



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**“Estudio comparativo de la actividad antioxidante, antiinflamatoria,
antimicrobiana de extractos orgánicos de planta silvestre y cultivos *in vitro*
de *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven”**

T E S I S

para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

STEPHANY ABIGAIL TADEO CUENCA

Matrícula: 2223801823 Correo: duralalastep@gmail.com

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesora interna: Dra. Mariana Sánchez Ramos

Asesora externa: M. en C. Silvia Marquina Bahena

J U R A D O

Presidenta: Dra. Angélica Roman Guerrero

Secretaria: Dra. Mariana Sánchez Ramos

Vocal: Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

Vocal: Dra. María Crystal Columba Palomares

Iztapalapa, Ciudad de México a 4 de noviembre de 2024



“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del CONAHCYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo”

La presente investigación fue financiada por el CONAHCYT con el
(CVU) 1252079



Ciudad de México, a 4 de noviembre del 2024

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Estudio comparativo de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y
antibacteriana de extractos orgánicos de planta silvestre, cultivos in vitro de

Ludwigia octovalvis (Jacq.) P.H Raven

que presentó

Stephany Abigail Tadeo Cuenca

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa



Asesor: Dra. Mariana Sánchez Ramos



Asesor: M. en C. Silvia Marquina Bahena

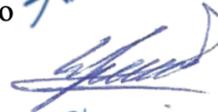


Jurado:

Presidente: Dra. Angélica Roman Guerrero



Secretario: Dra, Mariana Sánchez Ramos



Vocal: Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica



Vocal: Dra. Crystal Columba Palomares



AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quiero agradecer a mi asesora de tesis, Dra. Mariana Sánchez Ramos, por su invaluable guía, apoyo y paciencia, así como a sus consejos y sugerencias que fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Mi agradecimiento también va dirigido a todos aquellos docentes que contribuyeron con sus instalaciones, su conocimiento y experiencia, que enriquecieron mi formación académica junto con este trabajo, Dra. María Crystal Columba, Mtra. Elizabeth Negrete, Dr. Francisco Cruz, Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez, Dr. Juan José Acevedo, Dra. Mariana Pérez, M. en C. Silvia Marquina, Dra. Valery Domínguez y Dra. Virginia Mandujano.

A mi familia, en especial a mis padres Alejandra y Roberto, por su comprensión y apoyo constante durante todo el proceso. Su aliento y confianza en mí me han dado la fuerza necesaria para superar los desafíos y alcanzás mis metas.

A mis amigos y colegas Adrián Álvarez, Andrea Ruiz, Carla Arias, Carlos Daniel Ocampo, Hana Bello, Juan Pablo Díaz, Luis Fuentes, Ricardo Alvarado, por todo su apoyo y por hacer que el proceso de investigación fuera menos solitario y mucho más ameno.

Finalmente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por el financiamiento recibido, sin el cual esta investigación no habría sido posible.

RESUMEN

Ludwigia octovalvis es una hierba de la familia Onagraceae que se utiliza en México, especialmente en los estados de Morelos, Veracruz y Oaxaca, para tratar diversas afecciones cutáneas, infecciones, disuria y diabetes, entre otras. Estudios previos han demostrado su potencial como antidiabético, antimicrobiano y antioxidante. Sin embargo, aunque muchas plantas medicinales mexicanas se utilizan ampliamente, solo un pequeño porcentaje ha sido estudiado farmacológicamente, y la mayoría se extrae de la naturaleza sin un plan de sostenibilidad. El cultivo *in vitro* de *L. octovalvis* se presenta como una alternativa para propagar la planta de manera controlada y sin riesgos de extinción, permitiendo obtener compuestos farmacológicos en condiciones estables. El objetivo de este estudio es evaluar y comparar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana de extractos de la planta silvestre, plántulas cultivadas *in vitro* y cultivos de callo, con el fin de determinar las condiciones que maximizan la producción de compuestos bioactivos.

Los cultivos de callo se iniciaron en medio basal MS, adicionado con concentraciones variables de ácido naftalenacético (ANA) o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), combinados con 6-bencilaminopurina (BAP) o kinetina (KIN). Se utilizaron plántulas cultivadas *in vitro* como fuente de dos tipos de explantes: hoja y nodo. A partir de estos tratamientos, se obtuvieron dos respuestas morfogénicas: organogénesis (directa e indirecta) y callogénesis. Con la combinación de 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA y el explante de nodo, se obtuvieron plántulas por organogénesis indirecta, las cuales presentaron diferencias morfológicas con respecto a las que crecieron sin fitohormonas. Se estableció una línea de cultivo de callos con el explante de hoja utilizando 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D, logrando una producción máxima de biomasa y compuestos bioactivos en la semana seis.

A partir de estos cultivos *in vitro*, se obtuvieron extractos mediante maceración a temperatura ambiente con *n*-hexano, acetato de etilo y metanol. La eliminación de radicales libres de los diferentes extractos se midió utilizando el ensayo DPPH. Los extractos se sometieron a un cribado antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, mediante difusión en disco y microdilución en caldo. La actividad antiinflamatoria se evaluó utilizando un modelo biológico murino de inflamación auricular inducida por TPA en ratones CD1, tanto machos como hembras. Los componentes fitoquímicos de los extractos se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Los extractos que mostraron mayor captación del radical libre DPPH fueron el extracto de acetato de etilo de plántula (91.4%) y el extracto metanólico de callo (85.3%). A la concentración de 50 mg/mL, los extractos de hexano de callo y metanol de plántula formaron halos de inhibición contra *S. aureus* de 16.07 ± 1.30 y 8.39 ± 1.47 mm, respectivamente. Casi todos los extractos evaluados exhibieron actividad frente al SARM; en particular, el extracto de hexano de plántula mostró una CMI de 31.25 μ g/mL, el extracto de acetato de etilo de la planta silvestre de 62.5 μ g/mL, y el extracto metanólico de callo de 250 μ g/mL. No se detectó actividad contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* en los extractos evaluados. El extracto de acetato de etilo a 0.5 mg/oreja mostró una actividad antiinflamatoria superior a la indometacina a la misma dosis, con una inhibición del edema de 27.96% (machos) y 22.34% (hembras). Se encontraron 25 compuestos en los extractos de plántula y callo, entre ellos: α -tocospiro B, α -tocoferol, ácido *n*-hexadecanoico, ácido oleico, ácido palmitoleico, azafrina, betulina, betulinaldehído, campesterol, estigmasterol, fitol, γ -sitosterol, γ -tocoferol, lupeol y β -sitosterol.

Los cultivos *in vitro* produjeron compuestos diferentes que a los reportados para la planta silvestre; no obstante, varios de estos son relevantes por sus propiedades farmacológicas, lo que sugiere que el cultivo *in vitro* puede ser una alternativa eficaz para la producción de metabolitos bioactivos. Estos hallazgos destacan el potencial de la biotecnología en el cultivo de *L. octovalvis* para aplicaciones farmacéuticas y la necesidad de continuar con investigaciones para optimizar las condiciones de cultivo y maximizar la producción de compuestos beneficiosos.

ABSTRACT

Ludwigia octovalvis is an herb of the Onagraceae family used in Mexico, particularly in the states of Morelos, Veracruz, and Oaxaca, to treat multiple skin conditions, infections, dysuria, and diabetes, among other things. Previous studies have shown its potential as an anti-diabetic, antimicrobial, and antioxidant. However, although many Mexican medicinal plants are widely used, only a tiny percentage have been studied pharmacologically and most are collected from the wild without a sustainability plan. The *in vitro* cultivation of *L. octovalvis* is presented as an alternative to propagating the plant in a controlled manner, without risk of extinction, and to obtain pharmacological compounds under stable conditions. This study aims to evaluate and compare the antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activity of extracts from the wild plant, *in vitro* cultured seedlings, and callus cultures to determine the conditions that maximize the production of bioactive compounds.

Callus cultures were initiated on MS basal medium supplemented with different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) combined with 6-benzylaminopurine (BAP) or kinetin (KIN). *In vitro* germinated seedlings were used to source two types of explants: leaf and stem. Two morphogenic responses were obtained from these treatments: organogenesis (direct and indirect) and callogenesis. With the combination of 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA and the stem explant, seedlings were obtained by indirect organogenesis, which showed morphological differences concerning those grown without phytohormones. A callus culture line was established with the leaf explant using 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D, achieving maximum biomass and bioactive compounds production after six weeks.

Extracts were obtained from these *in vitro* cultures by maceration with n-hexane, ethyl acetate, and methanol at room temperature. Free radical scavenging of the different extracts was measured using the DPPH assay. The extracts were subjected to antimicrobial screening against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* by disc diffusion and broth microdilution. Anti-inflammatory activity was evaluated using a murine biological model of TPA-induced atrial inflammation in male and female CD1 mice. The phytochemical components of the extracts were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

The extracts with the highest uptake of the free radical DPPH were the ethyl acetate extract of the seedling (91.4%) and the methanolic extract of the callus (85.3%). At a 50 mg/mL concentration, the hexane and methanol extracts of callus and seedling formed inhibition halos against *S. aureus* of 16.07 ± 1.30 and 8.39 ± 1.47 mm, respectively. Almost all extracts tested showed activity against MRSA; in particular, the seedling hexane extract showed a MIC of 31.25 $\mu\text{g/mL}$, the wild plant ethyl acetate extract 62.5 $\mu\text{g/mL}$, and the callus methanol extract 250 $\mu\text{g/mL}$. No activity against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans* was detected in the tested extracts. The ethyl acetate extract at 0.5 mg/eye showed superior anti-inflammatory activity than indomethacin at the same dose, with edema inhibition of 27.96% (males) and 22.34% (females). Twenty-five compounds were found in seedling and callus extracts, including α -tocospiro B, α -tocopherol, n-hexadecanoic acid, oleic acid, palmitoleic acid, saffron, betulin, betulinaldehyde, campesterol, stigmasterol, phytol, γ -sitosterol, γ -tocopherol, lupeol and β -sitosterol.

The *in vitro* cultures produced different compounds from those reported for the wild plant; however, several of these are relevant for their pharmacological properties, suggesting that *in vitro* culture may be an effective alternative to produce bioactive metabolites. These results highlight the potential of biotechnology in cultivating *L. octovalvis* for pharmaceutical applications and the need for further research to optimize cultivation conditions and maximize the production of beneficial compounds.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	21
2. Marco teórico	22
2.1 Plantas medicinales de México	22
2.2 Metabolitos secundarios	22
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	25
2.4 Actividad antioxidante y estrés oxidativo	29
2.5 Actividad antimicrobiana	32
2.6 Actividad antiinflamatoria	34
3. Antecedentes	34
4. Justificación	42
5. Objetivos	42
5.1 Objetivo general	42
5.2 Objetivos específicos	42
6. Hipótesis	43
7. Metodología	43
7.1 Desinfección de semillas	43
7.2 Micropropagación <i>in vitro</i> de plántulas	45
7.3 Inducción a callo	45

7.4 Obtención de extractos de plántulas	46
7.5 Cinética de crecimiento para callos	47
7.6 Determinación de actividad antioxidante por DPPH.....	49
7.7 Evaluación del efecto antiInflamatorio <i>in vivo</i>.....	50
7.8 Actividad antimicrobiana	51
7.8.1 Difusión en disco	51
7.8.2 Microdilución en caldo	52
7.9 Comparacion de perfiles fitoquímicos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	53
8. Resultados y discusión	53
8.1 Desinfección de semillas	54
8.2 Propagación <i>in vitro</i> de plántulas	56
8.3 Inducción a callo	57
8.3.1 Efecto de los RCV sobre explantes de hoja y nodo	57
8.3.2 Efecto de los RCV sobre la callogénesis	63
8.3.3 Efecto de los RCV sobre la organogénesis	64
8.3.4 Organogénesis directa	66
8.3.5 Organogénesis indirecta	68
8.4 Cinética de crecimiento de callos	70
8.4.1 Análisis cromatográfico de cinética de callos	72
8.5 Extractos orgánicos de plántulas.....	74

8.6	Perfiles cromatográficos por CCF	75
8.7	Análisis fitoquímico de extractos por CG-EM.....	78
8.7.1	Perfiles cromatográficos de plántulas	79
8.7.2	Perfiles cromatográficos de callos	85
8.7.3	Comparación del contenido fitoquímico	87
8.8	Evaluaciones biológicas de extractos	87
8.8.1	Actividad antioxidante.....	88
8.8.2	Actividad antimicrobiana.....	89
8.8.2.1	Ensayo de difusión en disco.....	89
8.8.2.2	Ensayo microdilución en caldo	92
8.8.3	Actividad antiinflamatoria	96
9.	<i>Conclusiones</i>	98
10.	<i>Perspectivas</i>.....	98
11.	<i>Anexos</i>.....	99
11.1	Eventos de divulgación.....	99
11.2	Cromatogramas de los extractos evaluados por CG-EM	100
12.	<i>Bibliografía</i>.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>L. octovalvis</i>	35
Figura 2. <i>Ludwigia octovalvis</i> (Jacq.) Raven subsp. <i>octovalvis</i> . a. Rama con flores, frutas y raíz. b. Hoja. c. Bractéola. d. Flor. e. Sépalo. f. Pétalo. g. Estambres. h. Gineceo con sépalos. i. T.S. de ovario. J. Cápsula. (Barua, 2010).....	36
Figura 3. Compuestos aislados por Yan & Yang, 2005.....	38
Figura 4. Compuestos aislados por Chang et al., 2004 y 2007.....	39
Figura 5. Compuestos identificados por Averett et al., 1990.	40
Figura 6. Reacción llevada a cabo entre DPPH y un antioxidante.....	49
Figura 7. Resumen de los resultados.	54
Figura 8. Desinfección de semillas de <i>L. octovalvis</i> después de 24 horas de cultivo. a) Lote con ausencia de contaminación (Método A). b) Lote con presencia de contaminación (Método B).....	55
Figura 9. Evolución por días de la germinación de semillas de <i>L. octovalvis</i>	56
Figura 10. Plántula cultivada en frasco de 500 mL.	57
Figura 11. Desarrollo de callo en explante de hoja con 1 mg/L de BAP con 0.1 mg/L de 2,4-D.	64
Figura 12. Aspecto de plántulas cultivadas en diferentes medios de cultivo con RCV. MS: Sin RCV, X7: 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA. X17: 0.1 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA. X19: 0.1 mg/L KIN + 1 mg/L ANA. X21: 0.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA. X22: 0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA. X24: 1 mg/L KIN. X26: 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA.....	65
Figura 13. Plántulas obtenidas por organogénesis directa.....	67

Figura 14. Evolución de la organogénesis indirecta en explantes de hoja y nodo tratados con RCV. a) 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (X26). b) 0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (X22).	69
Figura 15. Plántulas obtenidas por organogénesis indirecta.	70
Figura 16. Perfil de crecimiento del callo beige de <i>L. octovalvis</i> en medio MS suplementado con 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D. a) Curva de crecimiento. b) Índice de crecimiento c). Evolución semanal. Los valores representan la media ± desviación estándar con n=3. ...	71
Figura 17. Curva de crecimiento exponencial con regresión lineal.	72
Figura 18. Perfiles cromatográficos de biomasa de la cinética de crecimiento de callos de <i>L. octovalvis</i>	74
Figura 19. Cromatografía en capa fina de las variaciones de plántulas obtenidas con el solvente Hexano, a diferentes sistemas de dilución. Hex: hexano. AcEt: acetato de etilo.	76
Figura 20. Cromatografía en capa fina de las variaciones de plántulas obtenidas con el solvente acetato de etilo, a diferentes sistemas de dilución. Hex: hexano. AcEt: acetato de etilo. DCM: diclorometano. Met: metanol.	77
Figura 21. Cromatografía en capa fina de las variaciones de plántulas obtenidas con el solvente metanol, a diferentes sistemas de dilución. Hex: hexano. AcEt: acetato de etilo. DCM: diclorometano. Met: metanol.	78
Figura 22. Cromatograma del extracto hexánico de X24 (1 mg/L KIN).	81
Figura 23. Cromatograma del extracto con acetato de etilo de X7 (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA).	82
Figura 24. Cromatogramas de extractos metanólicos. a) MS. b) X22.	83
Figura 25. Cromatogramas de extractos de callo con: a) hexano, b) acetato de etilo y c) metanol.	87

Figura 26. Placa de microdilución correspondiente a *S. aureus*. +: Control positivo con gentamicina. -: control de crecimiento. C.E: control de esterilidad..... 93

Figura 27. Placa de microdilución correspondiente a *S. aureus* resistente a meticilina +: Control positivo con gentamicina. -: control de crecimiento. C.E: control de esterilidad. 94

Figura 28. Placa de microdilución correspondiente a *P. aeruginosa*. +: Control positivo con gentamicina. -: control de crecimiento. C.E: control de esterilidad..... 94

Figura 29. Actividad antiinflamatoria de los extractos de plántulas sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones hembra y macho CDI..... 97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Categorías de ensayos de capacidad antioxidante (Pisoschi & Negulescu, 2012).</i>	30
Tabla 2. <i>Mecanismos de acción de agentes antimicrobianos.</i>	33
Tabla 3. <i>Condiciones de desinfección de semillas <i>L. octovalvis</i>.</i>	43
Tabla 4. <i>Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).</i>	44
Tabla 5. <i>Reguladores de crecimiento vegetal y combinaciones evaluadas en la inducción de callo. 2,4-D: ácido 2, 4-diclorofenoxiacético; ANA: ácido naftalenacético; BAP: 6-bencilaminopurina; KIN: kinetina.</i>	46
Tabla 6. <i>Efectos de los reguladores de crecimiento vegetal en la respuesta morfológica de hojas y segmentos nodales de <i>L. octovalvis</i>.</i>	60
Tabla 7. <i>Tratamientos que presentaron callogénesis.</i>	63
Tabla 8. <i>Tratamientos que presentaron organogénesis.</i>	66
Tabla 9. <i>Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de las variaciones de plántulas.</i>	74
Tabla 10. <i>Claves de las diferentes muestras analizadas.</i>	78
Tabla 11. <i>Compuestos detectados por CG-EM de los extractos de plántula obtenidos con hexano.</i>	79
Tabla 12. <i>Compuestos detectados por CG-EM de los extractos de plántula obtenidos con acetato de etilo.</i>	81
Tabla 13. <i>Compuestos detectados por CG-EM de los extractos de plántula obtenidos con metanol.</i>	82
Tabla 14. <i>Actividades biológicas reportadas de los compuestos detectados por CG-EM de todos los extractos de plántulas.</i>	83

Tabla 15. <i>Compuestos detectados por CG-EM de extractos de callo con hexano (CH), acetato de etilo (CA) y metanol (CM).</i>	85
Tabla 16. <i>Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH a partir de extractos de callo y plántula a diferentes concentraciones.</i>	88
Tabla 17. <i>Actividad antimicrobiana (mm) de extractos de cultivos in vitro de L. octovalvis contra diferentes patógenos.</i>	90
Tabla 18. <i>Actividad antimicrobiana (halo de inhibición en mm) reportada por otros autores para extractos de L. octovalvis.</i>	91
Tabla 19. <i>Claves correspondientes a los tratamientos evaluados para actividad antimicrobiana.</i>	92
Tabla 20. <i>Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos evaluados.</i>	94
Tabla 21. <i>Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) reportadas por otros autores de extractos de L. octovalvis.</i>	95
Tabla 22. <i>Actividad antiinflamatoria de los extractos de plántulas sobre el desarrollo del edema inducido con TPA en ratones CDI.</i>	96

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Rendimiento para extracto de plántula.</i>	47
<i>Ecuación 2. Índice de crecimiento.....</i>	48
<i>Ecuación 3. Tiempo de duplicación.....</i>	48
<i>Ecuación 4. Rendimiento para callo.....</i>	48
<i>Ecuación 5. Porcentaje de captación del radical libre DPPH.....</i>	50
<i>Ecuación 6. Porcentaje de inhibición del edema auricular.</i>	50

ABREVIATURAS

2, 4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
5-LOX	5-lipoxigenasa
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
B5	Medio Gamborg
BABI	Medio BDS adicionado con calcio
BAP	Bencilaminopurina
BDS	Medio B5 modificado por Dunstan and Short
CBM	Concentración bactericida mínima
CCF	Cromatografía en capa fina
CFU	Unidad Formadora de Colonias
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CIM	Concentración mínima inhibitoria
Cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenasa
CUPRAC	Capacidad antioxidante reductora del ion cúprico
d	Día
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-2-picrilhidrazil hidrato
DRW	Medio Driver and Kuniyuki
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRAP	Capacidad antioxidante reductor férrico
G	Gramos
H	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC50	Concentración Inhibitoria Media
IPN	Instituto Politécnico Nacional
kg	Kilogramos
KIN	Kinetina
L	Litro
LTB4	Leucotrienos
M	Molar
m	Metro
mg	Miligramos

MH	Medio Müller-Hilton
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MS	Medio Murashige and Skoog
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilmurámico
Nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PAF	Factor de activación plaquetaria
PBP	Proteínas de unión a la penicilina
PGE2	Prostaglandina E2
PGS	Prostaglandinas
ppm	Partes por millón
psi	Libras por pulgada cuadrada absoluta
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
s	Segundo
SH	Medio Schenk and Hildebrandt
SIM	Monitoreo selectivo de iones
tD	Tiempo de duplicación
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TPA	13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
TRAP	Parámetro antioxidante de captura total de radicales
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
UTC	Universidad Tecnológica Corregidora
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
WPM	Medio Woody Plant
XTT	2,3-bis {2-metoxi-4-nitro-5-[(sulfenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetrazolio}
μ g	Microgramos
μ M	Micro molar
μ max	Velocidad máxima de crecimiento

1. INTRODUCCIÓN

Ludwigia octovalvis es una especie de planta perteneciente a la familia Onagraceae. Llega a medir de 60 cm hasta 1.60 m de altura, sus hojas son angostas y alargadas, miden 10 cm de largo; sus flores son amarillas, presentan cuatro pétalos; sus frutos son cápsulas cilíndricas que contienen un gran contenido de semillas. Su origen es desconocido, pero se desarrolla en clima cálido. En los estados de Morelos, Veracruz y Oaxaca la utilizan como planta medicinal para afecciones en la piel, como infecciones, erisipela, granos, nacidos y roña, también la usan como diurético. Además, estudios farmacológicos han demostrado su efectividad como antibiótico y antifúngico (UNAM, 2009).

El 90% de la población mexicana ha utilizado al menos una vez en la vida algunas de las 4,500 plantas medicinales de México; el IMSS solo reporta 3,000 especies de plantas con atributos medicinales; sin embargo, solo el 5% de ellas cuenta con un análisis farmacológico, además, solo 250 especies son comercializadas, de las cuales el 85% de estas son extraídas del medio silvestre y no cuentan con un plan sustentable (SEMARNAT, 2019). Es por ello que el cultivo *in vitro* de plantas es una alternativa viable, ya que nos permite propagar de manera masiva plantas libres de patógenos en un corto tiempo sin depender de los factores abióticos, y sin poner en peligro de extinción a la planta. Por otro lado, a partir de explantes es posible obtener callos embriogénicos, es decir, células vegetales que se encuentran en un proceso de indiferenciación en constante división celular, lo que supone una ventaja para la obtención de compuestos químicos con actividades farmacológicas que produce la planta silvestre, con la ventaja de hacerlo en condiciones controladas y constante (Sharry Sandra, 2015). Es por ello que en este proyecto se busca evaluar y comparar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana de extractos de la planta silvestre,

plántulas cultivadas *in vitro* y los cultivos de callo de *L. octovalvis*, para conocer en qué condiciones se obtienen mayor cantidad de compuestos bioactivos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINALES DE MÉXICO

Algunas de las plantas medicinales más utilizadas en México son árnica, epazote, hierbabuena, insulina, lavanda, manzanilla, stevia y sábila; las cuales se comercializan en tiendas naturistas o mercados. *Heteroteca inuloides* o árnica mexicana es utilizada para tratar cuadros inflamatorios o como antimicrobianas. *Chenopodium ambrosioides* L. conocido en México como epazote, sus hojas secas se toman en infusiones como antihelmíntico y emenagogo. *Mentha spicata* conocida comúnmente como hierbabuena, es usada para tratar náuseas, vómito y desordenes gastrointestinales. *Chamaecostus cuspidatus* (insulina) sus hojas se utilizan como suplemento para el tratamiento de la diabetes. *Matricaria chamomilla* L. o manzanilla, tiene diversas preparaciones que se utilizan para varios padecimientos incluidos la fiebre, inflamación, espasmos musculares, desordenes menstruales y gastrointestinales, insomnio, úlceras, dolor reumático y hemorroides. Las hojas de *Stevia rebaudiana* se utilizan como agente edulcorante, también es consumida en infusión para reducir los niveles de glucosa en sangre. *Aloe vera* o sábila se utiliza para tratar quemaduras, heridas y para bajar la fiebre. (Guzmán et al., 2017)

2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los productos e intermediarios del metabolismo se denominan metabolitos, los cuales se clasifican en primarios o secundarios, en función de sus funciones intrínsecas en el organismo, las plantas de diferente especie y género producen diferentes metabolitos (Adetunji et al., 2021). Los metabolitos primarios están presentes en casi todas las partes de

las especies vegetales, e intervienen en el desarrollo, crecimiento, síntesis de hormonas y proteínas, fotosíntesis y respiración. Algunos de estos son los hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos orgánicos y ácidos grasos insaturados (Crozier et al., 2006). Los metabolitos secundarios son componentes claves para que las plantas interactúen con el medio ambiente en la adaptación a condiciones de estrés tanto bióticas como abióticas; por ejemplo, algunos intervienen en la protección contra herbívoros, bacterias, hongos, virus e incluso otras plantas, también atraen polinizadores y dispersores de semillas (L. Yang et al., 2018). Se clasifican según su biogénesis u origen biosintético, se consideran tres clases biogénicas principales: terpenoides, compuestos nitrogenados, y fenólicos (Harborne, 1999).

Terpenoides o isoprenoides tienen como origen biosintético pirofosfatos de isopentenilo y dimetilalilo. Son principalmente hidrocarburos insaturados cíclicos, con diferentes grados de oxigenación en los grupos sustituyentes. Se encuentran principalmente en los tricomas glandulares de las hojas, exudados de las yemas y resinas de la corteza. Se subclasifican en: monoterpenoides, iridoides, sesquiterpenoides, lactonas sesquiterpénicas, diterpenoides, saponinas triterpenoides, saponinas esteroides, cardenólidos y bufadienólidos, fitoesteroides, cucurbitacinas, nortriterpenoides, carotenoides y otros triterpenoides (Harborne, 1999). Algunos de estos se usan de manera medicinal como antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antihiper glucemiantes, antiinflamatorios, antioxidantes, antiparasitarios, inmunes moduladores y como potenciador para la permeación de la piel (Brahmkshatriya, 2013).

Alcaloides, son compuestos orgánicos con un átomo de nitrógeno unido a un sistema cíclico de cinco o seis carbonos, se derivan de los aminoácidos proteicos; se subdividen en clases las principales son: amarilidáceas, betalaína, diterpenoide, indol, isoquinolina,

licopodio, terpenicos, péptido, pirrolidina y piperidina, pirrolizidina, quinolina, quinolizidina, esteroides, tropanos, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, purinas y pirimidias. Se encuentran en el 20% de las especies angiospermas, se encuentran en niveles altos en los tejidos de almacenamiento como son raíces, frutos y semillas (Harborne, 1999). Presentan actividad como diuréticos, analgésicos locales, bactericidas, anticancerígenos, antihipertensivos, espasmolíticos colinomiméticos, antiasmáticos y antimaláricos (Roberts & Wink, 1998).

Los compuestos fenólicos son estructuras aromáticas con uno o varios grupos hidroxilos sustituyentes, también pueden estar sustituidos por grupos metilo o glucósido; su origen biosintético es a partir de la fenilalanina, la cual se forma a partir de la sedoheptulosa por la vía del shikimato; la formación del ácido *p*-hidroxicinámico a partir de la fenilalanina por desaminación y *p*-hidroxilación da la formación para distintas clases de fenoles. Algunas subclases de los fenoles son: antocianinas, antoclores, benzofuranos, cromonas, cumarinas, flavonoides, flavonas y flavonoles, isoflavonoides, lignanos, fenoles y ácidos fenólicos, cetonas fenólicas, fenilpropanoides, quinonoides, estilbenoides, taninos y xantonas (Harborne, 1999). Varios de estos han presentado actividad hiperglucemia, anticancerígeno, antioxidante, antiaterosclerótico, antiulceroso, antidiabético, cardioprotector, antiinflamatorio, neuroprotector, hepatoprotector, entre otras (Adetunji et al., 2021).

Los metabolitos secundarios se han utilizado ampliamente como productos farmacéuticos, nutracéuticos, agroquímicos y cosméticos (Süntar et al., 2021). Algunos fitofármacos destacados son la berberina, la quinina, el kaempferol, el taxol, la curcumina, la galantamina, la genisteína, el diaszhenin y la capsaicina (Nasim et al., 2022). Dentro de la amplia variedad de los biocompuestos que se utilizan para cosméticos se encuentran los siguientes: arbutina, ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido

linoleico, cedrol, quercetina, niacinamida, retinol y resveratrol (Liu, 2022). También en la industria alimentaria se emplean como saborizantes (vainillina, limoneno, cinamaldehído, antocianina, etc.) (Singh & Sudha, 2024) y pigmentos (antocianinas, carotenoides, ficobiliproteínas, betalaínas y clorofilas) (Luzardo-Ocampo et al., 2021). Por otra parte, se han utilizado en la industria agroquímica como herbicidas (artemisinina, glucosinolatos, isotiocianatos, momilactona, sorgoleona, leptospermona, sarmentina, entre otros (Motmainna et al., 2021) y pesticidas (nicotina, neem (azadiractina), riania, piretrinas, sabadilla, fluoroacetato, carboxin, etc.) (Oguh et al., 2019).

Pueden extraerse de sus fuentes naturales o sintetizarse químicamente; sin embargo, en muchos casos no son fáciles de sintetizar debido a su elevado costo de producción y su compleja estereoquímica, otras desventajas son la limitada disponibilidad, los métodos de extracción/aislamiento son complejos y costoso, se obtienen bajos rendimientos y baja biomasa (Varshney et al., 2021) (T. Chen et al., 2019; Süntar et al., 2021). Una alternativa ha sido el uso de cultivos *in vitro* de células y órganos vegetales, para aumentar los rendimientos y disminuir los costos de producción (Süntar et al., 2021). Algunos de los metabolitos secundarios producidos por esta alternativa son shikonina, vincristina, artemisinina, camptotecina y paclitaxel, los cuales presentaron rendimientos comercialmente viables en comparación con las fuentes vegetales (Süntar et al., 2021).

2.3 CULTIVO *IN VITRO*

Una alternativa para la producción de metabolitos secundarios de plantas es el uso de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, las cuales consisten en producir plantas o componentes de estas en condiciones ambientales controladas, ausencia de microorganismos asociados, nutrición heterotrófica, en recipientes (Suarez, 2020). Algunas de las técnicas

empleadas para la producción de metabolitos secundarios son la propagación *in vitro* de plantas (micropropagación), el cultivo *in vitro* de órganos vegetales (normalmente raíces), cultivo de células (suspensiones celulares, protoplastos o células gaméticas), cultivo de tejidos de callos o tejidos diferenciados (Espinosa-Leal et al., 2018).

La micropropagación de plantas permite la propagación masiva de plantas en espacios reducidos y con mayores tasas de multiplicación, bajo condiciones normales de multiplicación de propágulos asexuales, no producen semillas y libres de patógenos (Suarez, 2020). Por otro lado, puede inducirse la formación de callo (masa celular desdiferenciada) inoculando el explante adecuado en un medio semisólido con las cantidades adecuadas de nutrientes, reguladores de crecimiento vegetal y cultivado en condiciones ambientales controladas (Wawrosch & Zotchev, 2021). Los cultivos en suspensión pueden iniciarse a partir de pequeños agregados de callo, de modo que pueden desarrollarse líneas celulares homogéneas con un crecimiento rápido; para la producción de metabolitos secundarios la mayoría de investigaciones se centra en estos cultivos debido a su crecimiento comparativamente rápido y a la posibilidad de escalamiento a sistemas de biorreactores (Wawrosch & Zotchev, 2021).

Para ello se requiere de medios artificiales de cultivo ya que van a proporcionar la fuente de nutrientes para que crezcan de manera óptima estos cultivos, y se deben de seleccionar en base a los requerimientos nutrimentales de la especie. Actualmente existe una amplia variedad de medios de cultivo, los cuales pueden ser modificados para obtener una mejor respuesta, incluso se les añade antibióticos que no tengan efectos citotóxicos para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y moho en los cultivos (Kors, 2003). El más utilizado es el medio basal MS (Murashige and Skoog), ya es que un buen medio para la regeneración de plantas, debido a los altos niveles de nitrato y amonio que contiene. Otros

medios son el B5 con vitaminas B5, SH (Schenk and Hildebrandt); WPM (Woody Plant Medium) y DKW (Driver and Kuniyuki) para plantas leñosas; algunos medios modificados son el BDS (B5 modificado por Dunstan and Short) y BABI (BDS adicionado con más calcio) (Phillips & Garda, 2019).

Estos medios de cultivo son adicionados con reguladores de crecimiento vegetal ya que tienen un profundo efecto en la diferenciación celular, la biomasa y la producción de metabolitos secundarios farmacéuticos en cultivos de células, tejidos y órganos (Bienaimé et al., 2015). Los más utilizados para la micropropagación de plantas ornamentales por organogénesis, embriogénesis y proliferación axilar son el ácido naftalenacético, la bencil adenina, y la kinetina (Jain & Ochatt, 2010). Las citoquininas se suelen utilizar en los medios de micropropagación para estimular la proliferación de brotes axilares (Chawla, 2009). Sin embargo, las concentraciones ideales difieren de una especie a otra y deben establecerse con precisión para obtener las tasas efectivas de multiplicación. Las auxinas mejoran la germinación, la inducción de raíces y el crecimiento de las plántulas de muchas especies (Hashem & Kaviani, 2010).

El tamaño del inoculo también afecta a la biomasa y a la producción de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro* de plantas, debido al efecto de la densidad de los inóculos sobre la productividad primaria y secundaria de las células cultivadas a través de la inducción de enzimas implicadas en el metabolismo fenilpropanoide durante el cultivo de las células en medio fresco. El pH del medio de cultivo también afecta la productividad, ya que el metabolismo primario y las enzimas de la vía biosintética se ven afectados por el pH del medio de cultivo (Isah et al., 2018).

Existen otras alternativas para aumentar la producción de estos metabolitos secundarios, tales como la administración de precursores o elicitores al medio de cultivo.

Los elicitores son compuestos que estimulan diversos mecanismos de defensa de la planta y así promueven la biosíntesis de metabolitos secundarios para proteger a la célula y a toda la planta (Ramirez-Estrada et al., 2016). Los elicitores bióticos son sustancias de origen biológico, como polisacáridos originados a partir de paredes celulares vegetales y microorganismos, lisados de hongos y bacterias, o extracto de levadura. Los elicitores abióticos son de origen no biológico e incluyen factores físicos (estrés osmótico, luz UV, ultrasonidos, etc.), químicos (por ejemplo, metales pesados o sales minerales) y hormonales como el ácido salicílico o los jasmonatos (Isah et al., 2018).

Fontanilli et al, en 2015 establecieron un protocolo de micropropagación y encapsulación a partir de yemas auxiliares de *Ludwigia palustris*, proliferaron los brotes en medio MS sin reguladores de crecimiento, los cuales mostraron mayor peso fresco, seco y longitud total en biorreactor GROWTEK (Fontanilli et al., 2015). Se establecieron cultivos de callo de *Oenothera laciniata* en medio LS agar suplementado con 10^{-5} M de IAA y 10^{-5} M de kinetina, los cuales produjeron grandes cantidades del dímero elagitanino macrocíclico, oenoteína B y un trímero, oenoteína A, acompañados de taninos hidrolizables monoméricos relacionados; además, al adicionar 10 mM de NH^{+4} y 5 mM de NO^{-3} obtuvieron un mayor contenido de oenoteína B con 65 mg/g de peso seco, el cual fue superior al obtenido de las hojas de *O. laciniata* (Taniguchi et al., 1998). Salinas et al., en 2014 obtuvieron 5 líneas diferentes en función de su friabilidad y tasa de crecimiento de cultivos de callo provenientes de la especie *Lopezia racemosa*, utilizando explantes la hoja, segmento nodal y el hipocótilo, cultivados con medio MS suplementado con ANA o 2,4-D y BAP a concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4 mg/L. La línea con mayor producción de biomasa (3.91 g) fue con el explante de hoja con 1.0 mg/L 2,4-D con 0.5 mg/L BAP, también produjo una mayor producción que la planta silvestre del compuesto 6-O-palmitoil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -sitosterol con 174

µg/g de biomasa, el cual posee actividad antiinflamatoria con un 57.14% de inhibición del edema auricular en ratones (Salinas et al., 2014).

2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO

Bajo condiciones de estrés el organismo produce más especies reactivas de oxígeno (ROS) (radicales aniónicos superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno), que antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasas) y no enzimáticos (ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión, carotenoides y flavonoides), provocando un desequilibrio que ocasiona daños celulares, facilitando el desarrollo de enfermedades degenerativas como las cardiovasculares, cáncer, neurodegenerativas, inflamatorias, entre otras (Krishnaiah et al., 2011). El uso de plantas medicinales para tratar estas enfermedades ha sido de interés, ya que poseen un alto contenido de compuestos con propiedades antioxidantes capaces de capturar radicales libres. Algunas de estas plantas con potencial antioxidante son: *Abeliophyllum distichum*, *Brungmansia suaveolens*, *Capsicum annuum L.*, *Cuphea aequipetala*, *Notopterygium incisum*, *Salvia miltiorrhiza*, *Salvia microphylla*, *Satureja hortensis L.* y *Solanum erianthum* (Rodríguez-Yoldi, 2021; Villa-Ruano et al., 2013).

Los antioxidantes se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción en primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios inhiben la reacción en cadena de la oxidación, actuando como donantes o aceptores de hidrógeno de los radicales libres; los antioxidantes principales de este grupo presentan una estructura fenólica e incluyen los siguientes: minerales antioxidantes, vitaminas antioxidantes y fitoquímicos (flavonoides, catequinas, carotenoides, β -caroteno, licopeno, diterpeno y sus derivados). Los antioxidantes secundarios presentan varios mecanismos, como la unión de iones metálicos, la eliminación

de ROS, la conversión de hidroperóxidos en especies no radicales, la absorción de la radiación UV o la desactivación del oxígeno singlete; dentro de estos se encuentran: butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno y galato de propilo (Moharram & Youssef, 2014).

Existen diversas pruebas para la medición directa de la transferencia de electrones de los antioxidantes a los radicales libres, generalmente están asociadas a la capacidad de neutralizar determinados tipos de especies radicales que pueden ser artificiales y biológicamente irrelevantes; sin embargo, proporcionan información relevante sobre su potencial antioxidante intrínseco con mínimas interferencias en el entorno (Munteanu & Apetrei, 2021). Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante se dividen en tres categorías: espectrometría, ensayos electroquímicos y cromatografía, estos se resumen en la Tabla 1 (Moharram & Youssef, 2014).

Tabla 1. Categorías de ensayos de capacidad antioxidante (Pisoschi & Negulescu, 2012).

Técnica	Ensayo	Principio del método	Determinación del producto final
Espectrometría	DPPH	Reacción antioxidante con un radical orgánico	Colorimetría
	ABTS	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico	Colorimetría
	FRAP	Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III)	Colorimetría
	PFRAP	Reducción del ferricianuro potásico por antioxidantes y posterior reacción de ferrocianuro potásico con Fe ³⁺	Colorimetría
	CUPRAC	Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes	Colorimetría
	ORAC	Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por AAPH (2, 2'-azobis-2-amidino-propano)	Pérdida de la fluorescencia de la fluoresceína

	HORAC	Capacidad antioxidante para apagar radicales OH generados por un sistema de tipo Fenton basados en Co (II)	Pérdida de la fluorescencia de la fluoresceína
	TRAP	Capacidad antioxidante para eliminar los radicales derivados del luminol, generados por la descomposición de AAPH.	Apagado por quimioluminiscencia
	Fluorimetría	Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética de diferente longitud de onda	Registro de los espectros de excitación/emisión de fluorescencia
Electroquímica	Voltamperometría cíclica	Se varía linealmente el potencial de un electrodo de trabajo desde un valor inicial hasta un valor final y viceversa, se registra la intensidad de corriente especulativa	Medición de la intensidad del pico catódico/anódico
	Amperometría	El potencial del electrodo de trabajo se ajusta a un valor fijo con respecto a un electrodo de referencia	Medición de la intensidad de la corriente generada por la oxidación/reducción de un analito electroactivo
	Biamperometría	La reacción del analito (antioxidante) con la forma oxidada de un par redox indicador reversible	Medición de la corriente que circula entre dos electrodos
Cromatografía	Cromatografía de gases	La separación de los compuestos de una mezcla se basa en la distribución entre una fase estacionaria líquida y una fase móvil gaseosa	Detección por ionización de llama o conductividad térmica
	Cromatografía líquida de alta resolución	La separación de los compuestos de una mezcla se basa en la distribución entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida con polaridades diferentes, a un caudal y una presión elevados de la fase móvil	Detección UV-VIS, fluorescencia, espectrometría de masas o detección electroquímica

2.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana pueden utilizarse para el descubrimiento de fármacos, la epidemiología y la predicción de resultados terapéuticos (Balouiri et al., 2016). Dado el aumento de la resistencia microbiana ante los antibióticos, los productos naturales son de interés por ser una de las principales fuentes de nuevas moléculas farmacológicas (Bérdy, 2005). Estudios previos han demostrado las propiedades antimicrobianas de diversas plantas medicinales, entre las que destacan: *Achyrocline satureioides*, *Allium sativum*, *Baccharis trimera* Less, *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia*, *Mentha piperita*, *Ruta graveolens*, etc (N. Silva & Fernandes Júnior, 2010).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (Taroco et al., 2006). Para determinar la CIM se utilizan los métodos de dilución, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano ensayado en el medio agar (dilución en agar) o de caldo (macrodilución o microdilución); ambos métodos permiten medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos (Balouiri et al., 2016). Se han desarrollado métodos colorimétricos basados en el uso de reactivos colorantes como son las sales de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), y 2,3-bis {2-metoxi-4-nitro-5-[(sulfenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetrazolio} (XTT) y la resazurina (azul de alamar) (Al-Bakri & Afifi, 2007; Reis et al., 2004). Algunos factores que influyen los valores de la CIM son: el tamaño de inóculo, el tipo de medio de crecimiento, el tiempo de incubación y el método de preparación del inóculo (Balouiri et al., 2016).

Los agentes antimicrobianos se dividen en bacteriostáticos y bactericidas. Los agentes bacteriostáticos como la tetraciclina inhiben el crecimiento y la multiplicación de las bacterias; sin embargo, si se elimina el agente las células vuelven a multiplicarse, a diferencia de un agente bactericida el cual ocasiona daños irreversibles, un ejemplo son las fluoroquinolonas que no solo inhiben el crecimiento, también desencadenan vías dentro de las células que conducen a la muerte celular (Cavaliere, 2009).

La actividad antimicrobiana de un agente se debe principalmente a dos mecanismos, intervenir químicamente en la síntesis o función de componentes vitales de las bacterias y eludir los mecanismos convencionales de resistencia antibacteriana, algunos de estos están ejemplificados en la Tabla 2 (Vaou et al., 2021).

Tabla 2. Mecanismos de acción de agentes antimicrobianos.

Tipo de mecanismo	Antibióticos	Mecanismo de acción
Biosíntesis de proteínas bacterianas	Macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos y oxazolidinonas	La amikacina se une al ARNr 16S y a la proteína S12 de unión al ARN de la subunidad 30S del ribosoma procariota, inhibiendo la síntesis de proteínas al cambiar la forma del ribosoma de modo que no lee correctamente el codón del ARNm (Walsh, 2003)
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Ácido nalidíxico y fluoroquinolonas	La ciprofloxacina inhibe a la topoisomerasa II (ADN girasa) y la topoisomerasa IV, las cuales son necesarias para separar el ADN bacteriano, inhibiendo así la división celular (Maxwell, 1997)
Biosíntesis de la pared celular	Penicilina, cefalosporinas y vancomicina	Se unen al sustrato peptídico de la capa peptidoglicano impidiendo así una reacción enzimática. La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias Gram positivas, ya que se une al D-Alanil-D-Alanina e impide la formación de largos polímeros de NAM y NAG que forma filamentos vertebrales de la pared celular (Schneider & Sahl, 2010)
Destrucción de la pared celular bacteriana	Polimixinas	Se unen al componente lipídico del lipopolisacárido, provocando alteraciones estructurales por medio del intercambio de fosfolípidos que pueden terminar en desequilibrio osmótico, ocasionando fuga de moléculas celulares y la inhibición de la respiración celular (Poirel et al., 2017)

2.6 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La inflamación forma parte de la compleja respuesta biológica de los tejidos vasculares a estímulos nocivos, como patógenos, células dañadas o irritantes (Phanse et al., 2012). La respuesta inflamatoria se produce en tres fases, la primera fase está causada por el aumento de la permeabilidad vascular ocasionando la exudación de líquidos de la sangre al espacio intersticial, la segunda fase implica la infiltración de leucocitos de la sangre al tejido, y en la tercera fase la formación de granulomas y la reparación del tejido (Hariram Nile & Won Park, 2013). Los mecanismos de la inflamación implican el metabolismo del ácido araquidónico, el cual se metaboliza por la vía de la ciclooxigenasa (COX) en prostaglandinas y tromboxano A₂, mientras que por la vía de la 5-lipoxigenasa (5-LOX) en eicosanoides y leucotrienos, los cuales actúan como mediadores químicos en la inflamación (Sarveswaran et al., 2017). Los mediadores de la inflamación son la histamina, las prostaglandinas (PG_s), los leucotrienos (LTB₄), el óxido nítrico (NO), el factor de activación plaquetaria (PAF), la bradicinina, la serotonina, las lipoxinas, las citocinas y los factores de crecimiento. El uso de diferentes mediadores induce el edema de la pata, la inflamación subaguda mediante el modelo de bolsa de aire de carragenina y la inflamación crónica mediante la formación de granulomas inducidos por pellets de algodón en ratas. La inhibición de la generación de eicosanoides a partir de neutrófilos de rata y la liberación de citoquinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral- α , TNF- α) a partir de macrófagos se utilizan como marcadores para pruebas *in vitro* de inflamación (Hariram Nile & Won Park, 2013).

3. ANTECEDENTES

L. octovalvis (Jacq.) Raven, es una hierba acuática perteneciente a la familia Onagraceae (Figura 1), crece comúnmente en lugares húmedos y clima cálido entre los 20 a

20 msnm, en especial en las orillas de canales de riego en el trópico mexicano. No tiene origen nativo, sin embargo, se ha registrado en Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz y Yucatán (CONABIO, 2009).

Reino	• Plantae
Subreino	• Traqueobionta
Superdivisión	• Spermatophyta
División	• Magnoliophyta
Clase	• Magnoliopsida
Subclase	• Rosidae
Orden	• Myrtales
Familia	• Onagracea
Género	• Ludwigia
Especie	• <i>Ludwigia octovalvis</i> (Jacq.) P.H. Raven

Figura 1. Clasificación taxonómica de la especie *L. octovalvis*.

L. octovalvis crece en forma de arbusto erecto de hasta 2.5 m de altura bien ramificados (Figura 2). Sus hojas son lanceoladas a subovadas de 5.6 x 1-1.5 cm, cuneadas en la base, agudas en el ápice, subcoriáceas; nervios laterales de 13 a 17 pares; pecíolos de 3 a 5 mm de largo. Presenta flores amarillas cuádruples; bractéola ausente o reducida a una glándula; sépalos ovado-lanceolados verdes con márgenes rosáceos, con 3 nervios; pétalos anchamente ovados o cuneados; 8 estambres pétalo-íferos, casi iguales, con filamentos blancos y anteras amarillas pálidas, con nectario rojizo hundido en forma ovoide de 1.5 a 18 cm de longitud, con 4 lóculos; cápsulas rectas o ligeramente curvadas; semillas pluri-

seriadas en cada lóculo, libres, de globosas a elipsoides, de color pardo oscuro de 1 mm (Barua, 2010).

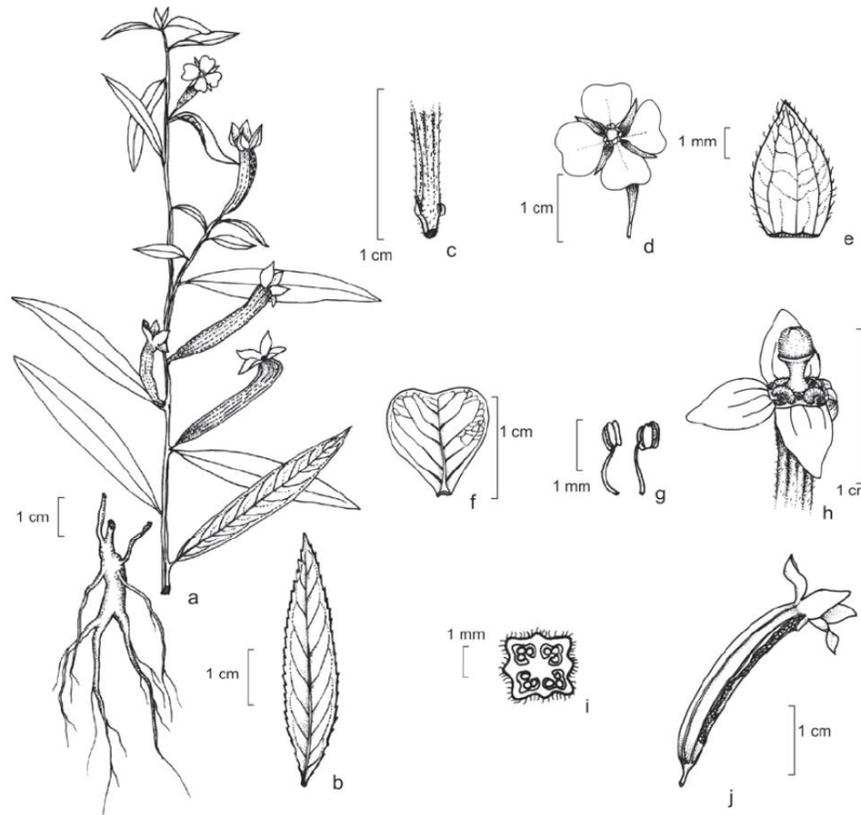
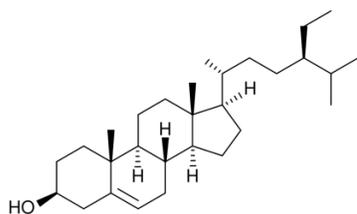


Figura 2. *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven *subsp. octovalvis*. a. Rama con flores, frutas y raíz. b. Hoja. c. Bractéola. d. Flor. e. Sépalo. f. Pétalo. g. Estambres. h. Gineceo con sépalos. i. T.S. de ovario. j. Cápsula. (Barua, 2010).

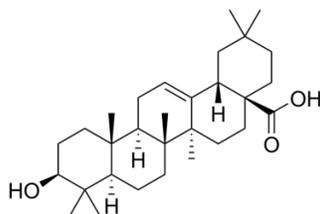
L. octovalvis se conoce comúnmente en México como clavel de laguna o clavillo. Se ha utilizado de manera medicinal en Morelos, Veracruz y Oaxaca, para el tratamiento de afecciones de la piel como infecciones, erisipela, granos, nacidos y roña. La aplican utilizando las hojas previamente calentadas y remojadas en alcohol; también preparan una pomada con la planta macerada que se mezcla con manteca y azufres para el tratamiento de la roña. Además, la infusión o decocción de las hojas la utilizan como diurético (UNAM, 2009).

L. octovalvis ha sido utilizada para diferentes tratamientos en la medicina tradicional, algunos que se mencionan en la literatura son para el edema, nefritis, hipertensión (Chang et al., 2004), disentería, enfermedades nerviosas, orquitis, leorrea, dolor de cabeza y glándulas inflamadas (Kadum Yakob et al., 2012), infecciones urinarias, dermatitis, úlceras, impétigo y granos (Kadum Yakob et al., 2015). Su decocción se bebe como bebida saludable, también para tratar la diarrea y flatulencias (Yakob et al., 2012). En la medicina tradicional china se utiliza para proporcionar propiedades inmunorreguladoras, hepatoprotectoras, cardio-vasculares y efectos antienvjecimiento (Lin et al., 2014). En el estado de Morelos y Guerrero se utiliza la infusión para la disuria por hiperplasia prostática (Averett et al., 1990). Particularmente en Morelos se reporta su uso local emergente por algunos pacientes con diabetes (Romero-Cerecero et al., 2009).

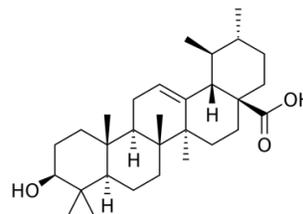
Los componentes principales de su extracto metanólico de toda la planta son flavonoides fenólicos, saponinas, esteroides y taninos (Kadum Yakob et al., 2012). Se han aislado β -sitosterol, ácido oleanólico, ácido 2 α -hidroxi ursólico, ácido tormentico, daucosterol, maltol, luteolina, quercetina, apigenina, Brevifolincarboxilato de metilo, ácido gálico y 3,4,8,9, dibenzo 10-polihidroxi [b,d]piran-6-ona (J. Yan & Yang, 2005).



β -sitosterol



Ácido oleanólico



Ácido 2 α -hidroxi
ursólico,

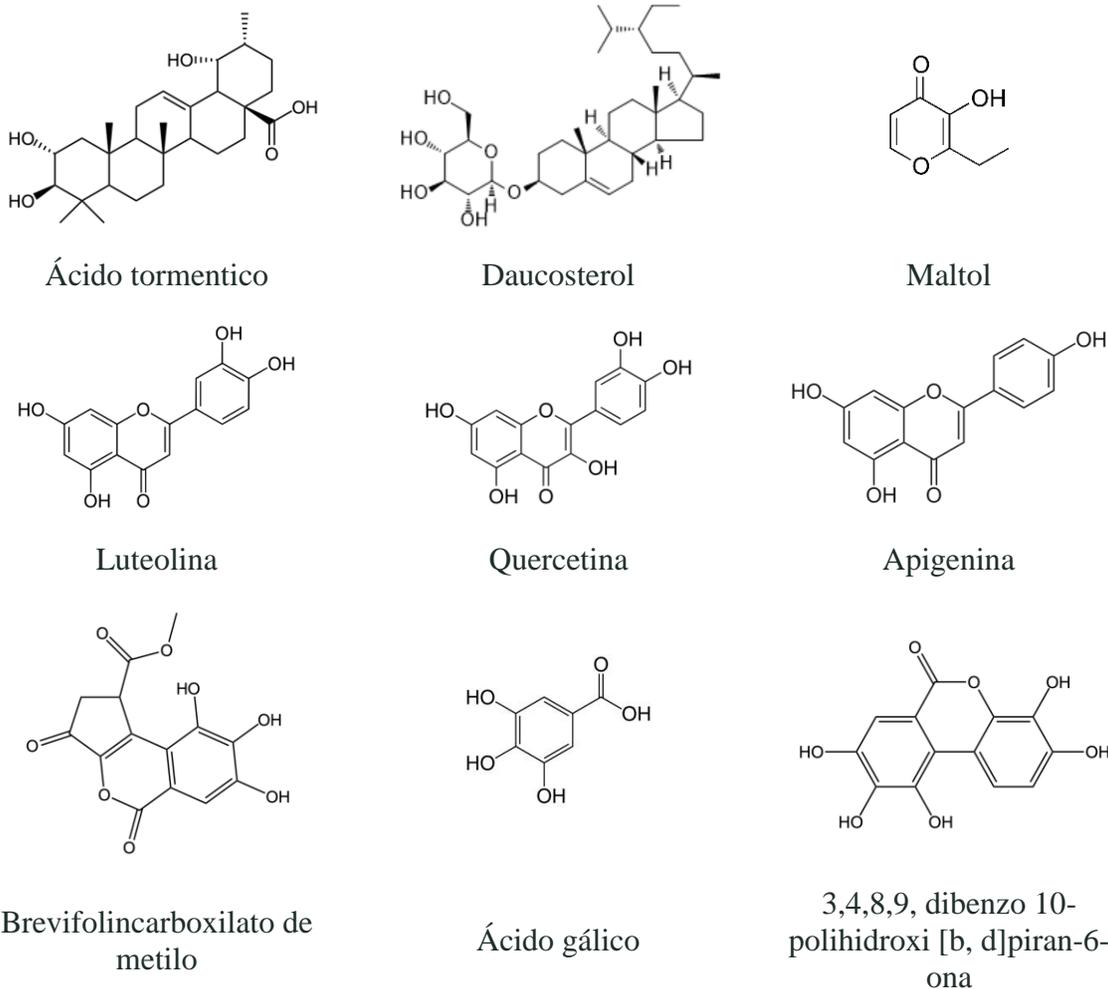
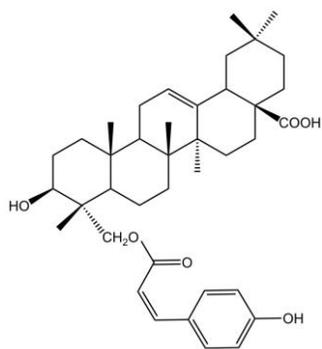


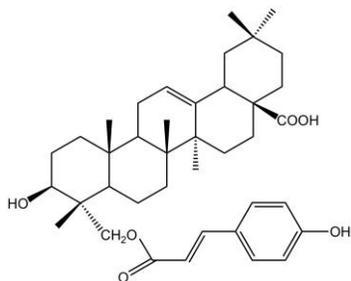
Figura 3. Compuestos aislados por Yan & Yang, 2005.

En 2004 aislaron del extracto metanólico de toda la planta, tres triterpenos nuevos (*(23Z)*-cumaroilhederagenina, (*(23E)*-cumaroilhederagenina y (*(3Z)*-cumaroilhederagenina, los cuales mostraron citotoxicidad significativa contra dos líneas celulares tumorales humanas, el carcinoma epidermoide oral KB y el carcinoma colorrectal HT29, con un rango de IC₅₀ de 1.2 - 3.6 μM (Chang et al., 2004). Posteriormente Chang & Kuo, en el 2007 aislaron la (*(23Z)*-feruloilhederagenina y la (*(23E)*-feruloilhederagenina, junto con dos triterpenos de tipo oleanano conocidos, el acetato de β-amirina y el palmitato de β-amirina de la planta entera (Chang & Kuo, 2007).



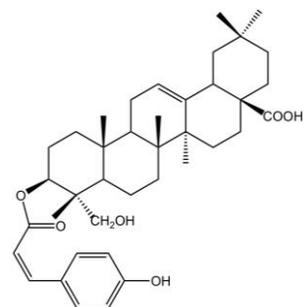
(23Z)-

cumaroilhederagenina



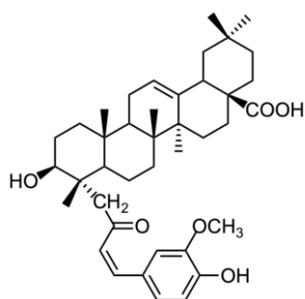
(23E)-

cumaroilhederagenina



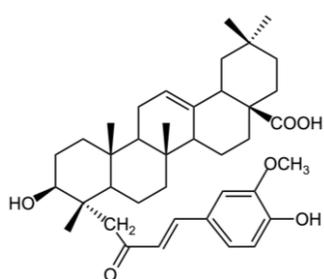
(3Z)-

cumaroilhederagenina



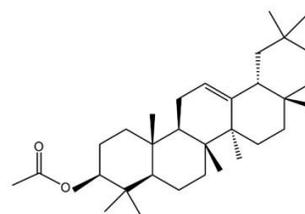
(23Z)-

feruloilhederagenina

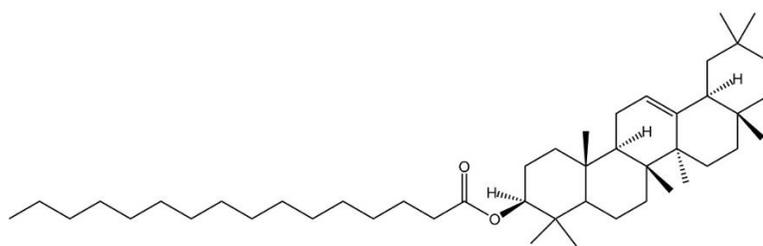


(23E)-

feruloilhederagenina



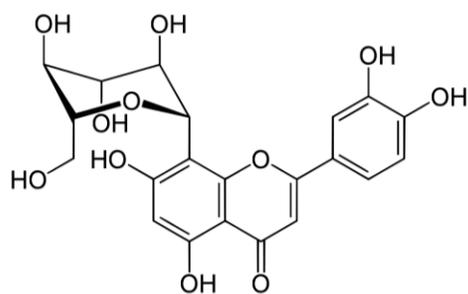
Acetato de β-amirina



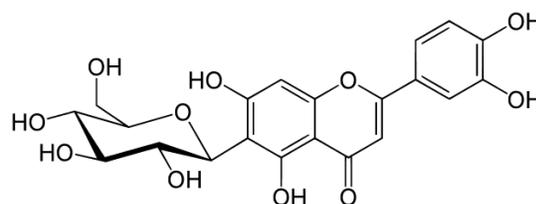
Palmitato de β-amirina

Figura 4. Compuestos aislados por Chang et al., 2004 y 2007.

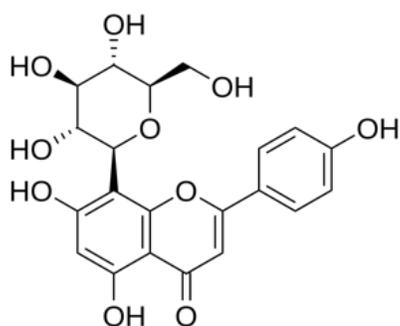
También han encontrado que esta planta contiene flavonas c-glicosidadas como orientina, isorientina, vitexina e isovitexina (Averett et al., 1990).



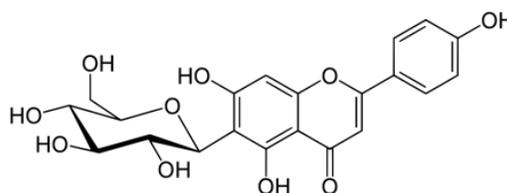
Orientina



Isoorientina



Vitexina



Isovitexina

Figura 5. Compuestos identificados por Averett et al., 1990.

Estudios previos demuestran que el extracto etanólico al 95% presenta actividad moderada anti-*Helicobacter pylori* (Wang & Huang, 2005); la clorofila extraída de *L. octovalvis* posee actividad inhibitoria potente contra la proliferación de adipocitos 3T3-L1 (Wu et al., 2010); el extracto etanólico al 65% presenta una inhibición del 82.7% $IC_{50}=202$ $\mu\text{g/mL}$ de la actividad de la β -glucosidasa, y de la lipasa 31.4% $CI_{50}= 288$ $\mu\text{g/mL}$ (Ramírez et al., 2012); se ha mostrado que el 80% de extracto de metanol de hoja inhibe tanto *E. coli* (0157:H7) como *E. coli* (ATCC 25922) y *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633), mientras que el de raíz inhibe *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) a valores de CIM y CBM de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ y 125 $\mu\text{g/ml}$ (Yakob et al., 2012); así mismo el extracto metanólico presenta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Candida albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* (A. C. O. Silva et al., 2013).

El extracto hidroalcohólico al 95% extiende significativamente la vida útil de las moscas con una dieta hipercalórica, también atenúa el deterioro cognitivo relacionado con la edad tanto en las moscas como en ratones, sin causar ninguna compensación negativa perceptible (Lin et al., 2014). Posteriormente Lin et al, demostraron que el extracto modula la señalización de AMPK en múltiples tejidos y mejora la homeostasis sistémica de la glucosa y mejora la memoria en ratones diabéticos (Lin et al., 2017). También se identificaron del extracto hidroalcohólico a la isoorientina, la cual demostró tener efecto inhibidor de la lipasa pancreática, y dos compuestos aislados con alto efecto inhibidor de la α -glucosidasa (galato de etilo y ácido gálico) (Morales et al., 2018). Cabe destacar que también se suplementó el extracto en ratones y se descubrió que es capaz de mejorar el rendimiento en ejercicios de resistencia, mejorar la fatiga y aumentar el glucógeno muscular (Y.-M. Chen et al., 2019).

A su vez se han sintetizado nanopartículas de plata a partir del extracto de hojas, las cuales demostraron que podría utilizarse como nanofármacos contra patógenos causantes de enfermedades infecciosas con formación de biopelículas (Sarathi Kannan et al., 2021). También se han sintetizado nanocatalizadores de titanio envueltos en biomoléculas de *L. octovalvis*, los cuales ejercen una función citotóxica potencial a través de la generación de más ROS, disminuyendo la viabilidad celular en el crecimiento de células HeLa y también la inactivación bacteriana a través de la actividad fotocatalítica (Ramasamy et al., 2021). Por otra parte, se han aislado extractos de bacterias endófitas que mostraron tener un efecto inhibidor de α -glucosidasa mayor al 50% (Pierre et al., 2022).

También se ha estudiado la toxicidad del extracto metanólico al 80% y demostró que no es tóxico vía oral; además, demostró que posee actividad inmunoprotectora, efectos hepatoprotectores y protectores cardiovasculares, ya que en dosis altas (800 mg/Kg)

disminuye significativamente el nivel de colesterol; y en células sanguíneas a dosis de 400 mg/Kg aumentó significativamente los neutrófilos, monocitos y linfocitos (Kadum Yakob et al., 2012)

4. JUSTIFICACIÓN

L. octovalvis es una hierba acuática que ha exhibido efectos antimicrobiano, antifúngico y antidiabético, se ha demostrado que principalmente biosintetiza compuestos tipo triterpeno y flavonoide, por lo tanto *L. octovalvis* es una especie potencial para la producción de posibles fármacos.

Dada la importancia de las actividades biológicas atribuidas a *L. octovalvis* es importante establecer sus cultivos de callos con la finalidad de producir compuestos bajo condiciones controles y constantes.

En este sentido, los cultivos de callo y células en suspensión permiten propagar masivamente el material vegetal en cualquier época del año en un corto periodo de tiempo en comparación con las especies silvestres.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana de extractos de la planta silvestre, plántulas cultivadas *in vitro* y los cultivos de callo de *L. octovalvis*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un protocolo de desinfección para cultivar plántulas de *L. octovalvis* en condiciones *in vitro*.

- Inducir a callos explantes nodales y de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* de *L. octovalvis* mediante un diseño experimental.
- Comparar los perfiles fitoquímicos de extractos de plántulas, callos y planta silvestre de *L. octovalvis*.
- Comparar el efecto antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano de extractos de plántulas, cultivos de callos y planta silvestre de *L. octovalvis*.

6. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* exhibirán efecto antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano debido a que biosintetizan compuestos estructuralmente semejantes a la planta silvestre *L. octovalvis*.

7. METODOLOGÍA

7.1 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Las semillas se colectaron en julio en Lomas del Tzompantle, Morelos, México. Se envolvieron en papel filtro en forma de sobre y se cerró con grapas. El sobre se depositó en un vaso de precipitado de 250 mL y se aplicaron métodos distintos para desinfectarlas bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

En cada método utilizado se aplicaron 6 gotas de detergente líquido Axióñ® y se expusieron por 15 min en agitación, posteriormente se aplicaron las condiciones indicadas en la Tabla 3, finalmente se realizaron tres lavados con agua destilada durante 5 min para todos los tratamientos.

Tabla 3. Condiciones de desinfección de semillas *L. octovalvis*.

Método	Etanol	Hipoclorito de sodio	Antifúngico
--------	--------	----------------------	-------------

	%	Tiempo (seg)	%	Tiempo (min)	%	Tiempo (min)
A	70	30	0.75	15	-	-
B	70	30	1	20	-	-
C	70	30	1	20	1	10

Una vez desinfectadas las semillas, se procedió a sembrarlas en tubos de cultivo que contenían medio Murashige & Skoog (Phillips & Garda, 2019) adicionado con antioxidantes, sacarosa al 3% y phytigel® 3 g/L (ver composición en Tabla 4), previamente esterilizado en autoclave (25 min a 15 psi), se incubaron bajo fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) hasta observar respuesta considerando un tiempo máximo de 20 d.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).

Macronutrientes	
NH₄NO₃	1.65 g/L
KNO₃	1.9 g/L
MgSO₄·7H₂O	0.37 g/L
CaCl₂	0.33 g/L
KH₂PO₄	0.17 g/L
Micronutrientes	
KI	0.83 mg/L
H₃BO₃	6.2 mg/L
MnSO₄·4H₂O	22.3 mg/L
ZnSO₄·7H₂O	8.6 mg/L
Na₂MoO₄·2H₂O	0.25 mg/L
CuSO₄·5H₂O	0.025 mg/L
CoCl₂·6H₂O	0.025 mg/L
Hierro	

Na₂EDTA	37.3 mg/L
FeSO₄.7H₂O	27.8 mg/L
Vitaminas	
Inositol	100 mg/L
Ácido Nicotínico	0.5 mg/L
Piridoxina	0.5 mg/L
Tiamina	0.1 mg/L
Glicina	2 mg/L
Antioxidantes	
Ácido ascórbico	150 mg/L
Ácido cítrico	200 mg/L

7.2 MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLÁNTULAS

Posteriormente a la germinación de las semillas, las plántulas se subcultivaron en medio de cultivo basal MS adicionado con sacarosa al 3% y phytigel® (3 g/L), en frascos Gerber® con 25 mL de medio, a su vez se utilizaban frascos grandes de 500 mL de capacidad con 100 mL de medio y se subcultivaron cada 2 semanas.

7.3 INDUCCIÓN A CALLO

Se utilizaron explantes de hoja y nodo procedentes de plántulas con 15 d de edad cultivadas bajo condiciones *in vitro*.

Se evaluó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal (auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido α -naftalenacético (ANA); citoquininas: 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN)) en distintas concentraciones y combinaciones, adicionándolos al medio de cultivo basal MS suplementado con sacarosa (30 g/L) y phytigel® (3 g/L), como se describe en la Tabla 5.

El tamaño de muestra fue de 10 repeticiones por tratamiento con 4 unidades experimentales, para lo cual se utilizaron frascos de vidrio tipo Gerber. Como indicadores de respuesta se evaluaron la formación callo, formación de brotes y formación de raíces.

Tabla 5. Reguladores de crecimiento vegetal y combinaciones evaluadas en la inducción de callo. 2,4-D: ácido 2, 4-diclorofenoxiacético; ANA: ácido naftalenacético; BAP: 6-bencilaminopurina; KIN: kinetina.

RCV (mg/L)	2,4-D				ANA				
	0	0.1	0.5	1	0	0.1	0.5	1	
BAP	0	W0	W1	W2	W3	X0	X1	X2	X3
	0.1	W4	W5	W6	W7	X4	X5	X6	X7
	0.5	W8	W9	W10	W11	X8	X9	X10	X11
	1	W12	W13	W14	W15	X12	X13	X14	X15
KIN	0.1	W16	W17	W18	W19	X16	X17	X18	X19
	0.5	W20	W21	W22	W23	X20	X21	X22	X23
	1	W24	W25	W26	W27	X24	X25	X26	X27

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), y se realizó una prueba Tukey a un nivel de confianza del 95%, utilizando el software de Minitab, para la elaboración de gráficas se utilizó GraphPad Prism 9.4.1.

7.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLÁNTULAS

Los tratamientos que mostraron la respuesta de formación de plántulas, se subcultivaron en periodos de 2 semanas en el medio suplementado con los RCV correspondientes, hasta obtener 5 g de plántula seca.

Para cada extracto orgánico, el material vegetal (planta seca) de cada tratamiento se trituró con mortero y pistilo de porcelana de manera independiente, posteriormente, se introdujo en un matraz Erlenmeyer y se añadió solvente orgánico cubriendo totalmente el material vegetal, y se dejó macerando 72 h. A continuación, se filtró por gravedad con papel

filtro Whatman No. 1, el solvente se sometió a destilación mediante el rotavapor con la finalidad de concentrar el extracto, el cual se recolectó en frascos limpios previamente pesados, finalmente dejó secar a temperatura ambiente, y el material vegetal fue sometido nuevamente a una segunda y tercera extracción.

La extracción se realizó en polaridad creciente, iniciando con el solvente de hexano, posteriormente se utilizó acetato de etilo y finalmente metanol. Una vez realizados los tres ciclos para cada solvente, se pesaron los frascos con el extracto seco, y se determinaron los rendimientos con la ecuación 1 (Ramírez-Salcedo et al., 2015).

Ecuación 1. Rendimiento para extracto de plántula.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de plántula seca (g)}} \times 100$$

Con la finalidad de comparar los compuestos en cada tratamiento se realizaron cromatoplasmas en capa fina (CCF) fase normal reveladas con luz ultravioleta, para cada solvente (hexano, acetato de etilo y metanol).

7.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA CALLOS

La cinética se realizó tipo lote por 10 semanas (0-10), para ello se utilizaron 0.5 a 0.6 g de callo de 23 d de edad que se sembraron en 25 mL de medio MS suplementado con los RCV correspondientes en frascos de vidrio tipo Gerber. El crecimiento celular fue medido cada semana, considerando la biomasa proveniente de 3 frascos, y se determinó su peso fresco y seco por gravimetría. A partir de los pesos de la biomasa seca y fresca (W) obtenidos por gravimetría se calculó el índice de crecimiento de cada semana utilizando la ecuación 2 (C. Yan et al., 2015). De los datos obtenidos se obtuvo la media y la desviación estándar, además se realizó un ANOVA y prueba Tukey a un nivel de confianza del 95%, utilizando el software de Minitab, y para la elaboración de gráficas se utilizó GraphPad Prism 9.4.1.

Ecuación 2. Índice de crecimiento.

$$\text{Índice de crecimiento} = \frac{W_{final} - W_{inicial}}{W_{inicial}}$$

Se determino la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) realizando una regresión lineal con la fase exponencial de los índices de crecimiento de la biomasa seca de callo, a partir de este parámetro cinético se calculó el tiempo de duplicación (t_D) utilizando la ecuación 3 (Setiaji et al., 2020).

Ecuación 3. Tiempo de duplicación.

$$t_D = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

La biomasa seca obtenida de cada una de las semanas de la cinética se trituró de manera independiente y se sometió a extracción (utilizando solventes en polaridad creciente) por sonicación. Los ciclos de sonicación fueron de 10 min a temperatura ambiente, y por triplicado para cada solvente. Finalmente, se obtuvieron los perfiles cromatográficos por cromatografía en capa fina (CCF) fase normal, reveladas con luz ultravioleta, para cada uno de los extractos, obteniendo 11 puntos de aplicación por solvente, que corresponden a las 10 semanas monitoreadas considerando la semana 0.

Los perfiles cromatográficos por CCF de la cinética permitieron identificar la semana con producción máxima de compuestos, con base en ello, se subcultivo la línea celular de callos y su cosecha se realizó en la semana conveniente. Se obtuvieron extractos procedentes de 50 g de biomasa seca y se determinó el rendimiento con la ecuación 4.

Ecuación 4. Rendimiento para callo.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de biomasa de callo seco (g)}} \times 100$$

7.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH

La actividad de captación del radical libre DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil hidrato, Sigma-Aldrich Cheime, Steinheim, Alemania) de los extractos analizados se midió mediante el método de Bondet et al., el cual fue ligeramente modificado (Bondet et al., 1997), y se determinó espectrofotométricamente. Cuando el DPPH reacciona con un compuesto antioxidante, se puede donar hidrógeno, se reduce, lo cual ocasiona el cambio de coloración de violeta intenso al amarillo claro, estos cambios de color se midieron a 515 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta/visible (Spectronic Genesys 8, Rochester, EE.UU.).

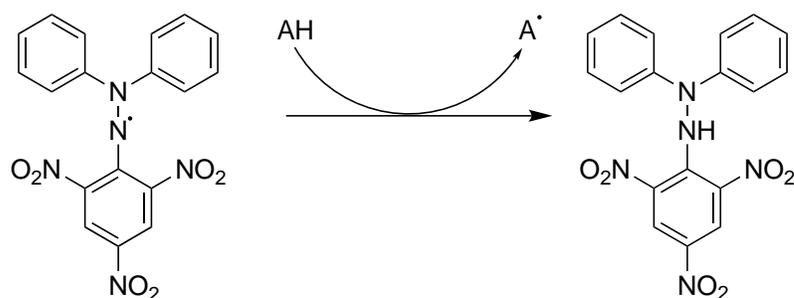


Figura 6. Reacción llevada a cabo entre DPPH y un antioxidante.

La solución stock de los extractos se prepararon disolviendo 20 mg de extracto en 1 mL de etanol absoluto, posteriormente se hicieron diluciones para obtener 1000, 100 y 10 ppm de cada muestra, también se obtuvieron las mismas concentraciones para la quercetina (control positivo). La solución DPPH en etanol se preparó antes de las mediciones. Se mezcló 1.5 mL de la solución DPPH con 0.5 mL de las soluciones muestras, en microcubetas desechables de 1 cm de longitud, teniendo una proporción final 3:1 aproximadamente.

Las muestras a 1000, 100 y 10 ppm se mantuvieron en oscuridad durante 90 min a temperatura ambiente, después, se midió la disminución de la absorción. Para el control, se midió la absorción de una muestra blanco con la misma cantidad de etanol y DPPH. El

experimento se realizó por triplicado. La actividad de captación del radical libre se calculó con la ecuación 5 (Domínguez-Villegas et al., 2013).

Ecuación 5. Porcentaje de captación del radical libre DPPH.

$$\% \text{Captación del radical libre} = \frac{AB - AA}{AB} \times 100$$

Donde AB-absorción de la muestra blanco (t= 0min); AA-absorción de las soluciones del extracto o quercetina (t=90 min).

7.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO *IN VIVO*

Los ratones macho y hembras CD1 adultos (20 ± 3 g) se obtuvieron de Animal Vivarium de PROPECUA S.A., y se mantuvieron en jaulas de plástico durante un periodo de acondicionamiento de 7 d previo a los experimentos en condiciones de laboratorio (ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h; temperatura 25 ± 2 °C; humedad 55-80%) con comida Rodent Chow y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron siguiendo los estatutos del Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (IACUC) y de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, modificada en 2001), revisada en 2024.

El ensayo se realizó según lo descrito por (García-Rodríguez et al., 2014). El control se trató con TPA (2,5 µg) diluido en acetona en la oreja derecha (Ws) y luego la oreja izquierda recibió sólo 25 mL de acetona (Wo). Los grupos experimentales (machos y hembras; n=7) recibieron TPA y 30 min después fueron tratados con extracto de acetato de etilo de la variación 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA, indometacina (0.5, 1 y 2 mg/ oreja) en la oreja derecha (Ws). La actividad antiinflamatoria se calculó en función de la diferencia de peso entre las secciones de oreja (6 mm) a las 6 h, en comparación con el grupo de control, mediante la ecuación 6 (García-Rodríguez et al., 2014).

Ecuación 6. Porcentaje de inhibición del edema auricular.

$$\% \text{Inhibición} = \frac{(W_s - W_o)_{\text{Control}} - (W_s - W_o)_{\text{Tratado}}}{W_s W_o} \times 100$$

7.8 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

7.8.1 DIFUSIÓN EN DISCO

Se preparó una solución stock de 50 mg/mL de cada extracto con 50 mg de extracto suspendido en 1 mL de su solvente correspondiente, posteriormente a partir de estos extractos se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de 25, 12.5 y 5 mg/mL. Se utilizaron como controles negativos los solventes (hexano, acetato de etilo y metanol). Los fármacos de referencia empleados fueron la gentamicina de 80 mg/mL para *E. coli* (ATCC 25922), estreptomicina de 500 mg/mL para *S. aureus* (ATCC 25923) y fluconazol 100 mg/50 mL para *C. albicans* (aislado de muestra de orina), de todos estos fármacos solo se utilizó un 1 mL para llevar a cabo el ensayo. Las muestras se almacenaron en el refrigerador a temperaturas de mínimo 8°C y máximo 2°C.

Se activaron las cepas en medios líquidos utilizando medio E.C para *E. coli*, caldo tripaseína de soya para *S. aureus*, y caldo dextrosa y papa para *C. albicans*. Después de 24 h de incubación se realizaron lavados con solución salina al 0.9% para retirar el medio y posteriormente sembrar en césped los microorganismos en cajas Petri con agar Müller-Hilton. Para su mantenimiento se sembraron diariamente por estría cruzada en agar MH, se llevó a cabo la tinción de Gram por cada siembra para asegurar la pureza de la cepa, evitando su contaminación durante el proceso.

Tras obtener colonias aisladas de cada cepa, se tomaron de 4 a 5 colonias a disolver en tubos de ensayo con solución salina al 0.9% los cuales se verificó su densidad midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro a 625 nm, la cual tenía que estar en el rango 0.018 a 0.13 equivalente al estándar McFarland de 0.5 (1×10^8 a 2×10^8 CFU/mL).

Con los estándares ajustados se inocularon por césped 5 cajas Petri estériles con agar MH empleando hisopos de algodón estériles por cada microorganismo. Seguido se añadieron los discos de papel filtro Whatman No. 1 de 6 mm con 10 μ L de cada extracto y sus respectivas diluciones, para los controles negativos y positivos se emplearon 3 cajas Petri. Posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C.

Después de 24 h de incubación se revisaron las cajas Petri inoculadas a contraluz para identificar las muestras que presentaron formación de halos de inhibición, aquellas que presentaron se midió el halo por triplicado con un Vernier.

7.8.2 MICRODILUCIÓN EN CALDO

A partir de colonias aisladas de un cultivo de 24 h en una placa de agar de *S. aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (ATCC 43300) y *P. aeruginosa* (aislado clínico), se seleccionaron de 3 a 5 colonias y se colocaron con un asa en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo Müller-Hilton, se continuaron añadiendo colonias hasta alcanzar la turbidez de un estándar de 0.5 McFarland; posteriormente se introdujeron 2 mL de la suspensión en 38 mL de solución salina (dilución 1:20), quedando una concentración final de 5×10^5 CFU/mL, con ayuda de la micropipeta se tomaron 0.01 mL de la suspensión y se colocaron en cada pocillo del panel MIC. Los extractos de callo, plántula y planta silvestre se evaluaron a concentraciones de 500 μ g a 31.25 μ g/mL, los cuales se disolvieron en DMSO al 10% y después en caldo Müller-Hilton. Se utilizó como fármaco de referencia a la gentamicina a concentraciones de 40 μ g/mL a 0.15 μ g/mL. Para el control negativo se utilizó una solución de DMSO al 10% (v/v). El ensayo se hizo por duplicado y las placas se incubaron por 24 h a 37°C. Después se leyó la absorbancia con un sistema de multidetección Glomax a 600 nm.

7.9 COMPARACION DE PERFILES FITOQUÍMICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica que permite analizar y separar compuestos volátiles y semivolátiles. Con la meta de identificar compuestos en los extractos de los cultivos *in vitro* (hexano, acetato de etilo y metanol), una pequeña muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases HP Agilent Technologies 6890 equipado con un filtro de masa de cuadrupolo MSD 5973 (HP Agilent), equipado con una columna capilar HP-5MS (longitud: 30 m; diámetro interior: 0.25 mm; espesor de la película: 0.25 M). Se utilizó helio (He) como gas de arrastre (1 mL por min a flujo constante). La temperatura de entrada se ajustó a 250 °C, mientras que la temperatura del horno fue inicialmente a 40 °C (se mantuvo durante 1 min) y se aumentó a 280 °C/min. El espectrómetro de masas funcionó en modo de impacto electrónico positivo con energía de ionización de 70 eV. La detección se realizó en modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) y los picos se identificaron utilizando los iones de fragmentación. La determinación de la composición metabólica se realizó por comparación de identidad eligiendo aquellos compuestos que cumplieron con un factor de coincidencia $\geq 80\%$ de acuerdo con la base de datos NIST versión 17 (National Institute of Standards and Technology, siglas en ingles). Los compuestos identificados se registraron en una tabla considerando su abundancia relativa en función del área bajo la curva determinada por el equipo.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del seguimiento de la metodología descrita previamente se logró el cumplimiento de los objetivos pertinentes a este trabajo, en resumen, se presentan los principales hallazgos obtenidos de los cultivos *in vitro*, las evaluaciones biológicas y la

comparación fitoquímica de las líneas de plántulas y callo, así como la cinética de callo (Figura 7). En los siguientes apartados se describen de manera extensa los resultados.

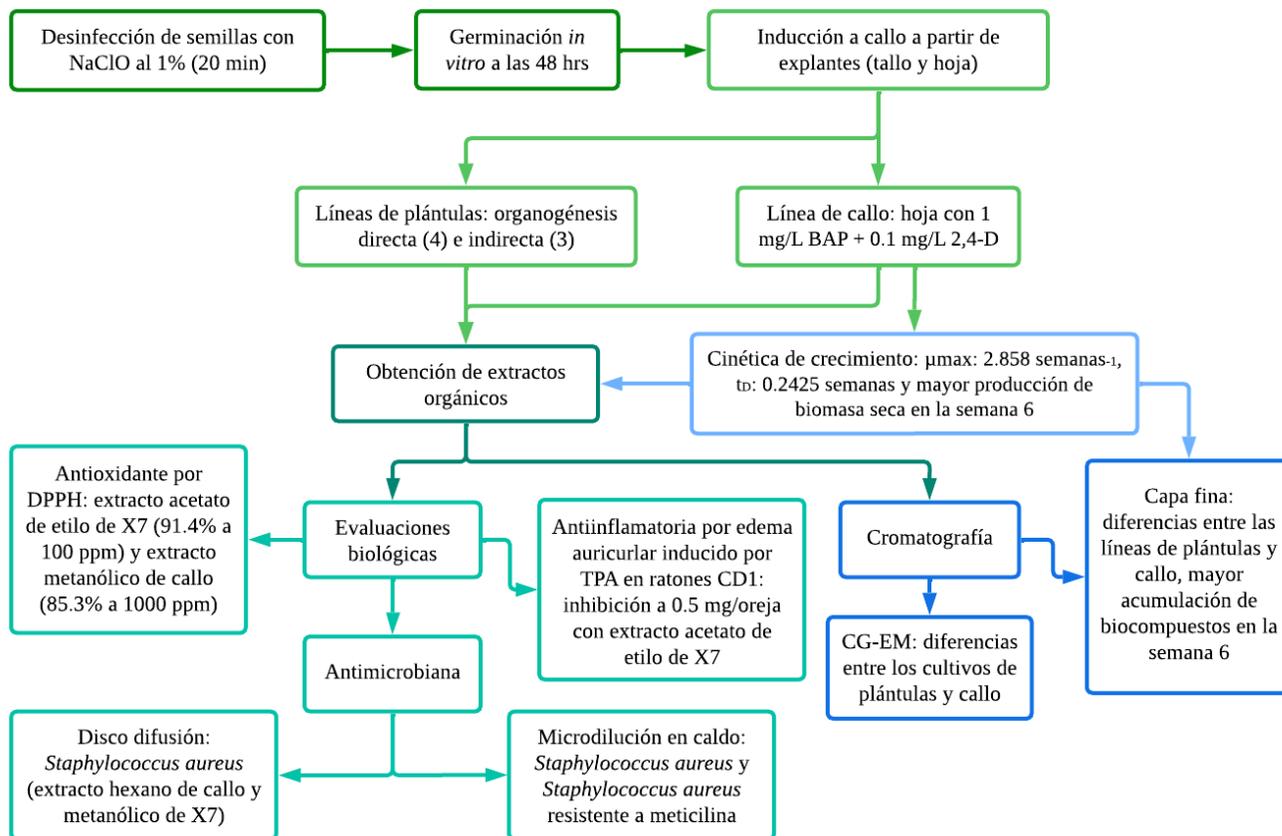


Figura 7. Resumen de los resultados.

8.1 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Se realizaron tres tratamientos para la desinfección de semillas (Tabla 3), los tres coincidían en el primer lavado de 30 segundos con 70% de etanol. Se observó que al realizar un lavado con 0.75% de hipoclorito de sodio a 15 min y consecutivamente los tres lavados de agua destilada (Método A), se contaminó todo el lote de semillas (Figura 8.a). Al aumentar la concentración al 1% de NaClO y el tiempo de lavado a 20 min (Método B), no se presentaba contaminación, posteriormente a las 48 h germinaban la mayoría de las semillas sembradas por unidad (Figura 8.b). El método C consistió en las mismas

condiciones que el anterior, a diferencia, se añadió un lavado con antifúngico al 1% durante 10 min, sin embargo, presentó contaminación en todo el lote de semillas. Por lo que se continuó ocupando el método B para germinar las semillas.

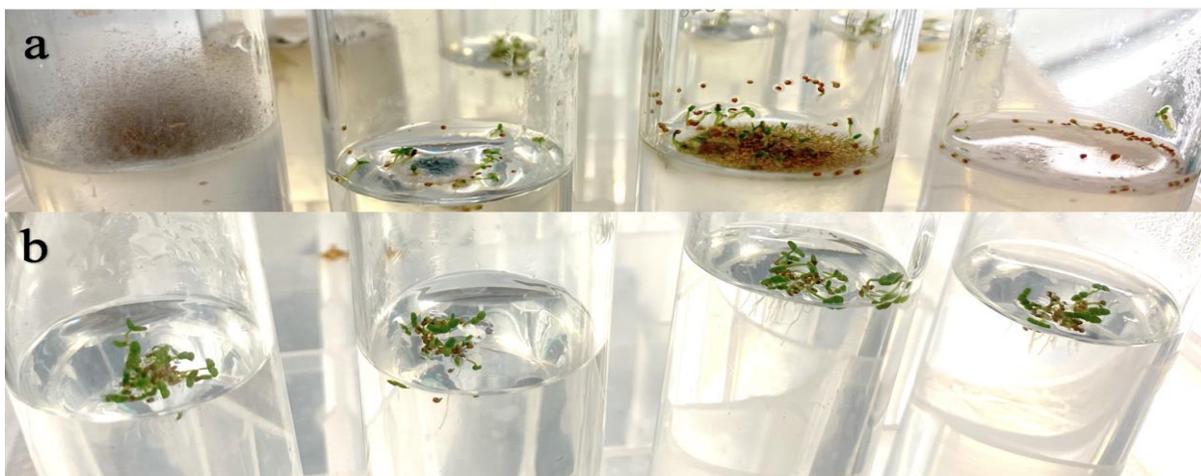


Figura 8. Desinfección de semillas de *L. octovalvis* después de 24 horas de cultivo. a) Lote con ausencia de contaminación (Método A). b) Lote con presencia de contaminación (Método B).

Estos resultados sugieren que la contaminación puede estar relacionada con la concentración y el tiempo de exposición con el hipoclorito de sodio, por lo que se propone que el aumento de estos parámetros favorece la ausencia de contaminación. De manera similar otros reportes de diferentes especies han demostrado la influencia del NaClO en la desinfección de semillas, por ejemplo, en la desinfección de semillas de *Lactuca sativa* se logró un 100% de inhibición de *Cercospora longissima* al emplear hipoclorito de sodio al 5% (Carmello & Cardoso, 2018); para la desinfección de semillas de *Melanoxylon brauna* se determinó que diferentes tiempos de inmersión del NaClO afectan en la contaminación, al máximo tiempo de exposición de 25 min se redujo significativamente la contaminación y se alcanzó la máxima germinación de un 51.88% (E. R. D. Silva et al., 2019). Por otro lado, el aumento de la concentración del hipoclorito de sodio afecta significativamente en la

germinación de las semillas junto con el crecimiento de las plántulas (Mohsen et al., 2012; Yildiz & Ekiz, 2014; Yildiz & Er, 2002),

8.2 PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLÁNTULAS

Se obtuvieron plántulas a partir de las semillas germinadas al segundo día , hasta la edad de 15 d se observó su mayor crecimiento, tanto de la longitud de tallo como de raíz, por lo que se subcultivaron cada 15 d en frascos de diferente tamaño (Figura 9), en los frascos tipo Gerber y de capacidad de 250 mL se observó el mayor crecimiento a las 3ra semana de ser subcultivadas, en los frascos Gerber se obtuvieron plántulas con tallo delgado y hojas pequeñas, pero en mayor cantidad, a diferencia de los de mediana capacidad, resultaron plántulas con hojas más grandes y tallos más gruesos.



Figura 9. Evolución por días de la germinación de semillas de *L. octovalvis*.

Al subcultivar las plántulas en frascos de 500 mL de capacidad se obtuvieron hojas más grandes y tallos más gruesos, además estas mostraron homogeneidad en el follaje con apariencia estable por un mes, por lo que se subcultivaron cada 4 semanas para incrementar la propagación y generar el material vegetal suficiente para la inducción a callogénesis (Figura 10).



Figura 10. Plántula cultivada en frasco de 500 mL.

8.3 INDUCCIÓN A CALLO

De las plántulas propagadas previamente, se utilizaron los explantes nodo y hoja para inducir la formación de callos. El abanico de tratamientos se muestra en la Tabla 5, las respuestas morfogénicas observadas fueron callogénesis y organogénesis (directa e indirecta) durante los 40 d de observación, en los siguientes apartados se describen y analizan los resultados de manera extensa.

8.3.1 EFECTO DE LOS RCV SOBRE EXPLANTES DE HOJA Y NODO

En la Tabla 6 se presentan los porcentajes de formación de callo y plántulas obtenidos con los diferentes tratamientos utilizados, así como la respuesta en ambos explantes (hoja y nodo). Al utilizar únicamente la fitohormona BAP a 0.1 mg/L con el explante nodo se formó un 25% de plántulas, mientras que con el explante hoja y 0.5 mg/L de BAP suministrado al

medio se obtuvieron ambas respuestas callogénesis (35%) y organogénesis (25 %) (Tabla 6). De manera similar, con 0.1 mg/L de BAP se obtuvo la formación de callos en *Beta vulgaris L.* utilizando explantes de cotiledones (Gürel et al., 2001), mientras que la aplicación única de esta fitohormona a 0.5 mg/L incrementó la formación de brotes en explantes de nódulos de *Aquilaria hirta* (Nor et al., 2011).

Por otra parte, KIN sola a las diferentes concentraciones evaluadas no presentó diferencias significativas, estos tratamientos fomentaron la formación de plántulas a un 30% con el explante nodo (Tabla 6). Análogamente, se obtuvo el 83% de regeneración de plántulas de *Cucumis sativus* con 1 mg/L de KIN (Abu-Romman et al., 2015); con raíces de *Quercus leucotrichophora L.* a la misma concentración de KIN se lograron tasas de multiplicación de 94.4% (Aseesh Pandey & Sushma, 2012); a partir de nodos de *Matthiola incana* con diferentes concentraciones de KIN (0.5-2 mg/L) se obtuvieron la formación de brotes y raíces (Hesar et al., 2011).

Únicamente a la concentración de 0.5 mg/L de ANA se observó respuesta de formación de plántulas con un 25% con el explante nodo (Tabla 6). A esta misma concentración se ha obtenido el aumento de raíces y plántulas con primordios foliares de plátano, (Hossain et al., 2016), también se obtuvo la máxima formación de raíces de *Punica granatum L.* (Murkute et al., 2004).

Por otra parte, el 2,4-D en ninguna de las concentraciones evaluadas dio respuestas de callogénesis ni organogénesis (Tabla 6). No obstante, en otras investigaciones se han obtenido líneas de cultivos de callo con mayores concentraciones de 2, 4-D, en el caso de *Cydonia oblonga* Mill. utilizaron el explante hoja y concentraciones de 2.5 y 5 mg/L para la formación de callo (Morni et al., 2000); también a 0.5-3 mg/L de 2,4-D obtuvieron porcentajes mayores del 88% de formación de callos de *Paspalum scrobiculatum L.* (P. Kaur

& Kothari, 2004). Por otra parte, a bajas concentraciones de esta fitohormona (0.2 mg/L) se obtuvieron porcentajes menores de 50% de generación de callo de *Triticum aestivum* L. (Zheng & Konzak, 1999); a su vez, a concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg/L de 2,4-D con hojas de *Allium sativum* se presentan porcentajes de callogénesis menores al 35% (M. A. Haque et al., 2003); al adicionar 0.8 mg/L de 2,4-D al medio MS con el explante tallo de *Launea taraxacifolia*, no presento respuesta de formación de callo, plántulas ni raíces (Ayobola et al., 2011). Estas investigaciones sugieren que las respuestas morfogénicas van a ser dependientes de las concentraciones de esta fitohormona junto con la especie que se esté evaluando.

La combinación de las fitohormonas BAP y 2,4-D favoreció la respuesta de callogénesis utilizando el explante hoja en todos los tratamientos evaluados, las mejores respuestas se presentaron con las combinaciones: 0.1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D (87.50%); 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D (95%); 0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D (95%) y 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D (90 %) (Tabla 6). Semejantemente otros estudios han establecido cultivos de callo con la combinación de estas fitohormonas a diferentes concentraciones (Andaryani et al., 2019; Fazeli-Nasab, 2018; N. K. Sharma et al., 2013; Sundarasekar et al., 2012).

Mientras que las combinaciones de BAP con ANA presentaron ambas respuestas, callogénesis con ambos explantes y organogénesis con el explante nodo. Análogamente, la combinación de los reguladores del crecimiento vegetal, fomentaron la proliferación de brotes por organogénesis indirecta de *Chenopodium quinoa* Willd. (Gethami & Sayed, 2020), De igual manera, promovieron la regeneración *in vitro* de *Prunella Vulgaris* (Rasool et al., 2009). También esta combinación favoreció la inducción de callos de *Lilium longiflorum* con respuestas mayores al 80% (Lestari et al., 2019); al igual que con hojas de

Catharanthus roseus se obtuvieron callos compactos con estos RCV a diferentes concentraciones (Rahman et al., 2019).

En cuanto a las combinaciones de KIN con 2,4-D fomentaron mayoritariamente la formación de callo con el explante hoja en las combinaciones: 0.1 mg/L KIN + 0.5 mg/L 2,4-D; 0.1 mg/L KIN + 1 mg/L 2,4-D; 0.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L 2,4-D; 0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L 2,4-D y 0.5 mg/L KIN + 1 mg/L 2,4-D (Tabla 6). Asimismo, el uso de estas fitohormonas en diferentes proporciones adicionadas en los medios de cultivo han facilitado la inducción a callo con el explante hoja de diferentes especies (Handayani et al., 2019; Hunaish & Almasoody, 202d. C.; Karimian et al., 2014; Sidek et al., 2022).

Finalmente, las fitohormonas KIN y ANA a diferentes concentraciones favorecieron la respuesta de organogénesis con ambos explantes, sin embargo, el explante nodo fue presente en más tratamientos con respuesta (Tabla 6). Entre estos los mejores tratamientos fueron con 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (83.33%, hoja) y 1 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA con ambos explantes hoja (58.33%) y nodo (50%). La interacción de estos RCV en otros estudios ha mostrado tener una respuesta positiva ante la propagación de plántulas a partir de distintos explantes (Kaviani, 2014; Kaviani et al., 2011; Nazirwan et al., 2020; Okere & Adegeye, 2011).

Tabla 6. Efectos de los reguladores de crecimiento vegetal en la respuesta morfogénica de hojas y segmentos nodales de *L. octovalvis*.

RCV	(mg/L)	Hoja		Nodo	
		Callo	Plántula	Callo	Plántula
0	0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 0.00 d
BAP	0.5	35.00 ± 13.60 bc	25.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e

KIN	0.1	30.00 ± 11.18 cd	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	30.00 ± 0.00 cd
	0.5	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	37.50 ± 12.50 bc
	1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	30.00 ± 11.18cd
ANA	0.1	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.5	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 0.00 d
	1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
2,4-D	0.1	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.5	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
BAP/2,4-D	0.1/0.1	87.50 ± 12.50 a	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1/0.5	30.00 ± 11.18 cd	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1/1.0	95.00 ± 11.18 a	0.00 ± 0.00 f	5.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 e
	0.5/0.1	30.00 ± 11.18 cd	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.5/0.5	95.00 ± 11.18 a	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.5/1.0	35.00 ± 13.69 bc	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/0.1	90.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/0.5	37.50 ± 12.50 bc	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/1.0	41.00 ± 12.45 bc	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	BAP/ANA	0.1/0.1	00.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c
0.1/0.5		0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
0.1/1.0		0.00 ± 0.00 e	65.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
0.5/0.1		0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
0.5/0.5		0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
0.5/1.0		0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	25.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 e
1.0/0.1		0.00 ± 0.00 e	16.00 ± 7.83 e	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
1.0/0.5		50.00 ± 0.00 b	37.50 ± 12.50 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
1.0/1.0		100.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e

	0.1/0.1	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1/0.5	17.50 ± 6.85 d	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1/1.0	37.50 ± 12.50 bc	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.5/0.1	37.50 ± 12.50 bc	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
KIN/2,4-D	0.5/0.5	33.33 ± 10.21 bcd	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.5/1.0	37.50 ± 12.50 bc	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/0.1	0.00 ± 0.00 e	33.33 ± 10.21 cd	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/0.5	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1/0.1	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	40.00 ± 0.00 b
	0.1/0.5	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	0.1/1.0	0.00 ± 0.00 e	25.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 0.00 d
	0.5/0.1	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	31.25 ± 10.83 cd
KIN/ANA	0.5/0.5	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	25.00 ± 0.00 d
	0.5/1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	25.00 ± 0.00 a	30.00 ± 11.18 cd
	1.0/0.1	0.00 ± 0.00 e	58.33 ± 10.21 b	0.00 ± 0.00 c	50.00 ± 0.00 a
	1.0/0.5	0.00 ± 0.00 e	83.33 ± 10.21 a	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e
	1.0/1.0	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 e

* RCV= Regulador de crecimiento vegetal. Los datos representan media ± desviación estándar. Los valores con las mismas letras en las columnas no son estadísticamente diferentes según la prueba múltiple de rangos de Tukey a un 95% de confianza.

Todos estos resultados corroboran que dependiendo de la combinación y proporción de auxinas y citoquininas expuestas a un tejido vegetal van a determinar el grado de organogénesis y callogénesis, a su vez estos parámetros dependen de cada especie evaluada. En particular para *L. octovalvis* principalmente la combinación de BAP con 2,4-D favorece la inducción de callo en hojas, mientras que KIN y ANA favorecen la formación de plántulas con segmentos nodales.

8.3.2 EFECTO DE LOS RCV SOBRE LA CALLOGÉNESIS

A partir de los tratamientos que mostraron los mayores porcentajes de inducción a callo (Tabla 7), se continuo con su subcultivo; sin embargo, la mayoría no fueron reproducibles, en el caso de los tratamientos T1, T2, y T3 se obtuvieron callos de tonalidad café oscuro que se oxidaban al subcultivarlos, a su vez el tratamiento T5 formo callos verdes que no eran friables; por otra parte, únicamente el tratamiento T4 genero callos beige friables y reproducibles a largo plazo.

Tabla 7. Tratamientos que presentaron callogénesis.

Clave	Tratamiento	% de formación	Tipo de callo
T1	0.1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D	87.50 ± 12.50	Café oscuro
T2	0.1 mg/L BAP + 1 mg/L 2,4-D	95.00 ± 11.18	Café oscuro
T3	0.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D	95.00 ± 11.18	Café oscuro
T4	1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D	90.00 ± 0.00	Café con verde
T5	1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA	100.00 ± 0.00	Verde

Después de 6 subcultivos se logró estabilizar la línea de callos T4, resultando callos beige friables (Figura 11). De manera similar la literatura reporta callos viables a largo plazo con 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D inducidos con explantes de ganglios de *Vitis vinifera L.* (Pehlivan et al., 2017). Sin embargo, la inducción de callos de *Eleusine coracana* con las mismas fitohormonas, concentraciones y explante no mostró respuesta de callogénesis (Venkatesan et al., 2022). Con respecto a la familia Onagraceae se han reportado cultivos de callos de *Oenothera hookeri* y *O. picensis* con 2 mg/L 2,4-D + 2 mg/L ANA (Martínez & De Halac, 1997). Para *Oenothera biennis L.* se utilizó la combinación 0.25 mg/L 2, 4-D + 1 mg/L KIN (Faramarzi Hafez et al., 2016) . En el caso de *Lopezia racemosa* se estableció el cultivo de callos con 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP (Salinas et al., 2014). De modo que

las concentraciones y combinación de los RCV para la inducción de callo son independientes de cada especie.

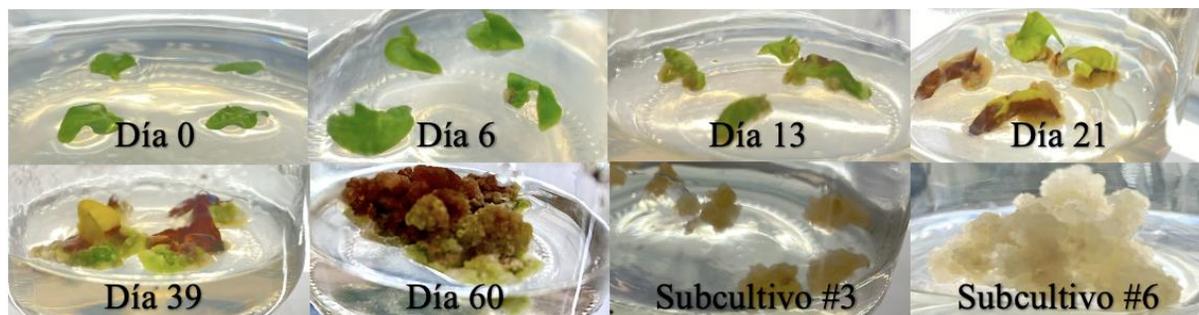


Figura 11. Desarrollo de callo en explante de hoja con 1 mg/L de BAP con 0.1 mg/L de 2,4-D.

Una vez establecido el cultivo de callos se realizaron varios subcultivos hasta obtener suficiente biomasa para llevar a cabo la cinética con la finalidad de identificar la semana de producción máxima de biomasa y compuestos por CCF. Posteriormente de su determinación, se continuo el subcultivo hasta obtener suficiente biomasa cosechada a la semana máxima de producción para conocer el perfil fitoquímico de los extractos de esta línea de callos.

8.3.3 EFECTO DE LOS RCV SOBRE LA ORGANOGÉNESIS

Partiendo de los tratamientos que formaron plántulas (Tabla 6), se clasifico el tipo de organogénesis por la morfología que presentaron; además, de todos los tratamientos con esta respuesta se seleccionaron únicamente los que mostraron diferencias morfológicas con la plántula obtenida sin RCV, es decir que fueron aquellas plántulas que presentaron diferencias en la coloración, grosor del tallo, tamaño de hojas y presencia de callo (Figura 12).

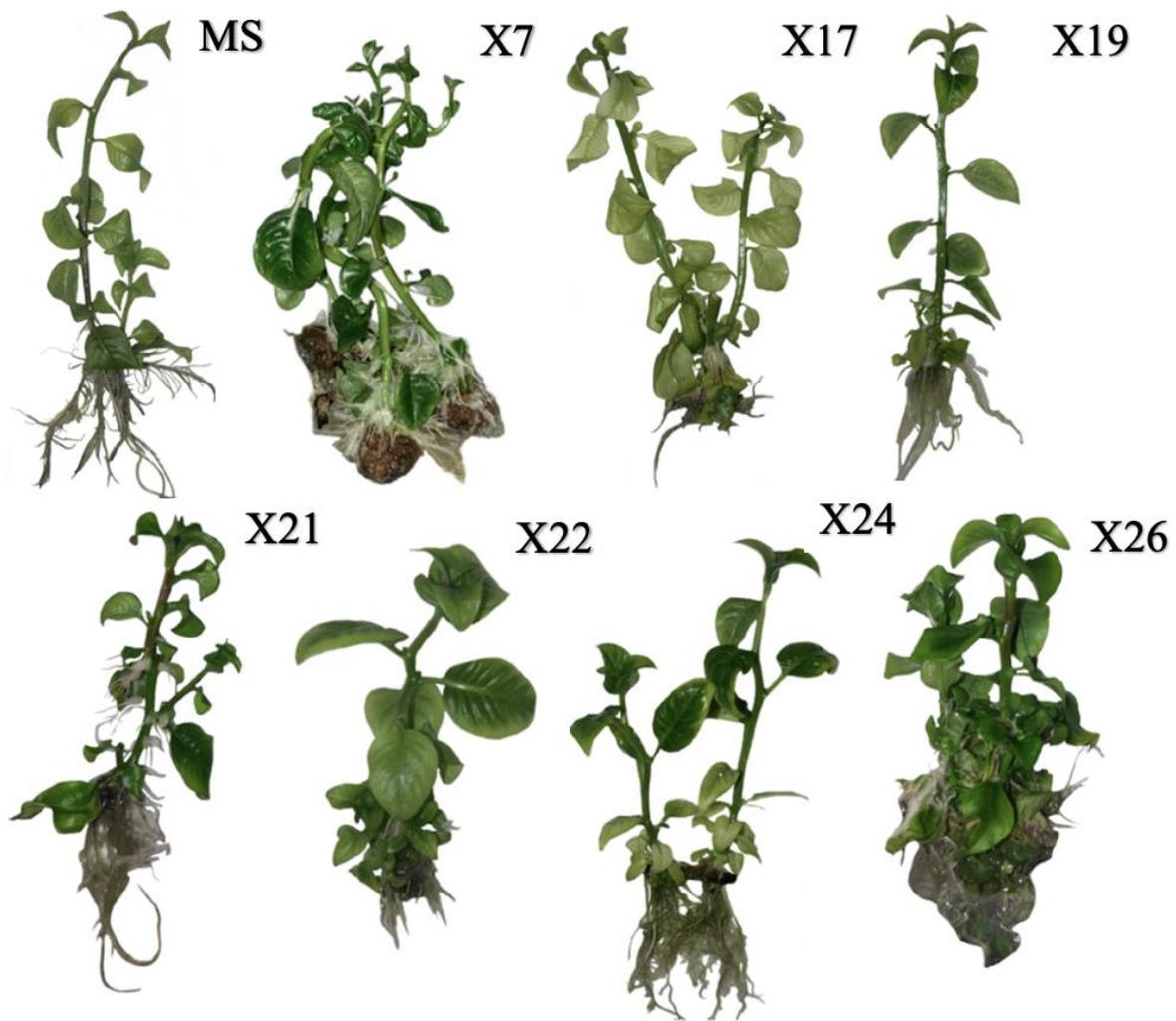


Figura 12. Aspecto de plántulas cultivadas en diferentes medios de cultivo con RCV. MS: Sin RCV, X7: 0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA. X17: 0.1 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA. X19: 0.1 mg/L KIN + 1 mg/L ANA. X21: 0.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA. X22: 0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA. X24: 1 mg/L KIN. X26: 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA.

De los cuales cuatro tratamientos formaron plántulas por organogénesis directa y tres tratamientos de manera indirecta (Tabla 8), entre estos el explante nodo destacó mayoritariamente en estos tratamientos y favoreció la organogénesis directa en cuatro tratamientos (X17, X19, X21 y X24) e indirecta en X22. Con el explante hoja se presentó la organogénesis indirecta en dos tratamientos (X7 y X26) y solo uno (X19) de forma directa. Análogamente la literatura reporta que el nodo en comparación con la hoja favorece la regeneración *in vitro* de diferentes plantas en presencia de la fitohormona ANA con

diferentes citoquininas; por ejemplo, en la propagación de *Hylecereus undatus* los tallos mostraron mayor capacidad de regeneración que el explante hoja al adicionarse 0.1 mg/L ANA + 2.5 mg/L BAP al medio (Dahanayake & Ranawake, 2012); la mayor frecuencia de regeneración de brotes (100%) se presentó con tallos de *Brassica alboglabra* Bailey en comparación con explantes de cotiledones e hipocótilos con 2 mg/L BAP en combinación con 1 mg/L ANA, o 4 mg/L 2iP con 0.5 mg/L ANA (Pua et al., 1989). Sin embargo, las concentraciones de citoquininas y auxinas van a diferir de una especie a otra para poder alcanzar tasas efectivas de multiplicación (Gomes et al., 2010).

Tabla 8. Tratamientos que presentaron organogénesis.

Clave	Combinación de RCV	% de formación	Explante	Tipo de organogénesis
X7	0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA	65.00 ± 0.00 b	Hoja	Indirecta
X17	0.1 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA	40.00 ± 0.00 c	Nodo	Directa
X19	0.1 mg/L KIN + 1 mg/L ANA	25.00 ± 0.00 d	Hoja/Nodo	Directa
X21	0.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA	31.25 ± 10.83 cd	Nodo	Directa
X22	0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA	25.00 ± 0.00 d	Nodo	Indirecta
X24	1 mg/L de KIN	30.00 ± 11.18 c	Nodo	Directa
X26	1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA	83.33 ± 10.21 a	Hoja	Indirecta

Los datos representan media ± desviación estándar. Los valores con las mismas letras en las columnas no son estadísticamente diferentes según la prueba múltiple de rangos de Tukey a un 95% de confianza.

8.3.4 ORGANOGÉNESIS DIRECTA

Los tratamientos X17, X21 y X24 no presentaron diferencias significativas, por lo que a diferentes concentraciones de KIN y ANA (presente o ausente) con el explante nodo se obtiene la misma respuesta de formación de plántulas de *L. octovalvis* por organogénesis directa (Tabla 8); la menor respuesta se obtuvo con X19 con un 25% de formación con ambos explantes. A pesar de que la mayoría de estos tratamientos no mostraron diferencias en

cuanto al % de formación, morfológicamente si presentaron diferencias (Figura 13). El tratamiento X17 generó plántulas con mayor cantidad de hojas de tonalidad verde claro y una menor formación de raíces; X19 presentó menor cantidad de hojas de una tonalidad verde; el tratamiento X21 mostró mayor formación de raíces e incluso presencia de raíces adventicias, su tallo era ligeramente más grueso que las otras variaciones y su pigmentación era de un verde más oscuro que las demás; en el caso de X24 se formaron hojas variegadas con la combinación de verde lima con un verde ligeramente oscuro.



Figura 13. Plántulas obtenidas por organogénesis directa.

Las diferencias morfogénicas pueden deberse a las múltiples funciones de las auxinas, tales como su capacidad para controlar la iniciación de hojas en el meristemo, la formación de tejido vascular durante la venación de la hoja, estimular la formación de raíces, guiar las respuestas trópicas y organizar los patrones tisulares dentro del embrión en desarrollo (Novak et al., 2014; Vanneste & Friml, 2009). Mientras que los bajos porcentajes de formación podrían atribuirse a las bajas concentraciones de citoquininas utilizadas, ya que estas desempeñan un papel fundamental en la regeneración de brotes (Šmeringai et al., 2023).

De manera similar, para *Artemisia scoparia* con 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA se obtuvo un 90% de organogénesis directa que generó múltiples brotes con hojas de color verde claro, con 2 mg/L KIN + 1 mg/L ANA se formaron un 18.1% de brotes con abundantes hojas verdes, y con 2 mg/L KIN se generaron brotes largos con hojas pequeñas (Aslam et al., 2006); en el caso de *Phalaenopsis Golden Peoker* se obtuvieron brotes por organogénesis directa con 2 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA con 6.15 brotes por planta (Cruz et al., 2023).

8.3.5 ORGANOGÉNESIS INDIRECTA

Los tratamientos X7, X22 y X26 lograron la regeneración de plántulas por organogénesis indirecta, de acuerdo a su % de formación (Tabla 8) los tres tratamientos fueron estadísticamente diferentes, la mejor respuesta con el 83.33% se obtuvo con 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (X26) con el explante hoja, este tratamiento durante los días 13 a 21 presento la formación de callos y brotes, al día 21 ya se presentaban plántulas (Figura 14.a). Con esta combinación también se logró la propagación de manera indirecta de *Cucumis sativus* con el explante hoja con un 45.54% de regeneración de brotes (Alam et al., 2019); para *Coccinia grandis* (L.) Voigt se obtuvo un 90% de regeneración de brotes por organogénesis indirecta con 0.1 mg/L ANA+ 1 mg/L BAP + 1 mg/L KIN (Thiripurasundari & Rao, 2012).

La menor respuesta fue con 0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (X22) con un 25% de formación a partir de segmentos nodales, en los cuales al día 6 ya presentaban la formación de callos, posteriormente al día 21 se observaron los primeros brotes y finalmente a los 39 d ya se formaba la plántula (Figura 14.b). Por otra parte, al utilizar este tratamiento en explantes de puntas de brotes de *Eustoma grandiflorum* se generaron 1.48 brotes por plántula, sin embargo, se formaron por organogenesis directa (Kaviani, 2014).

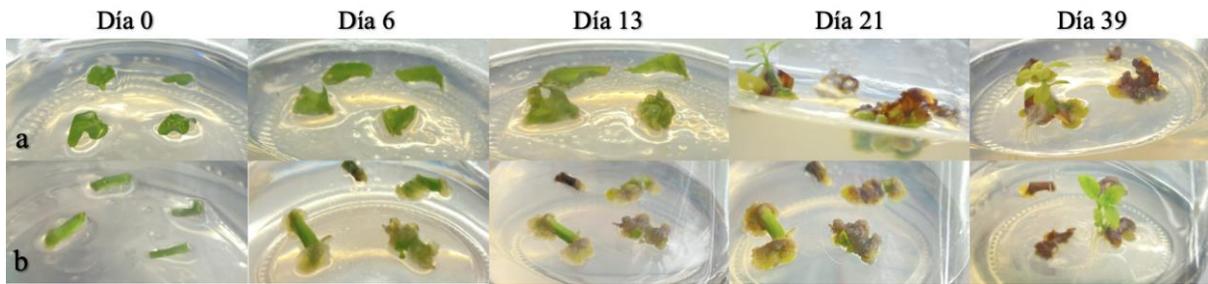


Figura 14. Evolución de la organogénesis indirecta en explantes de hoja y nodo tratados con RCV. a) 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (X26). b) 0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA (X22).

En cuanto a las diferencias morfogénicas de estos tratamientos, se puede observar en la figura 15, que los tratamientos X22 y X26 generaron plántulas con hojas más grandes, mientras que el tratamiento X7 estimuló la elongación de los tallos y una mayor abundancia de hojas. Cabe destacar que el tratamiento X7 presentó la concentración más alta de auxina, es decir 1 mg/L ANA, por lo que la elongación podría ser consecuencia de esta, ya que las auxinas influyen en la elongación de tallos (Gallavotti, 2013). Las otras variaciones presentaron la misma concentración de 0.5 mg/L ANA, por lo cual presentan más similitudes morfológicas, sin embargo, las diferencias entre las concentraciones de citoquininas difiere, siendo mayor en X26 con 1 mg/L KIN, este aumento podría ser la causa de que el tratamiento formara callos más notables y que la pigmentación sea ligeramente más intensa en las hojas y tallo que en los otros tratamientos, debido a que las citoquininas participan en el control de la división celular, el desarrollo de cloroplastos, la diferenciación de yemas y la iniciación de brotes (Brault & Maldiney, 1999).



Figura 15. Plántulas obtenidas por organogénesis indirecta.

8.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CALLOS

Para determinar la curva de crecimiento de la línea de callos obtenida con 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D, se utilizaron como parámetros el peso de la biomasa fresca y seca por cada semana, a su vez se realizó el seguimiento fotográfico de cada punto de la cinética (Figura 16). Como se puede observar en la curva de crecimiento la fase de adaptación ocurrió en la semana cero, a partir de la primera semana se observó el crecimiento exponencial hasta la sexta semana, en esa misma semana se obtuvo el pico más alto de producción de biomasa seca de 36.96 ± 3.24 g/L con un índice de crecimiento de 15.46, posteriormente hubo una desaceleración en las semanas siguientes que se mantuvo estable lo que es un indicativo de la fase estacionaria con índices de crecimiento que fluctuaban de 12.75 a 13.01.

Además, la morfología de los callos mostró cambios durante las diferentes etapas, en la Figura 16.c se observa que en el transcurso de la fase de crecimiento no hay cambios en la coloración de los callos permaneciendo su apariencia beige, sin embargo, hacia la sexta

semana los callos comenzaron a oscurecerse ligeramente, finalmente en la fase estacionara comenzaron a oxidarse los callos gradualmente hasta presentar una apariencia marrón.

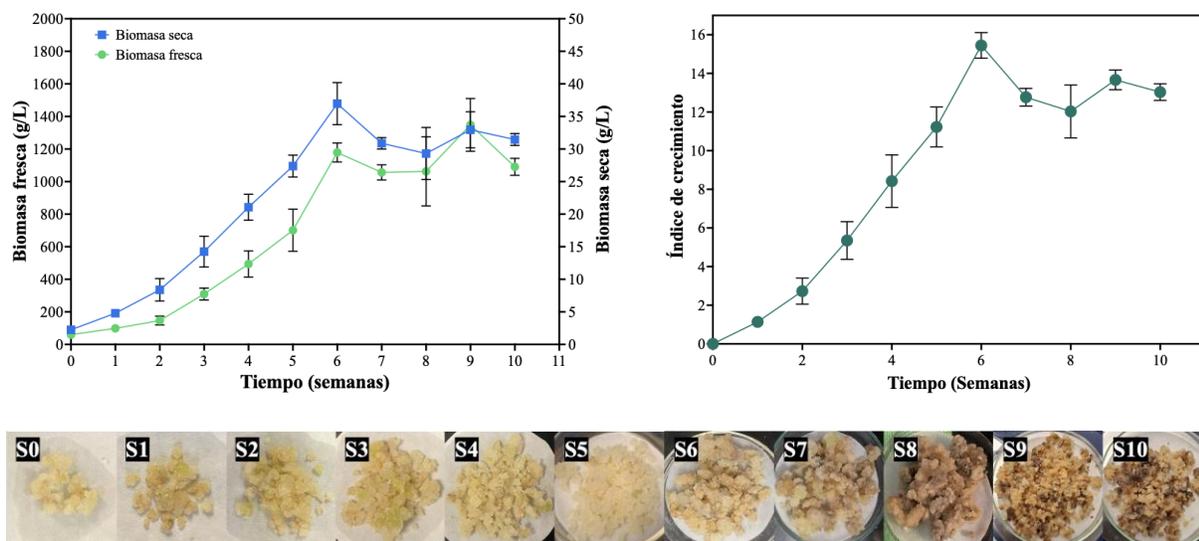


Figura 16. Perfil de crecimiento del callo beige de *L. octovalvis* en medio MS suplementado con 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D. a) Curva de crecimiento. b) Índice de crecimiento c). Evolución semanal. Los valores representan la media \pm desviación estándar con $n=3$.

A partir de la fase de crecimiento se determinó la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) la cual fue de 0.42 semana^{-1} (2.98 d^{-1}) correspondiente a un tiempo de duplicación de 1.66 semanas (11.67 d) (Figura 17). En otras investigaciones se han obtenido diferentes tiempos de duplicación, por ejemplo, en los cultivos de callo de *Taxus baccata* este fue de 9.6 d (Mihaljević et al., 2002), en suspensiones celulares de *Centella asiática* fue de 4.7 d (Omar et al., 2006) y en cultivos de raíces adventicias de *Panax ginseng* fue de 5.69 d (Le et al., 2019); por lo que este parámetro podría variar en los diferentes tipos de cultivos *in vitro*, así como en las especies de las que provienen estos cultivos.

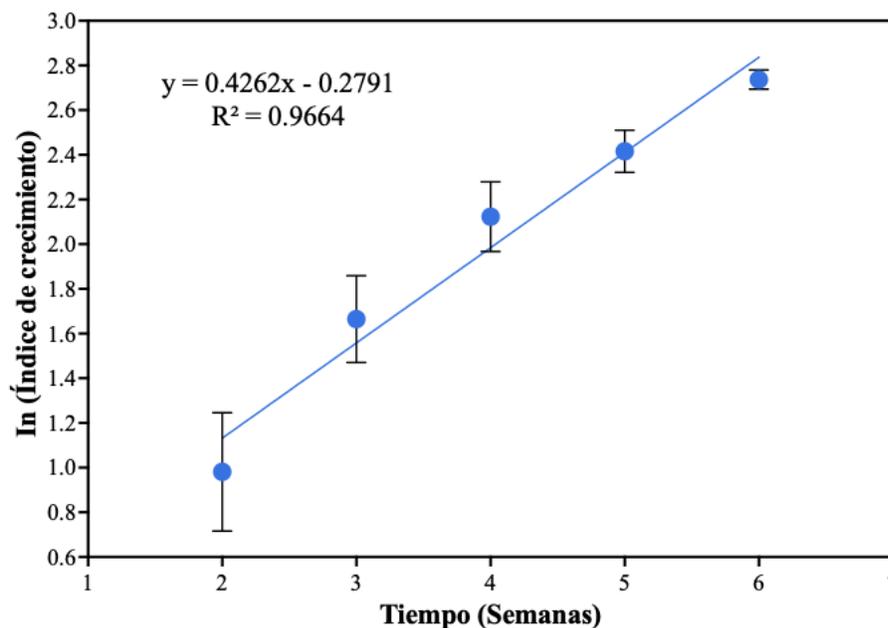


Figura 17. Curva de crecimiento exponencial con regresión lineal.

8.4.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE CINÉTICA DE CALLOS

La biomasa de cada punto de la cinética fue extraída con los solventes hexano, acetato de etilo y metanol. Los compuestos de los cultivos principalmente son de baja polaridad, debido a que los extractos de hexano muestran mayor abundancia en las cromatoplasas. Mientras que el extracto de acetato de etilo muestra compuestos de polaridad intermedia en poca abundancia. Por otra parte, los extractos metanólicos acumulan compuestos con apariencia de azúcares.

Se obtuvieron las siguientes cromatoplasas para cada extracto (hexano, acetato de etilo y metanol), utilizando diferentes sistemas de dilución que iban de menor a mayor polaridad (Figura 18). En las cuales se observó que en la semana seis se produce una mayor variedad de compuestos bioactivos que absorben la luz ultravioleta en onda corta y larga, en cada uno de los extractos obtenidos. Esto podría estar asociado al crecimiento, ya que en la sexta semana se presentó la mayor producción de biomasa seca, después en la fase

estacionaria (semana 7 a 10) se puede contemplar la disminución de algunos compuestos activos, lo cual corrobora que esta producción de compuestos esta asociada al crecimiento y no al estrés oxidativo por la reducción de nutrientes.

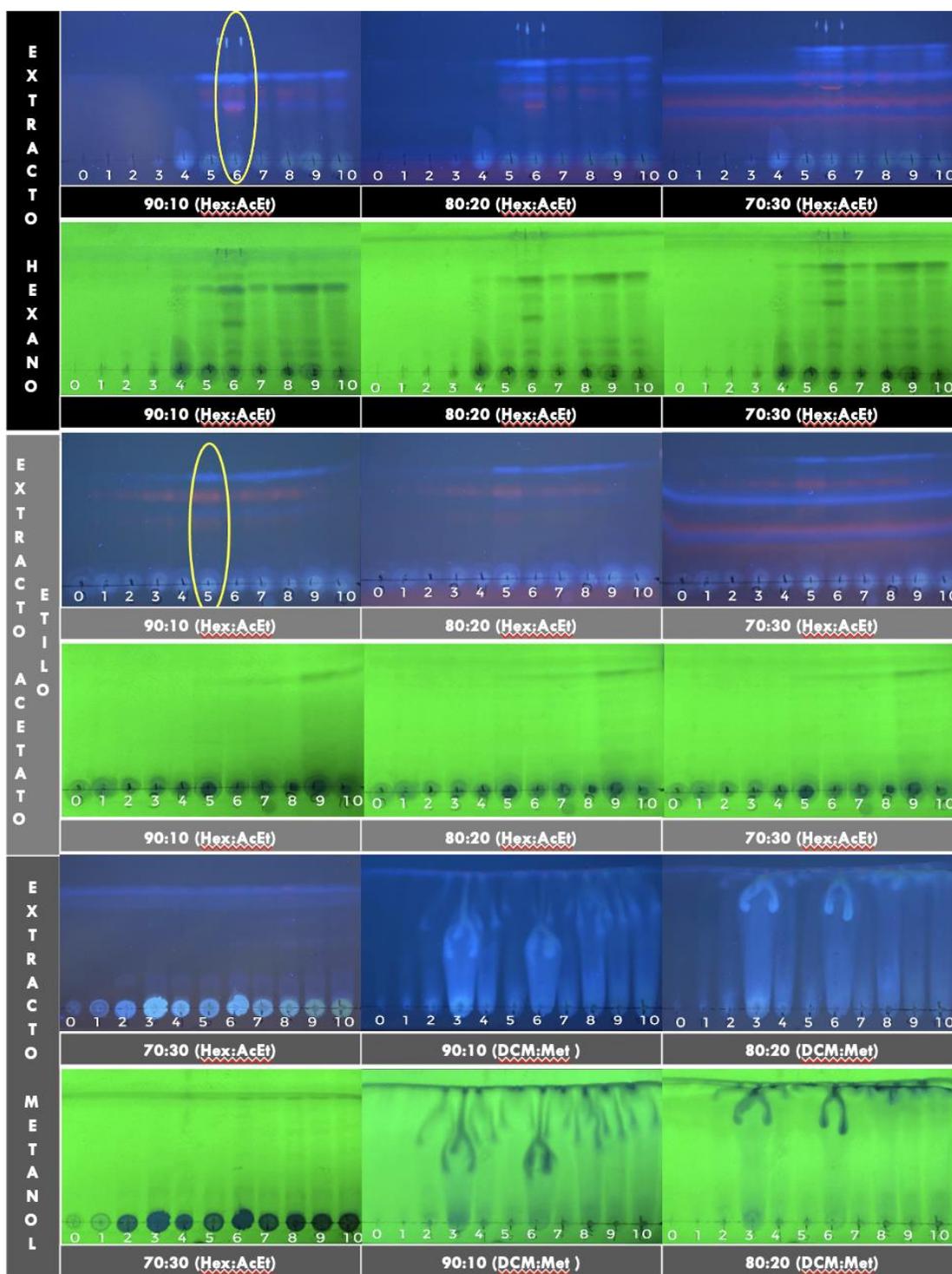


Figura 18. Perfiles cromatográficos de biomasa de la cinética de crecimiento de callos de *L. octovalvis*.

8.5 EXTRACTOS ORGÁNICOS DE PLÁNTULAS

Las plántulas provenientes de los 7 tratamientos de organogénesis (directa: X17, X19, X21 y X24; indirecta: X7, X22 y X26) se subcultivaron continuamente hasta generar 5 g de biomasa seca, y se obtuvieron sus extractos en polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol) con la finalidad de comparar los perfiles fitoquímicos y asociar los compuestos químicos al fenotipo.

La Tabla 9 muestra que los rendimientos de los extractos difieren entre los tratamientos, siendo de manera general el extracto metanólico el más abundante, seguido del acetato de etilo y hexano, respectivamente. Lo cual sugiere que las plántulas biosintetizan compuestos de polaridad alta principalmente.

Tabla 9. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de las variaciones de plántulas.

Clave	Tratamiento	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
MS	Control (sin RCV)	4.40%	10.97%	22.35%
X7	0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA	0.90%	8.75%	16.21%
X17	0.1 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA	1.36%	19.15%	15.17%
X19	0.1 mg/L KIN + 1 mg/L ANA	1.11%	12.60%	14.35%
X21	0.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA	1.13%	3.55%	25.88%
X22	0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA	1.26%	4.02%	20.64%
X24	1 mg/L KIN	1.17%	3.47%	26.97%
X26	1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA	0.60%	4.29%	34.80%

Particularmente en los extractos de hexano, el tratamiento MS (el control) presentó el mayor rendimiento con este solvente de 4.40%, mientras que los tratamientos con RCV

mostraron rendimientos que oscilaban de 0.6 a 1.36%, esto da indicativo a que la presencia de estas fitohormonas está asociada a la disminución de compuesto de menor polaridad. En el caso de los extractos con acetato de etilo, se obtuvo el máximo rendimiento con el tratamiento X17 con un 19.15%. Por otra parte, disminuyeron los rendimientos de las plántulas al aumentar la concentración de las auxinas y citoquininas en el medio, esto podría estar relacionado a la producción de compuestos de mediana polaridad. Finalmente, la mayor extracción de compuestos se obtuvo con el tratamiento X26 con un rendimiento de 34.80%, por lo que esta combinación de fitohormonas favorece la producción de compuestos de alta polaridad. Como se ha mencionado estas fluctuaciones en los rendimientos de los extractos podrían atribuirse a los RCV, ya que estos influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, por ejemplo las auxinas pueden regular las vías metabólicas secundarias de las plantas, como el metabolismo del fenilpropanol, flavonoides y antocianinas (Simões et al., 2009), en el caso de las citoquininas su aplicación exógena presenta un factor determinante en la producción mono y sesquiterpenoides (Danova et al., 2018).

8.6 PERFILES CROMATOGRÁFICOS POR CCF

Las cromatoplasmas de los extractos con hexano muestran que las plántulas acumulan compuestos similares, predominantemente eluatos de baja y mediana polaridad, Esto se debe a que, al aumentar la polaridad del eluyente, se favorece la visualización del contenido fitoquímico de las muestras. Cabe destacar que los tratamientos presentan, tanto en onda larga como corta, una mayor abundancia de compuestos en comparación con el control (MS sin RCV). Además, las cromatoplasmas indican que los tratamientos X22 y X24 acumulan compuestos únicos que no se encuentran en los demás tratamientos (Figura 19).

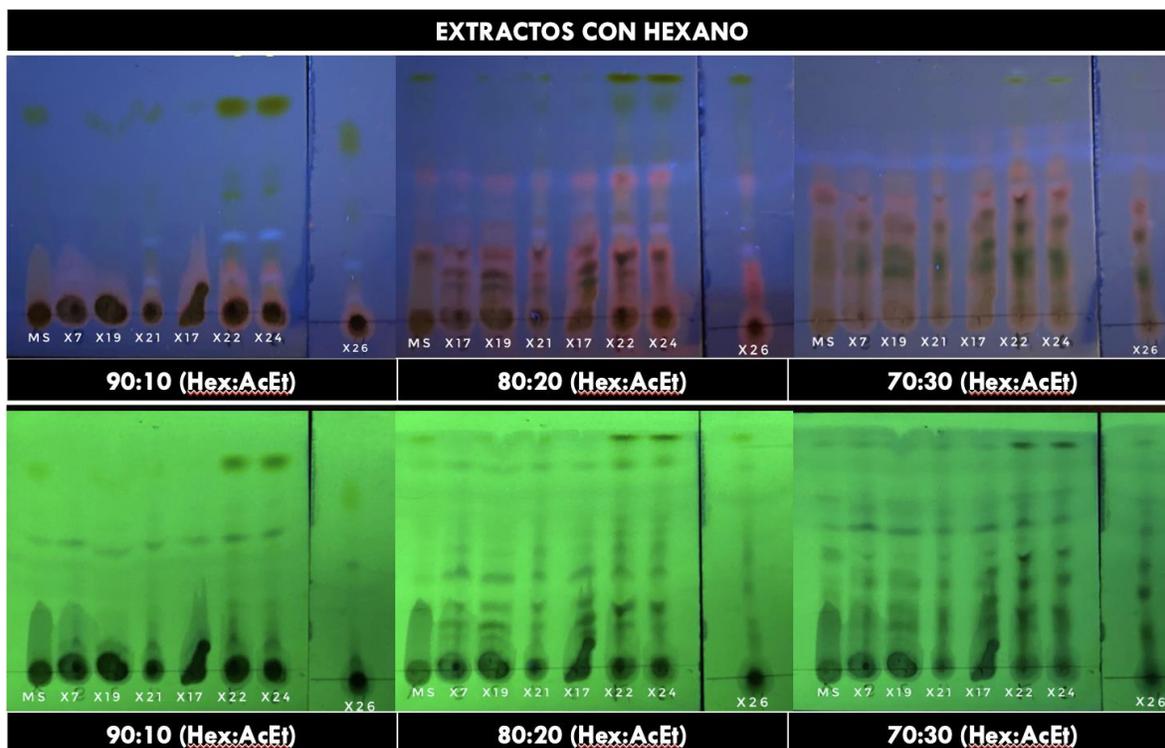


Figura 19. Cromatografía en capa fina de las variaciones de plántulas obtenidas con el solvente Hexano, a diferentes sistemas de dilución. Hex: hexano. AcEt: acetato de etilo.

En cuanto a los extractos de acetato de etilo, como se observa en la Figura 20, las plántulas almacenan compuestos afines, siendo la mayoría eluatos de polaridad mediana a alta, ya que, al aumentar la polaridad del eluyente, se facilita la visualización del contenido fitoquímico de las variaciones. Tanto en onda larga como en onda corta, los extractos con RCV son similares al control, excepto por las muestras X21, X22 y X24, los cuales en onda corta revelan compuestos ausentes en los demás tratamientos.

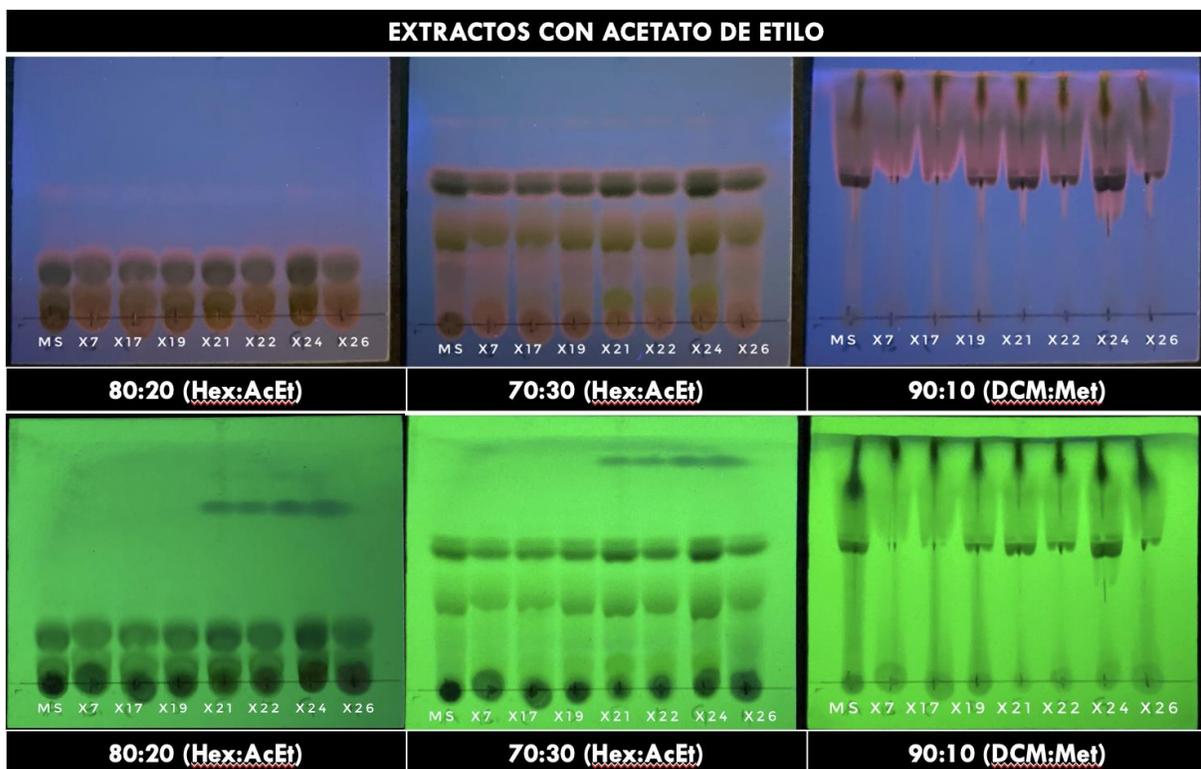


Figura 20. Cromatografía en capa fina de las variaciones de plántulas obtenidas con el solvente acetato de etilo, a diferentes sistemas de dilución. Hex: hexano. AcEt: acetato de etilo. DCM: diclorometano. Met: metanol.

Finalmente, las cromatoplasmas de los extractos metanólicos (Figura 21) evidencian que las plántulas, tanto con fitohormonas adicionadas al medio como su ausencia, acumulan compuestos semejantes de polaridad alta.

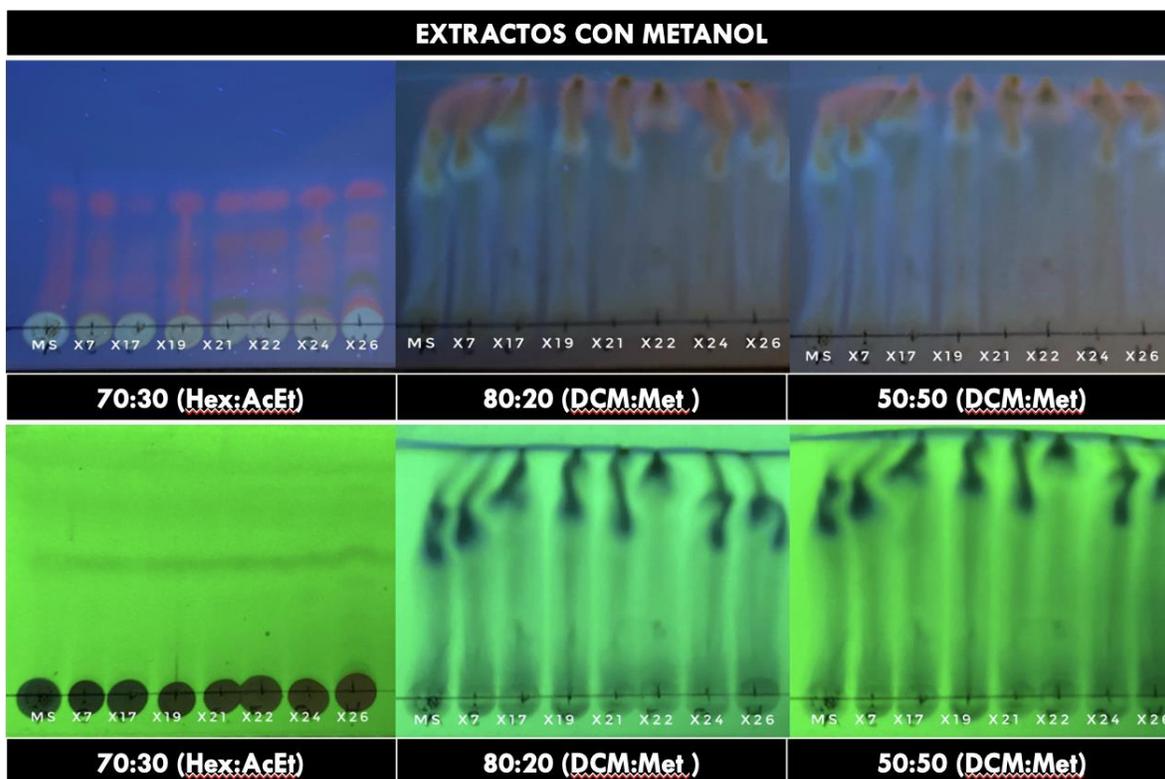


Figura 21. Cromatografía en capa fina de las variaciones de plántulas obtenidas con el solvente metanol, a diferentes sistemas de dilución. Hex: hexano. AcEt: acetato de etilo. DCM: diclorometano. Met: metanol.

8.7 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS POR CG-EM

Se analizó el perfil cromatográfico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los extractos de cultivos *in vitro* (hexano, acetato de etilo y metanol), de los cuales se encontraron compuestos reportados con actividades biológicas, lo que sustenta las actividades biológicas identificadas en nuestro estudio. Los resultados están basados en una similitud superior al 80% de acuerdo con la librería NIST. Los cromatogramas de todas las muestras evaluadas se encuentran en el Anexo 11.2. Las claves de las muestras analizadas se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Claves de las diferentes muestras analizadas.

Clave	Tratamiento	Tipo
MS	Control (Sin RCV)	Plántula

X7	0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA	Plántula
X17	0.1 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA	Plántula
X19	0.1 mg/L KIN + 1 mg/L ANA	Plántula
X21	0.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L ANA	Plántula
X22	0.5 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA	Plántula
X24	1 mg/L KIN	Plántula
X26	1 mg/L KIN + 0.5 mg/L ANA	Plántula
CH	Extracto de hexano (1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D)	Callo
CA	Extracto de acetato de etilo (1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D)	Callo
CM	Extracto metanólico (1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D)	Callo

8.7.1 PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE PLÁNTULAS

En la Tabla 11 se encuentran los 20 compuestos detectados de los extractos con hexano de las muestras (MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26) de plántulas, de los cuales los compuestos 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16 y 17 se hallaron en todas las muestras de plántulas variando únicamente en el contenido. Los compuestos que se detectaron en mayor abundancia fueron el compuesto fenólico α -tocoferol (12) con un 20.49% en el extracto de X24 (figura 22), y el fitoesterol γ -sitosterol (15) con un 21.94% en el extracto de X21. Cabe destacar que estos compuestos han presentado actividades biológicas, α -tocoferol ha sido reportado como antiinflamatorio (Reiter et al., 2007) y γ -sitosterol como antimicrobiano (Shubham et al., 2024).

Tabla 11. Compuestos detectados por CG-EM de los extractos de plántula obtenidos con hexano.

N°	Compuesto	Fórmula	RT (min)	Abundancia (%)							
				MS	X7	X17	X19	X21	X22	X24	X26

1	D-manosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	15.754	1.66	-	-	-	-	-	-	-
2	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	17.613	4.28	5.04	8.53	6.40	13.69	3.94	8.61	3.86
3	Fitol, acetato	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	17.514	8.90	8.14	7.86	4.68	6.91	3.52	3.78	4.39
4	Ácido n-hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	18.874	-	-	3.64	0.25	-	-	0.33	-
5	Palmito de isopropilo	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	19.308	-	-	-	-	-	0.26	-	-
6	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	20.536	-	-	2.07	-	-	0.78	-	-
Ácido fórmico, éster											
7	3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-il	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	20.713	-	-	-	-	-	-	-	4.19
8	Escualeno	C ₃₀ H ₅₀	28.642	8.26	-	9.48	4.54	14.26	7.79	18.47	4.92
9	α-tocospiro A	C ₂₉ H ₅₀ O ₄	28.997	-	-	1.23	1.85	-	-	-	-
10	α-tocospiro B	C ₂₉ H ₅₀ O ₄	29.04	-	1.15	0.83	-	0.28	1.10	-	1.98
11	γ-tocoferol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	31.42	0.28	-	-	0.63	-	1.14	0.55	6.65
12	α-tocoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	32.432	10.27	2.11	6.69	8.77	1.55	4.02	20.49	6.47
13	Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	33.897	1.52	1.99	2.11	2.18	2.44	16.40	1.71	1.14
14	Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	34.33	1.92	6.39	4.82	5.06	15.23	3.25	3.78	2.78
15	γ-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	35.335	6.48	18.90	8.86	12.97	21.94	6.81	14.93	6.90
16	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	35.762	1.45	2.12	0.65	3.13	0.74	0.89	0.73	0.30
17	Lupeol	C ₃₀ H ₅₀ O	36.701	0.12	0.71	0.56	0.26	1.36	1.34	0.67	0.37
18	Betulina	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	37.963	0.54	-	-	-	-	-	-	0.09
19	Betulinaldehído	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	37.943	-	1.37	0.73	0.46	-	-	-	0.79
20	1-heptatriacotanol	C ₃₇ H ₇₆ O	40.557	1.02	0.63	6.58	1.39	-	-	1.27	16.81

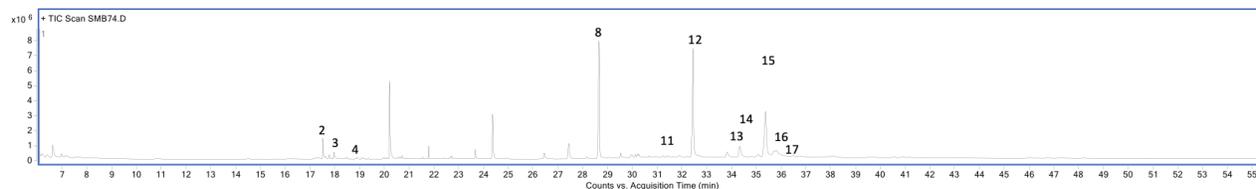


Figura 22. Cromatograma del extracto hexánico de X24 (1 mg/L KIN).

En los extractos obtenidos con el solvente acetato de etilo se detectaron 10 compuestos (Tabla 12), la mayoría de estos también se presentaron en los extractos con hexano. De manera única se encontró la presencia del compuesto neofitadieno (22) en el control (Sin RCV). Por otra parte, el extracto de X7 presentó la mayoría de compuestos detectados (Figura 23), de manera única presento al ácido oleico (6), estigmasterol (14), γ -sitosterol (15) y betulina (18), los cuales son de relevancia ya que se ha reportado su actividad como antitumoral, antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano (Carrillo et al., 2012; Günther et al., 2021; S. Haque et al., 2014; P. Huang et al., 2023; N. Kaur et al., 2011; Naikwadi et al., 2022; Ren et al., 2021).

El compuesto con mayor abundancia fue el fitol con un 14.42% en el extracto X21, es importante destacar que el fitol posee efectos ansiolíticos, citotóxicos, antioxidantes, inductores de la autofagia y la apoptosis, antinociceptivos, antiinflamatorios, inmunomoduladores y antimicrobianos (Islam et al., 2018).

Tabla 12. Compuestos detectados por CG-EM de los extractos de plántula obtenidos con acetato de etilo.

N°	Compuesto	Fórmula	RT (min)	Abundancia (%)							
				MS	X7	X17	X19	X21	X22	X24	X26
1	D-manosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	15.878	-	-	-	-	1.59	-	1.61	-
21	Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	17.613	0.09	-	-	-	-	-	-	-
3	Fitol, acetato	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	17.968	-	0.55	0.28	0.11	1.45	1.64	1.03	1.25

6	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	18.861	-	0.28	-	-	-	-	-	-
2	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	20.221	-	0.18	0.14	0.04	14.42	-	-	-
12	α-tocoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	32.432	-	0.10	0.02	0.02	-	-	-	-
14	Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	34.363	-	0.03	-	-	-	-	-	-
15	γ-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	35.329	-	0.16	-	-	-	-	-	-
18	Betulina	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	35.88	-	0.02	-	-	-	-	-	-
16	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	36.774	-	0.01	0.05	0.04	-	-	-	-

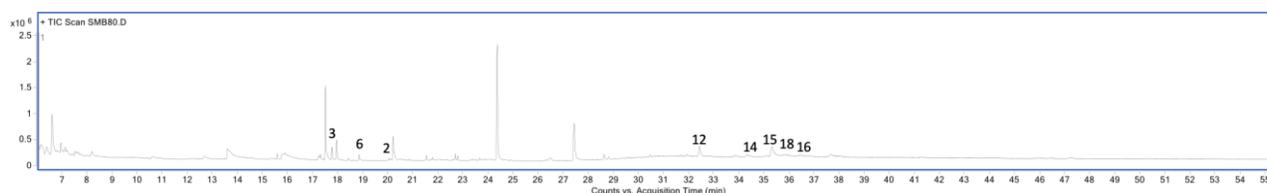


Figura 23. Cromatograma del extracto con acetato de etilo de X7 (0.1 mg/L BAP + 1 mg/L ANA).

Por otra parte, los cromatogramas de extractos metanólico no mostraron claridad en la detección de compuestos (Figura 24), es importante mencionar que el fundamento de la cromatografía de gases se basa en detectar analitos capaces de volatizarse, por lo que es común que los extractos polares no sean adecuados para analizarse por esta técnica. Sin embargo, fue posible detectar 6 compuestos (Tabla 13), entre estos el compuesto con mayor abundancia fue celobiosa (25) con un 15.05% y se detectó en el control (Sin RCV); mientras que el compuesto con relevancia biológica fue 5-hidroximetilfurfural (tratamiento X22, 5.66%), el cual posee actividades como antioxidante y antiproliferativo (Zhao et al., 2013).

Tabla 13. Compuestos detectados por CG-EM de los extractos de plántula obtenidos con metanol.

N°	Compuesto	Fórmula	RT (min)	Abundancia (%)						
				MS	X7	X17	X19	X21	X22	X24

22	Ciclopentano, 1-acetil- 1,2-epoxi-	$C_7H_{10}O_2$	8.962	-	-	-	-	-	2.74	1.59	2.51
23	4H-Piran-4-one, 2,3- dihidro-3,5-dihidroxi-6- metil-	$C_6H_8O_4$	9.442	-	-	-	-	-	4.69	-	-
24	5-Hidroximetilfurfural	$C_6H_6O_3$	11.517	-	-	-	-	-	5.66	-	-
25	Celobiosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	13.98	15.05	-	-	-	-	2.53	-	-
26	7-hidroxi-3-(1,1- dimetilprop-2- enil)cumarina	$C_{14}H_{14}O_3$	21.889	-	-	2.24	-	-	-	-	-
27	Ácido 6,9,12- octadecatrienoico, éster fenilmetilo, (Z,Z,Z)-	$C_{25}H_{36}O_2$	23.308	-	-	2.52	-	-	-	-	-

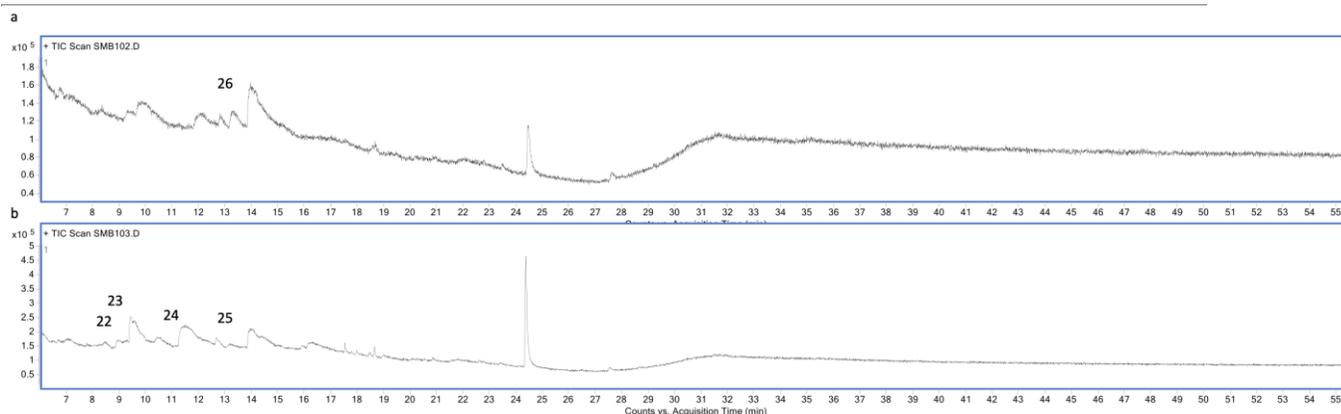


Figura 24. Cromatogramas de extractos metanólicos. a) MS. b) X22.

Por lo tanto, los extractos hexánicos, acetato de etilo y metanólicos de plántulas contienen en su mayoría compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides y azufrados, con actividades reportadas como antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos (Tabla 14).

Tabla 14. Actividades biológicas reportadas de los compuestos detectados por CG-EM de todos los extractos de plántulas.

N°	Compuesto	Tratamiento	Actividad	Referencia
----	-----------	-------------	-----------	------------

2	Fitol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, citotóxico, etc.	(Islam et al., 2018)
4	Ácido n-hexadecanoico	X17, X19 y X24	Antioxidante, antibacterial y antiinflamatorio.	(Aparna et al., 2012; Ganesan et al., 2024)
6	Ácido oleico	X7, X17 y X22	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral	(Cai et al., 2011; Carrillo et al., 2012; Santa-María et al., 2023)
8	Escualeno	MS, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, citotóxico	(Lou-Bonafonte et al., 2018)
10	α -tocospiro B	X7, X17, X21, X22 y X26	Citotóxico	(Yuan et al., 2014)
11	γ -tocoferol	MS, X19, X22, X24 y X26	Antioxidante y antiinflamatorio	(S.-W. Huang et al., 1994; Reiter et al., 2007)
12	α -tocoferol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antioxidante y antiinflamatorio	(S.-W. Huang et al., 1994; Reiter et al., 2007)
13	Campesterol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antibacterial, antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno	(Freitas Da Silva et al., 2023; Nazir et al., 2023)
14	Estigmasterol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, antidiabético, anticáncer, entre otras.	(Alawode et al., 2021; Bakrim et al., 2022)
15	γ -sitosterol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antidiabético y antiinflamatorio	(Balamurugan et al., 2011; Naikwadi et al., 2022)
16	β -sitosterol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antiinflamatorio	(Liao et al., 2018)

17	Lupeol	MS, X7, X17, X19, X21, X22, X24 y X26	Antiprotozoario, antiinflamatorio, antitumoral, antimicrobiano, entre otras.	(Gallo & Sarachine, 2009; Gupta et al., 2012; N. Sharma et al., 2020)
18	Betulina	MS, X7 y X26	Antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano y antitumoral	(Günther et al., 2021; S. Haque et al., 2014; P. Huang et al., 2023; Ren et al., 2021)
19	Betulinaldehído	X7, X17, X19 y X26	Antitumoral	(P. Huang et al., 2023)
24	5-Hidroxiacetilfurfural	X22	Antioxidante y antiproliferativo	(Zhao et al., 2013)

8.7.2 PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE CALLOS

Los extractos obtenidos de la línea de callo establecida con 1 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de 2,4-D, produjeron al menos 16 compuestos identificables en los distintos extractos obtenidos (Tabla 15). En todos los extractos de callo se detectó la presencia del ácido n-hexadecanoico (4), ácido oleico (6) y γ -sitosterol (15) (ver Figura 25). La mayor variedad de compuestos detectados se obtuvo con los extractos de acetato de etilo (Figura 12.b); no obstante, el compuesto con mayor abundancia se halló en el extracto metanólico, 5-hidroxiacetilfurfural (24) con un 39.89% de abundancia (Figura 25.c), el cual es relevante por sus propiedades como antioxidante y antiproliferativo (Tabla 15), otro compuesto importante es la azafrina ya que presenta actividad como cardioprotector (S. Yang et al., 2018)

Tabla 15. Compuestos detectados por CG-EM de extractos de callo con hexano (CH), acetato de etilo (CA) y metanol (CM).

N°	Compuesto	Fórmula	RT (min)	Abundancia (%)		
				CH	CA	CM

23	4H-Piran-4-one,2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	C ₆ H ₈ O ₄	9.205	-	-	15.50
25	Celobiosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	9.218	-	3.08	0.83
24	5-Hidroxi metilfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	10.723	-	-	39.89
28	6-oxoheptanoato de metilo	C ₈ H ₁₄ O ₃	12.043	-	0.28	-
29	Desulfosinigrina	C ₁₀ H ₁₇ NO ₆ S	14.145	-	0.72	-
1	D-manosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	14.749	-	4.32	14.86
5	Palmito de isopropilo	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	19.308	0.84	-	-
30	Ácido palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	20.267	0.74	-	-
4	Ácido n-hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	18.881	1.11	11.74	5.56
6	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	21.889	2.85	4.87	2.09
31	7-Dehidrodiosgenina	C ₂₇ H ₄₀ O ₃	31.565	9.89	11.96	-
32	Azafrina	C ₂₇ H ₃₈ O ₄	32.005	-	2.23	-
20	1-Heptatriacotanol	C ₃₇ H ₇₆ O	34.31	1.20	-	-
14	Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	34.876	1.35	6.76	-
15	γ-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	35.171	17.42	12.80	2.27
16	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	36.262	-	0.59	-

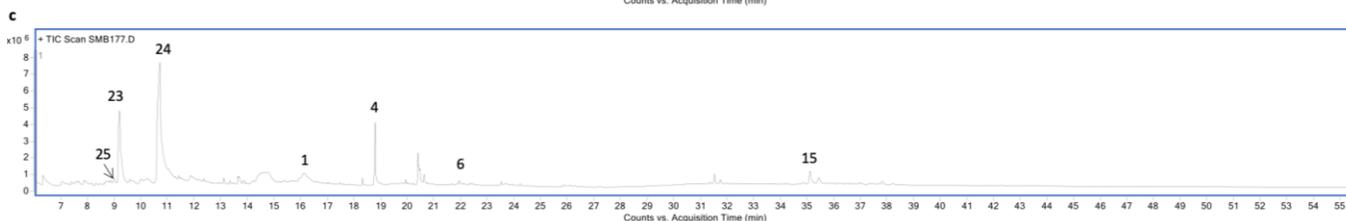
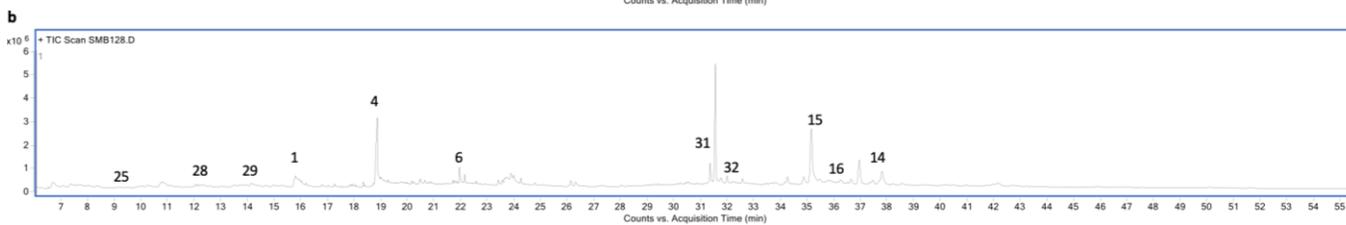
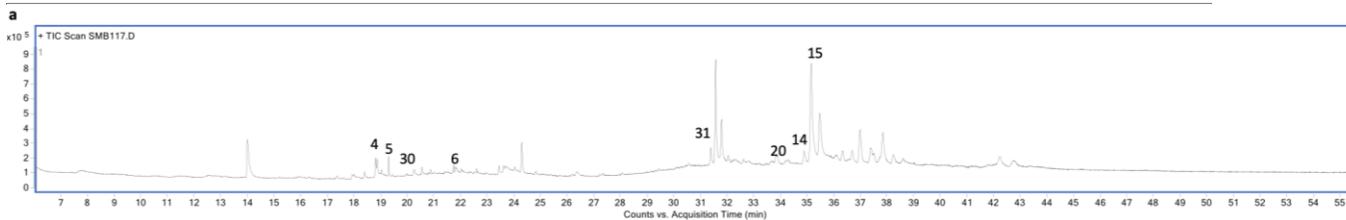


Figura 25. Cromatogramas de extractos de callo con: a) hexano, b) acetato de etilo y c) metanol.

8.7.3 COMPARACIÓN DEL CONTENIDO FITOQUÍMICO

Respecto al contenido fitoquímico de los cultivos *in vitro* obtenidos, se encontró por CG-EM que tanto los extractos de plántula como de callo biosintetizan compuestos tales como el ácido oleico, ácido n-hexadecanoico, estigmasterol, palmito de isopropilo, γ -sitosterol y β -sitosterol. Este último también se ha reportado en el extracto etanólico de la planta silvestre, no obstante, se identificaron otros compuestos mediante cromatografía en columna de gel de sílice, entre ellos el ácido oleanólico, ácido 2 α -hidroxi ursólico, ácido tormentico, daucosterol, matol, luteolina, quercetina, apigenina, brevifolincarboxilato de metilo, ácido gálico, 3, 4, 8, 9, 10-pentahidroxidibenzo[b, d]pirano-6-ona (12) y ácido elágico (J. Yan & Yang, 2005). También se ha encontrado la presencia del ácido gálico, galato de etilo, corilagina y ácido elágico en el extracto hidroalcohólico de hojas de *L. octovalvis* por HPLC (Morales-Ferra et al., 2023).

A pesar de que no se identificaron los mismos compuestos que se han reportado para la planta silvestre, se encontraron otros con relevancia biológica tales como el lupeol, campesterol y betulina, de los cuales se ha reportado su actividad como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobianos y antitumoral (ver Tabla 14).

8.8 EVALUACIONES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS

A partir de los extractos obtenidos de las variaciones de plántulas y del cultivo de callos, se evaluaron sus posibles actividades como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano. Estas evaluaciones fueron llevadas a cabo en diferentes instituciones, la actividad antioxidante se realizó en colaboración con la Dra. Valery Domínguez Villegas en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Química de la UAEM; la

actividad antiinflamatoria se efectuó en colaboración con el Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo en el Laboratorio de Toxicología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN; la actividad antimicrobiana se concluyó en dos partes disco difusión y microdilución en caldo, la primera se colaboró con la Dra. Virginia Mandujano González en el Departamento de Biología Molecular de la UTC, y la segunda con la Dra. Crystal Columba Palomares en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la UAEM.

8.8.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la actividad antioxidante de extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de callo y de plántula cultivada *in vitro* suplementada con 1 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de BAP (X7), en comparación con la quercetina como agente antioxidante estándar, mediante el ensayo DPPH.

Los extractos de hexano de callo no revelaron actividad de eliminación del radical DPPH a ninguna de las concentraciones probadas; el extracto de acetato de etilo presentó una captación 48.9% del radical libre a la concentración mayor de 1000 ppm, a menores concentraciones no presentó actividad; sin embargo, entre estos extractos, el metanólico fue el que obtuvo la mayor eliminación del radical libre con un 85.3% a 1000 ppm del extracto (Tabla 16). El extracto de plántula X7 de acetilo dio el mayor porcentaje de actividad de 91.4% a 100 ppm, a mayor concentración su actividad disminuyó a un 65.06% (Tabla 16).

Tabla 16. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH a partir de extractos de callo y plántula a diferentes concentraciones.

Muestra	Concentración (ppm)	Act. Antioxidante (%)
Quercetina	10	92.2±0.10
	100	95.6±0.35
	1000	97.5±0.00
	10	10.4±0.00

Extracto acetato de etilo X7	100	91.4±0.00*
	1000	65.06±0.00
Extracto hexano callo	10	-21.6±0.00
	100	-11.7±0.00
	1000	1.4±0.00
Extracto acetato de etilo callo	10	-23.4±0.00
	100	-11.2±0.00
	1000	48.9±0.00
Extracto metanol callo	10	14.7±0.00
	100	18.1±0.00
	1000	85.3±0.00

Los datos presentados son la media (\pm) con la desviación estándar, de 3 replicaciones por muestra.

Por lo tanto, las plántulas X7 biosintetizan compuestos antioxidantes, cuya actividad fue sobresaliente a la concentración de 100 ppm y compiten con el control quercetina. Cabe señalar, que el modelo DPPH es sensible a la detección de compuestos fenólicos, terpenos, terpenoides y fitoesteroles (Gulcin & Alwasel, 2023). De manera que, esta actividad podría atribuirse a la presencia de compuestos como el fitol, ácido oleico, α -tocoferol, estigmasterol γ -sitosterol, β -sitosterol, que se detectaron en el extracto de acetato de etilo por CG-EM.

En otro orden, las plántulas presentaron mayor actividad que los extractos de callo de *L. octovalvis*, mientras que para la planta silvestre se ha reportado un 80% de captación del radical libre DPPH a $1080.84 \pm 6.07 \mu\text{M}$ trolox equivalente/mg de peso seco del extracto metanólico de hojas (Yakob et al., 2012). Por lo que, la mayor producción de compuestos con potencial antioxidante se da en el cultivo de plántulas.

8.8.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

8.8.2.1 ENSAYO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Ningún extracto presentó actividad antimicrobiana contra las cepas *E. coli* y *C. albicans* en el ensayo de disco difusión. No obstante, contra *S. aureus* (ATCC 25923) el extracto hexánico de callo a diferentes concentraciones presentó la formación de halos de inhibición, siendo la mayor respuesta a 50 mg/mL con halos de 16.07 mm (Tabla 17); sin

embargo, en comparación con las concentraciones 25 y 12.5 mg/mL no presentaron diferencias significativas. El extracto metanólico de plántula a la mayor concentración presentó halos de 8.39 mm.

Tabla 17. Actividad antimicrobiana (mm) de extractos de cultivos *in vitro* de *L. octovalvis* contra diferentes patógenos.

Tratamientos	Concentración	Patógeno		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Hexano (-)	1 mL	-	-	-
Acetato de Etilo (-)	1 mL	-	-	-
Metanol (-)	1 mL	-	-	-
Gentamicina (+)	80 mg/mL	23.12±1.15	-	-
Estreptomycin (+)	500 mg/mL	-	37.74±1.27 ^a	-
Fluconazol (+)	100 mg/50 mL	-	-	25.58±1.25
Ext. Hexano de callo	50 mg/mL	-	16.07±1.30 ^b	-
	25 mg/mL	-	15.01±0.73 ^{bc}	-
	12.5 mg/mL	-	15.12±1.87 ^{bc}	-
	5 mg/mL	-	14.14±1.31 ^c	-
Ext. Acetato de Etilo de callo	50 mg/mL	-	-	-
	25 mg/mL	-	-	-
	12.5 mg/mL	-	-	-
	5 mg/mL	-	-	-
Ext. Metanólico de callo	50 mg/mL	-	-	-
	25 mg/mL	-	-	-
	12.5 mg/mL	-	-	-
	5 mg/mL	-	-	-
Ext. Hexano de plántula X7	50 mg/mL	-	-	-
	25 mg/mL	-	-	-
	12.5 mg/mL	-	-	-
	5 mg/mL	-	-	-
Ext. Acetato de Etilo de plántula X7	50 mg/mL	-	-	-
	25 mg/mL	-	-	-
	12.5 mg/mL	-	-	-
	5 mg/mL	-	-	-
Ext. Metanólico de plántula X7	50 mg/mL	-	8.39±1.47 ^d	-
	25 mg/mL	-	-	-
	12.5 mg/mL	-	-	-
	5 mg/mL	-	-	-

-: No presentaron actividad. Datos presentados como la media (±) con la desviación estándar. Valores con la misma letra en las columnas no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba Tukey a un 95% de confianza. n=5 de 2 repeticiones independientes.

En el caso de la planta silvestre *L. octovalvis*, se ha reportado que los extractos de hoja, tallo y raíz con diferentes solventes (n-hexano, acetato de etilo, metanol al 80%), inhiben el crecimiento de *S. aureus*, mientras que únicamente los de hoja inhiben a *E. coli*,

por otra parte, el extracto metanólico de hojas a 100 y 50 mg/mL forma halos de inhibición de 15 mm para *C. albicans* (Tabla 18). Estos resultados en comparación con los cultivos *in vitro*, difieren ya que los extractos de planta silvestre presentaron mayor actividad contra diferentes cepas, por el contrario, a los extractos de plántulas y callos que solo presentaron actividad contra *S. Aureus*, sin embargo, los halos de inhibición de fueron mayores en el extracto hexánico de callos a 50 mg/mL (16.07 ± 1.30), que los reportados para la planta silvestre (Tabla 18), lo cual podría indicar que los cultivos *in vitro* biosintetizan diferentes compuestos a los de la planta silvestre, y en el caso de los cultivos de callo se producen mayores compuestos con actividad antimicrobiana contra *S. aureus*.

Tabla 18. Actividad antimicrobiana (halo de inhibición en mm) reportada por otros autores para extractos de *L. octovalvis*.

Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Patógeno			Referencia
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	
Extracto metanólico de hojas	100	-	13	15	(A. C. O. Silva et al., 2013)
	50	-	11	15	(A. C. O. Silva et al., 2013)
	20	12.0 ± 0.4	7.8 ± 1.7	/	(Yakob et al., 2012)
Extracto de acetato de etilo de hojas	20	10.6 ± 0.5	9.12 ± 1.2	/	(Yakob et al., 2012)
Extracto hexánico de hojas	20	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	/	(Yakob et al., 2012)
Extracto metanólico de tallos	20	-	7.0 ± 0.6	/	(Yakob et al., 2012)
Extracto metanólico de raíces	20	-	10.5 ± 0.7	/	(Yakob et al., 2012)

-: No presento actividad. /: No se evaluó.

8.8.2.2 ENSAYO MICRODILUCIÓN EN CALDO

De manera complementaria al ensayo anterior, se midió la actividad antimicrobiana de los extractos de los cultivos *in vitro* y planta silvestre (Tabla 19), con el modelo microdilución en caldo, utilizando las cepas: *S. aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* resistente a meticilina (ATCC 43300). y *P. aeruginosa* (aislado clínico).

Tabla 19. Claves correspondientes a los tratamientos evaluados para actividad antimicrobiana.

Clave	Tratamiento
A	Extracto hexánico de plántula X7
B	Extracto de acetato de etilo de plántula X7
C	Extracto metanólico de plántula X7
D	Extracto hexánico de callo
E	Extracto de acetato de etilo de callo
F	Extracto metanólico de callo
G	Extracto de acetato de etilo de planta silvestre

En la Figura 26 se encuentra el panel CMI correspondiente a la cepa *S. aureus*, en la cual se visualiza que el tratamiento B, C, F y G inhibieron el crecimiento a todas las concentraciones evaluadas (500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g/mL}$). En cuanto a las demás muestras, el tratamiento A presento actividad en las concentraciones 500 a 62.5 $\mu\text{g/mL}$; mientras que la muestra E solo inhibió el crecimiento a la mayor dosis de 500 $\mu\text{g/mL}$, y el tratamiento D no presento actividad a ninguna dosis.

Figura 27. Placa de microdilución correspondiente a *S. aureus* resistente a meticilina
 +: Control positivo con gentamicina. -: control de crecimiento. C.E: control de esterilidad.

En la figura 28 se puede observar que ningún extracto presentó actividad contra *P. aeruginosa* a las diferentes dosis evaluadas.

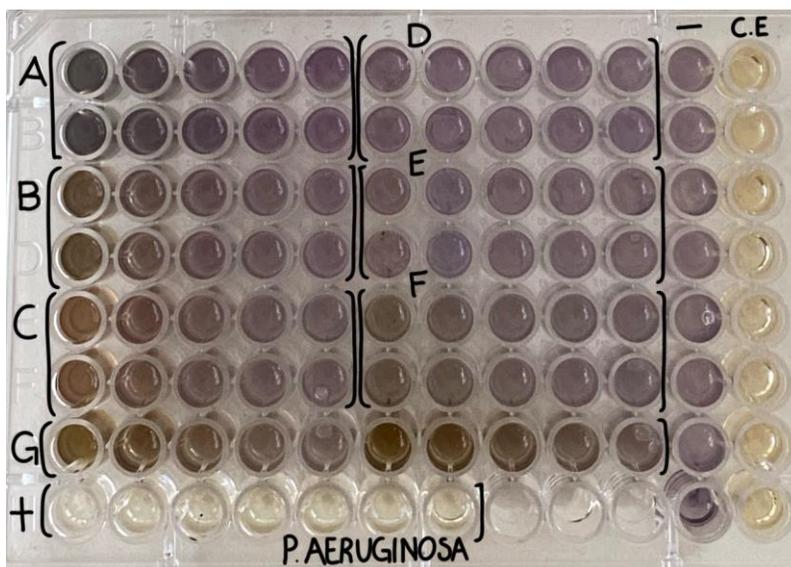


Figura 28. Placa de microdilución correspondiente a *P. aeruginosa*. +: Control positivo con gentamicina. -: control de crecimiento. C.E: control de esterilidad.

De acuerdo con estos resultados se estimaron las CMI de cada uno de los extractos evaluados (Tabla 20), de los cuales se obtuvo la menor concentración de 31.25 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* con los extractos de acetato de etilo y metanol de plántula, extracto metanólico de callo y de acetato de etilo de planta silvestre. En el caso de SARM la menor concentración se observó con el extracto de hexano de plántula a 31.25 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 20. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos evaluados.

Clave	Tratamiento	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
		<i>S. aureus</i>	SARM	<i>P. aeruginosa</i>
+	Gentamicina	≤ 0.78	12.5	≤ 0.78
A	Extracto de hexano de plántula	62.5	31.25	SE
B	Extracto de acetato de etilo de plántula	31.25	250	SE

C	Extracto metanólico de plántula	31.25	250	SE
D	Extracto de hexano de callo	SE	SE	SE
E	Extracto de acetato de etilo de callo	500	250	SE
F	Extracto de metanólico de callo	31.25	250	SE
G	Extracto de acetato de etilo de planta silvestre	31.25	62.5	SE

SE: Sin efecto. SARM: *S. aureus* (resistente a meticilina ATCC 43300). *S. aureus* (6538). *P. aeruginosa* (aislado clínico).

En contraste, se han reportado las CMI de los extractos metanólicos con diferentes partes de la planta silvestre *L. octovalvis* (Tabla 21) para *S. Aureus* y *P. aeruginosa*. De los cuales reportaron la menor CMI para *S. Aureus* de 250 µg/mL con el extracto metanólico de raíces de la planta silvestre, mientras que los extractos metanólicos de los cultivos *in vitro* presentaron una menor CMI de 31.25 µg/mL. No obstante, los extractos de plántula y callo no presentaron actividad contra *P. aeruginosa* a diferencia de los extractos de la planta silvestre que, si tuvieron actividad, lo cual evidencia que los cultivos *in vitro* producen compuestos diferentes a los de la planta silvestre, sin embargo, biosintetizan en mayor cantidad o diferentes compuestos antimicrobianos contra *S. Aureus* en comparación con la planta silvestre.

Tabla 21. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) reportadas por otros autores de extractos de *L. octovalvis*.

Tratamiento	CMI (µg/mL)		Referencia
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Extracto metanólico de hojas	500	125	(A. C. O. Silva et al., 2013; Yakob et al., 2012)
Extracto metanólico de tallos	1000	500	(Yakob et al., 2012)
Extracto metanólico de raíces	250	62.5	(Yakob et al., 2012)

8.8.3 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Se evaluó el efecto antiinflamatorio *in vivo* del extracto con acetato de etilo de plántulas X7, mediante el modelo de edema auricular inducido por TPA utilizando las dosis de 0.5 y 1 mg/oreja en machos y hembras, las cuales mostraron diferencias significativas respecto a la indometacina, teniendo un mayor efecto de inhibición del edema con los extractos de plántula X7 (Tabla 22). El tratamiento con 2 mg/oreja con extracto de plántula con una inhibición del 42.35% del edema en ratones machos y 45.23% en hembras, no fue estadísticamente diferente a la misma dosis con indometacina; sin embargo, a las dosis de 0.5 y 1 mg/oreja en machos y hembras, si fueron estadísticamente diferentes a la indometacina, teniendo un mayor efecto de inhibición del edema con los extractos de plántula, y entre estos no mostraron diferencias (Figura 29), por lo que se podría utilizar la menor dosis de 0.5 mg/oreja y se tendría el mismo efecto que con la dosis de 1 mg/oreja tanto como en ratones machos como hembras.

Tabla 22. Actividad antiinflamatoria de los extractos de plántulas sobre el desarrollo del edema inducido con TPA en ratones CD1.

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Formación edema auricular (mg)		DE ₅₀ (mg/oreja)
		Machos	Hembras	
Control TPA	-	24.18±0.99	22.38±0.64	-
Indometacina	0.5	21.64±0.02 ^{*a} (10.50%)	20.20±0.25 ^{*a} (9.72%)	Machos: 1.76 Hembras: 1.84
	1	18.90±0.34 ^{*a} (21.80%)	17.96±0.38 ^{*a} (19.71%)	
	2	13.80±0.65 ^a (42.93%)	13.03±0.63 ^a (41.76%)	
Extracto de plántula X7	0.5	17.42±1.20 ^{*ab} (27.96%)	17.38±0.36 ^{*ab} (22.34%)	Machos: > 2 Hembras: > 2
	1	18.76±0.88 ^{*ab} (22.42%)	15.83±0.69 ^{*ab} (29.29%)	
	2	13.94±0.78 ^a (42.35%)	12.26±0.81 ^a (45.23%)	

Datos presentados como la media (±) con error estándar (e.e.), datos en paréntesis indican el porcentaje de inhibición del edema respecto al grupo control TPA sin tratamiento, para cada sexo. Análisis estadístico

ANOVA dos vías, prueba post hoc SNK ($p \leq 0.05$), se calcularon en función del intervalo de confianza al 95% (IC95%). • vs 2 mg/oreja. * vs 1 mg/oreja. ^a vs control TPA. ^b vs indometacina. n=7

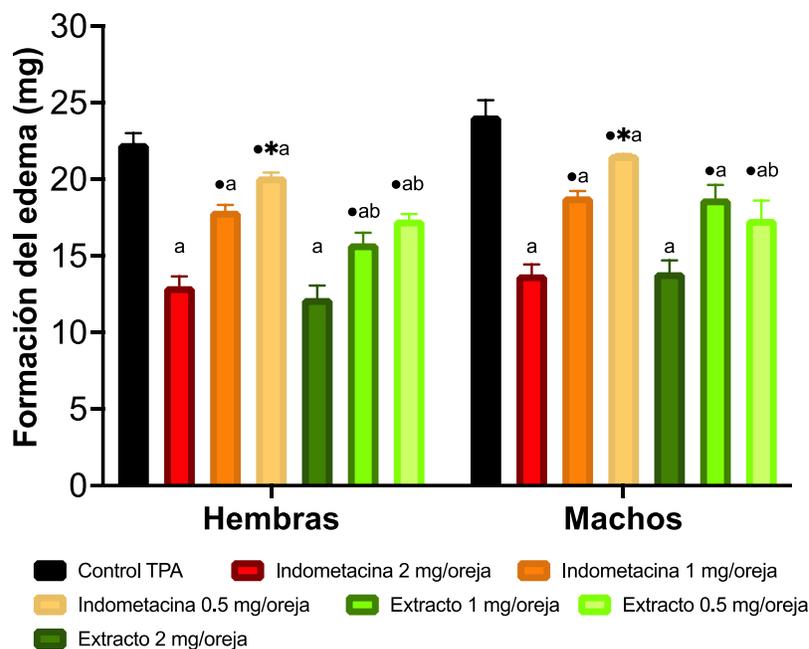


Figura 29. Actividad antiinflamatoria de los extractos de plántulas sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones hembra y macho CD1.

Con base en estos resultados, se destaca que las plántulas X7 exhiben un notable efecto antiinflamatorio. El perfil fitoquímico obtenido mediante CG-EM respalda estos hallazgos, ya que se identificaron compuestos mayoritariamente con propiedades antiinflamatorias en el extracto de acetato de etilo de X7. Entre estos compuestos se incluyen el ácido oleico, α -tocoferol, betulina, β -sitosterol, estigmasterol, fitol y γ -sitosterol.

Es importante señalar que no se ha evaluado esta actividad en extractos de la planta silvestre *L. octovalvis*, lo que hace que estos resultados sean relevantes, ya que por primera vez se establecen cultivos de plántulas con RCV de esta especie que podrían ser potencialmente productores de compuestos bioactivos.

9. CONCLUSIONES

- Se logró establecer un protocolo de desinfección para semillas de *L. octovalvis* mediante un tren de tratamiento con detergente líquido, etanol al 70%, NaClO al 1% y tres lavados con agua destilada.
- Se obtuvo una línea de cultivo de callos productores de compuestos antioxidantes y antimicrobianos a partir del explante hoja de *L. octovalvis* con 1 mg/L BAP+ 0.1 mg/L 2,4-D, con t_D de 11.67 d y una μ_{max} de 2.98 d⁻¹ y una producción máxima de biomasa seca en la 6ta semana.
- Las fitohormonas ANA + KIN/BAP promovieron la organogénesis directa en segmentos nodales, y la organogénesis indirecta en hojas de *L. octovalvis*. Las plántulas obtenidas a partir de estos tratamientos produjeron predominantemente compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas.
- Los cultivos *in vitro* y la planta silvestre biosintetizan compuestos diferentes.
- Las plántulas con 1 mg/L ANA + 0.1 mg/L BAP mostraron mayor actividad antioxidante (91.4% a 100 ppm del extracto con acetato de etilo) y antimicrobiana (contra *S. Aureus* y SARM, con una CMI de 31.25 µg/mL) que los extractos de callo. Además, el extracto de plántulas a 0.5 mg/oreja presentó un notable efecto antiinflamatorio semejante al del fármaco control (indometacina) a 1 mg/oreja.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria de todas las variaciones de plántulas obtenidas, así como la evaluación de las plántulas sin fitohormonas.

- Caracterizar el contenido fitoquímico de los cultivos in vitro por cromatografía en columna.
- Evaluar la actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria de los compuestos purificados.
- Elicitar el cultivo de callos para obtener una mayor producción de compuestos bioactivos específicos, a partir de estos establecer un cultivo de células en suspensión para aumentar los rendimientos y a futuro escalar a biorreactor.

11. ANEXOS

11.1 EVENTOS DE DIVULGACIÓN

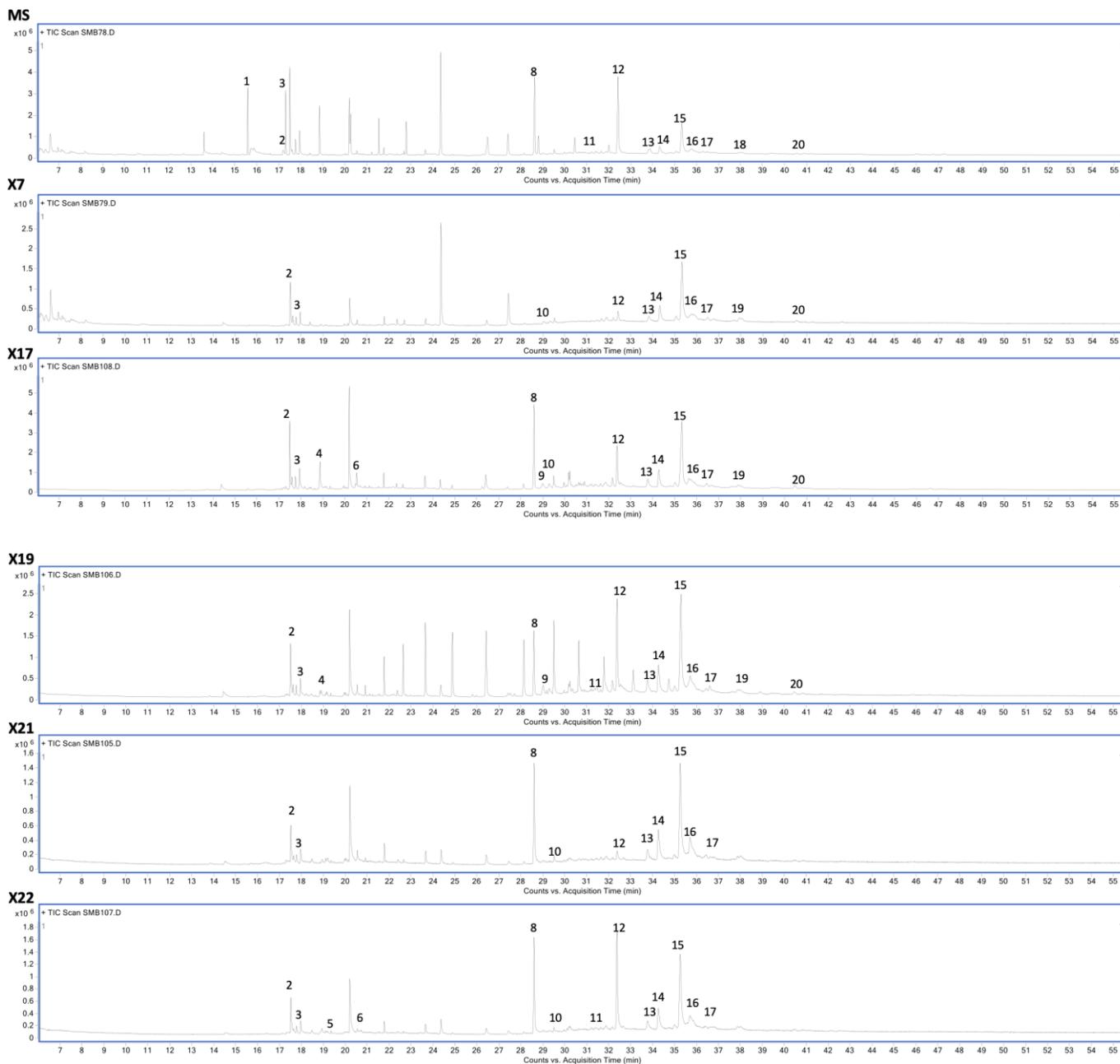
Eventos académicos en los que se participó con esta investigación:

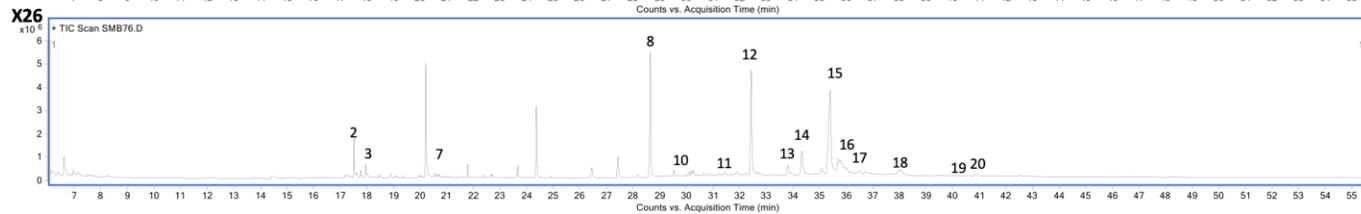
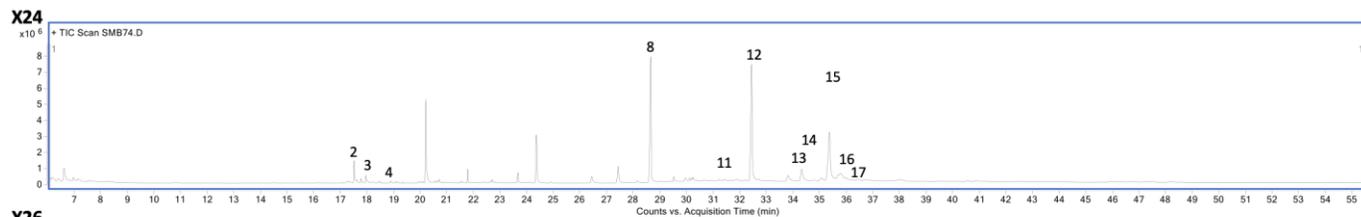
- 18ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales organizada por la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales en colaboración con la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y celebrada en mayo del 2023.
- Jornada a puertas abiertas de la Maestría en Medicina Molecular organizado por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y celebrado en octubre del 2023.
- 3^{er}. Congreso Internacional de Biotecnología Aplicada CIBTA 2023 organizado por la Universidad Tecnológica Corregidora y celebrado en noviembre-diciembre del 2023.
- XXVIII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud organizado por la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y celebrado en noviembre del 2023.

- 19ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales organizada por la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales en colaboración con la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y celebrada en mayo del 2024.

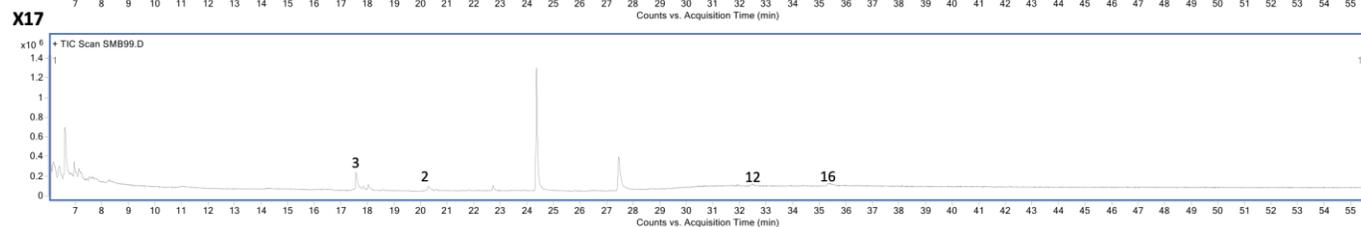
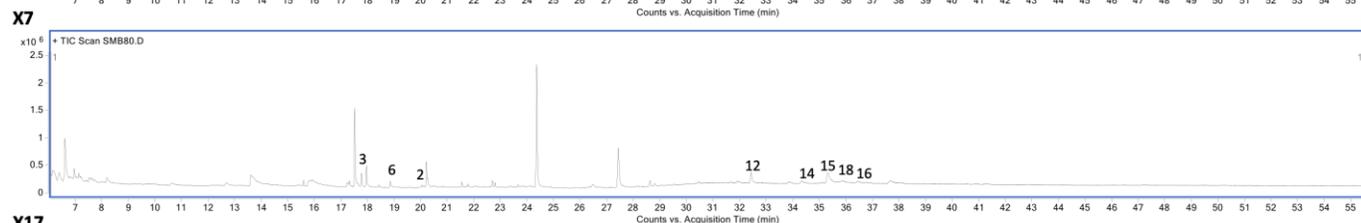
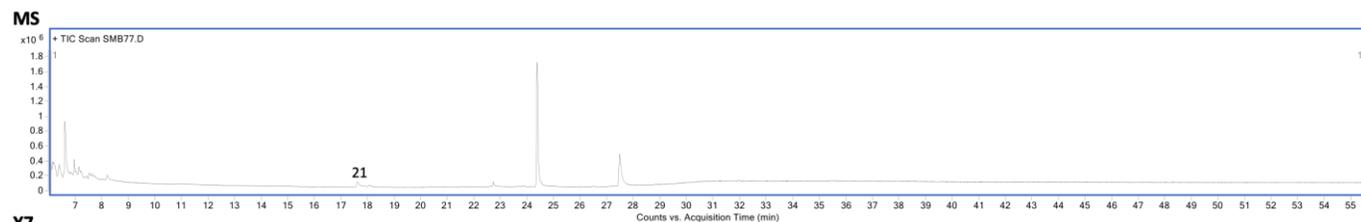
11.2 CROMATOGRAMAS DE LOS EXTRACTOS EVALUADOS POR CG-EM

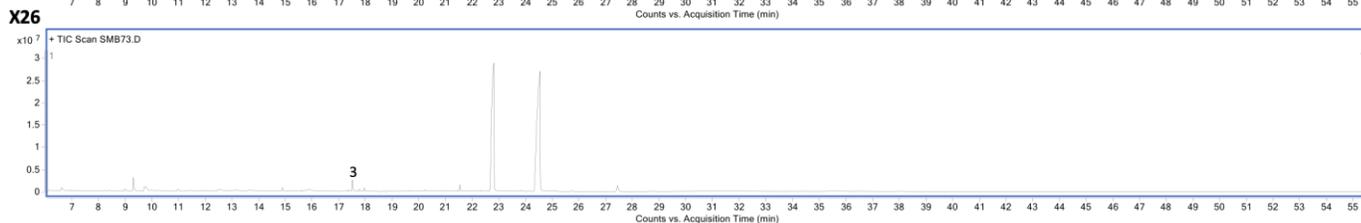
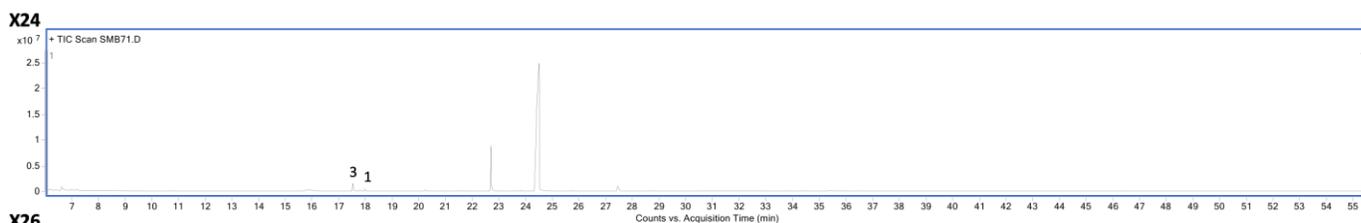
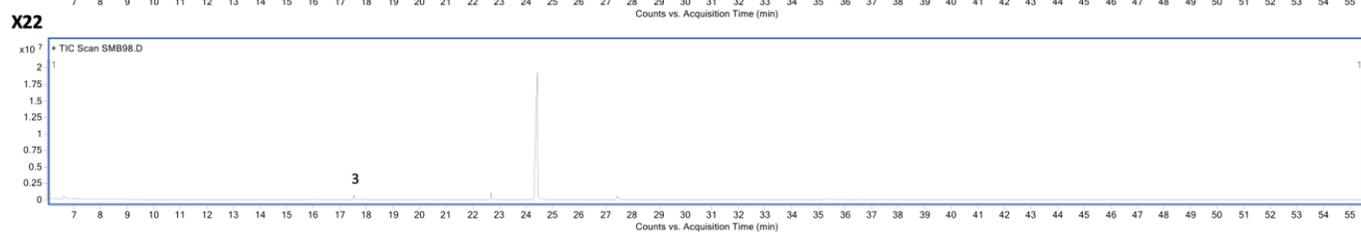
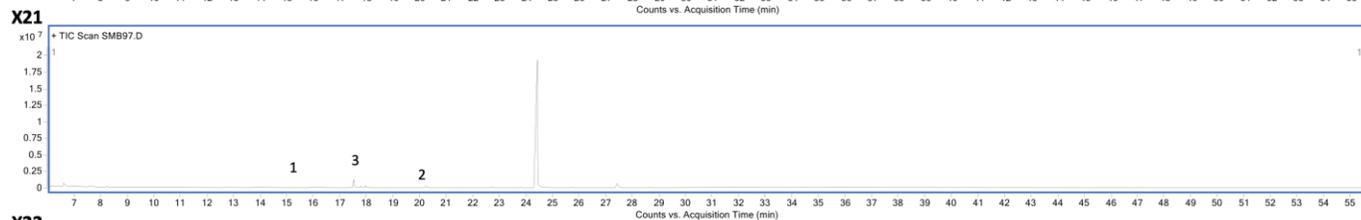
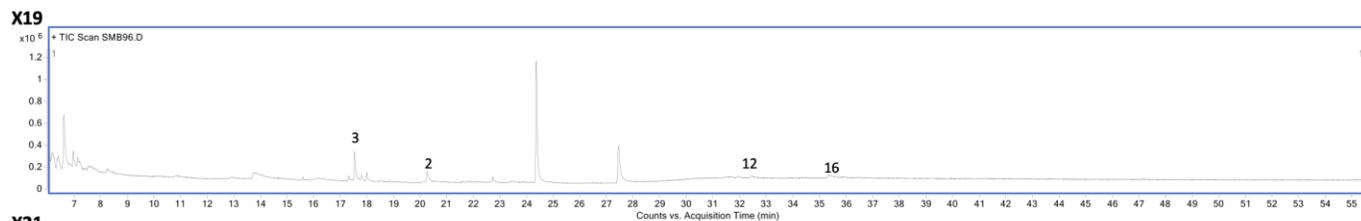
Cromatogramas obtenidos de los extractos hexánicos de las variaciones de plántulas:



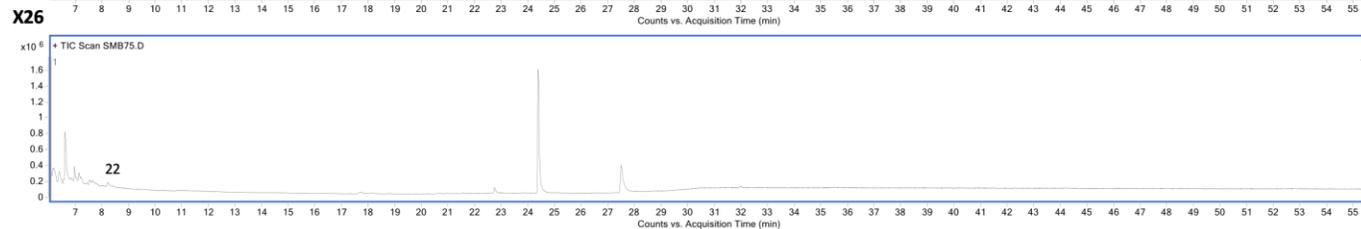
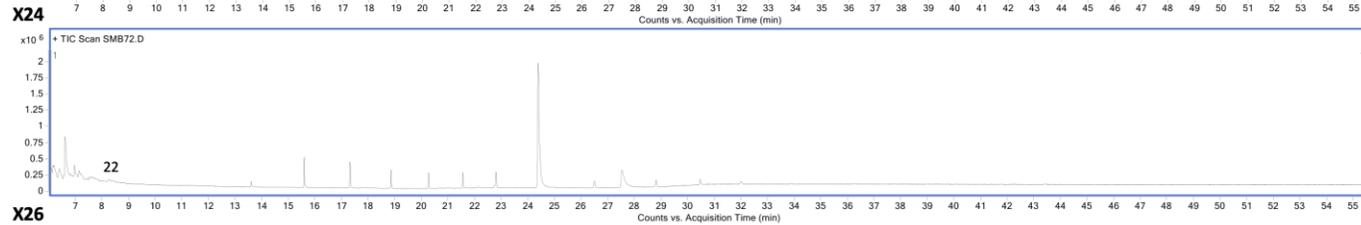
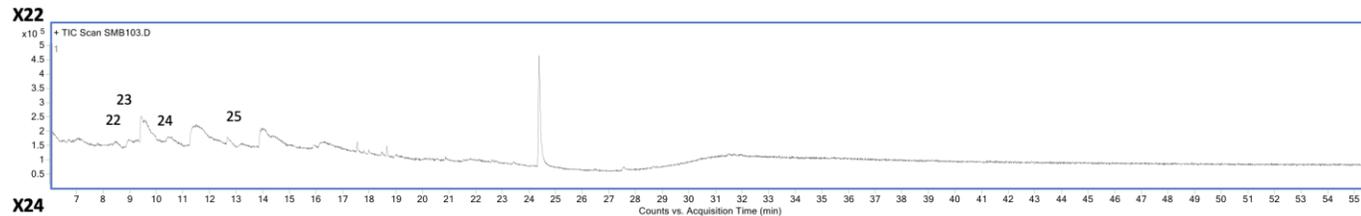
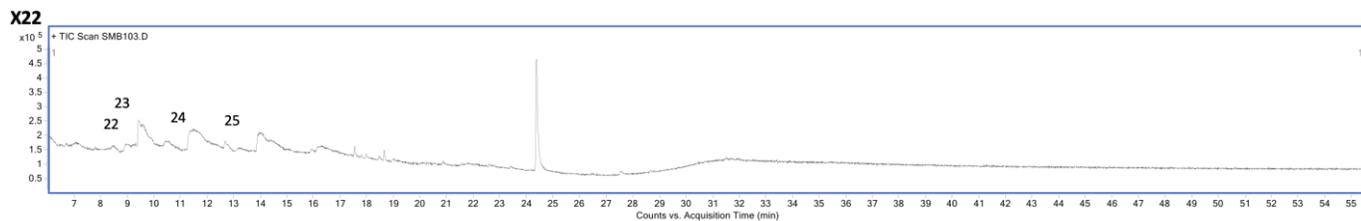
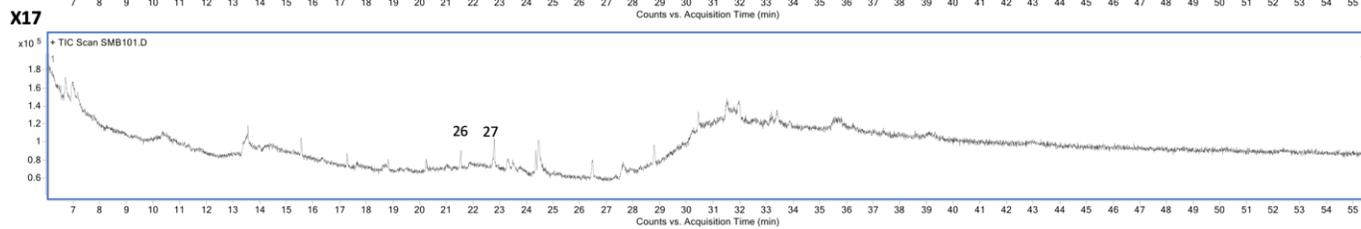
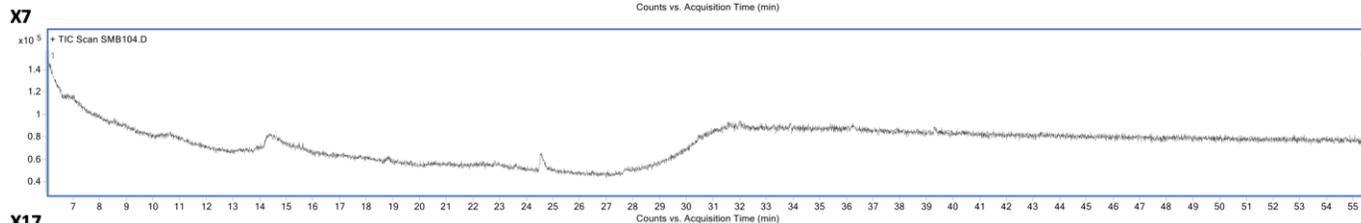
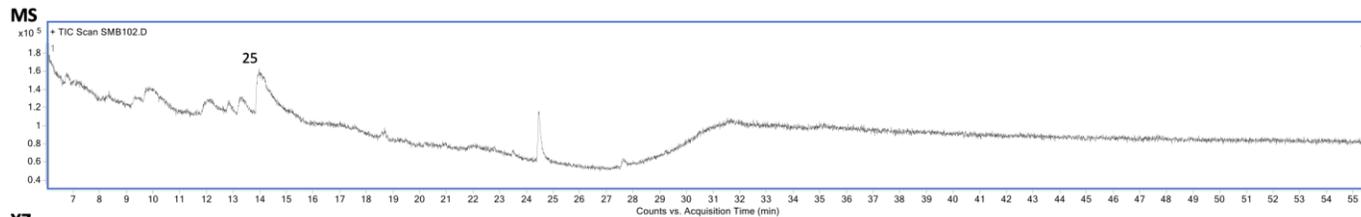


Cromatogramas obtenidos de los extractos con acetato de etilo de las variaciones de plántulas:





Cromatogramas obtenidos de los extractos metanolicos de las variaciones de plántulas:



12. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Romman, S. M., Al-Hadid, K. A., & Arabiyyat, A. R. (2015). Kinetin Is the Most Effective Cytokinin on Shoot Multiplication from Cucumber. *Journal of Agricultural Science*, 7(10), p159. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n10p159>

Adetunji, C. O., Palai, S., Ekwuabu, C. P., Egbuna, C., Adetunji, J. B., Ehis-Eriakha, C. B., Kesh, S. S., & Mtewa, A. G. (2021). General principle of primary and secondary plant metabolites: Biogenesis, metabolism, and extraction. En *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders* (pp. 3–23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820284-5.00018-6>

Alam, M. F., Mondol, P. C., Roy, S. K., Anisuzzaman, M., Parvez, S., Ray, S. K., Mahzabin, F., Tanny, T., & Alam, I. (2019). Determination of Apposite Plant Regeneration Protocol for Several Cucurbits through Direct and Indirect Organogenesis. *Horticultural Biotechnology Research*, 5, 4–13. <https://doi.org/10.25081/hbr.2019.v5.5279>

Alawode, T. T., Lajide, L., Olaleye, M., & Owolabi, B. (2021). Stigmasterol and β -Sitosterol: Antimicrobial Compounds in the Leaves of *Icacina trichantha* identified by GC–MS. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00170-3>

Al-Bakri, A. G., & Afifi, F. U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.013>

Andaryani, S., Samanhudi, S., & Yunus, A. (2019). Effect of BAP and 2,4-D on callus induction of *Jatropha curcas* in vitro. *Cell Biology & Development*, 3(2), 56–65. <https://doi.org/10.13057/cellbioldev/t030202>

Aparna, V., Dileep, K. V., Mandal, P. K., Karthe, P., Sadasivan, C., & Haridas, M. (2012). Anti-Inflammatory Property of *n* -Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chemical Biology & Drug Design*, 80(3), 434–439. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01418.x>

Aseesh Pandey, & Sushma, T. (2012). Influence of kinetin on in vitro rooting and survival of banj oak (*Quercus leucotrichophora* L.). *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(62). <https://doi.org/10.5897/AJB12.161>

Aslam, N., Zia, M., & Chaudhary, M. F. (2006). Callogenesis and Direct Organogenesis of *Artemisia scoparia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(9), 1783–1786.

Averett, J. E., Zardini, E. M., & Hoch, P. C. (1990). Flavonoid systematics of ten sections of *Ludwigia* (Onagraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(7), 529–532. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(90\)90124-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(90)90124-X)

Ayobola, M. S., Ejeoghene, R. A., & Olufemi, I. A. (2011). Potential of *Launea taraxacifolia* (Willd) Amin Ex. C. Jeffrey for in Vitro Regeneration. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(3), 93–96.

Bakrim, S., Benkhaira, N., Bourais, I., Benali, T., Lee, L.-H., El Omari, N., Sheikh, R. A., Goh, K. W., Ming, L. C., & Bouyahya, A. (2022). Health Benefits and Pharmacological Properties of Stigmasterol. *Antioxidants*, 11(10), 1912. <https://doi.org/10.3390/antiox11101912>

Balamurugan, R., Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 667(1–3), 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.025>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Barua, I. (2010). *The genus Ludwigia (Onagraceae) in India*. 20(1), 59–70. <https://dx.doi.org/10.22244/rheede.2010.20.01.14>

Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>

Bienaimé, C., Melin, A., Bensaddek, L., Attoumbéré, J., Nava-Saucedo, E., & Baltora-Rosset, S. (2015). Effects of plant growth regulators on cell growth and alkaloids production by cell cultures of *Lycopodiella inundata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(3), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0856-6>

Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>

Brahmkshatriya, P. P. (2013). Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. En K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 2665–2691). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_120

Brault, M., & Maldiney, R. (1999). Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(5), 403–412. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80046-1](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80046-1)

Cai, S., Huang, C., Ji, B., Zhou, F., Wise, M. L., Zhang, D., & Yang, P. (2011). In vitro antioxidant activity and inhibitory effect, on oleic acid-induced hepatic steatosis, of fractions and subfractions from oat (*Avena sativa* L.) ethanol extract. *Food Chemistry*,

124(3), 900–905. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.017>

Carmello, C. R., & Cardoso, J. C. (2018). Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. *Scientia Horticulturae*, 234, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.056>

Carrillo, C., Cavia, M. ^a del M., & Torre, A. S. R. (2012). Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. *NUTRICION HOSPITALARIA*, 27(5), 1860–1865. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6010>

Cavaliere, S. J. (2009). *Manual of antimicrobial susceptibility testing* (Coyle, Ed.). American Society for Microbiology.

Chang, C.-I., Kuo, C.-C., Chang, J.-Y., & Kuo, Y.-H. (2004). Three New Oleanane-Type Triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with Cytotoxic Activity against Two Human Cancer Cell Lines. *Journal of Natural Products*, 67(1), 91–93. <https://doi.org/10.1021/np030267m>

Chang, C.-I., & Kuo, Y.-H. (2007). Oleanane-type triterpenes from *Ludwigia octovalvis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 9(1), 67–72. <https://doi.org/10.1080/10286020500382769>

Chawla, H. S. (2009). *Introduction to plant biotechnology* (Third edition). Science Publishers.

Chen, T., Zhou, Y., Lu, Y., & Zhang, H. (2019). Advances in heterologous biosynthesis of plant and fungal natural products by modular co-culture engineering. *Biotechnology Letters*, 41(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2619-z>

Chen, Y.-M., Huang, C.-C., Hsiao, C.-Y., Hu, S., Wang, I.-L., & Sung, H.-C. (2019). *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) raven extract supplementation enhances muscle glycogen content and endurance exercise performance in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*,

81(5), 667–674. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0165>

CONABIO. (2009). *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven. Malezas de México. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/ludwigia-octovalvis/fichas/ficha.htm>

Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (1a ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470988558>

Cruz, K. Z. C. M., Alencar, A. A. S., Santana, J. G. S., & Oliveira Alves, L. E. (2023). *The Auxin and Cytokinin Balance Influence the in Vitro Regeneration of Phalaenopsis Shoots (Orchidaceae)*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.07.11.548545>

Dahanayake, N., & Ranawake, A. (2012). Regeneration of Dragon Fruit (*Hylecereus undatus*) Plantlets from Leaf and Stem Explants. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 14(4), 85. <https://doi.org/10.4038/tare.v14i4.4848>

Danova, K., Motyka, V., Todorova, M., Trendafilova, A., Krumova, S., Dobrev, P., Andreeva, T., Oreshkova, T., Taneva, S., & Evstatieva, L. (2018). Effect of Cytokinin and Auxin Treatments on Morphogenesis, Terpenoid Biosynthesis, Photosystem Structural Organization, and Endogenous Isoprenoid Cytokinin Profile in *Artemisia alba* Turra In Vitro. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 403–418. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9738-y>

Domínguez-Villegas, V., Domínguez-Villegas, V., García, M. L., Calpena, A., Clares-Naveros, B., & Garduño-Ramírez, M. L. (2013). Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of *Eysehadtia platycarpa*. *Natural Product Communications*, 8(2), 1934578X1300800. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800211>

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

Faramarzi Hafez, R., Ghadimzadeh, M., Moghaddam, A. F., & Jafari, M. (2016). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-Product*, 5(1). <https://doi.org/10.22092/jmpb.2016.108917>

Fazeli-Nasab, B. (2018). The effect of explant, BAP and 2,4-D on callus induction of *Trachyspermum ammi*. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12(1), 578–586. <https://doi.org/10.5219/953>

Fontanili, L., Lucchesini, M., & Mensuali-Sodi, A. (2015). *In vitro* propagation and shoot encapsulation as tools for *ex situ* conservation of the aquatic plant *Ludwigia palustris* (L.) Ell. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 149(5), 855–864. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.911779>

Freitas Da Silva, F. E., Das Chagas Lima Pinto, F., Loiola Pessoa, O. D., Marques Da Fonseca, A., Martins Da Costa, J. G., & Pinheiro Santiago, G. M. (2023). Campesterol Semi-Synthetic Derivatives as Potential Antibacterial: *In vitro* and *in silico* Evaluation. *Chemistry & Biodiversity*, 20(7), e202300536. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300536>

Gallavotti, A. (2013). The role of auxin in shaping shoot architecture. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2593–2608. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert141>

Gallo, M. B. C., & Sarachine, M. J. (2009). Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3, 46–66.

Ganesan, T., Subban, M., Christopher Leslee, D. B., Kuppannan, S. B., & Seedeivi, P. (2024). Structural characterization of n-hexadecanoic acid from the leaves of *Ipomoea*

eriocarpa and its antioxidant and antibacterial activities. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(13), 14547–14558. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03576-w>

García-Rodríguez, R. V., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A., Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz, M. Á., Vázquez-Hernández, M., Muñoz-Muñiz, O. D., & Cruz-Sánchez, J. S. (2014). *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.004>

George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. de. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background* (3rd Edition). Springer Netherlands Springer e-books.

Gethami, F. R. A., & Sayed, H. E. S. A. E. (2020). In vitro: Influence of Various Concentrations of Plant Growth Regulators (BAP & NAA) and Sucrose on Regeneration of *Chenopodium quinoa* Willd. *Plant. Asian Journal of Biology*, 34–43. <https://doi.org/10.9734/ajob/2020/v9i430095>

Gomes, F., Simões, M., Lopes, M. L., & Canhoto, J. M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology*, 27(6), 882–892. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.009>

Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>

Günther, A., Makuch, E., Nowak, A., Duchnik, W., Kucharski, Ł., Pelech, R., & Klimowicz, A. (2021). Enhancement of the Antioxidant and Skin Permeation Properties of Betulin and Its Derivatives. *Molecules*, 26(11), 3435. <https://doi.org/10.3390/molecules26113435>

Gupta, R., Sharma, A. K., Sharma, M. C., Dobhal, M. P., & Gupta, R. S. (2012).

Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of lupeol in experimental hyperglycaemia. *Natural Product Research*, 26(12), 1125–1129. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.560845>

Gürel, S., Gürel, E., & Kaya, Z. (2001). *Callus Development and Indirect Shoot Regeneration from Seedling Explants of Sugar Beet (Beta vulgarisL.) Cultured In Vitro*. 25(1), 25–33. <https://journals.tubitak.gov.tr/botany/vol25/iss1/4>

Guzmán, S. H., Díaz, R. S., & González, M. M. (2017). *PLANTAS MEDICINALES La realidad de una tradición ancestral* (Vol. 1). Progreso.

Handayani, Rd. S., Yunus, I., Sayuti, M., & Irawan, E. (2019). In-vitro Callus Induction of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Leaves Using Kinetin and 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid). *Journal of Tropical Horticulture*, 2(2), 59. <https://doi.org/10.33089/jthort.v2i2.23>

Hangarter, R. P., & Stasinopoulos, T. C. (1991). Effect of Fe-Catalyzed Photooxidation of EDTA on Root Growth in Plant Culture Media. *Plant Physiology*, 96(3), 843–847. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.843>

Haque, M. A., Nath, U. K., Ahmad, Q. N., & Alam, S. (2003). Effect of 2, 4-D and BAP on In vitro Regeneration of Garlic. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 2(12), 771–774.

Haque, S., Nawrot, D. A., Alakurtti, S., Ghemtio, L., Yli-Kauhaluoma, J., & Tammela, P. (2014). Screening and Characterisation of Antimicrobial Properties of Semisynthetic Betulin Derivatives. *PLoS ONE*, 9(7), e102696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102696>

Harborne, J. B. (1999). CLASSES AND FUNCTIONS OF SECONDARY PRODUCTS FROM PLANTS. En N. J. Walton & D. E. Brown, *Chemicals from Plants* (pp.

1–25). WORLD SCIENTIFIC / IMPERIAL COLLEGE PRESS.

https://doi.org/10.1142/9789812817273_0001

Hariram Nile, S., & Won Park, S. (2013). Optimized Methods for In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(1), 95–100. <https://doi.org/10.2174/138955713804484712>

Hashem, A. D., & Kaviani, B. (2010). *In Vitro Proliferation of an Important Medicinal Plant Aloe—A Method for Rapid Production*. 4(4), 216–222.

Hesar, A. A., Kaviani, B., Tarang, A., & Zanjani, S. B. (2011). *Effect of different concentrations of kinetin on regeneration of ten weeks (Matthiola incana)*. 4(5), 236–238.

Hossain, M. A., Rubel, M. H., Nasiruddin, K. M., & Evamoni, F. Z. (2016). Influence of BAP and NAA on in vitro plantlet regeneration of local and exotic banana cultivars. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 553–564. <https://doi.org/10.18801/jbar.060216.66>

Huang, P., Duan, X., Tang, Z., Zou, Z., Song, W., Gao, G., Li, D., Nie, F., Yan, X., Fu, Y., Guo, R., & Xu, Y. (2023). Betulinaldehyde exhibits effective anti-tumor effects in A549 cells by regulating intracellular autophagy. *Scientific Reports*, 13(1), 743. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27580-w>

Huang, S.-W., Frankel, E. N., & German, J. B. (1994). Antioxidant activity of .alpha.- and .gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2108–2114. <https://doi.org/10.1021/jf00046a007>

Hunaish, A. A., & Almasoody, M. M. (202d. C.). Induction of callus on various explants of arugula plant (*Eruca Sativa* Mill.) using the growth regulators (2,4-D and kinetin). *Plant Archives*, 20(2), 1654–1660.

Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., & Frukh, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: Strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *132*(2), 239–265. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>

Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., Chandra Shill, M., Karmakar, U. K., Yarla, N. S., Khan, I. N., Billah, M. M., Pieczynska, M. D., Zengin, G., Malainer, C., Nicoletti, F., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Apostolov, A., Banach, M., ... Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology*, *121*, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.032>

Jain, S. M., & Ochatt, S. J. (Eds.). (2010). *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants* (Vol. 589). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1>

Kadum Yakob, H., Manaf Uyub, Abd., & Fariza Sulaiman, S. (2012). Toxicological evaluation of 80% methanol extract of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven leaves (Onagraceae) in BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *142*(3), 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.035>

Kadum Yakob, H., Manaf Uyub, Abd., & Fariza Sulaiman, S. (2015). Immune-stimulating properties of 80% methanolic extract of *Ludwigia octovalvis* against Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in Balb/c mice following experimental infection. *Journal of Ethnopharmacology*, *172*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.006>

Karimian, R., Lahouti, M., & Davarpanah, S. J. (2014). Effects of Different Concentrations of 2, 4-D and Kinetin on Callogenesis of *Taxus Brevifolia* Nutt. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *1*(4), 167–170.

Kärkönen, A., Santanen, A., Iwamoto, K., & Fukuda, H. (2011). Plant Tissue Cultures. En Z. A. Popper (Ed.), *The Plant Cell Wall* (Vol. 715, pp. 1–20). Humana Press.

https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9_1

Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A., & Kishore, L. (2011). Stigmasterol: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research*, 2(9), 2259–2265.

Kaur, P., & Kothari, S. L. (2004). In vitro culture of kodo millet: Influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 73–79.

Kaviani, B. (2014). Micropropagation of ten weeks (*Matthiola incana*) and *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) (two ornamental plants) by using kinetin (KIN), naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Acta Scientiarum Polonorum*, 13(1), 141–154.

Kaviani, B., Hesar, A. A., & Kharabian-Masouleh, A. (2011). In vitro propagation of *Matthiola incana* (Brassicaceae)-an ornamental plant. *Plant Omics Journal*, 4(7), 435–440.

Kors, F. T. M. (Ed.). (2003). *Plant Cell and Tissue Culture, Phytopathology and Biochemicals*. DUCHEFA BIOCHEMIE B.V.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>

Le, K.-C., Jeong, C.-S., Lee, H., Paek, K.-Y., & Park, S.-Y. (2019). Ginsenoside accumulation profiles in long- and short-term cell suspension and adventitious root cultures in *Panax ginseng*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(1), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0108-x>

Lestari, K. D., Ni Wayan Deswiniyanti, Ida Ayu Astarini, & Luh Made Arpiwi.

(2019). Callus and shoot induction of leaf culture *Lilium longiflorum* with NAA and BAP. *Nusantara Bioscience*, *11*(2). <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n110209>

Liao, P.-C., Lai, M.-H., Hsu, K.-P., Kuo, Y.-H., Chen, J., Tsai, M.-C., Li, C.-X., Yin, X.-J., Jeyashoke, N., & Chao, L. K.-P. (2018). Identification of β -Sitosterol as in Vitro Anti-Inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(41), 10748–10759. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04555>

Lin, W.-S., Chen, J.-Y., Wang, J.-C., Chen, L.-Y., Lin, C.-H., Hsieh, T.-R., Wang, M.-F., Fu, T.-F., & Wang, P.-Y. (2014). The anti-aging effects of *Ludwigia octovalvis* on *Drosophila melanogaster* and SAMP8 mice. *AGE*, *36*(2), 689–703. <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9606-z>

Lin, W.-S., Lo, J.-H., Yang, J.-H., Wang, H.-W., Fan, S.-Z., Yen, J.-H., & Wang, P.-Y. (2017). *Ludwigia octovalvis* extract improves glycemic control and memory performance in diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *207*, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.044>

Liu, J.-K. (2022). Natural products in cosmetics. *Natural Products and Bioprospecting*, *12*(1), 40. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00363-y>

Lou-Bonafonte, J. M., Martínez-Beamonte, R., Sanclemente, T., Surra, J. C., Herrera-Marcos, L. V., Sanchez-Marco, J., Arnal, C., & Osada, J. (2018). Current Insights into the Biological Action of Squalene. *Molecular Nutrition & Food Research*, *62*(15), 1800136. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800136>

Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Yañez, J., Mojica, L., & Luna-Vital, D. A. (2021). Technological Applications of Natural Colorants in Food Systems: A Review. *Foods*, *10*(3), 634. <https://doi.org/10.3390/foods10030634>

Martínez, L. D., & De Halac, I. N. (1997). Callus induction in culture of *Oenothera*

hookeri and *Oenothera picensis* anthers. *Biologia plantarum*, 39(1), 11–16.
<https://doi.org/10.1023/A:1000980031227>

Maxwell, A. (1997). DNA gyrase as a drug target. *Trends in Microbiology*, 5(3), 102–109. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(96\)10085-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(96)10085-8)

Mayers, D. L. (Ed.). (2009). *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-595-8>

Mihaljević, S., Bjedov, I., Kovač, M., Leljak, D., & Jelaska, S. (2002). Effect of Explant Source and Growth Regulators on in vitro Callus Growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. *Food Technology and Biotechnology*, 40(4), 299–303.

Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31–42. <https://doi.org/10.12816/0025348>

Mohsen, A., Mohammad, A., Davood, A., & Nour, A. S. (2012). *Influence of sodium hypochlorite on seed germination and early seedling growth of rice (Oryza sativa L.) variety Tarum*. 13(1), 11–15.

Morales, D., Ramirez, G., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., Zavala, M., & Zamilpa, A. (2018). Identification of Digestive Enzyme Inhibitors from *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H.Raven. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/8781352>

Morales-Ferra, D. L., Zavala-Sánchez, M. Á., Jiménez-Ferrer, E., Trejo-Moreno, C., González-Cortazar, M., Gamboa-Gómez, C. I., Guerrero-Romero, F., & Zamilpa, A. (2023). Chemical Characterization, Antilipidemic Effect and Anti-Obesity Activity of *Ludwigia octovalvis* in a Murine Model of Metabolic Syndrome. *Plants*, 12(13), 2578. <https://doi.org/10.3390/plants12132578>

Morni, S., Onofrio, C. D., Bellocchi, G., & Fischella, M. (2000). Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 47–55.

Motmainna, Mst., Shukor B, A., Md. Kamal Uddin, J., Binti Asib, N., Mominul Islam, A., & Hasan, M. (2021). Assessment of allelopathic compounds to develop new natural herbicides: A review. *Allelopathy Journal*, 52(1), 21–40. <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2021-52-1-1305>

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Murkute, A. A., Patil, S., & Singh, S. K. (2004). *In vitro* regeneration in pomegranate cv. Ganesh from mature trees. 61(3), 206–208.

Naikwadi, P. H., Phatangare, N. D., & Mane, D. V. (2022). Active Anti-Inflammatory Potency of γ -Sitosterol from *Woodfordia floribunda* Salisb. *The Journal of Plant Science Research*, 38(2), 1–9. <https://doi.org/10.32381/JPSR.2022.38.02.4>

Nasim, N., Sandeep, I. S., & Mohanty, S. (2022). Plant-derived natural products for drug discovery: Current approaches and prospects. *The Nucleus*, 65(3), 399–411. <https://doi.org/10.1007/s13237-022-00405-3>

Nazir, S., Chaudhary, W. A., Mobashar, A., Anjum, I., Hameed, S., & Azhar, S. (2023). Campesterol: A Natural Phytochemical with Anti Inflammatory Properties as Potential Therapeutic Agent for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review: Campesterol: A Natural Phytochemical. *Pakistan Journal of Health Sciences*. <https://doi.org/10.54393/pjhs.v4i05.792>

Nazirwan, N., Wahyudi, A., Wahyuni, A., Yusanto, Y., & Maulinda, D. (2020).

Characterization of in Vitro Shoots Brassica oleracea Results of Cotyledon Explants Induction Using KIN and NAA. *Proceedings of the First International Conference on Applied Science and Technology (iCAST 2018)*. First International Conference on Applied Science and Technology (iCAST 2018), Manado, Indonesia. <https://doi.org/10.2991/assehr.k.200813.013>

Nor, H. H., Nor, A. M. A., Fadhilah, Z., & Haliza, I. (2011). Effect of 6-benzylaminopurine (BAP) in different basal media on shoot multiplication of *Aquilaria hirta* and detection of essential oils in the in vitro shoots. *African Journal of Biotechnology*, *10*(51), 10500–10503. <https://doi.org/10.5897/AJB11.121>

Novak, S. D., Luna, L. J., & Gamage, R. N. (2014). Role of Auxin in Orchid Development. *Plant Signaling & Behavior*, *9*(10), e972277. <https://doi.org/10.4161/psb.32169>

Oguh, C., Ogechi, O., Ubani, C., Okekeaji, U., Joseph Shaba, P., & Ugochukwu, E. (2019). *Natural Pesticides (Biopesticides) and Uses in Pest Management-A Critical Review*. *2*(3), 1–18.

Okere, A. U., & Adegeye, a. (2011). In vitro propagation of an endangered medicinal timber species *Khaya grandifoliola* C. Dc. *African Journal of Biotechnology*, *10*(17), 3335–3339. <https://doi.org/10.5897/AJB10.236>

Omar, R., Abdullah, M. A., Hasan, M. A., Rosfarizan, M., & Marziah, M. (2006). Kinetics and modelling of cell growth and substrate uptake in *Centella asiatica* cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *11*(3), 223–229. <https://doi.org/10.1007/BF02932034>

Pehlivan, E. C., Kunter, B., & Daneshvar, S. (2017). *Choise of Explant Material and Media for in vitro Callus Regeneration in Sultana Grape Cultivar (Vitis vinifera L.)*. *2*, 30–

34.

Phanse, M. A., Patil, M. J., Abbulu, K., Chaudhari, P. D., & Patel, B. (2012). In-vivo and in-vitro screening of medicinal plants for their anti-inflammatory activity: An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2704>

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>

Pierre, N. J., Christian, N. C., Flora, L.-Y. C., Jacques, Y., Catherine, K. P., Arnauld, K. E., Gisèle, E.-L., & Nicaise, A. J. (2022). Evaluation of the Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity of Endophytic Bacteria Extracts Isolated from *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P. H. Raven (Onagraceae). *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 70–75. <https://doi.org/10.36348/sjmps.2022.v08i02.005>

Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>

Pua, E.-C., Trinh, T. H., & Chua, N.-H. (1989). High frequency plant regeneration from stem explants of *Brassica alboglabra* Bailey in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17(2–3), 143–152. <https://doi.org/10.1007/BF00046859>

Rahman, N., Rosli, R., Kadzimin, S., & Hakimian, M. (2019). Auxin and Cytokinin Effects on Callus Induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental and Applied Agriculture*, 0, 1. <https://doi.org/10.5455/faa.54779>

Rai, A. C. (2022). *Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends*. Academic Press.

Ramasamy, K., Dhavamani, S., Natesan, G., Sengodan, K., Sengottayan, S.-N., Tiwari, M., Shivendra Vikram, S., & Perumal, V. (2021). A potential role of green engineered TiO₂ nanocatalyst towards enhanced photocatalytic and biomedical applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(30), 41207–41223. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13530-4>

Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., & Zamilpa, A. (2012). *In Vitro* Screening of Medicinal Plants Used in Mexico as Antidiabetics with Glucosidase and Lipase Inhibitory Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/701261>

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*, 21(2), 182. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>

Ramírez-Salcedo, H. E., Virgen-Calleros, G., Vargas-Radillo, J. de J., Salcedo-Pérez, E., & Barrientos-Ramírez, L. (2015). *Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hoja de Guazuma ulmifolia Lam. Contra fitopatógenos*. 6(27), 114–124. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000100010&lng=es&tlng=es

Rasool, R., Kamili, A. N., Ganai, B. A., & Akbar, S. (2009). Effect of BAP and NAA on Shoot Regeneration in *Prunella Vulgaris*. *Journal of Natural Sciences and Mathematics*, 3(1), 21–26.

Reis, R. S., Neves, I., Lourenço, S. L. S., Fonseca, L. S., & Lourenço, M. C. S. (2004).

Comparison of Flow Cytometric and Alamar Blue Tests with the Proportional Method for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin and Isoniazid. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2247–2248. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2247-2248.2004>

Reiter, E., Jiang, Q., & Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5–6), 668–691. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.01.003>

Ren, L., Niu, S., Sun, Y., Liang, Y., Zhao, J., Zhang, T., & Zhang, J. (2021). Anti-inflammatory action of betulin and its potential as a dissociated glucocorticoid receptor modulator. *Food and Chemical Toxicology*, 157, 112539. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112539>

Roberts, M. F., & Wink, M. (1998). *Alkaloids: Biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Plenum Press.

Rodríguez-Yoldi, M. J. (2021). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Plant Extracts. *Antioxidants*, 10(6), 921. <https://doi.org/10.3390/antiox10060921>

Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L., Huerta-Reyes, M., & Tortoriello-Garcia, J. (2009). *Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico*. 8, 5.

Salinas, R., Arellano-García, J., Perea-Arango, I., Álvarez, L., Garduño-Ramírez, M., Marquina, S., Zamilpa, A., & Castillo-España, P. (2014). Production of the Anti-Inflammatory Compound 6-O-Palmitoyl-3-O- β -D-glucopyranosylcampesterol by Callus Cultures of *Lopezia racemosa* Cav. (Onagraceae). *Molecules*, 19(6), 8679–8690. <https://doi.org/10.3390/molecules19068679>

Santa-María, C., López-Enríquez, S., Montserrat-de La Paz, S., Geniz, I., Reyes-

Quiroz, M. E., Moreno, M., Palomares, F., Sobrino, F., & Alba, G. (2023). Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients*, *15*(1), 224. <https://doi.org/10.3390/nu15010224>

Sarathi Kannan, D., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., & Venkatachalam, P. (2021). Antibacterial, Antibiofilm and Photocatalytic Activities of Biogenic Silver Nanoparticles from *Ludwigia octovalvis*. *Journal of Cluster Science*, *32*(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01784-w>

Sarveswaran, R., Jayasuriya, W. J. A. B. N., & Suresh, T. S. (2017). In vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts: A review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, *6*(17), 131–141.

Schneider, T., & Sahl, H.-G. (2010). An oldie but a goodie – cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(2–3), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.005>

SEMARNAT. (2019). *Plantas medicinales de México*. Gobierno de México. www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico

Setiaji, A., Annisa, R. R., Rumiayati, R., & Semiarti, E. (2020). Induction and Growth Kinetics Callus of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *12*(1), 35–41. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v12i1.21704>

Sharma, N. K., Vandana, Kumar, M., & Choudhary, R. C. (2013). Effect of 2, 4-D, BAP, KN, IAA and IBA on *in vitro* Regeneration of *Ocimum canum* Sims – An Important Hoary Basil Plant. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, *6*(3), 389. <https://doi.org/10.5958/j.2230-732X.6.3.008>

Sharma, N., Palia, P., Chaudhary, A., Shalini, Verma, K., & Kumar, I. (2020). A Review on Pharmacological Activities of Lupeol and its Triterpene Derivatives. *Journal of*

Drug Delivery and Therapeutics, 10(5), 325–332. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4280>

Sharry Sandra, A. M., Abedini Walter. (2015). *Plantas de Probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (Vol. 1). Editorial de la Universidad de La Plata.

Shubham, P., Sakshar, S., Srijan, P., Dipanjan, S., Sreya, D., Atanu, C., Ranabir, S., Gouranga, N., Achintyaa, S., Aditi, G., & Ritu, K. (2024). Antimicrobial activity, Phytochemical screening by HPTLC, FTIR and GC-MS of the extracts of *Cissus quadrangularis* (L.). *African Journal of Biomedical Research*, 27, 1203–1220. <https://doi.org/10.53555/AJBR.v27i1S.1212>

Sidek, N., Nulit, R., Kong, Y. C., Yien, C. Y. S., Sekeli, R., & EL-Barghathi, M. F. (2022). Callogenesis and somatic embryogenesis of *Oryza sativa* L. (cv. MARDI Siraj 297) under the influence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin. *AIMS Agriculture and Food*, 7(3), 536–552. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2022033>

Silva, A. C. O., Santana, E. F., Saraiva, A. M., Coutinho, F. N., Castro, R. H. A., Pisciotano, M. N. C., Amorim, E. L. C., & Albuquerque, U. P. (2013). Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/308980>

Silva, E. R. D., Simões, I. M., Baptista, J. O., Bighi, K. N., Fontes, M. M. P., Schmidt, E. R., Lopes, J. C., Caldeira, M. V. W., & Alexandre, R. S. (2019). IN VITRO GERMINATION OF MELANOXYLON BRAUNA SCHOTT. AND EVALUATION OF THE TOXICITY OF DISINFECTING AGENTS IN THE LACTUCA SATIVA L. MODEL PLANT. *CERNE*, 25(4), 375–385. <https://doi.org/10.1590/01047760201925042688>

Silva, N., & Fernandes Júnior, A. (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including*

Tropical Diseases, 16(3), 402–413. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>

Simões, C., Brasil Bizarri, C. H., Da Silva Cordeiro, L., Carvalho De Castro, T., Machado Coutada, L. C., Ribeiro Da Silva, A. J., Albarello, N., & Mansur, E. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(10), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.06.005>

Singh, N., & Sudha, M. L. (2024). Natural food flavours: A healthier alternative for bakery industry—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 61(4), 642–650. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05782-4>

Šmeringai, J., Schrumpfová, P. P., & Pernisová, M. (2023). Cytokinins – regulators of de novo shoot organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1239133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1239133>

Suarez, I. E. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.

Sundarasekar, J., Jeyanthi, J., James, A., Murugaiyah, V., & Subramaniam, S. (2012). Preliminary responses of 2, 4-D and BAP on callus initiation of an important medicinal-ornamental *Hymenocallis littoralis* plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(11). <https://doi.org/10.5897/JMPR11.790>

Süntar, I., Çetinkaya, S., Haydaroglu, Ü. S., & Habtemariam, S. (2021). Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: Biotechnological aspects. *Biotechnology Advances*, 50, 107768. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107768>

Taniguchi, S., Nakamura, N., Nose, M., Takeda, S., Yabu-uchi, R., Ito, H., Yoshida,

T., & Yazaki, K. (1998). Production of macrocyclic ellagitannin oligomers by *Oenothera laciniata* callus cultures. *Phytochemistry*, *48*(6), 981–985. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01007-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01007-8)

Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica* (Vol. 36). Chapingo.

Thiripurasundari, U., & Rao, M. V. (2012). Indirect organogenesis from nodal explants of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Biotechnology*, *11*, 352–354.

UNAM. (2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=ludwigia-octovalvis

Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*, *136*(6), 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, *9*(10), 2041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>

Varshney, N., Jain, D., Janmeda, P., & Mitra, D. (2021). *Role of medicinal plants in pharmaceutical sector: An overview*. *10*(2), 18–24.

Venkatesan, J., Ramu, V., Sethuraman, T., Sivagnanam, C., & Doss, G. (2022). Assessing the genetic fidelity of somatic embryo-derived plantlets of finger millet by random amplified polymorphic DNA analysis. *Biotechnology Letters*, *44*(12), 1379–1387. <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03305-3>

Villa-Ruano, N., Zurita-Vásquez, G. G., Pacheco-Hernández, Y., Betancourt-

Jiménez, M. G., Cruz-Durán, R., & Duque-Bautista, H. (2013). Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biological Research*, 46(2), 153–160. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000200006>

Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 65–70. <https://doi.org/10.1038/nrmicro727>

Wang, Y.-C., & Huang, T.-L. (2005). Screening of anti- *Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 43(2), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.09.008>

Wawrosch, C., & Zotchev, S. B. (2021). Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—Status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6649–6668. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>

Wu, S.-J., Ng, L.-T., Wang, G.-H., Huang, Y.-J., Chen, J.-L., & Sun, F.-M. (2010). Chlorophyll a, an active anti-proliferative compound of *Ludwigia octovalvis*, activates the CD95 (APO-1/CD95) system and AMPK pathway in 3T3-L1 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 716–721. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.001>

Yakob, H. K., Sulaiman, S. F., & Uyub, A. M. (2012). *Antioxidant and Antibacterial Activity of Ludwigia octovalvis on Escherichia coli O157:H7 and Some Pathogenic Bacteria*.

Yan, C., Huang, B., Han, L., & Li, S. (2015). Optimization of induction, subculture conditions, and growth kinetics of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels callus. *Pharmacognosy Magazine*, 11(43), 574. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.160443>

Yan, J., & Yang, X.-W. (2005). [Studies on the chemical constituents in herb of *Ludwigia octovalvis*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 30(24), 1923–1926.

Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>

Yang, S., Chou, G., & Li, Q. (2018). Cardioprotective role of azafrin in against myocardial injury in rats via activation of the Nrf2-ARE pathway. *Phytomedicine*, 47, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.042>

Yildiz, M., & Ekiz, H. (2014). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and regeneration capacity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hypocotyl explants. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(7), 1161–1164. <https://doi.org/10.4141/cjps2013-250>

Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, 89(6), 259–261. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6>

Yuan, Z., Duan, H., Xu, Y., Wang, A., Gan, L., Li, J., Liu, M., & Shang, X. (2014). α -Tocospire C, a novel cytotoxic α -tocopheroid from *Cirsium setosum*. *Phytochemistry Letters*, 8, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.02.007>

Zhao, L., Chen, J., Su, J., Li, L., Hu, S., Li, B., Zhang, X., Xu, Z., & Chen, T. (2013). In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of 5-Hydroxymethylfurfural. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10604–10611. <https://doi.org/10.1021/jf403098y>

Zheng, M. Y., & Konzak, C. F. (1999). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 19, 69–73.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00312

Matricula: 2223801823

Estudio comparativo de la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana de extractos orgánicos de planta silvestre y cultivos-in vitro de *Ludwigia octovalvis* (jacq.) P.H. Raven.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 17:00 horas del día 4 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DRA. MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES
DRA. MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA
DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: STEPHANY ABIGAIL TADEO CUENCA



STEPHANY ABIGAIL TADEO CUENCA
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DRA. MARIA CRYSTAL COLUMBA
PALOMARES

VOCAL

DRA. MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA

SECRETARIA

DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS