

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS A TRAVÉS DE CULTIVO *IN VITRO* DE  
*Mammillaria heyderi* MUEHLENPFORDT (1848).

POR


DIANA MASSIEL ACEVES AGUERO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES.


2024


PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS A TRAVÉS DE  
CULTIVO *IN VITRO* DE *Mammillaria heyderi* MUEHLENPFORDT (1848).


COMITÉ DE TESIS

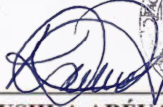
  
DRA. RUTH AMELIA GARZA PADRÓN  
Presidente

  
DR. RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA  
Secretario

  
DRA. CATALINA LEOS RIVAS  
Vocal

  
DRA. MA. JULIA VERDE STAR  
Vocal

  
DR. JOSÉ EZEQUIEL VIVEROS VALDEZ  
Vocal

  
DRA. KATIUSHKA ARÉVALO NIÑO  
Subdirector de posgrado



PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS A TRAVÉS DE  
CULTIVO *IN VITRO* DE *Mammillaria heyderi* MUEHLENPFORDT (1848).

**DIRECCIÓN DE TESIS**



---

**DRA. RUTH AMELIA GARZA PADRÓN**  
**DIRECTOR**



---

**DRA. NIEVES DEL SOCORRO MARTÍNEZ CRUZ**  
**ASESOR EXTERNO**

**DERECHOS RESERVADOS©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo No. 375249.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, gracias por ser mi segunda casa durante este tiempo, aquí pude conocer excelentes profesores, pero también grandes seres humanos.

A la Dra. Ruth Amelia Garza Padrón, por apoyarme en la realización de este proyecto, pero también por siempre ir más allá y ser un excelente ser humano, por darme consejos y enseñanzas personales y profesionales. Gracias, gracias, gracias por confiar en mí. ¡Te quiero muchísimo!

A la Dra. Ma. Eufemia Morales Rubio y al Dr. Jaime Francisco Treviño Neávez (QEPD), gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por enseñarme cómo debe ser un equipo de trabajo, por motivarme a hacer bien las cosas, por el apoyo, la confianza y el cariño. Los quiero infinitamente.

A la Dra. Nieves Del Socorro Martínez, el Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza, la Dra. Catalina Leos Rivas, la Dra. Ma. Julia Verde Star y el Dr. José Ezequiel Viveros Valdez; por su apoyo, orientación, enriquecimientos de mi proyecto, gracias por todo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Micropropagación, nada habría sido lo mismo sin ustedes, gracias por el apoyo, orientación y el tiempo de convivencia dentro y fuera del laboratorio.

A todos los que fueron parte de esta aventura, muchas gracias.

## DEDICATORIAS

A mi familia, por el cariño, los buenos momentos y los ánimos para seguir adelante.

A mi esposo, Alberto Carlos García Ávila, por el apoyo incondicional a seguir mis sueños e impulsarme a ser mejor cada día, gracias por tu comprensión y cariño ¡Te amo!

A mi hija, Emma Sofía García Aceves, gracias por recordarme que la vida es asombrosa, que está llena de amor y emoción, por favor nunca dejes de sorprenderte. Tenerte como hija, es el mejor regalo que me ha dado la vida. ¡Te amo!

A mi hermana Sara Aceves y mi cuñado Rafael Martínez, gracias por cuidarme, apoyarme y alentarme a seguir cada uno de mis proyectos. ¡Siempre juntos!

A mis amigas del posgrado: Deniss, Luz, Mariana, Claudia y Mayra, gracias por tantos buenos momentos, por el apoyo, retroalimentación y soporte durante este periodo.

## ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	14
RESUMEN.....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Características de la familia Cactaceae .....	3
2.1.1. Características del género <i>Mammillaria</i> .....	3
2.1.2. Características de <i>Mammillaria heyderi</i> .....	4
2.1.3. Ubicación taxonómica.....	5
2.1.4. Usos etnobotánicos .....	5
2.2. Cultivo de Tejidos Vegetales.....	5
2.2.1. Cultivo de callo .....	6
2.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas .....	7
2.2.3. Producción <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios.....	9
2.2.4. Producción <i>in vitro</i> de metabolitos en el género <i>Mammillaria</i> .....	10
2.3. Actividad biológica de cactáceas.....	11
2.3.1. Actividad Antioxidante .....	11
2.3.2. Betalaínas .....	12
2.3.2.1. Betacianinas .....	13
2.3.2.2. Betaxantinas .....	13
2.4. Determinación cualitativa de grupos funcionales.....	13
3. JUSTIFICACIÓN .....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO GENERAL .....	17
5.1. Objetivos particulares .....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
6.1. Material biológico .....	18
6.2. Metodología.....	18
6.2.1. Producción <i>in vitro</i> del tejido indiferenciado.....	18
6.2.2. Inducción de estrés abiótico .....	19
6.2.3. Extracción de muestras de estrés abiótico.....	20
6.2.4. Cinética de crecimiento con medio de cultivo específico .....	20
6.2.5. Análisis estadístico de cultivo <i>in vitro</i> .....	21

6.2.6	Obtención de extractos de callo para actividad biológica.....	22
6.2.7	Pruebas de tamizaje fitoquímico .....	23
6.2.8	Actividad antioxidante .....	24
6.2.8.1	Método de DPPH .....	24
6.2.8.2	Método de ABTS .....	24
6.2.9	Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu .....	25
6.2.10	Prueba de toxicidad de <i>A. salina</i> .....	25
6.2.11	Concentración del compuesto del extracto M6-MIII a través de resina ....	26
6.2.12	Prueba preliminar de cromatografía de capa fina .....	26
7.	RESULTADOS.....	27
7.1.	Material vegetal. ....	27
7.2.	Respuesta morfogénica del tejido <i>in vitro</i> de <i>M. heyderi</i> . ....	27
7.3.	Estrés abiótico del tejido <i>in vitro</i> de <i>M. heyderi</i> .....	32
7.4.	Cinética de crecimiento M6-MIII.....	34
7.5.	Obtención de extracto.....	37
7.6.	Determinación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto de <i>M.heyderi</i> 37	
7.7.	Actividad antioxidante .....	38
7.7.1.	Actividad antioxidante por DPPH.....	38
7.7.2.	Actividad antioxidante por ABTS.....	39
7.8.	Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	40
7.9.	Toxicidad en el bioensayo de <i>Artemia salina</i> .....	41
7.10.	Concentración de compuestos .....	41
7.11.	Preliminares de cromatografía en capa fina .....	41
8.	DISCUSIÓN .....	43
8.1.	Producción de tejido desdiferenciado.....	43
8.2.	Producción de pigmentos .....	44
8.3.	Cinética de crecimiento .....	44
8.4.	Actividad antioxidante por DPPH.....	45
8.5.	Actividad antioxidante por ABTS .....	46
8.6.	Cuantificación de fenoles totales.....	46
8.7.	Ensayo de letalidad sobre <i>A. salina</i> .....	46
8.8.	Concentración del compuesto activo.....	47
8.9.	Preliminares de cromatografía de capa fina .....	47
9.	CONCLUSIONES .....	48



10. PERSPECTIVAS .....	49
11. BIBLIOGRAFIA .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Medios de cultivo para proliferación de callo	19
2	Medios de cultivo para inducción de estrés	20
3	Crecimiento promedio de callo	28
4	Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el incremento de biomasa de callos <i>de M. heyderi</i> .	32
5	Pruebas de tamizaje fitoquímico para los extractos de <i>M. heyderi</i>	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	<i>Mammillaria heyderi</i> in vivo	5
2	Plántula <i>in vitro</i> de <i>Mammillaria heyderi</i>	18
3	Unidad experimental para los experimentos de cultivo <i>in vitro</i>	22
4	Planta adulta de <i>M. heyderi</i> : a) Corte transversal, b) Zona radicular y c) Zona apical	27
5	<i>Mammillaria heyderi</i> <i>in vitro</i> : a) Plántula vitrificada, b) Inicio de la producción de callo	27
6	Tejido de <i>M. heyderi</i> observado 30X	29
7	Tejido regenerado al cabo de las 24 semanas a) en medio sin reguladores (M1) y con ANA en diferentes concentraciones b) M2, c) M3 y d) M4	29
8	Tejido regenerado al cabo de las 24 semanas en medio con AIA en diferentes concentraciones b) M5, c) M6 y d) M7	30
9	Tejido regenerado al cabo de las 24 semanas en medio con 2,4-D. a) Medio M8, b) Medio M9 y c) Medio M10	31
10	Protocolo de estrés abiótico a) MI b) MII, c) MIII y d) MIV	33
11	Tejido de <i>M. heyderi</i> pigmentado 40X	36
12	Actividad antioxidante del extracto acuoso de <i>M. heyderi</i> por el método de DPPH	38
13	Actividad antioxidante del extracto acuoso de <i>M. heyderi</i> por el método de ABTS	39
14	Cuantificación de fenoles totales del extracto acuoso de <i>M. heyderi</i> por el método de Folin-Ciocalteu	40

- 15 Cromatografía de capa fina con el sistema Agua:Acetona 1:1. a) **42**  
Muestra en fase estacionaria, b) TLC revelada en UV

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Efecto de la concentración de sacarosa para la producción de betalainas en callos de <i>M. heyderi</i>	34
2	Peso fresco de la cinética de crecimiento para el protocolo de proliferación de biomasa en Medio M6 y M1 como control	35
3	Peso seco de la cinética de crecimiento para el protocolo de proliferación de biomasa en Medio M6 y M1 como control	35
4	Contenido de Betacianinas y Betaxantinas en M1 (control) y MIII	36
5	Curva de calibración de vitamina C para ensayo de DPPH	38
6	Curva de calibración de Trolox para ensayo de ABTS	39
7	Curva de calibración de ácido gálico para ensayo de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)	40

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μg	Microgramos
1N	1 Normal
Abs	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico)
2,4-D	Ácido 2, 4, diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	Bencilaminopurina
CI <sub>50</sub> (IC <sub>50</sub> )	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetros
DL <sub>50</sub> (LD <sub>50</sub> )	Dosis letal media
DPPH	2,2-difenil 1-picrilhidracil
Eq.	Equivalentes
g	Gramo
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
KMnO <sub>4</sub>	Permanganato de potasio
L	Litro
m	Metros
mg	Miligramos
mL	Militros
MS	Murashige y Skoog
nm	Nanómetros
TLC	Cromatografía de capa fina (Thin layer chromatography)
Trolox	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman-2-carboxílico
Vit. C	Vitamina C

## RESUMEN

Algunos compuestos naturales han sido sustituidos por compuestos sintéticos y esto ha ocasionado problemas al medio ambiente o a la salud; de tal modo que organizaciones como la FDA han limitado el consumo de los mismos; debido a lo anterior, en la actualidad las cactáceas han retomado importancia en diversas industrias como lo son la farmacéutica, cosmetológica y alimentaria, por la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes de manera natural; lo que ha ocasionado que diversos especímenes estén bajo protección (NOM-059-SEMARNAT-2010), tal es el caso del género *Mammillaria*. Ante esta situación, el cultivo *in vitro* es una alternativa que, en condiciones asépticas, medios definidos y ambientes controlados, permite conservar, regenerar y a su vez producir metabolitos secundarios, sin el deterioro de la especie.

Se estableció el cultivo *in vitro* de *Mammillaria heyderi* utilizando plántulas germinadas *in vitro* con la finalidad de obtener explantes asépticos que fueron desdiferenciados en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sin reguladores, posteriormente se realizó la producción de biomasa a través de la adición de diferentes auxinas: Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido indolacético (AIA) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 1, 3 y 5 mg/L cada una, consecutivamente, se indujo estrés abiótico a través de la adición de sacarosa (15 a 60 g/L) para favorecer la producción del pigmento y se realizó la extracción de los metabolitos secundarios, para su posterior cuantificación de actividad antioxidante así como la prueba de toxicidad en *Artemia salina*. Los resultados mostraron que el medio con 3 mg/L de AIA fue el mejor tratamiento para la producción de biomasa con una media de 10.30 g de callo, y mostrando un mejor crecimiento en la semana 7 y que el medio MIII (45 mg/L Sacarosa) obtuvo mejor producción de betalaínas: 1.327 y 2.274 mg/100 g tejido fresco para betacianinas y betaxantinas, respectivamente. El ensayo de letalidad de *A. salina* se obtuvo una  $DL_{50}$  de 5.315 mg/mL, mientras que la actividad antioxidante obtuvo una  $CI_{50}$  0.177 mg/mL, este resultado no se considera tóxico, sin embargo, presenta actividad antioxidante.

## ABSTRACT

Some natural compounds have been replaced by synthetic compounds and this has caused problems for the environment or health; in such a way that organizations such as the FDA have limited their consumption; Due to the above, cacti have now regained importance in various industries such as pharmaceuticals, cosmetology and food, due to the large number of secondary metabolites naturally present; which has caused various specimens to be under protection (NOM-059-SEMARNAT-2010), such is the case of the genus *Mammillaria*. Faced with this situation, *in vitro* culture is an alternative that, under aseptic conditions, defined media and controlled environments, allows the preservation, regeneration and in turn the production of secondary metabolites, without the deterioration of the species.

The *in vitro* culture of *Mammillaria heyderi* was established using *in vitro* germinated seedlings in order to obtain aseptic explants that were dedifferentiated in an MS medium (1962) without regulators, subsequently biomass production was carried out through the addition of different auxins: Naphthaleneacetic Acid (ANA), Indoleacetic Acid (IAA) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) at concentrations of 1, 3 and 5 mg/L each, consecutively, abiotic stress was induced through the addition of sucrose (15 to 60 g/L) to favor the production of the pigment and the extraction of the secondary metabolites was carried out, for its later quantification of antioxidant activity as well as the toxicity test in *Artemia salina*. The results showed that the medium with 3 mg/L of IAA was the best treatment for biomass production with an average of 10.30 g of callus and showing better growth at week 7 and that the MIII medium (45 mg/L Sucrose) obtained better production of betalains: 1,327 and 2,274 mg/100 g fresh tissue for betacyanins and betaxanthins, respectively. The *A. salina* lethality test obtained an LD<sub>50</sub> for the aqueous extract of 5.315 mg/mL, while the antioxidant activity obtained an IC<sub>50</sub> of 0.177 mg/mL, given the result it is not considered toxic, but with antioxidant activity.



## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las cactáceas han incrementado su importancia en diversas industrias por la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes como lo son la farmacéutica (Shetty *et al.*, 2012), cosmetológica (Corrales-García, 2009) y alimentaria (Gengatharan *et al.*, 2015), sumado al deterioro de áreas silvestres, hace necesario investigar y desarrollar tecnologías que permitan preservar estas especies.

Las cactáceas poseen usos muy diversos como proveedores de material para construir cercas, ornamentos y a su vez son utilizadas como plantas medicinales, ejemplo de ello, algunos grupos indígenas como los tarahumaras emplean los frutos de una especie del género *Mammillaria* como tratamiento contra el dolor y sordera, además de ser utilizado durante las prácticas mágico-religiosas, ya que contiene N-metil-3,4-dimetoxifenetilamina que posee efectos psicoactivos (Anderson, 2001).

El género *Mammillaria* es uno de los géneros más diversos, siendo México su principal centro de diversificación y que contiene más de 200 especies (Elansary *et al.*, 2019). El nombre del género proviene del latín "mammilla", mama, debido a que las aréolas se disponen en tubérculos cónicos en vez de estar organizados en costillas como en muchos otros cactus; en general, son plantas de forma globosa o cilíndrica con tamaños que varían desde 1 a 20 cm de diámetro y de 1 a 40 cm de altura (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991).

Algunas cactáceas se encuentran amenazadas por la pérdida de hábitat, saqueo intensivo, así como la agricultura (García-Rubio & Malda-Barrera, 2010) es por ello que el cultivo de tejidos vegetales ofrece la producción de plantas de libres de patógenos, mejora en rendimientos, independencia del clima, suelo y distribución geográfica, capacidad de establecer un sistema de producción definido en relación con las demandas del mercado y conservación de plantas de interés comercial o en vías de extinción en tiempos más cortos que los cultivos (Phillips & Garda, 2019).

Por lo anterior, el cultivo *in vitro* es una alternativa para la preservación de las cactáceas y la producción de metabolitos secundarios de utilidad para la población.

En el presente trabajo se propone establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de *Mammillaria heyderi* para favorecer la producción de metabolitos secundarios de importancia para su posible aplicación en la industria farmacéutica o de alimentos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Características de la familia Cactaceae

La familia Cactaceae se destaca en América por prosperar desde climas subtropicales hasta climas áridos, cuenta con más de 1500 especies en su mayoría endémicas del continente (Ramirez-Malagon *et al.*, 2007); por su parte México cuenta con una excepcional diversidad de cactáceas, siendo su centro de diversificación (Bravo-Avilez *et al.*, 2019). Muchos de los miembros de esta familia actualmente se encuentran amenazados o en peligro de extinción como resultado del bajo índice de crecimiento, bajas tasas de reproducción y las amenazas antropogénicas tales como: destrucción del hábitat, recaudación excesiva, ganadería y agricultura, etc (García-Rubio & Malda-Barrera, 2010). Es por lo que se encuentran bajo la protección de la Norma Oficial Mexicana de protección ambiental NOM-059-SEMARNAT-2010.

Poseen la capacidad de sobrevivir en suelos con nulas concentraciones de agua, es decir, retienen el agua con mayor eficiencia; se caracterizan por ser siempre perenes ya que tienen ramificación escasa y un cuerpo suculento y frutos comestibles (de Araújo *et al.*, 2021; Rojas-Aréchiga & Vázquez-Yanes, 2000).

Las cactáceas son generalmente propagadas por semillas (sexual), sin embargo, existen otras alternativas por medios vegetativos (esquejes, injertos y con técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*) (Seemann *et al.*, 2007); recientemente se ha optado por el cultivo *in vitro*, ya que permite la producción de callos que contienen metabolitos secundarios de uso terapéutico o bien, de órganos diferenciados como brotes que permiten producir metabolitos similares a la planta nativa (Chandran *et al.*, 2020).

#### 2.1.1. Características del género *Mammillaria*

El género *Mammillaria* es el más extenso y variado morfológicamente de la familia Cactaceae con alrededor de 200 especies descritas, se encuentran principalmente en el

norte y centro de América (Wybraniec & Nowak-Wydra, 2007). Los miembros de este género son utilizados con fines ornamentales, sin embargo, se han señalado algunos usos medicinales e industriales (Shetty *et al.*, 2012).

El género fue descrito por Adrian Haworth en 1812, el nombre proviene del latín "mammilla", ya que las aréolas se disponen en tubérculos cónicos en vez de estar organizados en costillas como en otras cactáceas. Son plantas de lento crecimiento, de forma globosa o cilíndrica con tamaños que varían desde 1 a 20 cm de diámetro y de 1 a 40 cm de altura. Las flores están usualmente dispuestas en un anillo alrededor de la corona, en la zona que creció el año anterior. La mayoría de las especies tienen flores pequeñas a medianas, de colores blanco, amarillo, rojo, rosas puros o con una vena central de otro color en cada pétalo. En cuanto a los frutos, son bayas globulares o alargadas, blandas generalmente de color rojo brillante y son llamados comúnmente como "chilitos". Las semillas, marrones o negras, tienen de 1 a 3 mm. Numerosas especies son amenazadas ya que el valor comercial de éstas es muy elevado (Anderson, 2001; Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991).

### **2.1.2 Características de *Mammillaria heyderi***

Es una cactácea de tallo simple hemisférico o subgloboso (Fig. 1), que mide entre 8 a 30 cm de diámetro y de 3 a 10 cm de altura. Sus tubérculos están dispuestos en 13 y 21 series de espinas. Las plantas de esta especie son redondeadas en el ápice y generalmente tienen las axilas desnudas, sus areolas son redondeadas con espinas radiales de 7 a 22 o 24, delgadas aciculares de menos de 0.5 mm de diámetro. En cuanto a las flores, estas son acampanuladas de 25 a 35 mm de longitud de color crema casi blanco, crema rosado pálido o crema verdoso pálido. Es una planta solitaria, con distribución limitada ya que sólo se encuentra en Estados Unidos (Texas y Arizona) y en México (Sonora, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí) (Anderson, 2001; Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991; Pilbeam, 1999).



**Figura. 1:** *Mammillaria heyderi* in vivo

### **2.1.3. Ubicación taxonómica**

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Cactaceae*

Subfamilia: *Cactoideae*

Tribu: *Cacteae*

Género: *Mammillaria*

Especie: *M. heyderi*

(Anderson, 2001; Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991)

### **2.1.4. Usos etnobotánicos**

Esta especie ha sido utilizada por los tarahuamaras para curación, ya que el látex producido es auxiliar en el dolor de oídos y sordera; además de este uso, se le dan atribuciones mágicas y es utilizado en rituales ceremoniales; contiene N-Metil-3,4dimetoxifeneltilamina, que tiene efectos psicoactivos (Lesne, 2001).

## **2.2. Cultivo de Tejidos Vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es el conjunto de técnicas mediante el cual se pueden obtener explantes (células, tejidos u órganos) en condiciones asépticas y

controladas, ha sido empleado para propagación masiva de plantas, recuperación de especies en peligro, producción de metabolitos secundarios, mejora genética de plantas, etc (Calva & Pérez, 2005).

Este conjunto de técnicas está basado en la totipotencialidad de las células vegetales, es decir, en la capacidad de una célula para dividirse y producir características celulares de un tejido u órgano y de esta forma regenerar un individuo (Davey, 2010).

La contribución de Haberlandt en 1902, puede considerarse como la primera publicación de experimentos para el cultivo de tejidos aislados de una planta (*Tradescantia*), en donde utilizó las hojas para promover una respuesta fisiológica (Imani *et al.*, 2009); sin embargo, la teoría de Schleiden y Schwann es inherente a la totipotencialidad, ya que expresan que cada célula animal o vegetal es un agregado de seres totalmente individualizados, es decir, independientes y son capaces de ser separados del organismo y continuar creciendo de forma independiente (Vasil, 2008).

El cultivo *in vitro* ha sido utilizado para la propagación a gran escala de especies con interés comercial, generación de individuos fértiles con alguna modificación genética, preservación de especies en peligro de extinción, así como para la generación de modelos de estudio, la producción de metabolitos secundarios, entre otras (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018)

### **2.2.1. Cultivo de callo**

El callo puede definirse como una masa irregular de células de tejido parenquimático, que carece de una estructura organizada y se puede obtener a partir de cualquier tipo de explante que contenga células nucleadas (Bhojwani & Dantu, 2013).

Este tipo de tejido desorganizado, se llega a producir de manera natural en diversas especies como respuesta cambios en los niveles endógenos de reguladores de crecimiento, infecciones, lesiones causadas por insectos, microorganismos o por tumoraciones; sin

embargo, gracias al cultivo *in vitro*, es posible producir este tipo de tejido que puede ser multiplicado indefinidamente a través de subcultivos que le proporcionen medio de cultivo nuevo, o bien, inducir estructuras diferenciadas a través de la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (George *et al.*, 2008).

El callo formado en un explante original se le denomina callo primario, mientras que las partes diseccionadas de callo primario, se denominan callos secundarios. Un solo explante de callo puede tener variaciones en cuanto a la coloración, textura, contenido de agua, estructura y capacidad de respuesta morfogenética; todas estas características pueden cambiar a lo largo del tiempo del cultivo *in vitro* debido al cambio genético o epigenético que las células presenten (Bhojwani & Dantu, 2013).

Este tipo de tejido se induce mediante reguladores de crecimiento, generalmente auxinas y citocininas (Lohmann, 2008); sin embargo, en ocasiones se ha demostrado que los explantes no requieren de la adición de estas moléculas, ya que el tejido desdiferenciado se produce en el área de corte del explante (Perez-Francés *et al.*, 1995).

Los patrones de crecimiento de un callo son similares a los cultivos en suspensión, cuyas fases son: 1) fase de latencia, 2) crecimiento exponencial y lineal, 3) disminución de crecimiento y 4) una fase estacionaria cuando el crecimiento se detiene (George *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Cultivo *in vitro* de cactáceas**

Entre las ventajas que se presentan en el cultivo *in vitro* de cactáceas se encuentra el incremento de plantas libres de virus, lo cual es de suma importancia en especies amenazadas ya que permite el incremento de la población; por otra parte, los brotes generados *in vitro* crecen más rápido que las plantas propagadas de manera natural. Uno de los problemas de esta técnica es que se puede producir la liberación al medio de compuestos fenólicos lo que conlleva a la oxidación del explante, sin embargo, puede ser combatido adicionando antioxidantes al medio de cultivo (Lema-Rumińska & Kulus,

2014). Entre las características que confiere a algunas cactáceas se encuentra la producción de grandes cantidades de auxinas que propician la formación de callo (Clayton *et al.*, 1990).

En gran cantidad de las especies pertenecientes a esta familia, no se encuentran reportes de la germinación u organogénesis *in vitro*, por lo cual la adición de reguladores de crecimiento para lograr una respuesta morfogénica deseada es un punto crítico que en muchos de los casos resulta del conocimiento empírico (García-Rubio & Malda-Barrera, 2010).

Entre los más estudiados se encuentra el género *Opuntia*, particularmente *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. por su valor nutricional y farmacológico contra cáncer (Harlev *et al.*, 2013). Por otra parte, algunas especies han sido reportadas para su producción en cultivo *in vitro* con fines de conservación, tal es el caso de *Cephalocereus senilis*, donde se multiplicaron la cantidad de explantes por medio de la activación de (Choreño-Tapia *et al.*, 2002); esta estrategia fue utilizada para ocho especies de *Turbinicarpus* que posteriormente fueron establecidas *in vivo* (Dávila-Figueroa *et al.*, 2005)

En cuanto al género *Mammillaria* se han reportado solo algunas especies, para *M. elongata*, se ha descrito la regeneración de brotes *in vitro*, adicionando 1.07  $\mu\text{M}$  Ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) y 22.20  $\mu\text{M}$  6-benzilaminopurina (BA) (Papafotiou & Balotis, 2001); para las especies *M. bocasana*, *M. densispina*, *M. pectinifera*, *M. picta*, *M. perbella*, *M. zephyranthoides*, *M. rhodantha*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana* y *M. orcutii* se estableció la metodología para la producción de brotes a partir de organogénesis directa o indirecta por medio de la adición de Cinetina (K) y Ácido Indolacético (AIA) en diferentes concentraciones (Ramirez-Malagon *et al.*, 2007). En el caso de *M. albicoma* se observó su capacidad morfogénica a partir de yemas florales 0.1 mg/L de ANA y 5.0 mg/L de BA (Wyka *et al.*, 2006). Cabe destacar que solo una pequeña parte de todas las especies pertenecientes al género han sido estudiadas en cultivo *in vitro*, considerando la gran diversidad de este; es por lo que *M. heyderi* no cuenta con reportes sobre su comportamiento *in vitro*.



### 2.2.3. Producción *in vitro* de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios también llamados productos naturales, son compuestos del metabolismo no esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un organismo; los cuales son útiles para la competencia interespecies, ya que en muchas ocasiones son producidos como defensa y son originados en plantas, bacterias, hongos y organismos marinos (esponjas, tunicados, corales y caracoles) (Vaishnav & Demain, 2011).

Históricamente se catalogan a los metabolitos secundarios en tres grupos: alcaloides, terpenos y fenilpropanoides, sin embargo, existen compuestos que no se adaptan a estas categorías ya que esta división se basa en la síntesis, precursores principales y características estructurales de las moléculas (Bernards, 2010).

Entre las actividades que presentan algunos de estos compuestos son actividades antibacterianas, antifúngicas, antitumorales, antioxidantes, por mencionar algunas. En estas moléculas se ha observado que algunos antibióticos, pigmentos bacterianos, terpenoides provenientes de plantas tienen actividad anti-VIH, antitumoral, anti-envejecimiento, inmunosupresor, actividades antiprotozoarios y antihelmínticos; por lo que no se limitan a una sola actividad biológica (Vaishnav & Demain, 2011).

Muchos productos naturales han llegado al mercado sin modificación química, esto distingue a los productos naturales de todas las demás fuentes químicas y alienta los esfuerzos por aislar nuevas moléculas con actividad biológica (Zhang & Demain, 2005).

Las plantas actualmente son fuente de gran cantidad de productos utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, además de ser fuente de numerosas sustancias de interés agroquímico, sin embargo, la concentración del metabolito secundario es dependiente de factores fisicoquímicos (concentración de sacarosa, minerales, reguladores de crecimiento, pH, temperatura y cantidad de luz), es por ello que el cultivo *in vitro* posee ventajas respecto al cultivo convencional, ya que se pueden

obtener metabolitos secundarios de gran utilidad a nivel industrial, además de obtener un incremento considerable en el rendimiento del metabolito de interés (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

#### **2.2.4. Producción *in vitro* de metabolitos en el género *Mammillaria***

La gran mayoría de los reportes sobre la producción de pigmentos de especies del género *Mammillaria*, son a partir de fruto o bien planta *in vivo* (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008); el cultivo *in vitro* es un área poco explorada, sin embargo, existen reportes sobre la producción de pigmentos en especies del género; en un estudio para *M. candida* Scheidweiler se realizaron pruebas para la proliferación en medio MS adicionado con 3 mg/L de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2-4,D), Ácido Naftalenacético (ANA) o Ácido Clorofenoxiacético (CFA), solos o en combinación con 0.1 mg/L de Cinetina (K), Cinetin Ribósido (CR) o Benciladenina (BA); mientras que para la producción de pigmento utilizaron glucosa (estrés abiótico) y extractos de hongos (estrés biótico) obteniendo mejores resultados en los medios que contenían 50 y 100 g/L de glucosa (Santos-Díaz *et al.*, 2005). En el caso de *Mammillaria huitzilopochtli*, se utilizó 2-4, D como regulador de crecimiento en un cultivo en suspensión para la producción del pigmento, para posteriormente probar su actividad biológica contra hongos fitopatógenos (Zepeda *et al.*, 2009).

En tejido *in vivo*, un equipo de trabajo analizó los frutos de *M. roseo-alba*, *M. donatii*, *M. coronata*, *M. karwinskiana*, *M. gummifera*, *M. infernillensis*, *M. centricirrha*, *M. krameri* y *M. magnimamma* por técnicas espectroscópicas y encontraron un nuevo compuesto llamado de forma trivial mammillarina, correspondiente a un pigmento dominante del tipo de las betalainas (Wybraniec & Nowak-Wydra, 2007).

A pesar de los reportes mencionados no se ha encontrado información para la producción de pigmentos o algún otro metabolito para especie *M. heyderi*.

### **2.3. Actividad biológica de cactáceas**

Se ha encontrado en este grupo de plantas diversas actividades *in vivo* e *in vitro*, entre ellas se encuentra la actividad antioxidante de *Opuntia monacantha*, a la cual se le comprobó dicha actividad por medio de siete bioensayos *in vitro* (Naseer *et al.*, 2015), de igual forma se ha comprobado dicha actividad para *Opuntia ficus indica*, además para esta especie se han encontrado actividad antiinflamatoria, neuroprotectora, antiviral, antidiabética, anticancerígena y antifúngica (Ammar *et al.*, 2012; Kaur, 2012).

Por otra parte, se ha evidenciado la actividad larvicida de extractos acuosos y etanólicos del endocarpio del fruto de *Pereskia bleo* (Kunth) DC (Thongwat *et al.*, 2014); para este género también se ha descrito la actividad antioxidante, citotóxica, antimicrobiana, diurética y antinociceptivo (de Castro Campos Pinto & Scio, 2014).

En cuanto a actividad antiinflamatoria en otros géneros, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que los frutos de copao (*Eulychnia acida* Phil.) tienen potencial sobre la inhibición de enzimas proinflamatorias LOX y COX-1 y COX-2 (Jiménez-Aspee *et al.*, 2015), además de la amplia gama de metabolitos secundarios encontrados en esta familia, también se han encontrado péptidos con actividad antimicrobiana a partir de *Echinopsis pachanoi*, el cual tiene una estructura similar a una neurotoxina proveniente de una araña (Aboye *et al.*, 2015).

#### **2.3.1. Actividad Antioxidante**

En años recientes se ha señalado la participación de oxígeno activo y los radicales libres en procesos de envejecimiento y otros padecimientos como enfermedades cardíacas, la inflamación, la artritis, deterioro del sistema inmunitario y cáncer. Estas patologías son causadas por el estrés oxidativo que se define como un desequilibrio entre el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una baja actividad de los mecanismos antioxidantes, como consecuencia un aumento del estrés oxidativo puede inducir daños a la estructura celular y potencialmente destruir tejidos (Charles, 2013).

Es por lo que se requiere el uso de antioxidantes, los cuales se definen como una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas, es decir, cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato (Gülçin, 2012). Entre las moléculas más abundantes en las dietas humanas con actividad antioxidante se encuentran los polifenoles. Estos compuestos están diseñados con un anillo aromático que lleva uno o más restos hidroxilo (Tiwari *et al.*, 2013).

### **2.3.2. Betalaínas**

Son pigmentos vacuolares, se caracterizan por su estructura, donde se encuentra un anillo N-heterocíclico y se acumulan en las plantas de alrededor de 17 familias en el orden Caryophyllales (Khan, 2016). De igual manera que las antocianinas, estas moléculas se producen en las semillas, frutos, flores, hojas, tallos y / o raíces de las plantas en su entorno natural (Jain & Gould, 2015), sin embargo, tienen exclusividad mutua con antocianinas, por lo que no se encuentran en las mismas plantas (de Aguiar Lage *et al.*, 2015).

Entre sus características se encuentra que son solubles en agua, y además de poseer actividad antioxidante, actúan para proteger contra la radiación. Se les han atribuido actividades contra el cáncer antiviral y antioxidante; siendo esta última actividad el principal foco de interés (Chauhan *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que son sintetizados a partir de tirosina y se suelen dividir en dos grupos de acuerdo con su coloración: Betacianinas (rojo-violeta) y betaxantinas (amarillo-naranja) (Azeredo, 2009). Debido a la glicosilación y la acilación, las betalaínas exhiben una gran diversidad estructural.

### **2.3.2.1. Betacianinas**

Compuestos de coloración roja que exhiben su máximo de absorción a 536 nm, su presencia en las flores está relacionada con la atracción de los animales para la polinización. La betacianina más común es la betanina, la cual se encuentra distribuida ampliamente en plantas, se ha considerado el betabel como la principal fuente de este tipo de compuestos (Rodríguez-Amaya, 2016). Este tipo de betalaínas son un aducto de iminio de ácido betulínico y ciclo-DOPA.

Usualmente se extraen de la pulpa de la fruta con un disolvente (agua, etanol o metanol), adicionando un tratamiento térmico o ácido, para mejorar el rendimiento de pigmento (Vergara *et al.*, 2014). De acuerdo con la regulación de los aditivos alimentarios, la betanina está permitida como colorante alimentario natural de color rojo, además de ser utilizado en la industria farmacéutica y de alimentos (Esatbeyoglu *et al.*, 2014).

### **2.3.2.2. Betaxantinas**

Son de color amarillo y estructuralmente resultan de la condensación de  $\alpha$ -aminoácidos y aminas con ácido betulínico, la más común es la vulgaxantina I (Jain & Gould, 2015) y tienen un espectro de absorción con longitud de onda máxima de aproximadamente 480 nm, independiente de la naturaleza de aminoácidos. A pesar de las similitudes estructurales con betacianinas, no se ha reportado evidencia alguna de que exista glicosilación en betaxantinas *in vivo* o *in vitro* (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013).

## **2.4. Determinación cualitativa de grupos funcionales**

Los metabolitos secundarios son agrupados en diferentes grupos de acuerdo con su naturaleza química: a) isoprenoides (terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos) b) derivados fenólicos: (fenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos, quinonas, antracénosidos) y c) alcaloides. Existe un

grupo de pruebas de tamizaje fitoquímico con la cual se observa de manera cualitativa la presencia o ausencia de un grupo funcional, esto a través del cambio de coloración cuando el reactivo reacciona con el metabolito presente en el extracto. Algunas de ellas son la prueba del  $\text{Br}_2/\text{CCl}_4$  (bromo en tetracloruro de carbono) o del  $\text{KMnO}_4$  (permanganato de potasio) utilizado para detectar insaturaciones; la prueba de 2-4-dinitrofenilhidracina para el grupo carbonilo; la reacción con  $\text{FeCl}_3$  (cloruro de hierro) para oxidrilos fenólicos; la prueba de Liebermann-Burchard para esteroides; la prueba de Salkowski para detectar la presencia de terpenos y para carbohidratos la prueba de Molisch, etc. (Kuklinski, 2000)

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios en extractos del género *Mammillaria*, sin embargo, **no existen reportes de la producción de los mismos *in vitro* o *in vivo* para *M. heyderi***, es por lo que con este trabajo se pretende implementar el cultivo *in vitro* para la producción de pigmentos de origen natural, ya que el alto consumo de colorantes sintéticos es tóxico para el organismo, por lo que la técnica representa una opción para la producción de los mismos a gran escala.

#### **4. HIPÓTESIS**

El cultivo de tejido indiferenciado *in vitro* de *Mammillaria heyderi* será capaz de producir betalaínas a través del estrés abiótico.



## 5. OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de *Mammillaria heyderi* para favorecer la producción de metabolitos secundarios de importancia por su posible aplicación en la industria farmacéutica o de alimentos.

### 5.1. Objetivos particulares

- Desarrollar un protocolo para la producción de tejido indiferenciado de *Mammillaria heyderi*.
- Inducir la producción de metabolitos secundarios en el cultivo de tejido *in vitro* mediante condiciones de estrés abiótico.
- Determinar la presencia los metabolitos secundarios de los extractos de callo de *Mammillaria heyderi* por métodos cualitativos.
- Determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH y ABTS del extracto acuoso.
- Determinar la toxicidad del extracto mediante el método de *Artemia salina*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico



**Figura. 2:** Plántula *in vitro* de *Mammillaria heyderi*

Se emplearon plántulas cultivadas *in vitro* de aproximadamente 1 año de *Mammillaria heyderi* para inducir calogénesis (Figura 2).

Mientras que para la evaluación de la toxicidad de los extractos se emplearon huevecillos de *Artemia salina*.

### 6.2. Metodología

#### 6.2.1 Producción *in vitro* del tejido indiferenciado

Se seleccionó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (SIGMA) sin reguladores de crecimiento, se añadieron 30 g/L de sacarosa y agar como agente solidificante se utilizó agar en una concentración de 7g/L. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de luz (16h/luz y 8 h/oscuridad) y temperatura constante ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 6 meses hasta obtener suficiente biomasa, realizando resiembras periódicas cada 8 semanas; posteriormente se cambiaron al medio MS elaborado en las mismas condiciones, sin embargo, se adicionó con un regulador de crecimiento de tipo auxina en diferentes concentraciones para lograr la proliferación celular de las plántulas (Tabla 1). Para cada tratamiento se utilizaron 10 frascos con 1g de callo completamente verde y friable. De igual forma se realizaron

resiembras cada 8 semanas registrando el peso fresco obtenido y su respuesta morfogénica semanalmente.

**Tabla 1.** Medios de cultivo para proliferación de callo

<b>Medio</b>	<b>Regulador</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
M1	Sin regulador (control)	No aplica
M2	ANA	1
M3	ANA	3
M4	ANA	5
M5	AIA	1
M6	AIA	3
M7	AIA	5
M8	2,4-D	1
M9	2,4-D	3
M10	2,4-D	5

El medio que obtuvo el mejor rendimiento y respuesta morfogénica se seleccionó para la siguiente etapa del proyecto.

#### 6.2.2. Inducción de estrés abiótico

Se partió de callos sin pigmentación, es decir, callos completamente verdes para la evaluación del estrés abiótico. Se pesó 1g de callo y se colocó en frascos tipo conserva con 10 mL de medio de cultivo MS sólido sin reguladores con diferente concentración de sacarosa (Tabla 2) con 3 repeticiones por tratamiento.

**Tabla 2.** Medios de cultivo para inducción de estrés

<b>Medio</b>	<b>Concentración de sacarosa (g/L)</b>
MI	15
MII	30
MIII	45
MIV	60

### 6.2.3 Extracción de muestras de estrés abiótico

Una vez transcurridos 4 semanas se sacaron las muestras para obtener el peso fresco y posteriormente cada muestra fue macerada para realizar una extracción acuosa con el fin de evaluar la pigmentación por medio de absorbancia (desde 300 hasta 650 nm), posteriormente se agregó agua bidestilada para realizar la extracción, acto seguido se sonicó durante 10 minutos (3800, Branson) y se mantuvo en reposo por 16 horas entre 0-4° C y fue filtrado con papel Whatman No. 1. Los extractos fueron liofilizados (FreeZone 1, Labconco) y resuspendidos con el fin de evaluar la pigmentación por medio de absorbancia (480 y 535 nm) (6320D, Jenway). El medio que obtuvo la mejor pigmentación se seleccionó para la realizar la cinética de crecimiento correspondiente.

### 6.2.4 Cinética de crecimiento con medio de cultivo específico

El medio con mejor producción del metabolito secundario fue seleccionado (MIII) en conjunto con el medio para la producción de tejido regenerado (M6) para realizar una cinética de crecimiento con la finalidad de obtener el tiempo óptimo para la proliferación de biomasa, así como, la producción del metabolito secundario. Se utilizaron callos de *M. heyderi* completamente verdes y se pesó 1 g de muestra por cada frasco en el medio seleccionado. Para evaluar la proliferación celular se tomó en cuenta el peso fresco y

posteriormente su peso seco hasta obtener un peso constante por cada semana, durante 12 semanas (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2005).

En cuanto a la pigmentación cada muestra se sometió a la extracción acuosa en frío anteriormente descrita y su posterior cuantificación mediante absorbancia en 480 y 535 nm en un espectrofotómetro (6320D, Jenway). Utilizando la fórmula descrita anteriormente (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008)  $B(mg/100g) = (AxFDxPMxVx100)/(\epsilon xPxL)$ , se puede obtener la concentración de betalaínas y betaxantinas. Donde B, es betacianinas o betaxantinas, A es la absorbancia a 535 (betacianinas) y 483 nm (betaxantinas); FD el factor de dilución al momento de leer en el espectrofotómetro, PM es el peso molecular (Betanina = 550 g/mol e Indicaxantina = 308 g/mol), V es el volumen del extracto,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (Betanina = 60 000 L/mol.cm, e Indicaxantina = 48 000 L/mol.cm), P es el peso de la muestra y L es la longitud de la celda (1 cm). Las tomas de muestra se realizaron por triplicado semanalmente, durante 4 semanas.

#### 6.2.5 Análisis estadístico de cultivo *in vitro*

Todos los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar con las repeticiones correspondientes por cada ensayo. La unidad experimental en cada uno de los casos fue un gramo de callo por frasco de vidrio con 10 mL de medio de cultivo (Fig. 3). Los datos obtenidos se sometieron a una prueba de normalidad de Kruskal-Wallis y posteriormente Análisis de Varianza de un factor a azar con el paquete de análisis

estadístico SPSS 18 (IBM), por su parte la comparación múltiple de medias se usó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 3:** Unidad experimental para los experimentos de cultivo *in vitro*

#### 6.2.6 Obtención de extractos de callo para actividad biológica

Una vez que se obtuvo el método de producción de callo *in vitro*, se cultivó durante 8 semanas bajo las condiciones descritas en la primera etapa en el medio M6, posteriormente todo el callo fue sometido a estrés abiótico en el medio MIII, y acto seguido se realizó la extracción acuosa anteriormente descrita, a este extracto se le denomina M6-MIII.

El callo pigmentado se pesó y maceró en un mortero de porcelana, para ser depositadas en un matraz Erlenmeyer agregando agua bidestilada fría (0-5°C) en proporción 5:1, posteriormente se sonicó (Mod. 3800, Branson) durante 30 minutos y se dejó en oscuridad por 24 horas a una temperatura de 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo se filtró con papel Whatman No. 1, se congeló con CO<sub>2</sub> en recipientes ámbar y se concentró por liofilización (Mod. FREEZONE 1, LABCONCO). El proceso se repitió hasta que el agua del extracto carecía de pigmentación. El extracto resultante fue almacenado en condiciones de refrigeración y en oscuridad.

El material vegetal restante fue utilizado posteriormente para elaborar una extracción con etanol absoluto y posteriormente acetona. Se obtuvo el rendimiento para los extractos a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{(\text{Peso del extracto})(100)}{\text{Peso del material vegetal}}$$

A partir del extracto acuoso se realizaron las pruebas preliminares de identificación de metabolitos, así como las de actividad biológica. Mientras que del extracto de etanol y acetona únicamente se le realizaron las pruebas de tamizaje fitoquímico por la disponibilidad del extracto.

#### 6.2.7 Pruebas de tamizaje fitoquímico

Se realizaron las pruebas de tamizaje fitoquímico en placas de porcelana para la identificación de grupos funcionales, cada prueba fue realizada por triplicado aplicando el reactivo correspondiente para cada una de las siguientes pruebas

- Insaturaciones: Prueba del  $\text{KMnO}_4$ .
- Grupo carbonilo: Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina.
- Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales): Prueba del  $\text{FeCl}_3$ .
- Esteroides y triterpenos: Prueba de Liebermann-Buchard y Prueba de Salkowski
- Carbohidratos: Prueba de Molish.
- Prueba de las coumarinas: Disolver la muestra en  $\text{NaOH}$
- Sesquiterpenlactonas: Prueba de Baljet.
- Flavonoides: Prueba del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y Prueba de Shinoda.
- Leucoantocianinas: Disolver la muestra en propanol-1
- Alcaloides: Prueba de Dragendorff.
- Saponinas: Prueba de la agitación.

## 6.2.8 Actividad antioxidante

### 6.2.8.1 Método de DPPH

El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Avella Gutiérrez y colaboradores (2008) con algunas modificaciones, se preparó una solución del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, SIGMA) a 40 ppm, con absorbancia de  $1 \pm 0.02$ ; Posteriormente se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico en metanol a 1 mg/mL y se elaboraron alícuotas entre 5 y 120 ppm, mientras que para el extracto del medio M6-MIII se elaboró solución stock de 20 mg/mL y se probaron 6 concentraciones; todo el ensayo se realizó por triplicado. En ambos casos las muestras se sonicaron hasta disolución total, posteriormente se dejaron reposar en la obscuridad por 30 min a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se procedió a leer las absorbancias con ayuda de un espectrofotómetro Jenway 6320D a 519 nm. Los resultados se expresan como % de inhibición utilizando la siguiente fórmula y como  $CI_{50}$ .

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final})(100)}{\text{Abs. inicial}}$$

### 6.2.8.2 Método de ABTS

El ensayo de actividad antioxidante por el radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) o ABTS, se obtuvo a partir de una mezcla de 2.4 mM de persulfato de potasio con 7mM de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP), el cual se mantuvo en obscuridad durante 16 h a temperatura ambiente, posteriormente se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 754 nm, como control positivo se utilizó una solución de Trolox a 4mM. Se utilizaron celdas de volumen reducido de 1 mL en los cuales se agregó 50  $\mu$ L de la solución del extracto (en diferentes concentraciones) y 950 del radical, se incubaron durante 7 minutos temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 754 nm. Todas las tomas se realizaron por triplicado y el resultado se expresa como capacidad antioxidante equivalente en Trolox.



### 6.2.9 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para la cuantificación de fenoles totales, se utilizó como curva de calibración Ácido gálico en una concentración de 10 mg/mL y posteriormente se utilizaron alícuotas entre 20 y 100  $\mu$ L, se colocaron en una celda desechable y se completó su volumen a 1 mL con agua destilada, posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido a 1N) y se dejaron reposar durante 6 min en obscuridad, al terminar este tiempo se adicionaron 100  $\mu$ L de Carbonato de sodio al 20% y se dejó en obscuridad durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se procedió a leer las absorbancias a 756 nm con ayuda de un espectrofotómetro Jenway 6320D. Para realizar la cuantificación de fenoles totales en el extracto acuoso M6-MIII, se realizó una solución stock de 10 mg/mL y se tomaron alícuotas de 0, 40, 80, 120 y 200  $\mu$ L posteriormente se completó el volumen con agua destilada y el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N en las mismas condiciones que el ácido gálico. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico/ gr de muestra, cabe mencionar que cada concentración de la curva y del extracto fueron realizados por triplicado.

### 6.2.10 Prueba de toxicidad de *A. salina*

Para la estimación de la toxicidad del extracto se realizó el ensayo de toxicidad en *Artemia salina*, para la cual se preparó agua de mar artificial al 4% p/v utilizando sal de mar Instant Ocean Aquarium System y agua bidestilada ajustando el pH a 7.8, una vez disuelta el agua se le agregaron 6 mg de levadura Mead Johnson y se agitó hasta su completa disolución, posteriormente se dejaron eclosionar los huevecillos en una temperatura entre 22-28° C. Se incubaron 100 mg de huevecillos de *A. salina* en condiciones de oscuridad y oxigenación. Para la preparación del extracto M6-MIII se obtuvo una solución stock de 1 mg/mL. En una microplaca de 96 pozos se agregaron 100  $\mu$ L de agua salina con 10 a 15 nauplios y se le colocó a cada pozo 100  $\mu$ L de la solución del extracto en concentraciones de: 0.5, 0.24, 0.12, 0.1, 0.08 y 0.06 mg/mL. Como control positivo fue utilizado dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 400 ppm y como control negativo agua de mar artificial, todas las concentraciones fueron probadas por triplicado, se dejó

incubar bajo una lámpara de 20 watts por 24 h y se procedió al conteo de nauplios vivos para determinar la  $DL_{50}$ . Se realizó un análisis estadístico Probit en SPPS 18 (IBM) (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993).

#### 6.2.11 Concentración del compuesto del extracto M6-MIII a través de resina

Con los resultados obtenidos para la actividad antioxidante con el extracto crudo se pretende concentrar el compuesto activo utilizando una resina de amberlita (XEAD7), por lo cual se colocó la resina en un embudo y se agregaron 250 mg de extracto M6-MIII diluido en agua bidestilada, asegurándose de agregar suficiente agua bidestilada, posteriormente sobre la resina, se agregó metanol y acto seguido se colectó y concentró el extracto, se volvió a aplicar la prueba de DPPH (misma metodología anteriormente mencionada) para confirmar que el compuesto causante de la actividad antioxidante se encuentra libre de compuestos que pudieran interferir con la misma.

#### 6.2.12 Prueba preliminar de cromatografía de capa fina

A partir del extracto M6-MIII se realizaron cromatografías de capa fina (TLC), esto con la finalidad de obtener un sistema eficiente como método de separación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo con diferentes combinaciones de fase móvil (agua, metanol, 2-propanol, acetona, cloroformo). Se utilizó como muestra control un estándar de betanina (Sigma), donde preparó una solución stock de 3 mg en 300  $\mu$ L de metanol y para el extracto se utilizaron 15 mg disueltos en 500  $\mu$ L, en cada punto se aplicaron 20  $\mu$ L en placas de sílica gel F254 (Merk) y se dejó secar. Se aplicaron diferentes sistemas para la fase móvil: 1) propanol-etanol-agua-ácido Acético (6:7:6:1), 2) Agua-Etanol (1:1), 3) Etanol-agua-acetona (1:1:1), 4) agua-acetona (1:1), 5) HCl 1%-Agua (1:99). Posteriormente se reveló en luz UV y en caso de ser posible se registraron los factores de retención ( $R_f$ ) con la siguiente fórmula

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (cm)}}$$

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Material vegetal.

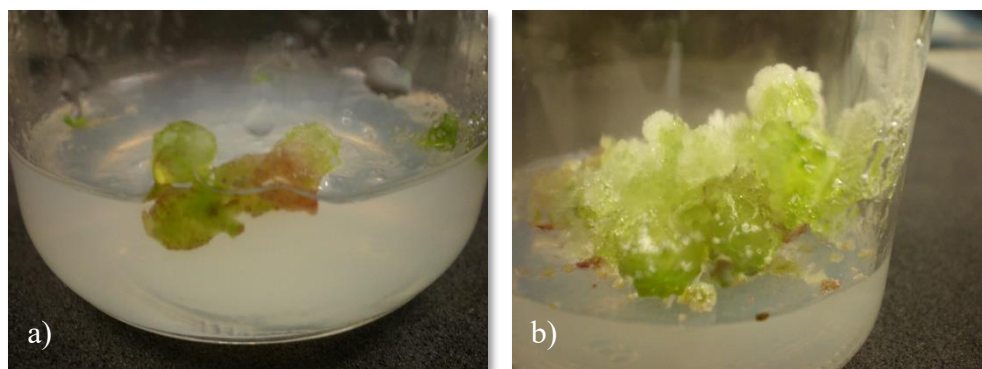
Con la finalidad de confirmar las características de la especie vegetal se procedió a la identificación de la planta adulta y se depositó un ejemplar en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con el número de folio 028493, el 11 de junio de 2018 (Figura 4).



**Figura 4:** Planta adulta de *M. heyderi*: a) Corte transversal, b) Zona radicular y c) Zona apical.

### 7.2. Respuesta morfogénica del tejido *in vitro* de *M. heyderi*.

Durante el desarrollo de la investigación, las resiembras realizadas en cada una de las etapas fue satisfactorio, ya que hubo nula contaminación para todas las unidades experimentales, lo que conllevó a evaluar la respuesta morfogénica, en donde, las plántulas de *M. heyderi* a través de las resiembras en el medio MS sin reguladores



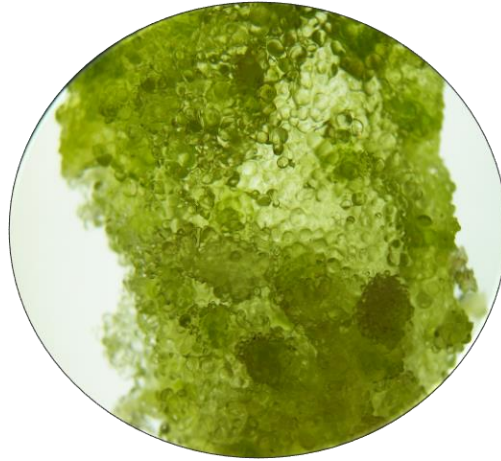
**Figura 5:** *Mammillaria heyderi in vitro*: a) Plántula vitrificada, b) Inicio de la producción de callo.

presentaron vitrificación (Fig. 5a) y posteriormente su conversión a tejido calloso (Fig. 5b), dicho tejido se presentó una consistencia friable y de color verde claro.

Una vez que se obtuvo suficiente biomasa, se sometió al protocolo de proliferación del tejido indiferenciado en el cual se obtuvieron diversas respuestas morfogénicas, seleccionando únicamente tejido verde y friable (Fig. 6). Los promedios de los pesos frescos registrados se muestran en la Tabla 3.

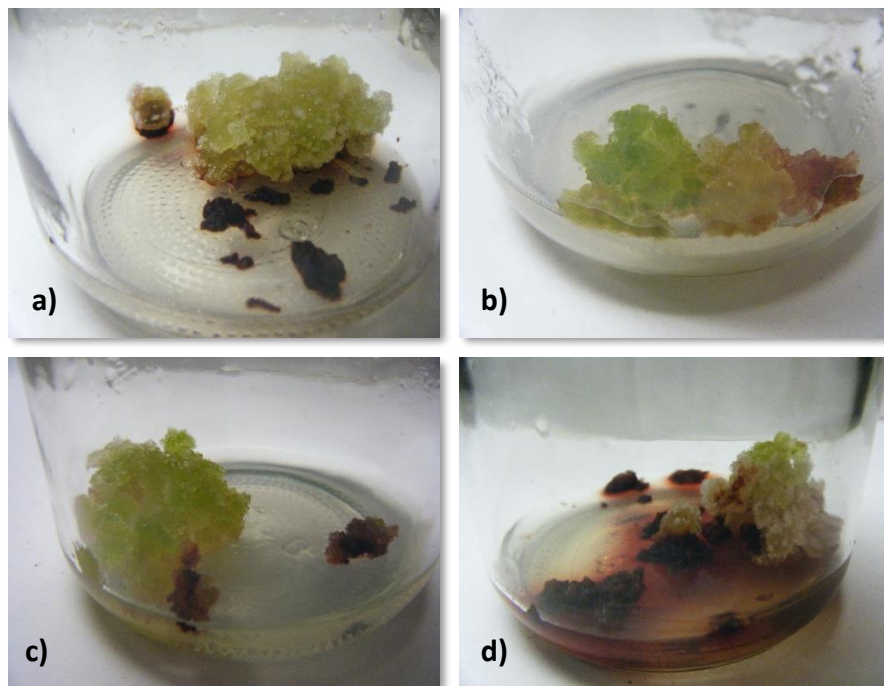
**Tabla 3.** Crecimiento promedio de callo

<b>Medio</b>	<b>Semana 8</b>	<b>Semana 16</b>	<b>Semana 24</b>
M1	1.76729167	3.67103333	6.51886667
M2	1.59549167	1.8288	2.87808333
M3	1.89634167	2.987525	6.294675
M4	2.0177	3.065225	6.71785833
M5	1.21263333	1.45225	1.673725
M6	2.612475	4.56912727	8.53265455
M7	2.61602727	4.13943636	8.28774545
M8	5.37703333	7.225925	7.4819
M9	2.088	3.55612727	6.61087273
M10	2.02685833	3.5943	6.5221



**Figura 6:** Tejido de *M. heyderi* observado 30X.

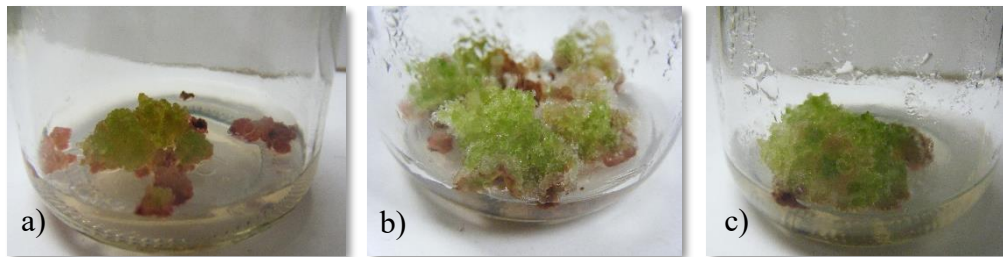
El control (M1) permaneció con pocos cambios (Fig. 7a), no obstante, es notable que los medios adicionados con ANA en la concentración de 1 y 3 mg/L y (M2, M3) presentaron poca pigmentación en la base del explante (Fig. 7b y 7c), para el M4 se presentó pigmento desde la primera semana, en donde posteriormente dicho pigmento



**Figura 7:** Tejido regenerado al cabo de las 24 semanas a) en medio sin reguladores (M1) y con ANA en diferentes concentraciones b) M2, c) M3 y d) M4

difundió al medio de cultivo (Fig. 7d). A través de los subcultivos se observó una oxidación fenólica de los explantes en este medio de cultivo.

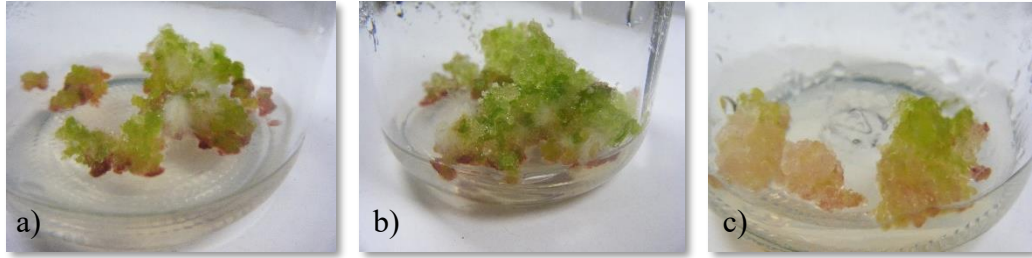
Los medios que contenían AIA (M5, M6 y M7) mostraron de manera general un tejido friable con crecimiento cristalino en la superficie de este, la base se encuentra ligeramente pigmentada en tono rojo-café (Fig. 8).



**Figura 8:** Tejido regenerado al cabo de las 24 semanas en medio con AIA en diferentes concentraciones b) M5, c) M6 y d) M7

En la semana 8, se obtuvo mejor crecimiento significativamente con el tratamiento M8, sin embargo, a partir de la semana 6, en algunas repeticiones comenzaron a presentar la diferenciación de las partes aéreas del callo a raíces. Los tratamientos M6 y M7, dicho tejido se encontraba pigmentado en la parte basal, donde el tejido estaba en contacto con el medio, la parte aérea se encontraba en su mayoría verde.

Para la semana 16, los mejores tratamientos resultaron ser M6 y M8, en donde M6, presentó en su mayoría oxidación en la parte basal, mostrando la superficie aérea del callo en coloración verde, de consistencia firme y compacta. Por su parte M8 continuó formando raíces, en donde a partir de estas crecieron numerosos pelos radiculares.



**Figura 9:** Tejido regenerado al cabo de las 24 semanas en medio con 2,4-D.  
a) Medio M8, b) Medio M9 y c) Medio M10

En la semana 24, los tratamientos que mostraron una diferencia significativa en el crecimiento fueron el M6, M7 y M8. El tratamiento M6 presentó crecimiento al igual que en la resiembra anterior, sin embargo, presentaba consistencia más friable, comparado con el tratamiento M7, que presentó mayor pigmentación en el tejido regenerado y se mostraba más compacto. Para los tratamientos con 2,4-D (M9 y M10) se obtuvo menor crecimiento y poca pigmentación, sin embargo, el tejido se mostraba amarillento y en algunas zonas presentaban oxidación (Fig.9b, c).

Cabe mencionar que existe diferencia significativa entre la semana 8 y la 16, pero no con la semana 24, por lo tanto, es recomendable acortar el tiempo de incubación a 16 semanas. Una vez obtenidos los datos de la respuesta morfo genética y el peso fresco, se eligió el tratamiento M6 para continuar la producción de biomasa por las características anteriormente mencionadas, cabe mencionar que el tratamiento M7, resultó con biomasa más compacta y presentó mayor pigmentación y por su parte el tratamiento M8 se descarta ya que se desea que el cultivo permanezca sin diferenciarse. En la tabla se puede observar un resumen de las respuestas morfo genéticas para este experimento

**Tabla 4:** Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el incremento de biomasa de callos de *M. heyderi*.

Tratamiento	Peso	Observaciones morfológicas 24 semanas				
	Media $\pm$ DE	Pigmentación	Oxidación	Coloración	Diferenciación	Apariencia
M1	3.7 $\pm$ 2.52 <sup>a, b</sup>	Basal	-	Verde	-	Friable
M2	6.03 $\pm$ 4.23 <sup>a, b, c</sup>	Basal	-	Verde	-	Friable
M3	8.62 $\pm$ 4.40 <sup>a, b, c, d</sup>	Basal	-	Verde	-	Friable
M4	7.08 $\pm$ 4.13 <sup>a, b, c, d</sup>	Basal	-	Verde	-	Friable
M5	2.92 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	Completa	+	Roja	-	Compacto
M6	10.30 $\pm$ 0.91 <sup>b, c, d</sup>	Basal	-	Verde	-	Friable
M7	12.38 $\pm$ 2.53 <sup>c, d</sup>	Basal	-	Verde	-	Compacto
M8	13.74 $\pm$ 5.51 <sup>d</sup>	Basal	-	Verde	Raíz	Compacto
M9	9.780 $\pm$ 2.56 <sup>a, b, c, d</sup>	Basal	+	Amarillenta	Raíz	Compacto
M10	8.47 $\pm$ 2.14 <sup>a, b, c, d</sup>	Basal	+	Amarillenta	Raíz	Compacto

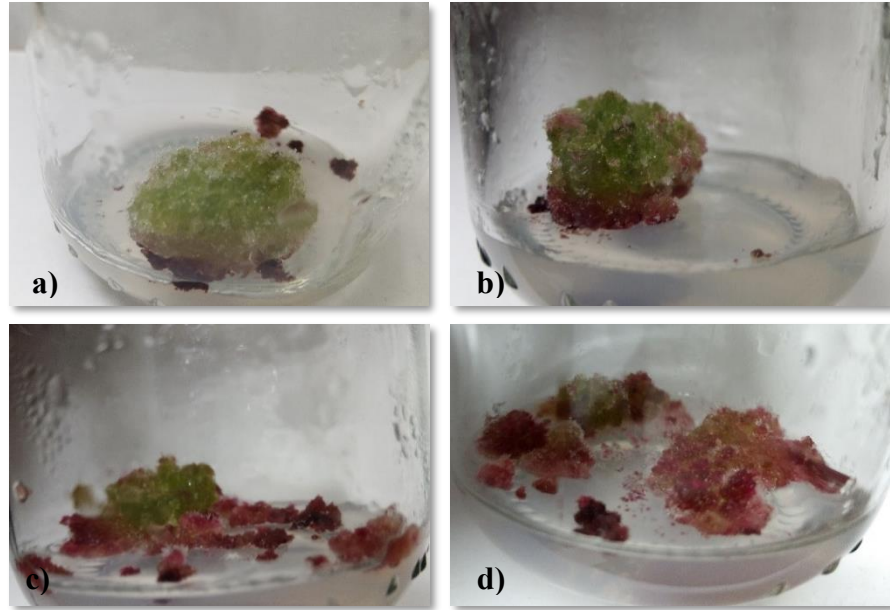
Los valores representan las medias obtenidas a las 24 semanas de crecimiento, con resiembras cada 8 semanas. n=10 para cada tratamiento. Las medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

### 7.3. Estrés abiótico del tejido *in vitro* de *M. heyderi*

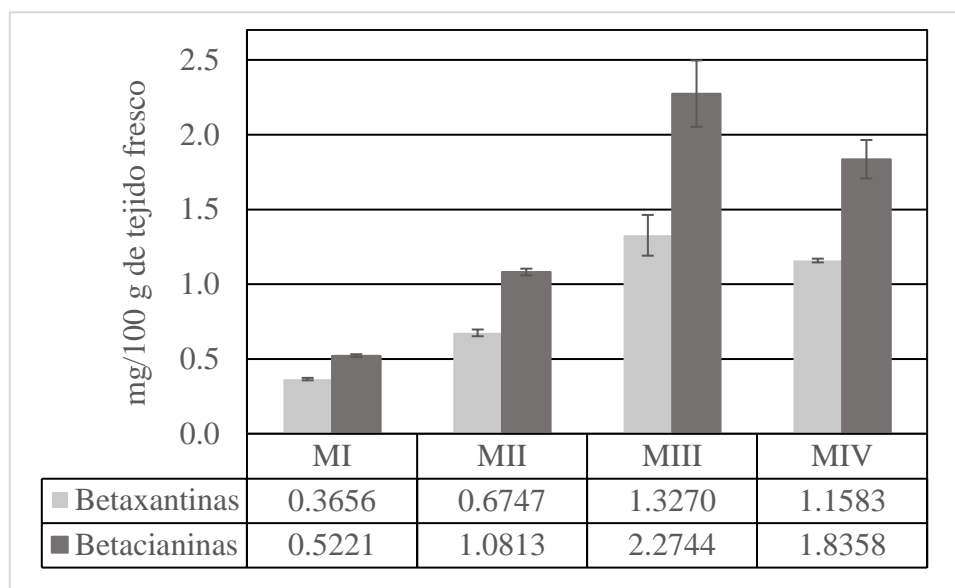
En la inducción de estrés abiótico (sacarosa) a las células de callo, el tejido presentó diversas respuestas, tal como se mencionan a continuación, en el medio que contiene 15g/L de sacarosa (Fig. 10a), se encontraba ligeramente oxidado en la zona donde el tejido se encuentra en contacto con el medio al cabo de 4 semanas, mientras que el resto del tejido permaneció sin cambios. El medio MII se encontraba pigmentado en tono rojo oscuro en la base, mientras que la parte aérea permanecía sin cambios (Fig. 10b). El medio MIII a partir de la primera semana mostró una pigmentación fusca casi en la totalidad del tejido, mismo que se intensificó hasta la semana 3 y posteriormente no se observaron



cambios (Fig. 10c). Los callos que se sometieron al medio MIV, se pigmentaron en su totalidad (Fig. 10d). Se encontró de manera general que a medida que aumenta el gradiente de sacarosa, aumenta el grado de pigmentación siendo el medio (MIII) el ideal para generar mayor contenido de betalainas de acuerdo con la absorbancia registrada (Gráfica 1).



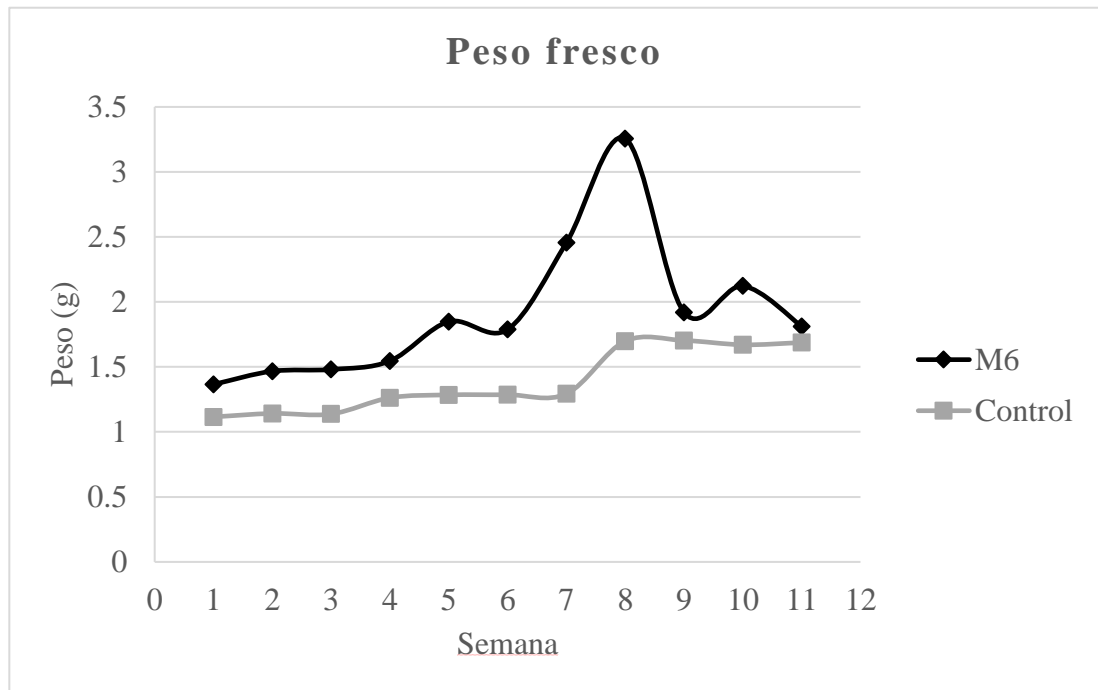
**Figura 10:** Protocolo de estrés abiótico a) MI b) MII, c) MIII y d) MIV



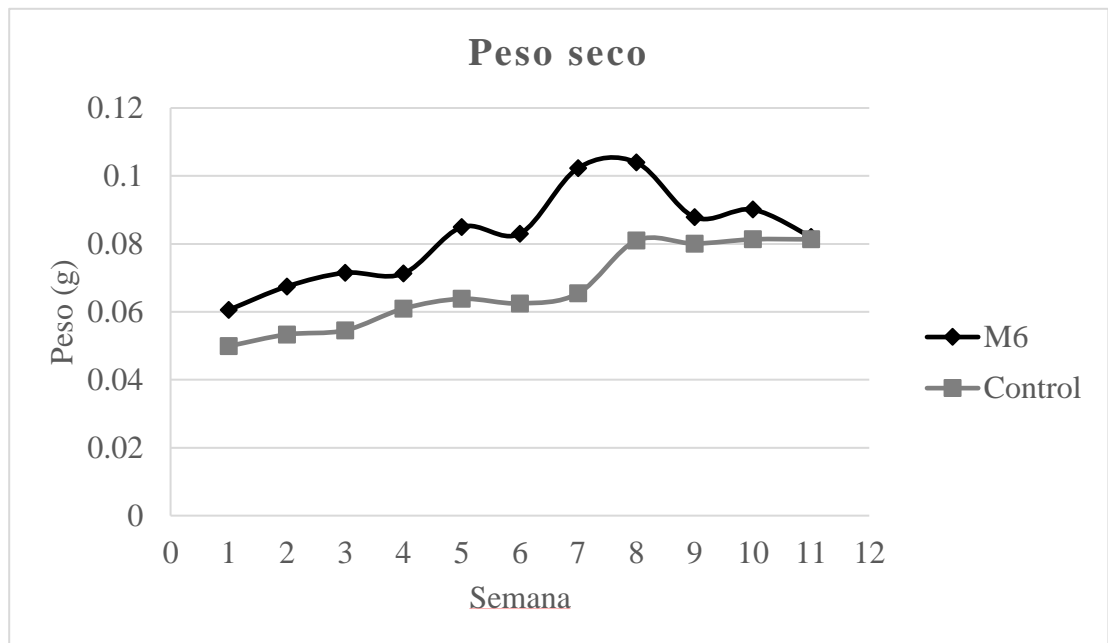
**Gráfica 1.** Efecto de la concentración de sacarosa para la producción de betalaínas en callos de *M. heyderi*.

#### 7.4. Cinética de crecimiento M6-MIII

En cuanto a la cinética de crecimiento del medio M6, existe diferencia altamente significativa entre el control (M1) y el tratamiento (M6) (F: 41.564, sig. 0.000), así como el tiempo (F=7.177, Sig=0.000), donde de acuerdo con la prueba de Tukey, las semanas 7 a 10, tienen la mejor producción de biomasa respecto a peso fresco (Gráfica 2). Sin embargo, se obtuvo el pico de crecimiento en la semana 8 con una media de 3.2564 g de peso fresco considerando que, estos datos son aplicables para el peso fresco y desde la semana 7 a la 11 en relación a la biomasa seca (Gráfica 3), donde el tiempo y el tratamiento resultaron ser altamente significativo (F=14.927, sig=0.000 y F=71.164, sig. 0.000, respectivamente); aunque se debe considerar que el subcultivo prolongado pueden ser perjudicial para el crecimiento de los callos, cabe mencionar que este cultivo no presentó signos de degeneración del cultivo.

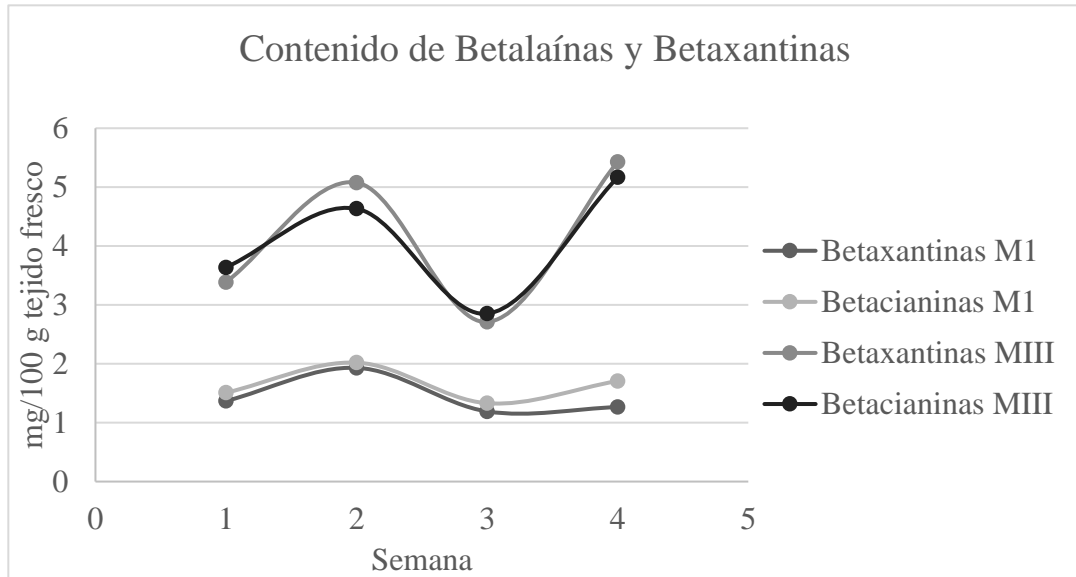


**Gráfica 2.** Peso fresco de la cinética de crecimiento para el protocolo de proliferación de biomasa en Medio M6 y M1 como control.



**Gráfica 3.** Peso seco de la cinética de crecimiento para el protocolo de proliferación de biomasa en Medio M6 y M1 como control.

Para la cinética de crecimiento del medio MIII con respecto al control (M1), no es necesario esperar 4 semanas para realizar la extracción de pigmento, ya que desde la semana 1, no existe diferencia significativa respecto al tiempo (semanas), pero si respecto a control (M1), cabe destacar que a pesar de obtener la absorbancia a 480 y 535 nm no existe diferencia significativa entre la producción de betalaínas y betaxantinas (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Contenido de Betacianinas y Betaxantinas en M1 (control) y MIII.

Se observaron las células al microscopio para revisar que, durante el cultivo el estrés osmótico no ocasionara daños en la estructura celular, mismo que no se observó.



**Figura 11:** Tejido de *M. heyderi* pigmentado 40X

### 7.5. Obtención de extracto

Se obtuvieron 101.2 g de callo cultivado en el medio M6-MIII, una vez realizada la extracción, el extracto acuoso obtuvo un rendimiento del 3.3% respecto al peso fresco del tejido desdiferenciado, mientras que las extracciones subsecuentes (metanol y acetona) obtuvieron un rendimiento más bajo, respecto al peso seco de la muestra (0.3% y 0.025%). Cabe mencionar que a pesar de todas las extracciones el tejido conservó parte de su coloración rojiza.

### 7.6. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto de *M. heyderi*

Todas las pruebas se realizaron en placas de porcelana, obteniendo resultados cualitativos mostrados en la tabla 5. Entre los que destacan como positivos: Insaturaciones, carbohidratos y alcaloides. Cabe resaltar que el extracto acuoso, es el único que muestra la presencia de cumarinas.

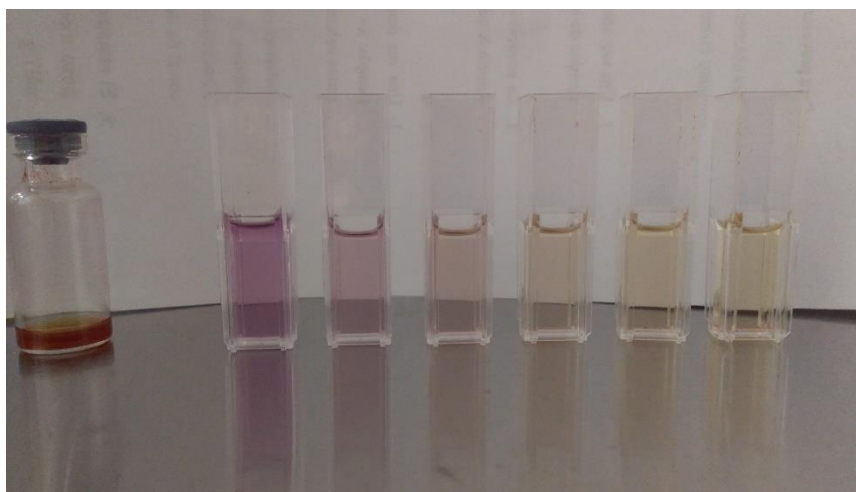
**Tabla 5:** Pruebas de tamizaje fitoquímico para los extractos de *M. heyderi*

<b>Grupo funcional</b>	<b>Prueba</b>	<b>Acuoso</b>	<b>Etanol</b>	<b>Acetona</b>
Insaturaciones	KMnO <sub>4</sub> .	+	+	-
Grupo carbonilo	2-4 Dinitrofenilhidracina	-	-	-
Oxhidrilos fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	-	-	-
Esteroides y triterpenos	Salkowski	-	+	+
	Liebermann-Buchard	-	+	+
Carbohidratos	Molish	+	+	+
Cumarinas	NaOH	+	-	-
Sesquiterpenlactonas	Baljet	-	-	+
Flavonoides	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	+	+
	Shinoda	-	+	+
Leucoantocianinas	Propanol-1	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff.	+	+	+
Saponinas	Agitación	-	-	-

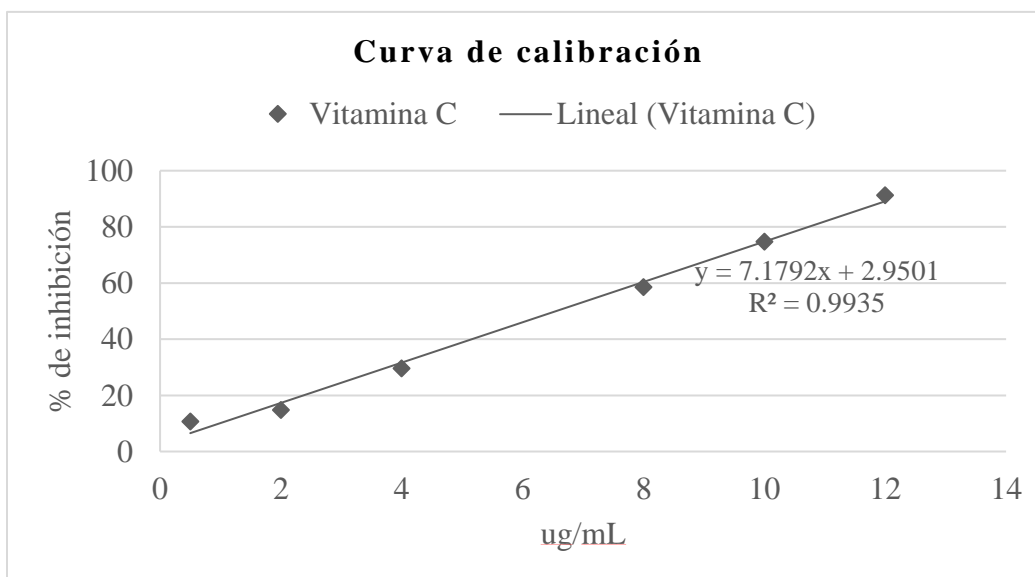
## 7.7. Actividad antioxidante

### 7.7.1. Actividad antioxidante por DPPH

Con el extracto acuoso una vez preparada la solución stock se probaron las distintas concentraciones (Fig.12), así mismo se realizó la curva de calibración de Ác. Ascórbico y se obtuvo una  $CI_{50}$  de 3.101  $\mu\text{g/mL}$  para éste (Gráfica 5), mientras que para el extracto acuoso fue de 0.177  $\text{mg/mL}$



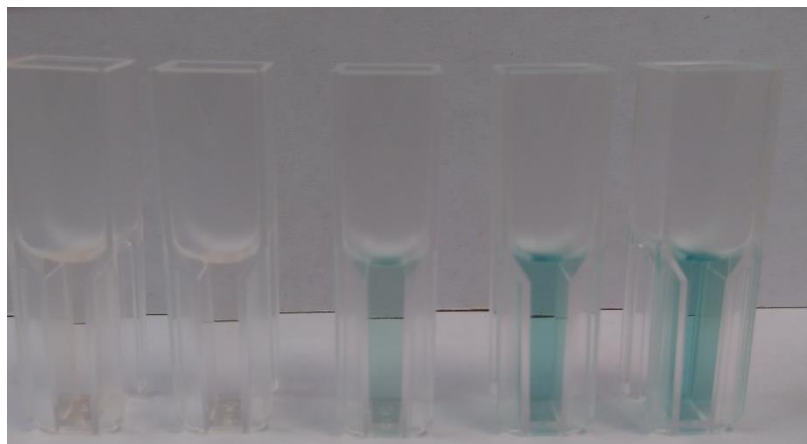
**Figura 12:** Actividad antioxidante del extracto acuoso de *M. heyderi* por el método de DPPH



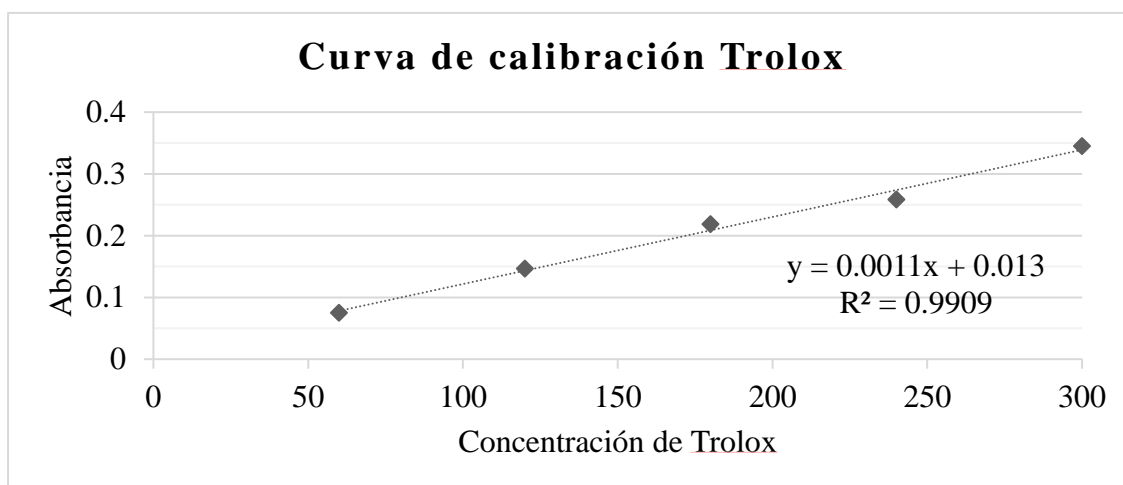
**Gráfica 5.** Curva de calibración de vitamina C para ensayo de DPPH

### 7.7.2. Actividad antioxidante por ABTS

En cuanto a la actividad antioxidante se probaron cinco concentraciones por este método de decolorización (Fig. 13) y se obtuvo 1.8587 mol ET/100 g de peso fresco para el extracto M6-MIII, a continuación, se muestra la curva de calibración de Trolox (Gráfica 6).



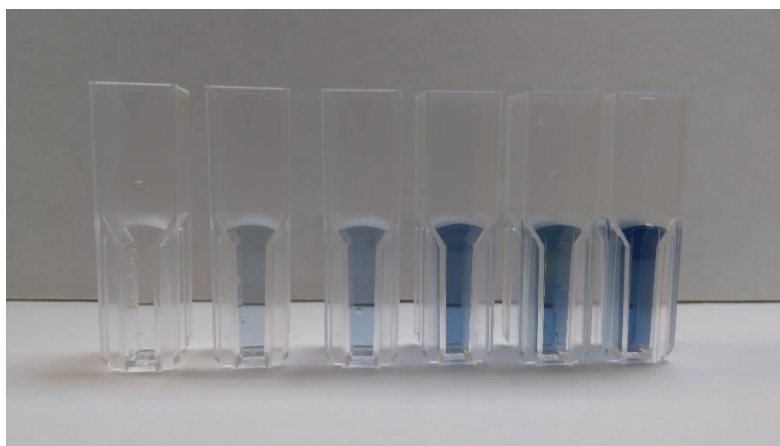
**Figura 13:** Actividad antioxidante del extracto acuoso de *M. heyderi* por el método de ABTS



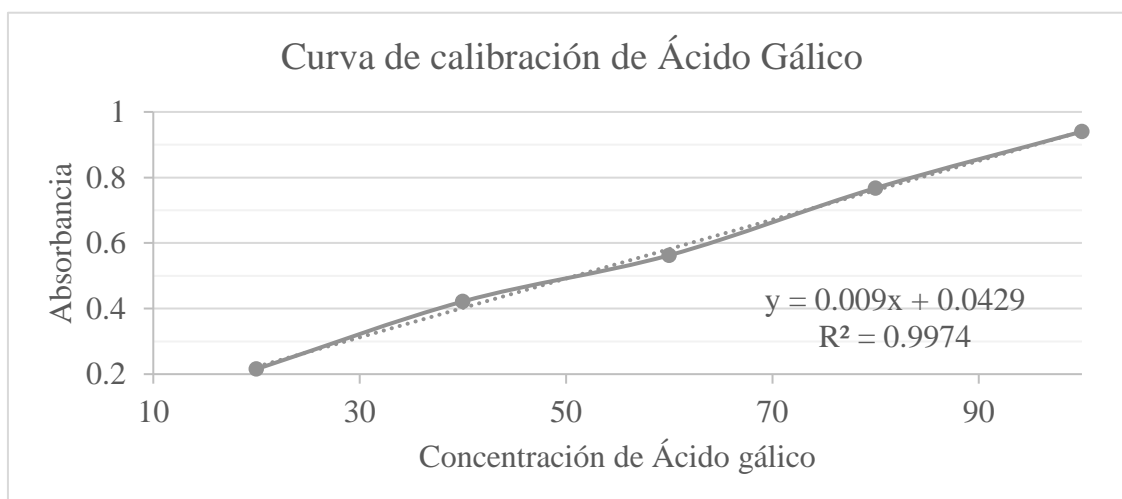
**Gráfica 6.** Curva de calibración de Trolox para ensayo de ABTS

## 7.8. Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para este ensayo se obtuvo 49.961g EAG/ 100 g de peso fresco en el extracto crudo M6-MIII, la curva de calibración de ácido gálico se muestra a continuación (Gráfica 7).



**Figura 14:** Cuantificación de fenoles totales del extracto acuoso de *M. heyderi* por el método de Folin-Ciocalteu



**Gráfica 7.** Curva de calibración de ácido gálico para ensayo de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)



#### 7.9. Toxicidad en el bioensayo de *Artemia salina*

La  $DL_{50}$  para el extracto acuoso fue de 5.315 mg/mL y ya que el extracto presentó una dosis mayor a 1 mg/mL, puede decirse que no presenta toxicidad en este modelo.

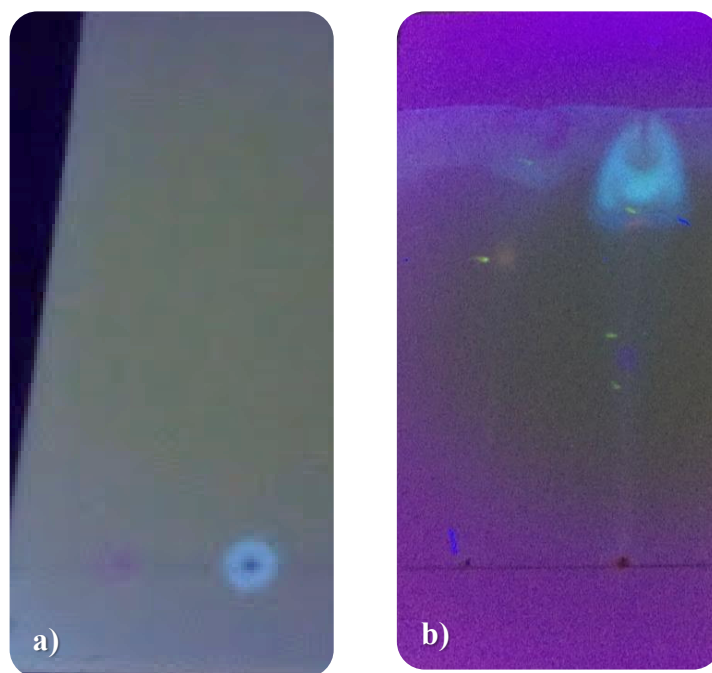
#### 7.10. Concentración de compuestos

Del extracto crudo que pasó por la resina de amberlita, se recuperaron 13.5 mg de extracto, al cual se le realizó la prueba de DPPH, obteniendo se obtuvo una  $CI_{50}$  de 3.503  $\mu$ g/mL para el Ácido Ascórbico, mientras que para el extracto fue de 0.126 mg/mL.

#### 7.11. Preliminares de cromatografía en capa fina

A partir del extracto acuoso de *M. heyderi* se realizaron cromatografías de capa fina (TLC), esto con la finalidad de obtener un sistema eficiente como método de separación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo con diferentes combinaciones de fase móvil (agua, metanol, 2-propanol, acetona, cloroformo). Sin embargo, a pesar de utilizar sistemas de solventes reportados anteriormente para betalaínas, la separación fue deficiente; donde el pigmento perdió su estabilidad, y con ello gran parte de la coloración, resultando una mancha irregular sobre el frente de la cromatografía; por lo que no fue posible establecer su  $R_f$ . A través del sistema (Agua:Acetona 1:1 vol/vol) y de la observación con luz UV (Fig. 15), se detectaron 2 manchas para el extracto ( $R_f$  0.44 y 0.78) y una para el estándar de betanina ( $R_f$  0.64).

Para el extracto acuoso, la mancha con  $R_f$  0.78, presenta una coloración rojiza, mientras que la de 0.44 es azul. El extracto muestra gran cantidad de componentes que no fueron separados en el frente de la cromatografía.



**Figura 15:** Cromatografía de capa fina con el sistema Agua:Acetona 1:1. a) Muestra en fase estacionaria, b) TLC revelada en UV

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Producción de tejido desdiferenciado

De acuerdo con la respuesta morfogénica de *M. heyderi*, Soria-Campos *et al.*(2013), menciona que las respuestas morfogénicas obtenidas para cada especie, dependen de la combinación y concentración hormonal; además de que estarán influenciadas también por el tipo de explante empleado, la madurez del tejido y las condiciones de cultivo; por su parte Clayton, Hubstenberger, y Phillips (1990) mencionan que algunas cactáceas del género *Mammillaria* tienen la capacidad de producir hormonas bajo condiciones de cultivo *in vitro* sin la necesidad de adicionar reguladores de crecimiento y al añadir pequeñas concentraciones de auxinas en combinación con citocininas se incrementa la producción de callo, esto podría explicar la respuesta morfogénica diferencial obtenida en este estudio.

A pesar de que los reguladores de crecimiento utilizados permanecen al grupo de las auxinas, la respuesta a cada uno de ellos combinado con los niveles endógenos de los mismos, causó respuestas diferenciales y de acuerdo con Davey (2010), la adición de auxinas puede generar la formación de raíces adventicias, sin embargo, en las concentraciones correctas de reguladores de crecimiento como ANA o 2,4-D se puede inducir la formación de callo. Por otra parte, la respuesta diferencial se puede deber a la resistencia metabólica que tienen las hormonas para ser inactivadas o sufrir cortes y se sabe que 2,4-D muestra mejor estabilidad que ANA e AIA (Imani *et al.*, 2009).

Al finalizar el experimento en semana 24, el mejor tratamiento resultó ser el medio M6 (AIA 5 mg/L), presentaba poco pigmento y de consistencia friable ideal para la producción de biomasa. Esto concuerda con un estudio realizado sobre *Opuntia robusta* Wendl., donde con AIA (2 mg/L) se obtuvo una mejor inducción de callo (friable), mientras que con ANA y 2,4-D el porcentaje fue significativamente mejor y con una morfología compacta para el callo (Astello-García *et al.*, 2013), por su parte en un tratamiento con AIA sobre *Mammillaria mathildae* se pudo observar que todos los tipos de explantes desarrollaron un callo verdoso y compacto y ligeras coloraciones rosas en respuesta a la combinación de reguladores de crecimiento(García-Rubio & Malda-Barrera, 2010).

## 8.2. Producción de pigmentos

De acuerdo con Santos-Díaz (2005), un aumento en la concentración de azúcares genera un incremento proporcional en la biomasa o en los metabolitos ya que incrementa la fuerza osmótica del medio en *M. candida*, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Agregar sacarosa al medio causa estrés osmótico, mismo que ha sido utilizado para la producción de pigmentos como antocianinas y betalaínas, sin embargo, no es la única forma de obtenerlo y una opción es modificar la concentración de algunos minerales como calcio, magnesio, cobre entre otros (Akula & Ravishankar, 2011). Este proceso también fue observado en *Turbinicarpus laui* donde una alta concentración de sacarosa (50g/L) aumentó significativamente los niveles de betalaínas después de 14 días de tratamiento (Reyes-Martínez *et al.*, 2019); sin embargo, se ha descrito que concentraciones altas de fuente de carbono (50g/L) puede existir una inhibición del metabolismo y para el caso de *Mammillaria candida*, concentraciones de 50 y 100 g/L no exhiben diferencias significativas (Santos-Díaz *et al.*, 2005). mismo que ocurre con la concentración más alta probada para *M. heyderi* (MIV), esto puede deberse a que bajo una alta concentración de sacarosa (50 g/L), el crecimiento del callo disminuyó, tal como sucede en cultivos *in vitro* de bugambilias (Anand *et al.*, 2020).

## 8.3. Cinética de crecimiento

En cuanto a la cinética de crecimiento del medio M6, se obtuvo el pico de crecimiento en la semana 8 con una media de 3.2564 g de peso fresco aunque se debe considerar que el subcultivo prolongado pueden ser perjudicial para el crecimiento de los callos; este cultivo no presentó signos de degeneración del cultivo al igual que con *Hylocereus costaricensis* donde también fue empleado para la producción de betalaínas (Winson *et al.*, 2020), por otra parte, el crecimiento de *M. heyderi* es lento comparado con otras especies, sin embargo, con *Coryphantha macromeris*, se obtuvo el pico de crecimiento aproximadamente en la semana 9 (Cabañas-García *et al.*, 2021). No obstante, para la cinética de crecimiento del medio M3, no es necesario esperar 4 semanas para realizar la extracción de pigmento, ya que desde la semana 1, no existe diferencia significativa

respecto al tiempo y tampoco entre la producción de betalaínas y betaxantinas. De acuerdo con Georgiev *et al.* (2008), se ha obtenido 0.0085 mg/100g de betacianinas en peso fresco en cultivo de callos de *Portulaca sp.* Jewel, lo cual es menor al crecimiento medio obtenido en cualquiera de las 4 semanas, el cual varía entre 1.3303 y 5.1687 mg/100g de tejido fresco.

#### 8.4. Actividad antioxidante por DPPH

Si bien existen diversas formas de obtener el extracto (ya sea por maceración o Soxhlet), se ha demostrado que los extractos acuosos son más eficientes que extracciones con etanol o metanol (Celli & Brooks, 2016). Cabe destacar que, a pesar de la extracción, parte del residuo vegetal permaneció con pigmento a pesar de realizar el proceso varias veces, esto puede deberse a que la pared celular posee muchos sitios con carga negativa que podrían retener a las betalaínas y afectar su liberación (Santos-Díaz *et al.*, 2005). El extracto obtuvo un rendimiento de 3.3%, lo cual es bajo, sin embargo, se debe considerar que los callos cultivados *in vitro* poseen una gran cantidad de agua intracelular,

En cuanto a la actividad antioxidante por el método de DPPH, se obtuvo una  $CI_{50}$  de 0.177 mg/mL para el extracto acuoso crudo, por su parte en cultivares de *Beta vulgaris* sub. *cycla* se ha encontrado que, los extractos metanólicos presentan una  $CI_{50}$  de 500  $\mu$ g/mL lo que se atribuye a el contenido de compuestos fenólicos que a la capacidad antioxidante de los pigmentos (Pyo *et al.*, 2004), de la misma forma que en cultivares de *Opuntia ficus-indica* L. se obtuvo entre 52.48 y 135.96  $\mu$ g/mL, y estos investigadores atribuyen esta propiedad a las betacianinas (Dehbi *et al.*, 2013), lo cual es mucho menor a lo reportado en este caso, sin embargo, estudios de cultivo de tejidos vegetales realizados sobre *Mammillaria herrerae* Werdermann establece una  $CI_{50}$  mayor a 3 mg/mL en callos y brotes (Song *et al.*, 2021), lo que nos hace suponer que se podría potenciar la cantidad de betalaínas producidas agregando nuevos factores de estrés o bien, seleccionando líneas celulares. Por su parte Shyamala y Jamuna (2010) determinaron  $CI_{50}$  en pulpa de betabel de 10.24 mg/mL (extracto metanólico), 33.64 mg/mL (extracto etanólico) y 23.48 mg/mL (extracto acuoso); siendo el extracto metanólico el que tiene mayor actividad en comparación con el acuoso, lo que se podría sugerir que la máxima actividad antioxidante

no se encuentra necesariamente en el extracto acuoso de este ensayo. Comparando las  $CI_{50}$  de betabel y las de tejido de *M. heyderi*, estas últimas resultan ser más activas.

#### 8.5. Actividad antioxidante por ABTS

En cuanto a la actividad antioxidante en *M. heyderi* por el radical ABTS, se obtuvo 1.8587 mol ET/100 g de peso fresco, es superior a la reportada por Hernández-Fuentes y colaboradores (2015), quienes obtuvieron 100-120  $\mu$ M ET/100 g muestra para tres variedades de *Opuntia joconostle*. El contenido de betalaínas se ha relacionado con la actividad antirradical que poseen los extractos, mismo que está ligado al número de grupos hidroxilo/ imino de dichas moléculas y, además esta actividad, depende de la posición de los grupos hidroxilo y la glucosilación de agliconas en las moléculas de betalaína (Cai *et al.*, 2003).

#### 8.6. Cuantificación de fenoles totales

En cuanto al contenido de fenoles totales Albano y cols. (2015) reportan el contenido de fenoles totales para frutos de *Opuntia ficus-indica*, 89.2 y 69.8 mg EAG/100 g de tejido vegetal en la variedad morada y anaranjada, respectivamente. Por su parte en *Stenocereus griseus* H. se obtuvo un valor de 42.4 mg de EAG /100 g de muestra fresca (García-Cruz *et al.*, 2012) mientras en este ensayo se obtuvo 49.961g EAG/ 100 g de peso fresco.

#### 8.7. Ensayo de letalidad sobre *A. salina*

A partir del extracto acuoso elaborado del tejido *in vitro*, se realizaron las pruebas de actividad biológica correspondientes, obteniendo una  $DL_{50}$  para el ensayo de letalidad sobre *A. salina* de 5.315 mg/mL, de acuerdo con Robles-García (2016) un extracto que presenta una dosis mayor a 1 mg/mL, es relativamente inocuo en este modelo, además, Rajabi (2015), demostró que los resultados obtenidos por el ensayo de letalidad de *A. salina* son comparables con los resultados del ensayo de citotoxicidad por MTT, conservando una correlación de respuesta entre ambas pruebas y que pueda emplearse como colorante alimenticio o cosmetológico (Polturak & Aharoni, 2018), o bien con fines farmacéuticos (Hadipour *et al.*, 2020) por lo cual este método provee una forma sencilla, rápida y a bajo costo para evaluar la toxicidad de extractos vegetales.

#### 8.8. Concentración del compuesto activo

En cuanto a la actividad antioxidante del extracto que pasó por la Amberlita fue de 0.126 mg/mL, lo que sugiere que ocurre la eliminación de compuestos orgánicos (proteínas, azúcares), sin decrementar su actividad antioxidante por el método de DPPH. Este proceso es ideal como método de preconcentración y aunque existen otras metodologías que incluyen extracción líquido-líquido, intercambio iónico, extracción en fase sólida y matrices quelantes, la extracción por solvente sufre de problemas como el manejo de un gran volumen de muestra, por lo cual es necesario encontrar un método eficaz de preconcentración (Tewari, 2002). La resina empleada en este ensayo está compuesta por éster acrílico y exhibe buenas propiedades físicas tales como distribución uniforme del tamaño de los poros, área superficial alta y estructura no iónica homogénea y se ha demostrado que son buenos adsorbentes para grandes cantidades de compuestos sin carga tales como algunos medicamentos (antibióticos, antiepilépticos y analgésicos) (Domínguez *et al.*, 2011).

#### 8.9. Preliminares de cromatografía de capa fina

Dentro del sistema se pudo determinar dos Rf (Agua:Acetona 1:1 vol/vol), para el extracto acuoso, la mancha con Rf 0.78, presenta una coloración rojiza, mientras que la de 0.44 es azul. El extracto muestra gran cantidad de componentes que no fueron separados en el frente de la cromatografía, mismos que pueden deberse a compuestos altamente polares y que presentan muy baja afinidad por la matriz usada por lo que se puede utilizar una matriz de celulosa (Sherma & Fried, 2003). En un estudio realizado por Sigwela y colaboradores (2021), se trabajó con cromatografías de capa fina de sílica gel F254, mientras que en la fase móvil se utilizó metanol y 5% de ácido acético acuoso en 50% de acetona y como muestra utilizaron cultivares de betabel, donde observaron Rf entre 0.7 y 0.8 atribuyendo estas manchas (rosas y amarillas) a las betalaínas.

## 9. CONCLUSIONES

- El mantenimiento del cultivo y el inicio de la desdiferenciación celular se lograron con el medio MS sin reguladores favoreciendo la producción de masa celular.
- El medio 6 presentó mejor proliferación celular sin estresar el cultivo y sin presentar alguna respuesta morfogénica.
- En el medio MIII se obtuvo la mejor producción de betalaínas.
- El tiempo requerido para la proliferación en medio M6 es de 7 semanas, mientras que para la producción de pigmento en MIII, se puede realizar la extracción en la semana 1. Ambos tiempos de producción son necesarios la elaboración del extracto vegetal en un sistema definido.
- De acuerdo con el sistema que produjo la mayor cantidad de pigmento M6-MIII, es posible obtener un alto contenido de fenoles totales y otros metabolitos secundarios con actividad antioxidante por el método de DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu; mismos que no resultaron ser tóxicos mediante el ensayo de letalidad de *A. salina*.
- La concentración del extracto a través de Amberlita, nos permite mejorar la actividad antioxidante por el método de DPPH.
- Es necesario determinar un sistema eficiente para la separación de metabolitos secundarios cambiando la fase estacionaria de la cromatografía.



## **10. PERSPECTIVAS**

A partir de los estudios realizados en el presente proyecto, la perspectiva a trabajos futuros se orienta de la siguiente forma:

El uso de sistemas de producción bien definidos en el área de cultivo de tejidos vegetales podría verse mejorado a través del uso de biorreactores para el escalamiento en la producción de pigmentos de origen natural, sin la necesidad de comprometer cultivos destinados a la alimentación, como es el caso del betabel.

Una de las limitaciones en este estudio fue el proceso de la extracción, por lo que podría agregarse alguna enzima o probar otro método de extracción ya que el tejido restante del extracto vegetal continuaba con pigmentación rojiza, lo que implica que el agua, metanol o etanol, no extrae en su totalidad al pigmento.

El fraccionamiento del extracto nos permitiría caracterizar a través técnicas espectroscópicas las betalaínas y otras moléculas presentes en el extracto, que puedan tener actividad biológica pues la literatura muestra que existen un gran rango de aplicaciones médicas reportadas y que no se probaron en este estudio.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Aboye, T. L., Strömstedt, A. A., Gunasekera, S., Bruhn, J. G., El-Seedi, H., Rosengren, K. J., & Göransson, U. (2015). A Cactus-Derived Toxin-Like Cystine Knot Peptide with Selective Antimicrobial Activity. *ChemBioChem*, *16*(7), 1068–1077. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402704>
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., de Bellis, L., & Blando, F. (2015). Betalains, Phenols and Antioxidant Capacity in Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits from Apulia (South Italy) Genotypes. *Antioxidants*, *4*(2), 269–280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>
- Ammar, I., Ennouri, M., Khemakhem, B., Yangui, T., & Attia, H. (2012). Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Industrial Crops and Products*, *37*(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.027>
- Anand, P., Singh, K. P., Singh, S. K., & Prasad, K. v. (2020). Sucrose and light induced betalain biosynthesis in callus cultures of bougainvillea (*Bougainvillea spp.*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *90*(9).
- Anderson, E. F. (2001). *The cactus family*. Timber Press.
- Astello-García, M. G., Robles-Martínez, M., Barba-de la Rosa, A. P., & Santos-Díaz, M. del S. (2013). African Journal of Biotechnology Establishment of callus from *Opuntia robusta* Wendl., a wild and medicinal cactus, for phenolic compounds production. *12*(21), 3204–3207. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12000>

- Avella Gutiérrez, M. D., Ortiz García, C. A., & Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. In *Simposio de Metrología 2008*. [https://www.cenam.mx/simposio2008/sm\\_2008/memorias/m2/sm2008-m220-1108.pdf](https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/m2/sm2008-m220-1108.pdf)
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Bernards, M. A. (2010). Plant natural products: a primer. *Canadian Journal of Zoology*, 88(7), 601–614. <https://doi.org/10.1139/Z10-035>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant Tissue Culture: An Introductory Text. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Bravo-Avilez, D., Zavala-Hurtado, J. A., & Rendón-Aguilar, B. (2019). Damage in Cactaceae, their geographic distribution and new evidences. *Botanical Sciences*, 97(4), 551–567. <https://doi.org/10.17129/botsci.2299>
- Bravo-Hollis, H., & Sánchez-Mejorada, H. (1991). *Las Cactáceas de México: Vol. III*.
- Cabañas-García, E., Areche, C., Gómez-Aguirre, Y. A., Borquez, J., Muñoz, R., Cruz-Sosa, F., & Balch, E. P.-M. (2021). Biomass production and secondary metabolite identification in callus cultures of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae), a traditional medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 137, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.002>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>

- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>
- Celli, G. B., & Brooks, M. S. (2016). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. *FRIN*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.034>
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Charles, D. J. (2013). Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. In *Springer 4* (Vol. 9781461443100). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4310-0>
- Chauhan, S. P., Sheth, N. R., Rathod, I. S., Suhagia, B. N., & Maradia, R. B. (2013). Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9248-2>
- Choreño-Tapia, J., González-Rosas, H., Terrazas-Salgado, T., & Hernández-Livera, A. (2002). Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8(2), 183–189.
- Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., & Phillips, G. C. (1990). Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe *Cactinae*. *J. AMER. SOC. HORT. SCI*, 115(2), 337–343.

- Corrales-García, J. (2009). Industrialization of cactus pads and fruit in Mexico: Challenges and perspectives. *Acta Horticulturae*, 811, 103–112. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2009.811.10>
- Davey, M. R., & Anthony, P. (2010). *Plant Cell Culture Essential Methods*. Wiley-Blackwell.
- Dávila-Figueroa, C. A., Lourdes de la Rosa-Carrillo, Ma. de, & Pérez-Molphe-Balch, E. (2005). *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(4), 540–545. <https://doi.org/10.1079/IVP2005668>
- de Aguiar Lage, D., da Silva Tirado, M., Vanicore, S. R., de Carvalho Sabino, K. C., & Albarello, N. (2015). Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(2), 341–350. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0771-x>
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Underutilized plants of the Cactaceae family: Nutritional aspects and technological applications. *Food Chemistry*, 362, 130196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130196>
- de Castro Campos Pinto, N., & Scio, E. (2014). The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)—A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(3), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0423-z>
- Dehbi, F., Hasib, A., Bouaziz, M., Ouatmane, A., & Elbatal, H. (2013). Effect of phenolic compounds and betalain pigments on the antioxidant capacity of Moroccan prickly pear juices. *Journal. B- Agronomic & Biological Sciences*, 9, 2–7.
- Domínguez, J. R., González, T., Palo, P., & Cuerda-Correa, E. M. (2011). Removal of common pharmaceuticals present in surface waters by Amberlite XAD-7 acrylic-

- ester-resin: Influence of pH and presence of other drugs. *Desalination*, 269(1–3), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.10.065>
- Elansary, H. O., Szopa, A., Klimek-Szczykutowicz, M., Jaferník, K., Ekiert, H., Mahmoud, E. A., Abdelmoneim Barakat, A., & O. El-Ansary, D. (2019). *Mammillaria* Species—Polyphenols Studies and Anti-Cancer, Anti-Oxidant, and Anti-Bacterial Activities. *Molecules*, 25(1), 131. <https://doi.org/10.3390/molecules25010131>
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., & Rimbach, G. (2014). Betanin-A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 36–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>
- Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18(6), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.003>
- García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., & Valle-Guadarrama, S. (2012). BETALAÍNAS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PITAYA DE MAYO (*Stenocereus griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(5), 1–5. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802012000500003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802012000500003&script=sci_arttext)
- García-Rubio, O., & Malda-Barrera, G. (2010). Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. In *HORTSCIENCE* (Vol. 45, Issue 6).
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 645–649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. de. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd edition. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 1, 1–501. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>

- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., & Pavlov, A. (2008). Betalain production in *plant in vitro* systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581–593. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0170-6>
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Hadipour, E., Taleghani, A., Tayarani-Najaran, N., & Tayarani-Najaran, Z. (2020). Biological effects of red beetroot and betalains: A review. *Phytotherapy Research*, 34(8), 1847–1867. <https://doi.org/10.1002/ptr.6653>
- Harlev, E., Nevo, E., Solowey, E., & Bishayee, A. (2013). Cancer Preventive and Curative Attributes of Plants of the Cactaceae Family: A Review. *Planta Medica*, 79(09), 713–722. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328632>
- Hernández-Fuentes, A. D., Franco-Bañuelos, A., Gallegos-Vazquez, C., Campos-Montiel, R. G., & Pinedo-Espinoza, J. M. (2015). Actividad antioxidante de genotipos de xoconostle (*Opuntia joconostle*) del estado de Zacatecas, México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 81–85.
- Imani, J., Kumar, A., & Neumann, K.-H. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93883-5>
- Jain, G., & Gould, K. S. (2015). Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants? *Environmental and Experimental Botany*, 119, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.002>
- Jiménez-Aspee, F., Alberto, M. R., Quispe, C., del Pilar Caramantin Soriano, M., Theoduloz, C., Zampini, I. C., Isla, M. I., & Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Anti-Inflammatory Activity of Copao (*Eulychnia Acida* Phil., Cactaceae) Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0468-7>

- Kaur, M. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(07), 15–18. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2703>
- Khan, M. I. (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 316–330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega.
- Lema-Rumińska, J., & Kulus, D. (2014). Micropropagation of cacti-A review. In *Haseltonia* (Issue 19, pp. 46–63). Cactus and Succulent Society of America, Inc. <https://doi.org/10.2985/026.019.0107>
- Lesne, M. (2001). [Pharmacokinetics parameters of the gastrointestinal absorption of drugs (author's transl)]. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 30(3), 239–272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1485>
- Lohmann, J. U. (2008). Stem Cells. In T. C. G. Bosch (Ed.), *Stem Cells*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8274-0>
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). *Plant Cell Culture Protocols* (V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo, Eds.; Vol. 1815). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>
- Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (Eds.). (2005). *Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Segunda Ed). Humana Press.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(1), 31–34. <https://doi.org/10.1055/S-2007-971236/BIB>



- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naseer, F., Ahmad, S., Ahmad, T., Farooqi, Z. R., & Atta-ur-Rehman, T. A. (2015). Antioxidant Potential of Leaves of *Opuntia monacantha* Ethanol Extract and Various Fractions: An *in vitro* Study. In *Global Journal of ...* (Vol. 9, Issue 2, pp. 144–149). <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2015.9.2.93168>
- Papafotiou, M., & Balotis, G. (2001). *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and ...*, 65, 163–167. <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1010601328667>
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
- Perez-Francés, J., Valdés, F., & Martin, R. (1995). Callus induction and culture from explants of *Erysimum scoparium* in a growth regulator-free medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 223–228.
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(3), 242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Pilbeam, John. (1999). *Mammillaria: The cactus file Handbook*. Nueffield Press.
- Polturak, G., & Aharoni, A. (2018). “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant*, 11(1), 7–22. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.008>
- Pyo, Y.-H., Lee, T.-C., Logendra, L., & Rosen, R. T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85(1), 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00294-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00294-2)

- Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>
- Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J. L., Nuñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2007). *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(6), 660–665. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9076-z>
- Reyes-Martínez, A., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J., & Santos-Díaz, M. del S. (2019). Enhanced production and identification of antioxidants in *in vitro* cultures of the cacti *Mammillaria candida* and *Turbincarpus laui*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2583–2595. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09656-8>
- Robles-García, M. A., Aguilar, A., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Feliz, F., Morales-del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., Madrigal-Pulido, J. A., & Del-toro-Sánchez, C. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). *Biotecnia*, XVIII(3), 3–8.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Rojas-Aréchiga, M., & Vázquez-Yanes, C. (2000). Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, 44(1), 85–104. <https://doi.org/10.1006/jare.1999.0582>
- Santos-Díaz, M., Velázquez-García, Y., & González-Chávez, M. (2005). Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia*, 39(6), 619–626. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239605>
- Seemann, P., Rodríguez, C., & Jara, G. (2007). Cultivo *in vitro* de cactáceas con fines de conservación ex situ. *Agro Sur*, 35(2), 24–26.

- Sherma, J., & Fried, B. (2003). Handbook of thin-layer chromatography. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 89, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)90561-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)90561-9)
- Shetty, A. A., Rana, M. K., & Preetham, S. P. (2012). Cactus: a medicinal food. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 530–536. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0462-5>
- Shyamala, B., & Jamuna, P. (2010). Nutritional Content and Antioxidant Properties of Pulp Waste from *Daucus carota* and *Beta vulgaris*. *Malaysian Journal of Nutrition*, 16(3), 397–408.
- Sigwela, V., de Wit, M., du Toit, A., Osthoff, G., & Hugo, A. (2021). Bioactive Betalain Extracts from Cactus Pear Fruit Pulp, Beetroot Tubers, and Amaranth Leaves. *Molecules*, 26(16), 5012. <https://doi.org/10.3390/molecules26165012>
- Solis, P., Wright, C., Anderson, M., Gupta, M., & Phillipson, J. (1993). A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica*, 59(03), 250–252. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959661>
- Song, K., Kang, H., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jekó, J., Kim, D. H., Lee, O. N., & Sivanesan, I. (2021). Micropropagation, phytochemistry and biological activity of the critically endangered *Mammillaria herrerae* Werdermann. *South African Journal of Botany*, 143, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.11.025>
- Soria-Campos, D., López-Escamilla, A. L., & Olgúín-Santos, L. P. (2013). Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. *Estudios Científicos En El Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas, II*, 121–128.
- Tewari, P. (2002). Preconcentration of lead with Amberlite XAD-2 and Amberlite XAD-7 based chelating resins for its determination by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 56(4), 735–744. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00606-3](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00606-3)

- Thongwat, D., Ganranoo, L., & Chokchaisiri, R. (2014). Larvicidal activity of *Pereskia bleo* (Kunth) dc. (cactaceae) fruit endocarp crude and fractionated extracts against *aedes aegypti* (L.) (diptera: *Culicidae*). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(6), 1292–1300.
- Tiwari, B. K., Brunton, N. P., & Brennan, C. S. (2013). Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*.  
<https://doi.org/10.1002/9781118464717>
- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29(2), 223–229.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>
- Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27(9), 1423–1440.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-008-0571-4>
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., & Robert, P. (2014). Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*, 157, 246–251.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.037>
- Winson, K. W. S., Chew, B. L., Sathasivam, K., & Subramaniam, S. (2020). The establishment of callus and cell suspension cultures of *Hylocereus costaricensis* for the production of betalain pigments with antioxidant potential. *Industrial Crops and Products*, 155, 112750. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112750>
- Wybraniec, S., & Nowak-Wydra, B. (2007). Mammillarinin: A New Malonylated Betacyanin from Fruits of *Mammillaria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8138–8143. <https://doi.org/10.1021/jf071095s>
- Wyka, T. P., Hamerska, M., & Wróblewska, M. (2006). Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae).

*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87(1), 27–32. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9128-9>

Zepeda, R., Estrada, M., Ocaña, A., & Brunner, I. (2009). Secondary metabolites induction in *Mammillaria huiquilopochtli* (Cactaceae) and evaluation of the fungicidal activity. *African Journal of Biotechnology*, 8(16), 3874–3878. <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/62074>

Zhang, L., & Demain, A. L. (2005). *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine* (L. Zhang & A. L. Demain, Eds.). Humana Press.

## CONSULTA ELECTRONICA

1. SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. DIARIO OFICIAL Segunda Sección. (Internet) Disponible en el sitio de red [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010)  
Revisado en la página de internet el 29 de mayo de 2022.