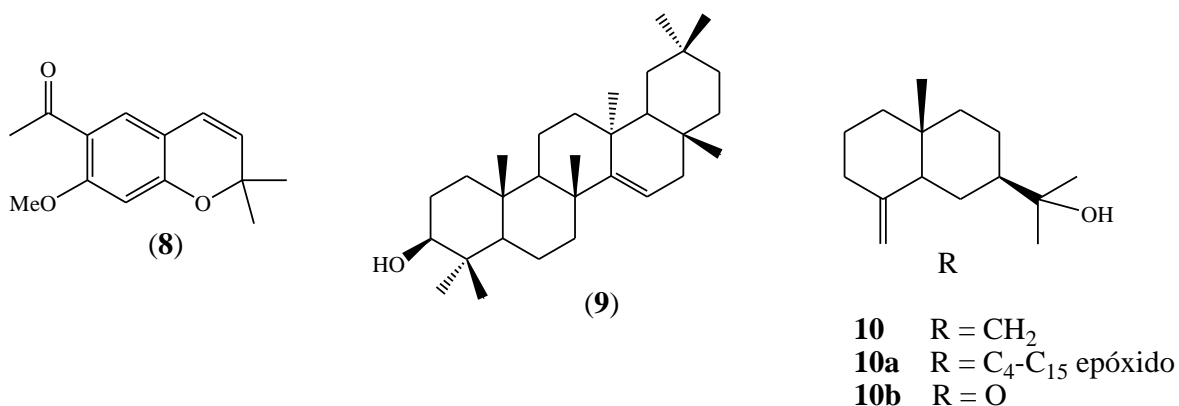
5-acetil-3 $\beta$ -angeloiloxi-2 $\beta$ -(1-hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano (**4**), 5-acetil-3 $\beta$ -angeloiloxi-2 $\beta$ -(hidroxiisopropil)-6-metoxi-2,3-dihidrobenzofurano (**5**), espeletona (**6**) y encecalinol (**7**); las evaluaciones antimicrobianas demostraron que los compuestos **4-6** promueven la inhibición de los dermatofitos *T. mentagrophytes* (200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ , compuestos **4**, **5** y **6**, respectivamente) y *T. rubrum* (100  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$ , compuestos **4**, **5** y **6**, respectivamente), mientras que el compuesto **7** presentó actividad contra ambos dermatofitos a 12.5  $\mu\text{g/mL}$  y además contra *Candida albicans* a 100  $\mu\text{g/mL}$  y *A. niger* a 200  $\mu\text{g/mL}$  (Ríos et al., 2003).



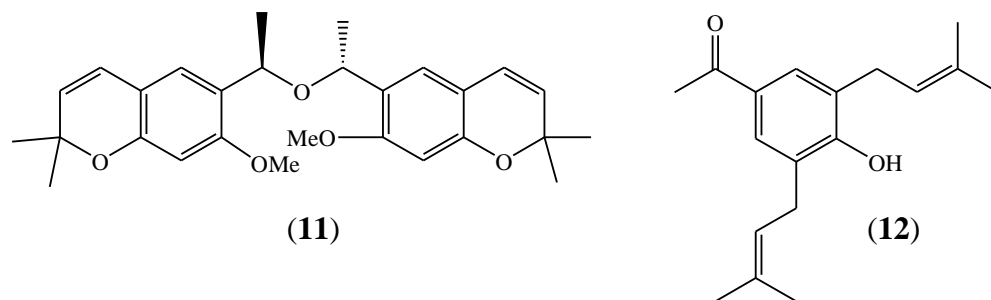
Por otro lado, se llevó a cabo el estudio piloto de doble ciego del extracto hexánico de las partes aéreas de *A. pichinchensis*, se demostró que el extracto aplicado de manera tópica en forma de crema reduce considerablemente la micosis generada el pie de atleta, para ello se realizó el seguimiento de los pacientes mediante un análisis micológico para evaluar la eficacia final del tratamiento. El extracto se estandarizó en un 10% y se comparó con el antimicótico de referencia ketomiconazol al 2%, los resultados demostraron que el extracto hexánico presentó un efecto superior al control con una efectividad del 80.3 y 76%, mientras que la tolerabilidad terapéutica fue del 80.3 y 71.7% con respecto al control, encontrándose que el compuesto mayoritario en el extracto es enecalinalol (7) (Romero-Cerecero et al., 2006). Este mismo grupo de investigación desarrolló una formulación en laca y se probó en pacientes diagnosticados con onicomiosis ligera a moderada (generada por el dermatofito *Trycophyton rubrum*), los resultados mostraron una eficiencia y tolerancia tópica inclusive superior al fármaco ciclopirox, cabe señalar que después del tratamiento es muy común que los pacientes experimenten recaídas, sin embargo, la formulación del fitomedicamento no presentó esos efectos ni alguno otro secundario (Romero-Cerecero et al., 2009a y 2009b). De manera paralela Aguilar-Guadarrama y cols. demostraron que el extracto hexánico de las partes aéreas de *A. pichinchensis* contiene metabolitos secundarios que promueven la inhibición de hongos dermatofitos y no dermatofitos, los metabolitos secundarios biológicamente activos fueron:

---

encecalina (**8**), taraxerol (**9**), (+)- $\beta$ -eudesmol (**10**) y dos derivados del compuesto **10**.



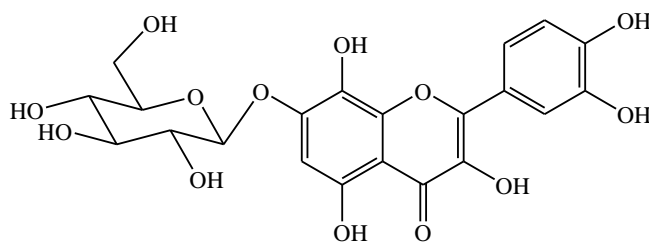
Posteriormente se reportó la actividad gastroprotectiva *in vivo* del extracto hexánico de las partes aéreas de *A. pichinchensis*, encontrándose un 85.65  $\pm$  4.76%, el extracto, a partir del extracto se purificó y caracterizó el compuesto encecanescina (**11**) y se demostró que el compuesto **11** es responsable del efecto observado a nivel extracto. Este mismo grupo de investigación obtuvo el compuesto 3, 5-diprenil-4-hidroxiacetofenona (**12**) a partir de las partes aéreas de *A. pichinchensis* y demostraron que promueve un efecto dosis-respuesta cuando se evaluó en modelos de inflamación y de dolor neuropático con una eficacia del 72.6% al 57.1%, este metabolito también presentó un efecto gastroprotectivo alcanzando una inhibición de las úlceras en un 75.59% a una dosis de 100 mg/kg (Sánchez-Mendoza et al., 2010 y 2013).



En otro estudio, se evaluó el extracto acuoso de las partes aéreas de *A. pichinchensis* en líneas celulares de cáncer y se observó que no presentó efecto citotóxico, sin embargo, promovió la proliferación celular en la línea de cáncer MRC-5 (células normales de pulmón fetal), así mismo se evaluó su efecto sobre heridas no infectadas de úlceras venosas crónicas en pacientes y demostró eficiencia significativa en acelerar la cicatrización sin generar efectos irritantes en la piel (Romero-Cerecero et al., 2011). Este

---

mismo grupo de investigación en el año 2012 realizó un estudio similar en pacientes con úlceras crónicas entre 2 y 15 cm de diámetro y menores de 10 años de su aparición aplicando una laca basada en extracto de las partes aéreas en *n*-hexano: acetato de etilo (70:30) estandarizado al 0.76% con el compuesto enecalina (**8**), este estudio demostró un efecto significativo sobre la aceleración de la cicatrización de las úlceras crónicas sin efectos irritantes en las heridas en comparación con el control (alginato de propilenglicol al 7%). Posteriormente en un estudio biodirigido respecto al efecto cicatrizante previamente observado en el extracto de *A. pichinchensis* se encontró que el compuesto relacionado con este efecto biológico es el compuesto identificado como 7-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-galactina (**13**), este compuesto mostró un efecto antiinflamatorio a nivel extracto determinado en un modelo *in vivo* sin causar daño hepático al ser aplicado en ratas (Romero-Cerecero et al., 2013).



(13)

### 2.3 Producción de metabolitos secundarios por las plantas

Como se mencionó anteriormente, *A. pichinchensis* es una especie que genera una amplia variedad de compuestos bioactivos y la producción de esta diversidad de moléculas está asociada a los estímulos que experimenta en el hábitat donde crece, al igual que cualquier otra especie vegetal, los factores bióticos y abióticos influyen directamente en el metabolismo secundario. De manera general, mediante el metabolismo primario dirigido por el proceso de fotosíntesis sintetiza compuestos orgánicos a partir de la energía solar en los cloroplastos que se encuentran principalmente en hojas y partes verdes de los vegetales, pero además desarrollan rutas que conducen a la formación de compuestos denominados metabolitos secundarios (compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales, pero les confiere ventajas selectivas interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente). Recientemente se ha enfocado atención especial a este tipo de compuestos químicos debido a su importancia como drogas medicinales, venenos,

---

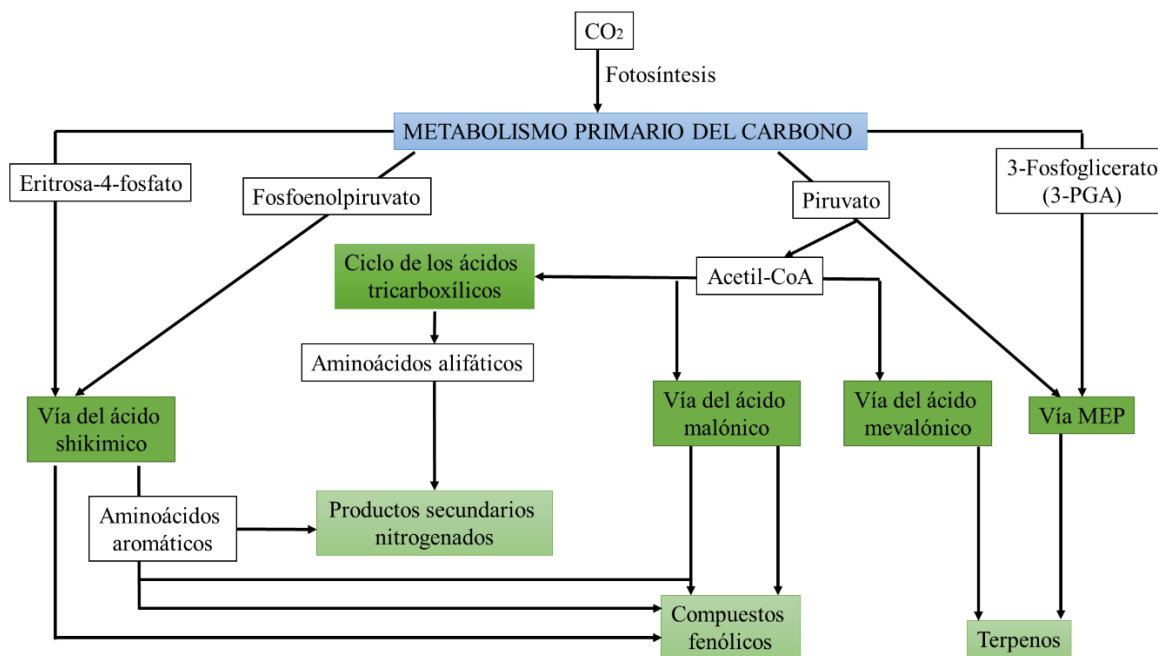
saborizantes, pegamentos, aceites, ceras u otros materiales utilizados en la industria (Croteau et al., 2000; Goossens et al., 2003; Karuppusamy, 2009).

Los metabolitos secundarios han sido optimizados y modelados durante la evolución, la mayoría de ellos cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos, inhiben el desarrollo de insectos, nemátodos, hongos y bacterias mejorando el crecimiento de la planta, pueden actuar como agentes alelopáticos, es decir, intervienen en la defensa química de las plantas, de esta manera los metabolitos secundarios que son secretados por una planta pueden interactuar con otras plantas y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato produciendo un efecto positivo o negativo en ella. Otra función ecológica es la atracción de polinizadores o dispersores de semillas e inclusive se les atribuye la función de protección de radiaciones ultravioleta (Sajc et al., 2000; Fieh, 2000; Dixon et al., 1995).

Lo anterior sustenta que los compuestos derivados del metabolismo secundario son de gran importancia para proteger a la planta tanto de factores bióticos y abióticos que restringen el crecimiento y aumentan la disponibilidad de una especie para competir con otras en un hábitat dado (Bourgaud et al., 2001; Ramakrishna et al., 2011).

Se conocen más de 100 000 estructuras de metabolitos secundarios provenientes de plantas, que han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Bhalla et al., 2005; Chinou, 2008). La formación de los metabolitos secundarios tiene lugar a partir de los metabolitos secundarios, la síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis donde se generan sus intermediarios (Figura 2). La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas tales como hidroxilaciones, metilaciones, epoxidaciones, malonilaciones, esterificaciones y glucosilaciones (Sepúlveda et al., 2003; Wink, 2007). Esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos en las especies, entre los miembros de una población y en los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la adaptación de las plantas. Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios derivan de rutas del metabolismo primario tales como la glucólisis, ciclo de Krebs o la vía del ácido shikimico. Para cada tipo de órgano, tejido y tipo celular existe una síntesis

constitutiva y específica de metabolitos secundarios, aunque se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis. Por otro lado, la síntesis de los metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos se incrementan como parte de la respuesta al estrés biótico o abiótico (Gutiérrez et al., 2009).



**Figura 2.** Metabolismo primario y secundario de plantas.

Por lo tanto, la producción de metabolitos secundarios mediante las plantas tiene bajos rendimientos debido a que es dependiente de los factores bióticos y abióticos, edad de la planta, inclusive factores geográficos y políticos; sin embargo, son productos de alta demanda en las diferentes industrias principalmente la farmacéutica. En atención a ello, se han desarrollado diversas estrategias para producirlos, en este sentido la síntesis química cuenta con numerosas rutas sintéticas que han logrado producir compuestos estructuralmente similares a los productos naturales, sin embargo, se ven limitados debido a que en la mayoría de los casos no posible reproducir lo que la naturaleza biosintetiza. Por lo tanto, sigue siendo una necesidad el desarrollo de tecnologías enfocadas a la producción de metabolitos secundarios bioactivos cuya calidad y costos no sean afectadas por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción.

## 2.4 Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

---

---

El cultivo de células y tejidos vegetales es el conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street 1977; Calva y Ríos 1999). Se basa en el principio de totipotencia que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul 2000).

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional de plantas son:

- Producción de plantas de sanidad controlada que permite el incremento en los rendimientos.
- Independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas sociopolíticos.
- Capacidad de establecer sistemas de producción definidos en relación a las demandas del mercado.
- Cultivo de especies no domesticadas o difíciles de cultivar en campo.
- Conservación del germoplasma de plantas de interés comercial en vías de extinción.
- Posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético más rápidos que los cultivos tradicionales.
- Producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difícil de obtener por extracción o por síntesis química.
- Producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, herbicidas o estrés abiótico con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos que secuestren metales pesados de suelos contaminados.
- Síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*.

- 
- Obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química.

La planta de interés a cultivar bajo condiciones *in vitro* es crecida en medio de cultivo de plantas, se han descrito en la literatura diferentes medios de cultivo (formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos *in vitro*) de plantas, estos medios de cultivo contienen sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento vegetal (Yasuda et al., 1972; Calva y Ríos 1999).

### **2.4.1 Medio de cultivo**

El medio de cultivo más utilizado es el MS (Murashige and Skoog, 1962), tiene altos niveles de nitrógeno inorgánico y de sales minerales, la fuente de carbono comúnmente utilizada es sacarosa en concentraciones del 3%, este azúcar es fosforilado y posteriormente forma un compuesto complejo con una molécula transportadora que facilita su ingreso a la célula a través de la membrana plasmática (Vásquez y Torres, 1995). La adición de vitaminas mejora el crecimiento de los cultivos vegetales y las hormonas son necesarias para el alargamiento, crecimiento y división celular.

#### **2.4.1.1 Macronutrientes**

Los macronutrientes proveen los seis principales elementos: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), requeridos para el crecimiento de las plantas. La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar las máximas de crecimiento varía considerablemente entre especies.

Los medios de cultivo deben contener suficiente nitrógeno inorgánico para un adecuado crecimiento de la célula vegetal. Las células vegetales pueden crecer solo en nitratos, pero se obtienen mejores resultados cuando el medio de cultivo contiene nitrato y amonio (Roca y Mrogiski, 1991). Los nitratos son suministrados en el intervalo de 25-40 mM, mientras que concentraciones típicas de amonio varían entre 2 y 20 mM. Concentraciones superiores a 8 mM pueden ser letales para crecimiento celular de algunas especies. Las células pueden crecer en un medio de cultivo conteniendo amonio como única



---

---

fuelle de nitr3geno, si uno o m3s de los 3cidos del ciclo de Krebs est3n presentes en concentraciones aproximadamente de 10 mM. Cuando las fuentes de nitr3geno, nitrato y amonio est3n presentes en el medio de cultivo, los iones amonio ser3n utilizados m3s r3pidamente que los iones nitrato.

El potasio es requerido para el crecimiento celular, la mayor3a de los medios de cultivo contienen potasio en forma de nitrato o cloruro en concentraciones entre 20-30 mM.

Las concentraciones 3ptimas de P, Mg, S y Ca var3an entre 1-3 mM cuando son satisfechos todos los otros requerimientos para el crecimiento celular; en ocasiones son necesarias concentraciones m3s altas si existen deficiencias en otros nutrientes.

#### **2.4.1.2 Micronutrientes**

Los minerales esenciales para el crecimiento de tejidos y c3lulas vegetales incluyen: hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo). El hierro puede ser el m3s cr3tico de todos los minerales, se pueden utilizar citrato y tartrato de hierro, pero estos reactivos son dif3ciles de disolver y frecuentemente se precipitan cuando se preparan los medios de cultivo, debido a ello se puede utilizar el complejo EDTA-hierro.

#### **2.4.1.3 Vitaminas**

Las vitaminas son requeridas por las plantas como catalizadores en varios procesos metab3licos. Las c3lulas y tejidos vegetales cultivados *in vitro* requieren algunas vitaminas y se consideran factores muy importantes en el crecimiento celular. Las m3s utilizadas son: tiamina (B1), 3cido nicot3nico, piridoxina (B6) y myo-inositol. La tiamina es indispensable para los cultivos en concentraciones de 0.1 a 10.0 mg/L; el 3cido nicot3nico es utilizado normalmente en concentraciones de 0.1-5.0 mg/L; la piridoxina es utilizada entre 0.1-10.0 mg/L. La vitamina que es requerida por todas las especies vegetales para el crecimiento es la tiamina. El 3cido nicot3nico y la piridoxina son frecuentemente adicionados en los medios de cultivo, pero no son esenciales para el crecimiento celular en muchas especies. El myo-inositol es com3nmente incluido en muchas soluciones de vitaminas debido a que se ha demostrado que estimula el crecimiento en ciertos cultivos de

---

células, aunque su presencia en el medio de cultivo no es esencial.

Otras vitaminas como biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, vitamina E (tocoferol), riboflavina y ácido *p*-aminobenzoico se utilizan en algunos medios de cultivo. El requerimiento de estas vitaminas en los cultivos de células vegetales generalmente es despreciable y no limitan el crecimiento.

#### **2.4.1.4 Hormonas**

Las hormonas vegetales regulan y controlan el crecimiento, diferenciación celular, división celular, floración, germinación y formación del fruto. Los mecanismos que intervienen generan cambios en la expresión genética, el citoesqueleto y la regulación de las vías metabólicas. Entre las hormonas naturales más conocidas se encuentran las auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico, y las más utilizadas en los cultivos celulares son las auxinas y citoquininas.

Las auxinas y citoquininas son dos grupos de reguladores de hormonas que inician el crecimiento celular desdiferenciado y promueven la división celular. Las auxinas naturales más importantes son el ácido indolacético (IAA), ácido indolbutírico (IBA), 4-cloro indolacético (4-cloro IAA), ácido fenilacético (PAA), y las sintéticas: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético. Las citoquininas más comunes son kinetina (KIN), N-bencilaminopurina (BAP), zeatina y 6-( $\gamma,\gamma$ -deimetilamino) purina. Las auxinas promueven la elongación de raíces a bajas concentraciones provocando un ablandamiento de la pared celular y con ello facilitan su crecimiento, mientras que las citoquininas favorecen la división celular y en el cultivo estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta, disminuyen la dominancia apical promoviendo la formación de brotes axilares, retardan el envejecimiento y en concentraciones elevadas pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces (Wahby, 2007).

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal requeridas dependen del objetivo de su uso y la especie. En ciertos valores sirven para mantener una línea de callos no diferenciados de una especie y pueden inducir organogénesis en otras. La

---

---

relación citoquininas/auxinas, el efecto puede conducir a la formación de yemas, crecimiento de callos indiferenciados o a la formación de tejidos de raíz.

En los cultivos celulares, es necesario utilizar concentraciones de hormonas considerablemente menores para mantener las células en suspensión.

#### **2.4.2 Establecimiento de células en suspensión**

Las suspensiones celulares es un conjunto de células indiferenciadas en forma libre o agregados, distribuidos en medio de cultivo líquido homogéneo en constante agitación, empleado para mantener y propagar las células vegetales. Sus aplicaciones van desde estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, producción de metabolitos secundarios, aislamiento de mutantes y estudios de embriogénesis somática (Roca y Mroginski, 1991).

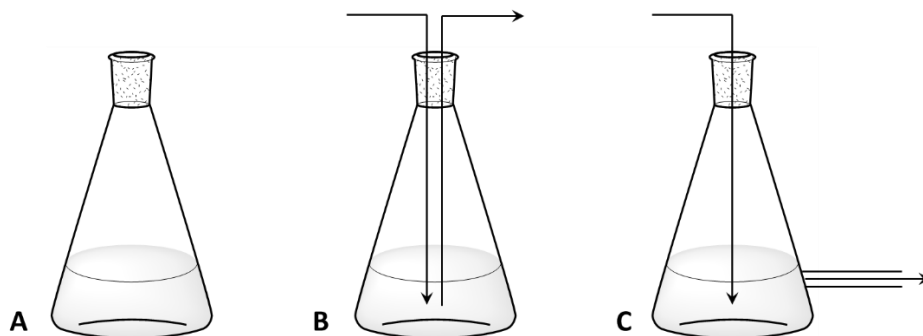
Una suspensión celular se prepara transfiriendo pequeños segmentos de callo friable a un medio líquido agitado para su crecimiento y disgregación, con una biomasa activa y abundante para alcanzar una importante densidad celular. La agitación es realizada mediante agitadores orbitales con el fin de ayudar a la dispersión de las células y favorecer el intercambio gaseoso; las velocidades que se manejan oscilan entre 30 y 150 revoluciones por minuto (rpm) dependiendo de la especie vegetal y el volumen de operación (Dixon, 1991).

Para la formación de los cultivos de células en suspensión normalmente se requiere de un inóculo grande. Si el callo no es friable, pocas células se desprenderán y el tamaño del inóculo de células en suspensión tardará en alcanzar una densidad alta para subcultivar, bajo condiciones de esterilidad se remueve el material calloso no desprendido y los agregados celulares por filtración permitiendo que el material más grande se sedimente. La densidad mínima inicial de células requeridas es del 10%, la tasa de crecimiento del cultivo incrementa fácilmente si las células son transferidas antes de alcance la fase estacionaria (Franklin y Dixon, 1994).



**Figura 3.** Establecimiento de cultivos de células en suspensión a partir de plántulas cultivadas *in vitro*.

Comúnmente se emplean matraces Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callo dispersos en él hasta llenar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los matraces; estos se ponen a incubar en un agitador giratorio a 80-150 rpm, bajo luz continua y a 25°C, mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días. El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es un callo friable (fácilmente disgregable en medio líquido) con un ritmo alto de división celular. Sin embargo, a veces es necesario utilizar otros tipos de callos, y en esos casos hay que realizar operaciones para romper los agregados celulares, como el uso de matraces con deflectores o el filtrado, la adición de pectinasas y celulasas al medio de cultivo para reducir el tamaño de los agregados celulares. En su iniciación las suspensiones celulares constan de grandes agregados y de células libres, alargadas y enormes que no se dividen, pero después de repetir los subcultivos se obtiene una suspensión fina dispersa de alto ritmo de crecimiento, estas suspensiones poseen pequeños agregados de células pequeñas, isodiamétricas, con paredes finas y citoplasma denso. Los sistemas de mantenimiento celular pueden ser continuos cerrados, cerrados y continuos abiertos (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de los sistemas de cultivo de suspensiones celulares vegetales. A = cultivo cerrado (no entra ni sale medio nuevo); B = continuo cerrado (entra medio nuevo y sale medio gastado, pero sin células); C = continuo abierto (entra medio nuevo y sale medio gastado con algunas células).

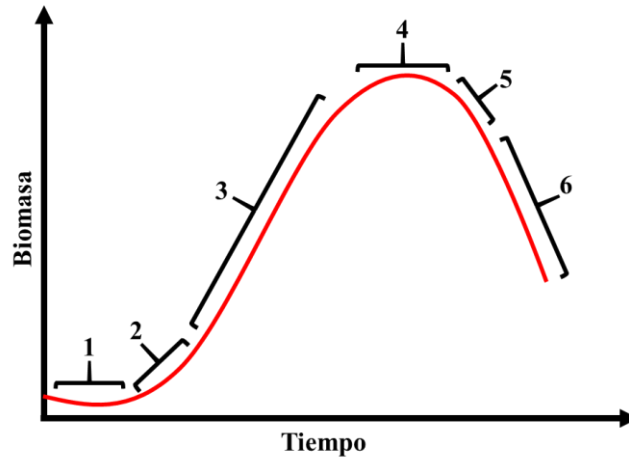
**Cultivos cerrados:** en este sistema las células producidas se quedan en el medio y de esta manera se produce un aumento en la densidad celular, al alcanzar la suspensión la denominada fase estacionaria, se toman fracciones de ella para subcultivarse en medio fresco y reiniciar de esta manera el ciclo de crecimiento. Este es el sistema más empleado en los laboratorios de investigación.

**Cultivos continuos cerrados:** en este sistema se suministra a la solución medio fresco en forma continuo, y simultáneamente se retira solo el medio “usado”, las células se separadas mecánicamente se acumulan en el sistema.

**Cultivos continuos abiertos:** Al igual que en el sistema anterior, se suministra medio fresco, pero el medio “usado” sale junto con las células.

#### 2.4.2.1 Cinética del crecimiento celular

Las células vegetales se reproducen por división celular, por lo cual presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas. Las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual cambia también la velocidad de crecimiento poblacional. Esto permite conocer diferentes fases de crecimiento, que sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o biomasa.



**Figura 5.** Fases del crecimiento celular.

Para esto se utilizan principalmente parámetros poblacionales definidos como velocidad específica de crecimiento, también conocida como tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación o de generación ( $t_g$ ).

La velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento está definida por la siguiente ecuación:

$$\mu = dx/dt * 1/x$$

En donde:

X= concentración de la biomasa

t= tiempo en días

En una curva de crecimiento se pueden reconocer las diferentes fases que se describen a continuación:

**Fase lag (1):** también conocida como fase de adaptación donde el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células en el inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. Cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo de crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Los cambios de las condiciones ambientales como

---

---

temperatura, iluminación y pH también pueden causar un retardo en el crecimiento en la fase inicial de un cultivo.

**Fase de aceleramiento (2):** en esta fase los componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el RNA seguido de las proteínas y el peso individual. La concentración celular es generalmente la última que muestra este incremento.

**Fase exponencial (3):** durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante y en consecuencia la concentración celular aumenta rápidamente.

**Fase de desaceleración (4):** en esta fase se marca considerablemente el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, la tasa de división celular disminuye, aunque en vista del elevado número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor. En este periodo la composición bioquímica de la biomasa cambia de manera opuesta a la mencionada en la fase de aceleración.

**Fase estacionaria (5):** durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de autosombreado), otro factor limitante puede ser la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo.

**Fase de muerte (6):** la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye, además se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la producción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular.

## **2.5 Metabolitos secundarios producidos mediante cultivos *in vitro* de especies de la familia Asteraceae**

---

La literatura reporta especies de diferentes géneros de Asteraceae de las que se han establecido cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión para producir metabolitos secundarios de interés biológico, por ejemplo la artemisinina (estructura) es una lactona sesquiterpénica utilizada contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* (protozoo parásito que causa malaria en humanos) y también posee actividad antitumoral contra varios tipos de cáncer, principalmente leucemia, este metabolito secundario es producido por *Artemisia annua*; sin embargo, su producción mediante síntesis química es muy complicada y costosa, pero ha sido posible mediante cultivos de células en suspensión producir el compuesto e inclusive se ha incrementado hasta 300 veces el rendimiento así como la reducción del tiempo de producción mediante el uso de elicitores (Baldi et al., 2007; Durante et al., 2011).

Por otro lado, *Hypericum perforatum L.* es ampliamente utilizada contra la depresión leve a moderada y como insecticida, el metabolito responsable de estos efectos conocido como hipericina (derivado rojo de la antroquinona) es producido en bajos rendimientos por la planta silvestre, sin embargo, los cultivos *in vitro* de células en suspensión elicitados con ácido jasmónico incrementan el rendimiento del compuesto significativamente en comparación con la planta silvestre, por lo que suponen una alternativa viable para su obtención (Walker et al., 2008).

Además, se han identificado metabolitos secundarios de interés biológico en cultivos *in vitro* que las especies vegetales en su hábitat natural no producen, por ejemplo, el compuesto pulchelina E (lactona sesquiterpénica) aislado de cultivos de callos, células en suspensión y raíces transformadas de *Rudbeckia hirta L.* con importante actividad inmunoestimulante, los cultivos *in vitro* superan hasta 20 veces el rendimiento identificado en la planta silvestre (Luczkiewicz et al., 2002).

*Vernonia cinerea* produce alcaloides mediante cultivos de callos, células en suspensión y raíces transformadas, donde se observó incremento de los compuestos modificando los reguladores de crecimiento empleados y tipo de tejidos cultivados para su obtención, (Maheshawari et al., 2007) inclusive sus rendimientos superan lo producido por la planta silvestre.



---

Por lo tanto, los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión son sistemas reproducibles, estables y muchas veces económicamente viables para la producción de diversos metabolitos secundarios bioactivos, que las plantas los producen cuando son requeridos de acuerdo a las necesidades metabólicas que experimenta.

---

### **3 JUSTIFICACIÓN**

---

*A. pichinchensis* es una especie vegetal endémica de los municipios de Tepoztlán, Huitzilac y Amatlán en el estado de Morelos, donde es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de infecciones fúngicas, ulceración gástrica y cicatrización de heridas tópicas, su uso etnomédico ha sido validado por varios estudios científicos que reportan que la planta biosintetiza metabolitos secundarios de tipo flavonoide glucosilado, benzocromeno, dihidrobenzofurano y eudesmano, inclusive se han desarrollado patentes a nivel extracto enriquecidos con algunos de estos compuestos debido a su efectividad; sin embargo, la variabilidad de compuestos bioactivos es dependiente del estímulo de factores bióticos y abióticos del entorno donde la planta crece, es por ello que necesario desarrollar estrategias que permitan su producción de manera masiva, controlada e independiente de los factores involucrados para su biosíntesis sin ser sobreexplotada.

Mediante herramientas biotecnológicas se han establecido sistemas controlados para producir diversos metabolitos secundarios de alto valor comercial a partir de especies vegetales. Una de las técnicas más aplicadas es el cultivo de células en suspensión debido a su factible escalamiento en reactores para la producción masiva, empleo de elicitores que promuevan el incremento de los compuestos de interés y obtención de extractos menos complejos que los producidos por las plantas silvestres. Actualmente a nivel industrial se producen compuestos bioactivos mediante cultivos de células vegetales presentando importantes ventajas con respecto a su obtención mediante síntesis química o vía directa de las especies vegetales, como reducción en la generación de contaminantes ambientales durante su biosíntesis y extracción, conservación de especies vegetales que podrían extinguirse, utilización de espacios reducidos que podrían ser aprovechados para vegetación alimenticia así como mantener el equilibrio ecológico.

Debido a lo anterior, en este proyecto se ha determinado establecer cultivos de callos y células en suspensión para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos a partir de la especie vegetal *Ageratina pichinchensis* y con ello aportar alternativas sostenibles de producción de metabolitos secundarios controladas, ambiental y ecológicamente amigables.

---

#### **4 HIPÓTESIS**

---

El establecimiento de cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión de *Ageratina pichinchensis*, permitirá el crecimiento celular y la acumulación estable de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente semejantes a los biosintetizados por la planta silvestre.

---

## 5 OBJETIVOS

---

## **Objetivo general**

Establecer cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión de *A. pichinchensis* para la producción de metabolitos secundarios bioactivos estructuralmente semejantes a los biosintetizados por la planta silvestre.

## **Objetivos específicos**

1. Cultivar bajo condiciones *in vitro* plántulas de *A. pichinchensis*.
2. Inducir a callo friable explantes de hoja de *A. pichinchensis* mediante el uso de reguladores de crecimiento vegetal.
3. Establecer un cultivo de células en suspensión a partir de callos friables de *A. pichinchensis*.
4. Aislar e identificar los metabolitos secundarios biosintetizados por los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión y planta silvestre.
5. Evaluar la actividad antiinflamatoria y cicatrizante de extractos y compuestos puros de los cultivos de callos y células en suspensión y planta silvestre.
6. Cuantificar los compuestos bioactivos presentes en el cultivo de callos, células en suspensión y planta silvestre mediante espectrometría de masas acoplado a masas.

---

## **6 METODOLOGÍA**



---

## 6.1 Material vegetal

La colecta de las partes aéreas de la planta *A. pichinchensis* (Axihuitl) y semillas se realizó en el barrio de San Juan Tlacotenco (19° 00' 43.8" N, 99.05' 38.6" W) del municipio de Tepoztlán en el estado de Morelos, México. Se envió una muestra al biólogo y M. en C. Gabriel Flores Franco para su identificación e ingreso a la Colección del Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). La muestra vegetal se identificó como *Ageratina pichinchensis* (Kunth) R. M. King & H. Rob de la familia Asteraceae con número de folio 33913.

## 6.2 Estudio biotecnológico

Para el estudio biotecnológico (establecimiento de callos y células en suspensión) se utilizaron semillas de *A. pichinchensis* colectadas en su hábitat natural. Se limpiaron 100 semillas y se depositaron en un sobre de papel filtro que se sumergió en un vaso de precipitado de 500 mL que contenía 150 mL de agua destilada con 5 gotas de detergente comercial Axion®, posteriormente se lavaron por 5 min con agua destilada y se añadió etanol al 70% durante 30 min, por último, se añadió hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 15 min y se enjuagaron con agua destilada bajo condiciones de esterilidad. Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri que contenían medio de cultivo MS (Murashege & Skoog) suplementado con 30 g/L de sacarosa y ajustado a pH 5.7 previamente esterilizado en autoclave a 121 °C y 1.5 kg /cm<sup>2</sup> durante 15 min, y se incubaron bajo condiciones controladas de luz y temperatura (16 h luz/ 8 h oscuridad y 25 ±2 °C).

### 6.2.1 Inducción a callo friable

Se utilizaron explantes de hojas procedentes de plántulas cultivadas *in vitro* de un mes de edad, los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) se seleccionaron basándonos en una revisión bibliográfica de los RCV reportados en especies de Asteraceae para inducción a callo. El medio de cultivo MS se suplementó con los RVG: ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4-amino-3-5,6-tricloropicolinato potásico (picloram) como auxinas y N<sup>6</sup>-furfurilaminopurina (KIN o kinetina) como citocinina.

Los explantes se cortaron de la base y el ápice bajo condiciones de esterilidad y se depositaron en frascos de vidrio tipo Gerber que contenían medio de cultivo MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, los RCV de la tabla 1 y se ajustaron a pH 5.7, previamente se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C y 1.5 kg/cm<sup>2</sup>.

**Tabla 1.** Tratamientos seleccionados para la inducción a callo friable.

Tratamiento	Auxina (mg/L)	Citocinina (mg/L)
Control	0	0
1	ANA	KIN
	0.1	0.1
2	1.0	0.1
3	2, 4 -D	KIN
	0.1	0.1
4	1.0	0.1
5	PIC	KIN
	0.1	0.1
6	1.0	0.1

La friabilidad de los callos se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ friabilidad} = 1 - \left( \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} \right) * 100$$

Con la biomasa de cada tratamiento se obtuvieron sus extractos orgánicos en AcOEt y se analizaron mediante cromatografía en capa fina con la finalidad de conocer su perfil químico y con ello seleccionar al tratamiento que induce callo friable y promueva la biosíntesis de metabolitos secundarios.

El tratamiento resultante con la mejor respuesta se sometió a un segundo abanico hormonal con las concentraciones de ambos RCV: 0.0, 0.1, 1.0 y 2.0 mg/L, con la finalidad

---

de identificar la concentración más apropiada para inducir a callo friable.

### **6.2.2 Crecimiento de células en matraz**

Se transfirieron 5.0 g de biomasa fresca de callos de 20 días de edad en 100 mL de medio de cultivo del tratamiento que indujo a callo friable pero sin agente gelificante en matraces de 500 mL, para ser incubados en agitadora orbital a 110 rpm bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), se realizaron varios subcultivos en periodos de 10 días hasta obtener células homogéneas.

### **6.2.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión**

Se llevó a cabo la cinética de crecimiento tipo lote por triplicado, para ello se sembraron 2 g de biomasa fresca en 50 mL de medio de cultivo previamente esterilizados en matraces de 250 mL y se pusieron en agitación (110 rpm) bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Los pesos secos de la biomasa desarrollada en cada matraz se analizaron por triplicado desde el día cero cada tercer día durante 22 días. Para lo anterior, la suspensión celular de cada matraz se filtró a vacío en un Büchner (papel Whatman No. 1) y la biomasa retenida se lavó con agua destilada para la eliminación de residuos de medio; posteriormente, se determinó gravimétricamente el peso seco de la muestra, colocando la biomasa en estufa a  $55^\circ\text{C}$ . Se utilizaron datos provenientes de tres experimentos independientes y se calculó la media y desviación estándar. La velocidad específica del crecimiento celular ( $\mu$ ) se obtuvo utilizando un método gráfico, donde los valores de biomasa de la fase exponencial de crecimiento se transformaron a  $\ln$  y se graficaron contra el tiempo, la gráfica se ajustó a una línea recta y la pendiente de esta correspondió a la  $\mu$  y a partir de este dato se calculó el tiempo de duplicación ( $t_d$ ).

### **6.2.4 Viabilidad celular**

La viabilidad celular se midió empleando el colorante azul de Evans (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999). Esta metodología se fundamenta en que una célula viable cuenta con su membrana celular íntegra, por lo tanto, al ingresar el colorante Azul de Evans y hacer

---

contacto con la muestra de células de un cultivo, las células viables no deben teñirse de azul.

Para evaluar la viabilidad celular del cultivo de *A. pichinchensis*, una muestra del cultivo se tiñó con la solución de Azul de Evans al 0.25% en una proporción de 1 mL de muestra con 2 mL del colorante. La muestra teñida se observó al microscopio (aumento 10X) y se realizó el conteo de aproximadamente 500 células por triplicado. El porcentaje de viabilidad de cada muestra se determinó tomando como base el número de células que no se tiñeron se azul (células viables) dividido entre el número total de células contadas.

#### **6.2.5 Determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico**

La concentración de azúcares totales se determinó a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración para la cual se prepararon soluciones de 0.1 a 1.0 µg /mL utilizando la sacarosa como estándar con un 99.97% de pureza (SIGMA-ALDRICH).

Se utilizó el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), que consiste en mezclar 2 mL de medio de cultivo libre de células o muestras de la curva patrón con 2 mL de fenol al 5% en tubos digestores de 15\*150 y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de hielo, una vez fríos se les añadieron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y reposaron durante 15 min, posteriormente se analizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm, los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedio con desviaciones estándar menores al 5%.

Se utilizó agua destilada como control negativo aplicando el mismo procedimiento para las muestras de la curva estándar y muestras problema.

---

## 6.3 Estudio fitoquímico

### 6.3.1 Material y equipo

El aislamiento y/o purificación de los metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante técnicas convencionales de cromatografía en columna abierta (CC) utilizando como fase estacionaria sílica gel 60 Merck (70-230 mesh) y como fase móvil se emplearon mezclas de n-hexano: AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH. El contenido químico de las fracciones fue monitoreado por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de sílica gel 60 Merck (F254, 0.2 mm) y lámpara de luz ultravioleta (onda corta), aplicando como revelador sulfato cérico amoniacal [(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O] al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Los reactivos empleados fueron obtenidos con proveedores comerciales y se utilizaron sin previa purificación. Los disolventes grado técnico fueron previamente destilados.

La elucidación estructural de los compuestos aislados, se efectuó mediante el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en 1 y 2 dimensiones, que se obtuvieron en los equipos Bruker Avance 400, Bruker AMX 500 y Varian Unity Inova de 200 MHz utilizando disolventes deuterados (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD y DMSO) y tetrametilsilano (TMS) como frecuencia interna, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están referidos en partes por millón (ppm), la multiplicidad de las señales (*s*, singulete; *d*, doblete; *t*, triplete; *m*, múltiple), el número de hidrógenos (deducidos por integración), y la constante de acoplamiento J (Hz). Para la asignación inequívoca de los sustituyentes en el esqueleto base de algunos compuestos fue necesario utilizar experimentos bidimensionales homonuclear (COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC). El peso molecular de los compuestos puros fue determinado por CG-EM (HP 5970, Agilent) y EM-FAB+ (JOEL M-STATION JMS-700) los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga (m/z).

### 6.3.2 Obtención de extractos orgánicos de callos y células en suspensión

Se secaron en la estufa 572.5 g de biomasa se callos frescos de 1 mes de edad a 55 °C durante 48 horas, y se obtuvieron 18.1 g de biomasa seca que se trituró hasta su pulverización, posteriormente se depositó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL utilizando 100 mL del disolvente AcOEt para ser sonicado por 30 min (X3). El disolvente se separó

---

por filtración y se destiló a presión reducida en un rotaevaporador Büchi R-II, obteniendo 2.58 g de extracto libre de disolvente. La biomasa de callos fue sometida a un segundo proceso de sonicación con metanol obteniendo 1.18 g de extracto.

El extracto de acetato de etilo se fraccionó utilizando una columna de vidrio de 2 cm de diámetro y 30 cm de altura, previamente empacado con gel de sílice (15 g, 70-30 mallas; Merck), se utilizó un sistema de gradientes con *n*-hexano / acetato de etilo (100: 00; 95:05;90:10; 85:15; 80:20; 75: 25 y 00: 100, v / v). Se recogieron fracciones de 10 ml para obtener 99 fracciones y se monitorearon por TLC (placas de gel de sílice ALUGRAM® SIL G / UV254). Las fracciones que mostraron similitud en TLC se agruparon obteniendo 9 grupos: MSR 1 (1-13; 81 mg), MSR 2 (14-16; 56 mg), MSR 3 (17-30; 12.3 mg), MSR 4 (31-42) ; 47 mg), MSR 5 (43-45; 16.5 mg), MSR 6 (46-57; 70.6 mg), MSR 7 (58-68; 62 mg), MSR 8 (69-85; 78.4 mg) y MSR 9 (86–99; 58,9 mg). La fracción menos polar MSR 1 mostró en TLC un compuesto, sin embargo al ser analizada por GC-MS indicó que esta fracción estaba constituida por la mezcla de ácido *n*-hexadecanoico (**29**) y metil éster del ácido hexadecanoico (**30**). De las fracciones MSR 2, MSR 4, MSR 6, MSR 7 y MSR 8 obtenidas de la columna principal se les realizaron cromatografías sucesivas por separado sobre gel de sílice usando *n*-hexano que contiene cantidades crecientes de acetato de etilo (100: 00→ 70: 30). Se aisló acetato de β-eudesmol (**20**) (5,2 mg; 0,6%) de la fracción MSR 2; desmetoxencecalina (**21**) (7,1 mg; 1,3%) de la fracción MSR 4; la mezcla de estigmasterol (**23**) y -sitosterol (**24**) (21.8 mg; 3.9%) se obtuvo de la fracción MSR 6; de la fracción MSR 7 se obtuvo 6 mg de 3-epilupeol (**26**) por cristalización, y el análisis por GC-MS de los licores madre permitió la identificación de β-amirina (**25**) y campesterol (**28**). La purificación cromatográfica en columna de la fracción MSR 8, utilizando un sistema de gradientes con *n*-hexano-EtOAc (100: 00 → 70: 30) dio lugar a cinco grupos de fracciones reunidas de acuerdo a la similitud observada en CCF, el grupo que contiene las fracciones 75–80 eluídas en un sistema *n*-hexano-AcOEt (70:30) mostro una sola mancha y se identificó como (2S,3R)-5-acetil-7,3-dihidroxi-2- (1-isopropenil) -2,3-dihidrobenzofurano (**22**) (12,8 mg, 2,3%). Las fracciones 81–90, eluídas con *n*-hexano-EtOAc (60:40) contenían un sólido amorfo que fue identificado como glucósido de estigmasterol (**27**).

Los compuestos 20, 21, 22 y 26 se identificaron mediante RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, y por

---

comparación con valores informados. Los compuestos **23**, **24** y **27** se caracterizaron por una comparación directa con muestras auténticas disponibles en nuestro laboratorio.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo con 3.050 kg de biomasa fresca de células en suspensión obteniendo 14.5 g de extracto en AcOEt y 6.5 g de extracto metanólico. El trabajo fitoquímico realizado a biomasa seca del cultivo de células en suspensión mostro la presencia de 10 de los 11 compuestos identificados en el cultivo de callos, el único no identificado fue el acetato de  $\beta$ -eudesmol (**20**).

### 6.3.3 Planta silvestre

El material vegetal se separó en hoja, tallo y flor, se dejó secar bajo la sombra a temperatura ambiente durante 14 días.

Cada una de las partes de la planta se sometió a un proceso de extracción vía maceración durante 72 horas a temperatura ambiente utilizando primeramente acetato de etilo y posteriormente metanol.

De hojas secas (1.085 Kg) se obtuvo 20.3 gr de extracto de acetato de etilo y 70.4 g de extracto metanólico.

De tallos secos (1200 Kg) se obtuvo 21. g gr de extracto de acetato de etilo y 82 g de extracto metanolico.

El extracto de AcOEt (20.3 g) obtenido de hojas se adsorbió en 40 g de silica gel y fue sometido a un fraccionamiento, se utilizó una columna de vidrio de 60 cm de largo y 10 cm de diámetro, se empaco con 120 gr de silica gel 60 (F254, mesh). La columna se eluyó con un sistema de gradientes n-Hexano: AcOEt (80: 20  $\rightarrow$  00:100) incrementando en un 20% cada cambio en la polaridad, de este primer fraccionamiento se obtuvieron 35 fracciones (300 mL) las cuales fueron concentradas y se reunieron en base a su similitud observada en CCF en 4 grupos identificados con las claves: MSR1-3A (3.7 g), MSR2-3B (5.23 g) , MSR3-3C (3.92 g) y MSR4-3D (4.52 g). Los tres primeros grupos de fracciones fueron sometidos a procesos de purificación sucesivos logrando purificar e identificar los siguientes compuestos: O-metilencecalinol **14** (18 mg), encecalina **8** (22 mg), 7-hidroxi encecalina **15** (7 mg), 8-hidroxi encecalina **16** (12 mg), eudesmol **10** (5 mg), encecalinol **7** ( 18 mg),

---

espeleona **6**, ( 8 mg), dehidroespeleona **17** ( 6 mg), estigmasterol **18** (32 mg), 3,5-diprenil-4-hidroxiacetofenona **12** (34 mg), y 5-acetil-3 $\beta$ -angeloiloxi-2 $\beta$ -(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano **5** (19mg). Del extracto metanólico se obtuvo nuevamente los compuestos **7** (21 mg), **8** (9 mg), **12** (12 mg) y una mezcla de azúcares no identificados.

El procedimiento de purificación de extractos de tallos fue muy similar al ya mencionado para el trabajo fitoquímico de hojas. Sin embargo el contenido metabólico observa en cromatografía en capa fina solo mostraba presencia significativa en el extracto de acetato de etilo por lo que solo este se sometió a proceso de purificación, identificando los siguientes compuestos; O-metilencecalinol **14** (7 mg), enecalina **8** (9 mg), (+)- $\beta$ -eudesmol **10** (1.2 g), mezcla de esteroides estigmasterol **18** y  $\beta$ -sitosterol **19** (43 mg) y una mezcla de compuestos polihidroxilados (azúcares) no identificados.

De flor, el extracto metanólico fue el que se decidió someter a proceso de purificación ya que mostraba en cromatografía en capa fina compuesto de mayor polaridad no observados en hoja ni tallo. Se tomaron 5 gr de extracto metanólico, se utilizó sílica gel fase estacionaria y un sistema de gradientes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (100:000→000:100) incrementando en un 5% cada cambio en la polaridad, obteniendo 38 fracciones de 100 ml, de las fracciones obtenidas en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se pudo identificar O-metil enecalinol **14** (6 mg), enecalina **8** (7 mg) y enecalinol **7** (9 mg) y de las fracciones obtenidos con metanol 100% se obtuvo un sólido amorfo de color amarillo que se identificó como 3-O- $\beta$ -D-Glucopiranosil-5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona **19** (38 mg).

#### **6.3.4 Purificación y caracterización química de metabolitos secundarios de cultivos *in vitro* y planta silvestre**

El aislamiento y/o purificación de los metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante técnicas convencionales de cromatografía en columna abierta (CC) utilizando como fase estacionaria sílica gel 60 Merck (70-230 mesh) y como fase móvil se emplearon mezclas de n-hexano: AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH. El contenido químico de las fracciones fue monitoreado por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de sílica gel 60 Merck (F<sub>254</sub>, 0.2 mm) y lámpara de luz ultravioleta (onda corta), aplicando como revelador sulfato amoniacal [(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O] al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Los reactivos empleados



---

fueron obtenidos con proveedores comerciales y se utilizaron sin previa purificación. Los disolventes grado técnico fueron previamente destilados.

La elucidación estructural de los compuestos aislados, se efectuó mediante el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en 1 y 2 dimensiones, que se obtuvieron en los equipos Bruker Avance 400, Bruker AMX 500 y Varian Unity Inova de 200 MHz utilizando disolventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  y DMSO) y tetrametilsilano (TMS) como frecuencia interna, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están referidos en partes por millón (ppm), la multiplicidad de las señales (*s*, singulete; *d*, doblete; *t*, triplete; *m*, multiplete), el número de hidrógenos (deducidos por integración), y la constante de acoplamiento *J* (Hz). Para la asignación inequívoca de los sustituyentes en el esqueleto base de algunos compuestos fue necesario utilizar experimentos bidimensionales homonuclear (COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC). El peso molecular de los compuestos puros fue determinado por CG-EM (HP 5970, Agilent) y EM-FAB<sup>+</sup> (JOEL M-STATION JMS-700) los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga (*m/z*).

---

## 6.4 Evaluaciones de las actividades biológicas *in vivo* e *in vitro*

De acuerdo con los antecedentes, *A. pichinchensis* produce metabolitos antifúngicos, cicatrizantes, gastroprotectivos y antiinflamatorios, por lo tanto, este estudio se enfocará a la identificación de los compuestos relacionados con el efecto antiinflamatorio y cicatrizante provenientes de los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión y de la planta silvestre.

### 6.4.1 Actividad antiinflamatoria *in vivo*

Los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio) y las normas internacionales de ética para el cuidado y uso de animales de experimentación.

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina (UAEM) con peso corporal entre 20 a 30 g, que se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y ciclos de iluminación-oscuridad de 12 h, los animales fueron nutridos con alimento balanceado especial *ad libitum* y agua purificada.

La actividad antiinflamatoria de los extractos y compuestos puros se realizó mediante la técnica descrita por Young & Young (1989) y modificada por Payá et al. (1993). Al grupo control negativo se le administró vía tópica acetona (vehículo) e indometacina como fármaco antiinflamatorio para el grupo control positivo.

Para inducir la inflamación, los animales fueron previamente anestesiados con pentobarbital sódico (3.5 mg/ kg de ratón vía intraperitoneal), posteriormente se administró como agente irritante 13-acetato-12-tetradecanoilforbol (TPA) a una dosis de 2.5  $\mu\text{g}$ / oreja aplicado en el pabellón derecho auditivo del ratón, el pabellón izquierdo se utilizó como control; después de 10 min de exposición del agente irritante se aplicó la muestra a prueba a una dosis de 1 mg/oreja.

Después de 4 h de la aplicación de las muestras, los ratones se sacrificaron por

---

dislocación cervical y se cortó una porción circular de 5 mm de diámetro de ambas orejas y se pesaron para determinar por diferencia el edema como delta ( $\Delta$ = variación) de peso ( $Pt - Pnt$ ).

Los resultados se expresaron como edema producido y porcentaje de inhibición frente al grupo control utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(Pt - Pnt)_{\text{control}} - (Pt - Pnt)_{\text{tratamiento}}}{(Pt - Pnt)_{\text{control}}} (100)$$

Dónde:

Pt: peso de la sección de oreja tratada

Pnt: peso de la sección de la oreja no tratada

#### **6.4.2 Actividad antiinflamatoria *in vitro***

##### **6.4.2.1 Cultivo de macrófagos en frascos de 75 cm<sup>2</sup>**

Los macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 (ATCC<sup>®</sup> Tib-71<sup>™</sup>) se cultivaron en medio ADVANCED DMEM/F12 (GIBCO) + 1% de GLUTAMAX<sup>™</sup> suplementado con 3.5% de SFB (inactivado por calentamiento) sin antibiótico en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, posteriormente se incubaron en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 70-90%. Se retiró el medio de cultivo y las células fueron desprendidas con 1.5 mL de tripsina (GIBCO) y se incubaron en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C por 10 min. Posteriormente se realizó el desprendimiento de las células mecánicamente aplicando suavemente golpes laterales al frasco e inmediatamente se inactivó la tripsina mediante la adición de 10 mL de mismo medio de cultivo y la suspensión celular se colocó en un tubo falcon de 15 mL para centrifugarla a 1250 rpm durante 5 min. Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo y se realizó el conteo en cámara de Neubauer para subcultivar en placas de cultivo de 96 pozos.

---

#### **6.4.2.2 Viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7**

Las células RAW 264.7 se sembraron en una placa de 96 pozos (10 000 células/pozo) con 0.1 mL de medio de cultivo ADVANCED DMEM/F12 + 1% de GLUTAMAX™ con 3.5% de SFB y se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (Yang, et al. 2012). Después del tiempo de incubación se adicionaron los tratamientos en estudio a diferentes concentraciones, el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5% v/v y etopósido a 40 y 20 µg mL<sup>-1</sup> como control positivo, finalmente se incubaron durante 20 horas.

Posteriormente se agregaron 20 µL de MTS (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation assay de Promega) a cada uno de los pozos y se incubaron por 2 h. Finalmente, se midió la densidad óptica a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

#### **6.4.2.3 Tratamiento de macrófagos con compuestos y LPS**

Se sembraron macrófagos RAW 264.7 (30 000 células/pozo) en una placa de cultivo celular de 96 pozos, con 0.2 mL de medio de cultivo ADVANCED DMEM/F12 + 1% de GLUTAMAX™ con 3.5% de SFB y se incubaron durante 24 h en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se aplicaron los compuestos puros o extractos (tratamientos) a 150, 75, 37.5, 18.8 y 9.4 µM, indometacina (control positivo) a 84 µM y dimetilsulfoxido (DMSO-vehículo) a 0.5% y se incubaron por 2 h.

Posteriormente se adicionó el LPS (estimulo) a una concentración final de 2 µg mL<sup>-1</sup> y se incubaron durante 24 horas. Finalmente se retiró el sobrenadante colocando 50 µL de cada pozo en una placa de ELISA para la reacción de GRIESS (NO) y 110 µL se depositaron en tubos eppendorf para ser almacenados a -20°C para realizar el posterior estudio de citocinas.

#### **6.4.2.4 Determinación de óxido nítrico (NO) en RAW 264.7**

Se utilizó nitrito como indicador de la producción de NO en el medio de cultivo, el cual se midió mediante la reacción de Griess de acuerdo al protocolo descrito por Yang *et al.*, 2012. Para ello, en una placa de ELISA de 96 pozos se depositaron 50 µL de cada sobrenadante del cultivo celular y se mezclaron con 100 µL del reactivo de Griess (50 µL de sulfanilamida al 1% y 50 µL de N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato 0.1% en ácido

---

fosfórico al 2.5%) durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la densidad óptica a 540 nm con un lector de placas de ELISA y la concentración de nitrito presente en las muestras se calculó por comparación con la  $DO_{540}$  de una curva estándar de  $NaNO_2$  preparada en medio de cultivo fresco.

#### **6.4.2.5 Determinación de la concentración de IL-6 en RAW 264.7**

La medición cuantitativa de IL-6 de murino presente en los sobrenadantes (medio de cultivo) se realizó utilizando el kit: Murine IL-6 Mini ABTS ELISA Development Kit (No. 900-M50) de PETROTECH siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.4.2.6 Cultivo de células RAW-Blue**

Los macrófagos murinos de la línea celular RAW-Blue (Raw-Blue InvivoGen) fueron cultivados en medio DMEM/F12 (GIBCO) suplementado con 10% de SFB (inactivado por calentamiento) (GIBCO) con 1% de MycoZap (Lonza)  $\mu\text{g/mL}$  de Zeocina, en frascos de cultivo celular de 75  $\text{cm}^2$  que se incubaron en atmósfera húmeda de  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$  cuando se alcanzó un 70-80% de confluencia se retiró el medio de cultivo y las células fueron desprendidas del frasco con 1.5 mL de tripsina (GIBCO, incubado durante 10 min en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, el desprendimiento de la película celular se completó realizando suaves golpes mecánicos en las partes laterales del frasco de cultivo e inmediatamente se inactivó la tripsina con 10 mL de medio de cultivo y la suspensión celular se colocó en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó a 1250 rpm durante 5 min. Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo y se realizó el conteo en cámara de Neubauer para subcultivar en frascos de 75  $\text{cm}^2$  o placas de cultivo de 96 pozos.

#### **6.4.2.7 Tratamiento de los macrófagos RAW-Blue**

Las células RAW-Blue se sembraron en una placa de cultivo celular de 96 pozos (30 000 células por pozo) con 0.1 mL de medio DMEM/F12 con 10% de SFB con 1% de antibiótico (MycoZap) y 200  $\mu\text{g/mL}$  de Zeocina y se incubaron durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, posteriormente los macrófagos se incubaron durante 2 h con los compuestos en estudio a diferentes concentraciones (CI50 o concentración inhibitoria que no afecta la viabilidad celular en el modelo NO) o dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5% v/v (vehículo) o indometacina a 84  $\mu\text{M}$  o ácido ursólico a 17.5  $\mu\text{M}$  (control positivo) y se dejaron

---

pozos con células control (células y medio de cultivo). A continuación, los macrófagos se incubaron durante 24 h con LPS (estímulo para la activación de NF- $\kappa$ B) a una concentración final de  $\mu$ g/mL en presencia (tratamientos) o ausencia (control 100% de activación de NF- $\kappa$ B) de los compuestos a evaluar, vehículo, indometacina, ácido ursólico (control positivo) y sin LPS (células control). Finalmente, se colectaron los sobrenadantes (libres de células) y se utilizaron en fresco para determinar la activación de NF- $\kappa$ B mediante la reacción con QUANTI-Blue<sup>MT</sup>.

#### **6.4.2.8 Determinación de la activación de NF- $\kappa$ B en RAW-Blue**

El ensayo colorimétrico de QUANTI-Blue<sup>MT</sup> permite detectar la activación de NF- $\kappa$ B/AP-1 después de la activación de TLRs (con la excepción del TLR5), NOD1/2 y Dectin-1. La fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) es detectada y medida en el ensayo QUANTI-Blue como indicador de la activación de NF- $\kappa$ B. Brevemente, en una placa ELISA de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ L de QUANTI-Blue (atemperado a 37°C) por pozo y se agregaron 20  $\mu$ L del sobrenadante del cultivo celular y se dejó incubando durante 30 min a 37°C. Finalmente se midió la densidad óptica a 630 nm ( $DO_{630}$ ) con un lector de placas de ELISA, y la activación de NF- $\kappa$ B se determinó por comparación entre la  $DO_{630}$  del control de 100% activación de NF- $\kappa$ B (LPS) frente a las  $DO$  de las muestras y el control positivo (ácido ursólico).

#### **6.4.3 Actividad cicatrizante *in vivo***

Se emplearon ratones CD1 machos adultos jóvenes, de 2 a 3 meses de edad con peso de 20 a 30 g al comienzo de los tratamientos. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas a temperatura constante (23-25 °C), humedad controlada (50%) y alimentación con dieta regular (Martínez, 2011).

Es importante hacer notar que el protocolo experimental fue revisado y aprobado por la Comisión para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la UAEM.

Se formó un grupo de 5 ratones a los cuales se les realizó una cinética de cicatrización control para tener un estándar de comparación de cuál es el comportamiento normal y el tiempo del cierre normal de una herida inducida en los modelos experimentales. Para inducir la herida, primero se anestesió a los ratones con pentobarbital sódico una dosis

---

de 30 mg/Kg de peso, después se cortó el pelo de los ratones con ayuda de tijeras y rasuradora. Al final, se procedió a realizar la herida utilizando un punch (navaja circular) de 2 mm de diámetro. En este grupo, a la herida se le aplicó 10  $\mu$ L de agua destilada, y después se llevó un seguimiento fotográfico utilizando un microscopio estereoscópico (Semi DV4) con un aumento de 8X y una cámara marca Canon PowerShot G9 de 12.1 Megapíxeles con un zoom de 6x. La primera imagen se capturó al realizar la herida, la segunda a las 24 horas y las siguientes fotos cada tercer día hasta que se observó la cicatrización completa. Por cada sesión de fotos y para cada ratón se tomaron 5 fotos, teniendo un mínimo de 50 fotos por cada cinética de cicatrización.

Para determinar la actividad cicatrizante de las muestras, la herida se realizó de la misma manera que para el grupo control, después de inducir la herida se aplicaron en forma tópica 10  $\mu$ L de muestra a una concentración de 10 mg/mL. La cinética de cicatrización, sesión de fotos y medición del área de cada herida fue determinada del mismo modo que se hizo con el grupo control.

La evaluación cuantitativa de la actividad cicatrizante se determinó con un analizador de imágenes (ImageJ) y el análisis estadístico se realizará con el programa GraphPad Prism 5. Se considerará la cinética promedio obtenida por cada grupo experimental y el promedio inicial del área será normalizado en todos los grupos, a cada una de las curvas se ajustará una cinética de decaimiento exponencial de primer grado para comparar las cinéticas obtenidas con los ratones sanos control contra las muestras evaluadas.

---

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



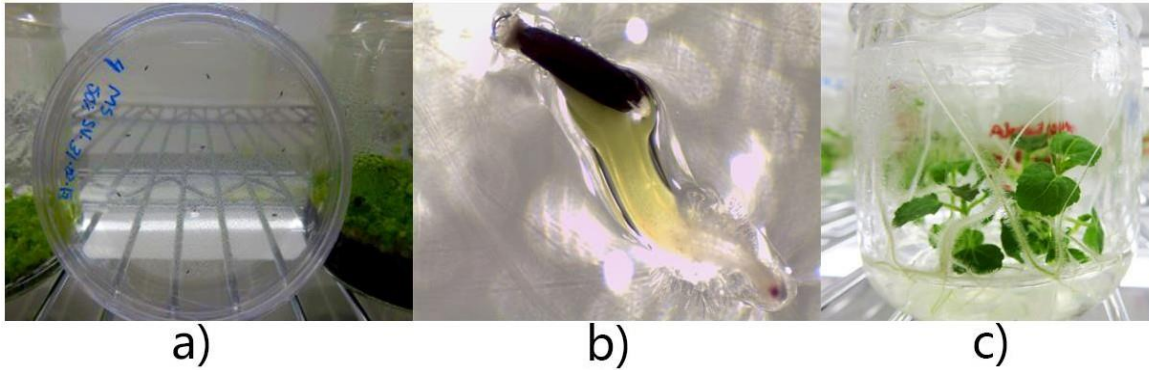
---

Para el establecimiento del cultivo de células en suspensión se colectaron semillas de *A. pichinchensis* en su hábitat natural e inmediatamente se desinfestaron y se sembraron en medio de cultivo MS en cajas de Petri. Las plántulas cultivadas bajo condiciones *in vitro* se utilizaron para la inducción a callo, siendo las hojas el explante seleccionado. Se emplearon ácido naftalenacético (ANA), (2, 4-D) y picloram como auxinas y KIN como citocinina. Se obtuvieron los extractos orgánicos de todos los tratamientos para conocer su perfil metabólico mediante cromatografía en capa fina y se seleccionó al tratamiento que indujo el callo más friable y mayor productor de metabolitos secundarios para establecer el cultivo de células en suspensión. Se subcultivó biomasa de callos y células con suspensión y se obtuvieron sus extractos orgánicos y se realizó su estudio fitoquímico dando lugar a la purificación y caracterización química de 12 metabolitos secundarios mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, paralelamente se llevó a cabo el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos de la planta silvestre que fue colectada en el mismo momento que se colectaron las semillas; posteriormente tanto extractos orgánicos de planta silvestre y cultivos *in vitro* así como compuestos puros se probaron en modelos biológicos *in vivo* e *in vitro*, finalmente se cuantificaron los metabolitos secundarios biológicamente activos en los cultivos *in vitro* y planta silvestre.

## **7.1 Estudio biotecnológico**

### **7.1.1 Germinación de semillas de *A. pichinchensis* bajo condiciones *in vitro***

Las semillas colectadas en su hábitat natural fueron sometidas a desinfestación mediante lavados con detergente comercial Axion®, hipoclorito comercial al 5% y agua destilada estéril, posteriormente se sembraron bajo condiciones de esterilidad en cajas de Petri que contenían medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 3% (Figura 6a) y se incubaron bajo condiciones controladas de luz y temperatura en un cuarto de cultivo. Después de 72 h se logró la germinación del 98% de las semillas sin contaminación (Figura 6b) y al ser transferidas a frascos de vidrio tipo Gerber con medio de cultivo crecieron al cabo de un mes (Figura 6c), con la finalidad de incrementar el material vegetal se micropropagaron las plántulas bajo las mismas condiciones controladas de luz y temperatura.



**Figura 6.** Semillas de *A. pichinchensis* germinadas bajo condiciones *in vitro*.

### **7.1.2 Inducción a callo friable de *A. pichinchensis***

El medio de cultivo MS se suplementó con los RVG: ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4-amino-3-5,6-tricloropicolinato potásico (picloram) como auxinas y N<sup>6</sup>-furfurilaminopurina (KIN o kinetina) como citocinina. Se utilizaron hojas de plántulas de un mes de edad como fuente de explante para la inducción a callo, para ello bajo condiciones de esterilidad se cortaron de la base y el ápice y se depositaron en los medios de cultivo de los diferentes tratamientos y se incubaron bajo las mismas condiciones controladas de luz y temperatura.

Todos los tratamientos indujeron a callo, los que contenían la misma auxina mostraron similitud respecto a la morfología del callo, los explantes mantuvieron su integridad y apariencia verde en los primeros dos días, posteriormente comenzaron a cambiar debido al efecto de los RCV sobre ellos, los explantes se fueron aclarando en color y engrosando de los extremos, principalmente en la región del corte, y a partir del quinto día se comenzó a observar la formación de callo.

Los explantes del tratamiento control (sin RCV) no produjeron ninguna respuesta, las hojas necrosaron y se oxidaron completamente al octavo día.

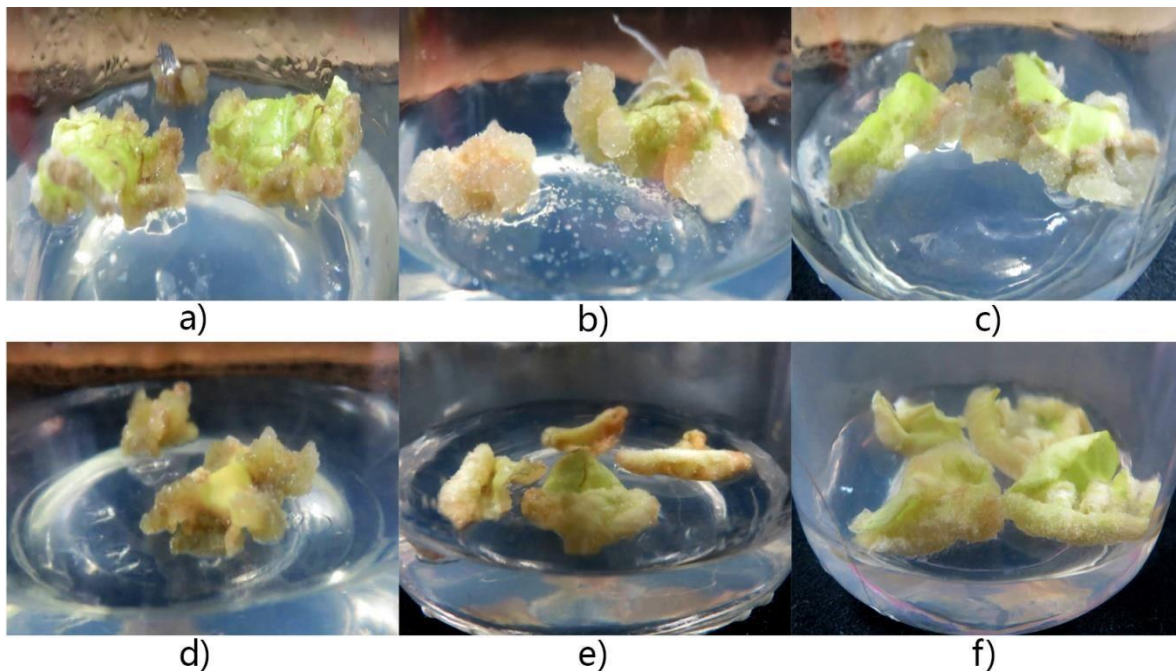
Los explantes de los tratamientos 1 y 2 (ANA y KIN) promovieron la inducción a callo con apariencia friable y beige desde el tercer día. El tratamiento 2 presentó mayor abundancia de callo con respecto al tratamiento 1 (Figura 7a y b). Tomando en cuenta que la única diferencia entre ambos tratamientos fue la concentración de la auxina, podemos decir

---

que a mayor concentración de auxina se induce una mayor tasa de división celular y como consecuencia incrementa la friabilidad en los explantes.

Los tratamientos 3 y 4 (2,4-D y KIN) promueven la formación de callo a partir del quinto día, sin embargo, la apariencia de éstos fue oxidada y menos friable que la observada en los tratamientos de la auxina ANA (Figura 7c y d). Este tratamiento requiere antioxidantes que mejoren la calidad del callo.

Los explantes de los tratamientos 5 y 6 presentaron apariencia compacta que rápidamente se oxidaron y se deshidrataron (Figura 7e y f), este resultado sugiere que la auxina picloram no es eficiente para la inducción a callo en explantes de hojas de *A. pichinchensis*.

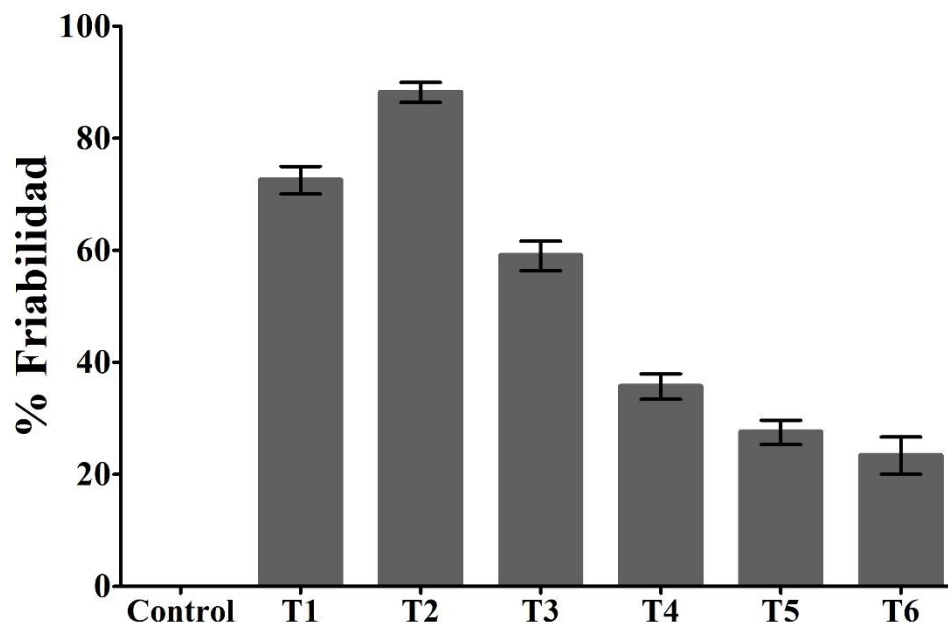


**Figura 7.** Efecto de los RCV sobre la inducción a callo de *A. pichinchensis* después de 20 días.

El análisis gravimétrico (a partir de biomasa de 20 días de edad de cada tratamiento) demostró que los callos más friables son promovidos por la auxina ANA en comparación con las demás auxinas, mientras que la auxina picloram genera los callos más compactos. El tratamiento 2 produjo mayor friabilidad alcanzando un  $95.35 \pm 0.51\%$ , por lo tanto, los RCV tienen un efecto determinante en la respuesta morfogénica de callos de *A.*

---

*pichinchensis*.



**Figura 8.** Efecto de los RCV sobre la friabilidad de los callos de *A. pichinchensis*.

Este resultado es semejante al reportado en la especie *A. adenophora*, en donde se demostró que los explantes de hoja fueron más eficientes para la inducción a callo utilizando 2,4-D y 6-benzilaminopurina (BAP) como RCV alcanzando un 87.2% de respuesta morfogénica (Shen et al., 2007); en otro estudio de la especie *Ageratum houstonianum* se logró la inducción a callo a partir de explantes de hoja mediante la adición de KIN y ácido indolacético (IAA) aunque su apariencia fue compacta (Mohammadi, 2017). Por lo tanto, explantes de hoja de especies de la misma familia responden de manera diferente a los mismos reguladores de crecimiento vegetal, aunque las hojas es el explante que promueve la formación de callos.

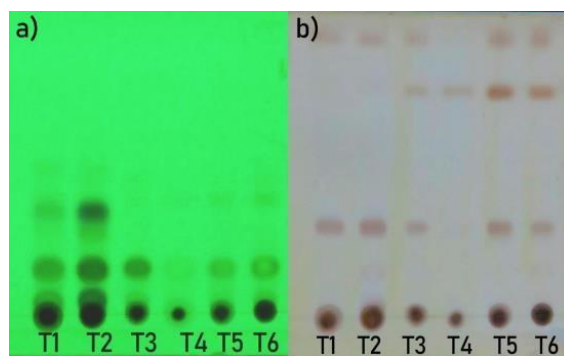
### **7.1.3 Comparación del perfil metabólico de los callos de los diferentes tratamientos de *A. pichinchensis***

La biomasa de cada tratamiento se deshidrató en una estufa a 55°C y se obtuvieron sus extractos orgánicos utilizando los solventes AcOEt y MeOH, posteriormente se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) con la finalidad de conocer cualitativamente

---

el perfil metabólico de cada tratamiento.

La cromatoplaca de la figura 9 muestra el contenido metabólico de los extractos en AcOEt de todos los tratamientos. Se observa que los callos de los diferentes tratamientos presentan similitud respecto a la producción de metabolitos; algunos compuestos absorben la luz ultravioleta (Figura 9a), mientras que otros sólo revelan con sulfato cérico amoniacal (Figura 5b). Los compuestos presentes en los extractos son de mediana y alta polaridad (sistema de elusión: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH, 95: 05). Cabe señalar que cualitativamente el extracto del tratamiento 2 posee mayor contenido metabólico en comparación con los demás tratamientos. Los extractos en MeOH no mostraron compuestos, por lo que la cromatoplaca no se muestra.

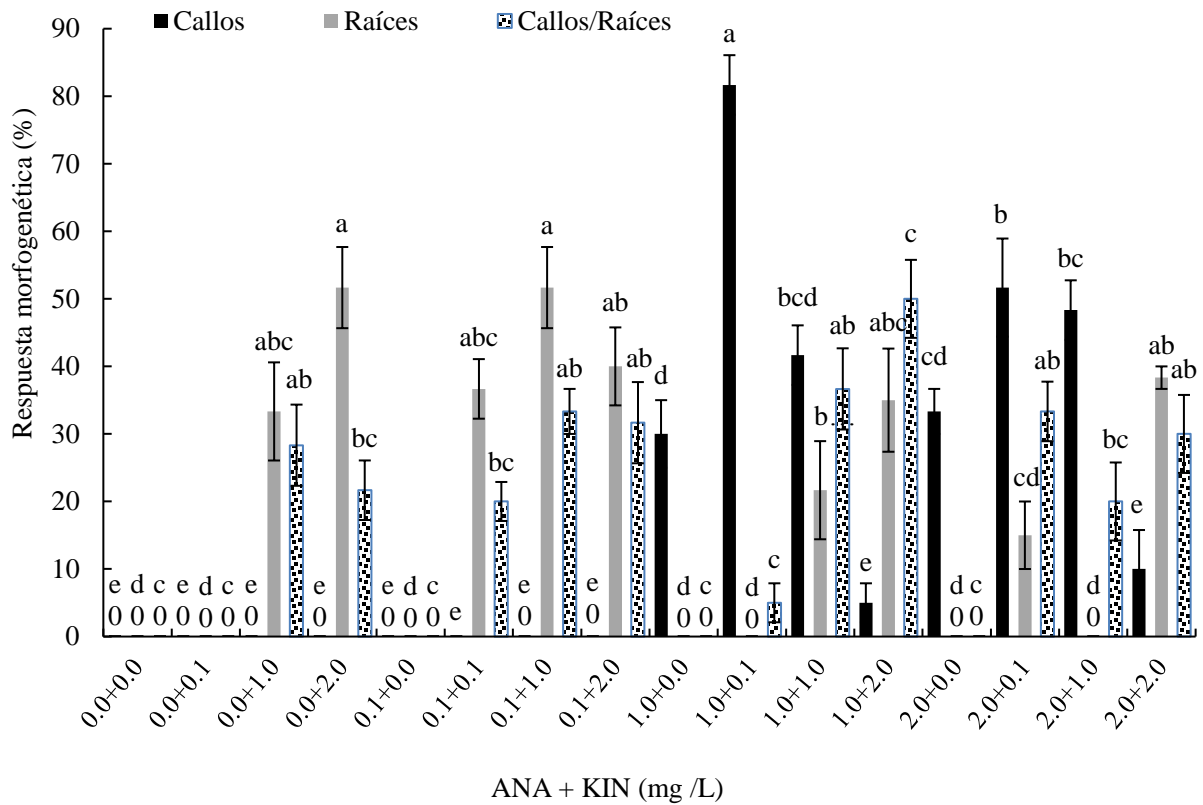


**Figura 9.** Cromatoplaca del perfil metabólico de los tratamientos 1-6. a) Revelada en luz UV, b) revelada con sulfato cérico amoniacal.

Por lo tanto, todos los callos producen metabolitos secundarios, sin embargo, debido al objetivo general del proyecto, se utilizaron ANA y KIN como RCV para la inducción a callo en explantes de hoja de *A. pichinchensis*.

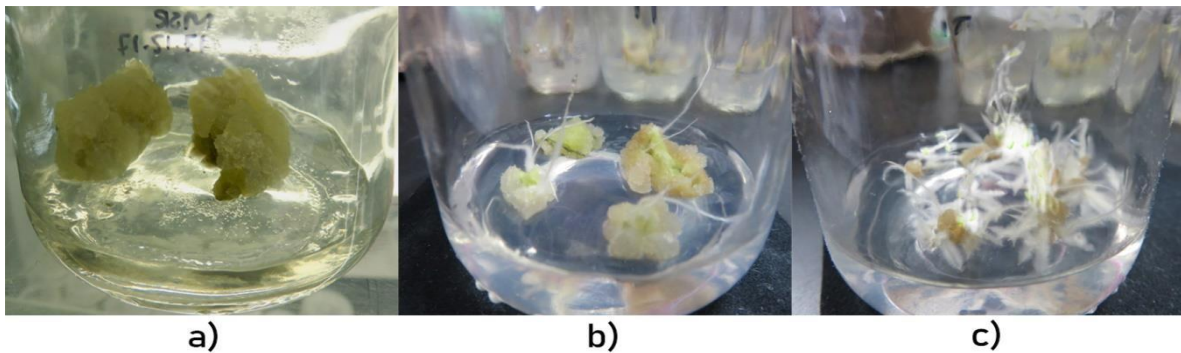
#### **7.1.4 Selección de la concentración apropiada para la inducción a callo friable de la combinación de los RCV ANA y KIN**

Con base en los resultados anteriores se seleccionó la combinación de ANA y KIN para la inducción a callo friable mediante un segundo abanico hormonal con la finalidad de identificar la concentración que promueve mayor proporción de callo friable. Se utilizaron las concentraciones: 0.00, 0.10, 1.0 y 2.0 mg/L para ambos reguladores de crecimiento vegetal (ANA y KIN).



**Figura 10.** ANOVA de las respuestas morfogénicas de los explantes de hoja de *A. pichinchensis* a las combinaciones de ANA y KIN.

Los callos de cada tratamiento fueron monitoreados con fotografías diariamente durante 20 días, al final del experimento se observaron tres respuestas morfogénicas: callos, raíces y callos rizogénicos (Figura 11).



**Figura 11.** Respuestas morfogénicas de los RCV ANA y KIN.

Los explantes del tratamiento control (desprovisto de RCV), 1 y 4 (contienen

---

---

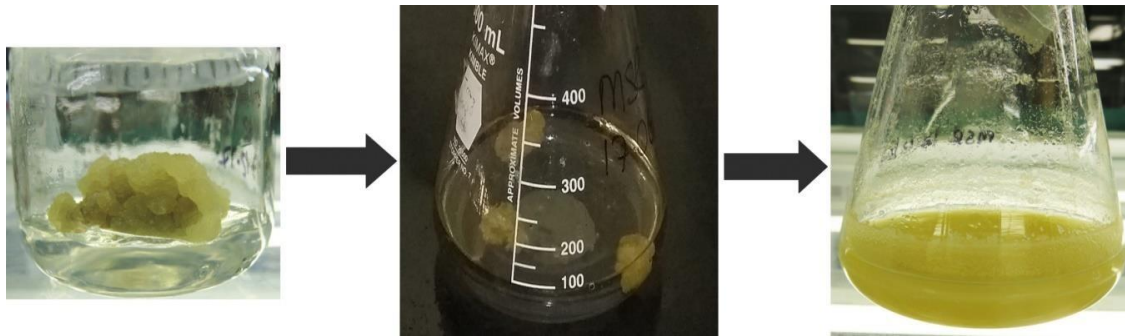
uno de los RCV a la concentración de 0.1 mg/L) no presentaron respuesta morfogénica, solo oxidaron y murieron. Los tratamientos que contienen 1.0 y 2.0 mg/L de auxina sin citocinina promueven la inducción a callo en un 30 33.3% (tratamientos 2 y 3), esto sugiere que en explantes de *A. pichinchensis* el incremento de auxina tiene un efecto directamente proporcional sobre la respuesta morfogénica.

La combinación ANA y KIN a la concentración más baja (tratamiento 5) promueve la formación de raíces y callos rizogénicos (36.7 y 20%, respectivamente); por otro lado, la concentración intermedia (tratamiento 10) y alta (tratamiento 15) promueven las tres respuestas morfogénicas siendo los callos la respuesta más predominante de la concentración intermedia (41.7%), y raíces (38.3%) para la concentración alta.

Cabe señalar que los tratamientos 9, 12 y 13 que contienen mayor proporción de auxina con respecto a la citocinina, promueven principalmente la inducción a callos, siendo el tratamiento 6 el que aporta una mejor respuesta (81.7%), seguida del tratamiento 7 (51.7%), 11 (48.3%) y 10 (41.7%), por lo tanto, el tratamiento más sobresaliente para la inducción a callo contiene 1.0 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de KIN, debido a lo anterior, este tratamiento fue el seleccionado para llevar a cabo el establecimiento del cultivo de células en suspensión.

#### **7.1.5 Crecimiento de células en matraz**

Se adicionaron 5 g de biomasa de callos de 20 días de edad en medio de cultivo MS suplementado con los RCV del tratamiento 2 sin fitagel en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo, posteriormente se incubaron en agitadora orbital a 110 rpm bajo las mismas condiciones de luz y temperatura controladas. Los callos mostraron rápida disgregabilidad a los 5 días, por lo que se realizaron subcultivos sucesivos hasta obtener suspensiones finas. Las células presentaron apariencia amarilla como se observa en la figura 12 y requirieron subcultivos cada 15 días.



**Figura 12.** Disgregación de callos en medio líquido.

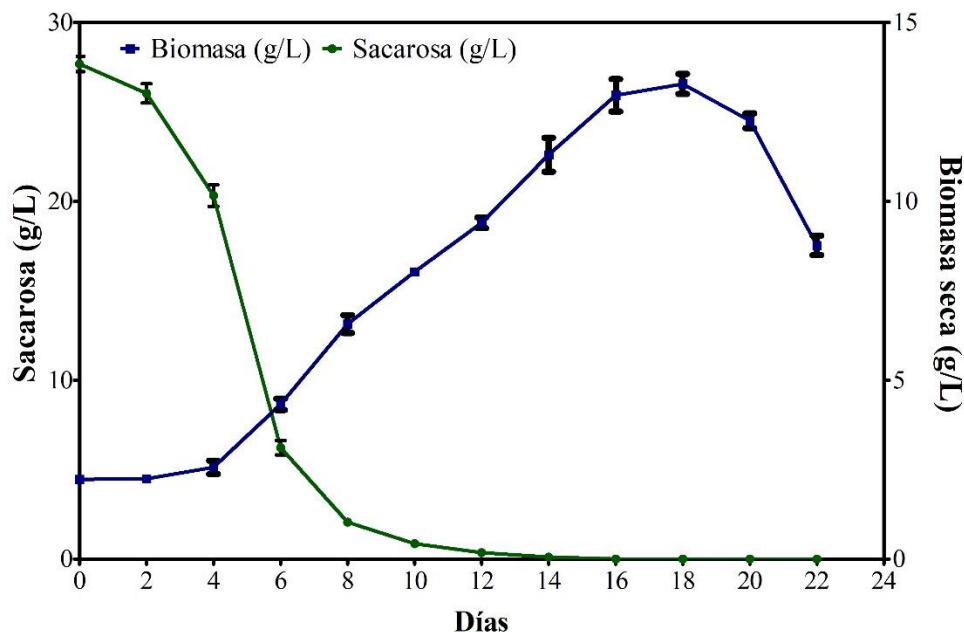
Las células fueron subcultivadas cada 15 días y se observó reproducibilidad de su apariencia durante 2 meses, por lo que se procedió a realizar la cinética de crecimiento con la finalidad de determinar sus parámetros cinéticos y contenido metabólico durante la cinética de crecimiento.

#### **7.1.6 Determinación de parámetros cinéticos del cultivo de células en suspensión**

La cinética de crecimiento tipo lote por triplicado en tres experimentos independientes en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo, utilizando 2 g de biomasa de un cultivo de células en suspensión de 10 días de edad. El crecimiento celular (determinado por peso seco), viabilidad celular, consumo de sacarosa y producción de metabolitos secundarios (monitoreado por cromatografía en capa fina) se monitoreó paralelamente durante 22 días a partir del día cero en intervalos de 48 horas.

La curva de la cinética de crecimiento mostró un comportamiento sigmoideo (Figura 13) en el que se distinguen las fases de crecimiento (determinado con la biomasa seca), de manera paralela se observa el consumo de la fuente de carbono (sacarosa) en correlación al incremento de producción de biomasa.

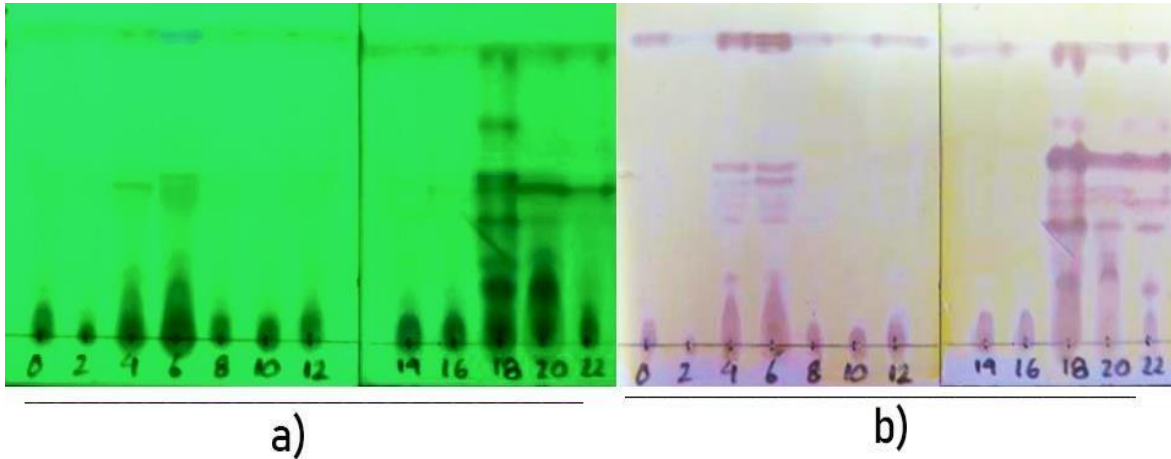




**Figura 13.** Cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *A.pichinchensis*.

Se observa una fase corta de adaptación (del cero al cuarto día) lo que sugiere que el crecimiento es relativamente rápido en comparación con especies que presentan hasta 20 días en esta fase (Santana et al., 2009); posteriormente inició la fase de crecimiento exponencial (días 4 al 16), donde incrementó la biomasa y se consumió la sacarosa hasta su agotamiento (día 14) alcanzado la biomasa máxima de  $13.28 \pm 0.4855$  g/L, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de  $0.2303$  días<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) fue de 3.01 días.

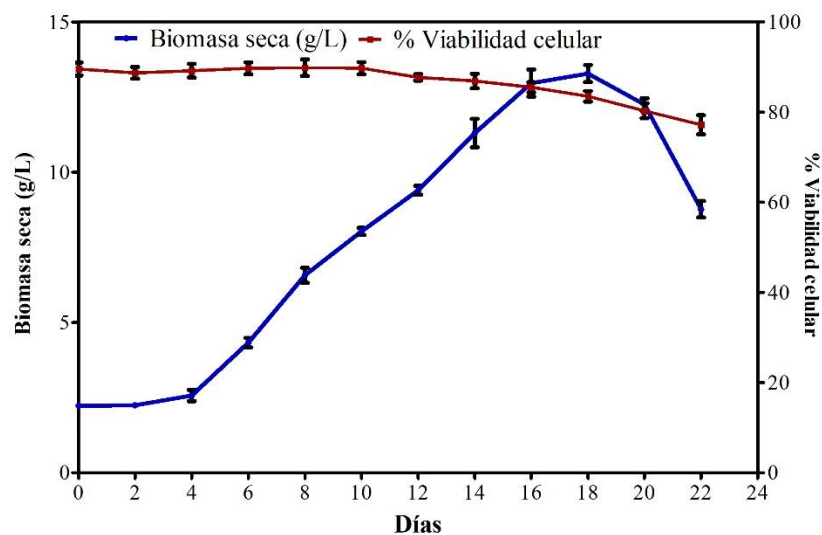
Al inicio de la fase exponencial se observa la producción de metabolitos secundarios asociados al crecimiento (días 4 y 6) de carácter polar (Figura 14), mientras que en la fase estacionaria se presenta la mayor acumulación de compuestos (días 18 y 20) de carácter polar que absorben la luz ultravioleta y también revelan compuestos que no absorben la luz ultravioleta; este resultado se asemeja al obtenido en cultivos de células en suspensión de la especie *A. millefolium*, donde reportaron la producción de aceites esenciales y el compuesto desmetoxiencecalina al término de la fase exponencial (Figueiredo et al., 1995) aunque los rendimientos alcanzados fueron por debajo de lo que biosintetiza la planta silvestre.



**Figura 14.** Perfil metabólico de la cinética de crecimiento de *A. pichinchensis*, (Cromatoplasmas eluidas en MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 95:05, a) reveladas en luz UV, b) reveladas con sulfato cérico amoniacal).

Por lo tanto, los cultivos de células en suspensión de *A. pichinchensis* producen compuestos en la fase estacionaria, posiblemente como respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo.

Con respecto a la viabilidad celular, inicialmente fue de  $89.57 \pm 2.50\%$  y se mantuvo hasta el día 10 (fase exponencial) y posteriormente decreció gradualmente a  $77.19 \pm 3.65\%$  en la fase de muerte (Figura 15).

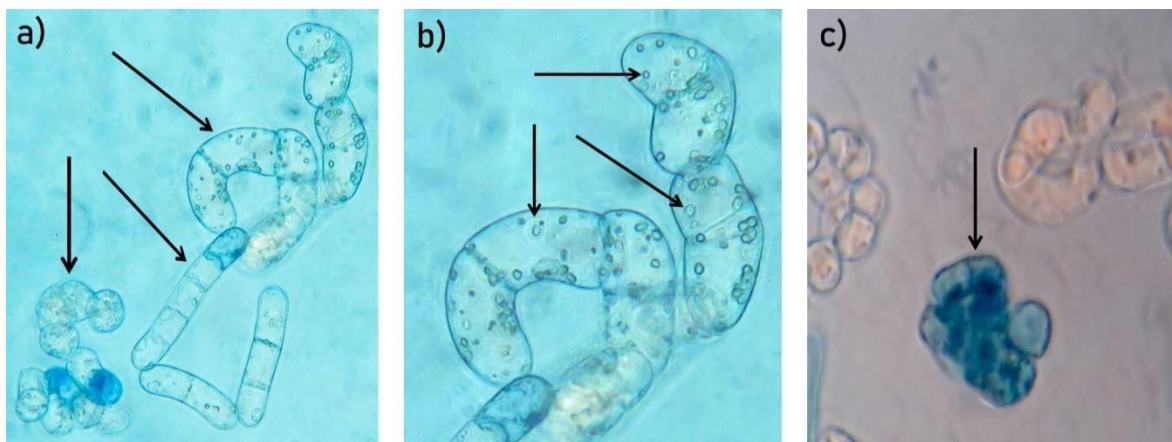


**Figura 15.** Viabilidad celular durante el crecimiento del cultivo de células en suspensión de *A. pichinchensis*.

---

Bajo el microscopio se observó la integridad de la membrana en las fases lag y exponencial que no permiten la entrada del colorante Azul de Evans. Se distinguen células de morfología redondeada ya alargadas (Figura 16a), cuya pared celular es muy delgada y presenta inclusiones citoplasmáticas, principalmente cloroplastos, en la etapa de crecimiento exponencial se visualizaron células en división celular, mostrando el tabique de la región ecuatorial de éstas, mientras que en otras se observó evidencia de la formación del huso mitótico (figura 16b). Las células alargadas de forma tubular probablemente se derivan del mesófilo de las hojas y se encuentran diferenciadas, las células redondas, isodiamétricas con menor grado de proliferación, lo que se evidencia en la escasez de cloroplastos en su interior (González et al., 2010), con inclusiones protoplasmáticas, brillantes en el microscopio.

En la etapa de muerte, las células presentaron necrosis y pérdida de la integridad de la membrana celular, así como falta de turgencia, por lo que se muestran más pequeñas y deformes (Figura 16c), este comportamiento es propio de esta fase de la cinética, evidenciándose la disminución de peso seco del cultivo, en esta etapa las células forman especies reactivas del oxígeno (ROS), como consecuencia del metabolismo celular que provocan estrés oxidativo y se activan las enzimas oxidasas (Sánchez, 2001; Trejo-Tapia et al., 2007).



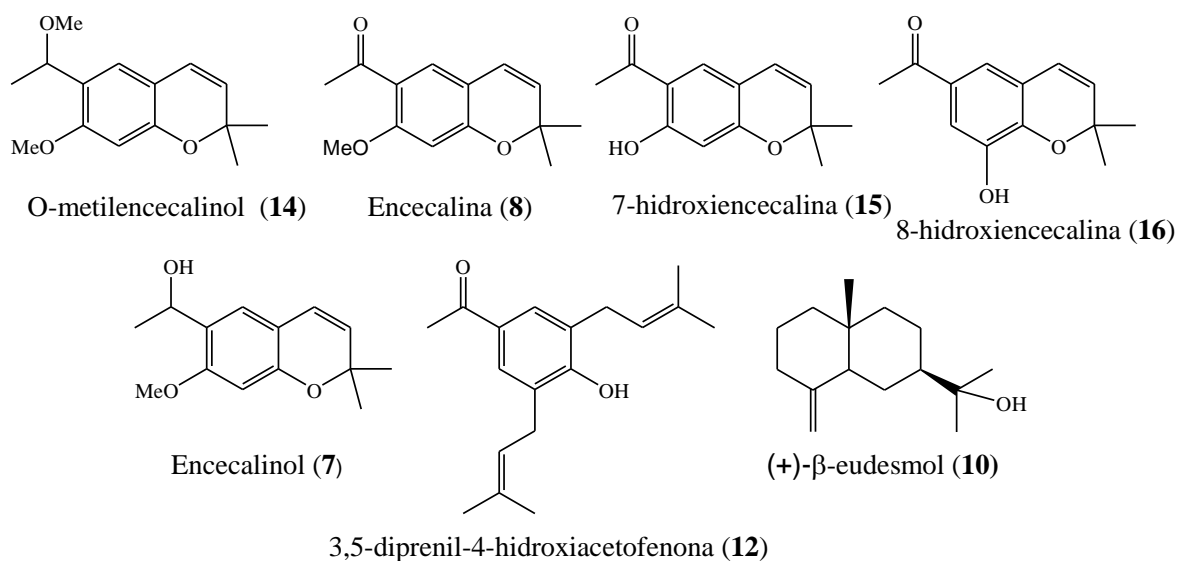
**Figura 16.** Células teñidas con Azul de Evans (40X).

Se observó que las células en suspensión forman agregados pequeños (entre 15 a 30 células), lo cual es común en las células en suspensión debido a que al dividirse no se separan adecuadamente o se asocian posteriormente (Arias et al., 2009; Mustafa et al., 2011), aunque también fue posible visualizar células individuales.

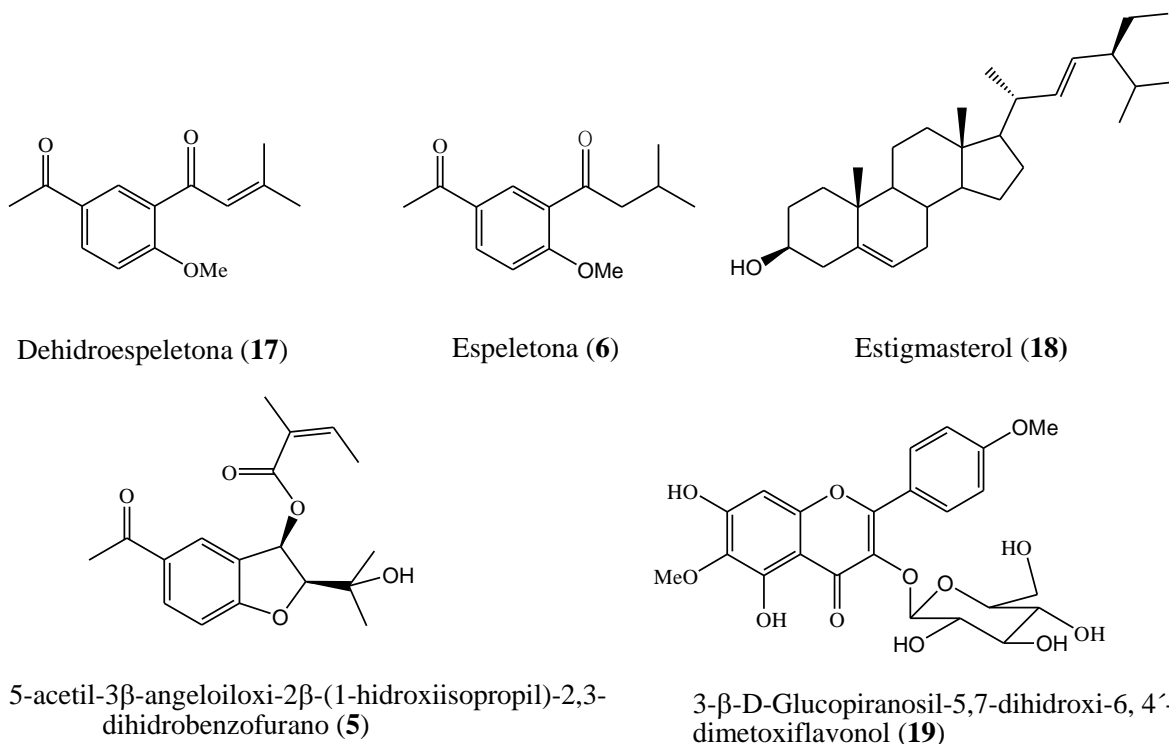
## 7.2 Estudio fitoquímico de las partes aéreas de *A. pichinchensis*

El material vegetal seco (hojas, tallo y flor) fue extraído primeramente con acetato de etilo y posteriormente con metanol. Cada uno de los extractos fue sometido a procesos de purificación utilizando cromatografía en columna, sílica gel de fase normal como material adsorbente y sistemas de gradientes constituidos principalmente por *n*-hexano, acetato de etilo, acetona y metanol.

Mediante cromatografías sucesivas fue posible obtener fracciones que al ser monitoreadas por cromatografía en capa fina revelaban la presencia de un solo compuesto, cada una de estas fracciones se analizó por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  principalmente, para algunas fue posible obtener experimentos en 2D homonuclear (COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC). Por Cromatografía de Gases-Acoplada a un Espectrómetro de Masas se estableció la pureza y el peso molecular de los compuestos identificados. Los compuestos aislados e identificados se muestran en la Figura 17.

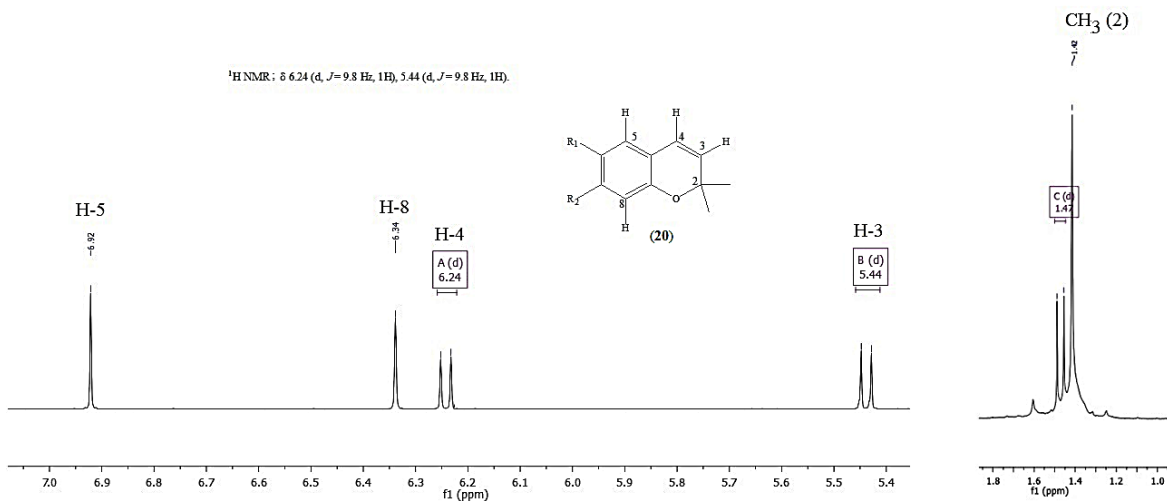


**Figura 17.** Compuestos aislados de partes aéreas de *A. pichinchensis*.



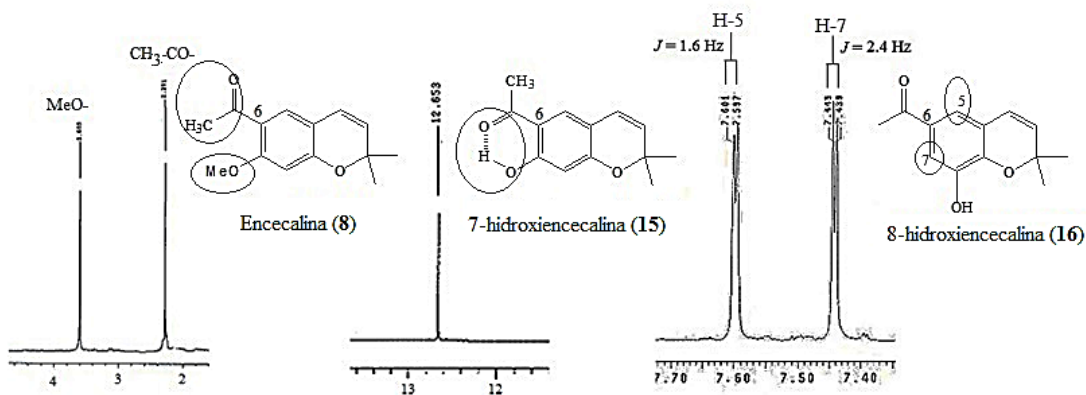
**Figura 17.** (Continuación) Compuestos aislados de partes aéreas de *A. pichinchensis*.

En análisis de datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  permitió establecer que los compuestos **14**, **8**, **15**, **16** y **8** contienen en su estructura el esqueleto base de un benzopirano o cromeno **20**. Los protones 3 y 4 se acoplan y en el espectro se observan dos señales dobles, cada señal tiene una constante acoplamiento de 9.8 Hz, lo que indica que los protones en el doble enlace se encuentran del mismo lado (*cis*). El patrón de sustitución del anillo aromático es el mismo para los compuestos **14**, **8**, **15**, **16** y **7**, observando en 6.36 y 6.94 dos señales simples las cuales guardan una relación *para* (posiciones 5 y 8), además de estas señales se observa una señal simple a campo alto ( $\delta$  1.42) que corresponde a los grupos metilo de la posición 2, figura 18.



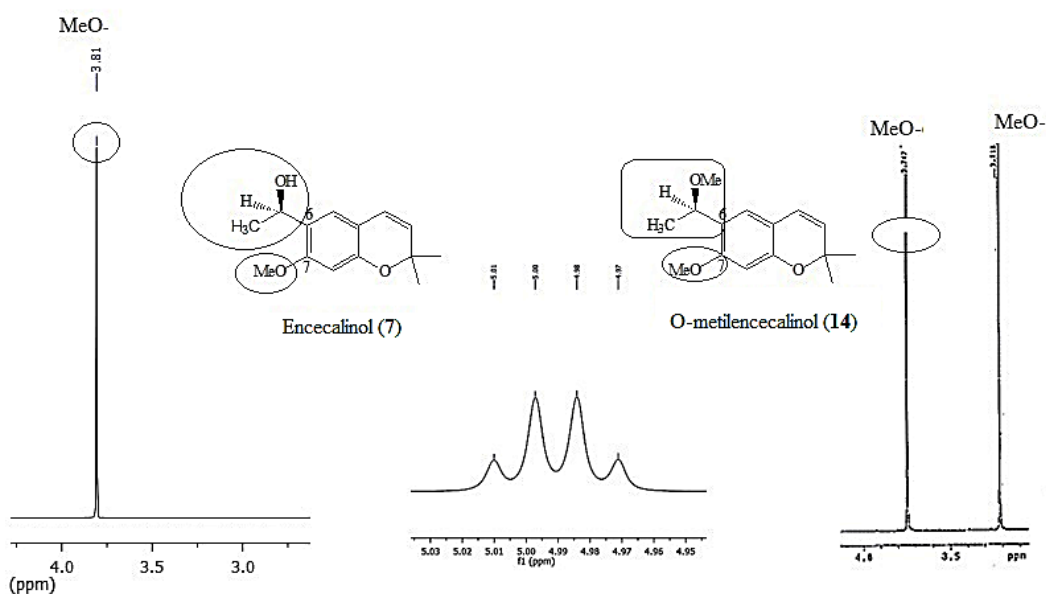
**Figura 18.** Esqueleto base (benzopirano) de los compuestos **14-16** y **18**.

Para los compuestos **14**, **8** y **7** el sustituyente de la posición 7 es un grupo metoxilo, el cual se observa como una señal simple en 3.77 ppm. Los compuestos **8**, **15** y **16** contienen una metilcetona en la posición 6 la cual se evidencia en el espectro de hidrogeno como una señal simple en 2.39 ppm, para el compuesto **15** no se observa la señal del metoxilo, ya que en la posición 7 contiene un grupo hidroxilo el cual forma un puente hidrogeno intramolecular con el carbonilo de la metilcetona, esta interacción se observa en 12.65 ppm y para el compuesto **16** se observan en 7.59 y 7.44 ppm dos señales dobles con constantes de acoplamiento de tipo meta ( $J = 1.6$  y  $2.4$  Hz) figura 19.



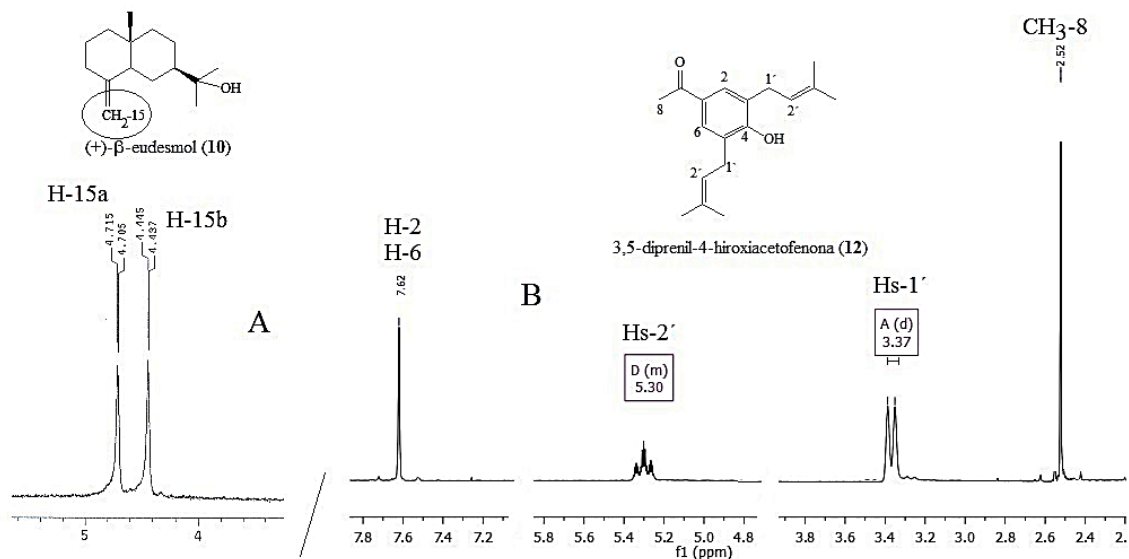
**Figura 19.** Grupo funcionales y patrón de sustitución observados para los compuestos **8**, **15** y **16**.

Los compuestos **14** y **7** contienen en su estructura un grupo metoxilo en la posición 7, y su diferencia estructural radica en el grupo funcional de la posición 6, para el compuesto **14** es un metiléter y para **7** es un alcohol secundario. Se observa en 4.98 ppm un cuarteto que deriva del acoplamiento del hidrogeno base de oxigeno con los hidrógenos del metilo, la señal del metoxilo se observa en 3.81 ppm como una señal simple. Para el compuesto **14** el cuarteto aparece en 4.61 ppm, así como también se observan dos señales simples en 3.74 y 3.21 ppm correspondientes a los dos metoxilos, figura 20. Los compuestos (**12**) y (**10**) muestran un rf similar al de los compuestos **8**, **15** y **16**, esto en un principio hizo pensar que se trataba del mismo tipo de compuestos, sin embargo, al obtener los experimentos de RMN de hidrogeno y carbono trece se pudo establecer que se trataba de compuestos de tipo diprenilacetofenona (**12**) y eudesmano (**10**).



**Figura 20.** Señales características del O-metilencecalinol (**14**) y encecalinol (**7**).

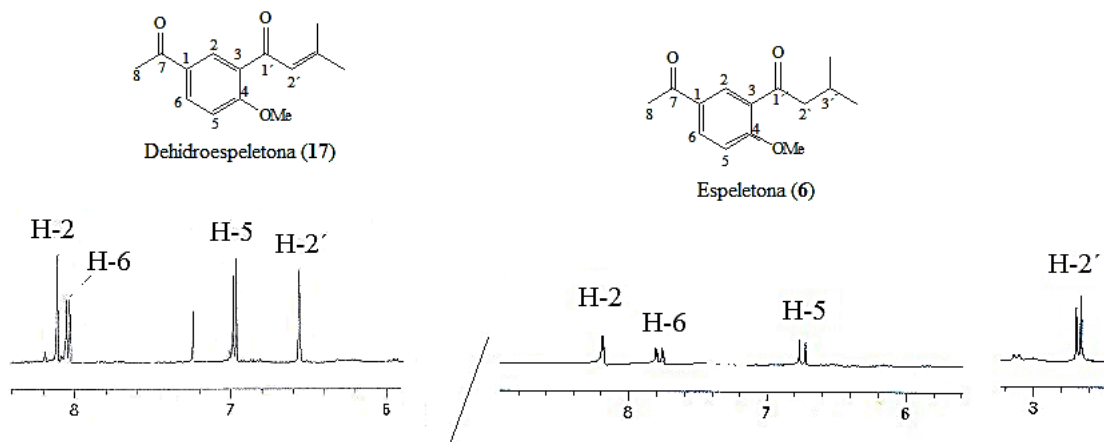
Los compuestos (**12**) y (**10**) muestran un rf similar al de los compuestos **8**, **15** y **16**, esto en un principio hizo pensar que se trataba del mismo tipo de compuestos, sin embargo, al obtener los experimentos de RMN de hidrogeno y carbono trece (figura 21) se pudo establecer que se trataba de compuestos de tipo eudesmano (**10**) y diprenilacetofenona (**12**).



**Figura 21.** Señales características de hidrógenos geminales (A) del eudesmano (**10**), y las correspondientes a ladiprenilacetona (**12**).

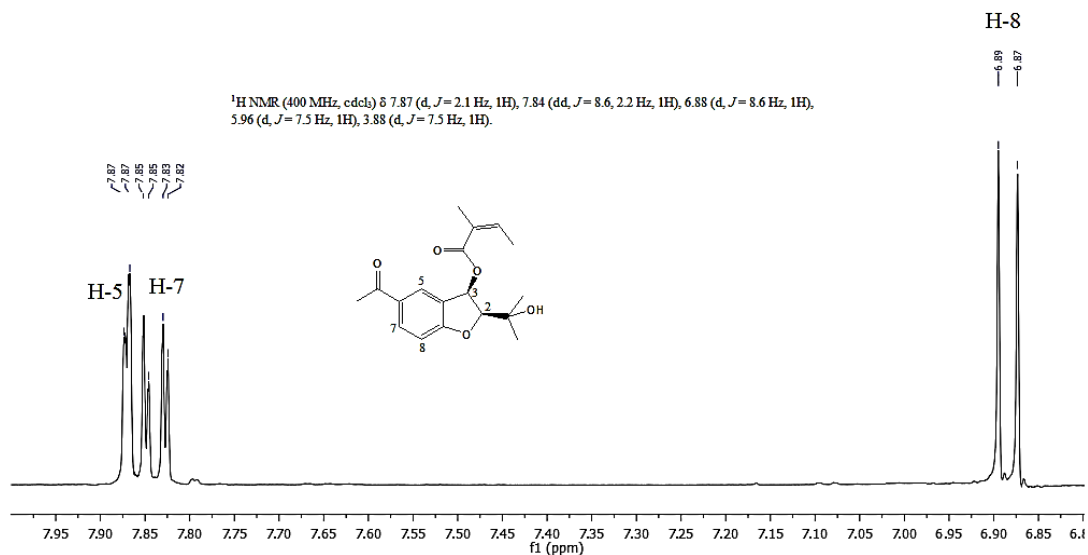
En las fracciones de mayor polaridad se aislaron 2 compuestos dicetónicos (**17**) y (**6**), los cuales se diferencian en el protón y carbono de la posición 2', ya que para el compuesto (**17**) se observa una señal para el hidrogeno vinílico en 6.51 ppm, para el compuesto (**6**) se observa para el metileno (CH<sub>2</sub>) una señal doble ya que este se acopla con el hidrogeno del metino de la posición 3, el sistema aromático de ambos compuestos muestran el mismo patrón de sustitución, en la figura se observa una señal doble a campo bajo para el hidrogeno 2 ( $\delta$  8.05; d,  $J= 2.4$  Hz), una señal doble de doble para el hidrogeno de la posición 6 ( $\delta$  7.98; dd,  $J= 2.4$  y 8.8 Hz) y para el hidrogeno 5 una señal doble ( $\delta$  6.92, d,  $J= 8.8$  Hz), figura 22. Cabe mencionar que la intensidad de las señales se debe a la concentración, esto indica que la espeletoona (**6**) se encuentra en menor concentración.





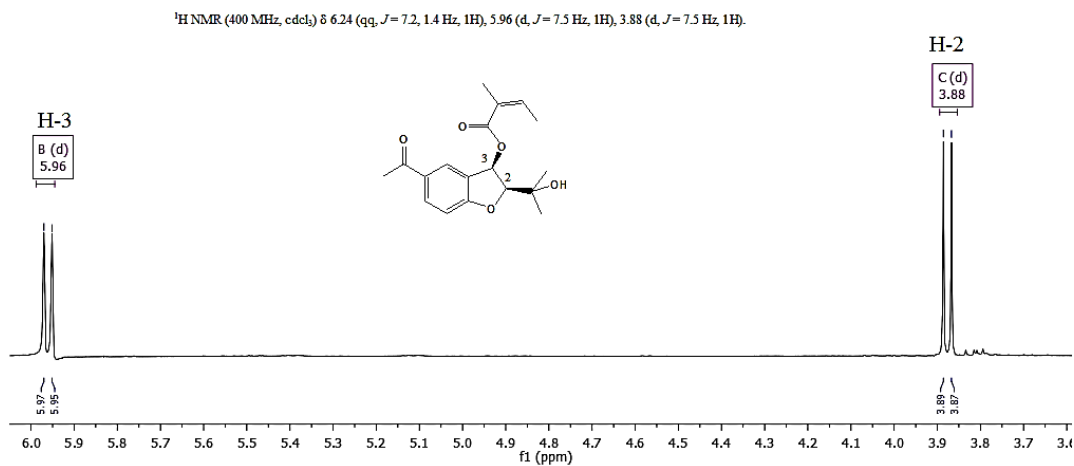
**Figura 22.** Señales del sistema aromático y de las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturada (17) y saturada (6).

En el grupo de fracciones de mayor polaridad también fue posible purificar un sólido resinoso de color amarillo, soluble en una mezcla de diclorometano:metanol (90:10), este residuo se analizó por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C primeramente, observando en el espectro de hidrogeno señales a campo bajo que evidencian la presencia de un sistema aromático 1, 3,4-trisustituido, en la figura 23 se puede observar la señal doble de hidrogeno de la posición 5 ( $\delta$  7.87, d,  $J=2.1$  Hz), una señal doble de doble (d,  $J=8.6$  y  $2.2$  Hz) que se asigna al hidrogeno 7 y una señal doble ( $\delta$  6.88, d,  $J=7.5$  Hz) para el hidrogeno de posición 8.



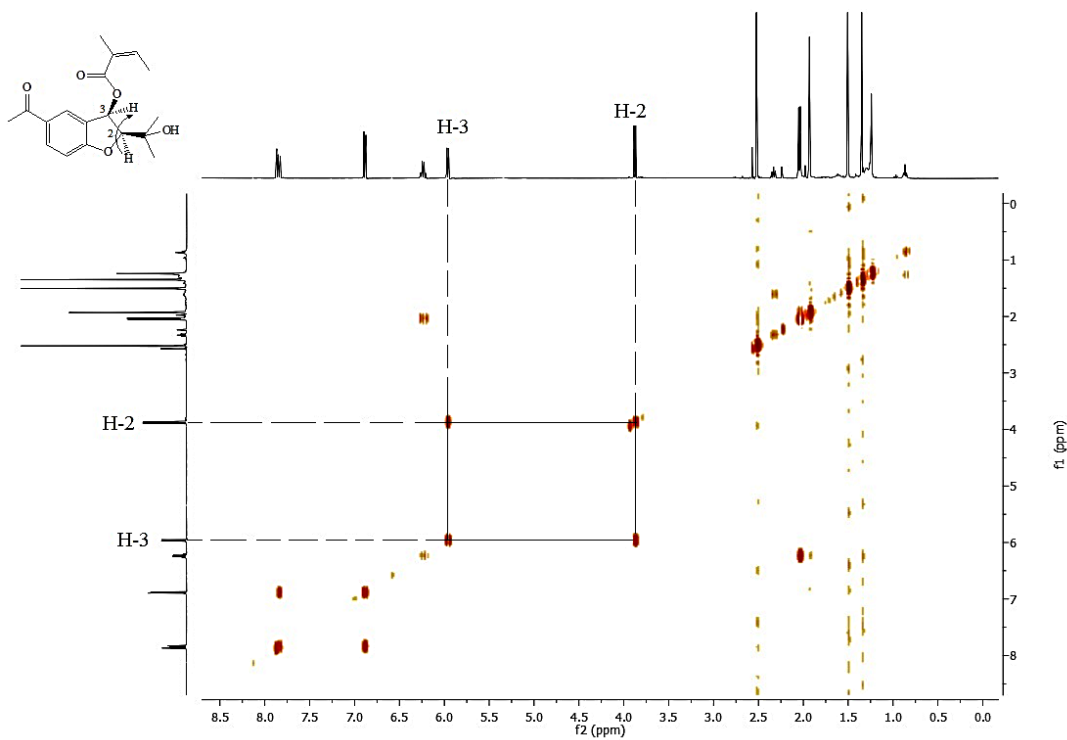
**Figura 23.** Sistema aromático con patrón de sustitución 1, 3,4-trisustituido.

Así mismo, en el espectro resaltan dos señales dobles que presentan el mismo valor de constante de acoplamiento ( $J= 7.5$  Hz) y aparecen en 3.88 y 5.96 ppm respectivamente, figura 24. En un principio se pensó que no existía acoplamiento entre ellas y que se trataba de protones acoplados en sitios diferentes en la molécula.



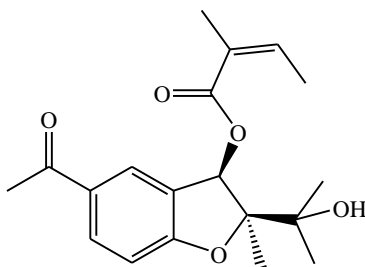
**Figura 24.** Señales para protones base de oxígeno acoplados.

En un principio se pensó que no existía acoplamiento entre ellas y que se trataba de protones acoplados en sitios diferentes en la molécula, sin embargo al analizar el experimento bidimensional homonuclear COSY (figura 25) se encontró correlación entre estos dos protones, el desplazamiento químico de una de las señales hacia campo más bajo (5.96 ppm) indica que uno de ellos está reciente una doble desprotección, lo cual en base a los antecedentes de *A. pichinchensis* indican que se trata de los protones base de oxígeno y bencílico del dihidrobenzofurano.

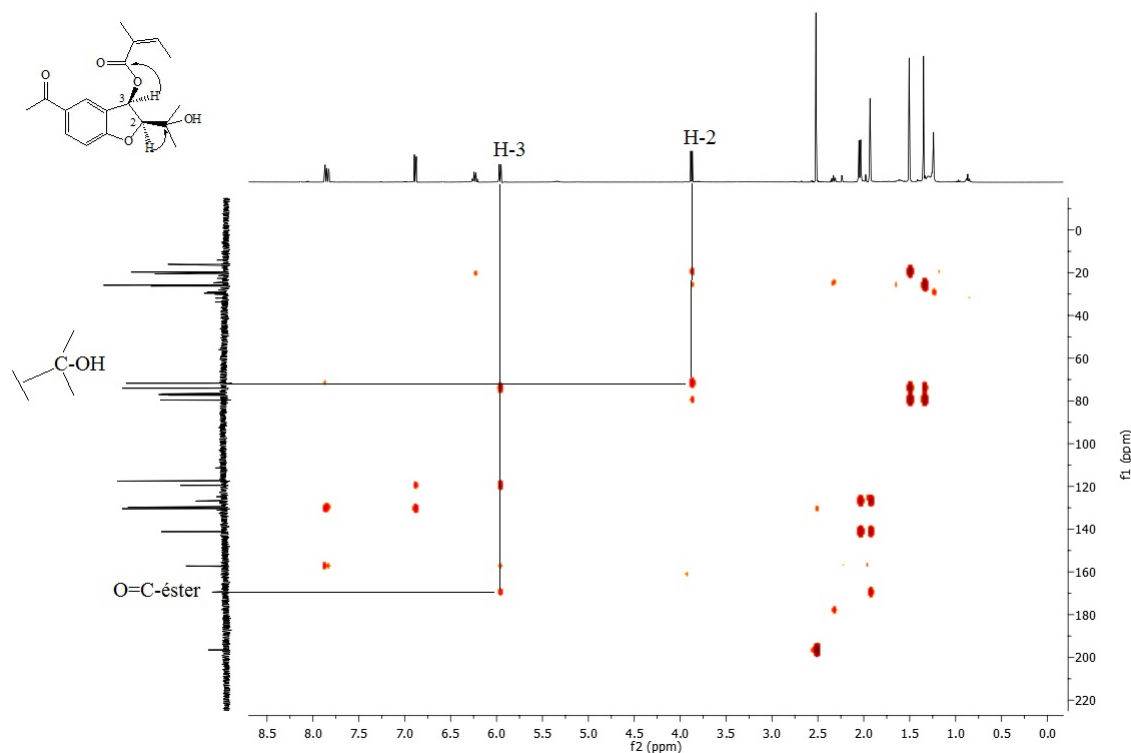


**Figura 25.** Correlación H-H de protones base de oxígeno.

Las señales mostradas en las figuras 24-26 aunada a las correlaciones heteronuclear H-C a tres enlaces (figura 26) de los hidrógenos base de oxígeno H-2 con el carbono del alcohol terciario, así como del H-3 con el carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado del éster (figura 26) se estableció la identidad estructural del benzodihidrofurano como: 5-acetil-3 $\beta$ -angeloiloxi-2 $\beta$ -(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (**5**).

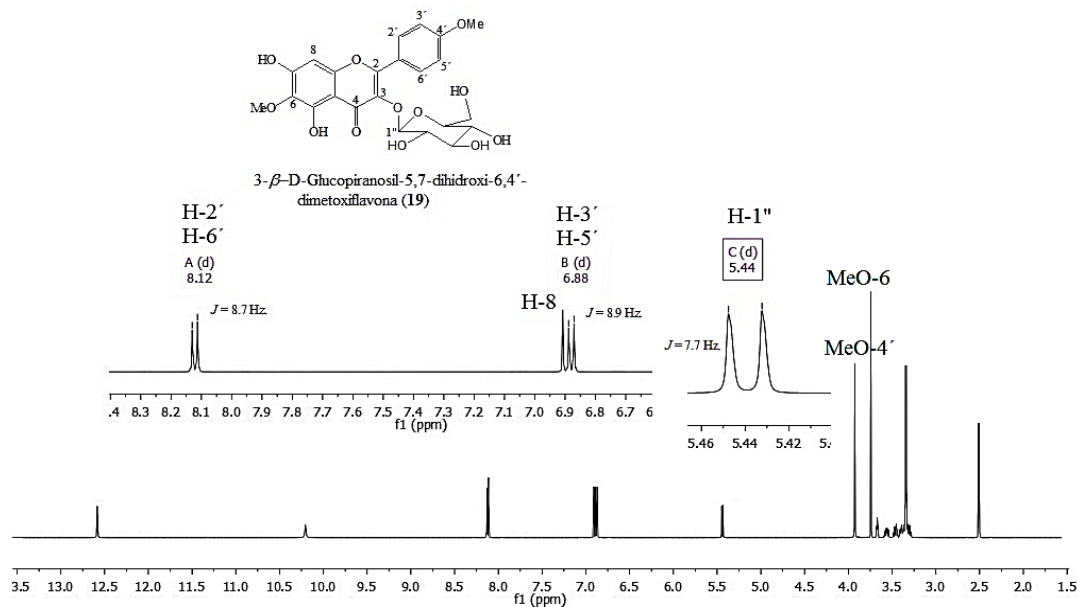


**(5)**



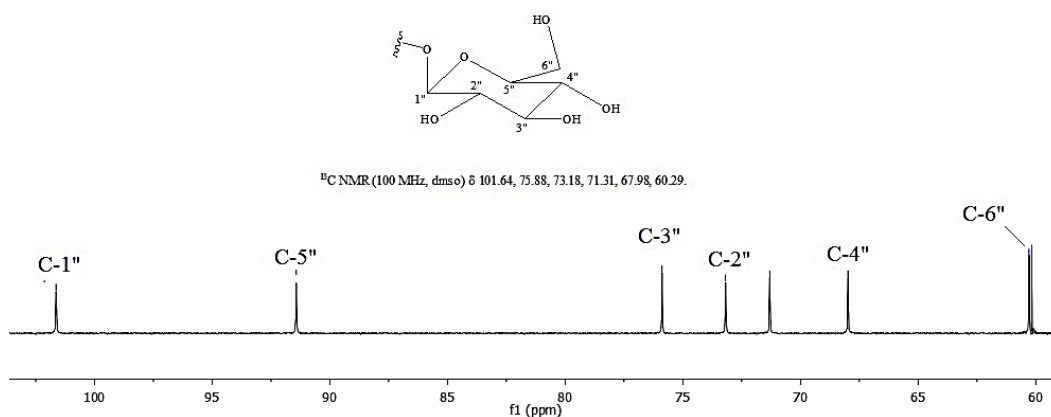
**Figura 26.** Correlación HMBC de los hidrógenos H-2 y H-3 con los sustituyentes en el benzodihidrofurano.

De las partes aéreas de *A. pichinchensis* también fue posible purificar y caracterizar un compuesto de tipo flavonoide glucosilado. De las fracciones de mayor polaridad obtenidas en MeOH 100% se obtuvo un sólido amorfo de color amarillo, el primer análisis espectroscópico mostro en el espectro de hidrogeno que se trataba de un compuesto fenólico glucosilado. Las evidencias espectroscópicas muestran en la región de sistemas aromáticos, dos señales dobles en  $\delta$  8.12 y 6.88 ( $J=8.7$  y 8.9 Hz respectivamente) y una señal simple en  $\delta$  6.91, lo cual indica que la estructura para este solido contiene 2 sistemas aromáticos, uno de ellos se encuentra 1,4-disustituido y el segundo se encuentra pentasustituido, figura 27.



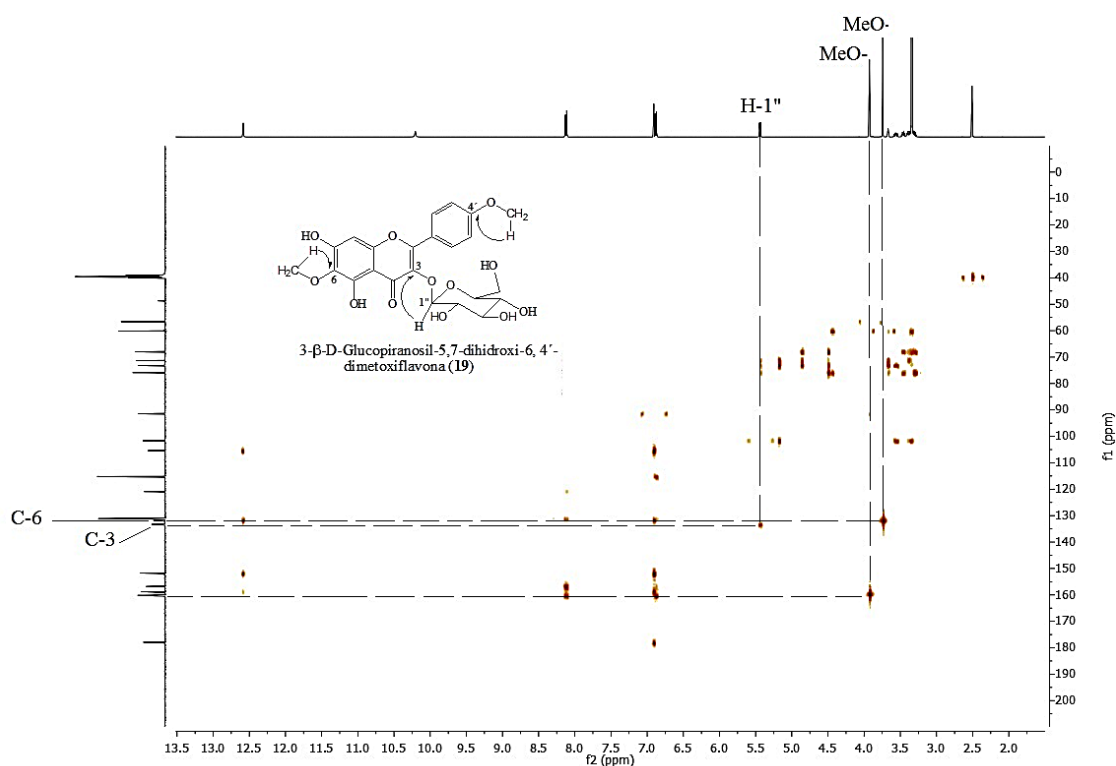
**Figura 27.** Señales asignadas a bencenos 1,4-di y pentasustituidos.

Además de estas señales se observa una tercer señal doble ( $J=7.7$  Hz) en  $\delta$  5.44 y varias señales múltiples entre  $\delta$  3.26-3.61, estas señales evidencian la presencia de un fragmento polihidroxlado y que por lo general se debe a existencia de una molécula de azúcar unida al esqueleto base del compuesto fenólico. Las señales de carbono corroboran la presencia de una molécula de azúcar (glucosa), figura 28.



**Figura 28.** Señales de carbono que evidencian al fragmento polihidroxlado (glucosa).

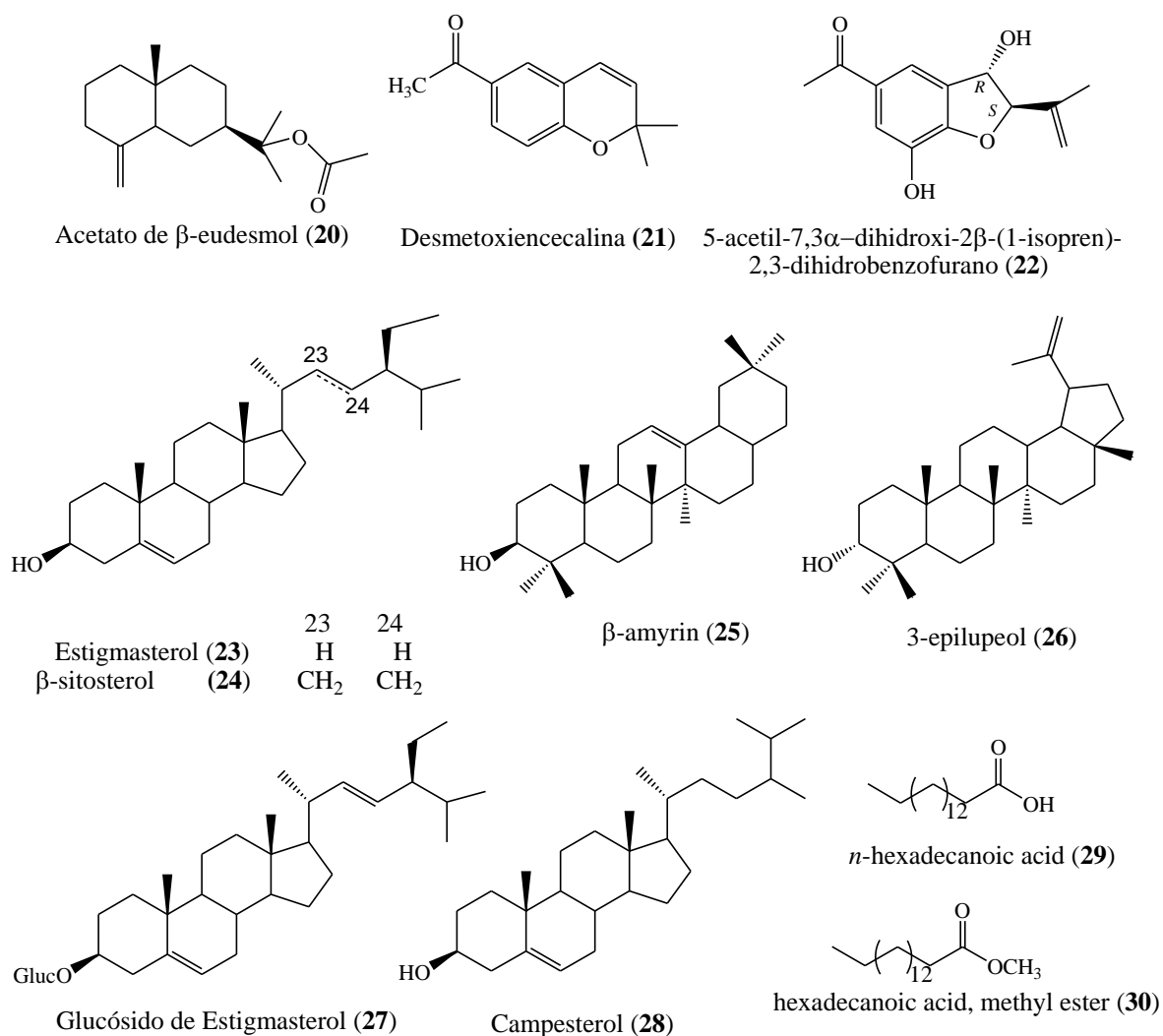
Una vez analizados los datos de RMN de hidrogeno y carbono se encontró estableció que la estructura para el sólido amarillo correspondía a un grupo de compuestos fenólicos conocidos como flavonoides. Además de las señales antes mencionadas se observan 2 señales simples, las cuales de acuerdo a su desplazamiento químico se asignan a 2 grupos metoxilo. Mediante el experimento bidimensional HMBC (figura 29) se establece que el azúcar se encuentra enlazado al carbono 3, un metoxilo al carbono 6 y el segundo metoxilo al carbono 4', estas asignaciones permiten identificar a este compuesto como: 3-β-D-Glucopiranosil-5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**19**).



**Figura 29.** Correlaciones heteronucleares H-C (tres enlaces) para el compuesto (**5**).

### 7.2.1 Estudio fitoquímico de cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis*

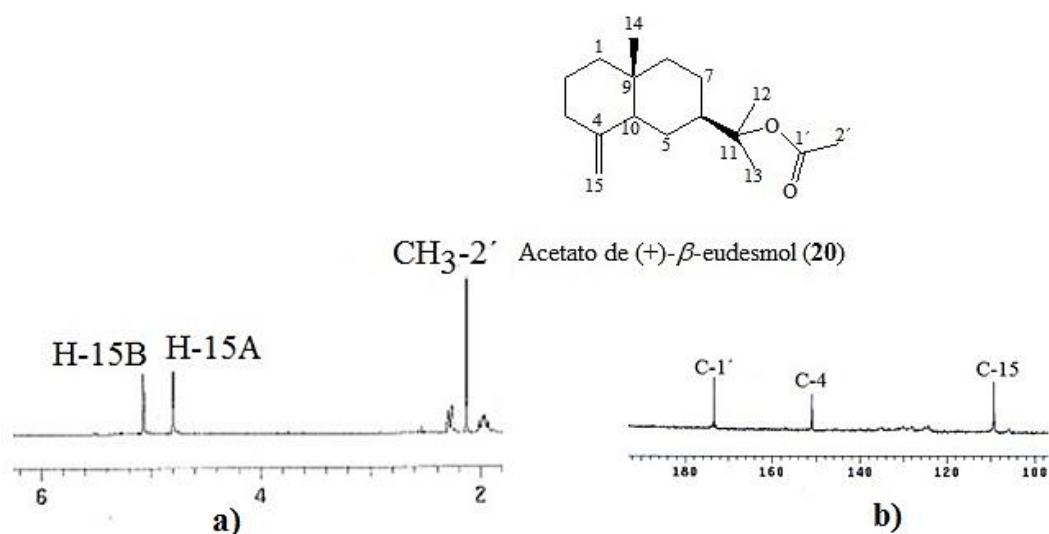
El trabajo de purificación realizado a biomasa seca obtenida tanto de cultivo de callos, así como de células en suspensión permitió identificar 10 metabolitos secundarios, figura 30.



**Figura 30.** Compuestos aislados de cultivos de callos y células en suspensión.

La identificación de cada uno de los compuestos se realizó utilizando las técnicas de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC) y Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM). El compuesto de menor polaridad obtenido presenta en RMN de <sup>1</sup>H, dos señales dobles en  $\delta$  5.02 y 4.78 (d,  $J$  = 1.2 Hz), por su desplazamiento químico y constante de acoplamiento estas señales indican que se trata de hidrógenos vinílicos de tipo geminales, en el espectro también se observa el grupo éster, en el espectro de hidrogeno en  $\delta$  2.18 una señal simple que integra para tres hidrógenos muestra la existencia del grupo metilo del acetato (figura 31a), en carbono trece las señales del doble

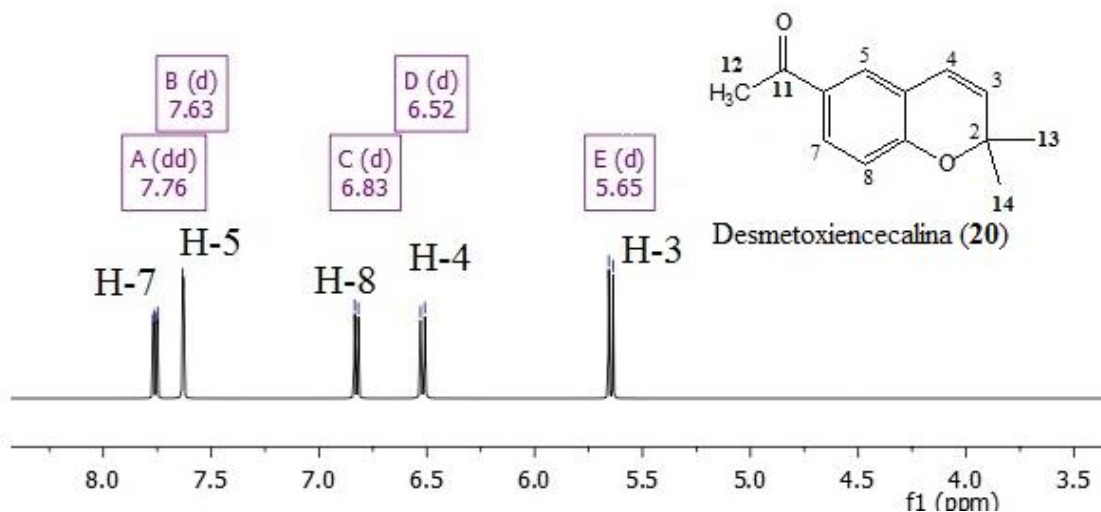
enlace exocíclico en  $\delta$  108.67 y 152.23 y la señal del carbonilo en  $\delta$  174.23 evidencian la propuesta estructural para el compuesto 20 (figura 31b).



**Figura 31.** Señales que indican la existencia de protones geminales y de un grupo acetato.

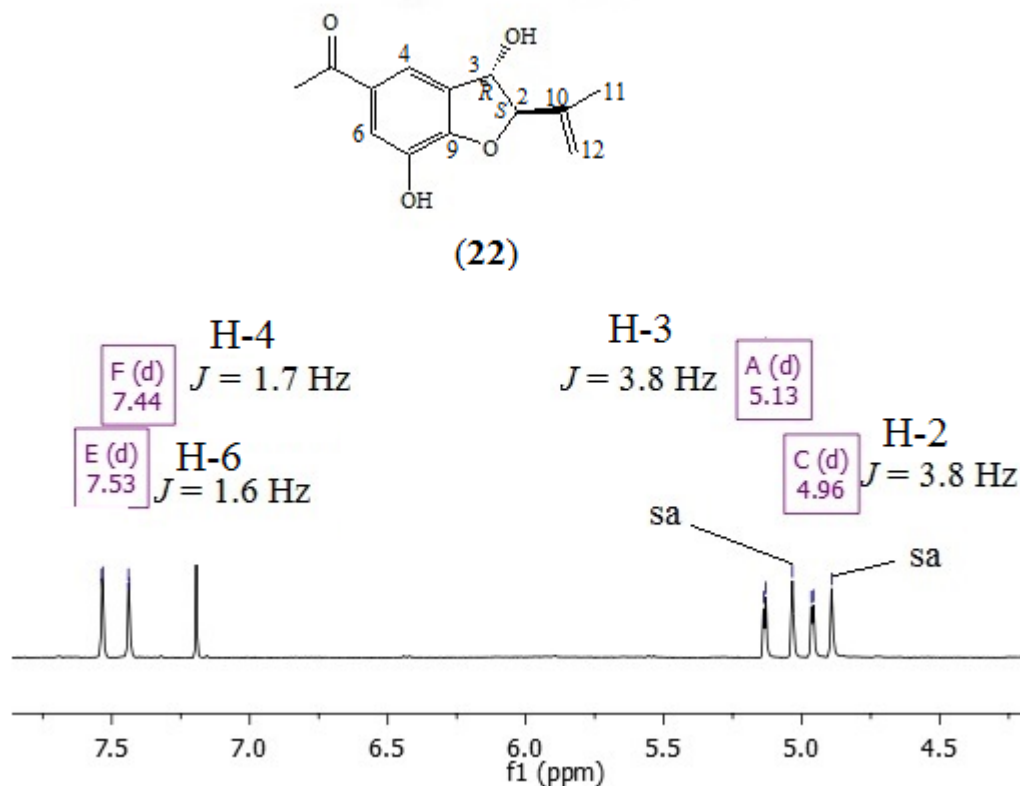
El segundo compuesto aislado fue identificado como desmetoxiencalina (**21**) contiene el esqueleto de un benzopirano al igual que la encalina (**8**) identificada en planta silvestre, contiene en su esqueleto base un doble enlace en el heterociclo, en donde los hidrógenos guardan una geometría *cis* ( $\delta$  6.52 y 5.65; d,  $J$ = 9.9 y 10 Hz, H-4 y H-3), además de estas, se observa un grupo de señales en  $\delta$  7.76 (dd,  $J$ = 8.5, 2.2 Hz);  $\delta$  7.63 (d,  $J$ = 2.2 Hz) y 6.83 (d,  $J$ = 8.5 Hz) que caracterizan a un sistema aromático 1,3, 4-trisustituido, las señales para los metilos tanto del acetato como los metilos del pirano se encuentra como señales simples en  $\delta$  2.54 y 1.40 respectivamente, figura 32.





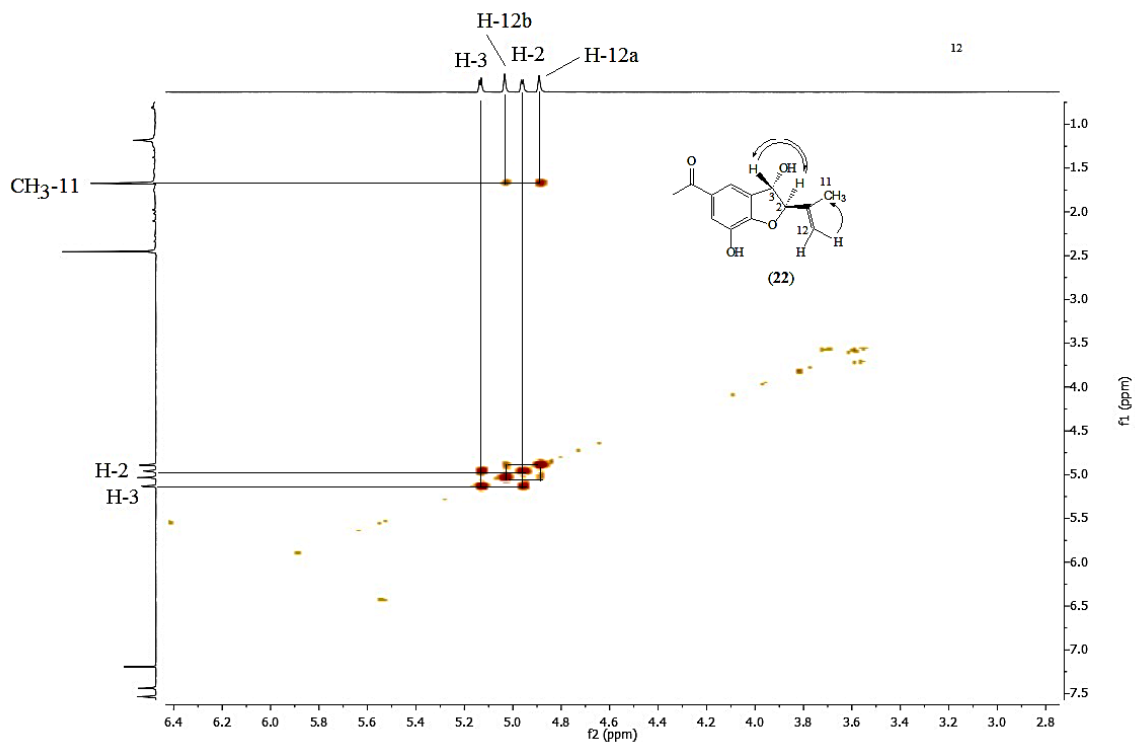
**Figura 32.** Señales para protones vinílicos del benzopirano (**21**).

Uno de los compuestos obtenidos en los cultivos *in vitro* que llamo la atención fue el benzodihidrofurano (**22**). Cuando se analizó por RMN de  $^1\text{H}$  se pensó en un compuesto estructuralmente diferente a los identificados en planta silvestre, sin embargo al ir analizando cada grupo de señales se dedujo que se trataba de un compuesto de tipo benzodihidrofurano y que a diferencia del compuesto (**5**) obtenido en planta silvestre, para este compuesto se observa en la región de protones aromáticos dos señales doble en  $\delta$  7.53 (d,  $J = 1.6$  Hz) y  $\delta$  7.44 (d,  $J = 1.7$  Hz), estas señales indican que el benceno se encuentra 1,3,4,5-tetrasustituido y que por lo tanto los protones presentan un acoplamiento meta, se observan dos señales anchas en  $\delta$  5.03 y 4.89, en esa misma región se encuentran adicionalmente dos señales dobles en 5.13 ( $J = 3.8$  Hz) y 4.96 ( $J = 3.8$  Hz), cabe mencionar que en esta región ( $\delta$  4.8 a 5.20) también se localizan hidrógenos unidos a carbono base de oxígeno, lo que hace pensar que existen estos dos tipos de protones, Figura 33.



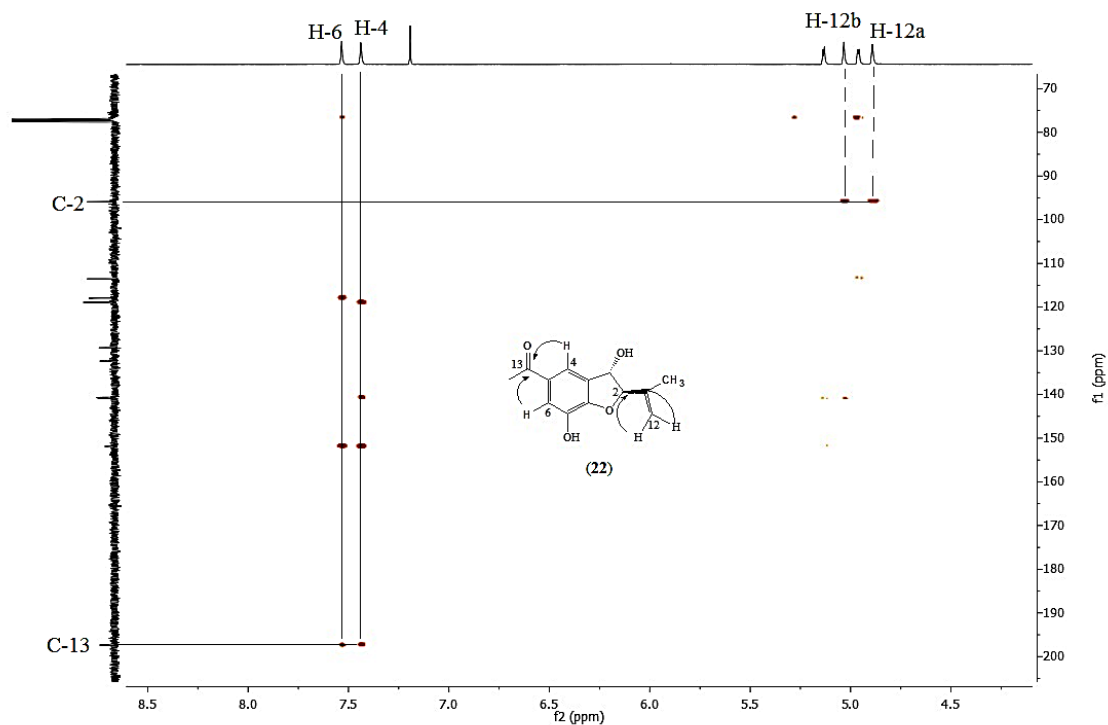
**Figura 33.** Señales que identifican a hidrógenos de un sistema aromático, de doble enlace No conjugado y base de oxígeno.

En el experimento bidimensional COSY (H-H) se observa correlación entre las dos señales dobles, así mismo, en el mismo experimento se pueden observar las correlaciones entre las dos señales anchas con una señal simple que aparece en  $\delta$  1.67 que por su desplazamiento químico se asigna a un  $\text{CH}_3$ - enlazado a un carbono  $\text{sp}^2$  (alqueno), esto indica que los hidrógenos del doble enlace y el metilo guardan una relación a tres enlaces, figura 34.



**Figura 34.** Correlaciones H-H de los hidrógenos base de oxígeno del dihidrofurano e hidrógenos geminales.

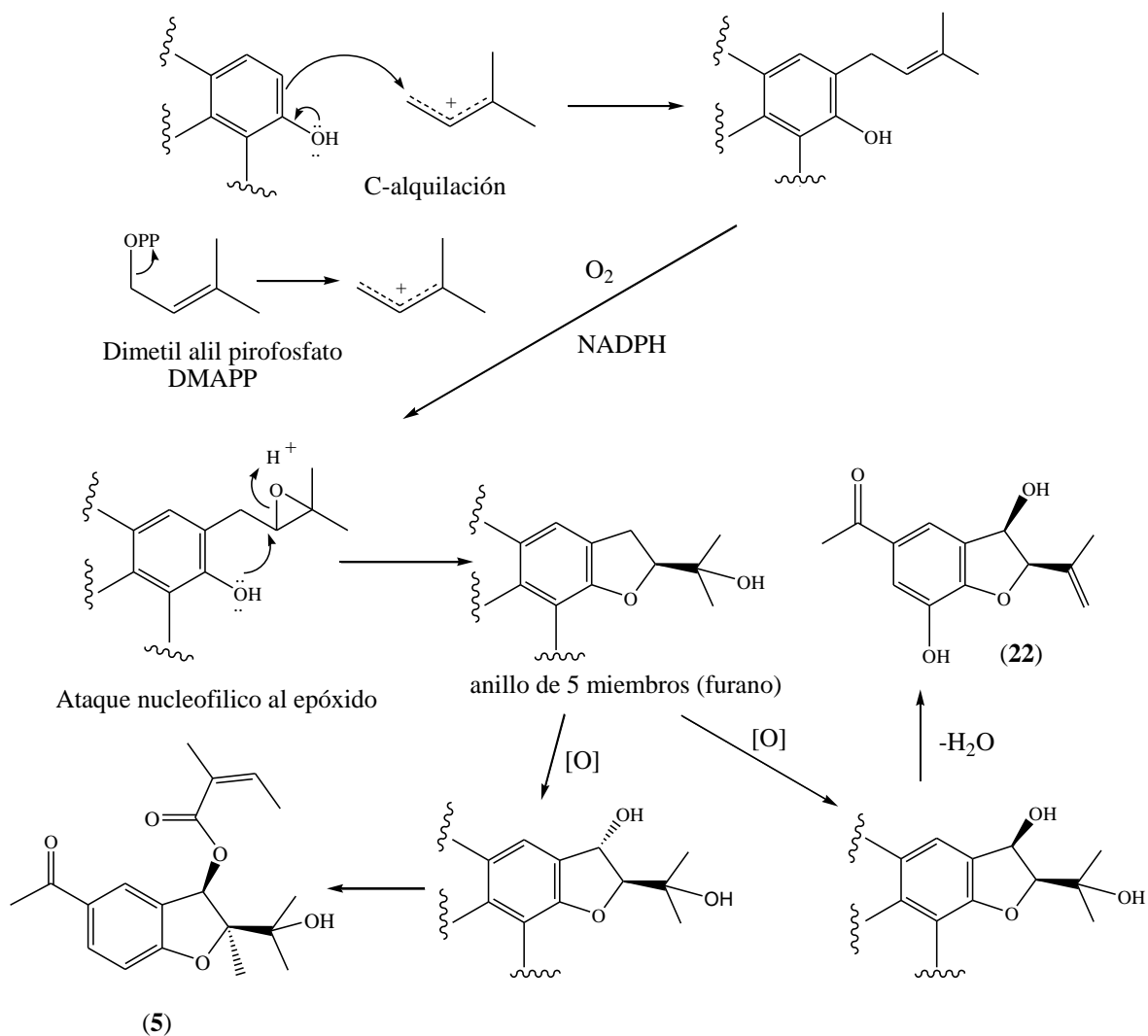
Mediante correlaciones protón –carbono a tres enlaces se estableció de manera inequívoca el patrón de sustitución y la posición del grupo acilo en el anillo aromático, así como la posición del isopreno en el anillo del dihidrofurano, figura 35. Con las evidencias antes mencionadas se identifica al compuesto (**22**) como: 5-acetil-7,3 $\alpha$ -dihidroxi-2 $\beta$ -(1-isopren)- 2,3-dihidrobenzofurano (**22**).



**Figura 35.** Correlaciones HMBC de los grupos isopropeno y acilo en el benzodihidrofurano (**22**).

Los compuestos (**5**) y (**22**) se generan a través de un epóxido intermediario, mediante un ataque nucleofílico al epóxido se produce el anillo de cinco miembros (furan), a partir de este, mediante una oxidación se llega al intermediario dihidroxilado, un hidroxilo es secundario y el segundo terciario. A partir de este, se deriva una reacción de esterificación en el oxígeno secundario incorporándose un grupo angeloiloxi en el carbono 3 del benzodihidrofurano dando lugar a al compuesto (**5**), para el compuesto (**22**) el hidroxilo terciario es el que se transforma, sufre una deshidratación para generar el alqueno (isopropeno). Aquí lo que cabe resaltar es la estereoquímica del hidroxilo en el carbono 3, para el compuesto (**5**) es  $\beta$  y para el compuesto (**22**) es  $\alpha$ , esta diferencia en la configuración origina la diferencia en las constantes de acoplamiento para protones de la posición 2 y 3, figura 36.

La hidroxilación es una reacción química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazando un átomo de hidrógeno, oxidando al compuesto. En bioquímica, las reacciones de hidroxilación son facilitadas por enzimas llamadas hidroxilasas.



**Figura 36.** Biosíntesis de benzodihidrofurano.

Los cultivos *in vitro* además de producir el benzopirano (21) y benzodihidrofurano (22) como productos principales, también producen esteroides y triterpenos, en particular se identificaron en mezcla estigmasterol (23) y  $\beta$ -Sitosterol (24), Glucósido de estigmasterol (27) y 3-epilupeol (26), estos compuestos se identificaron utilizando datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  principalmente. Los compuestos minoritarios se identificaron por Cromatografía de Gases acoplada a un espectrómetro de masas y estos fueron el triterpeno  $\beta$ -amirina (25), el esteroide Campesterol (28), un ácido y un éster alifáticos (29 y 30). Los espectros 1-15 que permitieron la identificación de los metabolitos secundarios antes mencionados se encuentran en la parte de anexos.

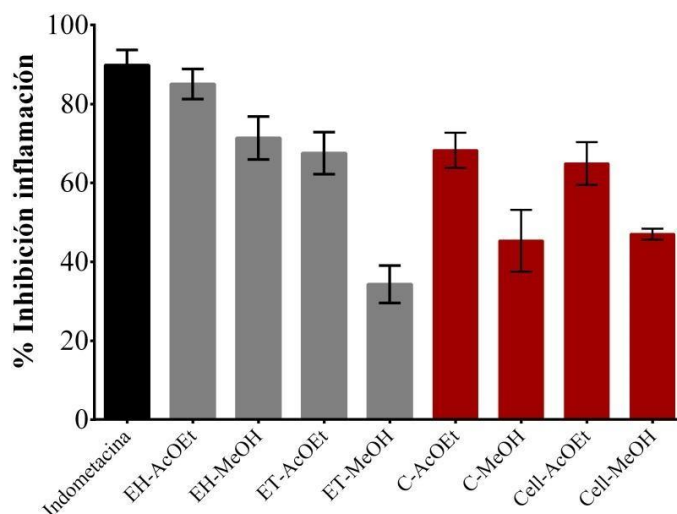
---

### 7.3 Estudio biológico de extractos y compuestos puros derivados de cultivos *in vitro* y planta silvestre de *A. pichinchensis*

#### 7.3.1 Actividad antiinflamatoria *in vivo* de extractos y compuestos puros de cultivos *in vitro* (callos y células en suspensión) y planta silvestre de *A. pichinchensis*

Los extractos obtenidos de hojas y tallos de *A. pichinchensis* fueron evaluados a la dosis de 1 mg/oreja en el modelo inducido por TPA en oreja de ratón. En la figura 37 se observa el efecto inhibitorio encontrado en estos extractos. Los resultados muestran que todos los extractos presentan porcentajes de inhibición relevantes con valores en el rango de  $36.87 \pm 4.75$  a  $85.10 \pm 3.82\%$  comparados con el fármaco de referencia (indometacina). Los extractos con mejor efecto inhibitorio fueron los derivados de las hojas (ambos extractos) y de tallos en AcOEt, mientras que el extracto metanólico mostró el menor efecto.

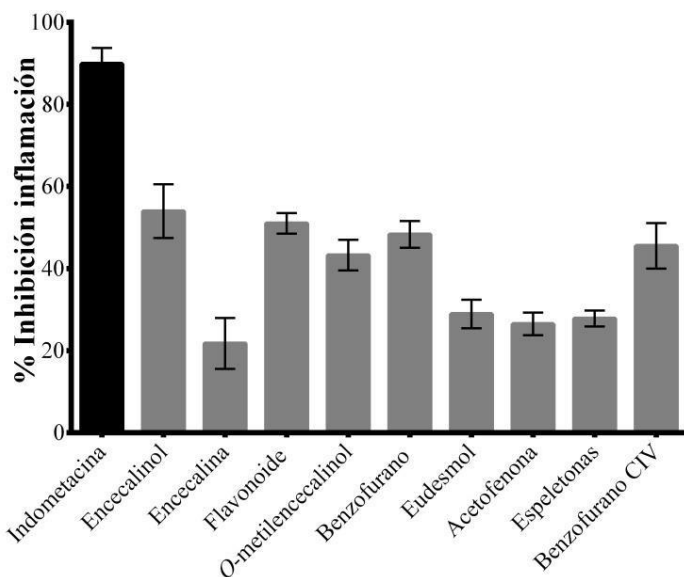
Se observó un comportamiento similar con los extractos provenientes de los cultivos *in vitro* con un efecto inhibitorio del  $45.36 \pm 7.85$  al  $68.30 \pm 4.45\%$ . Los extractos en AcOEt fueron los más activos, cabe señalar que los extractos metanólicos también fueron activos, aunque en menor proporción que los de AcOEt.



**Figura 37.** Efecto inhibitorio de extractos de planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis* sobre edema inducido por TPA en ratones (1 mg/oreja). **EH:** Extracto de hojas; **ET:** Extracto de tallos; **C:** Callos; **Cell:** Células en suspensión. Los datos representan la media  $\pm$  D. E. de al menos tres experimentos independientes ( $n=6$ ).

Los compuestos puros derivados de extractos de planta silvestre mostraron efecto antiinflamatorio significativo entre 21.75 a 53.96 % (Figura 38). El compuesto enecalinalol (aislado de los extractos de hojas y tallos en AcOEt) presentó un efecto del  $53.97 \pm 6.55$  % seguido del flavonoide glucosilado ( $51.01 \pm 2.50$ ) proveniente de las flores, estos compuestos fueron los más destacables como antiinflamatorios en la planta silvestre, el compuesto enecalinalol ha sido identificado en especies de Asteraceae y evaluado contra parásitos protozoarios, bacterias patógenas y hongos dermatofitos (Bohlmann et al., 1981; Harel et al. 2013; Rios et al, 2003; Klocke et al., 1985; Aguilar-Guadarrama et al., 2009), mientras que el compuesto de tipo flavonoide se ha reportado en *Arnica montana* y *Arnica chamissonis*, ambas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional como cicatrizante y antiinflamatoria a nivel extracto (Merfort y Wendisch, 1989), sin embargo el flavonoide puro no ha sido reportado con ninguna actividad biológica, además este compuesto no ha sido reportado en especies de *A. pichinchensis*. Por lo tanto, el efecto antiinflamatorio observado en los extractos de planta silvestre sugiere que la actividad antiinflamatoria es sinérgica, dado que a nivel puro los compuestos reducen su efecto biológico.

**Figura 38.** Efecto inhibitorio de compuestos puros de planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A.*



*pichinchensis* sobre edema inducido por TPA en ratones (1 mg/ oreja). (Los datos representan la media  $\pm$  D. E. de al menos tres experimentos independientes ( $n= 6$ )).

El compuesto de tipo benzofurano obtenido de los cultivos *in vitro* presentó un efecto del  $45.53 \pm 5.55$  %, cabe señalar que este compuesto no ha sido reportado en la especie *A. pichinchensis* y tampoco se aisló en la planta silvestre de este estudio.

Por lo tanto, los extractos de planta silvestre contienen metabolitos secundarios que participan en el efecto antiinflamatorio, así mismo, los extractos en AcOEt de callos y células en suspensión contienen un compuesto antiinflamatorio de tipo benzofurano.

### 7.3.2 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

#### 7.3.2.1 Viabilidad celular

Se determinó el efecto de los compuestos puros provenientes de planta silvestre y cultivos *in vitro* (callos y células en suspensión) sobre la viabilidad de las células RAW 264.7 a diferentes concentraciones (9.375, 18.75, 37.50, 75.0 y 150.00  $\mu\text{M}$ ) solubilizados en DMSO (0.5% de concentración final). En la tabla 2 se muestra el efecto encontrado para estas muestras, donde se observa que ningún compuesto presentó una reducción significativa de la viabilidad celular en comparación con el control positivo (etopósido) a ninguna de las concentraciones probadas.

**Tabla 2.** Efecto de compuestos puros derivados de planta silvestre y cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis* sobre la viabilidad de células RAW 264.7 e inhibición de células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

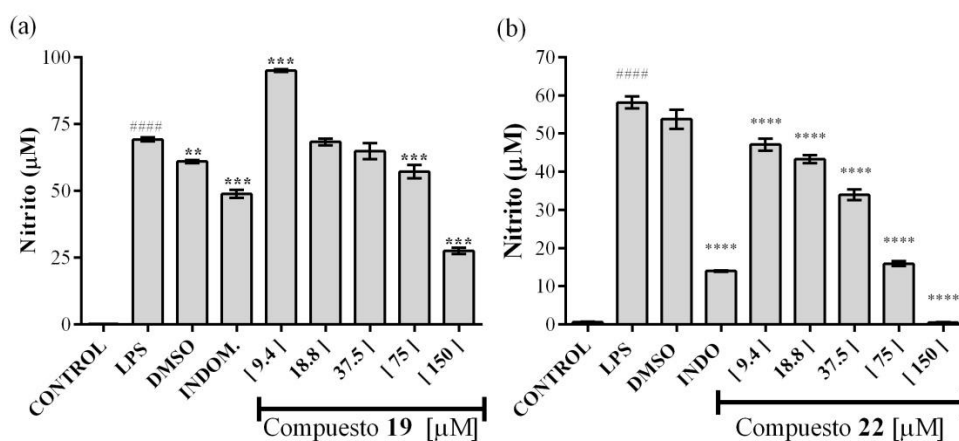
Compuesto	Efecto sobre RAW 264.7	
	% Viabilidad a 75 $\mu\text{M}$	(%) Inhibición de NO a 75 $\mu\text{M}$
(5)	121.2 $\pm$ 10.20	5.98 $\pm$ 5.22
(6)	104.7 $\pm$ 1.82	5.90 $\pm$ 8.35
(7)	110.9 $\pm$ 8.3	29.77 $\pm$ 9.37
(8)	112.4 $\pm$ 24.08	16.75 $\pm$ 5.36
(10 <sup>a</sup> )	104.00 $\pm$ 3.64	17.28 $\pm$ 6.30
(12 <sup>a</sup> )	100.20 $\pm$ 2.95	31.13 $\pm$ 16.35
(14 <sup>a</sup> )	109.9 $\pm$ 7.16	0.95 $\pm$ 1.35
(15)	115.6 $\pm$ 1.58	11.98 $\pm$ 7.85
(16)	99.33 $\pm$ 12.39	22.63 $\pm$ 10.38
(17)	103.9 $\pm$ 3.83	38.33 $\pm$ 14.66
(19)	101.3 $\pm$ 1.62	75.08 $\pm$ 3.07
(22)	102.8 $\pm$ 5.73	67.96 $\pm$ 1.32
Indometacina <sup>b</sup>	-----	65.93 $\pm$ 6.03
Etoposido <sup>c</sup>	42.02 $\pm$ 4.23	-----

Los datos representan la media  $\pm$  D. E. de al menos tres experimentos independientes ( $n=7$ ). **a:** se evaluaron a 37.5  $\mu\text{M}$  debido a que a 75  $\mu\text{M}$  afectaron la viabilidad celular, **b:** se evaluó a 84  $\mu\text{M}$ , **c:** se evaluó a 68  $\mu\text{M}$ .



### 7.3.2.2 Efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS

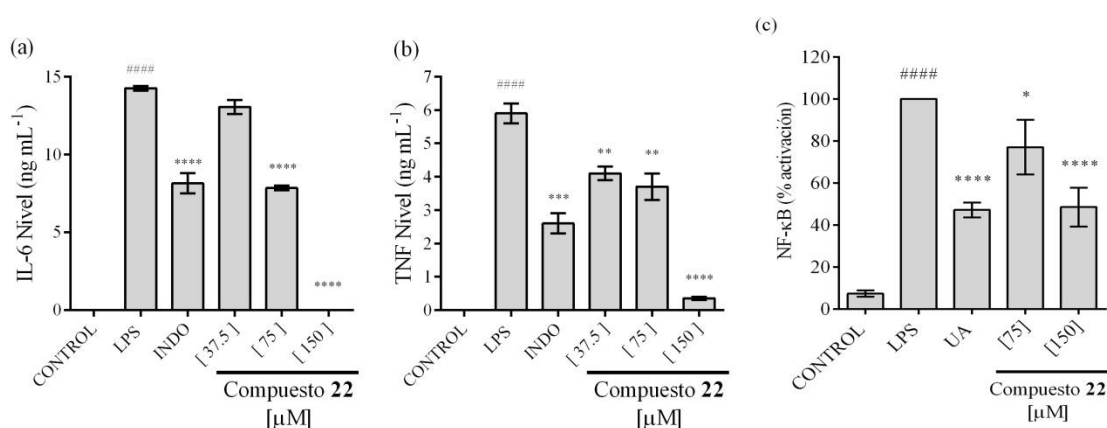
Se evaluó el efecto inhibitorio de los compuestos derivados de planta silvestre y cultivos *in vitro* sobre la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos (9.4, 18.8, 37.50, 75.0 y 150.00  $\mu\text{M}$ ) durante 2 horas y posteriormente fueron estimuladas con LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 20 h. La concentración de nitrito, un metabolito estable de NO, fue utilizado como indicador de la producción de ON en el medio. Los resultados experimentales mostraron que el nivel de NO se incrementó en las células RAW estimuladas con LPS, y este efecto disminuyó significativamente mediante el tratamiento con los compuestos. Los porcentajes de inhibición y valores de  $\text{CI}_{50}$  se muestran en la tabla 2 donde se puede observar que los compuestos **19**, **22** y **26** son los mejores inhibidores de la secreción de NO con  $\text{CI}_{50}$  de  $20.55 \pm 0.27$ ,  $36.96 \pm 1.06$  y  $15.50 \pm 0.97$  respectivamente, los cuales compiten con la indometacina que presentó un  $\text{CI}_{50}$  de  $54.69 \mu\text{M}$ .



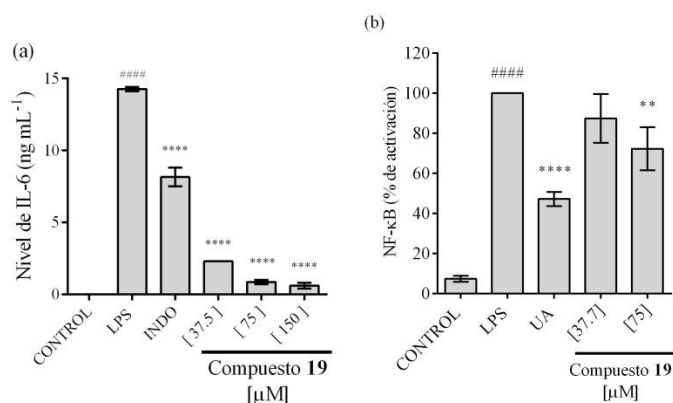
**Figura 39.** Efecto de los compuestos derivados de planta silvestre y cultivos *in vitro* sobre la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

En la literatura no se ha reportado el efecto antiinflamatorio de los compuestos **19** y **22** que resultaron ser inhibidores de la producción de NO a concentraciones que no afectan la viabilidad celular, sin embargo existen reportes científicos del efecto antiinflamatorio del compuesto **26** que demuestran inclusive su mecanismo de acción en esta actividad biológica (Romero-Estrada, et al. 2016).

Debido a lo anterior, los compuestos **19** y **22** fueron los únicos que se probaron para inhibir la interleucina 6 (IL-6) y la secreción de TNF, dos citocinas proinflamatorias, utilizando el modelo de células RAW estimuladas con LPS. La secreción de IL-6 y TNF se inhibió totalmente a 150  $\mu\text{M}$  y el efecto mostró una dependencia de la concentración, con un  $\text{CI}_{50}$  de  $73.71 \pm 3.21 \mu\text{M}$  y  $73.20 \pm 5.99 \mu\text{M}$  respectivamente. Así mismo se evaluó la capacidad del compuesto **22** para inhibir la activación del factor nuclear (NF)- $\kappa\beta$ , se observa un efecto dosis-respuesta alcanzando un 40% de inhibición de este factor a la concentración de 150  $\mu\text{M}$ .



**Figura 40.** Efecto del compuesto **19** sobre IL-6 y el factor nuclear (NF)- $\kappa\beta$ .



**Figura 41.** Efecto del compuesto **22** sobre citosinas proinflamatorias y el factor nuclear (NF)- $\kappa\beta$ .

El NO es un mediador proinflamatorio importante que participa en algunos procesos inflamatorios como artritis reumatoide, hepatitis crónica y fibrosis pulmonar, los resultados del compuesto **22** sugieren que este compuesto juega un papel importante en la

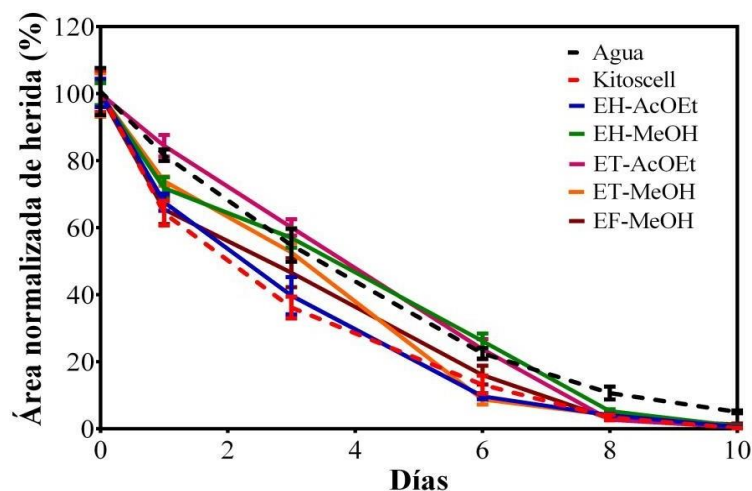
---

actividad antiinflamatoria de *A. pichinchensis*, por lo tanto, este compuesto podría considerarse como un agente antiinflamatorio debido a que tiene el potencial de inhibir la activación de NF- $\beta$ , NO, IL-6 y la secreción de TNF, es decir suprime la expresión de los genes diana NF- $\beta$  como la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la vía proinflamatoria.

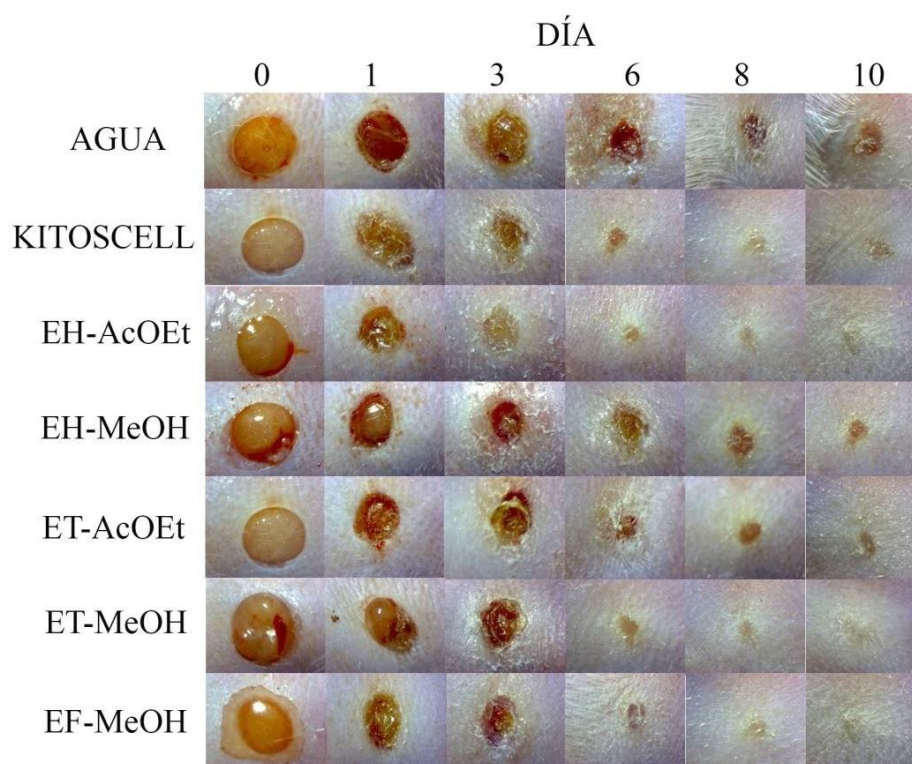
### 7.3.3 Actividad cicatrizante *in vivo*

Se evaluó el efecto cicatrizante de los extractos provenientes de planta silvestre y cultivos *in vitro* en el modelo de incisión dorsal en ratones macho CD-1 utilizando 10  $\mu$ g de extracto en la herida.

En la figura 42 se observa que el extracto de hojas en AcOEt y el extracto metanólico de flores presentaron una tendencia similar a la mostrada por el fármaco de referencia (Kitoscell), las fotografías de las heridas corroboran este efecto observándose un cierre de la herida similar al control positivo, así mismo se observa que el extracto de tallos en metanol y hojas en AcOEt presentan un cierre estéticamente superior al Kitoscell en el día 6 (Figura 43), este efecto puede estar asociado a la acción del contenido de los extractos sobre las diferentes fases que implica el mecanismo de cicatrización. Por lo tanto, este resultado sugiere que los extractos en AcOEt de hojas y flores poseen compuestos con posible efecto cicatrizante.



**Figura 42.** Efecto de extractos de planta silvestre *A. pichinchensis* sobre el cierre de herida.



**Figura 43.** Efecto de extractos de planta silvestre *A. pichinchensis* sobre la evolución del cierre de herida.

Se evaluaron los compuestos puros derivados de la planta silvestre y el resultado de esta actividad destaca a los compuestos **5**, **12** (obtenidos del extracto en AcOEt de hojas) y **19** (obtenido del extracto metanólico de flores) como posibles responsables del efecto cicatrizante observado en sus respectivos extractos de procedencia (figuras 44 y 45).

El compuesto **5** de tipo benzofurano ha sido reportado previamente en *A. pichinchensis* como antifúngico (Aguilar-Guadarrama et al., 2009), aunque no se ha demostrado científicamente su efecto cicatrizante; se ha demostrado que el compuesto **12** es un importante gastroprotectivo (Sánchez- et al., 2013), con respecto al compuesto **19** se ha identificado en especies de *Arnica montana* y *Arnica chamissonis* estas especies han sido evaluadas a nivel extracto y se ha demostrado su efecto cicatrizante, en especie de *A. pichinchensis* no se ha identificado este compuesto (Merfot et al., 1992).

Por lo tanto, este resultado sugiere que los compuestos **5**, **12** y **19** podrían promover el efecto cicatrizante que popularmente se atribuye a la especie vegetal *A. pichinchensis*.

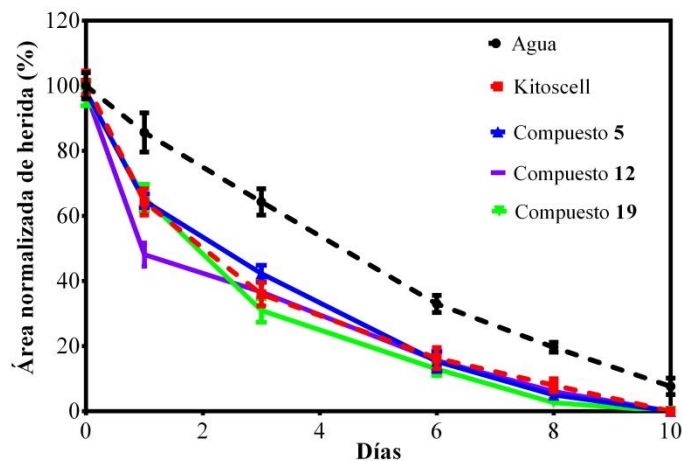


Figura 44. Efecto de los compuestos 5, 12 y 19 sobre el cierre de herida.

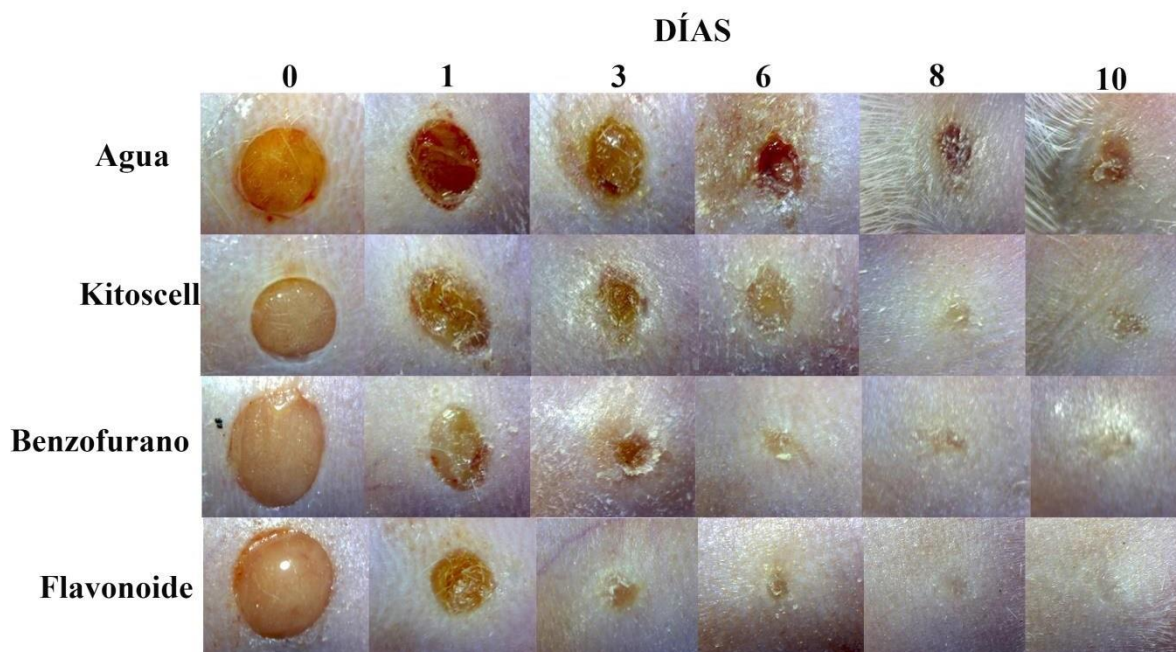
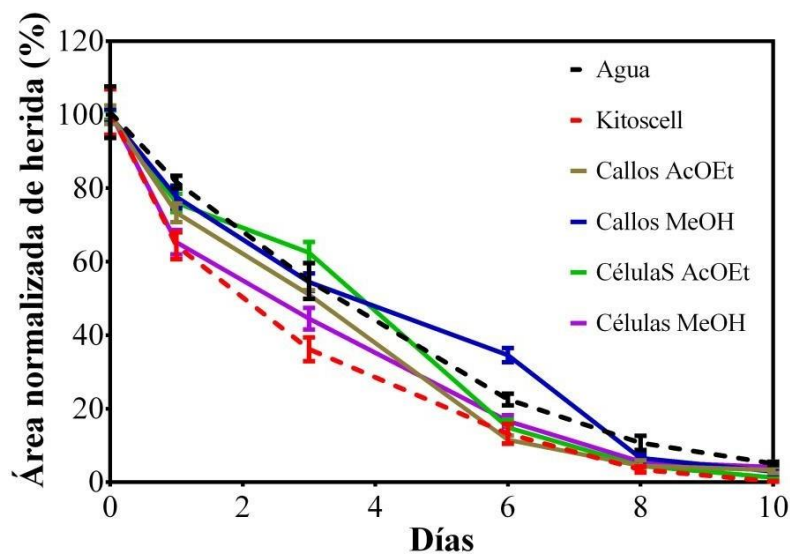
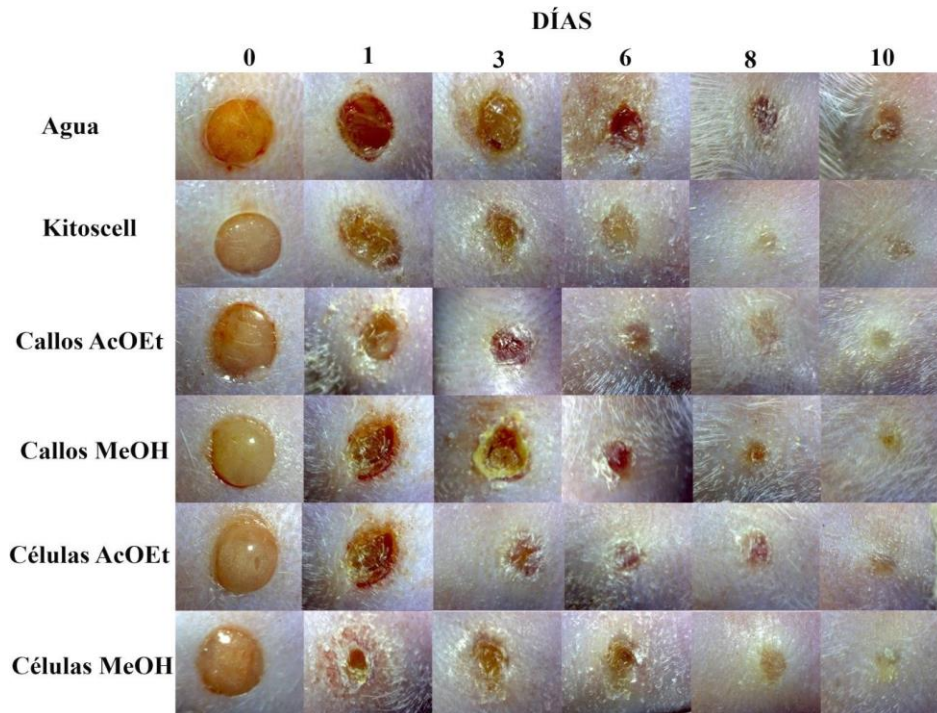


Figura 45. Efecto de compuestos 5, 12 y 19 sobre la evolución del cierre de la herida.

Con respecto a los extractos de los cultivos *in vitro* (figuras 46 y 47), se observa que el extracto de callos en AcOEt presentó un cierre de herida similar al control positivo a partir del día 6, es decir el contenido químico de este extracto puede estar promoviendo la fase proliferativa de la cicatrización; mientras que el extracto metanólico de células en suspensión promueve el cierre de herida de manera equiparable al control positivo durante las primeras 24 h.



**Figura 46.** Efecto cicatrizante de extractos de cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis*.

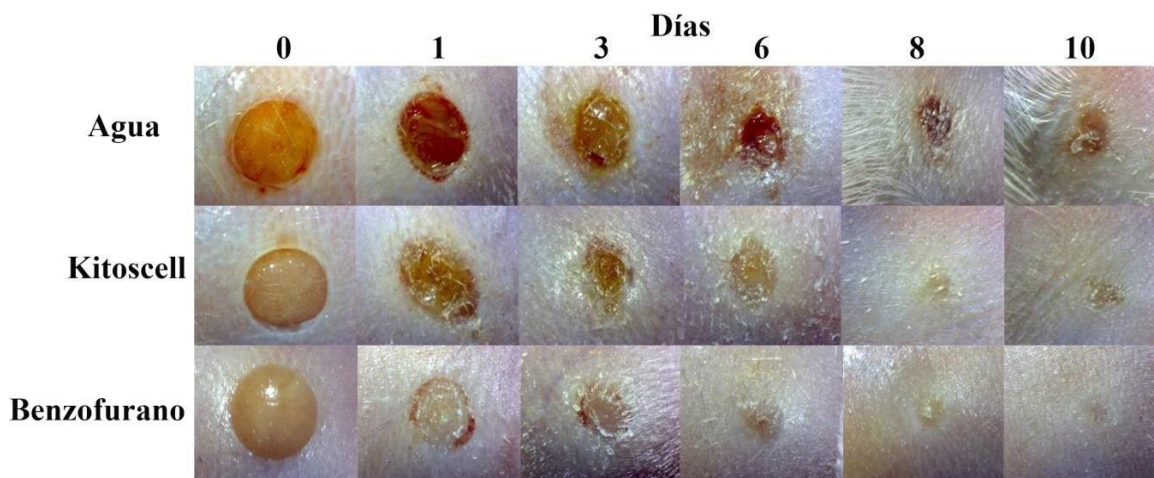


**Figura 47.** Efecto de extractos de cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis* sobre el cierre de la herida.

En la figura 48 se muestra el resultado de la actividad cicatrizante del compuesto **22** (aislado de los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión), se observa que es un compuesto con potencial como cicatrizante debido a que promueve el cierre de la herida de manera superior en comparación con el fármaco control, cabe señalar que hasta el momento este compuesto es el que ha demostrado un mejor efecto cicatrizante en comparación con los compuestos provenientes de la planta silvestre, aunque no es un compuesto novedoso, es la

---

primera vez que se obtiene de cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis*, la literatura reporta que ha sido aislado de *A. adenophora* (Zhou et al., 2013), sin embargo, no existen reportes de su efecto cicatrizante.

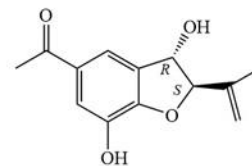
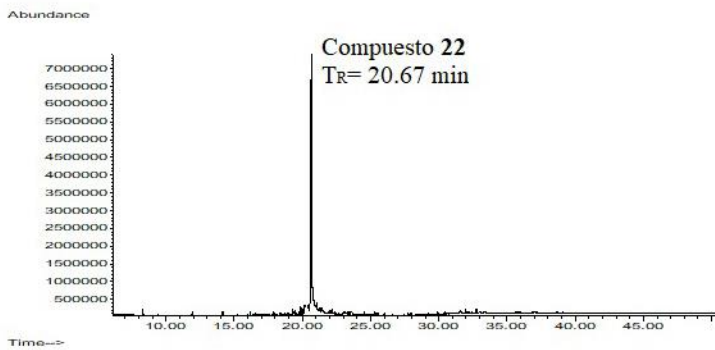


**Figura 48.** Efecto del compuesto (22) derivados de callos y células en suspensión de *A. pichinchensis* sobre el cierre de la herida.

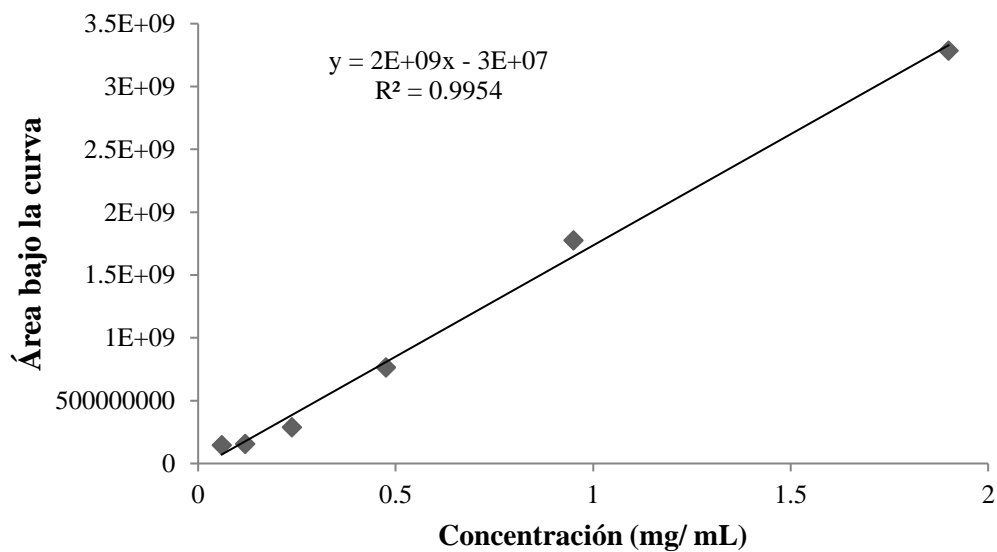
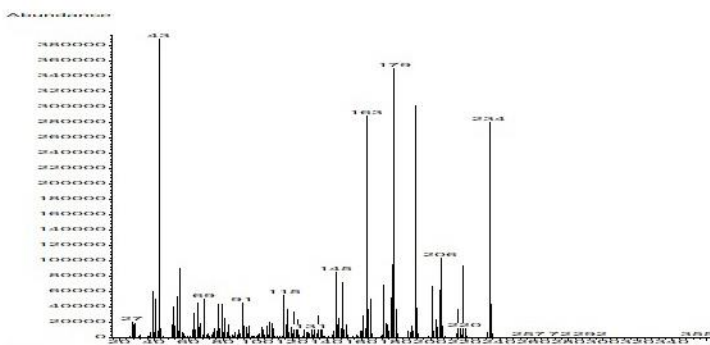
#### 7.4 Cuantificación de compuestos bioactivos en cultivos *in vitro* de *A. pichinchensis*

Los cultivos de callos y células en suspensión producen compuestos bioactivos que no se identificaron en la planta silvestre (compuestos **22** y **26**), el **22** fue un importante antiinflamatorio y cicatrizante, mientras que del **26** solo se ha demostrado su efecto antiinflamatorio, debido a ello se cuantificó su contenido en cultivos de callos de 30 días de edad y en las células en suspensión (durante la cinética de crecimiento).

Para la cuantificación se prepararon diluciones seriadas de cada compuesto (provenientes en este estudio a partir de los cultivos *in vitro*) y se obtuvieron sus curvas de cuantificación a partir de las áreas bajo la curva obtenidas por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM) mediante el análisis de los picos al tiempo de retención ( $T_r$ )= 20.67 min para el compuesto **22** y 38.70 min para el compuesto **26** con sus picos del ion molecular a  $m/z$ = 234 y 426 (compuesto **22** y **26**, respectivamente); para cada compuesto se analizaron tres muestras y la gráfica representa la media de esos datos (figuras 49 y 50, respectivamente).

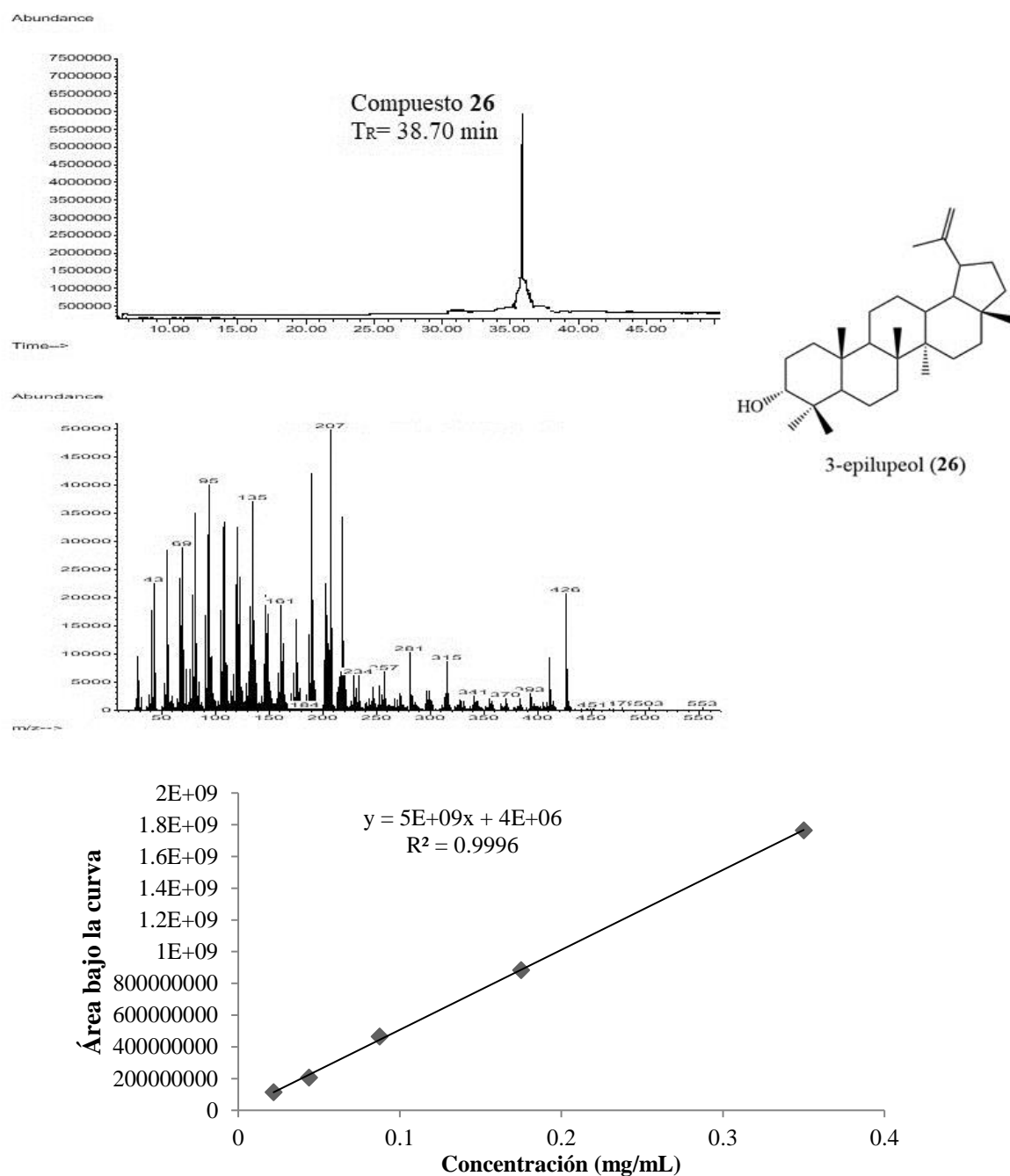


5-acetil-7,3 $\alpha$ -dihidroxi-2 $\beta$ -(1-isopren)-  
2,3-dihidrobencofurano (22)



**Figura 49.** Patrón de fragmentación y curva estándar del compuesto 22.





**Figura 50.** Patrón de fragmentación y curva estándar del compuesto 26.

Se tomó una alícuota de 2.5 mg del extracto de callos en AcOEt (provenientes de biomasa seca de un cultivo de callos de 30 días de edad) libre de disolvente y se resuspendió en 1.0 mL de AcOEt para posteriormente ser analizado por CG-EM, su área se correlacionó con la curva estándar de cada compuesto (22 y 26) con la finalidad de determinar su contenido expresados en mg de compuesto por cada gramo de biomasa, se

encontró que el extracto contiene  $0.65 \pm 0.011$  mg/ g de biomasa seca para del compuesto **22**, mientras que para el compuesto **26** se determinó un  $0.2011 \pm 0.015$  mg/g biomasa seca (figuras 51 y 52).

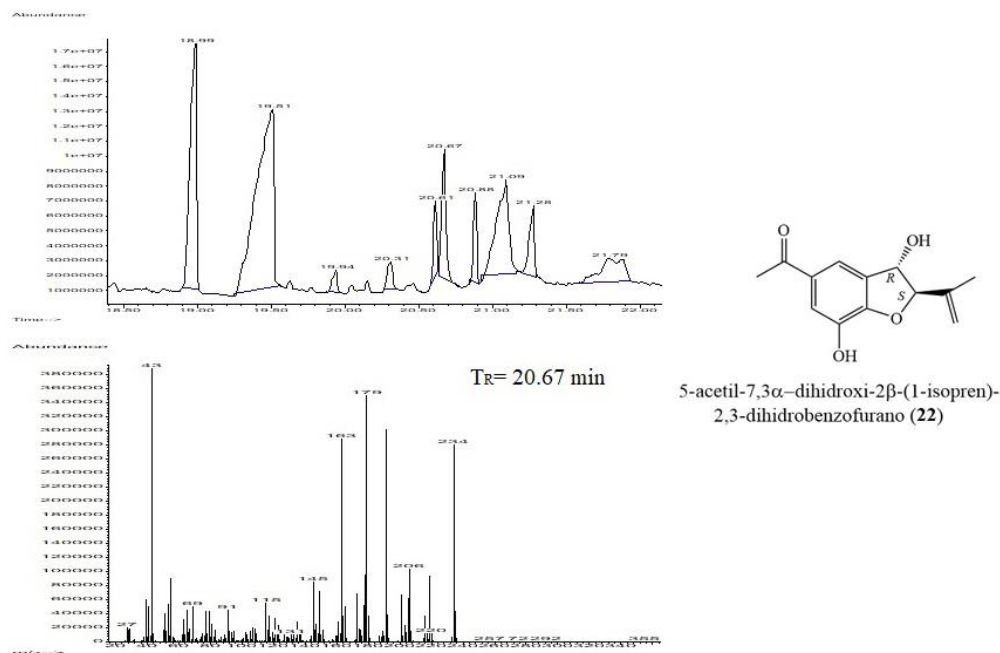


Figura 51. Identificación del compuesto **22** en el extracto de callos.

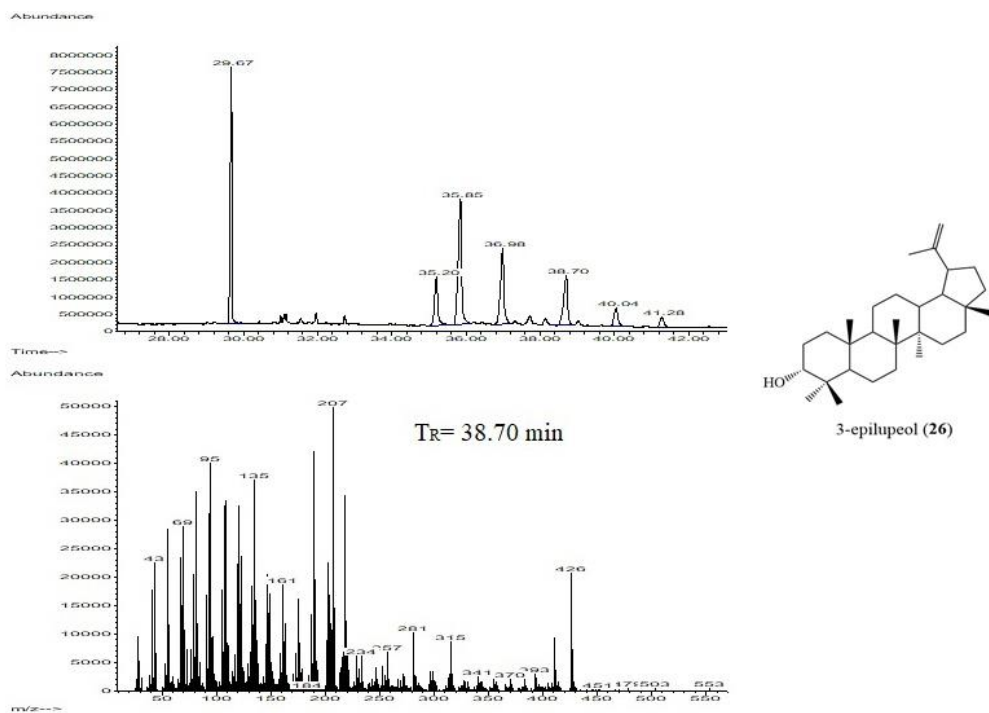


Figura 52. Identificación del compuesto **26** en el extracto de callos.

Estos compuestos no fueron identificados en los extractos de planta silvestre (figura 53), por lo que este resultado sugiere que la adición de ANA y KIN (1.0/ 0.1 mg L<sup>-1</sup>) al medio de cultivo fue esencial para la producción de los metabolitos bioactivos **22** y **26** mediante el cultivo de callos derivados de segmentos de hojas de plántulas *in vitro*.

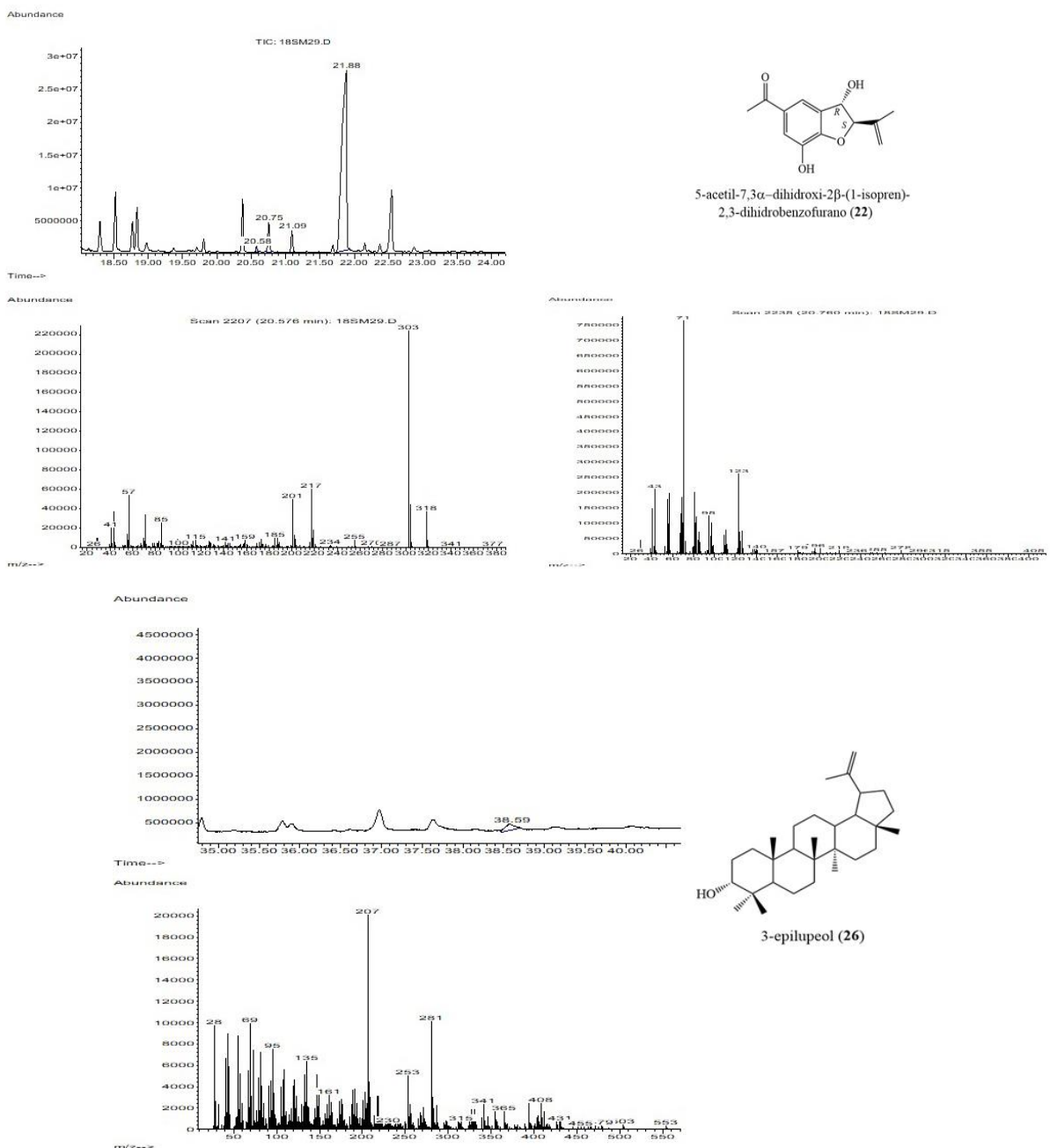
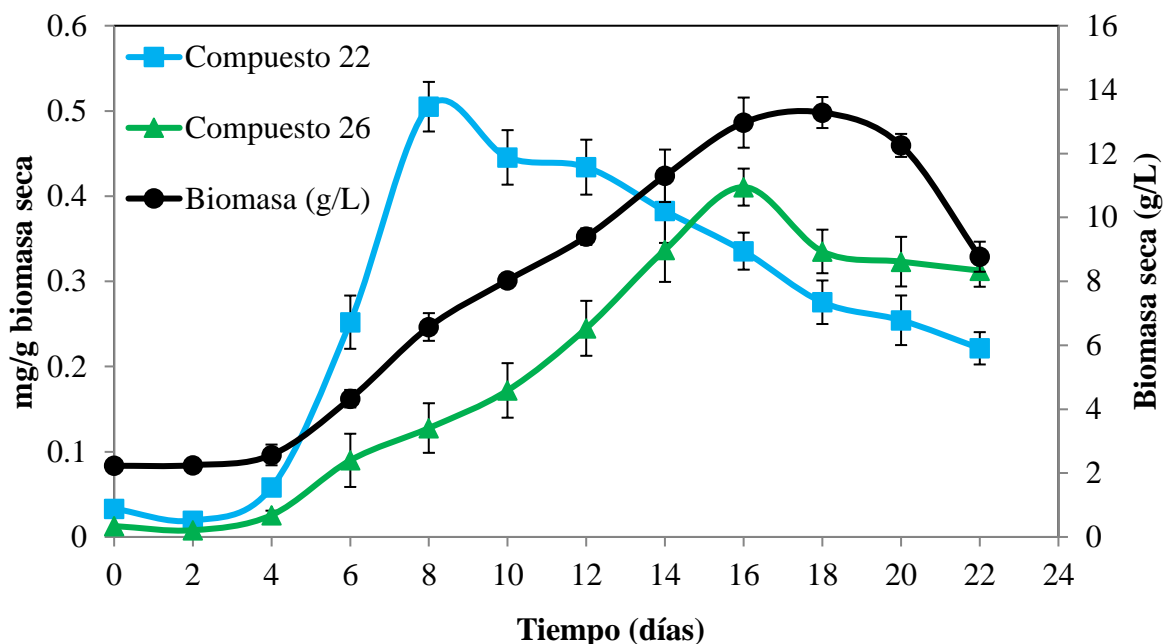


Figura 53. Patrón de fragmentación y curva estándar del compuesto **22** y **26**.

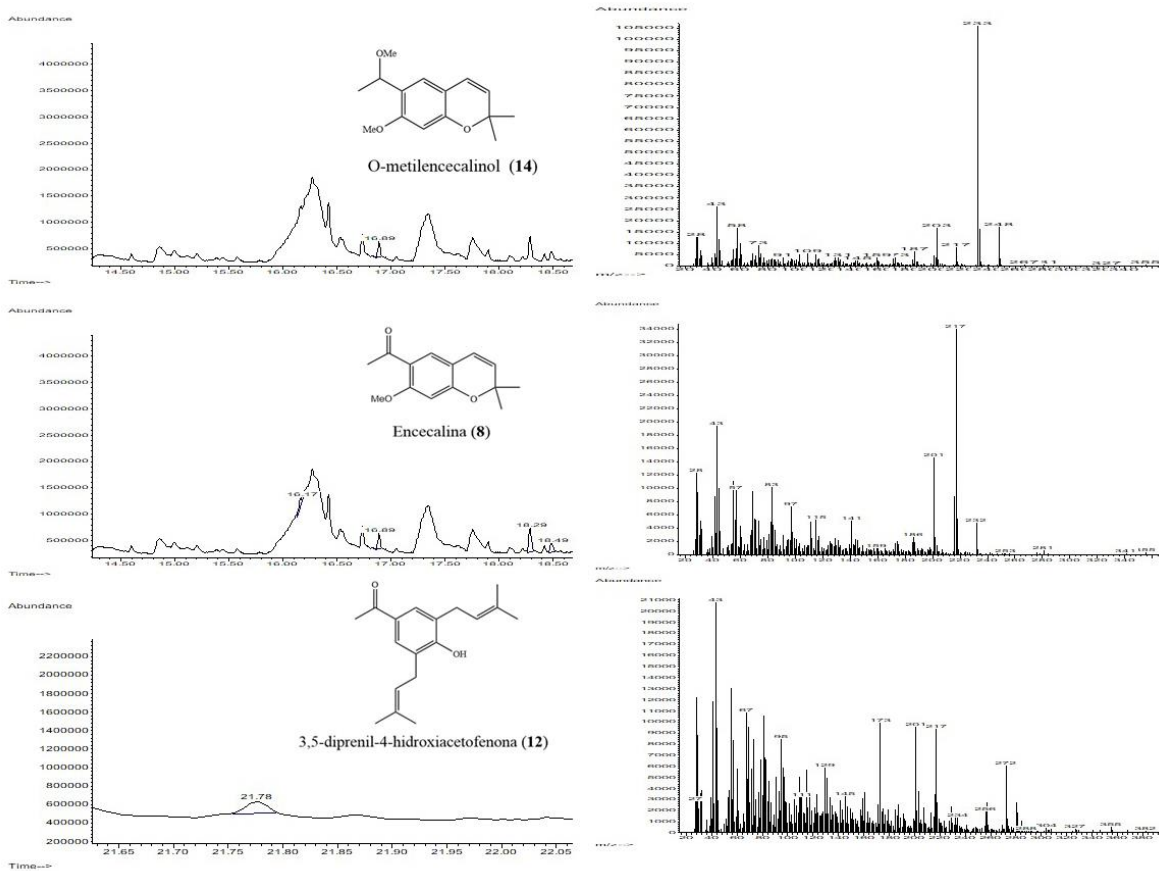
En la cinética del cultivo de células en suspensión se encontró que la producción máxima del compuesto **22** ocurre en la fase exponencial (día 8) obteniendo  $0.50 \pm 0.029$  mg g<sup>-1</sup> de biomasa seca (figura 54), mientras que la producción máxima del compuesto **26** fue de  $0.41 \pm 0.037$  mg g<sup>-1</sup> de biomasa seca en el día 16.



**Figura 54.** Cinética de crecimiento de células en suspensión de *A. pichinchensis* y producción de los compuestos **22** y **26**.

Por lo tanto, los cultivos de células en suspensión producen en menor tiempo los compuestos bioactivos identificados hasta el momento (**22** y **26**) en comparación con los cultivos de callos, este resultado sugiere que las células en suspensión reproducen los metabolitos secundarios producidos por los callos. Este resultado es importante debido a que podemos continuar estudiando el cultivo con la finalidad de incrementar los rendimientos de estos compuestos mediante el uso de elicitores que promuevan su acumulación.

Por otro lado, se identificaron en los cultivos de células en suspensión compuestos que han sido aislados de *A. pichinchensis* (figura 55) como enecalina (**8**) y acetofenona (**12**) y *O*-metilencecalinol (**14**), en el caso de la primera se ha demostrado que es un importante antifúngico (Romero-Cerecero et al., 2012). Cabe señalar que estos compuestos aún no han sido cuantificados en nuestro estudio.



**Figura 55.** Compuestos identificados en los cultivos de células en suspensión previamente aislados en plata silvestre de *A. pichinchensis*.

Por lo tanto, mediante los cultivos de células en suspensión de *A. pichinchensis* ha sido posible producir metabolitos secundarios bioactivos que no se habían identificado en la planta silvestre así como compuestos bioactivos producidos por la planta silvestre.

---

## 8. CONCLUSIONES

---

Se estableció un cultivo de callos de *A. pichinchensis* a partir de explantes de hoja provenientes de plántulas de 1 mes de edad cultivadas *in vitro*, los RCV que promueven callos friables son ANA y KIN (1.0 y 0.1 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), estos RCV fueron determinantes en la producción de 11 (**20-30**) metabolitos secundarios, de los cuales **23** y **25-29** se describieron previamente en la literatura con propiedades antiinflamatorias, además producen metabolitos (**20-22**, **25** y **26**) que no han sido identificados en especies de *A. pichinchensis*.

Se demostró por primera vez que los compuestos **19** (aislado de planta silvestre) y **22** (proveniente de cultivos de callos y células en suspensión) inhiben eficazmente la producción de factores proinflamatorios inducidos por LPS como NO, IL-6 y TNF en macrófagos RAW 264.7 (solo compuesto **22**) y la activación del NF-κβ en macrófagos RAW-Blue sin causar citotoxicidad, por lo tanto estos compuestos pueden considerarse agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.

A partir de los callos friables se obtuvo una línea de células en suspensión, cuya cinética de crecimiento mostró un comportamiento sigmoideo con una duración de 22 días, la producción máxima de biomasa se alcanzó a los 16 días de edad (13.28 ± 0.4855 g L<sup>-1</sup>) con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.2303 días<sup>-1</sup> y tiempo de duplicación de 3.01 días, se identificaron metabolitos secundarios durante toda la cinética, observando mayor acumulación en la fase estacionaria.

El estudio fitoquímico de biomasa seca del cultivo de células en suspensión reproduce la producción de los compuestos identificados en los cultivos de callos a excepción del compuesto **20**. El cultivo de células en suspensión logró el incremento de los compuestos antiinflamatorios (**22** y **26**) en un 9.49% y además biosintetiza los compuestos **8**, **12** y **14** que han sido aislados de *A. pichinchensis*.

De los 12 compuestos aislados de planta silvestre los metabolitos **5**, **12** y **19** promovieron el efecto cicatrizante en el modelo *in vivo* de incisión dorsal, esto respalda el uso popular cicatrizante que se atribuye a la especie vegetal *A. pichinchensis*.

---

## **8. PERSPECTIVAS**



---

1. Cuantificar los compuestos bioactivos identificados en los cultivos de células en suspensión y compararlos con respecto a los rendimientos de estos compuestos en la planta silvestre.

2. Incrementar el rendimiento de los compuestos bioactivos producidos por el cultivo de células en suspensión mediante el uso de elicitores.

3. Determinar el efecto cicatrizante mediante modelos *in vitro* de los compuestos que mostraron efecto cicatrizante significativo *in vivo*.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

Aguilar-Guadarrama B., Navarro V., León-Rivera I., Rios M. Y. 2009. Active compounds against tinea pedis dermatophytes from *Ageratina pichinchensis* var. *bustamenta*. *Natural Product Research* 16, 1559-1565.

Bhalla R., Narasimhan K. Swaup S. 2005. Metabolomics and its role in understanding celular responses in plants. *Plant Cell Reports* 24, 562-571.

Blair S., Mesa J., Correa A., Carmona-Fonseca J., Granados H., Sáez J. 2002. Antimalarial activity of neurolenin B and derivates of *Eupatorium inulaefolium* (Asteraceae). *Die Pharmazie* 57, 1-3.

Bremer K. 1994. Asteraceae. Cladistics and classification. Timber Press. Portland, USA, 752 pp.

Cáceres A., Menéndez H., Cohobón E., Samayoa B. E., Jauregui E., Peralta E., Carrillo G. 1995. Antogonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmited diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 48, 85-88.

Clavin M., Gorzalczany S., Macho A., Muñoz E., Ferrato G., Acevedo C., Martino V. 2007. Anti-inflammatory activity flavonoids of *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Etnopharmacology* 112, 585-589.

Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) American Society of Plants Physiologists, Chapter 24, pp. 1250-1318.

Del Barrio G., Spengler I., García T., Roque A., Álvarez A. L., Calderón S. J., Parra F. 2011. Antiviral activity of *Ageratina havanensis* and major chemical compounds from the most active action. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 915-920.

Fang N., Mabry J. T. 1988. Sesquiterpenes from *Ageratina tomentella*. *Phytochemistry* 27, 283-285.

Funk V. A., Susanna A., Steussy T. F., Robinson H. E. 2009. Classification of Compositae. In: Funk V. A., Susana A., Stuessy T. F., Bayer R. J. (Eds.) *Systematics*,

---

evolution and biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy (IAPT). Viena, Austria pp. 171-189.

García P., del Río R. E., Guzmán R., Martínez G. M. I., Scior T. R. F. 2011b. Preliminary studies on the analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in two termal models of acute pain. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 42, 45-51.

García P., García S., Martínez G., Scior R. F., Salvador J. L., Martínez M. M., del Río R. E. 2011a. Analgesic effect of leaf extract from *Ageratina glabrata* in the hot plate test. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 928-935.

García S. E., Ramírez L. C. B., del Río T., Martínez P. 2011. A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatoriae) from Michoacan. *International Journal of Experimental Botany* 80, 139-146.

Gómez F., Quijano L., Calderón J. S., Perales A., Rios T. 1982. 2,2-Dimethychromenes from *Eupatorium aschbornianum*. *Phytochemistry* 21, 2095-2097.

Gupta M., Mazumder U. K., Chaudhuri I., Chaudhuri R. K., Bose P., Bhattacharya S., Manikandan L., Patra S. 2002. Antimicrobial activity of *Eupatorium Ayapana*. *Fitoterapia* 73, 168-170.

Habtemariam S. 1998. Extract of gravel root (rhizome of *Eupatorium purpureum*) inhibits integrin-dependent U937 cell adhesión. *Phytotherapy Research* 12, 422-426.

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, 1222-1239.

Katinas L., Gutiérrez D.G., Grossi M. A., Crisci J.V. 2007. Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la sociedad Argentina de botánica* 42, 113-129.

---

Lima T., Santos A. D., Costa D. T. M., Souza R. J., Barison A., Steindel M., Biavatti M. W. 2015. Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 25, 7-10.

Maia J., Zoghbi M., Da Silva H., Andrade E. 1999. Essential oils of *Eupatorium triplinerve* Vahl and *E. paniculatum* Poepp. et Endl. *Journal of Essential Oils Research* 11, 541-544.

Monroy O. C., Castillo P. 2007. Medicinal plants used in the state of Morelos 2nd edition. Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 69.

Mulabagal V., Tsay H. 2004. Plant cell cultures as a source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal Applied Sciences and Engineering* 2, 29-48.

Muñoz B. P., Rojas F. L., Robles J., Fiorentino S., Hernández J., Orduz-Díaz L. L., Pombo O. L. 2016. Evaluation of cytotoxic activity of extracts and fractions of species *Conyza trihecatactis* and *Ageratina vacciniaefolia*. *Revista de Facultad de Ciencias Básicas* 12, 212-227.

Muñoz M., Esparza G., González A., Bascones A. 2009. Oral ulcers: clinical aspects. A tool for dermatologists. Part 1. Acute ulcers. *Clinical Explan Dermatological* 34, 289-294.

Murray R. D. H. 1989. Coumarins. *Natural Products Reports* 591-624

Navarro V. M., González A., Fuentes M., Avilez M., Rios M. Y., Zepeda G. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 87, 85-88.

Ocegueda S., Moreno S. E., Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO Biodiversitas* 62, 12-15.

Ortiz B. E., Villaseñor J. L., Téllez O. 1998. La familia Asteraceae en el estado de Nayarit (México). *Acta Botánica Mexicana* 44, 25-57.

---

Pichersky E., Gang D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sciences* 5, 439-445.

Rios M. Y., Aguilar-Guadarrama B., Navarro V. Two new benzofuranes from *Eupatorium aschembornianum* and their antimicrobial activity. *Planta Medica* 69, 967-970.

Romero-Cerecero O., Rojas G., Navarro V., Herrera-Arellano A., Zamilpa-Álvarez A., Tortoriello J. 2006. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Ageratina pichinchensis* on patients with tinea pedis: an explorative pilot study controlled with ketoconazole. *Planta Medica* 72, 1257-1261.

Romero-Cerecero O., Zamilpa A., González-Cortazar M., Alonso-Cortés D., Jiménez-Ferrer E., Nicasio-Torres P., Aguilar-Santamaría L., Tortoriello J. Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*. *Planta Medica* 79, 622-627.

Rzedowski J. 1972. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. *Cienc. Mex.* 27, 123-132.

Sajc L., Grubisic D., Vunjak G. 2000. Bioreactors for plant engineering: An Outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4, 89-99.

Sasikumar J. M., Doss A.P.A., Doss A. 2005. Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. *Fitoterapia* 76, 240-243.

Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H., Rocha-Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de fitopatología* 21, 355-363.

Silva-Sánchez B., Gómez-Hurtado A., Beiza-Granados L., del Río R. E., Rodríguez-García G. 2017. Caracterización química y espectroscópica de flavonoides de *Ageratina brevipes*. *Ciencia Nociáita* 70, 94-104.

Smith N., Mori S. A., Henderson A., Stevenson Wn., Heald S. V. 2004. Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press. Princeton, USA 694 pp.

---

---

Vanisree M., Tsay H-S. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O., Quax W. (Eds.) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 267-285. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Velasco J., Barreto S., Buitrago D., Vivas R. 2006. Antimicrobial activity of extracts from *Ageratina neriifolia* (Asteraceae). Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences at La Universidad de Zulia 14, 411-414.

Verportee R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Discovery Today 3, 232-238.

Villaseñor J. L. 1993. La familia Asteraceae en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 44, 117-124.

Villaseñor J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. Interciencia 28, 160-167.

Villaseñor J. L. 2018. Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. Botanical Sciences 96, 332-358.

Villaseñor J. L., Ortíz E., Juárez V. 2004. Asteraceae. In: García-Mendoza A. J., Ordoñez M. J., Briones-Salas M. (Eds.). Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza-World wildlife fund. México, D. F., México pp. 177-192.

Villaseñor J. L., Ortíz Y. E. 2013. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad 83, 905-928.

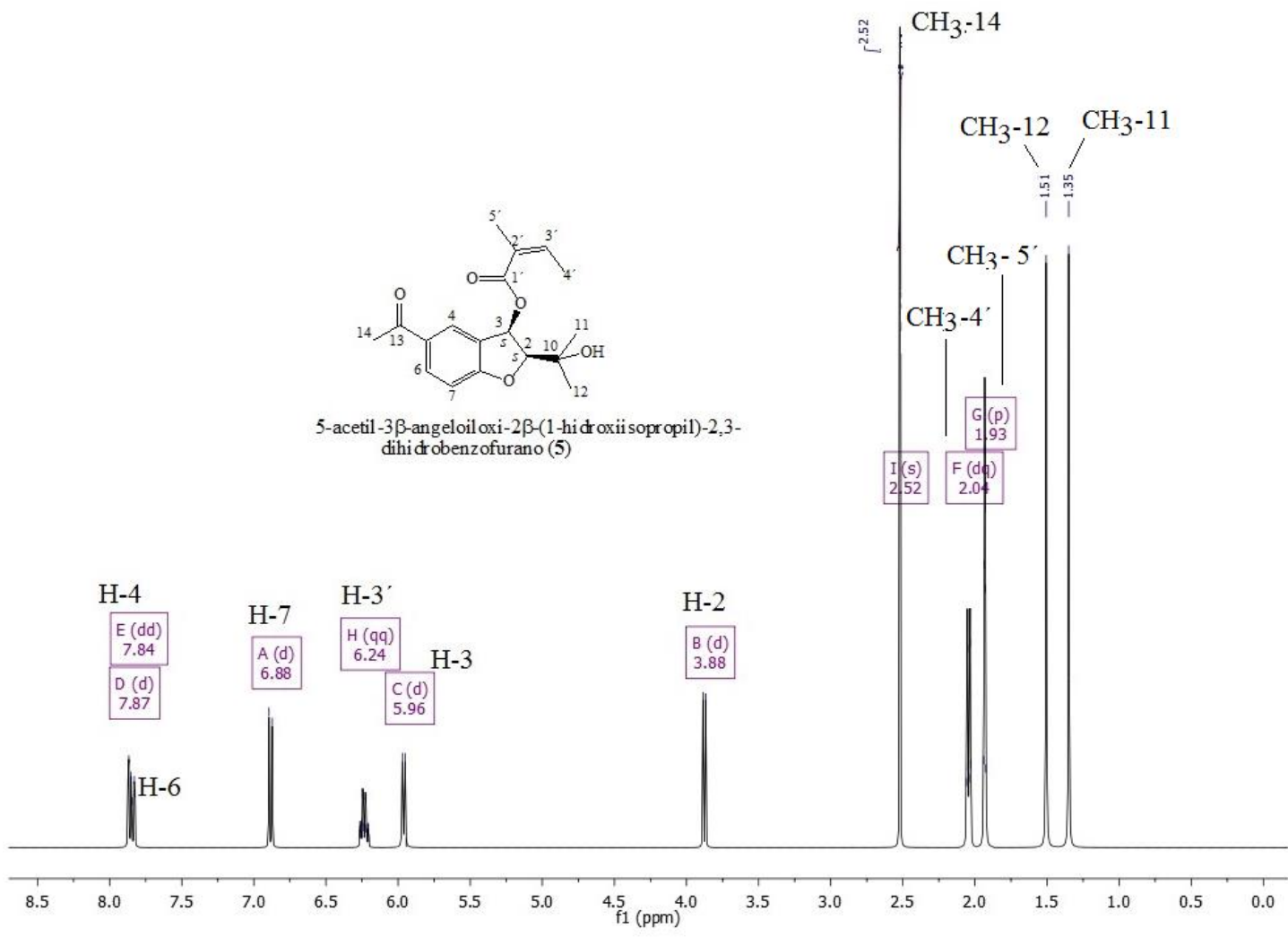
Villaseñor J. L., Rosell J. A., Ortíz E. 2007. Plant families as predictors of plant biodiversity in Mexico. Diversity and Distributions 13, 871-876

Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64, 3-19.

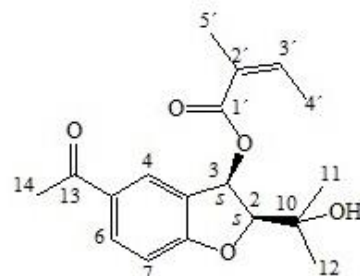
---

Zhang M. L., Wu M., Zhang J. J., Irwin D., Gu Y. C., Shi Q. W. 2008. Chemical constituents of plants from Genus Eupatorium. *Chemistry and Biodiversity* 5, 40-55.

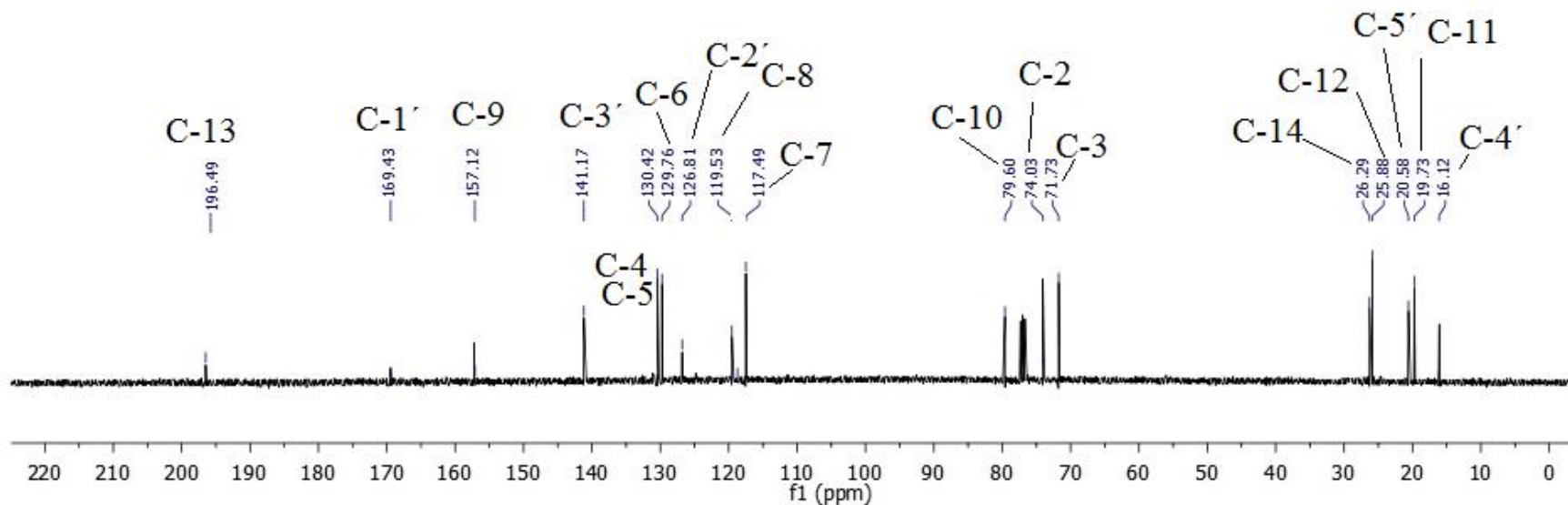




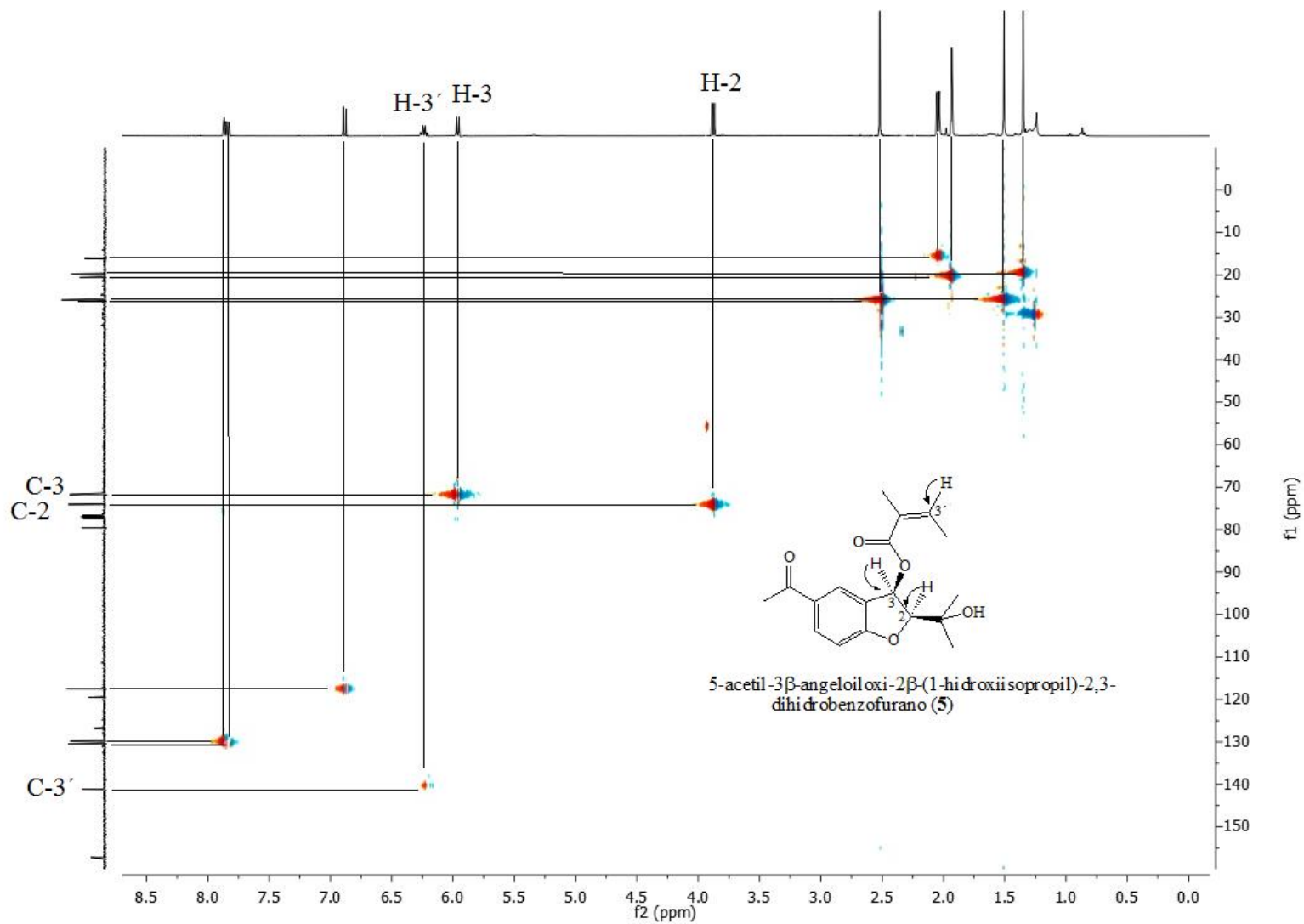
**Espectro 1.** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Chloroform-d) de 5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (5).



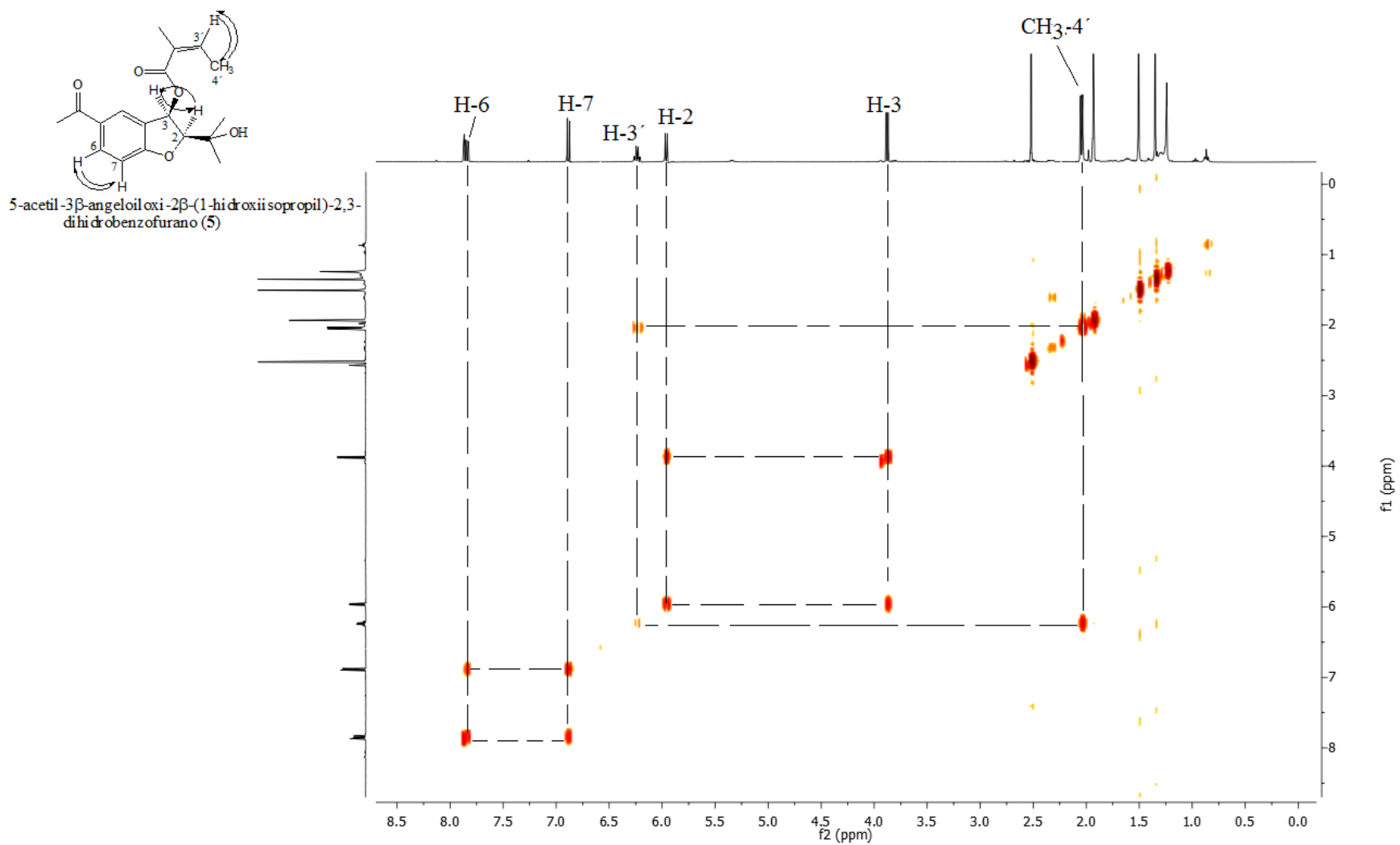
5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (5)



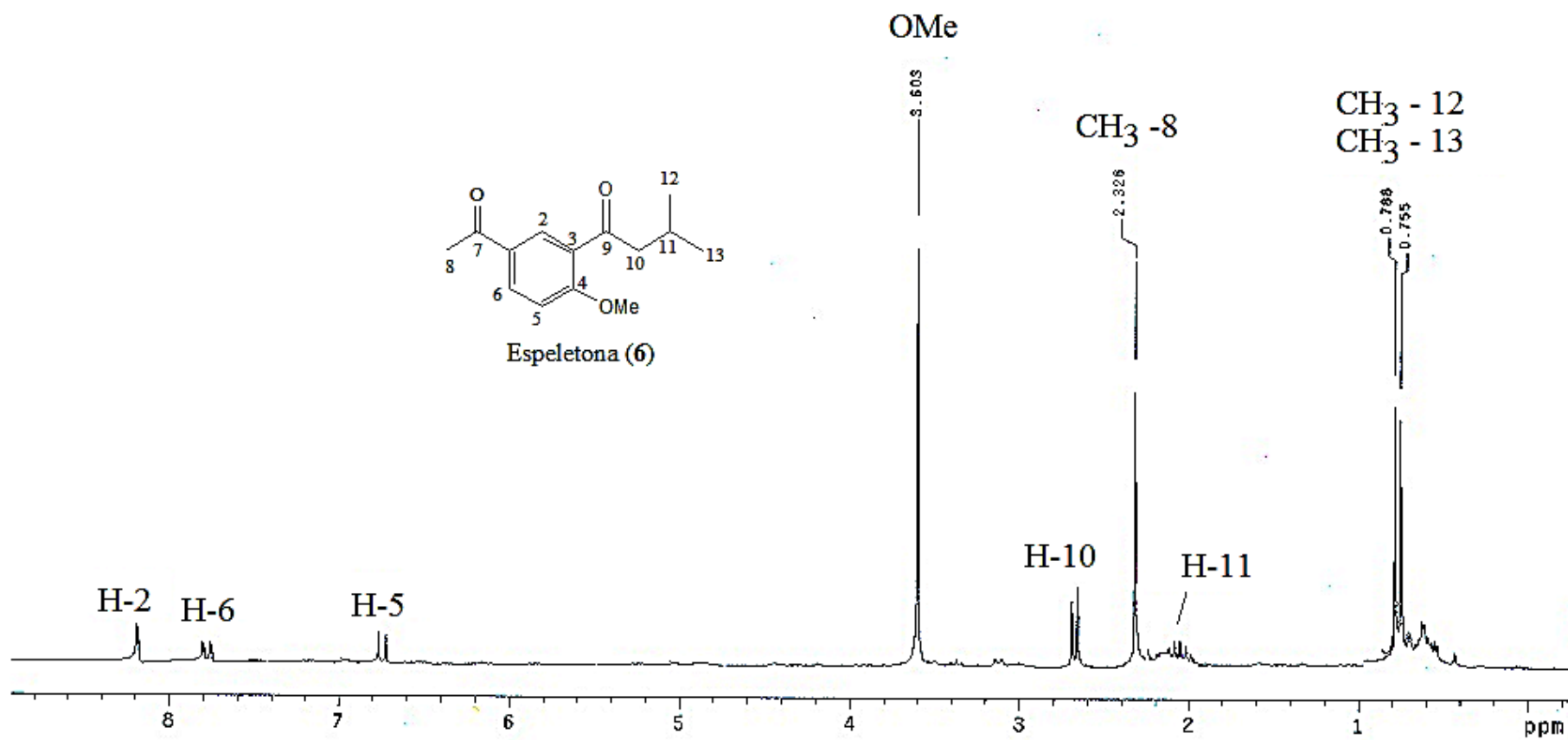
**Espectro 2.**  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{cdCl}_3$ ) de 5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (5)



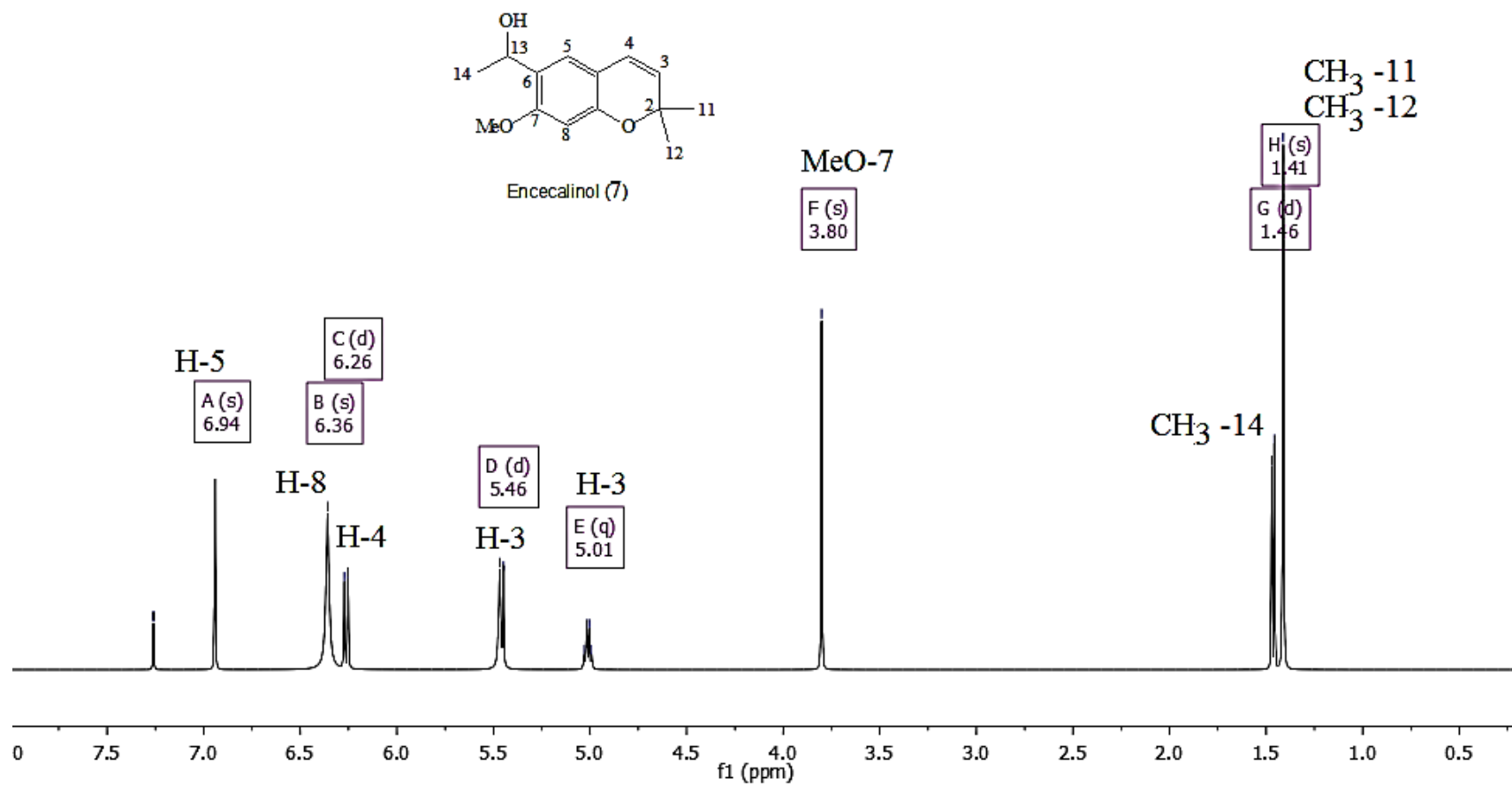
**Espectro 3.** HSQC (400 MHz, cdcl<sub>3</sub>) de 5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (5)



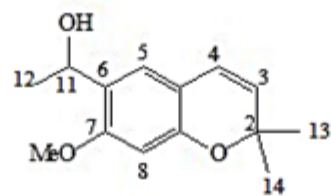
**Espectro 4.COSY (400 MHz, cdCl<sub>3</sub>) de 5-acetil-3β-angeloiloxi-2β-(1-hidroxiisopropil)-2,3-dihidrobenzofurano (5)**



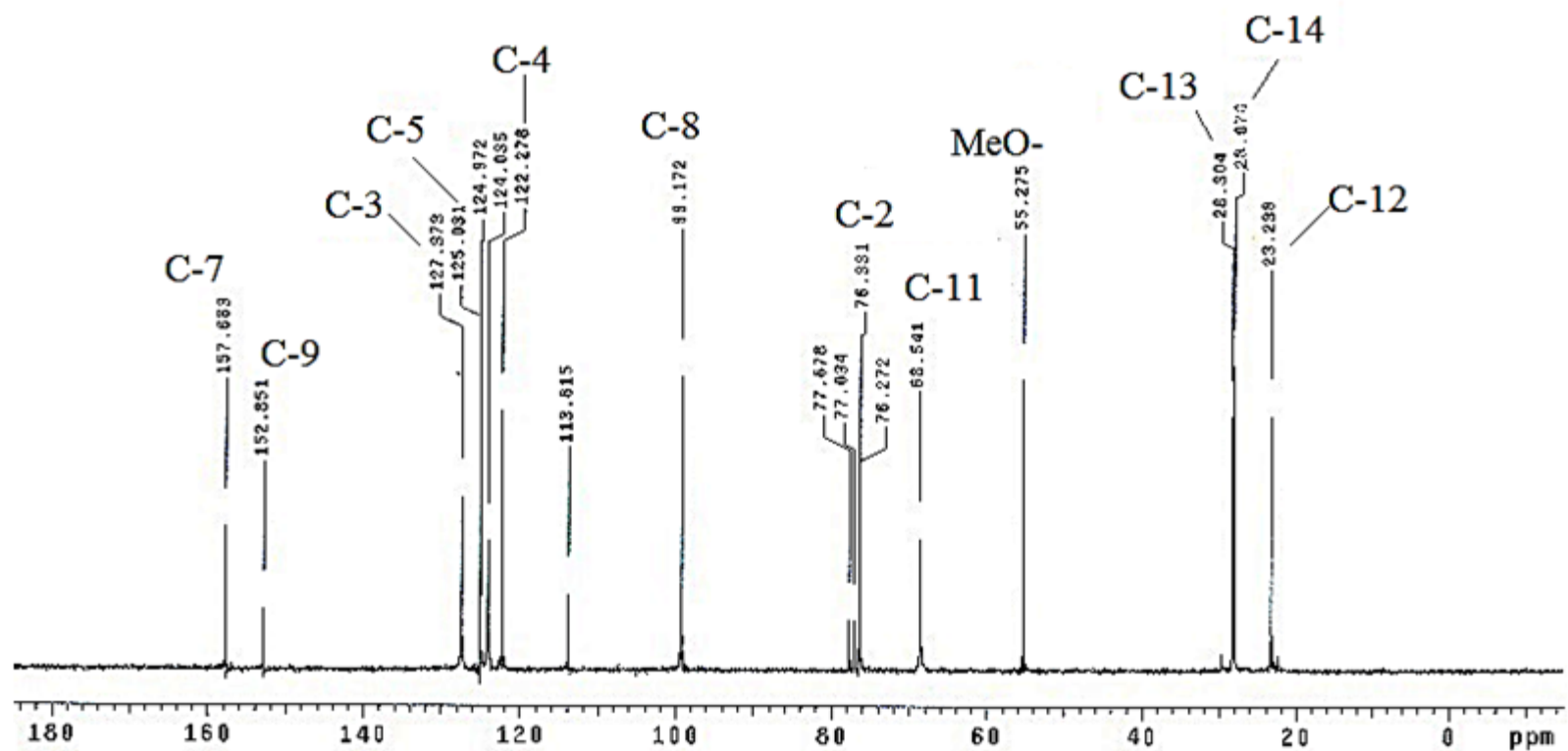
**Espectro 5.** <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, Chloroform-d) de espeletona (6)



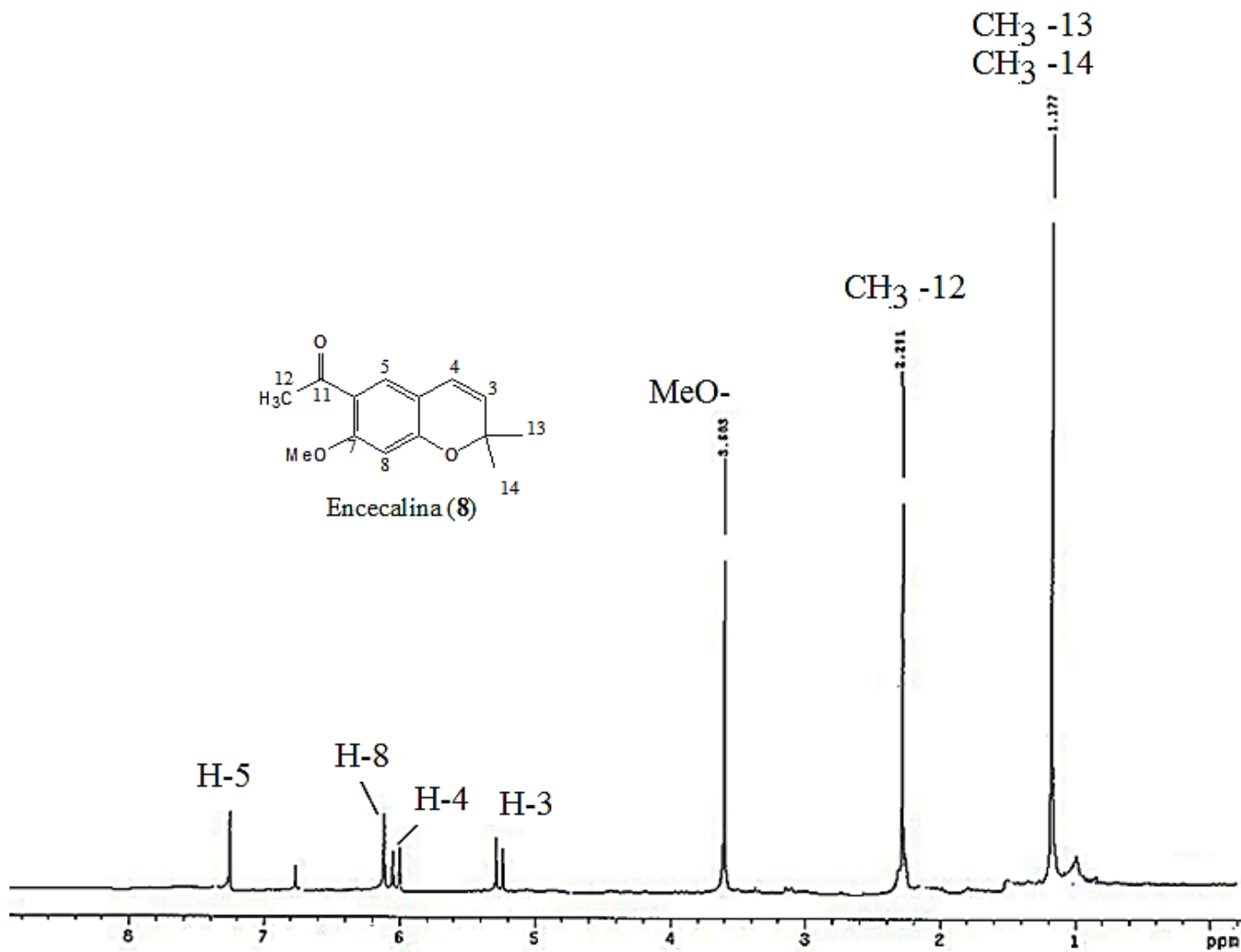
**Espectro 6.** <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Chloroform-d) de Encecalinol (7)



Encecalinol (7)

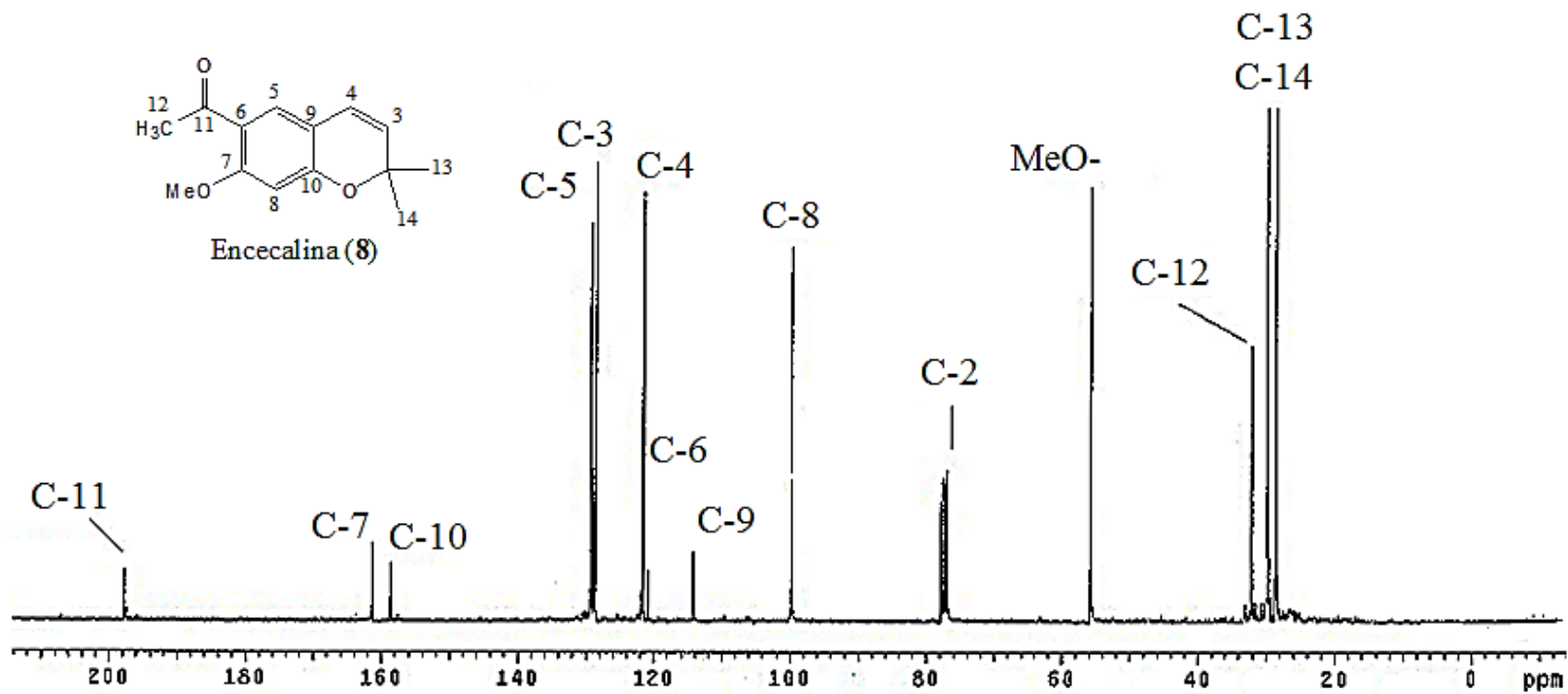


Espectro 7.  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, Chloroform-d) de Encecalinol (7)

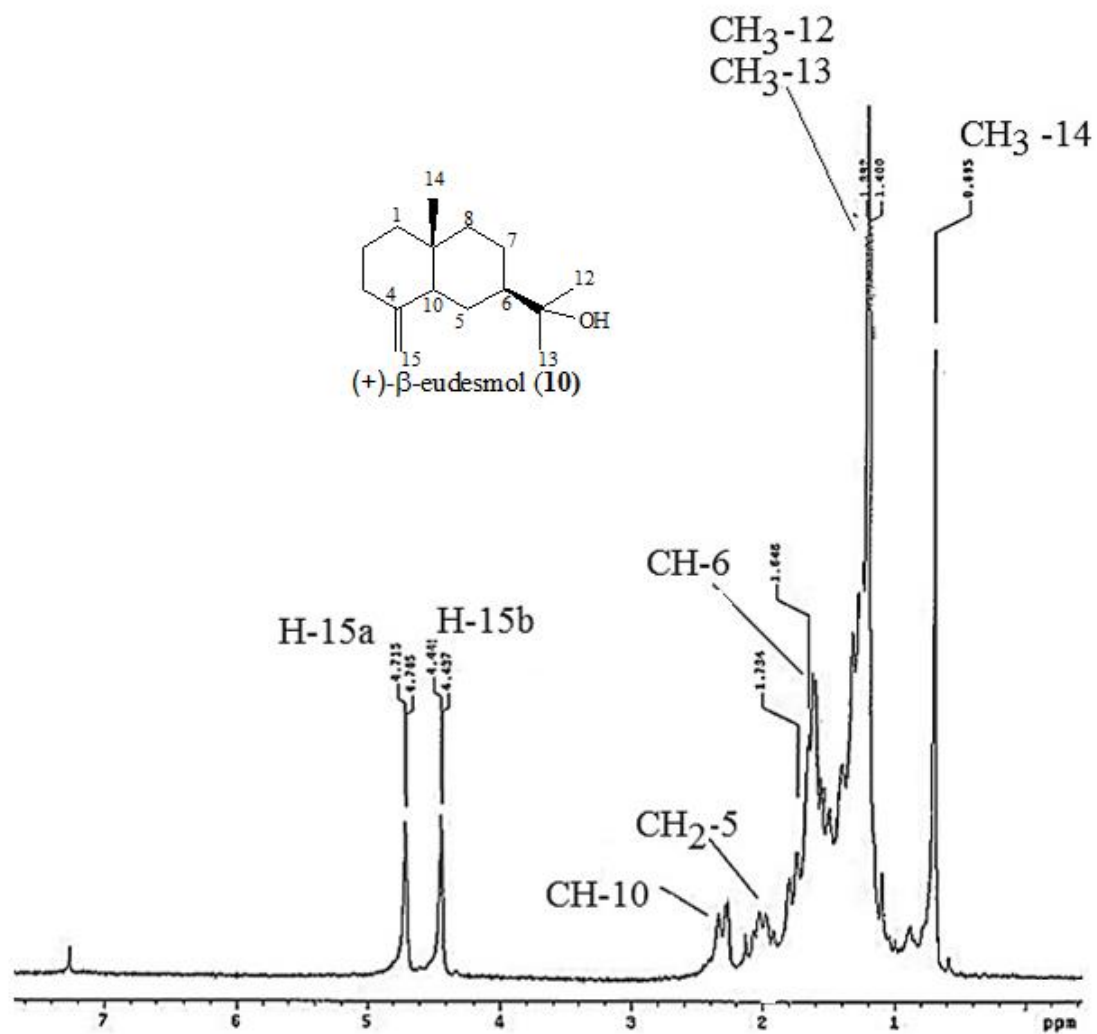


Espectro8. <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Encecalina (8)

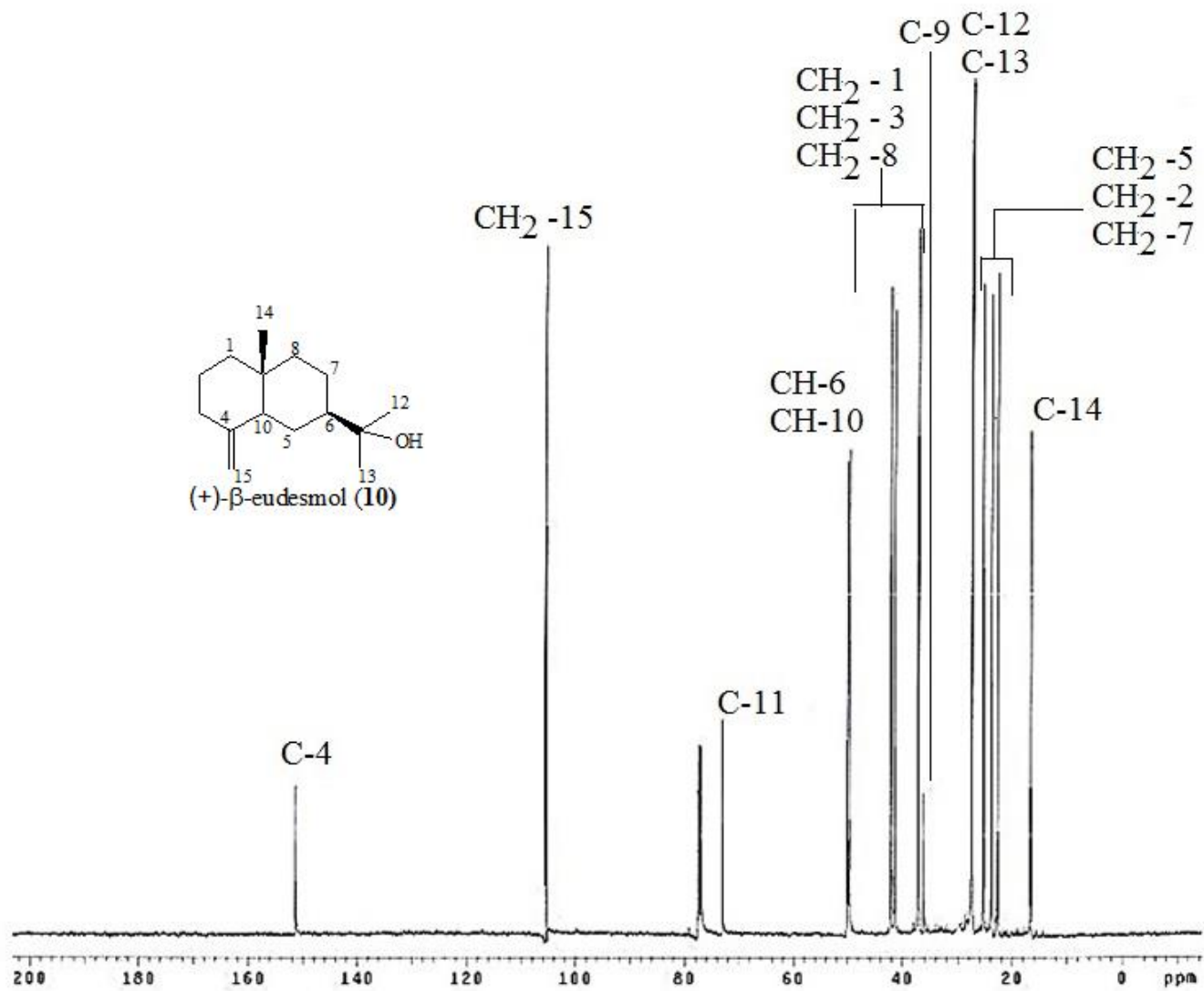




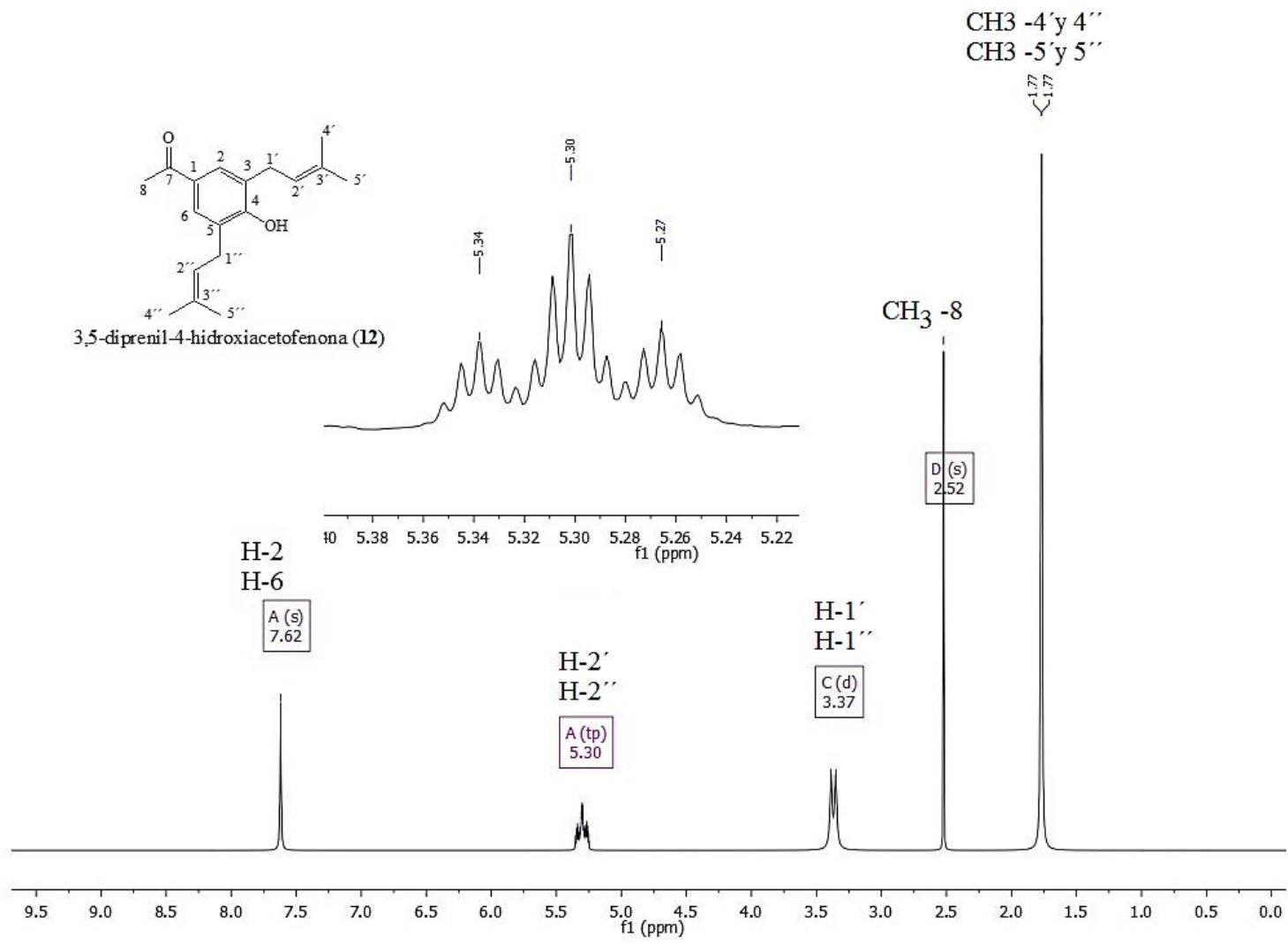
**Espectro 9.** <sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Encecalina (8)



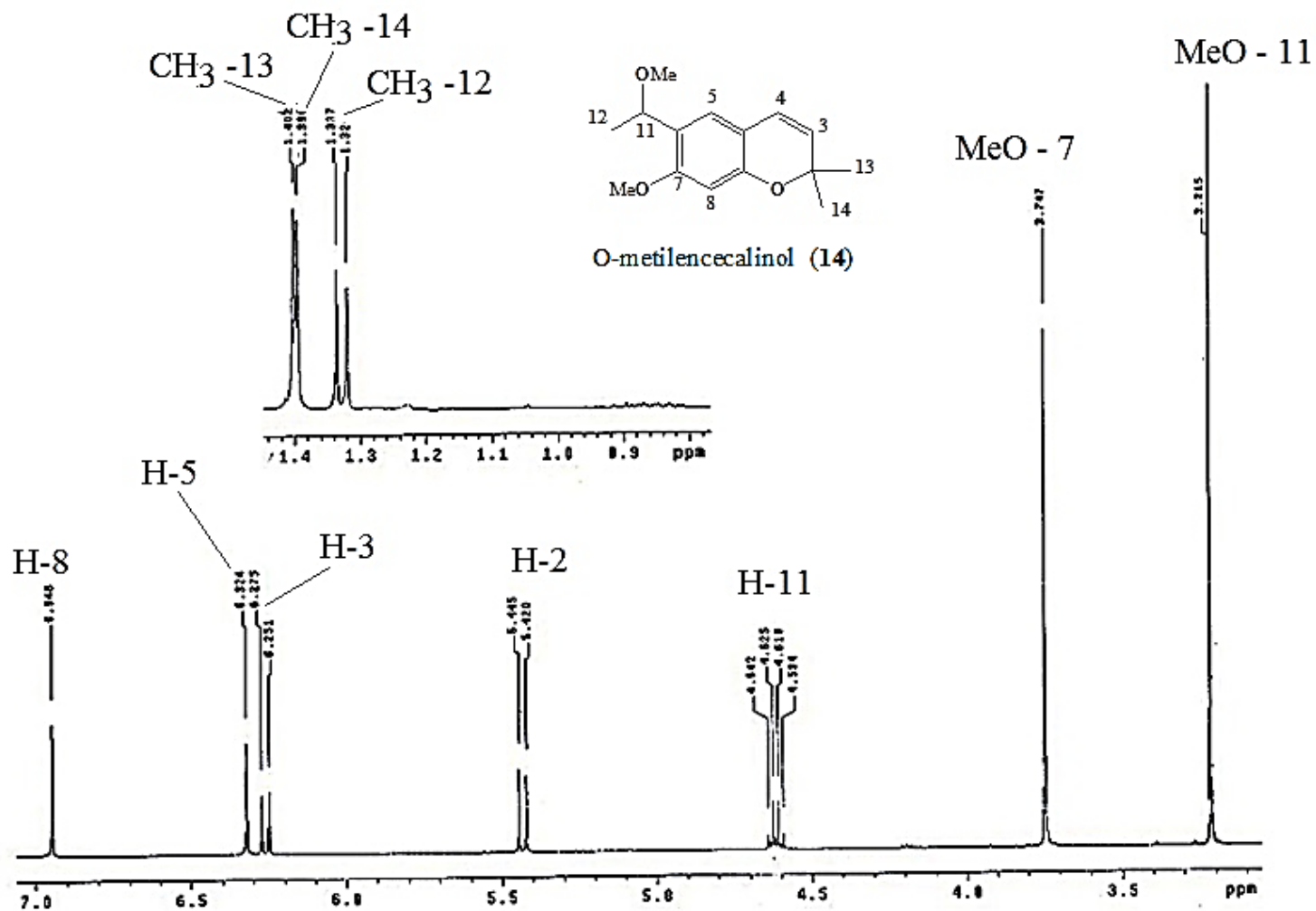
**Espectro 10.** <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de (+)-β-eudesmol (10)



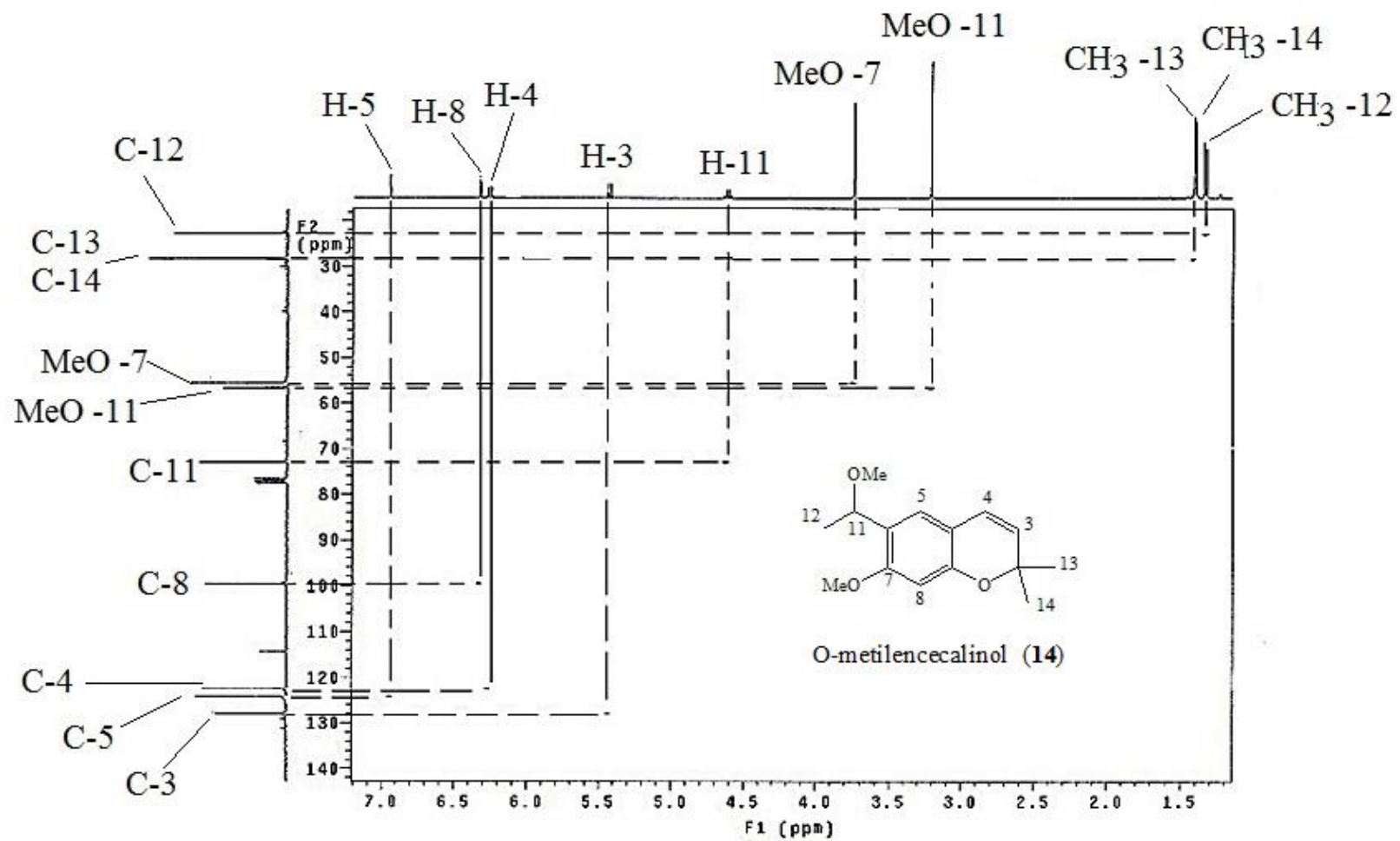
**Espectro 11.**  $^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de (+)- $\beta$ -eudesmol (10)



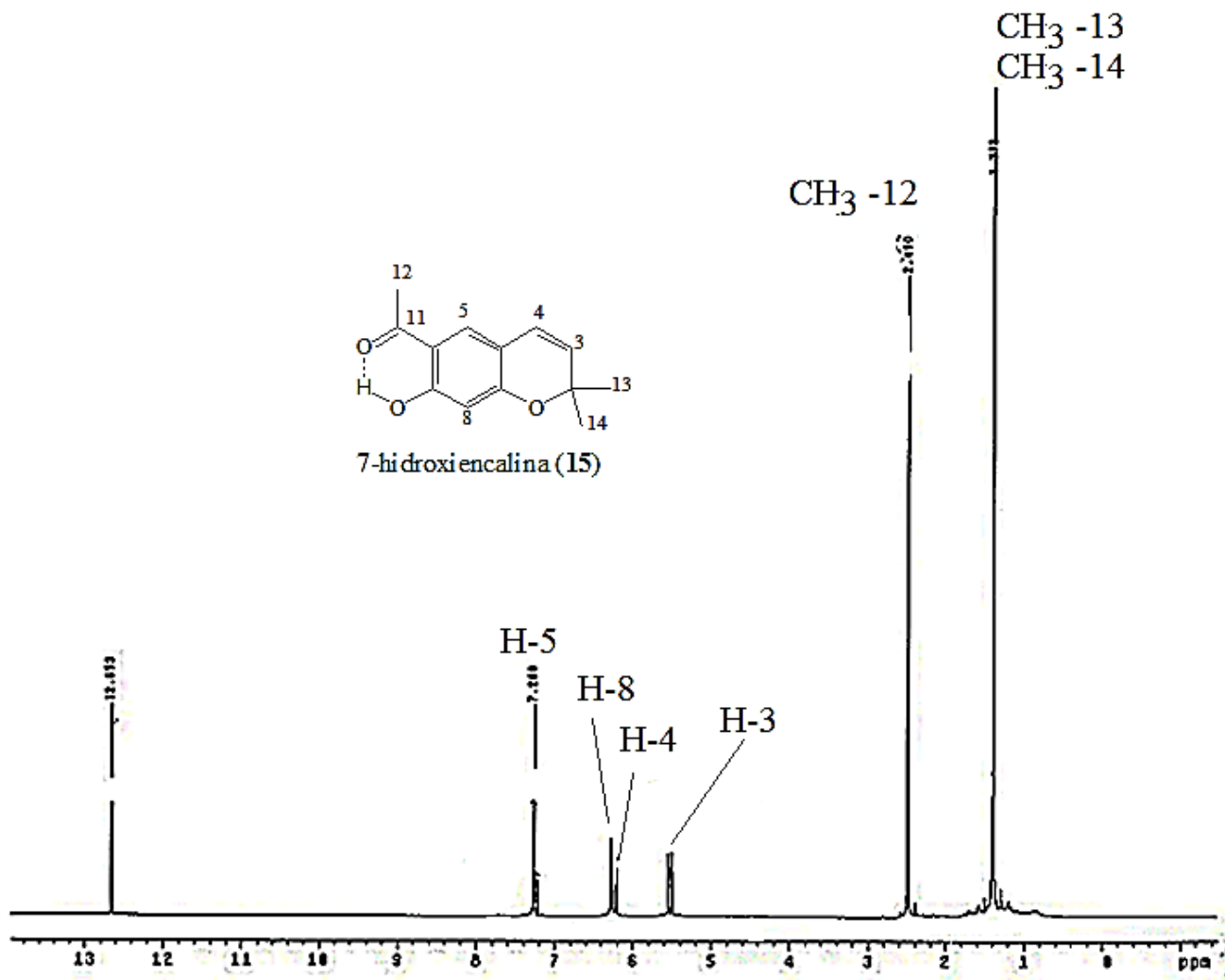
**Espectro 12.** <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 3,5-diprenil-4-hidroxiacetofenona (12)



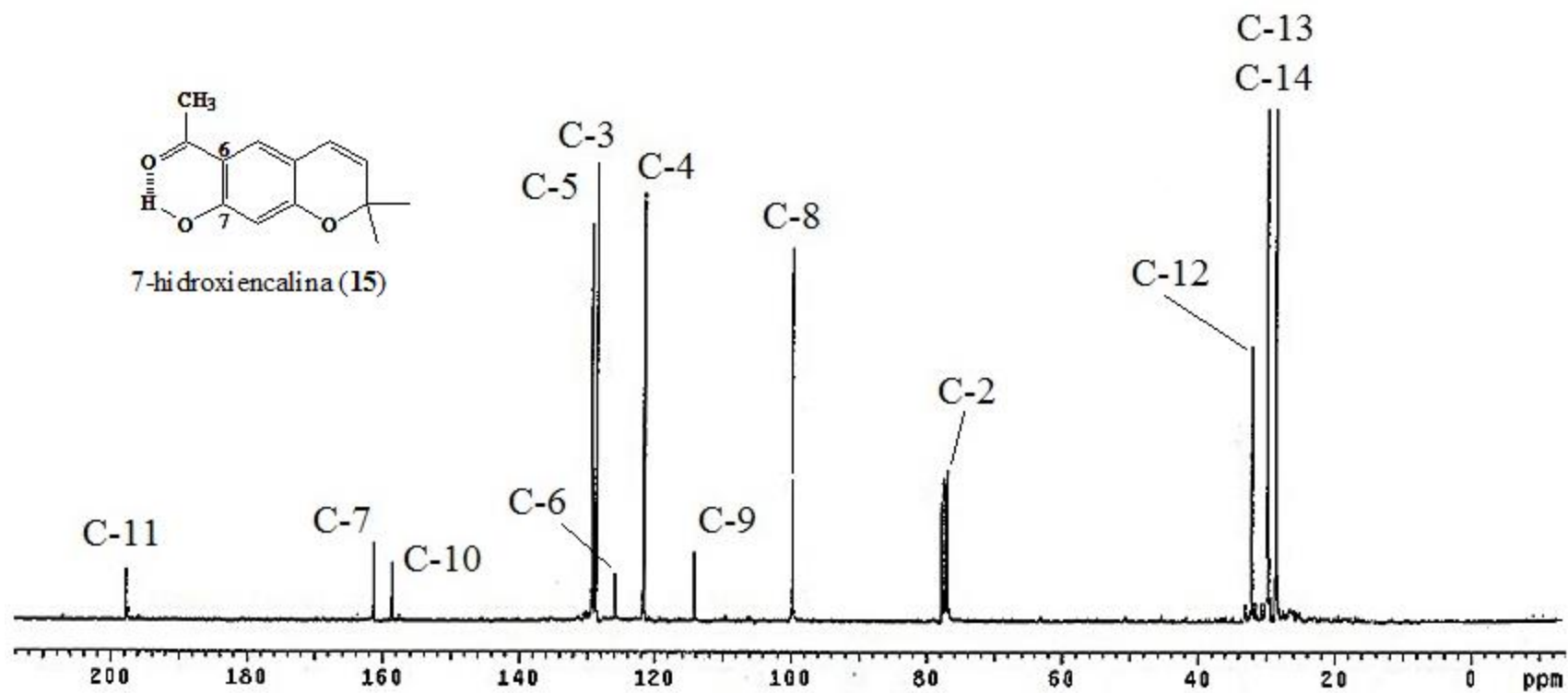
Espectro 13. <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de O-metilencecalinol (14)



**Espectro 14.** HETCOR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de O-metilencecalinol (14)

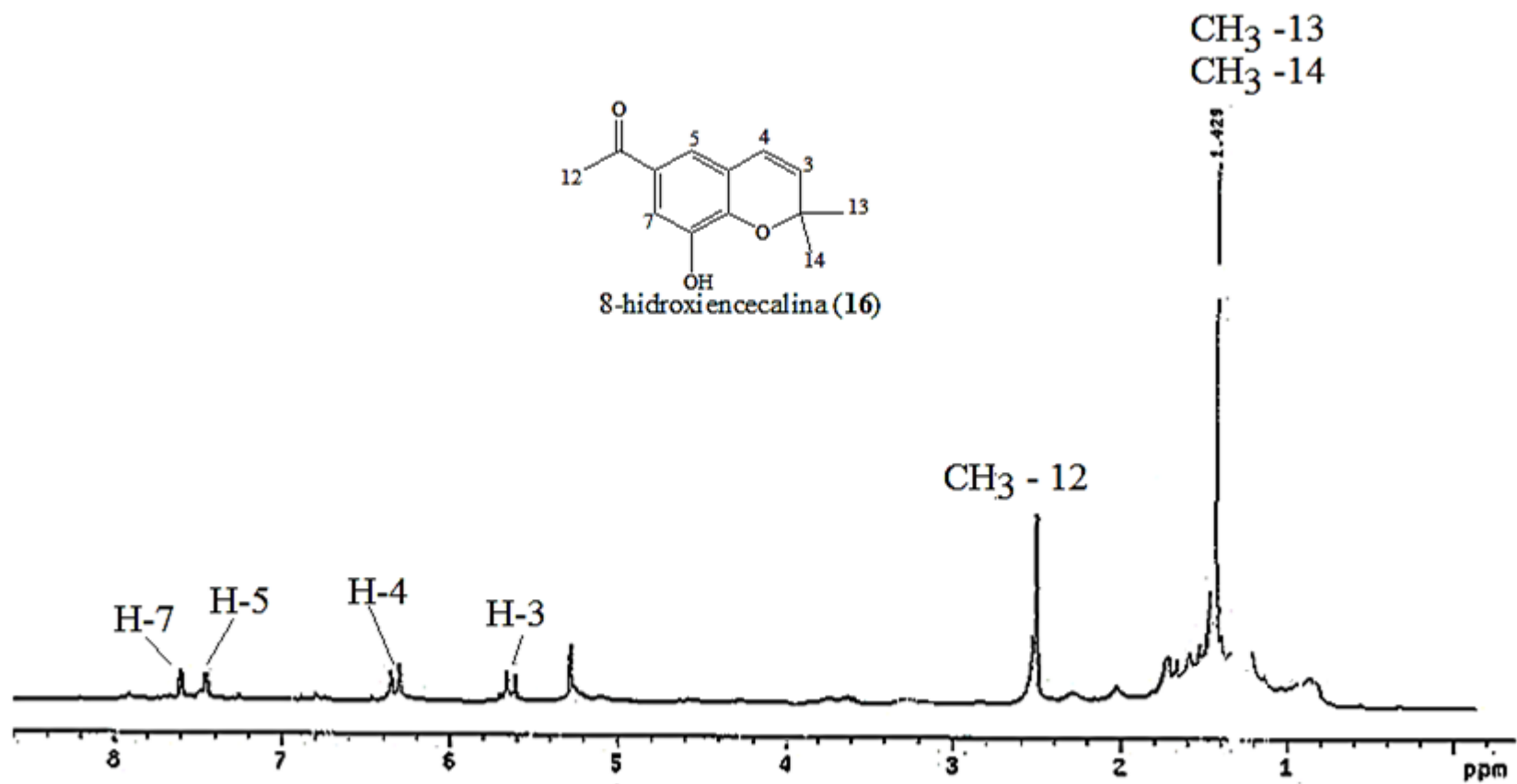


Espectro 15. <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 7-hidroxiencalina (15)

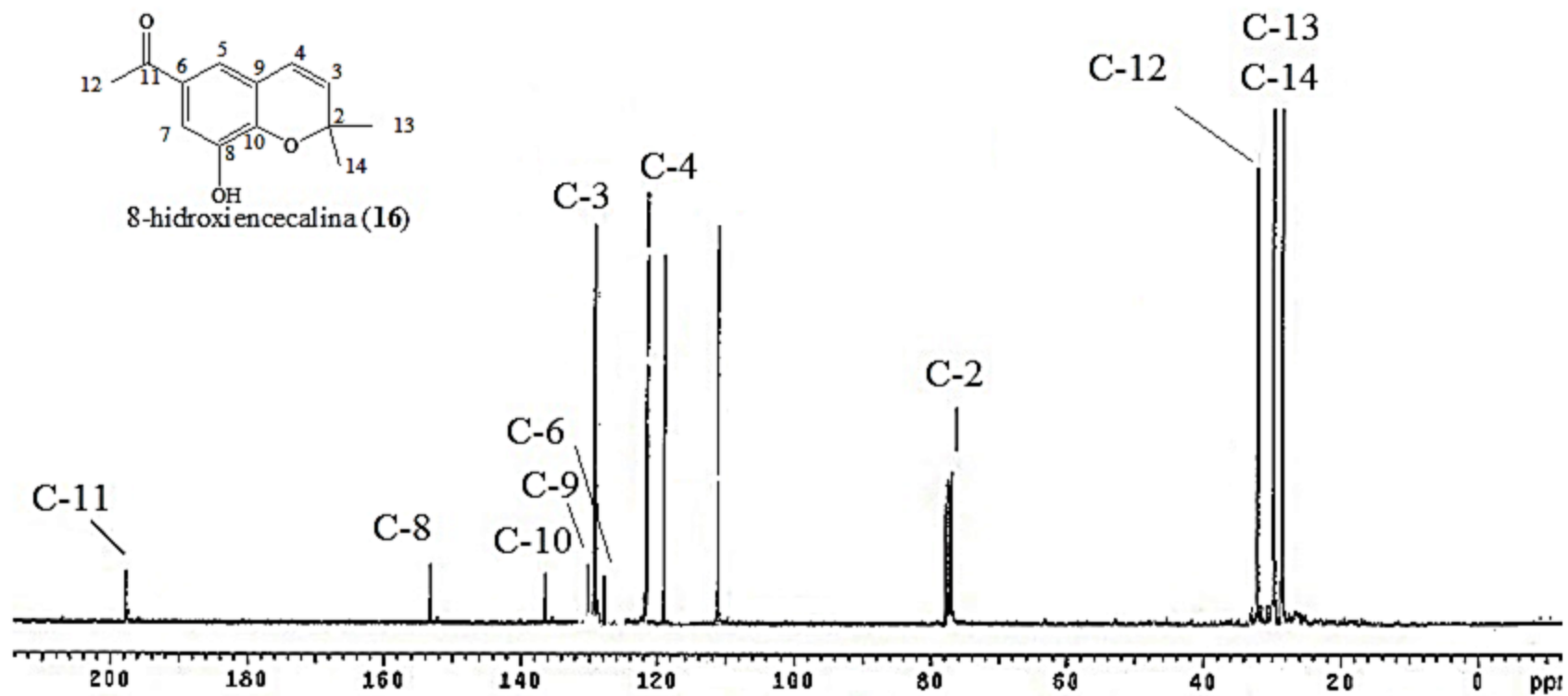


**Espectro 16.** <sup>13</sup>C-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 7-hidroxiencalina (15)

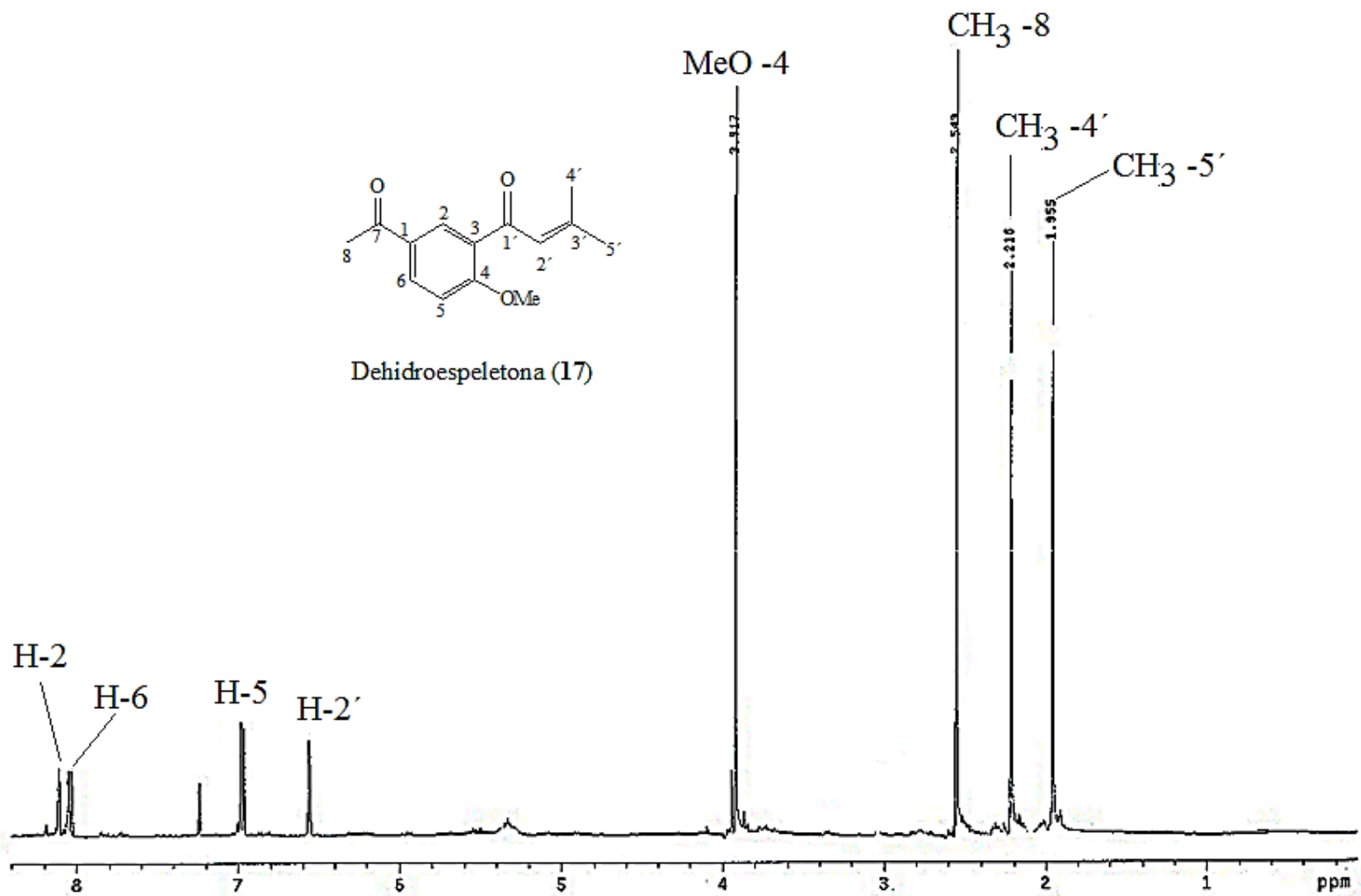




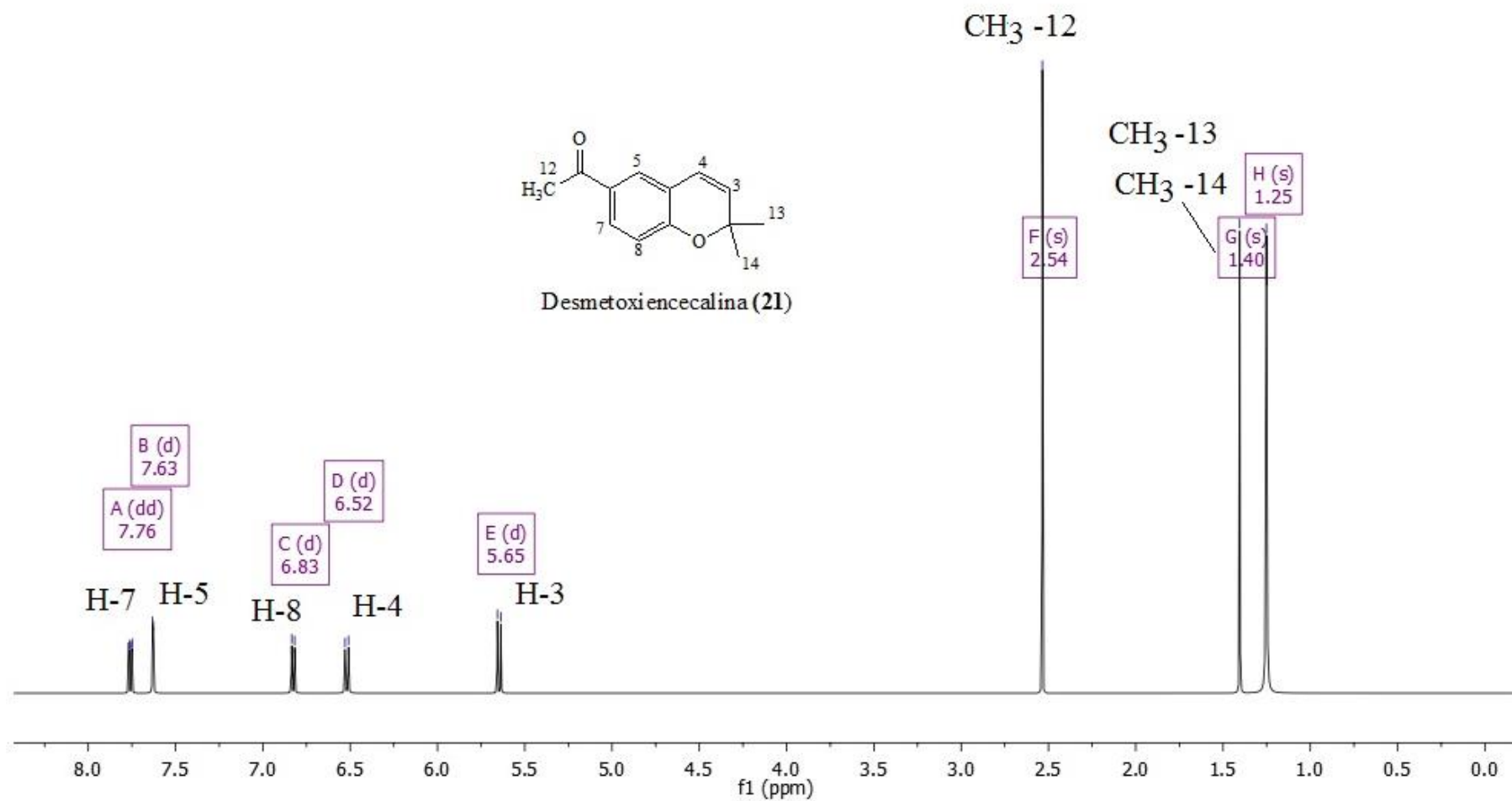
**Espectro 17.** <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 8-hidroxieneccalina (16)



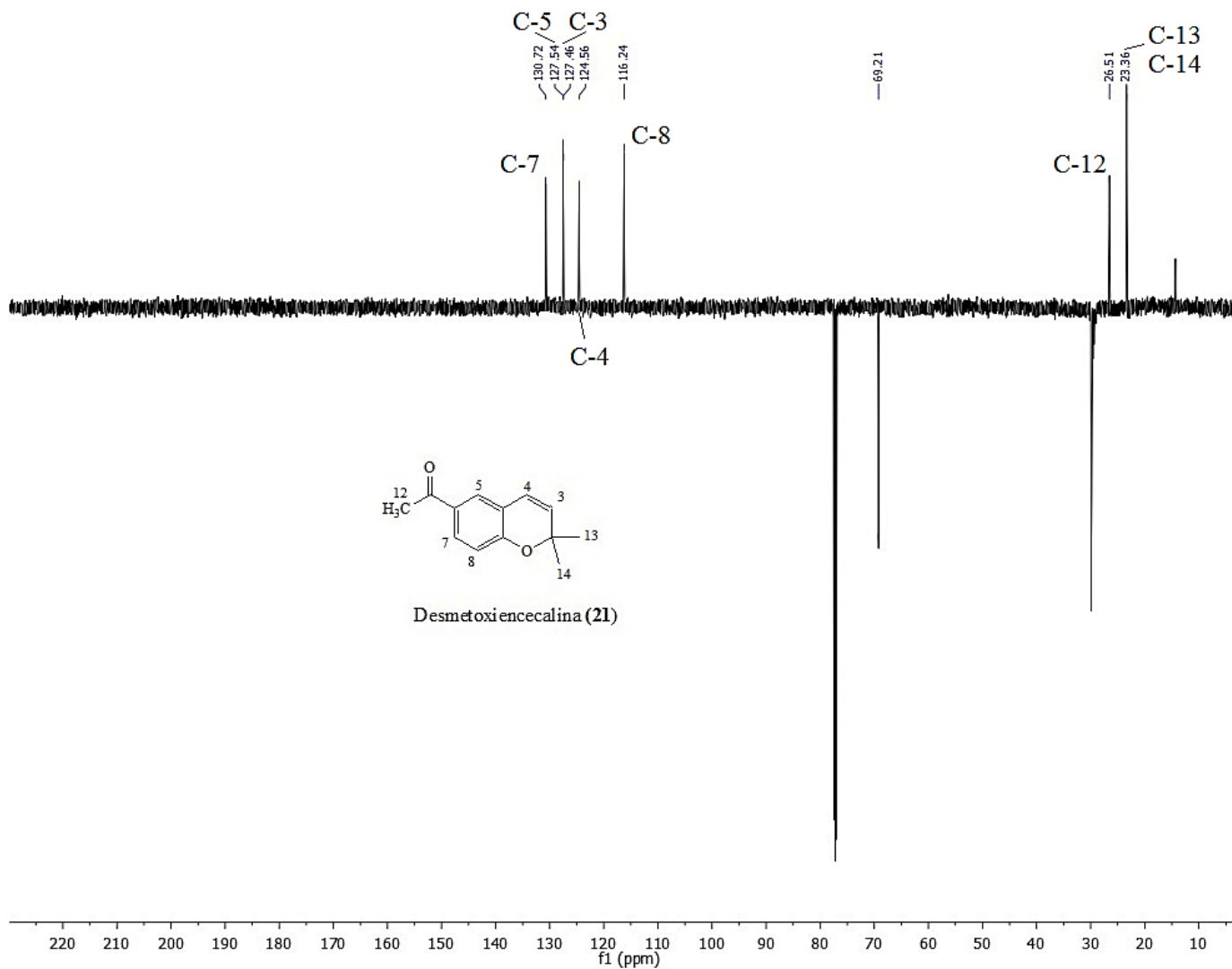
**Espectro 18.** <sup>13</sup>C-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 8-hidroxiencecalina (16)



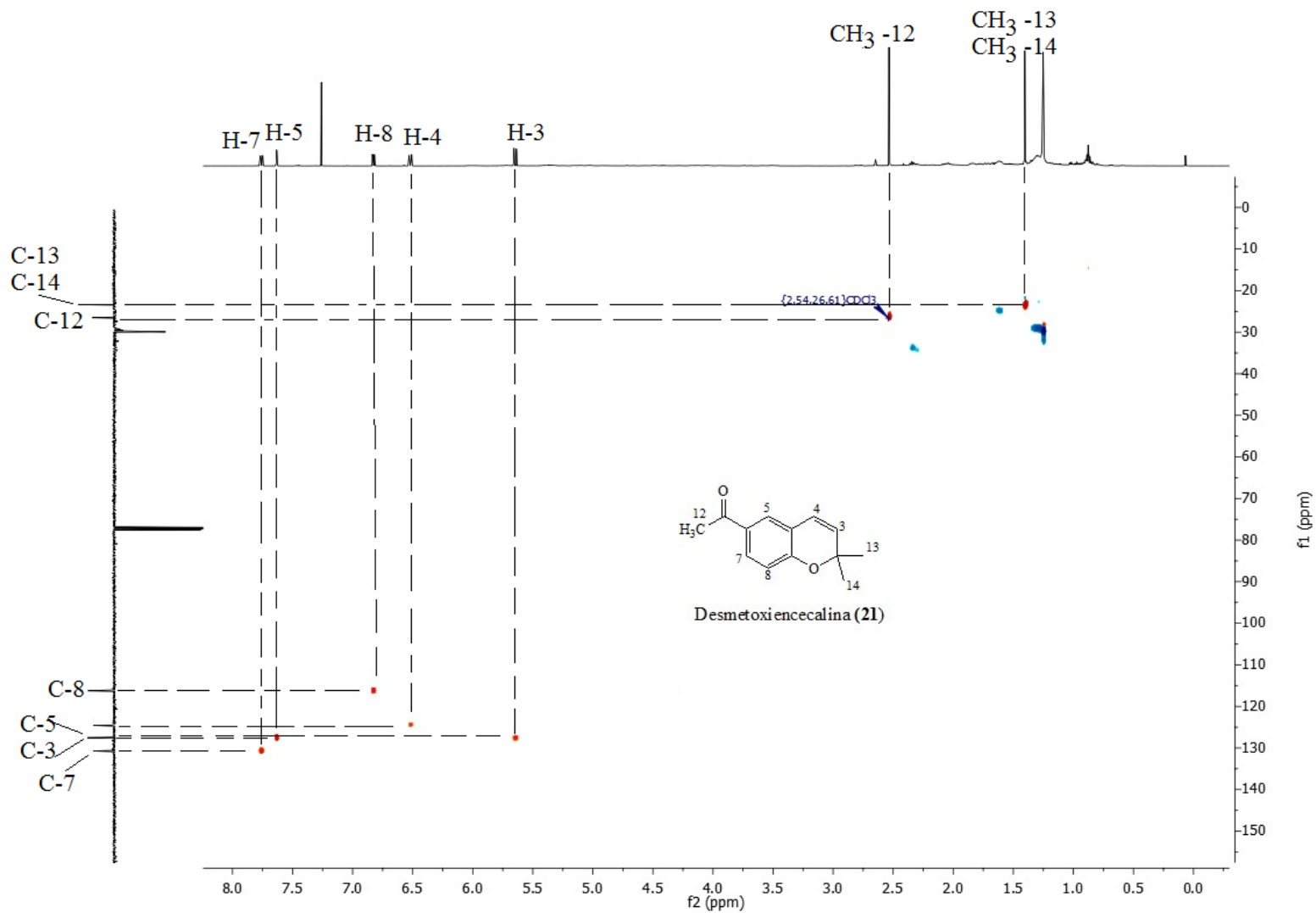
**Espectro 19.** <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Dehidroespeletona (17)



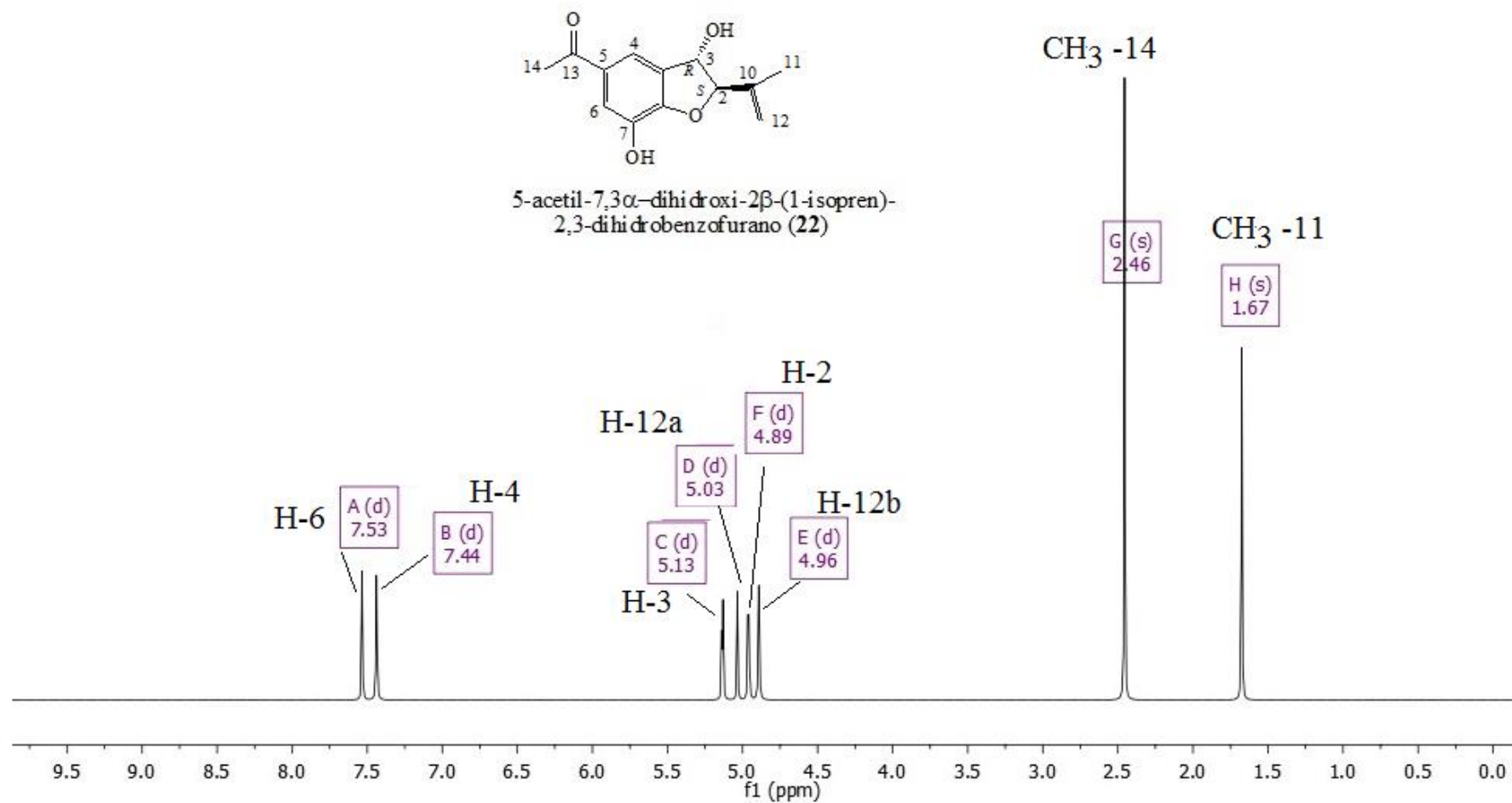
**Espectro 20.** <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Desmetoxiencicalina (21)



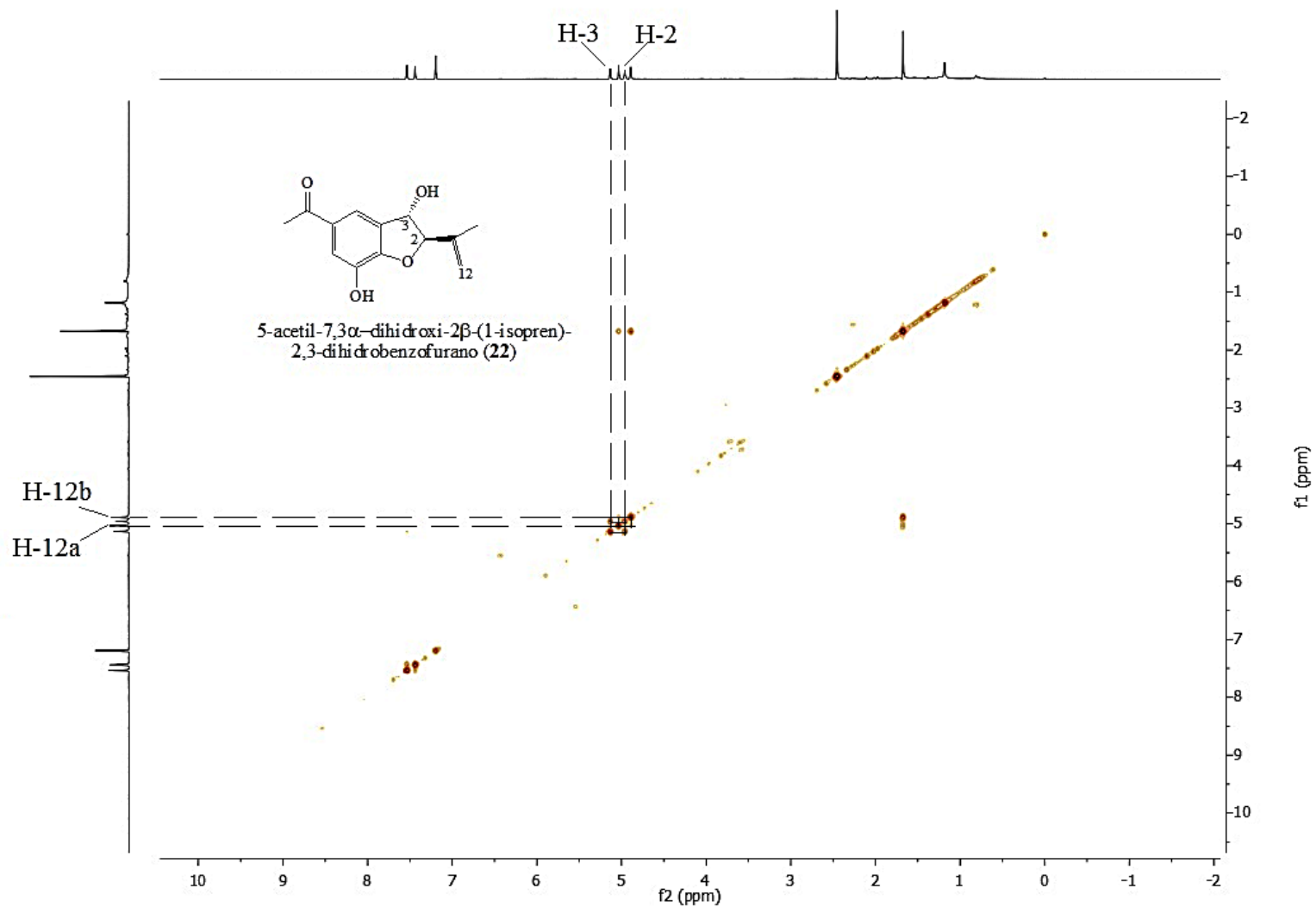
**Espetro 21.** DEPT (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Desmetoxiencocalina (21)



**Espectro 22.** HSQC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de Desmetoxiencalina (21)

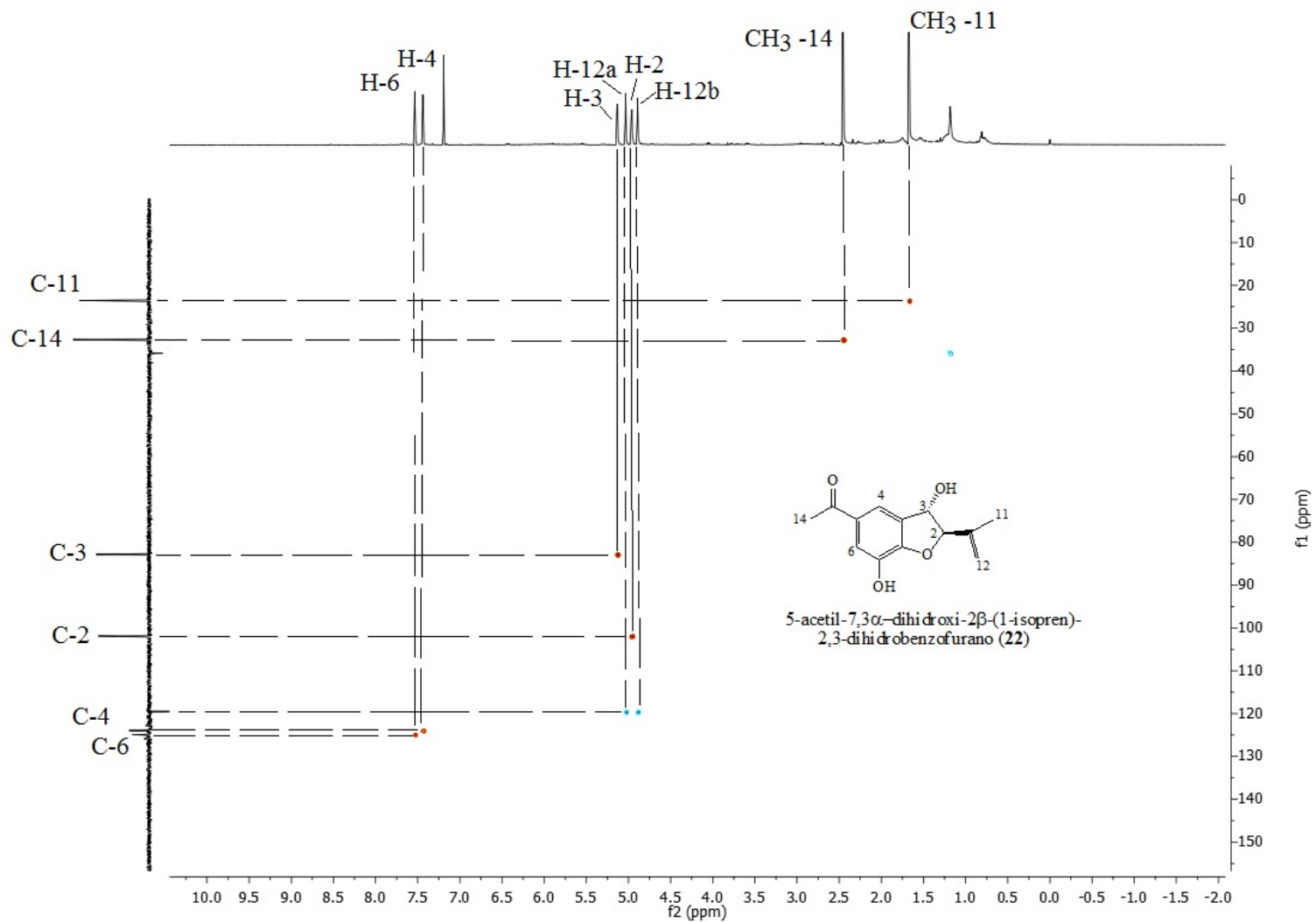


**Espectro 23.** <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 5-acetil-7,3 $\alpha$ -dihidroxi-2 $\beta$ -(1-isopren)- 2,3-dihidrobenzofurano (22)

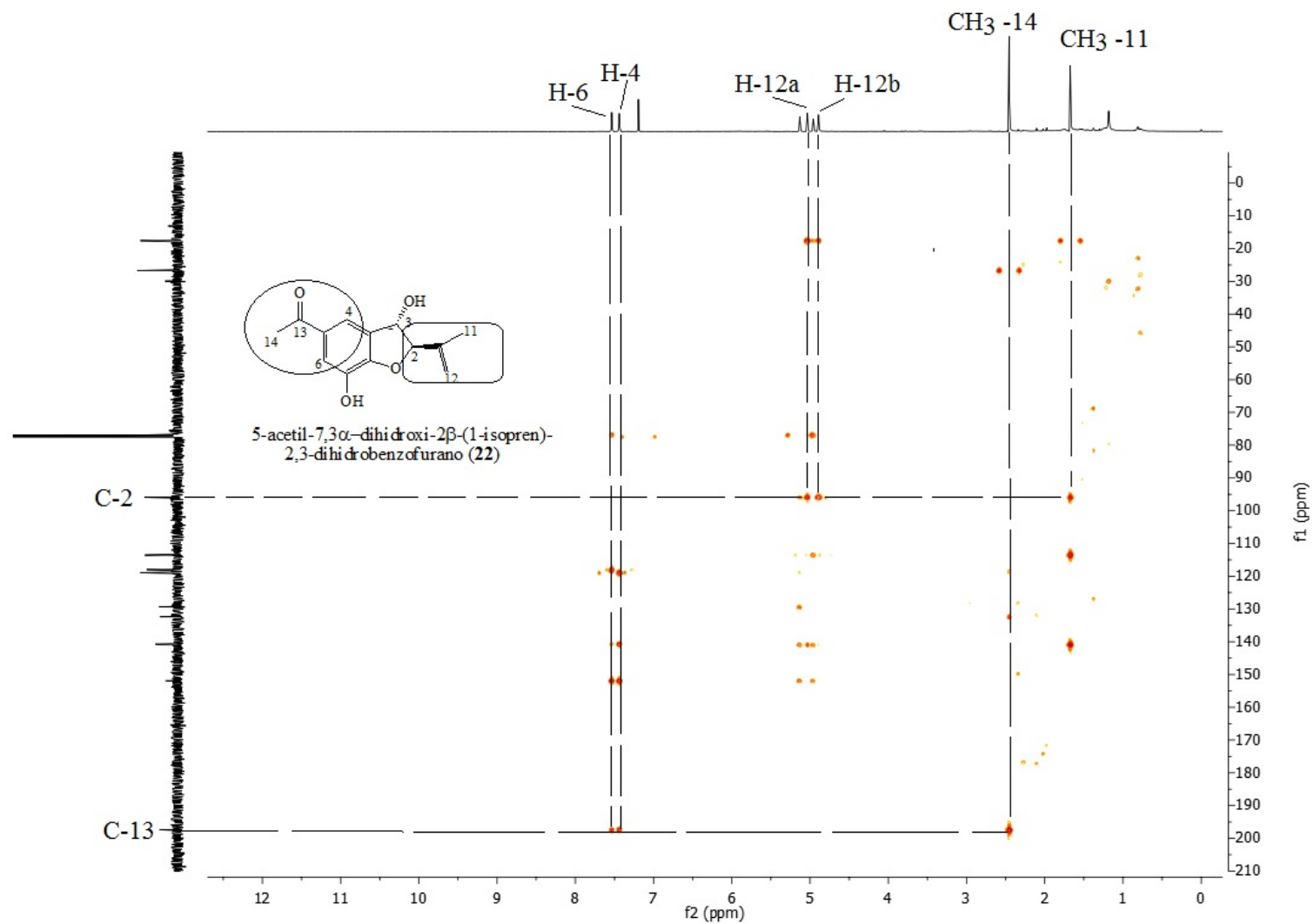


**Espectro 24.** COSY(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 5-acetil-7,3 $\alpha$ -dihidroxi-2 $\beta$ -(1-isopren)- 2,3-dihidrobenzofurano (22)

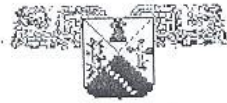




**Espectro 25.** HSQC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 5-acetil-7,3α-dihidroxi-2β-(1-isopren)- 2,3-dihidrobenzofurano (**22**)



**Espectro 26.** HMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 5-acetil-7,3 $\alpha$ -dihidroxi-2 $\beta$ -(1-isopren)-2,3-dihidrobenzofurano (22)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18.02.2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dr. Antonio Bernabé Antonio  
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

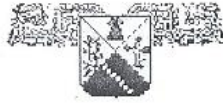
Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. MARIA LUISA VILLARREAL ORTEGA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18-02-2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dr. Antonio Bernabé Antonio  
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

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. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18-02-2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dr. Antonio Bernabé Antonio  
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18.02.2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)

Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dr. Juan José Acevedo Fernández

Dr. Antonio Bernabé Antonio

Dr. Francisco Cruz Sosa

Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: "Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

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. ANTONIO BERNABE ANTONIO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18-02-2019

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dr. Antonio Bernabé Antonio  
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

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. JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18.02.2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dr. Antonio Bernabé Antonio  
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

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. MANASES GONZALEZ CORTAZAR





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 18.02.2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (Tutor)  
Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dr. Antonio Bernabé Antonio  
Dr. Francisco Cruz Sosa  
Dr. Manasés González Cortazar

Tesis: Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión a partir de *Ageratina pichinchensis* (Asteraceae) para la producción de metabolitos secundarios bioactivos"

Alumno que la presenta a revisión: MARIANA SANCHEZ RAMOS

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. FRANCISCO CRUZ SOSA