



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**“Establecimiento de cultivos de callo de *Erigeron canadensis* y
evaluación de su actividad antioxidante y antimicrobiana”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

Andrea Ruiz Betancourt

Matrícula: 2223801912. Correo: andy.ruba.07@gmail.com

Director:

Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesores:

Dra. Mariana Sánchez Ramos

Dra. María Crystal Columba Palomares

Jurado:

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero

Secretaria: Dra. Mariana Sánchez Ramos

Vocal: Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo

Vocal: Dra. Virginia Mandujano González

Ciudad de México a 11 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)

1255013



Ciudad de México, a 11 de noviembre del 2024

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

Establecimiento de cultivos de callo de *Erigeron canadensis* y evaluación de su
actividad antioxidante y antimicrobiana

que presentó
Andrea Ruiz Betancourt

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dra. Mariana Sánchez Ramos

Asesor: Dra. María Crystal Columba Palomares

Jurado:

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero

Secretario: Dra. Mariana Sánchez Ramos

Vocal: Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo

Vocal: Dra. Virginia Mandujano González

AGRADECIMIENTOS:

- A, *mi familia*, por el apoyo brindado durante todo mi desarrollo académico y personal, principalmente a mi madre Alejandra por ser mi soporte y estar siempre presente para brindarme su ayuda en todos los aspectos de mi vida.
- A, *los docentes*, que contribuyeron en mi formación académica y profesional, Mariana Sánchez, Elizabeth Negrete, Virginia Mandujano, Crystal Columba y Silvia Marquina.
- A, *mis compañeros de laboratorio*, Ricardo Cocoltzi y Karen Estefes que participaron activamente en el mantenimiento de las líneas de cultivo *in vitro* y actividades de laboratorio.
- A, *mis amigos*, Abigail Tadeo, Ricardo Cocoltzi, Karen Estefes, Hana Bello, Ricardo Alvarado, Ivonne Barrios, Isabel Ayala, Natalia Medrano, Carlos Flores, Juan Pablo Díaz, Jonathan González, Jennifer Martínez, Fabiola Hernández y Luis Fuentes.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES A:

- *Laboratorio de fitoquímica* del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) a cargo de la M. en C. Silvia Marquina Bahena por el apoyo en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- *Laboratorio de fitoquímica* del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) donde el Dr. Manasés González Cortazar procesó las muestras de extracto orgánico mediante HPLC.
- *Laboratorio de Investigación Farmacéutica* de la Facultad de Química de la UAEM en el cual se realizó la evaluación de la actividad antioxidante bajo la supervisión de la Dra. Valery Domínguez Villegas.
- *Departamento de Biotecnología* de la Universidad Tecnológica Corregidora (UTC) por prestar sus instalaciones para la evaluación de la actividad antimicrobiana en colaboración con la Dra. Virginia Mandujano González.
- *Laboratorio de Química de Productos Naturales* de la Facultad de Farmacia de la UAEM a cargo de la Dra. María Crystal Columba Palomares por colaborar en la evaluación de la actividad antimicrobiana.
- *Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica* de la Facultad de Medicina de la UAEM por facilitar la evaluación del efecto cicatrizante con la participación del Dr. Juan José Acevedo Fernández y la Dra. Elizabeth Negrete León.

RESUMEN

Erigeron canadensis es una especie vegetal de la cual no se han explorado a profundidad los compuestos químicos que es capaz de producir, dado que es una especie que ha sido catalogada como invasora en Europa y Asia, situación que ha llevado a investigar sus formas de control más que sus propiedades medicinales, entre las cuales se encuentran reportados sus efectos antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, entre otras. Por otra parte, en México es una especie nativa que no ha sido investigada por sus efectos medicinales, a pesar de ser empleada en el tratamiento tradicional de fiebre y problemas estomacales.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer cultivos *in vitro* de callo de la especie para estandarizar la producción de los compuestos encontrados en la planta silvestre y determinar la actividad biológica de los extractos orgánicos de polaridad creciente de hojas y tallos de la planta silvestre mexicana. Para ello, el material vegetal se colectó en el Estado de Morelos, se realizó la identificación taxonómica, y posteriormente se estableció el cultivo *in vitro* de callos para la extracción de compuestos bioactivos. Los extractos obtenidos de la planta silvestre fueron analizados por CCF (cromatografía en capa fina), GC-MS (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) y HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución), mientras que los extractos de los cultivos de callo se analizaron por CCF. Además, se realizó la evaluación del potencial antioxidante, antibacteriano y antifúngico *in vitro* de los extractos de la planta silvestre, así como la evaluación del efecto cicatrizante en un modelo *in vivo*, no realizada anteriormente.

El medio de cultivo MS sólido permitió la germinación de un 67-100% de las semillas desinfectadas con etanol 70% y NaClO 0.1%, para la inducción de callo se tomaron explantes

de hoja, internodo y raíz de las plántulas obtenidas, dichos explantes se inocularon en medio MS sólido con los RCV (PIC, KIN, BAP), mediante la aplicación de un diseño experimental de 18 tratamientos, destacando el explante de internodo y los tratamientos T5 (0.1 mg/L PIC + 1.0 mg/L BAP) y T6 (0.1 mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP) que indujeron callo friable capaz de sobrevivir los subcultivos consecutivos en un 96.75% y 87.5%, respectivamente. Los tratamientos T5 y T6 fueron sometidos a cambios en su composición de la fuente de carbono (sacarosa 3 y 5% p/v y glucosa 3% p/v) y porcentaje de sales basales del medio MS (100, 75, 50 y 25% p/v) con la finalidad de mejorar la friabilidad del callo y reducir su oxidación, observándose mayor producción de biomasa a los 21 días de cultivo cuando el medio MS se encuentra al 100% de su concentración en las fuentes de carbono empleadas (sacarosa al 3 y 5 %, glucosa al 3%) y mayor consistencia friable en los tratamientos con sacarosa y glucosa al 3%.

Paralelamente, se exploró la fitoquímica de la planta silvestre, se obtuvieron extractos seriados en polaridad creciente (*n*-hexano, acetato de etilo y metanol) de las hojas y los tallos, lo que permitió comparar la producción de compuestos por órgano de la planta (CCF y HPLC) e identificar los compuestos menos polares y su abundancia relativa (GC-MS), entre los que se encuentran el fitol, cubebeno, farneseno, diferentes ácidos grasos y la 8-metilcumarina, que no ha sido reportada con anterioridad para la especie. Estos compuestos podrían estar presentes también en las líneas de callo debido a que los perfiles por CCF de la planta silvestre y líneas de callo exhiben compuestos mayoritarios similares.

En cuanto a la actividad biológica de los extractos orgánicos de la planta silvestre, destaca el extracto de tallo de polaridad media a 1000ppm que muestra efecto antioxidante mediante la prueba de DPPH. Mientras que el extracto de hoja de polaridad media presenta la CMI más baja, de 62.5 µg/mL contra *Streptococcus pyogenes*, el extracto de tallo de polaridad baja fue el único

que inhibió *Pseudomonas aeruginosa* y el de polaridad media inhibió *Staphylococcus aureus* (incluida una cepa resistente) con un CIM de 500 µg/mL y de 125 µg/mL, respectivamente, los extractos de hoja de polaridad baja y media tuvieron actividad antifúngica (*Candida albicans*), particularmente el extracto de polaridad baja a 100 mg/mL muestra el halo de mayor tamaño (20.02mm) y similar al del control positivo (Fluconazol). No se demostró la actividad cicatrizante de los extractos de tallo de polaridad alta y de hoja de polaridad media.

Finalmente, se concluye que *E. canadensis* posee propiedades medicinales que requieren ser investigadas a mayor profundidad y continuar la investigación fitoquímica para determinar los compuestos responsables de las actividades biológicas observadas, así como la investigación biotecnológica para mantener la producción estable de compuestos de interés e investigación de compuestos producidos *in vitro*, además de evaluar la actividad biológica de los extractos de callo, ya que su composición química podría ser distinta a la de la planta silvestre y por tanto variar en su actividad biológica.

ABSTRACT

Erigeron canadensis is a plant species whose chemical compounds have not been investigated in depth since it is considered an invasive species in Europe and Asia, situation that has already led to research into its growth control rather than its medicinal effects, among which its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and other effects were reported. Besides, in Mexico it is a native species that has not been investigated for its medicinal effects, despite being used in traditional medicine to treat fever and stomach illnesses.

The objective of this study was establishing *in vitro* callus cultures of this species to standardize the production of compounds founded in the wild plant and determine the biological activity of the organic extracts of growing polarity from leaves and stems of Mexican wild plant. For this purpose, the plant material was collected in Morelos State, it has been used in the taxonomic identification, and subsequently the establishment of *in vitro* callus cultures for the extraction of bioactive compounds. The extracts obtained from the wild plant were analyzed by CCF (thin layer chromatography), GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) and HPLC (high performance liquid chromatography), while the extracts from callus were analyzed by TLC. In addition, the evaluation of the antioxidant, antibacterial and antifungal potential *in vitro* of the wild plant was carried out, as well as the evaluation of wound healing effect in an *in vivo* model, not previously carried out.

The solid MS medium allowed the germination of 67-100% of seeds disinfected with 70% ethanol and 0.1% NaClO, for callus induction, leaf, internode and root explants were taken from seedlings obtained. These explants were inoculated in MS solid media with plant growth regulators (PIC, KIN, BAP), through an experimental design of 18 treatments, highlighting the

internode explant and the treatments T5 (0.1 mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP) and T6 (0.1 mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP) for its ability to induce callus capable of survive consecutive subcultures in 96.75% and 93.33%, respectively. The treatments T5 and T6 were subjected to changes in their carbon source (sucrose and glucose) and MS salt concentrations (100, 75, 50 and 25%) to improve its friability and reduce oxidation, greater biomass production was observed after 21 days of culture when MS medium is at 100% of its salts in every carbon source (sucrose 3 and 5%, glucose 3%), also the friability were higher in treatments with sucrose and glucose at 3%.

In parallel, the phytochemistry of the wild plant were explored, serial extracts of increasing polarity (*n*-hexane, ethyl acetate and methanol) were obtained from leaves and stems, which allowed us to compare the production of organic compounds by TLC and HPLC and identified the least polar compounds and their relative abundance by GC-MS, among which are phytol, cubebene, farnesene, different fatty acids and 8-methylcoumarin, which has not been previously reported for the species. These compounds could also be present in the callus cultures because the TLC profiles of the wild plant and callus exhibit similar mainly compounds.

Regarding the biological activity of the organic extracts of the wild plant, the medium polarity stem extract at 1000 ppm has antioxidant effect through DPPH. While the medium polarity leaf extract has the lowest MIC of 62.5 µg/mL against *Streptococcus pyogenes*, the low polarity stem extract was the only one that inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and the medium polarity stem extract inhibits *Staphylococcus aureus* with MICs of 500 and 125 µg/mL, respectively, the low and medium polarity leaf extracts had antifungal activity against *Candida albicans*, particularly the low polarity extract at 100 mg/mL showed an inhibition halo of 20.02 mm, similar to positive control (Fluconazole). The wound healing effect were not demonstrated to high polarity steam extract and medium polarity leaf extract.

Finally, it is concluded that *E. candensis* has medicinal properties that require further investigations and continued the phytochemical research to determine the compounds responsible for the observed biological effects, as well the biotechnological research to maintain the stable production of bioactive compounds and investigate the compounds produced *in vitro*, as well as evaluate the biological activity of callus extracts, because its chemical composition could be different to the wild plant, so the biological activity could be different too.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO	3
2.2.	COMPUESTOS BIOACTIVOS	4
2.2.1.	<i>Clasificación de compuestos bioactivos</i>	5
2.2.2.	<i>Actividad antioxidante de compuestos</i>	7
2.2.3.	<i>Actividad antimicrobiana de compuestos</i>	10
2.2.4.	<i>Actividad cicatrizante de compuestos</i>	12
2.3.	CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES	14
2.3.1.	<i>Cultivos de callo</i>	18
2.3.2.	<i>Cultivo de células en suspensión</i>	20
2.4.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	22
3.	ANTECEDENTES	25
3.1.	<i>ERIGERON CANADENSIS</i> L.	25
3.2.	ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE <i>E. CANADENSIS</i>	27
4.	JUSTIFICACIÓN	35
5.	HIPÓTESIS	35
6.	OBJETIVOS	36
7.	MÉTODO	37
7.1.	COLECTA MATERIAL VEGETAL	37
7.2.	PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	37
7.3.	INDUCCIÓN DE CALLO	39
7.4.	EXTRACTOS ORGÁNICOS DE PLANTA SILVESTRE Y BIOMASA DE CULTIVOS DE CALLO	41
7.5.	PERFILES CROMATOGRÁFICOS	43
7.5.1.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	43

7.5.2.	<i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)</i>	43
7.5.3.	<i>Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)</i>	44
7.6.	EVALUACIONES BIOLÓGICAS	44
7.6.1.	<i>Pruebas in vitro</i>	45
7.6.2.	<i>Pruebas in vivo</i>	48
7.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
8.1.	MATERIAL VEGETAL	51
8.2.	PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	53
8.2.1.	<i>Desinfección</i>	53
8.2.2.	<i>Propagación</i>	55
8.3.	INDUCCIÓN DE CALLO	57
8.3.1.	<i>Efecto de las modificaciones al T5 y T6 sobre los callos</i>	62
8.4.	EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LA PLANTA SILVESTRE	68
8.5.	PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE HOJAS Y TALLOS DE LA PLANTA SILVESTRE	70
8.5.1.	<i>Perfiles cromatográficos por CCF</i>	70
8.5.2.	<i>Análisis de los extractos de la planta silvestre por GC-MS</i>	73
8.5.3.	<i>Análisis fitoquímico de extractos de la planta silvestre por HPLC</i>	88
8.6.	PERFILES CROMATOGRÁFICOS EN CAPA FINA DE LOS CULTIVOS DE CALLO	91
8.7.	EVALUACIONES BIOLÓGICAS	97
8.7.1.	<i>Pruebas in vitro</i>	97
8.7.2.	<i>Pruebas in vivo</i>	105
9.	CONCLUSIONES	109
10.	PERSPECTIVAS	111
11.	ANEXOS	112
	ANEXO 1. EVENTOS ACADÉMICOS EN LOS QUE FUE PRESENTADO EL PROYECTO	112

12.	REFERENCIAS.....	113
-----	------------------	-----

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de compuestos bioactivos.....	6
Figura 2. Cultivo in vitro de plantas.....	15
Figura 3. Callo friable en condiciones in vitro.....	19
Figura 4. Cultivo de células en suspensión.....	21
Figura 5. Distribución de <i>E. canadensis</i>	25
Figura 6. Estados de la República Mexicana donde se utiliza <i>E. canadensis</i>	26
Figura 7. <i>E. canadensis</i>	27
Figura 8. Ácidos fenólicos identificados en <i>E. canadensis</i>	34
Figura 9. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>E. canadensis</i>	34
Figura 10. Resumen de los resultados.....	51
Figura 11. Sitios de colecta de <i>E. canadensis</i>	52
Figura 12. Ejemplares de <i>E. canadensis</i> in situ.....	52
Figura 13. Diferencias morfológicas de las plántulas obtenidas.....	54
Figura 14. Desarrollo de las plántulas de <i>E. canadensis</i> in vitro.....	56
Figura 15. Inicio de la formación de callo.....	59
Figura 16. Callo obtenido de internodo.....	59
Figura 17. Tejido calloso oxidado.....	61
Figura 18. Organogénesis indirecta en los cultivos T5 y T6.....	61
Figura 19. Oxidación del tejido de los tratamientos con medio MS 25%.....	66
Figura 20. Tratamientos T5 con mayor producción de biomasa y acumulación de agua.....	67
Figura 21. Tratamientos T6 con mayor producción de biomasa y acumulación de agua.....	67
Figura 22. Placas cromatográficas de las colectas de planta silvestre.....	68
Figura 23. Apariencia de los extractos orgánicos obtenidos de la planta silvestre.....	70
Figura 24. Perfiles cromatográficos de los extractos de hexano de hoja y tallo.....	71
Figura 25. Perfiles cromatográficos de los extractos de AcOEt de hoja y tallo.....	72
Figura 26. Perfiles cromatográficos de los extractos de metanol de hoja y tallo.....	73

Figura 27. Estructuras de los compuestos presentes en los extractos de hexano de la planta silvestre identificados por GC-MS.....	76
Figura 28. Cromatograma (GC-MS) del extracto hexánico de hoja	80
Figura 29. Cromatograma (GC-MS) del extracto hexánico de tallo.....	81
Figura 30. Estructuras de los compuestos presentes en los extractos de AcOEt de la planta silvestre identificados por GC-MS.....	82
Figura 31. Cromatograma (GC-MS) del extracto de AcOEt de hoja de la planta silvestre.....	84
Figura 32. Estructuras de los compuestos presentes en los extractos de metanol de la planta silvestre identificados por GC-MS.....	85
Figura 33. Cromatograma (GC-MS) del extracto metanólico de hoja (polaridad alta).....	87
Figura 34. Cromatograma (GC-MS) del extracto metanólico de tallo (polaridad alta).....	87
Figura 35. CCF de los extractos de polaridad media y alta de la planta silvestre.....	88
Figura 36. Cromatogramas (HPLC, UV ₃₂₅) de los extractos obtenidos con AcOEt de la planta silvestre.....	89
Figura 37. Cromatogramas (HPLC, UV ₃₂₅) de los extractos obtenidos con MeOH de la planta silvestre.....	90
Figura 38. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T5 (extracción con hexano).....	92
Figura 39. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T6 (extracción con hexano).....	92
Figura 40. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T5 (extracción con AcOEt).....	93
Figura 41. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T6 (extracción con AcOEt).....	94
Figura 42. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T5 (extracción con MeOH).....	95
Figura 43. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T6 (extracción con MeOH).....	96
Figura 44. Ensayo MTT de los extractos orgánico de la planta silvestre.....	102
Figura 45. Reducción de la incisión dorsal.....	107

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Solventes comúnmente utilizados en la extracción de compuestos bioactivos.....	22
Tabla 2. Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....	23
Tabla 3. Resumen de estudios fitoquímicos y biológicos de <i>E. canadensis</i>	29
Tabla 4. Tratamientos de desinfección de semillas.....	38
Tabla 5. Composición del medio MS utilizada.....	38
Tabla 6. Balances hormonales para inducción a callo.....	40
Tabla 7. Porcentaje de desinfección y germinación de las semillas.....	53
Tabla 8. Formación de callo al finalizar los 30 días de cultivo por explante.....	57
Tabla 9. Peso de la biomasa fresca de los callos por tratamiento al día 21.....	63
Tabla 10. Peso de la biomasa seca de los callos por tratamiento al día 21.....	64
Tabla 11. Porcentaje de acumulación de agua en los callos por tratamiento al día 21.....	65
Tabla 12. Peso y rendimiento de los extractos seriados obtenidos de la planta silvestre.....	69
Tabla 13. Compuestos encontrados en los extractos de hexano de la planta silvestre mediante GC-MS.....	74
Tabla 14. Compuestos encontrados en los extractos de AcOEt de la planta silvestre mediante GC-MS.....	81
Tabla 15. Compuestos encontrados en los extractos de metanol de la planta silvestre mediante GC-MS.....	84
Tabla 16. Efecto antioxidante de los extractos orgánicos de tallo y hoja de la planta silvestre.....	98
Tabla 17. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de la planta silvestre sobre <i>Candida albicans</i>	101
Tabla 18. Efecto antibacteriano de los extractos orgánicos de la planta silvestre.....	103
Tabla 19. Reducción de la herida por el extracto de Tallo-MeOH en modelo de cicatrización en ratones CD1 machos.....	106
Tabla 20. Reducción de la herida por el extracto de Hoja-AcOEt en un modelo de cicatrización en ratones CD1 machos.....	106

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AA	Ácido araquidónico
ABTS	2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFA	Ácido feliacético
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano (Cloruro de metileno)
CIBIS	Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Hex	<i>n</i> -Hexano
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IFN	Interferón
IL	Interleucina
KIN	Kinetina
MeOH	Metanol
MH	Medio Mueller-Hinton
MS	Medio Murashige & Skoog
MTT	Azul tetrazolio (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuo)
NaClO	Hipoclorito de sodio
NF-κB	Factor nuclear kappa B

Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
PIC	Picloram
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
Rf	Factor de retención
RT	Tiempo de retención
SCA	Sulfato cérico amoniacal
TDZ	Thidiazuron
TNF	Factor de necrosis tumoral
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTC	Universidad Tecnológica Corregidora

1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales han sido utilizadas desde los inicios de la civilización como alimento, fuente de fibras textiles y medicina (1,2), también como venenos o alucinógenos, que hoy en día son aprovechado en la industria farmacológica (3).

Las plantas consideradas medicinales son aquellas especies que poseen compuestos que pueden ejercer diversas actividades biológicas, las cuales impactan de manera benéfica sobre la salud humana, por lo que son apreciados en la medicina tradicional y moderna, así como en la industria cosmética y nutracéutica, además de ser ampliamente utilizadas por la población debido a su accesibilidad y eficacia a precios más bajos que medicamentos sintéticos (4).

Para el estudio científico de estos usos empíricos han surgido disciplinas como la *Fitomedicina* que estudia las especies vegetales y sus extractos en la medicina alternativa o complementaria (3), la *Fitoterapia* que evalúa la eficiencia y los efectos de los productos obtenidos de las plantas y sus propiedades curativas, sin embargo, es la *Fitofarmacología* la disciplina que se encarga de demostrar científicamente los efectos de los extractos vegetales estandarizados (5) y la *Etnofarmacología* que documenta la herencia cultural del conocimiento empírico de las preparaciones tradicionales (remedios herbolarios o mezclas galénicas) (6).

Las propiedades curativas de las plantas se han atribuido a los metabolitos secundarios que producen (1), ya que pueden ejercer efectos farmacológicos y/o toxicológicos en tejidos vivos, es decir, son compuestos bioactivos (7,8).

Es importante diferenciar que los metabolitos primarios cumplen funciones elementales en el desarrollo y crecimiento de la planta (1,9), mientras que los secundarios poseen funciones de defensa y adaptación al entorno, por lo que son aprovechados por su potencial terapéutico (2), a pesar de que estos son producidos en menor cantidad que los primarios, algunos son particulares

de ciertos grupos vegetales por lo que son importantes herramientas quimio-taxonómicas y de otros sus funciones son aún desconocidas (1,9,10).

Por otro lado, alrededor del 25% de los principios activos empleados en medicamentos alopáticos han sido sintetizados total o parcialmente de plantas con potencial medicinal, lo que ha incrementado los esfuerzos científicos para conocer los efectos farmacológicos y tóxicos de las especies vegetales, encontrar alternativas más económicas de producción y compuestos efectivos contra microorganismos resistentes a las terapias alelopáticas (11,12).

Sin embargo, la fitomedicina aún debe superar limitantes en cuanto la producción de los extractos herbales, con base en su caracterización química, conservación de la diversidad biológica y biocultural, documentación sobre efectos terapéuticos o tóxicos de los extractos puros o en combinación, cambios en los fitoquímicos, interacción con otros fármacos, estandarización de la producción y ajuste de dosis (5,13).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Plantas medicinales en México

En nuestro país, Martín de la Cruz escribió el *Herbario azteca* en el siglo XVI, después conocido como el *Códice de la Cruz-Badiano*, el cual contiene la descripción de usos terapéuticos y psicoactivos de 251 plantas mexicanas (6,10,14). Por otra parte, en el código *Florentino* se encuentran reportadas especies vegetales para tratar infecciones ocasionadas por bacterias y parásitos intestinales (10,14). Actualmente se encuentran 3103 registros de especies medicinales utilizadas en nuestro país en el *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana* (15), sin embargo, el conocimiento sobre composición química, toxicidad y efectividad de dosis es aún limitado (16).

Se calcula que las plantas medicinales de México representan el 15% (alrededor de 4 mil especies) del total de la flora mexicana, de éstas, tan solo el 5% cuenta con análisis farmacológicos y 250 especies son comercializadas de forma cotidiana, sin embargo, el 85% de estas son extraídas del medio natural sin planes de manejo y del 80-90% de la población mexicana hace uso de ellas (17).

Por otra parte, la regulación para el uso de productos a base de plantas medicinales en México está a cargo de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), ante la cual es necesario probar que el producto es seguro y eficaz (medicamentos herbolarios), sin embargo, la evidencia científica detrás de sus efectos o fórmula pocas veces es reportada (11), a pesar de que se cuenta con normas para la fabricación (NOM-164-SSA1-2015, NOM-059-SSA1-2015, NOM-248-SSA1-2011), etiquetado (NOM-072-SSA1-2012), así como métodos de análisis y especificaciones de plantas y sus derivados para ser utilizados como medicamentos y remedios herbolarios en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) (15).

Respecto a los Medicamentos Herbolarios (MH), estos son productos elaborados con material vegetal o sus derivados, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente (18). Algunos ejemplos de especies que forman parte de las principales formulaciones de los MH son: ajo (*Allium sativum*), gayuba (*Arctostaphylos uva ursi*), caléndula (*Callendula officinalis*), equinácea (*Echinacea purpurea*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), pasionaria (*Passiflora incarnata*) y uva (*Vitis vinífera*) (15).

Por otro lado, los Remedios Herbolarios (RH) son preparaciones de partes o derivados de plantas, que se les atribuyen propiedades medicinales por conocimiento tradicional (19). Entre las especies más reportadas en la herbolaria se encuentran: toronjil (*Agastache mexicana*), bugambilia (*Bougainvillea glabra*), equiseto (*Equisetum myriochaetum*), gordolobo (*Gnaphalium oxypyllum*), sauco (*Sambucus mexicana*), nopal (*Opuntia ficus indica*) y valeriana (*Valeriana mexicana*) (15).

Sin embargo, existen otras especies utilizadas en el país dentro de la medicina herbolaria como tratamiento alternativo, como son el árnica (*Heteroteca inuloides* y *Arnica montana*) usada como antiinflamatorio, antimicrobiano y para tratar dolores reumáticos; otro ejemplo, la manzanilla (*Matricaria chamomilla* y *Chamaemelum nobile*) empleada en el tratamiento de problemas gastrointestinales e inflamación; el estafiate (*Artemisia ludoviciana*) como remedio para problemas estomacales; la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala*) usada en el tratamiento de tumores; la cola de caballo (*Equisetum hyemale*) para tratar males renales y de estómago; el gordolobo (*Gnaphalium oxypyllum*) como tratamiento contra el asma y bronquitis (20,21).

2.2. Compuestos bioactivos

Como ya se mencionó anteriormente, las plantas son capaces de producir una gran diversidad de compuestos que no cumplen roles fundamentales en el ciclo de vida de la planta, pero si participan en la adaptación y defensa ante factores bióticos y abióticos, además, brindan

características propias como olor, sabor, color y consistencia, estos compuestos son llamados metabolitos secundarios y son apreciados en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y agroquímica (4,12,22).

Su producción está regulada mediante reguladores del crecimiento vegetal (RCV), lo que permite a la planta tener respuestas de defensa como la acumulación de otros compuestos en ciertos tejidos, activación de rutas metabólicas, reducción del crecimiento, regulación de la apertura de estomas y floración (23), a su vez, la producción de estos compuestos se ve afectada por las condiciones ambientales y estacionales (temperatura, radiación UV, humedad, químicos, relaciones con hongos, insectos y otros herbívoros, competencia con otras especies vegetales) (4,8), lo que resulta en un bajo rendimiento, frecuentemente menor al 1%; con la finalidad de incrementar el rendimiento se utilizan técnicas biotecnológicas para el cultivo de tejidos vegetales y extracción de compuestos, lo que permite la conservación de especies (12,22,24) y suplir la creciente demanda de medicamentos derivados de plantas, cuyo mercado fue valuado en 32,808.94 millones USD en 2023 y se espera aumente a 45,401.52 millones USD para 2030 (25).

2.2.1. Clasificación de compuestos bioactivos

Estos compuestos pueden clasificarse considerando las clases químicas y rutas de síntesis, teniendo 3 grupos principales: terpenos y terpenoides producidos por las rutas del ácido mevalónico (MVA) y del metileritrol fosfato (MEP), alcaloides producidos por la ruta del ácido shikímico, y compuestos fenólicos producidos por la vía MVA y del ácido shikímico (2); en la actualidad, se han aislado e identificado las estructuras de aproximadamente 25,000 terpenoides, 12,000 compuestos sulfurados y alcaloides y 8,000 fenoles y polifenoles (1).

Entre los compuestos bioactivos que se pueden encontrar en las plantas están los terpenos y terpenoides (compuestos más abundantes), fenilpropanoides (de los que se componen los fenoles

o compuestos fenólicos como son los ácidos fenólicos, estilbenoides, cumarinas, taninos y flavonoides), alcaloides, glicósidos (proviene de otras rutas metabólicas, pero se les adicionan azúcares en algún paso de la síntesis), saponinas y quinonas (Figura 1) (1,7,26,27).

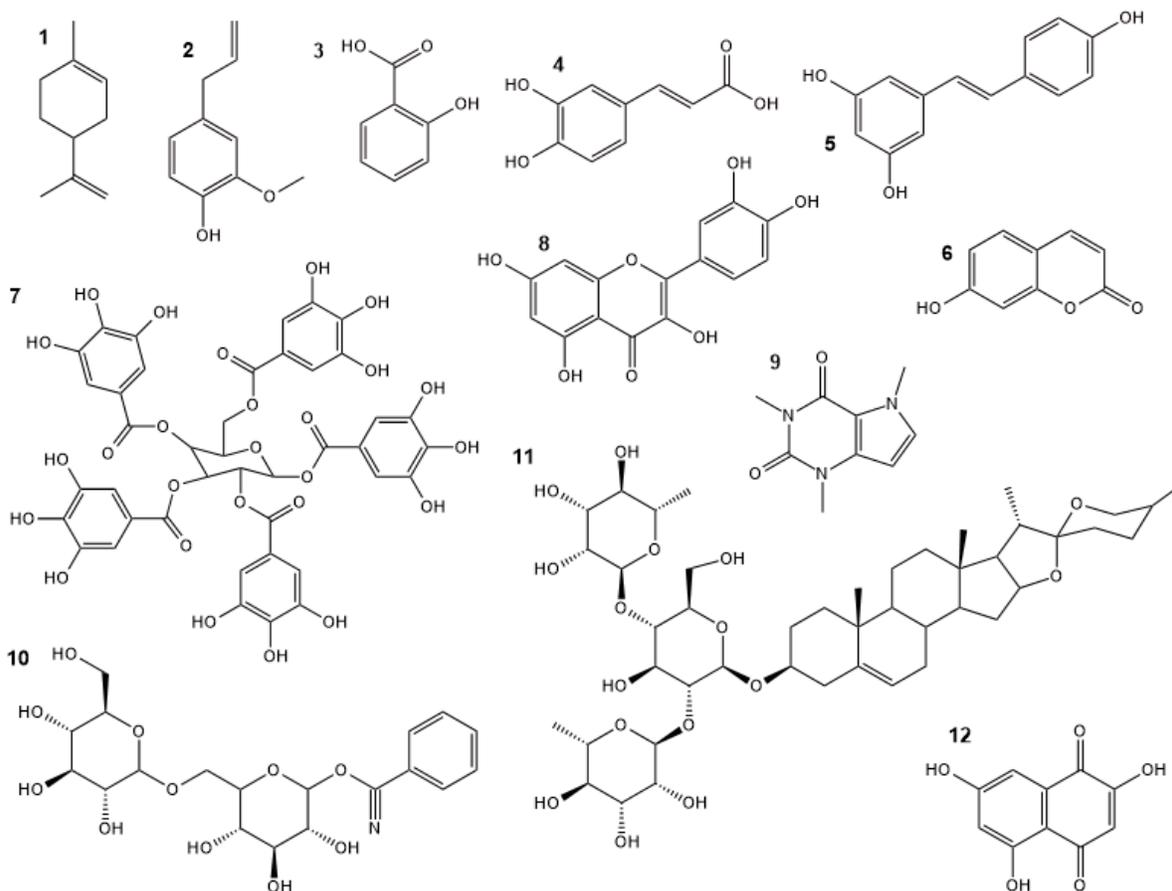


Figura 1. Ejemplos de compuestos bioactivos.

1) Terpeno (limoneno), 2) Fenilpropanoide (eugenol), 3) Ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos: salicílico), 4) Ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos: cafeico), 5) Estilbenoides (resveratrol), 6) Cumarinas (umbeliferona), 7) Taninos (galotanino), 8) Flavonoide (quercetina), 9) Alcaloide (cafeína), 10) Glucósido (amigdalina), 11) Saponina (dioscina) y 12) Quinona (flaviolina).

Autoría propia con ejemplos mencionados en la literatura (1,2,13).

Las actividades biológicas de los compuestos mencionados son variadas, incluso dentro de cada grupo, y su consumo debe ser regulado puesto que pueden ser tóxicos al alcanzar ciertas concentraciones en el organismo que les permitan llegar a ciertos órganos. Entre sus actividades biológicas comprobadas mediante experimentación se encuentran:

- *Terpenos y terpenoides*: antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antiinflamatorios, antioxidantes, antiparasitarios, anticancerígenos, analgésicos, relajantes, antirreumáticos y moduladores de la respuesta inmune (2,13,28).
- *Fenoles y compuestos fenólicos*: antioxidantes, antiulcerosos, antidiabéticos, cardioprotectores, anticancerígenos, antialérgicos, antifúngicos, antiinflamatorios, neuroprotectores, hepatoprotectores, antimicrobianas, antiaterosclerótico, vasodilatadores (1,13,29).
- *Alcaloides*: tóxicos, efectos diuréticos, analgésicos, antimicrobianos, anticancerígenos, antihipertensivos, colinomiméticos, vasoconstrictores, antiasmáticos y antipaludismo, así como narcóticos y estimulantes (2,13,26,30).
- *Glucósidos*: pueden ser tóxicos cuando se hidrolizan, pero son antimicótico, antiinflamatorio, antibacteriano, antioxidante, antidiabético, antiviral, diurético, cardioprotector, hepatoprotector, antitumoral y citotóxico (2,13,26,31).
- *Saponinas*: antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antimicrobiana, antiviral y antifúngico, algunas veces tóxicos (1–3,32).
- *Quinonas*: antimicrobianos, anticancerígenos, antifúngicos, antitusivos, antidepresivos y antiparasitario (13,33,34).

2.2.2. Actividad antioxidante de compuestos

Los compuestos fenólicos y terpenoides son los principales antioxidantes, ya que, estando presentes en bajas concentraciones, retardan o inhiben la oxidación de un sustrato y combaten los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ERO) involucrados en el desarrollo y mantenimiento crónico de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer, ya que el estrés oxidativo establecido en estas fisiopatologías induce daños celulares por oxidación de

biomoléculas, un mal funcionamiento de las mitocondrias y alteración en la reparación de daños al ADN, reduciendo el cuadro de la enfermedad con pronóstico desfavorable con el tiempo (7,13,35).

Los compuestos fenólicos reaccionan con radicales libres inhibiéndolos e impidiendo la lipoperoxidación, principalmente de lipoproteínas de baja densidad o LDL, pero también los fosfolípidos de las membranas, y reducen la formación de hidroperóxidos protegiendo a las células, factores de transcripción y enzimas, del proceso de oxidación. Algunos ejemplos de estos compuestos son los ácidos rosmarínico, ferúlico, cafeico, clorogénico, vanílico, p-hidroxibenzoico y p-cumárico, que se encuentran en aceites esenciales de romero, olivo, tomillo, salvia, té verde y almendras (36,37). Los terpenos y triterpenos también ralentizan la oxidación de lípidos, algunos ejemplos son el terpineno y terpinoleno, así como ácido carnósico, carnosol, carvacrol y timol (37).

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides poseen propiedades antioxidantes dependiendo del número y posición de los grupos hidroxilo, siendo la fracción de catecol (anillo B con grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4') una de las más importantes, sin embargo, a pesar de que la fracción de azúcar aumenta la solubilidad de los flavonoides y por ende su disponibilidad para ser asimilado por el organismo, también bloquea los grupos fenólicos, evitando que la fracción aglicona sea atacada por radicales libres que la oxiden, lo que reduce su capacidad antioxidante (38). Los flavonoides también son excelentes ligandos para diseñar complejos metálicos que aumentan su solubilidad y disponibilidad biológica, además modifican la actividad antioxidante de la aglicona, logrando algunas veces aumentar su actividad, como se observó con la Cr(III)-Quercetina aumenta el porcentaje de inhibición del radical DPPH (35,39).

Otros compuestos fenólicos importantes son los taninos, los cuales son capaces de formar complejos con proteínas mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o iónicas y enlaces covalentes, estos complejos interactúan con las ERO para proteger las membranas de la lipoperoxidación y el ADN; el complejo también puede formarse con enzimas, dependiendo de la afinidad de cada una, y puede tanto mejorar como reducir la actividad de la enzima, así como formar enlaces con otros compuestos nitrogenados (aminoácidos, bases nitrogenadas, poliaminas), lo que podría tener efecto en la actividad celular (40,41).

Los alcaloides también han sido estudiados por su actividad antioxidante para evitar problemas neurodegenerativos, siendo capaces de reducir la concentración de ROS (cafeína, galantamina, morfina, nicotina, palmatina, piperina), proteger a lípidos y proteínas de la oxidación (annotinina, galantamina), así como al ADN (lobelina), inhibir la desmielinización evitando el estrés oxidativo en las dendritas (arecolina), modular la actividad de enzimas protectoras como la superóxido dismutasa (berberina, capsaicina, evodiamina) o la catalasa (lycopodina, mahanimbina, noscapina), mediar la apoptosis (isorincofilina, rincofilina, vinpocetina) y prevenir la despolarización de la membrana celular mediando el flujo de iones (nantenina) (42).

Para medir el potencial antioxidante *in vitro* de compuestos, se ha recurrido a ensayos químicos por colorimetría, basándose en la formación de radicales estables (ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico, DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo), la reducción de iones metálicos (hierro en FRAP, cobre en CUPRAC, Folin-Ciocalteu o FC) o utilizando métodos competitivos (ORAC: capacidad de absorción de radicales oxígeno, TRAP: capacidad antioxidante total) (43).

2.2.3. *Actividad antimicrobiana de compuestos*

Por otra parte, los fenoles deben su capacidad bactericida a los grupos hidroxilo presentes en su estructura química, su cantidad y posición determinan la inhibición de cepas específicas (44), mediante diversos mecanismos de acción como: daño de membranas plasmáticas, inactivación de enzimas y desnaturalización de proteínas, sin embargo, no son efectivos contra quistes y su actividad depende de la concentración de los compuestos que lleguen al sitio de acción (45).

Los ácidos fenólicos (cafeico, gálico, vanílico, siríngico, cumárico, elágico, protocatecúico) son antimicrobianos más fuertes que los flavonoides (quercetina, luteolina, delfindina, epicatequina), pero, ambos son capaces de inhibir cepas de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, entre otras, así como cepas resistentes a antibióticos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (44).

Además, los flavonoides han mostrado actividad antifúngica, inhibiendo la germinación de las esporas o la formación de biofilms, y sinergia con medicamentos alopáticos. Sin embargo, otros compuestos fenólicos, como el ácido clorogénico, resveratrol o ácido gálico, modifican la permeabilidad de la membrana (inhiben la síntesis de ergosterol) y/o desregulan la expresión génica, además de evitar la formación de biofilms (46).

Por otra parte, los terpenos también han demostrado tener actividad antimicrobiana aun contra aquellos organismos resistentes a antibióticos alopáticos convencionales, mediante la ruptura de la membrana celular y la inhibición de la transcripción y traducción génica para la síntesis de proteoglicanos de pared celular, así como los terpenoides, que interfieren con la multiplicación, desarrollo y actividades metabólicas y fisiológicas de las bacterias, estos también pueden destruir

las membranas y paredes celulares o evitar la formación de biofilms en bacterias, incluso pueden tener un efecto sinérgico con antibióticos (28).

Asimismo, los terpenoides son capaces de romper la membrana celular, inducir estrés oxidativo, dañar el ADN, evitar la formación de biofilms y/o afectar el ciclo celular de los hongos, por lo que también son preciados compuestos antifúngicos (46).

Los taninos actúan contra bacterias y hongos mediante la inhibición de enzimas y sustratos, así como inactivar mecanismos de unión a membrana, al formar puentes de hidrógeno entre el grupo fenol y sitios específicos de proteínas de membrana, pero también actúan como ionóforos que inhiben la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones, además son capaces de quelar iones metálicos que pueden servir como cofactores en los procesos metabólicos (40).

Los alcaloides se han identificado como antimicrobianos, en particular los alcaloides indólicos e isoquinólicos han sido modificados sintéticamente mediante dimerización, amidación o derivatización (agregar grupos hidroxilo, isoprenilo, metoxilo, alquilo, fenilo o bifenilo, etc.) para potenciar su actividad antimicrobiana, reducir su neurotoxicidad y conferirles selectividad, lo que permite la interacción con enzimas bacterianas, como la SortasaA (implicada en la fijación de proteínas superficiales a la pared de peptidoglicano), o enzimas fúngicas, como la Isocitrato liasa (implicada en la producción de toxinas que confieren patogenicidad), así como con proteínas de la membrana bacteriana. (47,48).

La actividad antibacteriana de los alcaloides indolizidínicos (pergularinina, tiloforinidina) se debe a la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, mientras que los alcaloides isoquinolínicos (sanguinarina, berberina) pueden inhibir la división celular bacteriana, pero no afectan la replicación de ADN o las membranas celulares, por su parte los alcaloides quinolínicos inhiben la respiración celular de bacterias, ya que reducen el consumo de oxígeno pero no el de hidrógeno,

finalmente los alcaloides poliamínicos (escualamina) afectan la integridad de las membranas celulares de las bacterias. Adicionalmente, algunos de ellos actúan sinérgicamente con antibióticos y antifúngicos alopáticos (47).

Además, los alcaloides poseen efectos antifúngicos, ya que son capaces de interferir en la regulación de la expresión génica, actividad de enzimas y formación de biofilms, pero también pueden ocasionar daños a membranas celulares de los hongos, lo que desencadena una serie de fallas metabólicas en las células fúngicas (46).

Algunos de los métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana son la prueba de susceptibilidad a antibióticos (AST por sus siglas en inglés), en la cual la inhibición se observa como un halo sin crecimiento microbiano y el compuesto bioactivo puede incorporarse por dilución o difusión, por su parte la concentración mínima inhibitoria (CMI) se refiere a la concentración más baja de compuestos que logra inhibir el crecimiento microbiano por lo menos en un 80%, después de un periodo de incubación de 24 h a 37°C y 100% de humedad relativa (49).

2.2.4. Actividad cicatrizante de compuestos

El proceso de cicatrización ocurre en cuatro fases, la primera de ellas es la hemostasis en la cual se evita la pérdida de sangre al formar coágulos en el área afectada a través de la unión de las plaquetas (trombocitos) y los leucocitos comienzan a migrar para iniciar la segunda fase, la inflamatoria, en ésta, los macrófagos y neutrófilos establecen una barrera contra microorganismos y los fibroblastos se activan en el sitio para regular la acción de colagenasas. En la tercera fase, la de proliferación, los fibroblastos contribuyen a la formación de la matriz extracelular y la epitelización, también comienza la angiogénesis. Finalmente, en la cuarta fase, la de remodelación, termina la epitelización y se forma la cicatriz al cierre total de la herida (50).

Sin embargo, de llegarse a presentar infecciones o inflamación crónica que incremente la formación de ERO, la cicatrización se vería afectada (51).

Los terpenos y compuestos polifenólicos poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas que los hacen agentes cicatrizantes al promover la reepitelización y angiogénesis (50), sin embargo, el proceso inflamatorio se ve promovido por la presencia de ERO, por lo que los agentes antioxidantes, como terpenos y compuestos polifenólicos, contribuyen en la atenuación de la inflamación mediante la supresión de citoquinas proinflamatorias, como las interleucinas IL-1 e IL-6, factor de necrosis tumoral TNF- α y el interferón IFN- γ . Además, la actividad antimicrobiana de estos compuestos daña las membranas celulares bacterianas, lo que ayuda a combatir infecciones (51).

Particularmente, los compuestos fenólicos están asociados a efectos cicatrizantes debido a que modulan la actividad de factores de crecimiento, MMPs (metaloproteinasas de matriz extracelular, como el colágeno y la elastina), TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) y la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible, que regula la formación del colágeno). Pero, los compuestos fenólicos también participan como antiinflamatorios, ya que propician la liberación Nrf2 (factor nuclear eritroide 2, proteínas involucradas en la expresión de enzimas antioxidantes) de la Keap1 (proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch, sensor de estrés oxidativo) que la mantiene inactiva en el citoplasma, lo que disminuye la inflamación, por otra parte, los compuestos fenólicos reducen la actividad del NF- κ B (factor nuclear kappa B, proteínas que regulan la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria) debido a que evitan la activación de la IKK (quinasa I kappa B) y el factor sea liberado y traslocado al núcleo, además, los compuestos fenólicos evitan la liberación de AA (ácido araquidónico) por la PLA2 (fosfolipasa A2), esto evita que el AA libre sea metabolizado en un mediador de la respuesta proinflamatoria (52).

Por su parte, los terpenoides captan radicales libres, modulan la acción de enzimas antioxidantes, lo que a su vez contribuye a regular la respuesta proinflamatoria, sin embargo, algunos también están involucrados en la reducción de la actividad de la NF- κ B mediante el bloqueo de la IKK por una baja fosforilación, lo que evita su liberación y traslocación al núcleo celular, inhibición de la GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β) que es un activador de la NF- κ B y la inhibición de la fosforilación del I κ B α o NFKBIA (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) con lo que se evita la unión del NF- κ B al ADN. Los terpenoides también modulan la ruta del AA, evitando que la PLA2 libere el AA y que las enzimas COX (ciclooxigenasa, producción de prostaglandinas) y LOX (lisil oxidasa, formación de precursores de colágeno y elastina) metabolicen el AA para la respuesta proinflamatoria (52).

Los alcaloides también poseen actividad antiinflamatoria debido a su participación como antioxidantes ya que incrementan la expresión de Nrf2 (factor nuclear involucrado en la producción de enzimas antioxidantes), pero también inhiben la formación de Keap1 y con ello la expresión de NF- κ B se ve reducida, lo que evita la respuesta proinflamatoria, algunos alcaloides inhiben la enzima LOX que transforma el AA en señales proinflamatoria (52).

Para la evaluación de los efectos cicatrizantes se realizan pruebas *in vitro* e *in vivo*, siendo los modelos *in vivo* excisional e incisional los más empleados (50).

2.3. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales

Con la finalidad de obtener en mayor cantidad los compuestos bioactivos, que puedan ser utilizados como antioxidantes, antimicrobianos, cicatrizantes o algún efecto medicinal distinto, se ha implementado los cultivos *in vitro* de células y tejidos vegetales a través de herramientas biotecnológicas, que permiten la rápida multiplicación y conservación de tejidos vegetales en espacios reducidos con condiciones medioambientales controladas artificialmente en laboratorio

(12,53), proteger ejemplares y genotipos de importancia médica, evitando así la extracción del medio ambiente, deterioro de ecosistemas y pérdida de biodiversidad (3), así como evitar daños a la salud humana por consumo de especies silvestres con acumulación de contaminantes y/o metales pesados (54).

El cultivo de células y tejidos vegetales consiste en técnicas para crecer plantas en condiciones aisladas y controladas, sobre un medio de cultivo artificial enriquecido y aséptico (Figura 2), cualquier parte de la planta puede ser usada para iniciar el crecimiento o regeneración, obtener embriones somáticos, líneas celulares, plantas libres de enfermedades, clones de la planta madre o callo, esto es posible ya que las células vegetales (principalmente las meristemáticas) son totipotentes, es decir, poseen la información genética necesaria para producir una planta completa (3,55).

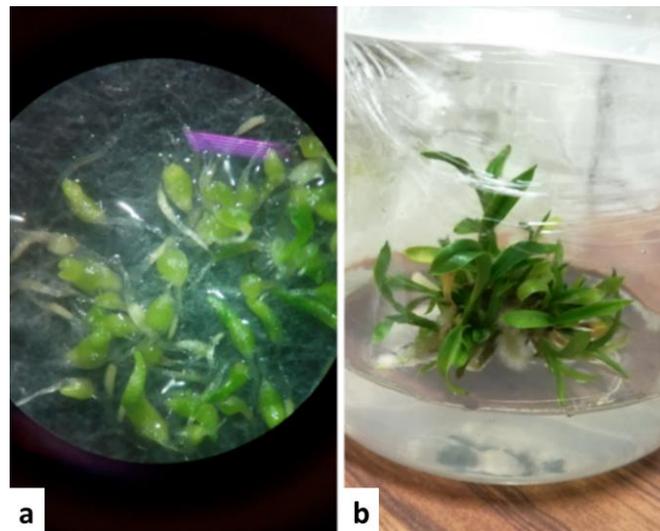


Figura 2. Cultivo *in vitro* de plantas.
Semillas germinando (a) y propagación de plantas (b).
Autoría propia.

Para iniciar el cultivo se requiere seleccionar el explante dependiendo del tipo de cultivo que se va a realizar, el propósito y la especie a utilizar (55). Que el explante tenga un desarrollo

adecuado depende de la edad, posición, tipo y tamaño de éste, ya que la capacidad totipotente de las células varía y una mayor área de exposición es más propensa a desarrollar microorganismos contaminantes que compiten por los suplementos del medio y producen sustancias que modifican las condiciones de cultivo ocasionando la muerte del explante, mientras que si es muy pequeña es probable que no se observe respuesta (3).

El medio de cultivo debe contener los suplementos fundamentales que permitan sustentar el crecimiento y desarrollo del explante en condiciones *in vitro* (3), como son sales inorgánicas (macro y micronutrientes), vitaminas para promover el crecimiento (como son la tiamina o B₁, ácido nicotínico o B₃, piridoxina o B₆ y mioinositol), una fuente de carbono, RCV, un agente gelificante (comúnmente agar) y compuestos antioxidantes (ácido ascórbico o carbón activado) para evitar la oxidación del explante, algunas veces aminoácidos como nutrientes y antibióticos para evitar la contaminación del explante (3,55–57).

La fórmula del medio a utilizar determina en gran medida el éxito del cultivo y por lo general se utiliza medio sólido para iniciarlo, sin embargo, cuando se desea aumentar la producción se recomienda el uso de medio líquido, para lo cual se elimina el agente gelificante. Entre las fórmulas de medio base más ampliamente utilizadas se encuentran Murashige & Skoog (MS), B5 de Gamborg, LS de Linsmaier & Skoog, NN de Nitsch & Nitsch y SH de Schenk & Hilderbrandt, además del medio para plantas leñosas WPM (Woody Plant Medium) (3,12).

Entre los RCV encontramos las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno; sin embargo, podemos encontrar otros reguladores sintéticos como morfactinas, dicegulac (sódico), paclobutrazol y prohexadiona de calcio, así como otras sustancias que cumplen un rol regulador como poliaminas, oligosacarinas, jasmonatos, brasinoesteroides, turgorinas y sistemina (58).

Las auxinas son los RCV más utilizados para iniciar la división celular, formación de raíces e inducción de callo, de forma natural se encuentran el ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido fenilacético (AFA), sin embargo, existen auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el dicamba (ácido 3,6-dicloro- σ -anísico) y picloram (PIC). Por su parte las citoquininas, son los RCV empleados para promover la división celular, formación y elongación de brotes; la kinetina (KIN), zeatina y difenilurea son las citoquininas encontradas naturalmente en las plantas, mientras que las sintéticas son la 6-bencilaminopurina (BAP), N⁶(²-isopentenil)-adenina (2iP) y el thidiazuron (TDZ) (57,59).

Por otro lado, la fuente de carbono compone del 2 al 5% del medio, y provee la energía para el mantenimiento celular, organogénesis y embriogénesis, además ayuda al mantenimiento del potencial osmótico del medio de cultivo. La sacarosa es la fuente de carbono comúnmente utilizada, sin embargo, existen otras como son la glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, almidón, galactosa y fuentes naturales como el agua de coco o pulpa de frutas (57,60).

Se requieren condiciones controladas de mantenimiento, como son pH entre 5.4 y 5.8 (permite una correcta asimilación de nutrientes y crecimiento celular), medio de cultivo estéril, fotoperiodo de 0 a 12 h luz y temperatura entre 25 y 28°C (3,56).

Con el objetivo de aumentar la producción de compuestos bioactivos, se suele incluir factores de estrés llamados *elicitors* (estímulos que inducen respuestas de defensa) (12). Los hay bióticos, que son moléculas complejas producidas de forma endógena o exógena (RCV, fragmentos de la pared celular, productos del metabolismo de microorganismos fitopatógenos) detectadas por la membrana celular como una señal de ataque y desencadenan la producción de sustancias de defensa; y abióticos, que son agentes no biológicos como sales inorgánicas, metales pesados y

factores físicos (radiación UV, sequías, temperatura, pH ácido o alcalino, químicos, entre otros) (3,4).

El cultivo de células y tejido vegetales también permite utilizar técnicas de ingeniería metabólica para modificar genéticamente enzimas y proteínas reguladoras que participan en la síntesis de compuestos, promoviendo o silenciando regiones de ADN involucradas en la expresión de genes implicados en la producción de compuestos bioactivos, así como aumentar la resistencia ante sequías, plagas y salinidad, sin la necesidad de un estímulo adverso biótico o abiótico sobre las células del cultivo vegetal (3,4).

2.3.1. Cultivos de callo

El callo es un tipo de tejido vegetal originado de la multiplicación desorganizada de las células no diferenciadas formando una masa celular con texturas, formas y colores variados, compuesto tanto de células con diferente capacidad totipotente (22,56,61), se produce como una respuesta ante el estrés, corte o ataque de insectos y/o microorganismos fitopatógenos (55).

El callo se obtiene al pasar por tres fases: 1) la inducción de la división celular, 2) división celular activa (se pierde la especialización de las células) y 3) cese de la división (se incrementa la diferenciación nuevamente y ocurre la morfogénesis) (55,56).

La ausencia de luz, las concentraciones endógenas o del medio de cultivo de reguladores del crecimiento, incluso el tipo de corte y la posición en que se coloca el explante en el medio, pueden inducir la división activa de las células originando el callo u órganos (55,56,61).

Los niveles de reguladores del crecimiento son el factor determinante para la formación de callo y su concentración va a depender de la especie vegetal y origen del explante (61), siendo las auxinas uno de los reguladores más importantes, ya sea sola o en combinación (22), comúnmente con alguna citoquinina para lograr la dediferenciación celular (58).

El callo puede ser clasificado por su apariencia en compacto, nodular y friable, este último se obtiene después de realizar varios subcultivos (cambio del material vegetal a medio nutritivo nuevo, para volver a suplementar los nutrientes necesarios para el crecimiento) y permite obtener compuestos bioactivos biosintetizados por el callo (Figura 3) (22), también puede ser clasificado en embriogénico y no embriogénico (friable, cristalino, de color amarillo o café y de rápido crecimiento) (61).



Figura 3. Callo friable en condiciones *in vitro*.
Autoría propia.

El callo friable, al igual que los cultivos de células en suspensión, permiten la extracción e identificación de los compuestos de una especie de interés medicinal. Empleando estas técnicas biotecnológicas y optimizando las condiciones de crecimiento, nutrición y elicitación es posible incrementar hasta en un 300% la producción de compuestos a comparación de plantas silvestres (12,22).

Se han establecido cultivos de callo para la investigación y producción de compuestos, por ejemplo, en *Coryphantha macromeris*, una especie utilizada en la medicina tradicional mexicana como alucinógeno o agente simpaticomimético (62), así como cuantificarlos y relacionarlos a los

efectos biológicos, como en el caso de *Hibiscus sabdariffa* una especie antioxidante y antibacteriana (63), pero también se pueden obtener extractos de la biomasa celular producida en los cultivos, como en el caso de *Eryngium planum*, *E. campestre* y *E. maritimum* que se emplean como antioxidante, antiinflamatorio, antiangiogénico, antimicrobiano, anticancerígeno (efecto citotóxico y antiproliferativo) y anti-insomnio debido al ácido rosmarínico y glucósidos presentes en los extractos (64).

Por lo tanto, el callo friable es empleado para iniciar cultivos de células en suspensión, ya que permite una mayor separación de los agregados celulares (22,55,56), así como la extracción y purificación de compuestos de forma rápida, simple y ecológica, ya que se busca la reducción de residuos peligrosos durante el proceso de extracción, así como el uso óptimo de los recursos para asegurar la sustentabilidad (29).

Además, los cultivos de callo presentan ventajas frente a las plantas silvestres, ya que las células que conforman los callos producen mayores cantidades de compuestos, los cultivos pueden mantenerse de forma indefinida manteniendo la integridad genética en espacios menores y bajo condiciones controladas, por lo que los compuestos pueden ser producidos independientemente de los factores ambientales externos, así como la obtención de material aséptico (libre de microorganismos e insectos) (65).

2.3.2. Cultivo de células en suspensión

Los cultivos consisten en agregados celulares o células dispersas en un medio nutritivo líquido (Figura 4), la morfología de las células es aún más homogénea que en los cultivos de callo, aumentan los gránulos de almidón, el citoplasma es más denso y pierden su totipotencialidad (55,56), además la división celular es más rápida, el cambio de medio de cultivo es más fácil y se

obtiene mayor cantidad de biomasa con una alta concentración de compuestos bioactivos, así como líneas celulares de producción constante (22).



*Figura 4. Cultivo de células en suspensión.
Autoría propia.*

Existen dos métodos principales para realizar el cultivo de células en suspensión: en lotes (medio de cultivo con recambio completo en el subcultivo) y continuo (medio de cultivo reemplazado durante el cultivo y el exceso de células se remueve) (3,55,56). Se suelen incluir reguladores del crecimiento para favorecer el desarrollo celular, pero, también están involucrados en el metabolismo secundario, estimulando la acumulación de determinados compuestos (29).

Los cultivos de células en suspensión han permitido obtener alcaloides de *Catharanthus roseus* para tratar cáncer (vincristina y vinblastina), y el empleo de elicitores incrementó la producción de alcaloides (53). *Cnidioscolus chayamansa* posee efectos antioxidantes, hipoglucémicos, antiinflamatorios, hepatoprotectores, cardioprotectores e hipocolesterolémico, de la cual se ha aislado un triterpeno (acetato de lupeol) con importante actividad antiinflamatoria, así como identificado los compuestos responsables de sus efectos medicinales, dicho triterpeno se pretende

producir en mayores cantidades mediante el cultivo de células (66). Los elicitores pueden ser probados en cultivos de células en suspensión, un ejemplo es el caso con *Vitis vinifera*, en el cual la elicitación mediante régimen de oscuridad, fenilalanina y metil jasmonato en combinación, aumentó la producción de fenoles, flavonoides y estilbenos, en comparación a los rendimientos reportados por la planta silvestre, que son apreciados en la dieta como protectores ante problemas cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (67).

2.4. Métodos de extracción de compuestos bioactivos

Los extractos de plantas medicinales utilizados en fitomedicina no son compuestos puros, sin embargo, se estandariza su producción y caracteriza su composición fitoquímica, para obtener la calidad deseada en los productos y utilizar los compuestos con actividad biológica conocida (3).

Se recomienda secar el material vegetal a la sombra antes de la extracción para evitar el desarrollo de microorganismos, fermentación o descomposición de los compuestos. El secado por aire, en microondas, en estufa o por congelamiento son los métodos preferidos (1).

La extracción es el proceso para obtener los principios bioactivos utilizando solventes (Tabla 1), el solvente es elegido considerando la solubilidad y polaridad del componente a extraer (1). Los solventes como etanol, metanol o acetato de etilo son los más utilizados para la extracción de compuestos hidrofílicos, mientras que el diclorometano, solo o en mezcla con metanol, es empleado para la extracción de compuestos hidrofóbicos (8). Considerando la polaridad de los solventes es posible extraer selectivamente compuestos (68,69).

Tabla 1. Solventes comúnmente utilizados en la extracción de compuestos bioactivos

Solvente	Compuestos obtenidos
Acetona	Flavonoides, estilbenos
Acetato de etilo	Antocianinas, flavonoles, polifenoles

Cloroformo	Flavonoides, terpenoides
Éter etílico	Flavonoles, ácidos fenólicos
Diclorometano	Terpenoides
Etanol	Alcaloides, flavonoles, polifenoles, taninos, terpenoides
Éter de petróleo	Compuestos fenólicos
Éter	Alcaloides, terpenoides
Hexano	Terpenoides
Metanol	Antocianinas, flavonas, polifenoles, saponinas, taninos, terpenoides
Agua	Antocianinas, saponinas, taninos, terpenoides, ácidos fenólicos

Información tomada de Lefebvre et al. (2021) y Jha et al. (2022).

Sin embargo, el proceso de extracción también debe considerar las formas de extracción tradicional, ya que es la forma de uso por la población, algunas veces se seleccionan fenotipos vegetales particulares para la extracción o se realizan colectas en cierto momento del año, lo que hace diferente la composición química de los extractos, además la forma de preparación y/o extracción puede afectar a los compuestos, incrementando su actividad farmacológica o disminuyéndola (70).

También debe ser considerado el método de extracción a ser utilizado, en la Tabla 2 se mencionan los métodos empleados con mayor frecuencia y sus consideraciones para ser empleados, sin embargo, existen más métodos de extracción (1,8,26,69).

Tabla 2. *Métodos de extracción de compuestos bioactivos.*

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Maceración	El material vegetal es triturado para aumentar el área de contacto y se deja reposando en solventes con agitación intermitente	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Extracción selectiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento lento • Posibilidad de destruir compuestos termosensibles
Infusión	La muestra es hervida para extraer los compuestos volátiles	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> • Altas cantidades de solvente

Extracción asistida por ultrasonido	Las ondas ultrasónicas incrementan la permeabilidad e interrumpen la pared celular, lo que facilita la extracción	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento simple <ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Rápido • Funciona a bajas temperaturas 	<ul style="list-style-type: none"> • Daño al material vegetal

Información tomada de Muhammad et al. (2019), Sangamithra et al. (2019), Jha et al. (2022) y Adetunji et al. (2021).

Una vez obtenido el extracto los componentes pueden ser aislados mediante cromatografía en columna y analizados por cromatografía de capa fina (CCF) o líquida de alto rendimiento (HPLC), mientras que para la identificación se utilizan técnicas como espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). También se pueden combinar técnicas de cromatografía líquida con detección ultravioleta (LC/UV), espectrometría de masas (LC/MS) y/o resonancia magnética nuclear (LC/NMR) para identificar compuestos y usar técnicas de espectroscopía ultravioleta/luz visible (UV/VIS) y espectrofotometría infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (NMR) con carbono y protones, espectrometría de masas (MS) y difracción de rayos X para determinar las estructuras químicas, en conjunto con reacciones de hidrólisis e hidratación se pueden conocer las relaciones de estructura y función. En cuanto a la cuantificación de los compuestos las técnicas más empleadas son la GC-MS y HPLC (1).

3. ANTECEDENTES

3.1. *Erigeron canadensis* L.

Algunos de sus nombres comunes son arrocillo, calzadilla (71), pegajosa, cola de caballo o mantecosa (72). Pertenece a la familia *Asteraceae*, la cual se encuentra en la clase *Magnoliopsida* (dicotiledóneas) (73), antes conocida como *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, es nativa del continente americano y ha sido introducida en Europa, Asia, África y Oceanía (Figura 5) (74), y es considerada una planta invasora resistente al glifosato (75,76).

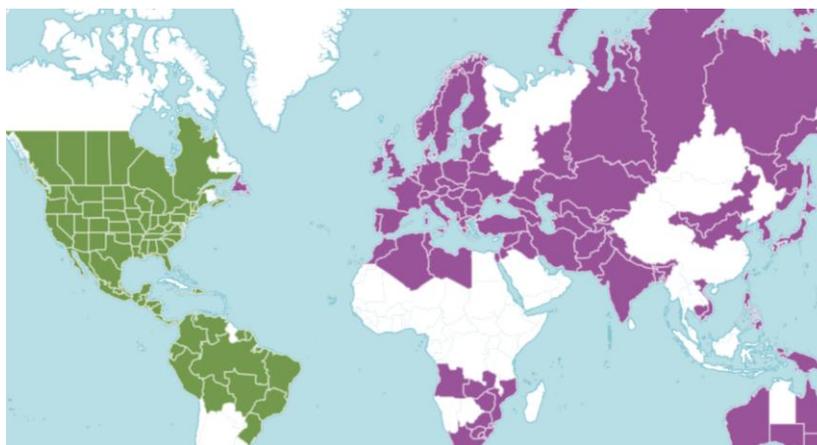


Figura 5. Distribución de *E. canadensis*.
Distribución nativa en verde e introducida en magenta (74).

En México se encuentra entre los 1000 y 2500 m.s.n.m., reportada también a 2850 m.s.n.m. en el valle de México. Se distribuye en todo el país siendo común en ambientes perturbados y zonas rurales, de climas cálidos y semicálidos, algunas veces asociada a bosques de pino y de encino (77,78).

De forma tradicional, se han usado las hojas como cataplasma externo para desinfectar heridas y tratar hemorroides, mientras que los aceites volátiles se han utilizado en el tratamiento de bronquitis y cistitis, sin embargo, la forma más común de uso es la toma de infusiones, hechas de la parte aérea y flores al 1% para desintoxicar el hígado y de 3-4% como diurético y en el

tratamiento de problemas urinarios, por su parte, la decocción de la planta completa al 10% se emplea como antirreumático (79). En México, se ha usado para el tratamiento de diarrea, bilis y empacho en Tlaxcala, mientras que en Veracruz se usa para tratar la fiebre (Figura 6), sin embargo, las variedades pubescentes se han reportado como irritantes de nariz, garganta y piel (71). En China ha sido utilizada de forma tradicional como desintoxicante, calmante de la picazón en la piel, tratamiento contra la diarrea, estomatitis, otitis, conjuntivitis y dolor de dientes (80).



Figura 6. Estados de la República Mexicana donde se utiliza *E. canadensis*.
Uso tradicional como planta medicinal (71).

E. canadensis es una planta erecta anual o bianual de tipo herbáceo de hasta dos metros de alto (Figura 7a), los tallos son cilíndricos y pueden estar ramificados en forma de roseta en la base de la planta, estriados y puede ser glabro o pubescente, las hojas son sésiles y numerosas de forma lineal a lanceolada, de hasta 10cm de largo, dispuestas de forma alterna, pueden o no presentar tricomas, de color verde claro; la inflorescencia consta de numerosas cabezuelas en panícula terminal y piramidal (Figura 7b), representa aproximadamente la mitad de la talla total de la planta, las flores o cabezuelas poseen involucreo campanulado con brácteas agudas dispuestas en dos series, con flores femeninas en la periferia y al centro flores hermafroditas (Figura 7c), los frutos son aquenios oblongos de hasta 1.3mm de largo, pálido y con vilano de color blanco (Figura 7d y

7e), raíz largo de tipo pivotante (77,78). En los meses de marzo a junio se da la fase de crecimiento activa y en los meses de julio y agosto comienza la floración, culminando con la fructificación en el mes de septiembre (81).

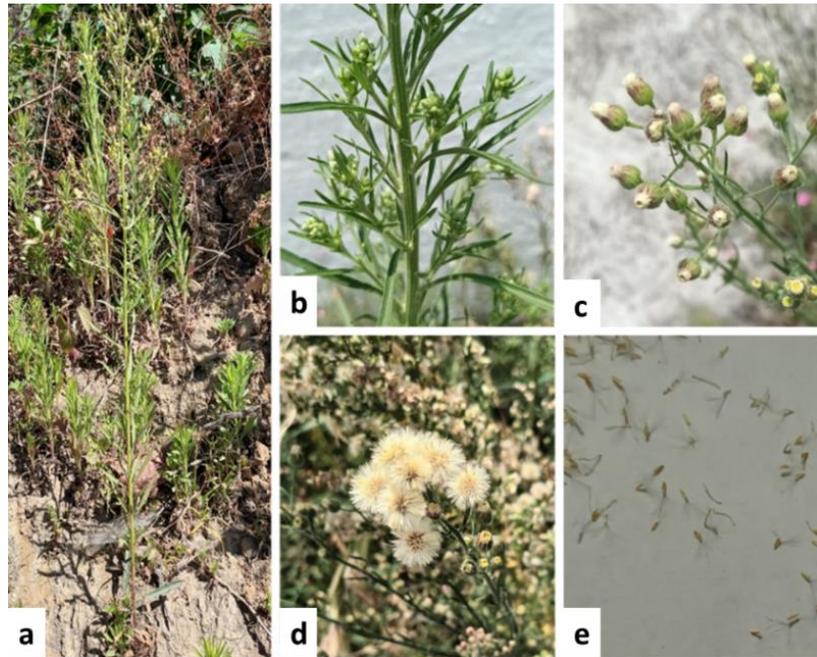


Figura 7. *E. canadensis*.
Planta completa (a), inflorescencia (b), flor (c), achenios en el receptáculo (d) y frutos maduros (e).
Autoría propia.

3.2. Estudios fitoquímicos y biológicos de *E. canadensis*

Se han realizado diversos estudios con esta especie, principalmente en el área agronómica, donde se ha utilizado para descubrir posibles herbicidas con actividad sobre enzimas del ciclo fotorespiratorio (82), o la inhibición de genes involucrados en la resistencia a herbicidas (83,84), también para conocer las adaptaciones que favorecen la dispersión de las semillas y colonización de ambientes (85–87) además de su resistencia a herbicidas (81,88–103), y las formas de control del crecimiento y propagación de *E. canadensis* (75,104–108), así como los daños al suelo (109,110), especies con las que coexiste (otras plantas y hongos) (76,111) y especies de hongos

que podrían llegar a ser controles biológicos de *E. canadensis* debido a sus propiedades como herbicidas (112,113).

También ha tomado atención debido a la tolerancia que posee a crecer en suelos contaminados con metales pesados y acumularlos, lo que la hace una especie con posible uso en la fitorremediación de suelos contaminados con cadmio, plomo o cobre (114–119); sin embargo, esta capacidad de retener contaminantes podría ser un riesgo para la salud de quien la consuma, debido a la toxicidad de los contaminantes y no a los compuestos de la especie.

No se encontraron antecedentes sobre el cultivo de tejidos mediante técnicas biotecnológicas de ningún tipo para esta especie y tampoco para el género *Erigeron* o *Conyza* (género en el que se encontraba clasificada con anterioridad); sin embargo, se cuentan con algunos estudios preclínicos y fitoquímicos que han permitido conocer los compuestos que produce (Figura 8 y 9) y actividad biológica (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de estudios fitoquímicos y biológicos de *E. canadensis*

Parte de la planta (Origen)	Extracto	Compuestos identificados/aislados	Actividad/Respuesta	Referencia
Parte aérea (República Checa*)	Éter de petróleo y etanol	β -santaleno, β -himacaleno, cupareno, α -curcumeno y γ -cadineno	Antiinflamatorio (reducción del edema causado por carragenina y formalina en ratas)	(120)
Tallo (Estados Unidos)	Agua	Aceites esenciales (α -tujeno, β -pineno, mirceno, d-limoneno, <i>cis</i> y <i>trans</i> ocimeno, cosmeno, cariofileno, α - <i>cis</i> -bergamoteno, β - <i>trans</i> -bergamoteno, β -farneseno, β -himacaleno, β -cubebeno, β -bisaboleno, δ -cadineno, α -curcumeno y acetilenos)	ND	(121)
Parte aérea (Polonia*)	Metanol	Quercetina, ramnetina, isoramnetina y apigenina	Mutagénico (quercetina y ramnetina inducen mutaciones en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>)	(122)
Planta completa (Pakistán)	Metanol	Compuestos obtenidos en la fracción de acetato de etilo (esfingolípido y su derivado glucopiranosido, β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido, estigmasterol y harmina)	ND	(123)
ND (Francia)	Agua	Aceites esenciales (α y β pineno, β -mirceno, cosmeno, limoneno, careno, tujeno, alcanfor, isoborneol, mentol, isobornil acetato, α y β cariofileno, <i>Epi</i> -biciclosesquifelandreno, β -sesquifelandreno, α -santaleno, germacreno B y D)	Antifúngico (inhibe <i>Rhizoctonia solani</i> a 1600 ppm, <i>Fusarium solani</i> y <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> a 400, 800 y 1600 ppm)	(124)
ND (Polonia*)	ND	Extracto rico en polisacáridos	Antioxidante (protector de plaquetas ante peroxinitrito) Anticoagulante (evita la agregación de plaquetas)	(125)
Tallo, raíz, inflorescencia (Hungría)	Metanol	Fracciones: hexano, cloroformo y residuo	Anticancerígeno (fracción hexano de raíz actividad contra células de adenocarcinoma de cervix HeLa y carcinoma de piel A431, fracciones de hexano y cloroformo de tallo y	(126)

			fracción hexano de raíz mostraron actividad contra células de cáncer de mama MCF7)	
ND (Polonia*)	Agua	Fracciones: glicoconjugada, rica en polisacáridos y aglicona	Anticoagulante (las tres fracciones en concentraciones superiores a 0.75 mg/mL evitan la agregación de plaquetas)	(127)
Parte aérea (Corea)	Agua	Aceites esenciales: principalmente limoneno y δ -3-careno	Citotóxico (efecto contra queratinocitos HaCaT)	(128)
Parte aérea (China)	Metanol	Fracciones (cinco) mediante HPLC	Aclarante (fracción 1 muestra un 48% de inhibición de melanina a 100 mg/mL)	(129)
Inflorescencias (Polonia)	Etanol 65%	Extracto purificado	Antioxidante (protector de proteínas plasmáticas ante peroxinitrito)	(130)
Parte aérea (China)	Etanol 95%	Compuestos obtenidos por fraccionamiento con éter de petróleo, acetato de etilo y butanol y purificación de compuestos derivados de β -amirina	Anticancerígeno (erigeronol o 3-O-(hidroxi-acetil)-23,28-dihidroxi- β -amirina inhibe el crecimiento de células del melanoma B16 con un $CI_{50} = 7.77 \pm 0.47$ μ g/mL)	(80)
Raíz (Hungría)	Metanol	Dihidropiranoïdes: conyzapiranona A y B; matricaria lactona, ácido 9,12,13-trihidroxi-10(E)-octadecanoico, epifriedelanol, friedelina, taraxerol, simiarenol, espinasterol, estigmasterol, β -sitosterol y apigenina	Anticancerígeno (Actividad contra células de cáncer de cervix HeLa, cáncer de mama MCF-7, cáncer de piel A431 y fibroblastos MRC-5)	(131)
ND (Túnez)	Metanol	Fracciones: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y butanol	Antiviral (contra citomegalovirus humano HCMV AD-169 y enterovirus Coxsackie B tipo 3), no se demostró actividad citotóxica contra fibroblastos MRC-5	(132)
Planta completa (China)	Etanol 95%	Aislamiento de ácido-3-O- β -D-glucopiranosido-3'-(O- β -D-glucopiranosido)-6'-(O-4''-hidroxibenzoato) piromecónico, ácido-3-O- β -D-glucopiranosido-6'-(O-4''-hidroxibenzoato) piromecónico y ácido-3-O- β -D-glucopiranosido-6'-(O-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxibenzoato) piromecónico	No activo contra <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	(133)
Inflorescencia (Polonia)	ND	Complejo polifenoles-polisacáridos	Anticoagulante (interacción con el cofactor II de heparina para inactivar la trombina)	(134)

Planta completa (Pakistán)	Etanol 80%	Conyzolido y conyzoflavona	<p>Antimicrobiano (<i>Escherichia coli</i> CIM= 25 y 50 µg/mL, <i>Bacillus subtilis</i> CIM= 150 y 100 µg/mL, <i>Shigella flexeneri</i> CIM= 125 y 100 µg/mL, <i>Staphylococcus aureus</i> CIM= 50 y 100 µg/mL, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIM= 100 y 150 µg/mL, <i>Salmonella typhi</i> CIM= 100 y 100 µg/mL)</p> <p>Antifúngico (<i>Trichophyton longifusus</i> CIM= 100 y 10 µg/mL, <i>Candida albicans</i> CIM= 350 y 50 µg/mL, <i>Aspergillus flavus</i> CIM= 300 y 200 µg/mL, <i>Fusarium solani</i> CIM= 150 y 50 µg/mL, <i>Candida glabrata</i> CIM= 400 y 100 µg/mL).</p> <p>Las CIM son respectivas a los compuestos aislados.</p>	(135)
Parte aérea (Serbia)	Agua	Derivados del ácido cinámico (ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico) y del ácido benzoico (ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico)	Diferencias estacionales en la producción de ácidos fenólicos (fase vegetativa con ácidos ferúlico y cumárico en mayor cantidad)	(81,89)
Planta completa (Pakistán*)	Metanol	Fracciones: hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y agua	<p>Antimicrobiano (extracto metanólico y fracciones de hexano, cloroformo y acetato de etilo inhiben el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>)</p> <p>Antifúngico (extracto metanólico y fracciones de hexano, cloroformo y acetato de etilo inhiben el crecimiento de <i>Candida albicans</i>, <i>Aspergillus niger</i> y <i>Candida glabrata</i>; fracciones de cloroformo, acetato de etilo y agua inhiben el crecimiento de <i>Fusarium solani</i>)</p> <p>Fitotóxico (<i>Lemna minor</i> susceptible al extracto metanólico y a todas las fracciones)</p>	(136)
Parte aérea (Pakistán*)	Metanol	Fracciones: hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y agua	Antioxidante (inhibición del radical DPPH por las fracciones de acetato de etilo y agua en 100 µg/mL)	(137)

Raíz y flor (Hungría)	Agua	Aceites esenciales (2E-hexanal, α y β pineno, sabineno, mirceno, <i>p</i> -cimeno, limoneno, <i>trans</i> -ocimeno, 2,5-dimetil estireno, <i>E,E</i> -cosmeno, <i>cis</i> -verbenol, <i>trans</i> -sabinol, 2-alil-fenol, mirtenol, <i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol, <i>trans</i> -crisntenil acetato, modheph-2-ene, β -cariofileno, α - <i>trans</i> -bergamoteno, α -curcumeno, himacaleno, δ -cadineno, matricaria éster, matricaria lactona, germacreno B, espatulenol, turmerona, β -copaen-4- α -ol, salvia-4(14)-en-1-ona	Antifúngico (ambos extractos a 8 μ g presentan actividad contra <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Trichophyton interdigitalis</i>), no se demostró efecto antimicrobiano contra <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(138)
Parte aérea (Corea*)	Etanol	ND	Antioxidante (inhibición de radical DPPH) Gastro protector (reducción y protección contra úlceras causadas por HCl/etanol)	(139)
Flor y tallo (India)	Etanol y metanol	Saponinas, terpenoides, taninos, antraquinonas, esteroides y flavonoides	Antimicrobiano (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> susceptible al extracto etanólico de flores, <i>Escherichia coli</i> susceptible al extracto metanólico de flores)	(140)
Parte aérea (Corea)	Metanol	ND	Antiinflamatorio (inhibe la sintasa iNOS y la ciclooxigenasa Cox-2 en macrófagos, lo que a su vez inhibe la translocación y actividad del factor NFkB y suprime la fosforilación de quinasas MAPKs)	(141)
Raíz (China)	Acetato de etilo	3- β -eritrodiol	Anticancerígeno (induce la apoptosis de células MKN-45 de cáncer de estómago, dependiente de la dosis y tiempo)	(142)
Hoja (Pakistán)	Agua	Síntesis de nanopartículas de ZnO	Antimicrobiano (contra <i>Escherichia coli</i> con una CMI=55.7 μ g y <i>Staphylococcus aureus</i> con una MIC=94.6 μ g)	(143)
Planta completa (Pakistán)	Metanol 70%	Alcaloides, taninos, triterpenos, proteínas, carbohidratos, saponinas, flavonoides y esteroides	Antidiabético (inhibición de α -glucosidasa, reducción de niveles de glucosa en ratones diabéticos)	(144)
Parte aérea (Pakistán)	Agua	Aceites esenciales (α -pineno, β -felandreno, β -pineno, β -mirceno, limoneno, <i>cis</i> y <i>trans</i> β -ocimeno, γ -terpineno, (3E,5E)-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetrano, <i>cis</i> y <i>trans</i> tagetona, <i>cis</i> y	Repelente (<i>Aedes aegypti</i> repelido en 50%, disminución del efecto con el tiempo, efecto por menos de una hora)	(145)

			<i>trans</i> tagetenona, carvona, oxido de piperitona, β -elemeno, β -cariofileno, α -bergamoteno, β -farneseno, β -himacaleno, germacreno D, elixeno, <i>cis</i> -Lachnophyllum éster, matricaria éster, germacreno D-4-ol		
Inflorescencia (Polonia)	ND	Complejo polifenoles-polisacaridos		Radioprotector (protege linfocitos contra la radiación)	(146)
Parte aérea (Pakistán)	Agua	Aceites esenciales (β -pineno, β -mirceno, limoneno, <i>trans</i> - β -ocimeno, cosmeno, β -cariofileno, α -bergamoteno, <i>trans</i> - β -farneseno, germacreno D, <i>cis</i> -Lachnophyllum éster, matricaria éster)		Insecticida (<i>Tribolium castaneum</i> a 40mg/mL ocasiona un 46.6 \pm 2.1, 84 \pm 1.6 y 100% de mortalidad a las 24, 48 y 72 h, respectivamente) Antifúngico (<i>Aspergillus flavus</i> zona de inhibición de 16.5mm)	(147)
Hojas, flores (Portugal*, Marruecos*)	Agua:Metanol (70:30)	Compuestos fenólicos (derivados del ácido cafeoilquínico) y taninos		Antihipertensivo (relajación de vasos de ratas Wistar)	(148)
Inflorescencias (República Checa)	ND	Complejo proteína-polisacáridos de polifenoles		Inmunoestimulante (estimulación de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, acelera la eficacia de la fagocitosis y liberación de radicales libres)	(149)
ND (Turquía)	Metanol	ND		Antioxidante (el extracto crudo inhibe los radicales libres DPPH y ABTS a concentraciones de 2 mg/mL) Citotóxico (células de cáncer de próstata DU-145 y células de cáncer de pulmón A549) Antiinflamatorio (línea de macrófagos murinos Raw 264.7)	(150)
Inflorescencia (República Checa)	ND	Complejo proteína-polisacáridos de polifenoles		Antitusivo (Cuyos macho y efecto dependiente de la dosis)	(151)

*: país donde se realizó el estudio en caso de no contar con el origen del material vegetal utilizado. ND: información no mencionada. Las estructuras químicas de los compuestos identificados para la especie se encuentran ilustrados en las Figuras 8 y 9.

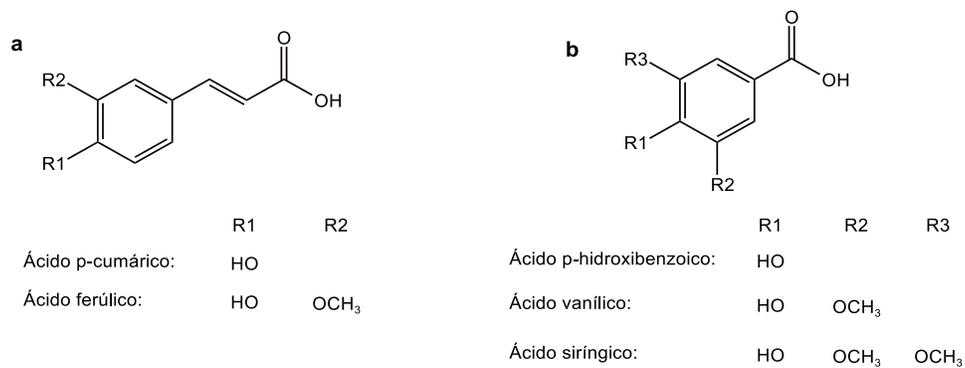


Figura 8. Ácidos fenólicos identificados en *E. canadensis*.
Derivados del ácido cinámico (a) y del ácido benzoico (b). Autoría propia.

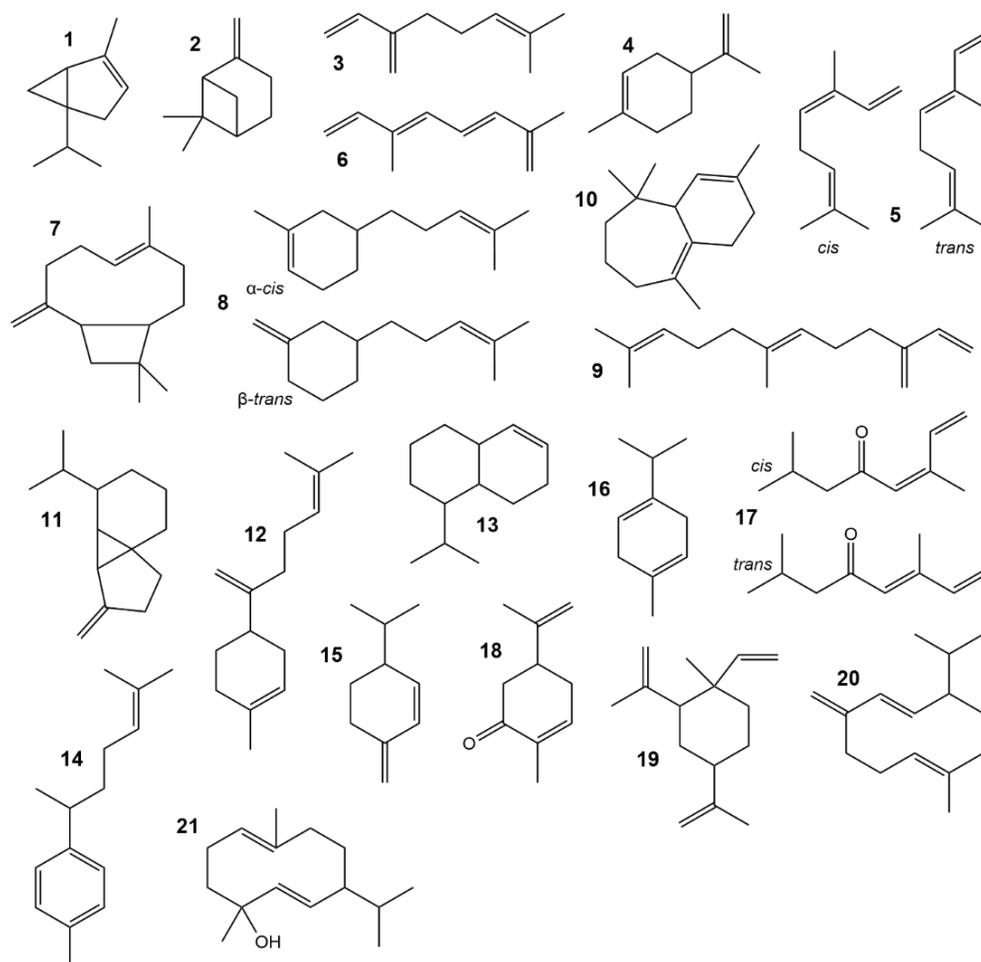


Figura 9. Compuestos identificados en el aceite esencial de *E. canadensis*.
1) tujeno, 2) pineno, 3) mirceno, 4) limoneno, 5) ocimeno, 6) cosmeno, 7) cariofileno, 8) bergamoteno, 9) farneseno, 10) himacaleno, 11) cubebeno, 12) bisaboleno, 13) cadineno, 14) curcumeno, 15) felandreno, 16) terpineno, 17) tagetona, 18) carvona, 19) elemeno, 20) germacreno D y 21) germacreno D-4-ol.
Autoría propia.

4. JUSTIFICACIÓN

E. canadensis es una especie medicinal que tiene actividades biológicas comprobadas en etapa preclínica efectos como antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, anticancerígeno, entre otros, además es una especie ampliamente distribuida en México y el continente americano, para el cual también es una especies nativa, a pesar de ello no se han realizado estudios biológicos de los individuos que crecen en México o América y el conocimiento de esta especie es limitado en nuestro país, aunado a esto, no se ha realizado la extracción selectiva de compuestos bioactivos de diferente polaridad para evaluar su potencial antioxidante, antibacteriano y antifúngico *in vitro* contra cepas de importancia médica, así como su posible efecto cicatrizante *in vivo*. Implementar técnicas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* de esta especie, ayudaría a mantener de manera sustentable y sostenible la producción de compuestos de interés por parte de la especie, en cualquier época del año y libre de contaminantes, con fines de investigación de sus efectos medicinales bajo diferentes condiciones de cultivo para favorecer la callogénesis.

5. HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos seriados de menor a mayor polaridad de *E. canadensis* contendrán compuestos antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos y cicatrizantes, los cuales podrán ser producidos de forma constante mediante el cultivo *in vitro* de callos.

6. OBJETIVOS

→ General

Establecer cultivos en condiciones *in vitro* de callo de *E. canadensis* capaces de producir compuestos bioactivos y evaluar su potencial antioxidante, antibacteriano y antifúngico *in vitro*, así como su posible efecto cicatrizante *in vivo*.

→ Específicos

- Realizar la colecta en campo del material vegetal para la identificación taxonómica, establecimiento de cultivos y obtención de extractos orgánicos.
- Establecer un protocolo de desinfección y cultivo de *E. canadensis* en condiciones *in vitro*.
- Inducir la formación de callo partiendo de explantes de hoja, segmento nodal y raíces de plántulas cultivadas *in vitro* mediante reguladores del crecimiento vegetal.
- Obtener extractos orgánicos seriados de menor a mayor polaridad con hexano, acetato de etilo y metanol de las hojas y tallos de la planta silvestre y las líneas de callo.
- Comparar los perfiles cromatográficos de planta silvestre y sus cultivos de callo de los extractos orgánicos mediante CCF e identificar los compuestos de la planta silvestre mediante GC-MS.
- Determinar el potencial antioxidante (DPPH), antibacteriano (MTT) y antifúngico (disco difusión Kirby-Bauer) *in vitro* y la capacidad cicatrizante *in vivo* (modelo excisional) de los extractos de la planta silvestre.

7. MÉTODO

7.1. Colecta material vegetal

Se colectaron ejemplares a finales de enero y marzo 2023 en cuatro sitios de la localidad Tetela del Volcán, Morelos, cuyas coordenadas son: 18°53'32.9''N 98°43'05.8''W, 18°53'17.1''N 98°43'31.3''W, 18°53'40.5''N 98°43'23.7''W y 18°52'58.2''N 98°45'58.3''W.

Los ejemplares completos fueron prensados y enviados al herbario HUMO del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la UAEM para la identificación taxonómica por el M. en C. Gabriel Flores Franco, lugar donde se mantienen bajo el folio 28943.

Por otra parte, las semillas utilizadas en los ensayos de desinfección y en la propagación *in vitro* se obtuvieron de las inflorescencias colectadas en los sitios de muestreo, así como la parte aérea (tallos y hojas), ya que permiten la extracción de una mayor cantidad de compuestos mediante solventes orgánicos y coleccionar solamente la parte aérea permite la regeneración del individuo *in situ*.

7.2. Propagación *in vitro*

A los aquenios se les retiró el vilano y fueron colocados en sobres de papel filtro para su desinfección y posteriormente se sembraron en condiciones asépticas.

En la primera fase de establecimiento del cultivo *in vitro* se realizaron ensayos de desinfección de semillas. Las cuales se colocaron en sobres de papel filtro debido a su tamaño y se utilizó el método común de desinfección para Asteráceas, el cual consiste en el lavado con agua destilada estéril y surfactante (detergente Salvo®) por 10 min, seguido de etanol al 70% por 30 s, después se realizaron variantes en la concentración de NaClO comercial (Clorox®) y tiempo de lavado considerando los tratamientos mostrados en la Tabla 4. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 5 min cada uno y la siembra de las semillas en tubos de vidrio de 14.5

cm de largo y 2.2 cm de diámetro con 25 mL de medio de cultivo MS, se realizaron cinco repeticiones de cinco unidades experimentales cada una, dando un total de 25 tubos por cada tratamiento de desinfección, mismos que se mantuvieron para el monitoreo de germinación.

Tabla 4. Tratamientos de desinfección de semillas.

Tratamiento	%Clorox®	%NaClO	Tiempo (min)
A	20	0.1	20
B	15	0.075	30

Los ensayos de desinfección y la propagación *in vitro* se realizaron en medio MS (Tabla 5) (152) adicionado con antioxidantes (ácidos cítrico 100 mg/L y ascórbico 150 mg/L), sacarosa al 3% (p/v) y Phytigel® 3 g/L, el pH fue ajustado entre 5.7 ± 0.1 antes de agregar el agente solidificante.

Tabla 5. Composición del medio MS utilizada.

Medio Basal	Fórmula química	Cantidad (mg/L)
<i>Macronutrientes</i>		
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	170
<i>Micronutrientes</i>		
EDTA (sal sódica)	Na ₂ EDTA	37.3
Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
<i>Vitaminas</i>		
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2

Ácido nicotínico (Vit. B3)	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5
Piridoxina (Vit. B6)	C ₈ H ₁₁ NO ₃	0.5
Tiamina (Vit. B1)	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS+	0.1

Las condiciones de almacenamiento en todos los casos fueron a 25 ± 2 °C y en un fotoperiodo de 16 h luz utilizando luz blanca fluorescente ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$).

Las unidades experimentales fueron monitoreadas de 2 a 3 veces por semana y se realizaron subcultivos de las plántulas cada mes manteniendo la composición del medio de cultivo utilizado para su germinación.

7.3. Inducción de callo

Las plántulas subcultivadas se mantuvieron en crecimiento hasta alcanzar una talla de 5 cm o superior y sus órganos bien desarrollados. Los explantes fueron tomados de la raíz (seccionada en dos partes, aproximadamente de 3 cm cada una), las hojas jóvenes (cortes transversales para obtener cuadrados de aproximadamente 0.5 cm por lado) y tallo (segmentos internodales entre 0.3 a 0.8 cm), los cuales fueron inoculados en los tratamientos de inducción, colocando de 5 a 7 explantes por frasco, en un total de cinco unidades experimentales de cada tipo de explante para cada tratamiento de inducción.

Los tratamientos consistieron en medio MS adicionado con vitaminas y antioxidantes, así como sacarosa y Phytigel® en las mismas cantidades empleadas en la fase de propagación, ajustando el pH en 5.7 ± 0.1 antes de agregar el agente solidificante, sin embargo, se adicionaron los reguladores del crecimiento Kinetina (KIN), 6-Bencilaminopurina (BAP) y Picloram (PIC) para inducir la desdiferenciación, siguiendo los tratamientos propuestos en la Tabla 6. Dicha selección de hormonas y concentraciones se realizó tomando como referencia los resultados para la especie *Conyza filaginoides* (153), ya que anteriormente *E. canadensis* se encontraba clasificada

en el género *Conyza* y dicho trabajo es el único antecedente con el que se cuenta sobre su cultivo *in vitro*.

Tabla 6. Balances hormonales para inducción a callo.

Tratamiento	KIN (mg/L)	BAP (mg/L)	PIC (mg/L)
Control (T0)	-	-	-
T1	0.1	-	0.1
T2	1.0	-	0.1
T3	2.0	-	0.1
T4	-	0.1	0.1
T5	-	1.0	0.1
T6	-	2.0	0.1
T7	0.1	-	1.0
T8	1.0	-	1.0
T9	2.0	-	1.0
T10	-	0.1	1.0
T11	-	1.0	1.0
T12	-	2.0	1.0
T13	0.1	-	2.0
T14	1.0	-	2.0
T15	2.0	-	2.0
T16	-	0.1	2.0
T17	-	1.0	2.0
T18	-	2.0	2.0

Una vez inoculados los explantes en los diferentes tratamientos se mantuvieron en las mismas condiciones de almacenamiento empleadas en la fase de propagación durante 30 días, haciendo observaciones una vez por semana. Transcurrido el mes, los callos obtenidos fueron subcultivados en medio de cultivo idéntico al de procedencia para el crecimiento y se realizaron los subcultivos mensualmente para la propagación del callo.

En cada observación se realizó el cálculo del porcentaje de formación de callo utilizando la siguiente fórmula para cada unidad experimental (154):

$$\% \text{formación de callo} = \frac{\text{explantes con callo}}{\text{total de explantes}} \times 100$$

Sin embargo, fue necesario realizar modificaciones al medio de cultivo debido al proceso de organogénesis, observado en los tratamientos hormonales con supervivencia a los subcultivos. Las modificaciones consistieron en la reducción de las sales basales (macro y micronutrientes) del medio MS a 75%, 50% y 25%, además de probar el aumento de la fuente de carbono (Sacarosa) al 5% y una fuente diferente (Glucosa al 3%).

De las líneas resultantes se consideró la supervivencia a los subcultivos siguientes, apariencia o morfología, producción de biomasa, porcentaje de acumulación de agua y producción de compuestos (perfiles por cromatografía en capa fina).

Para el cálculo del porcentaje de acumulación de agua se realizó con los datos de los pesos de la biomasa en fresco (PF) y en seco (PS) de los callos a los 21 días de su subcultivo en los medios modificados, como se muestra en la siguiente fórmula (155):

$$\% \text{ Acumulación de agua} = \left[\frac{PF - PS}{PF} \right] \times 100$$

7.4. Extractos orgánicos de planta silvestre y biomasa de cultivos de callo

La parte aérea de la planta silvestre fue separada en tallos y hojas, cada órgano de planta fue secado por separado a la sombra, a una temperatura de 18 ± 3 °C por 3 días, sobre camas de papel periódico en un cuarto ventilado, posteriormente se pulverizaron las hojas con ayuda de un mortero y los tallos en un procesador de alimentos (Nutribullet®, NB-101B) para facilitar la trituración del material y obtener partículas de menor tamaño.

La biomasa de las hojas se pesó y se colocó en un matraz de 2 L para la extracción seriada con solventes orgánicos de menor a mayor polaridad, para lo cual se agregaron 500 mL de hexano (Hex), se maceró la biomasa durante 72 h y se recuperó la fase líquida, este proceso se realizó dos veces más con el mismo solvente para después utilizar la misma biomasa y agregar 500 mL de acetato de etilo (AcOEt) y repetir el procedimiento, al finalizar los macerados con AcOEt se

agregaron 500mL de metanol (MeOH) a la biomasa utilizada anteriormente y se repitió el procedimiento hasta completar tres maceraciones.

La biomasa de los tallos fue sometida al mismo procedimiento de pesaje y extracción seriada con solventes orgánicos de menor a mayor polaridad, realizando tres macerados de 72 h para cada solvente y utilizando la misma biomasa recuperada del solvente anterior.

En el caso de los callos obtenidos, la biomasa fue colocada dentro de una caja Petri de vidrio con papel filtro en la base y fue secada en un horno de secado horizontal (Ecoshel, Modelo 9023A) a 50 °C por 12 h, una vez secos se procedió directamente la trituración y maceración en solventes orgánicos, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para los órganos de la planta silvestre.

Las fases líquidas resultantes de cada maceración se filtraron a través de papel filtro Whatman 1 (tamaño de poro de 11 µm, flujo medio) para eliminar residuos de biomasa y se concentraron en un rotaevaporador (Prendo, D-402-10). Los extractos resultantes se reunieron por polaridad del solvente orgánico utilizado en la extracción y órgano de la planta o línea de callo, para obtener un total de tres extractos por cada órgano de la planta o línea de callo.

Los extractos se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta la evaporación total del solvente para obtener los pesos de cada extracto concentrado o seco y se comparó con el peso de la biomasa seca inicial de la planta silvestre para obtener el rendimiento mediante la fórmula (156):

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Peso seco del extracto}}{\text{Peso seco de la biomasa}} \times 100$$

7.5. Perfiles cromatográficos

7.5.1. Cromatografía en capa fina

Los extractos fueron evaluados mediante CCF utilizando cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ Supelco®. Se colocaron muestras de cada extracto en las placas y posteriormente se realizó la elución en sistemas de polaridad creciente Hex-AcOEt 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, seguidos de un sistema 100:0 de diclorometano (CH₂Cl₂) y de ser necesario se utilizaron sistemas 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 y 50:50 de CH₂Cl₂-MeOH, hasta la completa elución de los compuestos, con la finalidad de obtener los perfiles cromatográficos de cada extracto considerando su polaridad. Finalmente, las placas fueron reveladas en luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) para determinar la presencia de compuestos con enlaces conjugados de diferente polaridad en cada extracto, así como con sulfato cérico amoniacal (SCA) como revelador químico universal para identificar compuestos con grupos hidroxilo (alcoholes y polialcoholes) (157).

7.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Se realizó la identificación de los compuestos presentes en mayor abundancia mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en colaboración con el laboratorio 307 de fitoquímica del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM a cargo de la M. en C. Silvia Marquina Bahena.

Las muestras de los extractos fueron disueltas en solventes grado reactivo a una concentración de 4 mg/mL, los cuales fueron inyectados en el equipo de cromatografía. Los extractos de hexano se disolvieron en diclorometano, los de AcOEt y metanol en su solvente de procedencia, estos fueron analizados en un cromatógrafo de gases HP Agilent Technologies 6890 acoplado al detector de masas HP Agilent de cuádruplo MSD 5973. Utilizando Helio en una columna capilar Agilent HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano, 30 m longitud, 0.32 mm diámetro interno, 0.50 µm grosor,

temperatura de -60 hasta 350 °C), a una temperatura inicial de 40 °C con un aumento progresivo hasta 280 °C, el tiempo por corrida fue de 50 min. En cuanto al espectrómetro de masas se utilizó impacto positivo con energía de ionización a 70eV. Se manejó el monitoreo selectivo de iones (SIM) para la detección, los picos fueron identificados y cuantificados mediante los iones de fragmentación, los cuales se compararon con la biblioteca de datos NIST 14 (National Institute of Standard and Technology) con un factor de coincidencia superior al 80%.

7.5.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

También se realizó cromatografía de líquidos (HPLC) para las muestras de metanol, debido a la polaridad alta de los compuestos presentes en estos extractos, en colaboración con el Dr. Manasés González Cortazar del Laboratorio de fitoquímica del CIBIS. Para lo cual se utilizó un módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y el software Empower Pro (Waters Corporation). La fase estacionaria consistió en una columna de fase reversa Discovery C18 Supelco (250 x 4 mm, 5 µm) y la fase móvil consistió en el sistema A (agua grado HPLC con 0.5% ácido trifluoroacético o TFA) y sistema B (acetonitrilo) en gradientes de: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30% B; 21-23 min, 50% B; 24-25 min, 80% B; 26-27 min, 100% B; 28-30 min, 0% B. El volumen de inyección de los sistemas fue de 10 µL, manteniendo un flujo de 0.9 mL/min durante 30 min, la muestra fue inyectada a una concentración de 2 mg/mL. La absorbancia fue medida a 360 nm.

7.6. Evaluaciones biológicas

Las evaluaciones biológicas se realizaron por colaboración empleando los métodos establecidos y estandarizados en los laboratorios de investigación.

Para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* se colaboró con la Dra. Valery Domínguez Villegas en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Química de la UAEM.

En cuanto a la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*, se realizó en colaboración con la Dra. Virginia Mandujano González en las instalaciones del Departamento de Biotecnología de la UTC y con la Dra. María Crystal Columba Palomares en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, UAEM.

Finalmente, la evaluación del efecto cicatrizante *in vivo* se realizó en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina de la UAEM en colaboración con el Dr. Juan José Acevedo Fernández y la Dra. Elizabeth Negrete León.

Cabe destacar que las actividades biológicas fueron evaluadas solamente para los extractos de hojas y tallos de la planta silvestre.

7.6.1. Pruebas *in vitro*

7.6.1.1. Potencial antioxidante

Se empleó el ensayo de DPPH (hidrato 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, Sigma-Aldrich Chemie), descrito por Domínguez-Villegas et al. (2013) para determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de la planta silvestre de *E. canadensis*, ya que este método permite medir la capacidad de las moléculas para inhibir directamente la estructura de los radicales libres al ser donadores de átomos de hidrógeno.

Para ello las muestras al igual que el radical DPPH se disolvieron en etanol absoluto. De los extractos de la planta silvestre se preparó una solución de 20 mg/mL, utilizando baño de ultrasonificación y baños agua caliente (40°C) para disolver completamente las muestras, y tomar las alícuotas del stock necesarias para preparar las soluciones problema a concentraciones de 1000

ppm, 100 ppm y 10 ppm (equivalentes a 1000, 100 y 10 mg/L). Como control positivo se utilizaron soluciones de quercetina a 1000 ppm, 100 ppm y 10 ppm. A 0.5 mL de estas soluciones se les agregó 1.5 mL de la solución de DPPH (50 µM) y de la misma manera se preparó la muestra blanco, utilizando etanol absoluto y el radical DPPH, todas las soluciones se almacenaron en condiciones de oscuridad por 90 min para finalmente realizar las lecturas en un espectrofotómetro Genesys 20 a 517 nm por triplicado (n=3).

Las absorbancias de la muestra blanco ($\dot{A}B$) al tiempo cero y de la muestra de extracto ($\dot{A}M$) después del tiempo de almacenamiento (90 min se utilizaron para calcular los porcentajes de inhibición del radical libre (DPPH) mediante la fórmula siguiente (158):

$$\%inhibición = \left[\frac{\dot{A}B - \dot{A}M}{\dot{A}B} \right] \times 100$$

7.6.1.2. Actividad antimicrobiana

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron las cepas bacterianas: *Escherichia coli* (Gram -, ATCC 25922 y ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (Gram +, ATCC 25923 y ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* metilcilin-resistente (Gram +, ATCC 43300), *Salmonella typhimurium* (Gram -, ATCC 14028), *Streptococcus pyogenes* (Gram +, ATCC 19615) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -, aislado clínico), las cuales han sido reportadas en problemas gastrointestinales y urinarios (159); así como la levadura *Candida albicans* (aislado clínico) la cual causa infecciones en las mucosas gastrointestinales y genitales (160). Y se realizaron las evaluaciones *in vitro* mediante las pruebas de susceptibilidad con discos y difusión en medio.

Para la **prueba de susceptibilidad por disco difusión Kirby-Bauer** (161), las cepas previamente activadas en medios líquidos, EC con MUG para *E. coli* (ATCC 25922), caldo soya tripticaseína para *S. aureus* (ATCC 25923) y caldo dextrosa-papa para *C. albicans* (aislado

clínico), se sembraron en medio Mueller-Hinton (MH) mediante estría cruzada para la obtención de colonias, estas fueron disueltas en solución salina 0.9% y ajustadas al estándar McFarland 0.5 (equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL) a una absorbancia entre 0.08 y 0.13 en longitud de onda de 625 nm. El estándar de cada microorganismo fue sembrado nuevamente en cajas Petri con agar MH con un isopo estéril, dispersando en toda la superficie del agar.

Los extractos de hexano y AcOEt se disolvieron en los solventes de procedencia, mientras que los extractos de metanol se disolvieron en agua; de cada extracto se prepararon soluciones problema de 100, 50, 25 y 12.5 mg/mL, las cuales se adicionaron a discos estériles de papel filtro de 6mm de diámetro en una cantidad de 10 μ L, además se prepararon de las misma forma discos con los antibióticos gentamicina 80 mg/mL, estreptomicina 500 mg/mL y fluconazol 2 mg/mL, como controles positivos para la inhibición del crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, respectivamente, y los discos con los controles negativos, que fueron los disolventes utilizados para los extractos (hexano, acetato de etilo y agua).

Los discos con las muestras de extracto y controles se colocaron en la superficie del agar MH previamente inoculado. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 h y se midieron los halos de inhibición (mm) con un Vernier.

También se realizó el **método de microdilución en caldo** para obtener las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) empleando la metodología reportada en el M100S Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (162) en las cepas *E. coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* metilcilin-resistente (ATCC 43300), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. pyogenes* (ATCC 19615) y *P. aeruginosa* (aislado clínico).

Para ello, se prepararon los extractos a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 y 3.9 μ g/mL, partiendo de una solución stock de concentración 1000 μ g/mL realizando

diluciones con DMSO 10%. Como control positivo se utilizó gentamicina en concentraciones de 20 a 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El inóculo de cada cepa bacteriana se preparó en solución salina 0.85% y se ajustó visualmente al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), estos se diluyeron 1:100 en caldo MH, teniendo una concentración final de 5×10^5 UFC/mL.

Se utilizaron placas de 12 x 8 pozos, utilizando una fila de pozos como el control de crecimiento positivo (100 μL de caldo más 100 μL de inóculo) y otra como control de esterilidad (200 μL caldo), en el resto de pozos se colocaron las diferentes concentraciones de los extractos (100 μL esterilizados por filtración, filtro Corning® de 0.20 μm) y se les adicionaron 100 μL de los inóculos, las placas se incubaron durante 24 h a 37°C.

Para determinar las CMI se agregaron 10 μL de la solución MTT (0.4 mg/mL) a los pozos después de las 24 h de incubación y se comparó visualmente con el control de crecimiento positivo, en el cual el color es azul violeta debido a la presencia de células que realizan la respiración celular, aquellos pozos con cambio de color a amarillo se consideraron como las concentraciones que inhibían la actividad metabólica de las bacterias, el valor de CMI se reportó en $\mu\text{g}/\text{mL}$ considerando la concentración más baja en la que se observó el cambio de color (163).

7.6.2. Pruebas in vivo

7.6.2.1. Actividad cicatrizante

La evaluación del efecto cicatrizante se realizó con ratones CD1 macho de 20 ± 2 g, mantenidos en condiciones medioambientales controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (55%) y fotoperiodo (12 h luz), alimentadas con pellets estándar (Rodent diet, Circulo ADN S.A. de C.V.) y en todo momento con agua disponible.

Los procedimientos realizados fueron apegados a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, además, el Comité para el

Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL) de la Facultad de Medicina de la UAEM, aprobó el protocolo para el ensayo cicatrizante.

Para realizar el ensayo, los ratones fueron sedados mediante inyección intraperitoneal de 1 mL de pentobarbital inyectable Aranda® por gramo de peso para afeitar la región dorsal y realizar la incisión de 5 mm de diámetro.

Partiendo de 1 y 5 mg de los extractos orgánicos se prepararon soluciones stock de 1 mL, disolviendo el extracto MeOH en agua y el extracto AcOEt en agua con 100µl de DMSO para lograr la disolución completa. Como controles negativos se utilizaron agua destilada sola y con el vehículo, KitosCell-Q® (fenil metil piridona, 8 g) disuelto en agua destilada como control positivo en una concentración de 5 mg/mL. y los extractos orgánicos obtenidos de la planta silvestre a 0.01 y 0.05 mg por aplicación.

Para cada aplicación de tratamiento se colocaron 0.01 mg y 0.05 mg de los extractos disueltos con una micropipeta de 10 µL en la herida de forma tópica en los días 0, 1, 3 y 6. El cierre de las heridas se monitoreó al día 0, 1, 3, 6, 8, 10 y 13 de haber realizado la incisión con una cámara para microscopio AmScope MU1000 de 10mp.

De cada unidad experimental (herida dorsal del ratón) se tomaron cinco fotografías y de cada fotografía se realizaron cinco mediciones de área con el programa Image J. El promedio de las mediciones por fotografía para los diferentes días ($\bar{x}f_{Día x}$) se utilizó para obtener el área normalizada con la fórmula siguiente (164):

$$\text{Área normalizada} = \frac{\bar{x}f_{Día x} (100)}{\bar{x}f_{Día 0}}$$

Finalmente, se obtuvo el promedio de las repeticiones (las áreas normalizadas de cada unidad experimental) para obtener las gráficas de reducción de la herida durante los 13 días de monitoreo. Finalizado el ensayo los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ y cabe destacar que se

redujo el número de animales utilizados en medida de lo posible para realizar la evaluación del efecto cicatrizante.

7.7. Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias significativas se realizaron las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos obtenidos en las pruebas de desinfección, germinación, inducción de callo, acumulación de agua y potencial antioxidante, así como ANOVA de una vía en los datos paramétricos obtenidos de las biomasas de callos, halos de inhibición en la actividad antimicrobiana y áreas normalizadas en la actividad cicatrizante. Mientras que para determinar los tratamientos diferentes en cada grupo de datos evaluado se realizó la pruebas Tukey a 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

El análisis estadístico y la presentación en gráficas se realizó con el programa GraphPad Prism 9.3.0 (Dotmatics), corroborando la información estadística con el programa NCSS 2020 (NCSS Statistical Software).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en el trabajo se siguió la metodología antes descrita y en resumen se presentan las técnicas y procedimientos empleados con los principales hallazgos en cuanto al cultivo *in vitro* e inducción de callo, comparación de la fitoquímica de la planta silvestre y las líneas de callo, así como en las evaluaciones biológicas (Figura 10), los cuales se describen y analizan en extenso en los siguientes apartados.

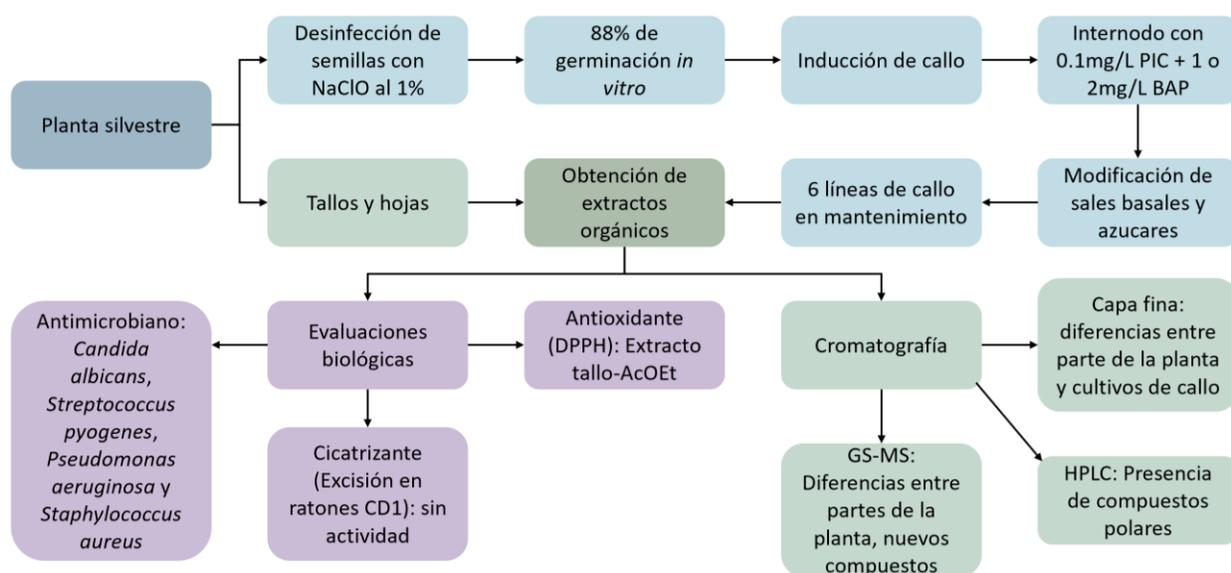


Figura 10. Resumen de los resultados.

8.1. Material vegetal

Para la obtención del material vegetal requerido para el establecimiento de los cultivos *in vitro* y la extracción de los compuestos de *E. canadensis* se realizaron colectas en los meses de enero y marzo de 2023 en las cercanías al área habitada de Tetela del Volcán (Figura 11) se identificaron ejemplares en estado vegetativo y reproductivo para ambos meses (Figura 12), haciendo evidente que la floración puede ocurrir también en los meses de crecimiento vegetativo (marzo a junio) (81), llegando a encontrar inflorescencias hasta finales de marzo, lo que permitió la colecta de

hojas y tallos para la obtención de extractos orgánicos de la planta silvestre en estado vegetativo y de achenios maduros para el establecimiento del cultivo *in vitro* mediante la germinación.



Figura 11. Sitios de colecta de *E. canadensis*.

Sitio 1: 18.892465, -98.718273. Sitio 2: 18.888082, -98.725362. Sitio 3: 18.894588, -98.723248. Sitio 4: 18.882834, -98.766206.

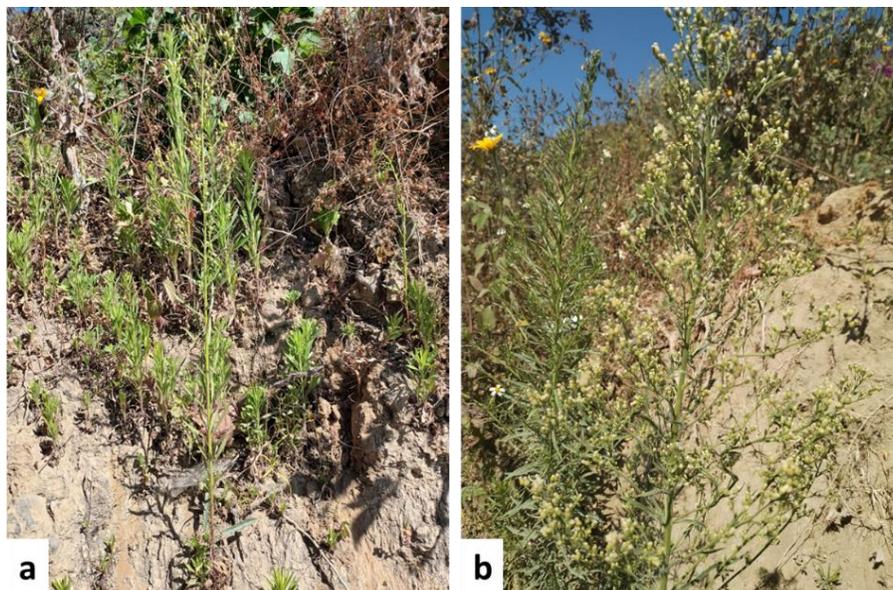


Figura 12. Ejemplares de *E. canadensis* in situ. Fase de crecimiento activo o estado vegetativo (a) y floración (b).

8.2. Propagación *in vitro*

8.2.1. Desinfección

Para el establecimiento de los cultivos *in vitro* se utilizaron las semillas previamente colectadas, las cuales fueron desinfectadas antes de ser sembradas en condiciones estériles, para ello se plantearon dos tratamientos de desinfección, los cuales al día 20 después de la siembra muestran un 100% de desinfección en ambos casos, por lo que no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, el porcentaje de germinación fue significativamente diferente como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de desinfección y germinación de las semillas.

Tratamiento	%Desinfección	%Germinación
A	100 ± 0	88 ± 13.04*
B	100 ± 0	40 ± 7.07

*Los valores presentan la media ± desviación estándar de los datos obtenidos al día 2, n=5. *: tratamiento con la media más alta, significativamente diferente con p-value>0.05 para el porcentaje de desinfección y p-value<0.008 para el porcentaje de germinación. Prueba de Kruskal-Wallis y Tukey.*

Utilizando el tratamiento A fue posible obtener desde un 67% hasta 100% de germinación, mientras que el tratamiento B permitió un porcentaje de germinación de 33% a 47% como máximo, evidenciando las diferencias significativas entre ambos tratamientos de germinación. Además, al final de los 30 días de monitoreo las plántulas del tratamiento A exhibieron mayor tamaño con órganos más desarrollados, así como una talla superior a comparación de las plántulas del tratamiento B, las cuales mostraron hojas de menor tamaño, de coloración tenue, internodos cortos, menor cantidad de raíces y de poca longitud (Figura 13).

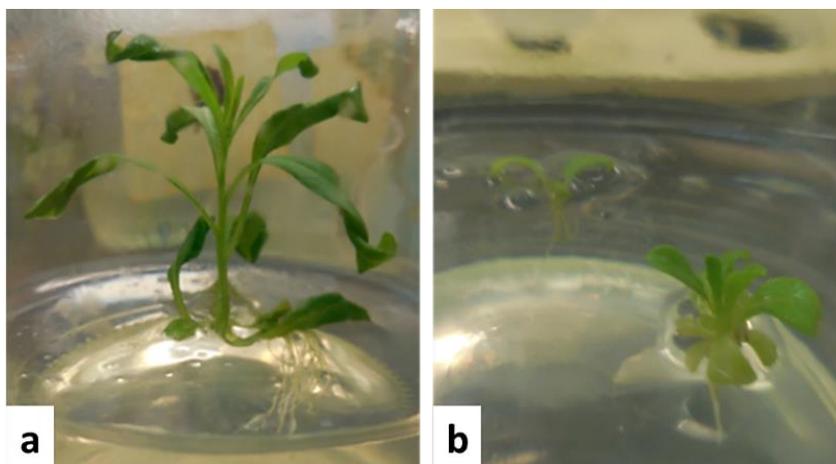


Figura 13. Diferencias morfológicas de las plántulas obtenidas. Tratamientos A (a) y B (b) de desinfección al día 30.

Estas diferencias en el porcentaje de germinación y en la morfología de las plántulas entre los tratamientos pueden estar relacionadas al tiempo de exposición y concentración de NaClO empleadas para la desinfección, ya que fueron las variables a considerar, en cuanto a los tiempos de lavado con detergente, etanol 70% y agua, e incluso las condiciones de siembra y mantenimiento fueron las mismas para ambos tratamientos. Por lo que se propone el aumento en la exposición al NaClO como principal causa de la disminución en la germinación en el tratamiento B, a pesar de que la concentración de NaClO fue menor que en el tratamiento A.

Reportes de otras especies han mostrado resultados similares a los observados en *E. canadensis*, por ejemplo, en semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae), la viabilidad se vio afectada al ser expuesta a NaClO 0.1% durante 7 min (165), a pesar de que la concentración de NaClO es similar a la del tratamiento A, en *E. canadensis* no se observaron dificultades para la germinación. Para *Oncidium bifolium* (Orchidaceae) se observó que el aumentar la concentración de NaClO disminuye la germinación (166) al igual que en *Linum usitatissimum* (Linaceae), el aumento de la temperatura de desinfección disminuye significativamente la germinación (167). Mientras que en un estudio con *Allium cepa* y *Latuca sativa* se identificaron aberraciones

cromosómicas en células meristemáticas causadas por la exposición a hipoclorito de sodio como agente desinfectante (168).

Por otra parte, en *Aster pyrenaicus* (Asteraceae) se identificó el tamaño del aquenio (grande) y la coloración (oscura) como factores que aumentan el porcentaje de germinación, así como el mantenimiento en un fotoperiodo de 12 h luz a una temperatura de 20 °C (169), sin embargo, en el caso de *E. canadensis* no se realizó una separación de los aquenios por tamaño o coloración.

En caso de la contaminación persistente por bacterias, el tiempo de lavado en detergente puede aumentarse de 20 a 25 min, o bien aumentar la cantidad de cloro comercial de 20 a 25% para reducir la contaminación, se probó añadiendo agua oxigenada comercial con 2.5-3.5% de peróxido de hidrógeno (170), sin embargo, la contaminación persistió, por lo que se propone utilizar HgCl₂ como agente desinfectante ya que ha permitido la obtención de cultivos asépticos en otras especies de la familia Asteraceae (171,172).

8.2.2. Propagación

El monitoreo semanal de la germinación y desarrollo permitió identificar las siguientes fases fenológicas en condiciones *in vitro* (Figura 14):

- a) Germinación: cambio de coloración del aquenio, de color café o marrón a verde debido a la emergencia de la plúmula entre el tercer y quinto día.
- b) Desarrollo de los primeros órganos: en *E. canadensis* las hojas son el primer órgano que se desarrolla, entre los días cinco y ocho se puede apreciar el desarrollo de las dos hojas primordiales (originadas de los cotiledones).
- c) Plántulas: después del desarrollo de hojas primordiales emerge la raíz y continua la elongación del tallo con el desarrollo de las hojas del follaje entre el día ocho y quince.

- d) Floración: Si el cultivo se mantiene por más de un mes después del subcultivo de las plántulas, los tallos comienzan a ramificarse y generar inflorescencias, que se desarrollan hasta la apertura de las flores.

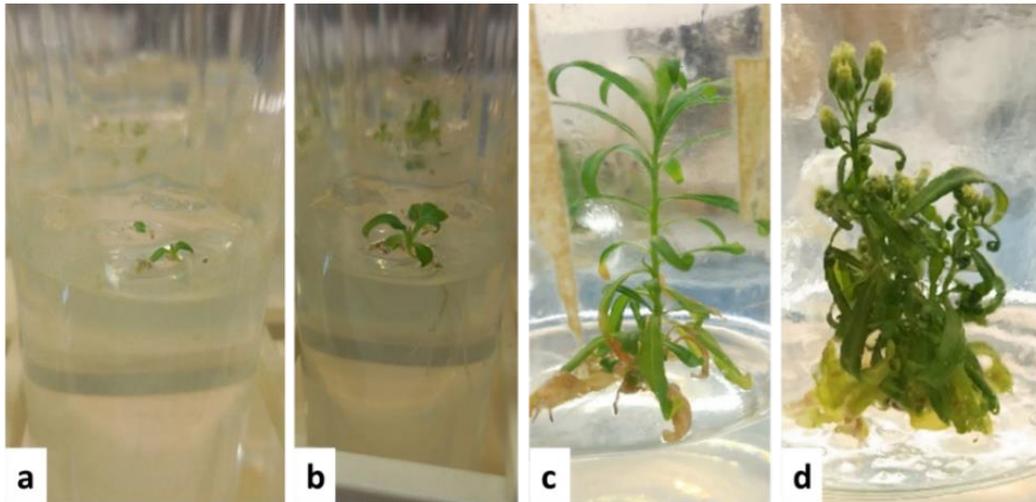


Figura 14. Desarrollo de las plántulas de *E. canadensis* in vitro. Germinación (a), emergencia de las primeras hojas (a y b), desarrollo de raíz y elongación de tallo (c), floración (d).

La floración en condiciones *in vitro* está relacionada al fotoperiodo (principalmente el uso de 16 h luz), reguladores del crecimiento, concentraciones altas de nitrógeno o sacarosa en el medio y cambios de temperatura (vernalización), principalmente (173), por lo que descubrir la causa de la floración *in vitro* de *E. canadensis* requiere la realización de experimentos variando el fotoperiodo, la concentración de sales del medio basal y la concentración de sacarosa, ya que son las condiciones que se mantuvieron constantes durante la propagación de la especie.

Por otra parte, se observó que la floración retarda la elongación del tallo y el crecimiento de las hojas, por lo que las plantas ya no eran viables para la toma de explantes, de tal forma que fue necesario tomar las plántulas que se encontraban en estado vegetativo y en activo crecimiento (aproximadamente dos semanas después del subcultivo) para la inducción de callo.

8.3. Inducción de callo

Partiendo de las plántulas obtenidas desde la germinación se estableció el cultivo de callos. Para ello, se utilizó como antecedente el balance auxina:citoquinina de 1mg/L de Picloram y 0.1 mg/L de KIN o BAP para obtener callos friables de *Conyza filaginoides* (153) (género en el que se agrupaba anteriormente *E. canadensis*), por lo que en el presente estudio se ampliaron las concentraciones de estas hormonas para obtener líneas de callo friable.

Se identificaron 8 tratamientos (T2, T3, T5, T6, T12, T14, T15 y T16) como formadores de más de un 50% de callo friable en alguno de los explantes y que sobrevive más de 30 días (Tabla 8); sin embargo, después de realizar el subcultivo de los callos, solamente los procedentes de los tratamientos T5 y T6 de explante internodal fueron capaces de sobrevivir y continuar su crecimiento, a pesar de haberse observado el desarrollo de callo en todos los explantes de hoja del tratamiento T5 y en los tres tipos de explante del tratamiento T6 con una mayor frecuencia en los explantes de raíz.

Tabla 8. Formación de callo al finalizar los 30 días de cultivo por explante.

Tratamiento	RCV	Explante		
		Hoja	Internodo	Raíz
T0	Control	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T1	0.1 mg/L PIC + 0.1 mg/L KIN	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T2	0.1 mg/L PIC + 1.0 mg/L KIN	60±10 ^b	0±0 ^d	90±7.07 ^b
T3	0.1 mg/L PIC + 2.0 mg/L KIN	62.5±12.58 ^b	0±0 ^d	100±0 ^a
T4	0.1 mg/L PIC + 0.1 mg/L BAP	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T5	0.1 mg/L PIC + 1.0 mg/L BAP	100±0^a	96.75±6.5^a	0±0^c
T6	0.1mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP	73.33±11.54^b	87.5±9.57^{a,b}	90±7.07^b
T7	1.0 mg/L PIC + 0.1 mg/L KIN	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T8	1.0 mg/L PIC + 1.0 mg/L KIN	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T9	1.0 mg/L PIC + 2.0 mg/L KIN	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T10	1.0 mg/L PIC + 0.1 mg/L BAP	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T11	1.0 mg/L PIC + 1.0 mg/L BAP	0±0 ^c	33.33±11.54 ^c	0±0 ^c
T12	1.0 mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP	0±0 ^c	62.5±15 ^b	0±0 ^c
T13	2.0 mg/L PIC + 0.1 mg/L KIN	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T14	2.0 mg/L PIC + 1.0 mg/L KIN	0±0 ^c	67.33±6.35 ^b	0±0 ^c
T15	2.0 mg/L PIC + 2.0 mg/L KIN	0±0 ^c	80±18.25 ^b	0±0 ^c

T16	2.0 mg/L PIC + 0.1 mg/L BAP	0±0 ^c	67.5±9.57 ^b	0±0 ^c
T17	2.0 mg/L PIC + 1.0 mg/L BAP	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c
T18	2.0 mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP	0±0 ^c	0±0 ^d	0±0 ^c

Los valores reportados corresponden al porcentaje de formación de callo ± desviación estándar, n=5. ^a: tratamiento con la media más alta, letra similar indica que no hay diferencias significativas entre ellos, el orden de las letras en superíndice indican las medias en orden decreciente con diferencias significativas. p-value<0.02 para explantes de hoja y raíz y p-value<0.007 para explantes de internodo. Prueba de Kruskal-Wallis y Tukey.

De forma general, el explante de internodo formó callo en un mes en el 38.88% de los tratamientos, mientras que de los explantes de hoja y raíz se obtuvo callo en 22.22% y 16.66% de los tratamientos, respectivamente. Sin embargo, la literatura reporta que el tipo de explante, los RCV, sus concentraciones y la especie vegetal son factores determinantes para obtención de callo. Particularmente, especies pertenecientes a la familia Asteraceae de las que se han establecido cultivos de callo en medio basal MS suplementado con hormonas, tales como *Vernonanthura patens*, en la cual utilizar 2,4-D (0.5 mg/L) y BAP (1 mg/L) induce callo friable en explantes de hoja (174) mientras que en *Cichorium intybus* se formaron al emplear ANA (0.5 mg/L) y BAP (1 mg/L) (175) y en *Artemisia arborescens* el callo se formó en condiciones de oscuridad con KIN (2 mg/L) y ANA (1 mg/L), así como en fotoperiodo de 16 h luz con BAP (2 mg/L) y ANA (1 mg/L) (172). Por otra parte, el explante de internodo de *Artemisia scoparia* formó callo en tratamientos con KIN (0.5 mg/L) y AIB (1 mg/L) (176), en *Artemisia ludoviciana* los explantes internodales formaron callo en condiciones de oscuridad y fotoperiodo de 16 h luz con BAP (0.1 mg/L) y PIC (1 mg/L), mientras que los explantes de raíz lo hicieron en tratamientos con KIN (0.1 mg/L) y 2,4-D (1 mg/L), tanto en oscuridad como en fotoperiodo de 16 h luz, y con KIN (0.1 mg/L) y PIC (1 mg/L) en condiciones de oscuridad (177).

En todos los tratamientos se obtuvieron callos con variaciones de color del verde al blanco y algunas veces con ligera coloración café. Los callos de hoja fueron ligeramente más compactos en comparación con los obtenidos de explantes de internodo y raíz, a pesar de tener resistencia a la

oxidación en los primeros días de cultivo no sobrevivían los 30 días de cultivo (Figura 15^a), mientras que los callos formados de internodos presentaban apariencia más suave y de color blanco, además resistieron de mejor manera la oxidación (Figura 15b), a diferencias de los callos de raíz, los cuales, desde los primeros días de formación, comenzaban a presentar oxidación a pesar de su apariencia suave y colores claros (Figura 15c).



Figura 15. Inicio de la formación de callo.
Explantos de hoja (a), internodo (b) y raíz (c).

Solamente los explantes de internodo de los tratamientos T5 y T6 con 0.1 mg/L de PIC + 1 y 2 mg/L de BAP respectivamente, formaron callo friable de consistencia suave y color blanco a verde, con pocas diferencias morfológicas apreciables (Figura 16), destacando que el tratamiento T5 presenta oxidación del tejido con mayor frecuencia que el tratamiento T6. Los callos de estos tratamientos son capaces de resistir los subcultivos y continuar su crecimiento, por ello estas líneas fueron mantenidas para la obtención del material inoculado en los tratamientos siguientes.

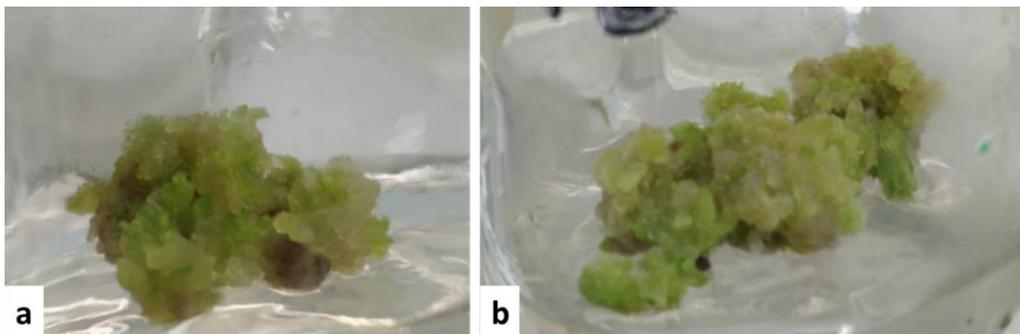


Figura 16. Callo obtenido de internodo.
T5 con 0.1 mg/L PIC + 1.0 mg/L BAP (a) y T6 con 0.1 mg/L PIC + 2.0 mg/L BAP (b).

Cabe destacar que, en las dos líneas de callo que se mantienen, la relación auxina:citoquinina es baja, puesto que tanto T5 como T6 contienen la menor concentración de la auxina PIC (0.1 mg/L) pero las dos concentraciones más altas de la citoquinina BAP (1 mg/L y 2 mg/L respectivamente). Sin embargo, aumentar la concentración de la auxina PIC a 1 o 2 mg/L no favorece la producción de callo, puesto que el explante muere debido a la oxidación, suceso que también ocurre con el callo recién formado dentro de las primeras dos semanas. Aunado a esto, se observó que los tratamientos con Kinetina no sobreviven al subcultivo después de los 30 días de cultivo.

El picloram es una auxina sintética también utilizada como herbicida contra dicotiledóneas y plantas leñosas principalmente (178), sin embargo, para la formación de callo se han utilizado 0.5 mg/L en *Mucuna pruriens* (179) y 1 mg/L en *Gerbera jamesonii* (180) sin efectos adversos, así como 2.5 mg/L PIC en combinación con 0.5 mg/L de Thidiazuron (TDZ) en *Siraitia grosvenorii* (181).

Por otra parte, en cultivos *in vitro* de brócoli, las concentraciones de 1.0-2.0 mg/L de BAP en combinación con 1.0 a 3.5 mg/L de AIB permite la formación de callo y el tratamiento con 1.0 mg/L BAP + 1.5 mg/L AIB permitió la mayor producción de biomasa, sin embargo, las concentraciones con mayor cantidad de AIB (1.0-3.5 mg/L) en combinación con BAP (1.0-2.0 mg/L) inducen la formación de hojas (182).

En cuanto a la iluminación, se observó que durante los primeros meses de cultivo la escasez de iluminación ocasiona la oxidación del tejido durante la fase de crecimiento (Figura 17), por lo que se mantuvieron en un fotoperiodo (16 h luz) con iluminación directa, condiciones similares a las empleadas en la germinación y crecimiento de las plántulas para evitar la oxidación completa del tejido. Si bien la variación en la iluminación es un factor que puede o no favorecer la formación

de callo, también se ve afectada la morfología de los callos y la producción de compuestos (183–185).



Figura 17. Tejido calloso oxidado.

A pesar, de que las condiciones de mantenimiento fueron similares durante todo el proceso de inducción y crecimiento del callo, se observó la presencia de hojas y callo con menor friabilidad (Figura 18), por lo que se modificó la concentración de sales basales y azúcares con la finalidad de obtener callos friables no organogénicos.



Figura 18. Organogénesis indirecta en los cultivos T5 y T6.

De estos tratamientos adicionales, se observó que el peso fresco de los callos es mucho más variable que el peso seco y la acumulación de agua, como se describe a continuación.

8.3.1. Efecto de las modificaciones al T5 y T6 sobre los callos

Con la finalidad de evitar la organogénesis indirecta en los tratamientos T5 y T6, así como mejorar la consistencia friable de los callos se modificaron las concentraciones de sales basales del medio MS, realizando la reducción de macro y micronutrientes al 75, 50 y 25%, también se aumentó la cantidad de sacarosa (del 3 al 5%) y se probó la glucosa a 3% como una fuente de carbono alterna.

Estas modificaciones se realizaron debido a que está reportado que los azúcares actúan también como moduladores del desarrollo y crecimiento vegetal mediante la expresión génica, mantenimiento del potencial osmótico y conservación del agua dentro de las células, así como el almacenamiento de carbohidratos ocasiona la expansión de las células y en combinación con RCV inducen respuestas morfogénicas (186). Particularmente, la sacarosa, glucosa y fructosa son consideradas moléculas que participan en el crecimiento, respuesta al estrés, mediación de la germinación y fotosíntesis, regulación de la expresión génica y mantenimiento de homeostasis osmótica (187).

En cuanto a los callos de *E. canadensis*, se realizaron las tomas de muestra de la misma cantidad de frascos al día 21 de haber realizado el subcultivo en el medio modificado, dado que en dicho momento los callos han alcanzado su crecimiento máximo y aumentar el tiempo de permanencia en el medio podría ocasionar la oxidación del tejido.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, donde se observa que existen diferencias significativas en la producción de biomasa fresca cuando se modifica la fuente de carbono y la concentración de sales del medio MS, notando que para los tratamientos con 3% y 5% de sacarosa con el balance hormonal T5 se presentan una mayor producción de biomasa fresca cuando el medio MS está en su 100% de sales basales, siendo de 79.20 ± 7.52 y 90.12 ± 10.21 g/L respectivamente,

mientras que en los tratamientos con glucosa el porcentaje de sales en 75% permite una mayor obtención de biomasa (63.62 ± 19.89 g/L), sin embargo, considerando todos los tratamientos, es el medio MS 100% con sacarosa al 5% el tratamiento que presenta una mayor producción de biomasa en fresco (90.12 ± 10.21 g/L). Por otra parte, en el balance hormonal T6, la mayor producción de biomasa se logra en MS al 100% de sus sales basales con 3% de sacarosa (147.21 ± 16.59 g/L) y con 5% de sacarosa (129.54 ± 9.51 g/L), superando incluso la mayor producción observada en el tratamiento T5. Por lo que, en cuanto a producción de biomasa fresca, el tratamiento T6 con el 100% de la concentración de sales basales y 3% de sacarosa brinda una mayor cantidad.

Tabla 9. *Peso de la biomasa fresca de los callos por tratamiento al día 21.*

Fuente de carbono	Concentración sales MS	T5	T6
Sacarosa 3%	100%	79.20±7.52	147.21±16.59
	75%	61.64±1.55	60.71±12.18*
	50%	40.22±5.45*	47.23±4.29*
	25%	34.04±3.96*	40.84±4.88*
Sacarosa 5%	100%	90.12±10.21	129.54±9.51
	75%	38.66±5.78*	55.35±2.48*
	50%	30.75±6.08*	41.90±3.69*
	25%	29.32±5.63*	34.26±3.12*
Glucosa 3%	100%	55.81±5.73*	72.02±15.39*
	75%	63.62±19.89	77.37±27.40*
	50%	47.014±0.10*	67.01±5.29*
	25%	29.29±4.10*	51.09±6.68*

*Los valores reportados corresponden a la media del peso (g/L) del callo fresco \pm desviación estándar, $n=3$. *: tratamientos estadísticamente diferentes al tratamiento original (MS 100% + Sacarosa 3%), con un p -value < 0.0001 para T5 y T6. ANOVA de una vía y Tukey.*

Ahora bien, considerando el peso seco de los callos, es posible conocer el o los tratamientos que resultan en una mayor cantidad de insumo para la obtención de los extractos orgánicos, por ello en la Tabla 10 se analizan las líneas con una mayor producción de biomasa seca, notando que el comportamiento es muy similar, tanto para el T5 como para el T6, al observado en los gráficos

de biomasa fresca. También se observaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos originales con el 100% de sales MS y sacarosa al 3% en ambos balances hormonales.

Tabla 10. Peso de la biomasa seca de los callos por tratamiento al día 21.

Fuente de carbono	Concentración sales MS	T5	T6
Sacarosa 3%	100%	4.75±0.33	7.70±0.76
	75%	3.78±0.07	3.72±0.66*
	50%	2.67±0.32*	2.89±0.33*
	25%	2.01±0.23*	2.35±0.18*
Sacarosa 5%	100%	7.22±0.42*	8.93±0.78
	75%	3.46±0.45*	4.55±0.20*
	50%	2.79±0.54*	3.82±0.33*
	25%	2.53±0.54*	2.94±0.31*
Glucosa 3%	100%	3.47±0.28*	4.03±0.71*
	75%	3.93±0.90	4.51±0.25*
	50%	2.95±0.06*	4.03±0.30*
	25%	1.63±0.17*	2.91±0.33*

Los valores reportados corresponden a la media del peso (g/L) del callo seco \pm desviación estándar, $n=3$. *: tratamientos estadísticamente diferentes al tratamiento original (MS 100% + Sacarosa 3%), con un p -value < 0.0001 para T5 y T6. ANOVA de una vía y Tukey.

En cuanto a las variaciones del tratamiento T5 y T6 se observaron coincidencias en los tratamientos que presentan mayor producción de biomasa fresca y seca, sin embargo, es el tratamiento T6 de MS 100% con 5% de sacarosa el que permite la obtención de más biomasa seca (8.93±0.78 g/L), seguido del tratamiento T6 con MS 100% y 3% de sacarosa (7.70±0.76g/L), superando incluso la biomasa producida por el tratamiento T5 de MS 100% con 3% de sacarosa (4.75±0.33 g/L).

El aumento en la producción de biomasa al aumentar la concentración de sacarosa también ha sido reportado para la especie *Fagonia indica* (Zygophyllaceae), obteniendo mayor biomasa en los tratamientos suplementados con 5% de sacarosa, en la cual también la producción de compuestos fenólicos se vio favorecida al igual que en los tratamientos con glucosa 3% (188), sin embargo, en *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) la concentración de sacarosa al 3% resulta mejor para

el crecimiento celular, mientras que la de 5% es mejor para la producción de ginkgolidos (189), así como en el caso de *Justicia gendarussa* (Acanthaceae), donde la mayor producción de biomasa seca se da en el tratamiento con 3% de sacarosa, mientras que el peso fresco es mayor en el tratamiento con el 2% de sacarosa (190). Por otra parte, en los callos obtenidos de *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae), se observó que la glucosa no induce la formación de callo como lo hace la sacarosa en 1.5% y 3%, además de que las concentraciones de sales del medio MS más favorables fueron a 100% y 50% (191), a diferencia de *Piper longum* (Piperaceae), especie que es capaz de formar callo en medio MS al 100%, 50% y 25% de sus sales basales (156).

Finalmente, se calculó el porcentaje de acumulación de agua para identificar las líneas de callo que presentan consistencia friable. Destaca que en todas las líneas evaluadas el porcentaje supera el 90% (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de acumulación de agua en los callos por tratamiento al día 21.

Fuente de carbono	Concentración sales MS	T5	T6
Sacarosa 3%	100%	93.98±0.39	94.76±0.09
	75%	93.86±0.16	93.84±0.13
	50%	93.34±0.11	93.84±0.74
	25%	94.09±0.13	94.21±0.24
Sacarosa 5%	100%	91.94±0.44*	93.11±0.12*
	75%	91.03±0.38*	91.77±0.03*
	50%	90.92±0.15*	90.86±0.04*
	25%	91.38±0.30*	91.42±0.15*
Glucosa 3%	100%	93.75±0.16	94.36±0.24
	75%	93.69±0.61	94.01±0.63
	50%	93.71±0.13	93.97±0.38
	25%	94.40±0.30	94.28±0.11

Los valores reportados corresponden al porcentaje de acumulación de agua \pm desviación estándar, $n=3$. *: tratamientos estadísticamente diferentes al tratamiento original (MS 100% + Sacarosa 3%), con un p -value < 0.002 para T5 y T6. Prueba de Kruskal-Wallis y Tukey.

Los tratamientos no presentaron diferencias significativas, cuando el azúcar ya sea sacarosa o glucosa, está al 3%, sin embargo, el aumento de la concentración de sacarosa disminuye

significativamente la acumulación de agua en los callos, dando una consistencia más dura, a comparación de los tratamientos con 3% del azúcar, los cuales presentan mayor acumulación de agua y, por tanto, una consistencia más friable. Por otra parte, los tratamientos que mostraron los valores más altos, en sacarosa y glucosa al 3% corresponden a la concentración de sales MS al 100 y 25%. Únicamente el tratamiento T6 con MS al 100% de la concentración de sales y 3% de sacarosa se encuentra como unos de los tratamientos con mayor producción de biomasa fresca y seca (147.21 g/L y 7.70 g/L, respectivamente) y con mayor acumulación de agua (94.76%), por lo que es una línea que será mantenida debido a los beneficios que presenta en cuanto a producción para la obtención de extractos.

Considerando los datos anteriores, en cuanto a producción de biomasa y acumulación de agua, las líneas escogidas para su mantenimiento son las cultivadas en MS 100% con 3% y 5% de sacarosa, así como las de MS 75% con 3% de glucosa, de los balances hormonales T5 y T6, además las líneas con MS 25% de sales fueron descartadas debido a la oxidación del tejido en los subcultivos consecutivos y poca producción de biomasa (Figura 19).

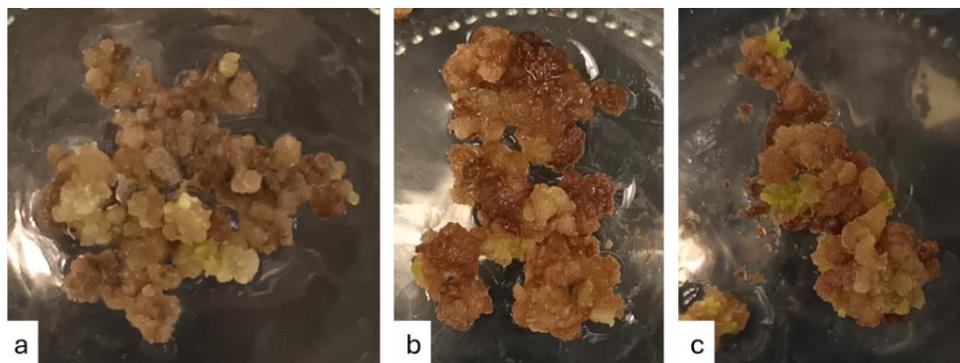


Figura 19. Oxidación del tejido de los tratamientos con medio MS 25%.
T5 + 3% sacarosa (a); T5 + 5% sacarosa (b); T6 + 3% glucosa (c).

De las líneas de callo seleccionadas es notable que la apariencia es similar en cuanto al color verde-amarillo que se presenta en la mayoría del callo, con algunas porciones de color blanco, así como la consistencia esponjosa y facilidad para ser disgregado durante los subcultivos.

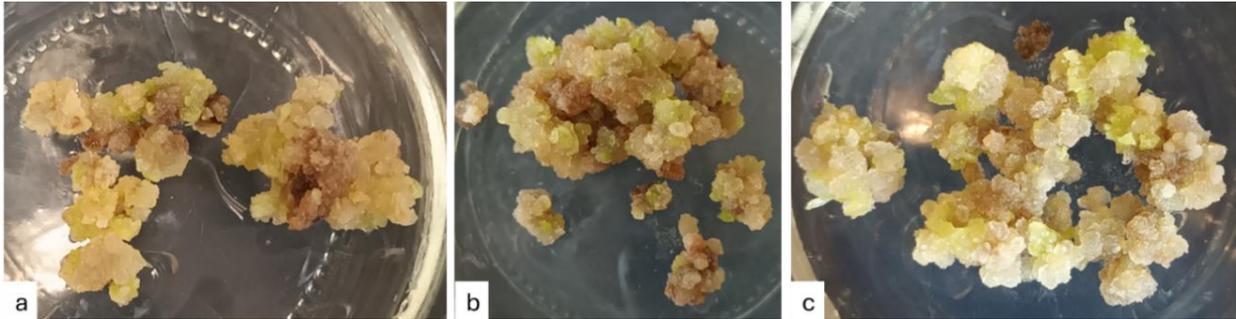


Figura 20. Tratamientos T5 con mayor producción de biomasa y acumulación de agua. MS 100% + 3% sacarosa (a); MS 100% + 5% sacarosa (b); MS 75% + 3% glucosa (c).

Las características fenotípicas no permiten la identificación de las líneas de callo entre sí, sin embargo, es notable que los tratamientos provenientes del balance hormonal T5 presentan con mayor frecuencia secciones de callo oxidado (Figura 20), mientras que los callos provenientes el balance hormonal T6 suelen ser más estables en cuanto a coloración blanco-verde y crecimiento (Figura 21).

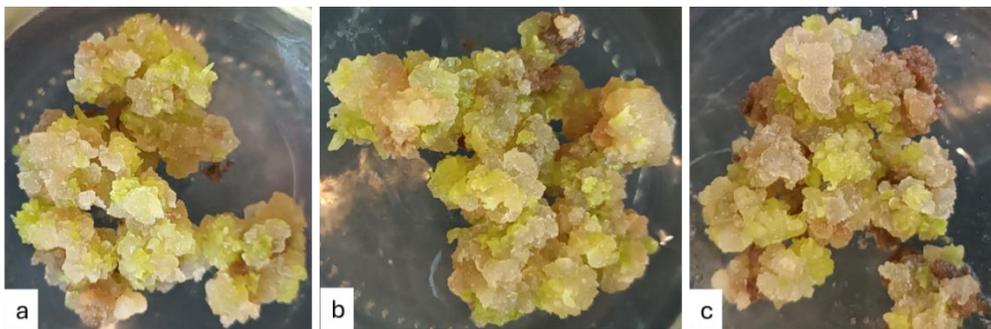


Figura 21. Tratamientos T6 con mayor producción de biomasa y acumulación de agua. MS 100% + 3% sacarosa (a); MS 100% + 5% sacarosa (b); MS 75% + 3% glucosa (c).

Finalmente, las líneas que se conservan actualmente para la continuidad de los estudios son los balances hormonales T5 y T6 en medio de cultivo MS 100% con las 3 variantes de azúcares

(sacarosa 3% y glucosa 3%) debido a que en los subcultivos siguientes fueron las más estables al no presentar formación de órganos vegetales, menor grado de oxidación, mayor crecimiento y acumulación de agua.

8.4. Extractos orgánicos de la planta silvestre

De forma paralela al estudio biotecnológico de *E. canadensis*, se realizó la exploración fitoquímica de la planta silvestre con la finalidad de conocer su perfil fitoquímico y tener un punto de referencia para comparar con los cultivos de callo obtenidos.

Debido a que se realizaron dos colectas en momentos diferentes del año (enero y marzo), se verificó que el contenido de los extractos fuera similar entre sí mediante CCF, como se muestra en la Figura 22. Ya que los extractos de la colecta de enero (C1) y la colecta de marzo (C2) mostraron perfiles similares se reunieron los extractos manteniendo la separación por órgano vegetal y polaridad.

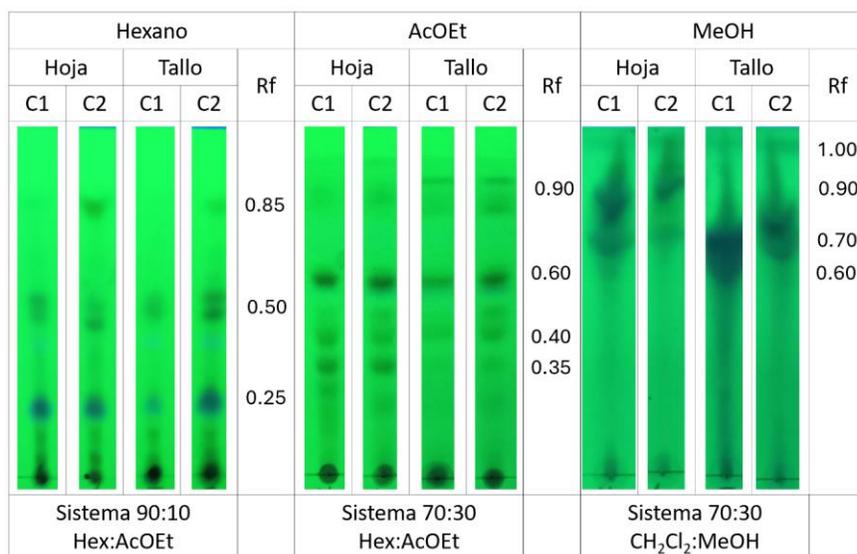


Figura 22. Placas cromatográficas de las colectas de planta silvestre. Reveladas con luz UV₂₅₄.

Una vez se reunieron los extractos, se realizó el cálculo del rendimiento considerando la biomasa fresca de la cual se obtuvieron los extractos y el peso final de los extractos, cuyos resultados se presentan en la Tabla 9. Notoriamente, el mayor rendimiento se logró con metanol para ambos órganos vegetales, sin embargo, la hoja presentó mayor acumulación de compuestos, puesto que el rendimiento promedio fue de 3.83%, mientras que el rendimiento promedio para tallo fue de 3.01%.

Tabla 12. *Peso y rendimiento de los extractos seriados obtenidos de la planta silvestre.*

Parte usada	Extracto	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
Hoja	Hexano (Hex)	6.29	2.11
	Acetato de etilo (AcOEt)	6.20	2.08
	Metanol (MeOH)	21.83	7.31
Tallo	Hexano (Hex)	1.66	0.54
	Acetato de etilo (AcOEt)	1.99	0.65
	Metanol (MeOH)	24.26	7.86

Los datos se presentan por solvente utilizado (de menor a mayor polaridad) por órgano de la planta silvestre del que se obtuvo el extracto (hoja y tallo).

Los extractos presentaron diferentes consistencias y colores. Los extractos con hexano y AcOEt fueron de color oscuro, diferenciándose en la consistencia aceitosa del primero y sólida del segundo, por su parte, los extractos con metanol fueron de consistencia similar a la miel, y solamente el extracto de tallo presentó coloración tenue (Figura 23).

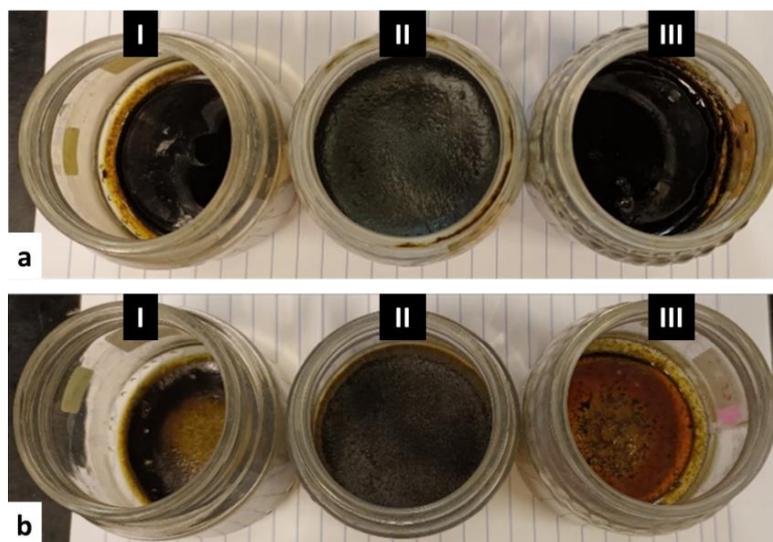


Figura 23. Apariencia de los extractos orgánicos obtenidos de la planta silvestre. Por órgano: hoja (a) y tallo (b). Por orden de extracción: hexano (I), acetato de etilo (II) y metanol (III).

El hexano es un solvente orgánico de baja polaridad, por lo que algunas grasas, aceites esenciales y otros compuestos naturales no polares son extraídos con este solvente (192), por ello la consistencia aceitosa en ambos extractos y el bajo rendimiento. Por su parte, el AcOEt es un solvente de mediana polaridad, que permite obtener mejores rendimientos debido a que su polaridad facilita obtener diversos compuestos de diferentes polaridades (terpenoides, glucósidos, quinonas y carbohidratos) (193–195), sin embargo, el metanol es un solvente muy polar y extrae los compuestos más polares de la planta (flavonoides, taninos, glucósidos, compuestos fenólicos y aminoácidos), así como azúcares ricos en grupos hidroxilo (195,196). Debido a la capacidad del metanol de extraer los azúcares de las plantas es que se obtiene un mayor peso y rendimiento, ya que son uno de los metabolitos primarios que se encuentran en mayor proporción.

8.5. Perfiles cromatográficos de hojas y tallos de la planta silvestre

8.5.1. Perfiles cromatográficos por CCF

Los extractos obtenidos fueron sometidos a análisis por cromatografía en capa fina fase normal, lo que permitió un primer acercamiento al tipo de compuestos biosintetizados por la planta silvestre.

En los extractos de hexano se identificó la presencia de compuestos de baja polaridad que eluyen en sistemas poco polares, además de compuestos visibles en la luz ultravioleta de onda corta (254 nm), onda larga (365 nm) y en el revelador químico universal (SCA) (Figura 24). En el extracto de hoja y tallo se presenta un compuesto mayoritario no visible en la luz UV₃₆₅ (Rf 0.80), sin embargo, el siguiente compuesto presente en ambos extractos (Rf 0.55) es más visible en esta longitud de onda, al igual que los dos últimos compuestos en eluir (Rf 0.35 y 0.30). Es notorio que la composición química observada en la placa es similar entre ambos órganos de la planta.

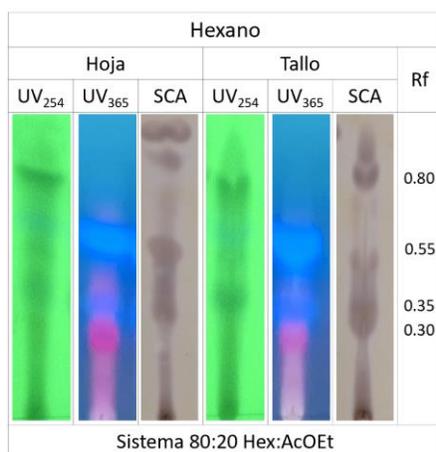


Figura 24. *Perfiles cromatográficos de los extractos de hexano de hoja y tallo.*

Por otra parte, en los extractos de AcOEt también se identificó la presencia de diferentes compuestos que eluyen desde sistemas poco polares hasta sistemas de polaridad alta (Figura 25). Al eluir con un sistema de baja polaridad se puede observar que en el extracto de tallo hay compuestos que son similares a los presentes en la hoja, sin embargo, las cantidades son menores, por ejemplo, el compuesto con un Rf de 0.90 es muy visible con el revelador cérico amoniaco en

la hoja, pero en el tallo es apenas perceptible. El siguiente compuesto en eluir (Rf 0.70) es visible tanto en la luz UV como con el revelador cérico amoniacal y es uno de los compuestos mayoritarios en ambos órganos de la planta, pero con mayor presencia en la hoja. El compuesto con un Rf de 0.55 también es uno de los compuestos mayoritarios para ambos órganos de la planta, sin embargo, el compuesto con un Rf de 0.45 solamente lo es para hoja.

Al aumentar la polaridad del sistema de elución, se puede observar la presencia de otros dos compuestos (Rf 0.48 y 0.37) que se encuentran en menor cantidad que los compuestos menos polares, sin embargo, están presentes en ambos órganos de la planta, destacando el compuesto con Rf 0.48 con mayor presencia en el extracto de hoja.

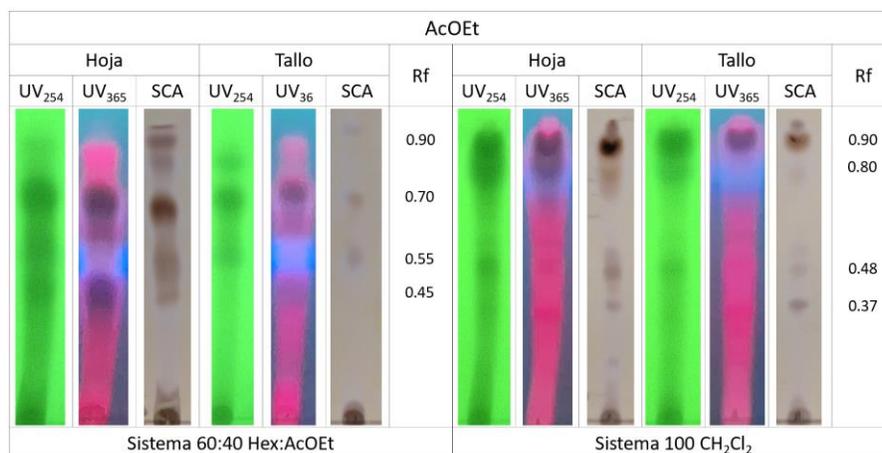


Figura 25. Perfiles cromatográficos de los extractos de AcOEt de hoja y tallo.

Finalmente, en los extractos de metanol se observaron algunos compuestos de baja polaridad que eluyen en sistemas de baja y mediana polaridad (Rf 0.98 y 0.77), como se observa en la Figura 26, estos compuestos son visibles en ambas longitudes de onda, sin embargo, se encuentran en menor cantidad que los compuestos más polares, los cuales se pueden observar al aumentar la polaridad del sistema de elución (90:10 CH₂Cl₂:MeOH), notando que uno de los compuestos mayoritarios (Rf 0.77) es visible tanto en la luz UV como en el revelador SCA, a este compuesto

le siguen algunos otros con menor presencia, sin embargo, aquellos cuyos Rf son 0.65 y 0.30 están presentes en ambos órganos de la planta. Al aumentar los sistemas de elución no se observan los compuestos más polares retenidos en la base de la placa, pero al llegar al sistema de 40:60 CH₂Cl₂:MeOH se observa la migración de los compuestos los cuales se encuentran muy cercanos entre sí, observando a partir del Rf 0.75 la presencia de compuestos en ambos extractos, debido a la polaridad de estos compuestos es difícil realizar la separación en una placa de fase normal, pero se confirma la presencia de compuestos de polaridad alta.

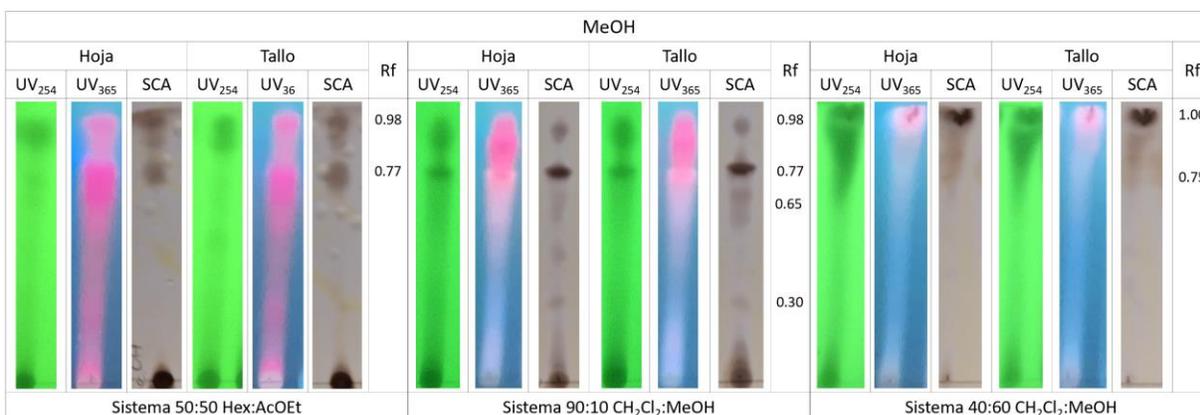


Figura 26. Perfiles cromatográficos de los extractos de metanol de hoja y tallo.

8.5.2. Análisis de los extractos de la planta silvestre por GC-MS

Una vez identificados los compuestos mediante cromatografía en capa fina fase normal, se analizaron los extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cabe mencionar que esta técnica permite identificar compuestos de forma precisa, siempre y cuando sean compuestos capaces de ser volatilizados, lo que permite conocer los componentes de mezclas complejas e incluso cuantificarlos, por otra parte, los compuestos pueden ser derivatizados para hacerlos lo suficientemente volátiles, reducir su polaridad o mejorar su estabilidad térmica para ser analizados mediante cromatografía de gases (197,198).

Los resultados obtenidos mediante GC-MS se muestran de menor a mayor polaridad de extracto, en la Tabla 10 se enlistan los compuestos encontrados en los extractos de hexano, es notorio que la cantidad de compuestos identificados es alta, esto debido a que son compuestos de polaridades bajas, con la capacidad de ser volatilizados y estabilidad térmica, lo que favorece el análisis mediante cromatografía de gases.

Es destacable que la hoja posee una mayor cantidad de compuestos de baja polaridad, 19 compuestos detectados por el equipo de GC-MS, a comparación del tallo en el que se identificaron 13 compuestos, sin embargo, seis compuestos se encuentran en ambos órganos de la planta.

Tabla 13. Compuestos encontrados en los extractos de hexano de la planta silvestre mediante GC-MS.

Parte de la planta	Compuestos identificados	Abundancia relativa (%)	RT (min)	Actividad biológica
	Triciclo[5.3.0.0(2,6)]deca-3,8-diene-5,10-diona ⁽¹⁾	12.89	14.565	ND
	8-metil-cumarina ⁽²⁾	8.82	14.677	ND
	Acetato de fitol ⁽³⁾	5.10	17.580	Antimicrobiano (199)
	3 ^a ,7 ^a -dihidro-5-metil-indene-1,7(4H)-diona ⁽⁴⁾	4.24	14.118	ND
	Ácido α -linoleico (etil éster) ⁽⁵⁾	4.11	21.620	ND
	β -cubebeno ⁽⁶⁾	3.63	13.672	ND
	Cis- β -farneseno ⁽⁷⁾	3.55	13.238	ND
	3-(1,5-dimetil-hex-4-enil)-2,2-dimetil-ciclopent-3-enol ⁽⁸⁾	3.02	17.173, 17.252	ND
<i>Hoja</i>	α -curcumeno ⁽⁹⁾	2.63	13.619	Antifúngico (200), antimicrobiano (200), antiinflamatorio (201), citotóxico (202), antitripanosoma (203)
	L- α -normetadol ⁽¹⁰⁾	2.20	21.758, 21.817	ND
	β -amirina ⁽¹¹⁾	2.20	36.938	Cicatrizante (204), antiinflamatorio (205–207), antiplasmodial (208)
	Hentriacontano ⁽¹²⁾	2.16	31.913	Antiinflamatorio (209,210), citotóxico (211), antibiofilm (212)
	Ácido linoleico (propil éster) ⁽¹³⁾	1.94	21.521	ND

	(1R,7S,E)-7-isopropil-4,10-dimetileneclodec-5-enol ⁽¹⁴⁾	1.86	16.135	ND
	α -bergamoteno ⁽¹⁵⁾	1.76	12.989	ND
	Estigmasterol ⁽¹⁶⁾	1.54	35.414	Antiinflamatorio (213–219), antioxidante (220–222), citotóxico (223,224), antimicrobiano (225,226)
	Escualeno ⁽¹⁷⁾	1.39	28.694	Citotóxico (227), antioxidante (228,229), antidiabético (229,230)
	α -amirina ⁽¹⁸⁾	1.25	35.992	Citotóxico (231,232), antiinflamatorio (207)
	Heptacosano ⁽¹⁹⁾	0.90	29.588	ND
	Ácido hexadecanoico (etil éster) ⁽²⁰⁾	9.84	18.993	ND
	α -amirina ⁽¹⁸⁾	7.88	35.7, 36.583, 37.68	Citotóxico (231,232), antiinflamatorio (207)
	Estigmasterol ⁽¹⁶⁾	7.36	35.145	Antiinflamatorio (213–219), antioxidante (220–222), citotóxico (223,224), antimicrobiano (225,226)
	Ácido hexadecanoico (metil éster) ⁽²²⁾	6.97	18.329	Neuroprotector (233), cardioprotector (234)
	Ácido linoleico (etil éster) ⁽²¹⁾	5.33	20.562	Antidiabético (235), anticancerígeno (236)
	Estra-1,3,5(10)-trien-17- β -ol ⁽²³⁾	4.17	18.874	ND
Tallo	Ácido α -linoleico (etil éster) ⁽⁵⁾	3.17	20.628	ND
	Ácido linoleico (metil éster) ⁽²⁴⁾	3.03	19.958	ND
	Triciclo[5.3.0.0(2,6)]deca-3,8-diene-5,10-diona ⁽¹⁾	2.85	14.467	ND
	3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano ⁽²⁵⁾	2.23	31.696	ND
	(1R,7S,E)-7-isopropil-4,10-dimetileneclodec-5-enol ⁽¹⁴⁾	1.96	16.024	ND
	Ácido 6,9,12-ácido octadecatrienoico (metil éster) ⁽²⁶⁾	1.89	20.024	ND
	L- α -normetadol ⁽¹⁰⁾	1.60	21.712	ND
	5,6,6-trimetil-5-(3-oxobut-1-enil)-1-oxaspiro[2.5]octan-4-ona ⁽²⁷⁾	1.42	17.429	ND

ND: No determinado. Superíndice indica el número de compuesto en la Figura 27

En su mayoría se observan ácidos grasos lo que podría brindar la consistencia oleosa a ambos extractos, sin embargo, también se observan compuestos de polaridades bajas como son los terpenos. Se encuentran también compuestos como el cubebeno, farneseno, curcumeno, amirina y

bergamoteno que fueron identificados anteriormente en los aceites esenciales de la especie (80,121,145,147), así como también se ha identificado la presencia de estigmasterol (131).

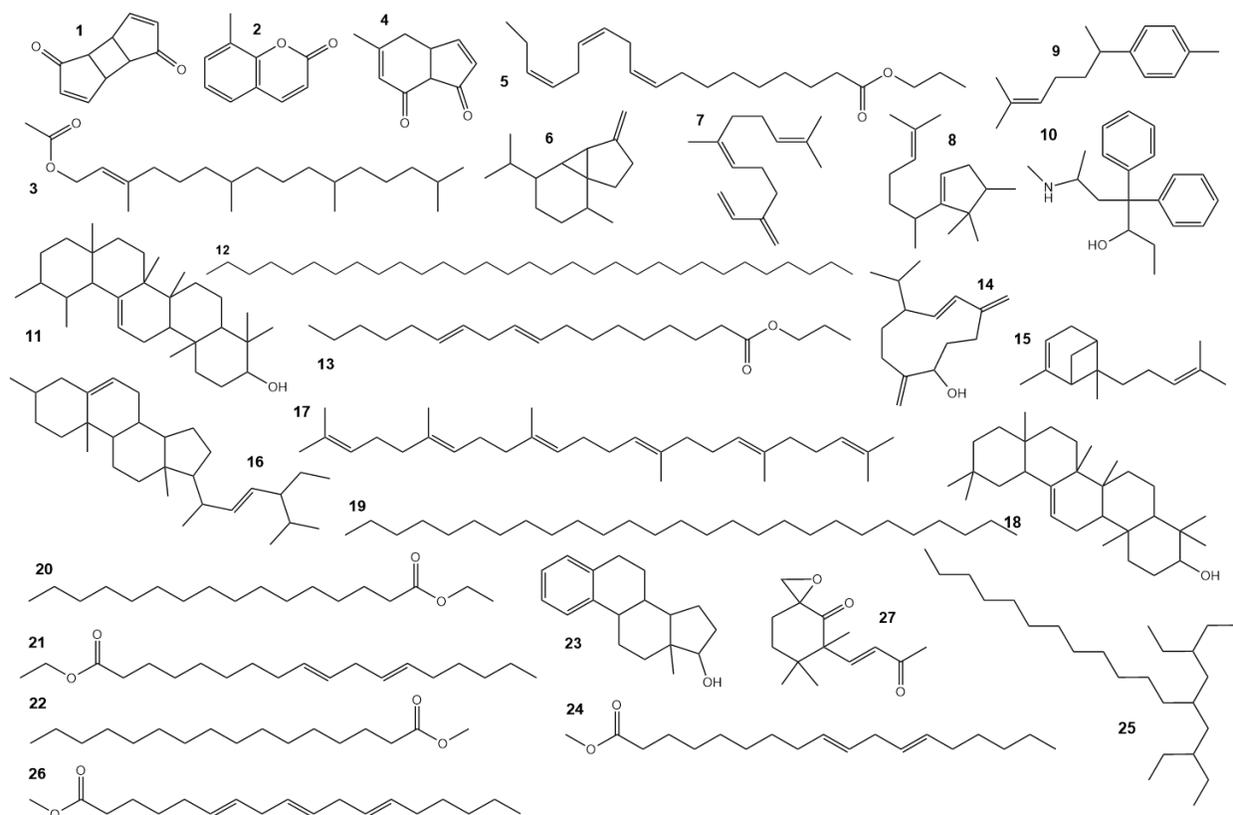


Figura 27. Estructuras de los compuestos presentes en los extractos de hexano de la planta silvestre identificados por GC-MS.

1) Triciclo[5.3.0.0(2,6)]deca-3,8-diene-5,10-diona, 2) 8-metil-cumarina, 3) acetato de fitol, 4) 3a,7a-dihidro-5-metil-indene-1,7(4H)-diona, 5) ácido α -linoleico (etil éster), 6) β -cubebeno, 7) cis- β -farneseno, 8) 3-(1,5-dimetilhex-4-enil)-2,2-dimetil-ciclopent-3-enol, 9) α -curcumeno, 10) L- α -normetadol, 11) β -amirina, 12) hentriacontano, 13) ácido linoleico (propil éster), 14) (1R,7S,E)-7-isopropil-4,10-dimetilenciclodec-5-enol, 15) α -bergamoteno, 16) estigmasterol, 17) escualeno, 18) α -amirina, 19) heptacosano, 20) ácido hexadecanoico (etil éster), 21) ácido linoleico (etil éster), 22) ácido hexadecanoico (metil éster), 23) estra-1,3,5(10)-trien-17- β -ol, 24) ácido linoleico (metil éster), 25) 3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano, 26) ácido 6,9,12-ácido octadecatrienoico (metil éster) y 27) 5,6,6-trimetil-5-(3-oxobut-1-enil)-1-oxaspiro[2.5]octan-4-ona.

Cabe destacar, que se encuentran otros compuestos con actividades biológicas de interés para este estudio que no han sido reportadas anteriormente para la especie (Tabla 10). Tal es el caso del acetato de fitol, el cual ha mostrado actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* (199). Los compuestos 5 y 13 se han encontrado como mayoritarios en *Elsholtzia ciliata*, cuyo extracto posee

actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (237), en *Wrightia tictoria* se demostró el efecto antiinflamatorio de la fracción que los contenía en conjunto con otros compuestos de baja polaridad (238) y en *Khaya senegalensis* también fueron mayoritarios en los extractos de hoja y corteza, los cuales mostraron un notorio potencial antioxidante en el ensayo de DPPH (239).

Los compuestos 20 y 21 son mayoritarios en un extracto con actividad citotóxica contra células de cáncer de mama (T47D) (240). El ácido linoleico (compuesto 13 y 21) podría tener actividad antimicrobiana, ya que fue un compuesto mayoritario de un extracto de baja polaridad con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella enteritidis* (241), sin embargo, de forma aislada posee efecto neuroprotector relacionado a la capacidad antioxidante (242) y por docking molecular se sugiere su actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* (243), mientras que en su forma etilada reduce el contenido de melanina y reduce la actividad de la tirosinasa en células de melanoma (B16) haciéndolo un posible anticancerígeno (236).

Por otro lado, el β -cubebeno se ha encontrado como compuesto mayoritario en fracciones de *Bixa orellana* con capacidad antiproliferativa de células tumorales (U251: glioma; MCF7: mama; NCI/ADR-RES: ovario; 786-0: riñón; NCI-H460: pulmón; PC-3: próstata y HT29: colon) (244).

Algunas formas de α -normetadol, han mostrado tener efectos analgésicos, sin embargo, se requiere mayor investigación (245), mientras que el α -curcumeno ha mostrado actividad antiproliferativa de *Sccharomyces cerevisiae*, la bacetria *Enterobacter cloacae* (presenta sinergismo con el imipenem) (200) y el protozoario *Trypanosoma brucei* (203), así como actividad antiinflamatoria del epitelio bronquial (201), actividad citotóxica contra leucemia mieloide crónica (K562) y cáncer de próstata (LNCaP) (202).

La α -amirina contenida en nanocápsulas ha servido como citotóxico contra células de leucemia (231), de forma directa contra células HeLa (232) y mediante docking molecular se propone como molécula antioxidante (246), mientras que la β -amirina podría tener actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* ya que resultados de docking molecular muestran afinidad por la proteína Rv1636 que regula el crecimiento de la bacteria (247), también muestran afinidad por proteínas de SARS-CoV-2, lo que contribuye a la inactivación del virus (248) y por la α -glucosidasa, lo que sugiere su actividad como antidiabético (249), por otra parte la β -amirina se encontró como compuesto mayoritario en el extracto de hoja de *Bombax ceiba*, el cual tiene potencial como neuroprotector (250).

El compuesto α -bergamoteno ha mostrado tener actividad antioxidante en diferentes grados cuando se encuentra entre los compuestos mayoritarios de extractos vegetales (251,252), sin embargo, no se ha confirmado su efecto de forma aislada. Mientras que el hentricontano ha mostrado actividad contra células de cáncer de estómago (BGC-823) (211) y evita la formación de biofilms de *Mycobacterium smegmatis* (212).

El estigmasterol ha demostrado tener actividad inmunomoduladora, por lo que también ha resultado ser un efectivo antiinflamatorio (213). A su vez, coadyuva al tratamiento del cáncer de útero debido a la sensibilización de las células a la quimioterapia (253). Por otra parte, el efecto antioxidante promueve la producción de insulina, haciéndolo un posible antidiabético, además de evitar la acumulación de colesterol (220), además, su acción contra las ROS sugiere su efecto en el tratamiento de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (222). También ha mostrado efecto contra células HeLa (221,224), cáncer de vejiga (223) y mediante docking molecular se sugiere su acción sobre cáncer de mama (MCF-7) (254), cáncer de ovario (255) y células NIH/3T3 (fibroblastos) (254). Posee actividad como antimicrobiano contra el parásito *Trypanosma*

congolense (225), las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* (226).

Por su parte, el escualeno, ha mostrado actividad antioxidante y efecto modulador de los niveles de glucosa/triglicéridos cuando se encuentra en combinación con astaxantina (256) o actividad citotóxica contra cáncer de mama (MDA-MB-231) en combinación con hidroxitirosol (257), de forma independiente posee efecto citotóxico contra células de cáncer de estómago (AGS) (227). Además, incrementa la sensibilidad de células de adenocarcinoma A549 a los tratamientos con radiación UVC y gamma (γ -IR) (258), disminuye la virulencia de *Staphylococcus aureus* (259) y su actividad antioxidante se relaciona a la protección del hígado contra el cisplatino como tratamiento contra el cáncer (228).

El heptacosano en conjunto con el fitol mejoran la respuesta celular al tratamiento con doxorubicina en la leucemia mieloide en mecanismos diferentes, sin embargo, por separado no muestran actividad citotóxica propia (260).

El compuesto 22 (metil palmitato) ha mostrado actividad como neuroprotector y vasodilatador (233), sin embargo, tiene un efecto cardioprotector contra el fenómeno de isquemia/reperfusión (234). De forma aislada, el ácido palmítico (compuestos 20 y 22) ha mostrado actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter cloacae* (261). Por su parte, los compuestos 22 y 24 fueron mayoritarios en un extracto con actividad antioxidante y antimicrobiana (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*) (261).

El compuesto 26 fue mayoritario en un extracto con actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (262).

Comparando con los compuestos reportados en la literatura, el extracto de hoja contiene seis de estos (Figura 28), mientras que en el extracto de tallo solamente encontramos 1, pero es parte de los compuestos mayoritarios para esta parte de la planta (Figura 29).

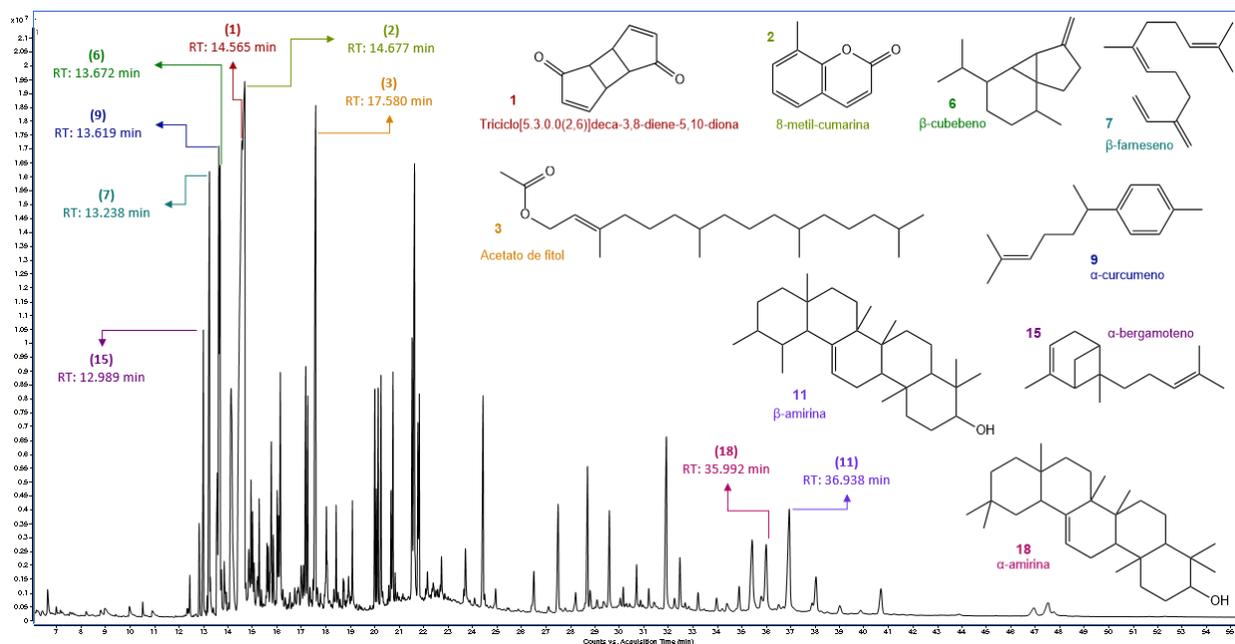


Figura 28. Cromatograma (GC-MS) del extracto hexánico de hoja.

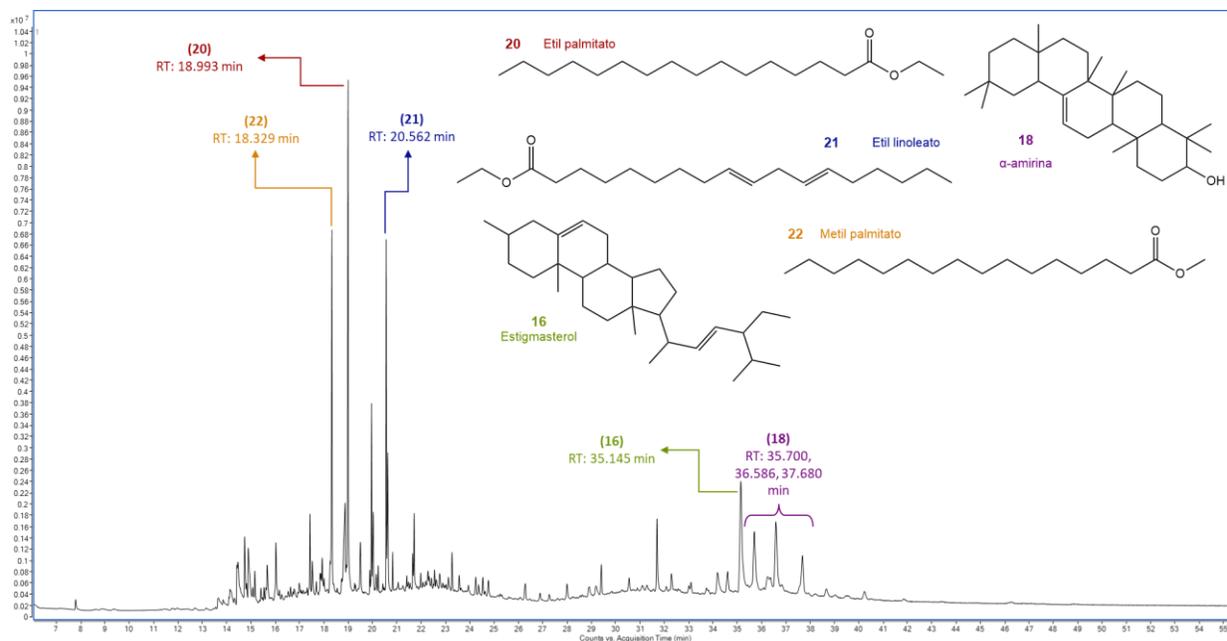


Figura 29. Cromatograma (GC-MS) del extracto hexánico de tallo.

Para el caso del α -bergamoteno se obtuvieron valores más bajos a los reportados en anteriores trabajos (121,145), a diferencia del β -farneseno, β -cubebeno y β -curcumeno, para los cuales, los valores de abundancia relativa son mayores a los reportados (121), esto podría deberse a la diferencia en los meses de colecta, así como las condiciones de crecimiento de las plantas.

En cuanto a los extractos de AcOEt, se observan similitudes a los extractos de hexano, principalmente en la composición del extracto de hoja, en que se presenta los compuestos 2 y 3 nuevamente entre los mayoritarios, así como los compuestos 7 y 15 reportados con anterioridad para la especie (Tabla 11), sin embargo, la mayor acumulación de estos últimos compuestos se logra mediante la extracción con hexano.

Tabla 14. Compuestos encontrados en los extractos de AcOEt de la planta silvestre mediante GC-MS.

Parte de la planta	Compuestos identificados	Abundancia relativa (%)	RT (min)	Actividad biológica
Hoja	Acetato de fitol ⁽³⁾	10.31	17.442, 17.882, 21.055	Antimicrobiano (199)

8-metil-cumarina ⁽²⁾	9.12	14.342	ND
Fitol ⁽²⁸⁾	7.46	20.155	Antimicrobiano (199,263)
β -copaeno ⁽²⁹⁾	4.03	14.027	ND
Ácido α -linoleico (etil éster) ⁽⁵⁾	2.75	21.482	ND
Ftiocol (2-hidroxi-3-metil-1,4-naftalendiona) ⁽³⁰⁾	2.73	14.861	ND
τ -Cadinol ⁽³¹⁾	2.60	17.147	Antimicrobiano (264,265)
Ácido linoleico (etil éster) ⁽²¹⁾	2.35	20.635	Antidiabético (235), anticancerígeno (236)
Isopropil hexadecanoato ⁽³²⁾	1.53	19.892	ND
β -farneseno ⁽⁷⁾	0.76	13.127	ND
Ácido hexadecanoico (metil éster) ⁽²²⁾	0.76	18.336	Neuroprotector (233), cardioprotector (234)
α -bergamoteno ⁽¹⁵⁾	0.37	12.903	ND
Tallo	-	-	-

ND: No determinado. Superíndice indica el número de compuesto en la Figura 30.

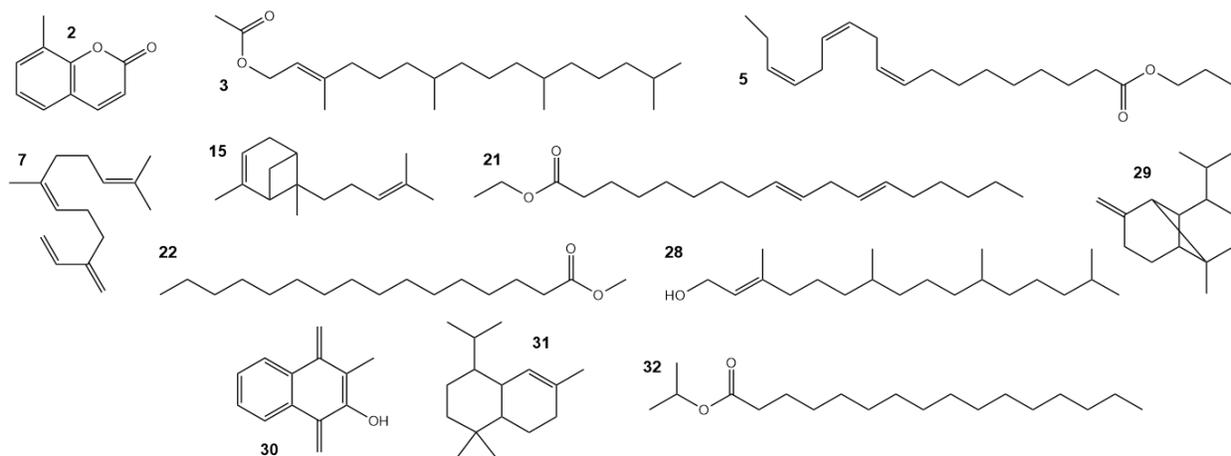


Figura 30. Estructuras de los compuestos presentes en los extractos de AcOEt de la planta silvestre identificados por GC-MS.

2) 8-metil-cumarina, 3) acetato de fitol, 5) ácido α -linoleico (etil éster), 7) β -farneseno, 15) α -bergamoteno, 21) ácido linoleico (etil éster), 22) ácido hexadecanoico (metil éster), 28) fitol, 29) β -copaeno, 30) ftiocol (2-hidroxi-3-metil-1,4-naftalendiona), 31) τ -cadinol y 32) isopropil hexadecanoato.

Cabe destacar que en el extracto de tallo no se identificaron compuestos por GC-MS, por lo que este extracto es analizado más adelante mediante HPLC, ya que esta técnica permite identificar la presencia de compuestos de mayor polaridad y fue también aplicada en los extractos de metanol

debido a que fue notoria la reducción en la cantidad de compuestos encontrados en estos extractos obtenidos. Además, los compuestos como el β -farneseno y α -bergamoteno que, a pesar de encontrarse en el extracto de hoja de polaridad media, su abundancia relativa fue menor a comparación del extracto de hexano para el mismo órgano de la planta (hoja).

Entre los compuestos no encontrados con anterioridad en los extractos se hexano, está el fitol que ha mostrado actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* (199), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella sp.* (263), también fue encontrado como uno de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de *Ranunculus constantinopolitanus* y *R. arvensis* que mostraron actividad contra *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (266).

Por su parte el τ -Cadinol mostró actividad antimicrobiana contra *Trypanosoma cruzi* (264) y *Staphylococcus aureus* de diferentes cepas (265), además, la forma alfa del cadinol mostró de actividad citotóxica contra células de cáncer de páncreas (267).

Finalmente, los compuestos mayoritarios para este extracto se muestran en la Figura 31, notando que la cantidad de compuestos mayoritarios también fue menor a comparación del extracto de hexano, sin embargo, varios de ellos se encuentran en ambos extractos de hoja.

Cabe destacar, la presencia de la 8-metil cumarina como uno de los compuestos que se encuentra en mayor cantidad en los extractos con hexano y AcOEt de hoja, del cual no se ha reportado su actividad biológica y podría estar participando de forma individual o en sinergia con otros compuestos en la actividad antifúngica que presentaron ambos extractos, además las cumarinas han sido reportadas efectivas contra la insuficiencia venosa, psoriasis e hipertensión (268) y derivados de cumarinas se han utilizado como anticoagulantes, estos actúan contra la vitamina K que es un cofactor en el proceso de coagulación (269).

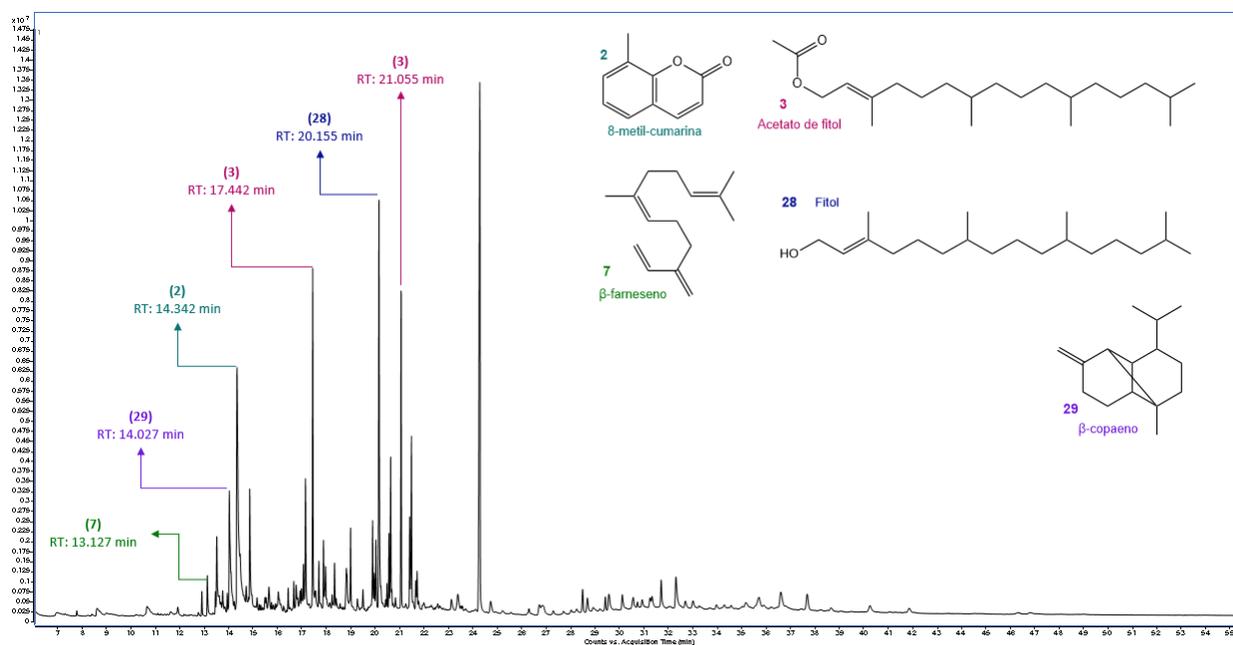


Figura 31. Cromatograma (GC-MS) del extracto de AcOEt de hoja de la planta silvestre.

En cuanto a los extractos de metanol, ambos órganos de la planta muestran una composición diferente a los extractos de AcOEt y hexano (Tabla 12), ya no se encuentran compuestos de baja polaridad como los ácidos grasos presentes en los extractos de hexano, sin embargo, algunos compuestos de polaridades más altas pudieron ser volatilizados para su análisis por GC-MS.

Tabla 15. Compuestos encontrados en los extractos de metanol de la planta silvestre mediante GC-MS.

Parte de la planta	Compuestos identificados	Abundancia relativa (%)	RT (min)	Actividad biológica
Hoja	4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa ⁽³³⁾	23.24	13.961, 16.017	ND
	Ácido 3-hidroxidodecanoico ⁽³⁴⁾	7.51	20.188	ND
	Ácido esteárico (Ác. Octadecanoico) ⁽³⁵⁾	6.20	17.475	Antiangiogénico (270)
	Ácido 2-[[2-[[2-[(2-pentilciclopropil)metil] ciclopropilmetil] ciclopropil]methyl]-ciclopropanbutanoico (metil éster) ⁽³⁶⁾	3.10	18.401	ND
	Ácido 2'-hexil-metil-éster, [1,1'-biciclopropil]-2-octanoico ⁽³⁷⁾	2.05	17.928	ND

	Ácido 3-hidroxidodecanoico ⁽³⁴⁾	65.59	13.784, 16.056, 17.101	ND
	1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-etanona ⁽³⁸⁾	7.31	11.537	ND
	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona ⁽³⁹⁾	5.44	9.245	Antioxidante (271,272), mutagénico (273), citotóxico (274)
<i>Tallo</i>	Ácido fólico ⁽⁴⁰⁾	4.09	10.69	Antimetastásico (275), antioxidante (276,277), regulador de la inflamación (277,278), neuroprotector (279–283)
	DL-arabinosa ⁽⁴¹⁾	2.21	7.55	ND
	Ácido 2,3-bis(acetiloxi)-dodecanoico (propil éster) ⁽⁴²⁾	1.29	18.342	ND

ND: No determinado. Superíndice indica el número de compuesto en la Figura 32.

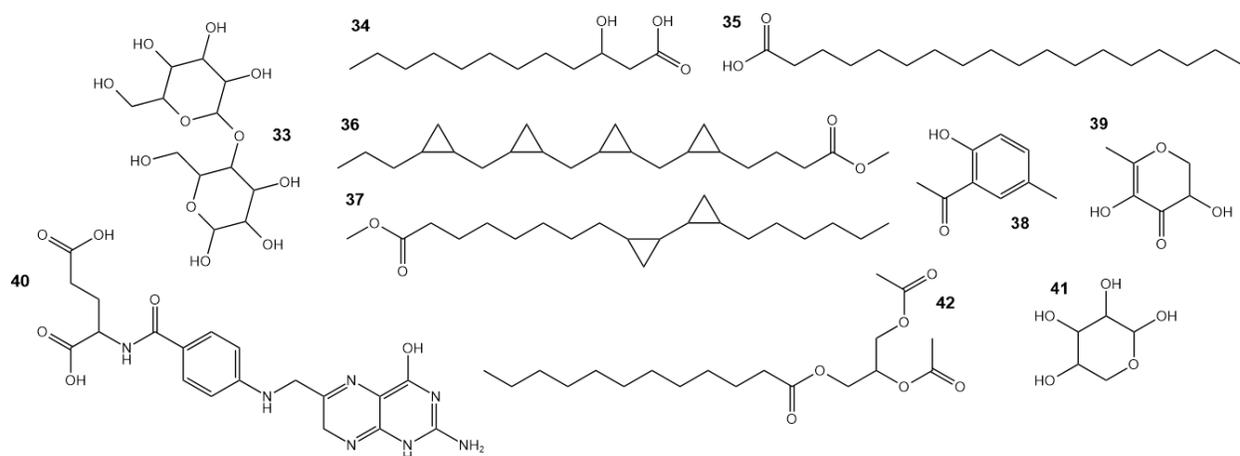


Figura 32. Estructuras de los compuestos presentes en los extractos de metanol de la planta silvestre identificados por GC-MS.

33) 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranosil, 34) ácido 3-hidroxidodecanoico, 35) ácido esteárico (ác. octadecanoico), 36) Ácido 2-[[2-[[2-[(2-pentilciclopropil)metil] ciclopropil]metil] ciclopropanbutanoico (metil éster), 37) ácido 2'-hexil-metil-éster, [1,1'-biciclopropil]-2-octanoico, 38) 1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-etanona, 39) 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona, 40) ácido fólico, 41) DL-arabinosa y 42) Ácido 2,3-bis(acetiloxi)-dodecanoico (propil éster).

Por otra parte, las actividades biológicas atribuidas a estos compuestos han sido pocas, entre ellas destaca la del compuesto 35, el cual ha mostrado interacciones con enzimas involucradas en la vasoconstricción (284) y en la formación de vasos sanguíneos, este compuesto es un inhibidor de la angiogénesis en tumores, particularmente en gliomas se observó que reduce el tamaño del

tumor debido a la interferencia en la vascularización (270). Mientras que el compuesto 39 presenta actividad citotóxica contra células cancerígenas de colon, mediante la inducción de la apoptosis (274).

El ácido fólico ha demostrado inhibir la proliferación y migración de células de cáncer colorrectal de diferentes líneas celulares (COLO-205, LoVo y HT-29) (275). Además, podría ser un tratamiento contra el Alzheimer debido a su interacción con enzimas de metilación del ADN, lo que ayuda en la regulación de proteínas relacionadas a la enfermedad (285,286), también interactúa con factores relacionados a la inflamación, por lo que se sugiere como un control en la inflamación crónica (287). Por otra parte, ha sido usado como vehículo para incrementar la capacidad antitumoral de la quimioterapia en combinación con otros compuestos, lo que también contribuye a la reducción de efectos secundarios (288–299), sin embargo, ha mostrado ser un inhibidor de la apoptosis en células derivadas del endotelio de las venas del cordón umbilical (HUVEC) (300,301) debido a su actividad antioxidante, también podría ser un tratamiento contra la arterioesclerosis (276,302) y la hipertensión pulmonar (303).

En cuanto a la arabinosa, se trata de un azúcar que ha mostrado tener actividad antioxidante al formar parte de polisacáridos o biopolímeros (304,305), así como efecto inmunomodulador (306,307). Sin embargo, de *Erigeron canadensis* se han probado complejos con polisacáridos que han mostrado tener actividad como radioprotectores (146) y antitusivos (151).

El compuesto 34 es el único que se encuentra en ambos extractos y además como uno de los compuestos mayoritarios (Figura 33 y 34), principalmente en el extracto de tallo, sin embargo, no fue posible la identificación de un mayor número de compuestos mediante cromatografía de gases debido a la polaridad elevada de los compuestos, fenómeno también observado al realizar las placas de cromatografía en capa fina.

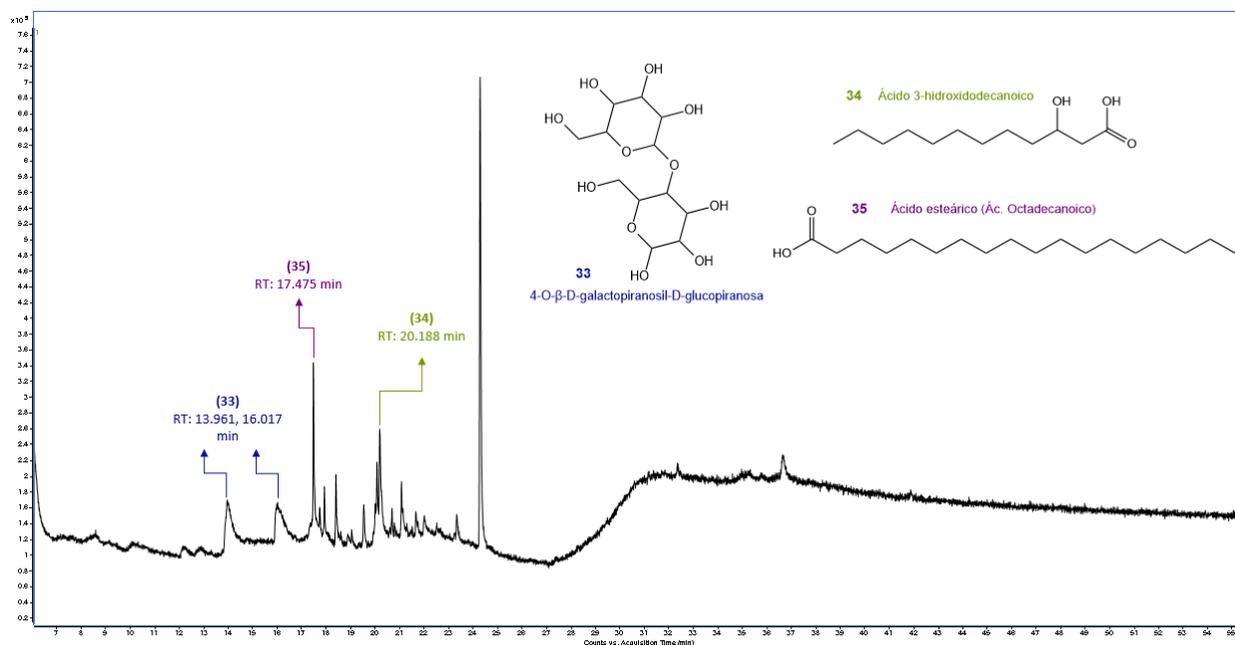


Figura 33. Cromatograma (GC-MS) del extracto metanólico de hoja (polaridad alta).

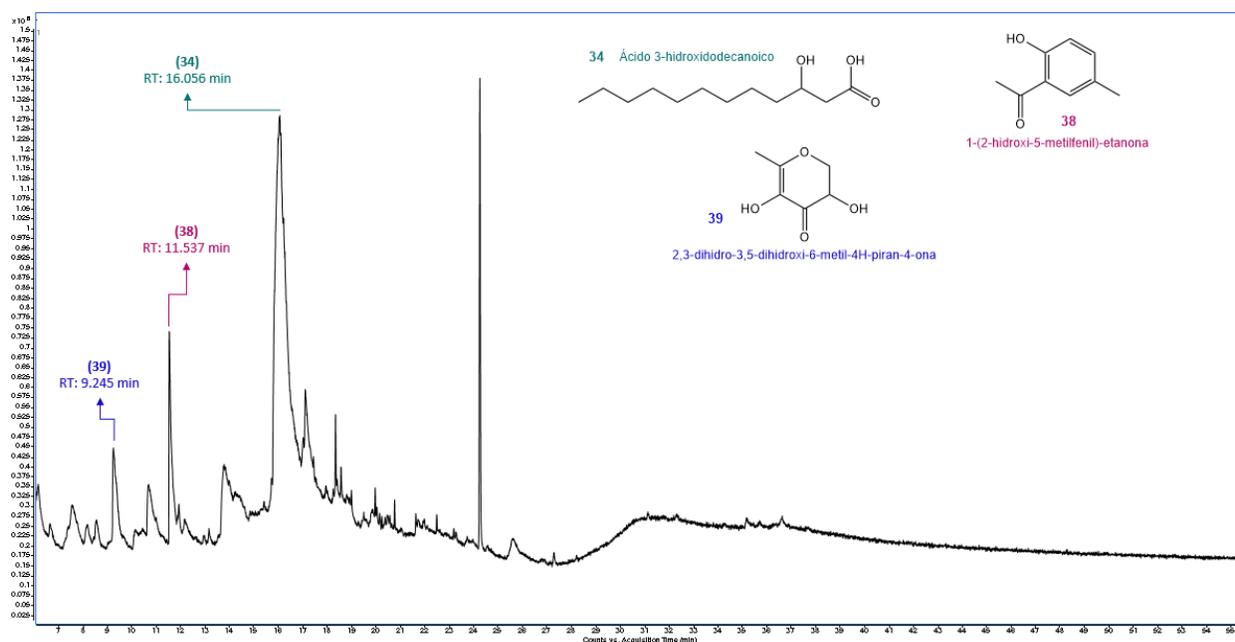


Figura 34. Cromatograma (GC-MS) del extracto metanólico de tallo (polaridad alta).

Realizar el análisis de los compuestos presentes en la planta silvestre sienta las bases para la comparación con los cultivos de callo, sin embargo, se requiere mayor estudio de la fitoquímica

de la especie tanto para la purificación y caracterización de los compuestos presentes de forma certera, como para la evaluación de la actividad biológica de los compuestos identificados.

8.5.3. Análisis fitoquímico de extractos de la planta silvestre por HPLC

Debido a que en cromatografía de gases solamente se detectan aquellos compuestos capaces de volatilizarse (lo que implica un aumento de temperatura) y de baja polaridad, se realizó cromatografía de líquidos HPLC que permite la separación de compuestos no volátiles a una baja temperatura y compuestos de mayor polaridad (308) para determinar la presencia de compuestos de mayor polaridad en los extractos de metanol y en el extracto de tallo obtenido con AcOEt, ya que en estos extractos la cantidad de compuestos identificados fue poca o nula mediante GC-MS, pero mediante CCF se observaron compuestos de mayor polaridad retenidos en la base de la placa en los extractos de AcOEt y MeOH, sin embargo, en este último los compuestos pueden eluir en sistemas de alta polaridad (Figura 35).

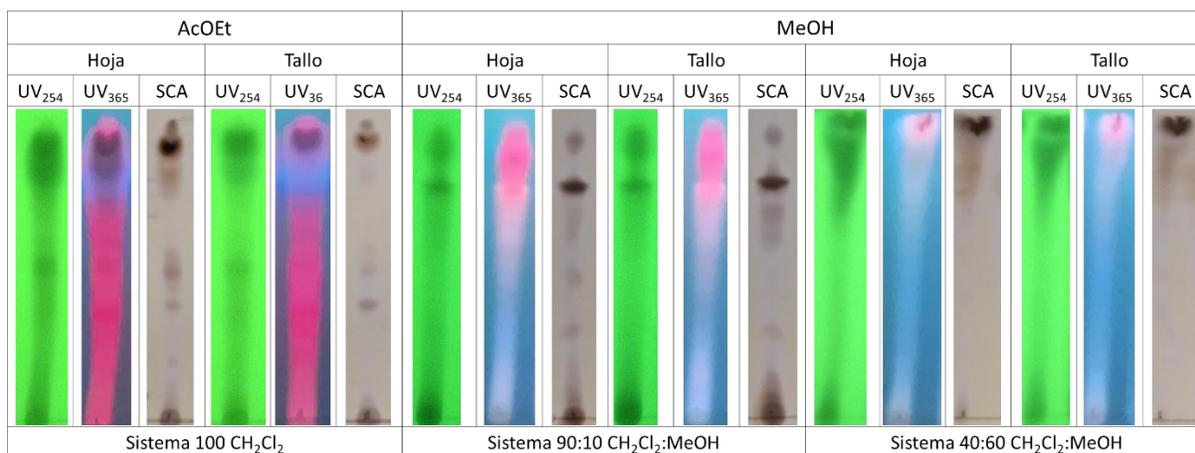


Figura 35. CCF de los extractos de polaridad media y alta de la planta silvestre.

Para el extracto de tallo obtenido con AcOEt se observan compuestos similares a los de la hoja (Figura 36), los compuestos que presentan mayor abundancia son los de menor polaridad, siendo el mayoritario, en ambos extractos, el que presenta un tiempo de retención aproximado de 22 min,

los siguientes dos compuestos que se observan al minuto 25 podrían tener una abundancia ligeramente mayor en el extracto de hoja, mientras que el compuesto del minuto 27.8 muestra una presencia mayor en el extracto de tallo, finalmente, el compuesto del minuto 28.4 se observa en mayor cantidad en el extracto de hoja nuevamente.

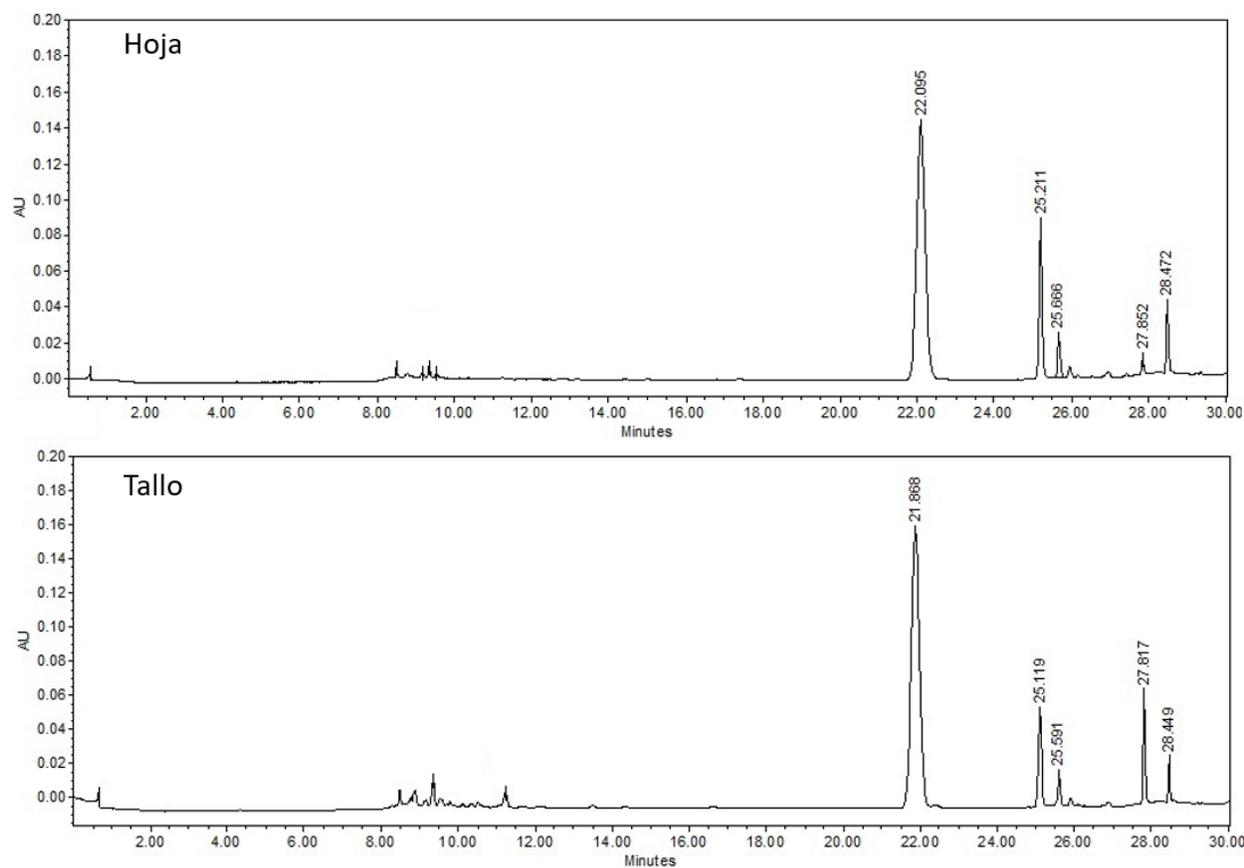


Figura 36. Cromatogramas (HPLC, UV₃₂₅) de los extractos obtenidos con AcOEt de la planta silvestre.

En la Figura 37 se muestran los cromatogramas obtenidos para los extractos obtenidos con metanol, en los cuales se observan compuestos con tiempos de retención que van del minuto 8 al 12 principalmente, los cuales también son observables en los extractos de AcOEt en cantidades menores (Figura 36).

Para el caso de los extractos de metanol de hoja y tallo se observan similitudes entre los tiempos de retención para algunos compuestos, sin embargo, las cantidades son diferentes, notando que de forma general en el extracto de tallo la cantidad de estos compuestos es menor a comparación de la hoja. Aunado a esto, se espera identificar entre estos compuestos los reportados anteriormente para la especie (ácidos cumárico, ferúlico, hidroxibenzoico, vanílico y sirínico) (81,89).

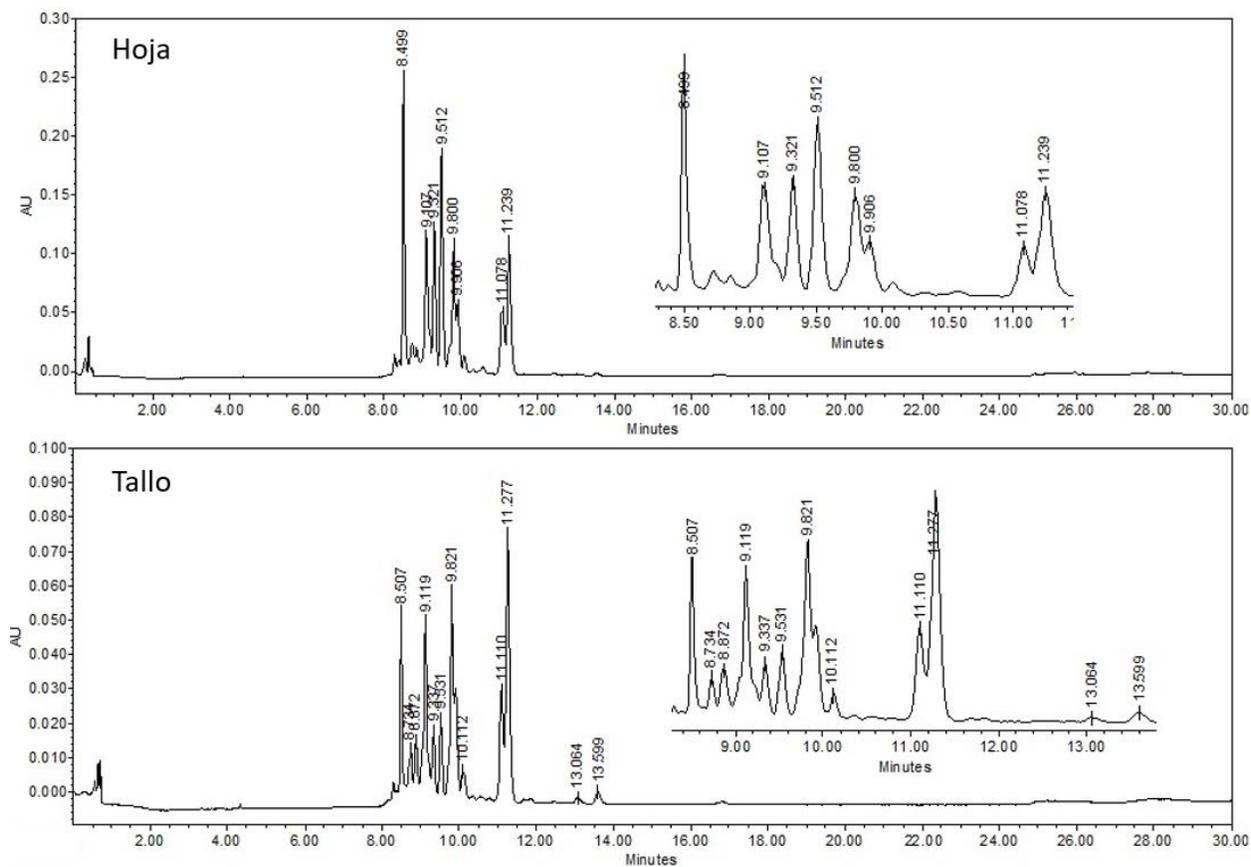


Figura 37. Cromatogramas (HPLC, UV₃₂₅) de los extractos obtenidos con MeOH de la planta silvestre.

Cabe destacar que los compuestos observados mediante HPLC en estos extractos también deben ser purificados y realizar un análisis por resonancia magnética para corroborar las estructuras químicas de los compuestos señalados en la literatura y en los presentes en los extractos obtenidos. Esto ayudaría también a comparar con los extractos de las diferentes líneas de callo mantenidas en el laboratorio.

8.6. Perfiles cromatográficos en capa fina de los cultivos de callo

Una vez fueron determinadas las líneas de callo que se mantendrían debido a sus características morfológicas y supervivencia, éstas se analizaron mediante CCF y se compararon con los perfiles de la planta silvestre, con la finalidad de identificar similitudes en cuanto a composición química.

Para ello se obtuvieron los extractos de los cultivos de callo de la misma forma que se obtuvieron los de la planta silvestre, sin embargo, debido a la poca cantidad de muestra de biomasa seca resultante de los cultivos de callo no se logró determinar los rendimientos de extracción. Los extractos de metanol continuaron siendo los que permiten una mayor recuperación del extracto. En apariencia los extractos se observaron de color amarillo tenue en el caso de los de hexano, verde en los extractos de AcOEt y tonalidades del naranja a café en los extractos de metanol, la consistencia no fue determinada debido a la poca cantidad del extracto.

En todos los tratamientos se observan compuestos similares a los presentes en la planta silvestre, sin embargo, existen algunas diferencias de composición en algunos tratamientos y una variedad más amplia de compuestos en los órganos de la planta silvestre.

Comenzando con los extractos de hexano, se observa el compuesto mayoritario de hojas y tallos se encuentra también en los cultivos de callo los Rf 0.80 en ambos balances hormonales, mientras que el compuesto de Rf 0.55 presente en la planta silvestre como mayoritario en luz UV₃₆₅ no es apreciable en los cultivos de callo, sin embargo, un compuesto con Rf 0.50 es ligeramente apreciable tanto en las líneas T5, como T6; por otra parte, el compuesto con Rf 0.35 es apreciable tanto en los cultivos como en la planta silvestre como uno de los compuestos mayoritarios en ambos casos, pero el compuesto del Rf 0.30 se presenta en mayor abundancia en los extractos de la planta silvestre a pesar de estar también presente en los callos (Figura 38 y 39).

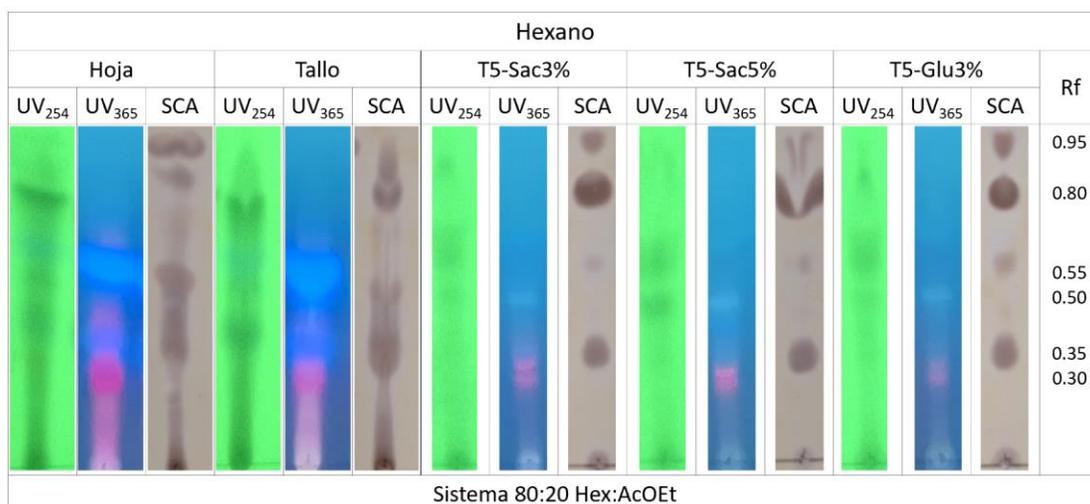


Figura 38. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T5 (extracción con hexano).

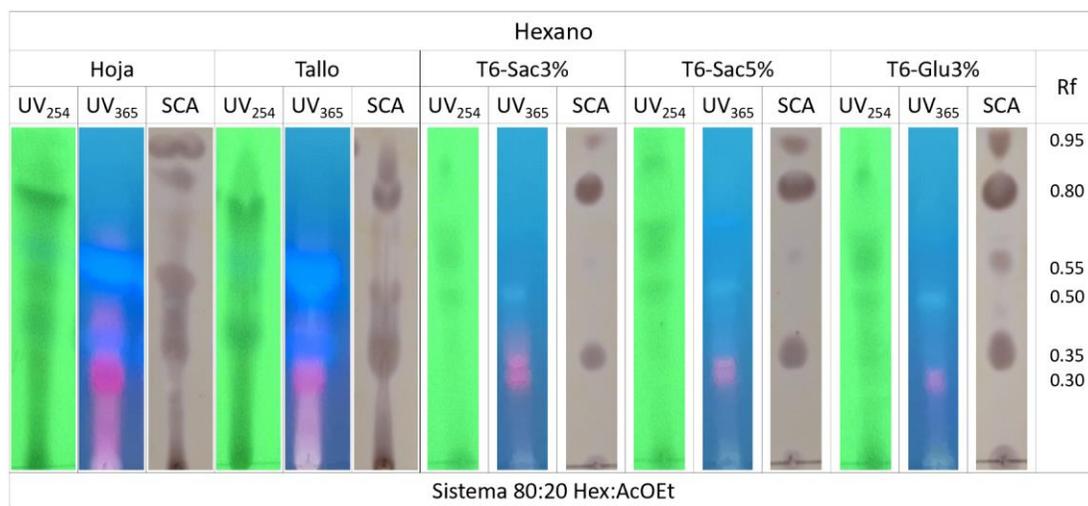


Figura 39. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T6 (extracción con hexano).

Para los extractos con AcOEt se corrieron dos sistemas (Figura 40 y 41), en el sistema de menor polaridad se observa un compuesto con Rf de 0.90 que es mayoritario en los cultivos de callo pero que no se presenta en el extracto de hoja, mientras que en el extracto de tallo está presente en una menor cantidad que la exhibida por los callos. Uno de los compuestos con Rf 0.70 puede observarse tanto en los cultivos como en la planta silvestre, sin embargo, el otro compuesto es solamente apreciable para la planta silvestre. En cuanto a los compuestos con Rf 0.55, aquellos

visibles en luz UV₃₆₅ se encuentran solamente en la planta silvestre, mientras que los que revelan con SCA varían se encuentran presentes tanto en cultivos como en la planta silvestre, variando en cuanto a concentración, destacando el extracto de hoja y el callo T6 con 3% de glucosa como los que presentan mayor abundancia. Los compuestos con Rf 0.45 son observables únicamente en los extractos de la planta silvestre.

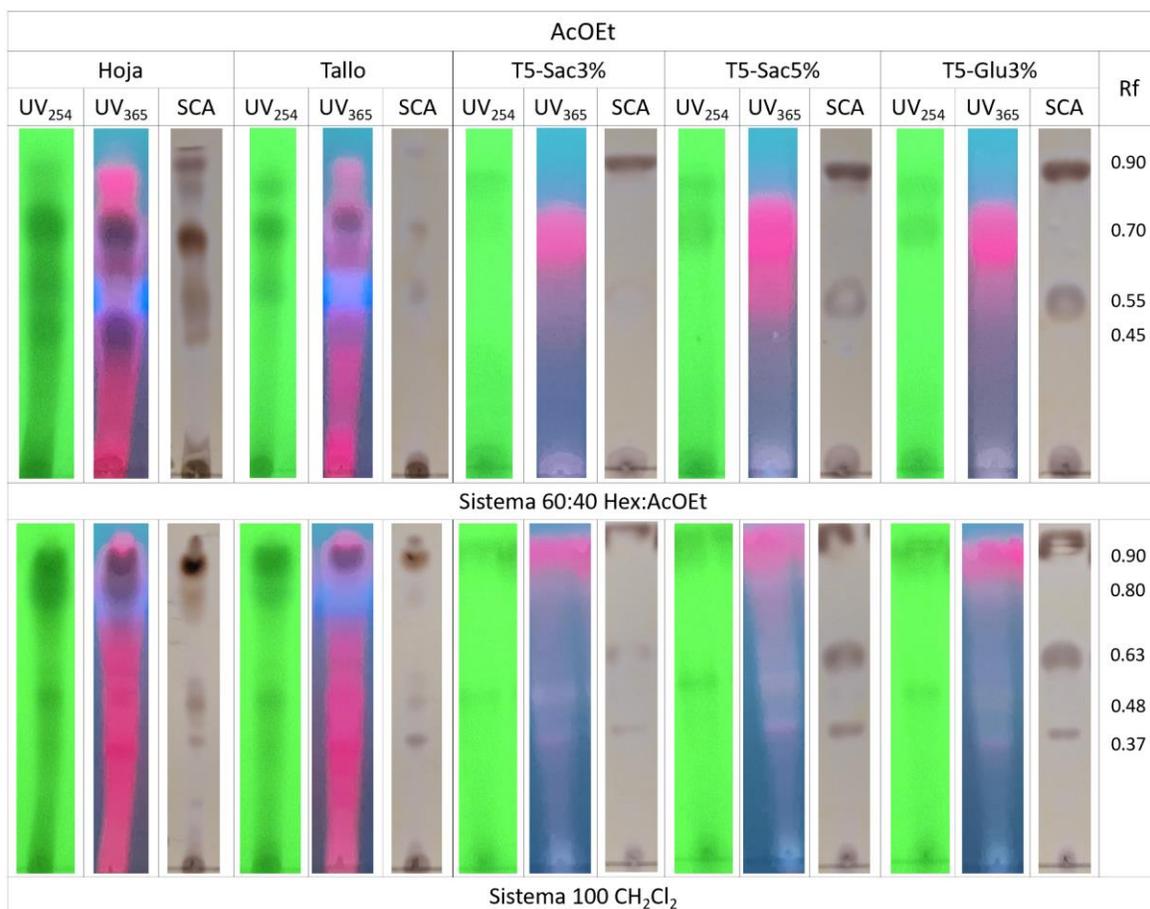


Figura 40. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T5 (extracción con AcOEt).

Si se aumenta la polaridad del sistema de elución, se aprecia que el compuesto con Rf 0.37 se encuentra presente tanto en los cultivos de callo como en la planta silvestre, sin embargo, el compuesto con Rf 0.48 se encuentra principalmente en la planta silvestre, en los callos podría estar presente en bajas cantidades. El compuesto con un Rf 0.63 es apreciable solamente en los cultivos

de callo, pero no se descarta que se encuentre en menores cantidades en la planta silvestre, este compuesto tiene una mayor presencia en los callos cultivados con glucosa al 3%, por lo que este azúcar podría estar promoviendo su producción.

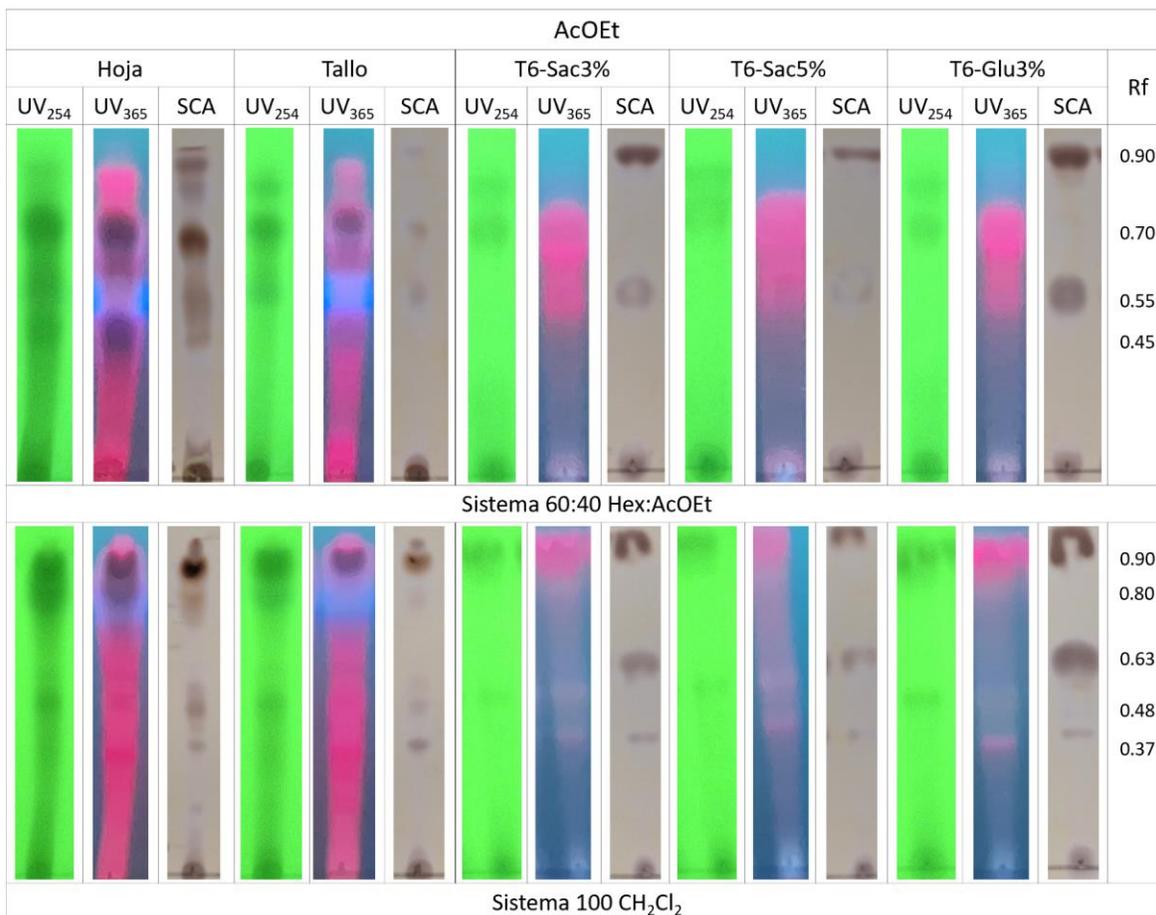


Figura 41. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T6 (extracción con AcOEt).

Finalmente, en los extractos de metanol presentan compuestos similares en los cultivos de callo y la planta silvestre, variando principalmente en la cantidad producida por los callos (Figura 42 y 43) se pueden observar algunos compuestos de polaridad media (Rf 0.98 y 0.77 en sistema 50:50 Hex:AcOEt) que están presentes en mayor cantidad en los órganos de la planta silvestre y en los cultivos de callo con glucosa al 3 %, sin embargo uno de los compuestos mayoritarios eluye en el sistema siguiente, este compuesto (Rf 0.77) también se encuentra tanto en la planta silvestre como

en los cultivos de callo, pero en estos últimos la cantidad producida es menor, cabe destacar que en el extracto de hoja se encuentra un compuesto con Rf de 0.65 que también es posible observarlo en los cultivos de callo, aunque la cantidad es menor a comparación de la planta silvestre.

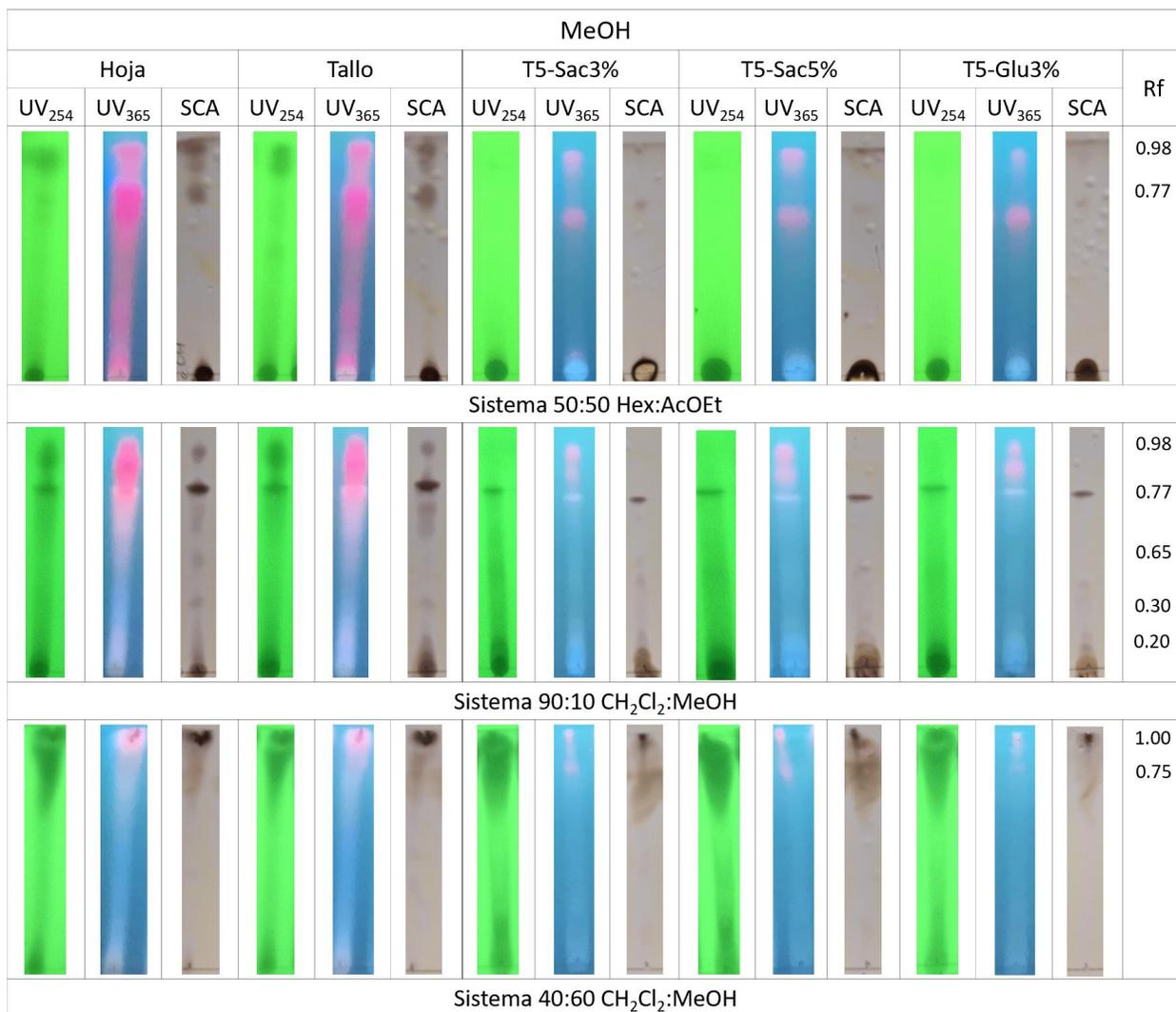


Figura 42. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T5 (extracción con MeOH).

Cabe rescatar que se esperaba obtener compuestos de polaridad alta mediante la extracción metanol, sin embargo, utilizar placas de fase normal para estos compuestos dificulta la separación, como se observa en las placas eluidas en el sistema de mayor polaridad, tanto en la planta silvestre como en los cultivos de callo se observa la presencia de compuestos con Rf de 0.75 que no son

separados con facilidad, sin embargo, es notoria la similitud entre las placas de la planta silvestre y los cultivos de callo, destacando los tratamientos de sacarosa que presentan cantidades ligeramente superiores a las observadas en la planta silvestre, principalmente en los tratamientos con 5% de sacarosa.

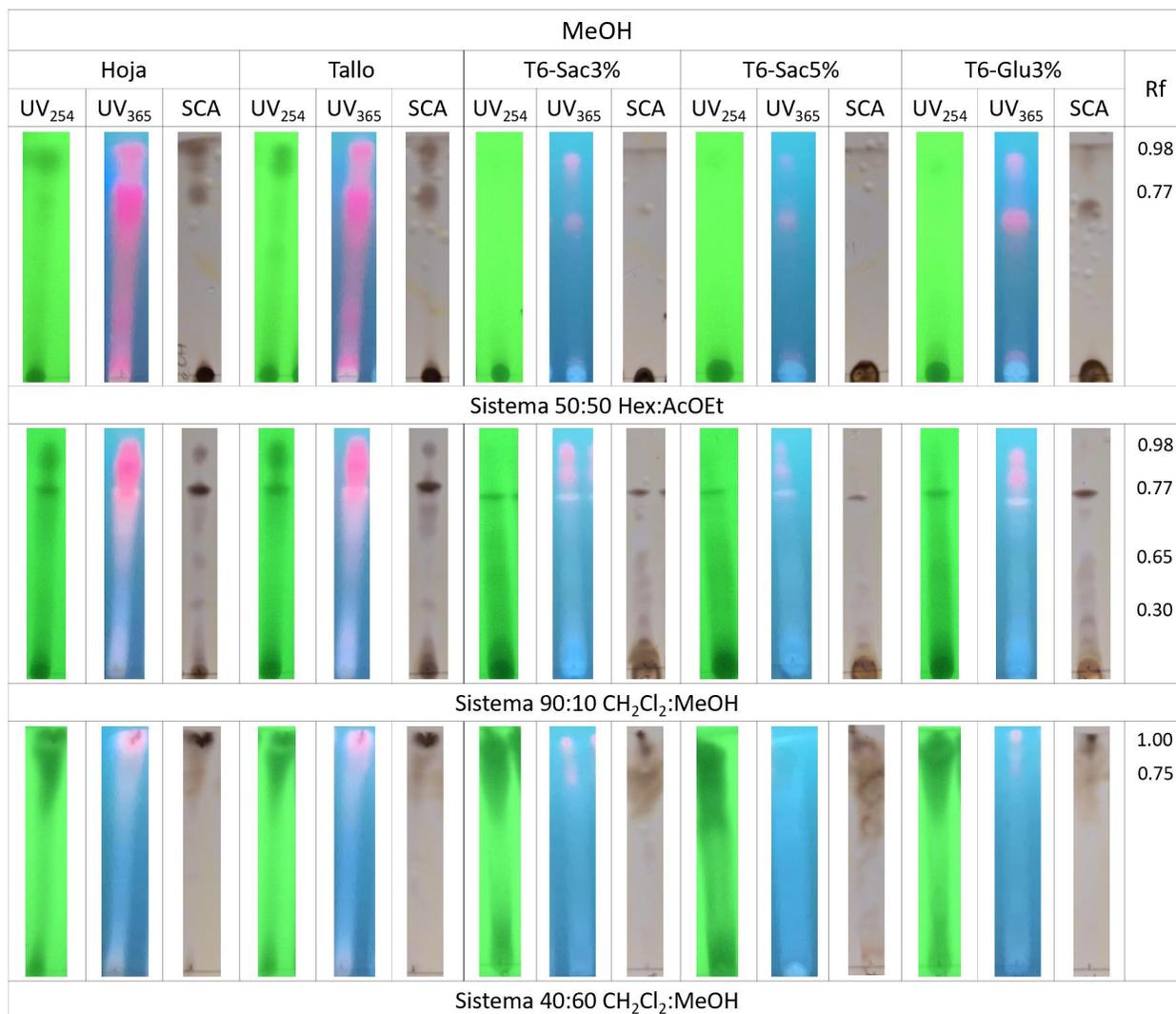


Figura 43. Perfiles cromatográficos de las variaciones de callo T6 (extracción con MeOH).

Para confirmar la presencia y comparar las cantidades producidas por los cultivos de callo y la planta silvestre se requiere de análisis cuantitativos, como son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa y HPLC que nos permitan conocer más detalles sobre la fitoquímica

particular de los callos, puesto que la modificación de la concentración de azúcares puede promover la producción de compuestos, tal es el caso de *Withania somnifera* (Solanaceae), en la cual se cultivaron brotes en 3%, 6% y 9% de sacarosa, lo que promovió la producción de compuestos, mientras que la concentración de 12% es tóxica para el explante (309). Sin embargo, también se puede favorecer solamente la producción de algunos compuestos, como se observó en los cultivos de células de *Hylocereus costaricensis* (Cactaceae), ya que al aumentar la cantidad de sacarosa se reduce la producción de betalaina, pero al mantener los cultivos con 1% de sacarosa se obtienen las cantidades más altas de betacianina y betaxantina (154). En otro caso, se vió favorecida la producción de taxol y taxanos al combinar ácido salicílico 5 μ M y glucosa 2% en el medio de callos de *Taxus baccata* (Taxaceae) (310).

8.7. Evaluaciones biológicas

E. canadensis cuenta con estudios farmacológicos, sin embargo, la mayoría de estos han sido realizados en Europa y Asia, no se cuentan con antecedentes en cuanto a actividad biológica para los individuos que crecen en México como una planta nativa, por lo que se realizaron las evaluaciones antioxidantes, antimicrobiana y cicatrizante a nivel de extracto para determinar los efectos medicinales de esta especie nativa. Cabe resaltar que los extractos evaluados fueron los de la planta silvestre, como un antecedente para las evaluaciones de los extractos de callo, puesto que esta planta tampoco ha sido cultivada en condiciones *in vitro*.

8.7.1. Pruebas *in vitro*

8.7.1.1. Potencial antioxidante

El ensayo de DPPH nos permite evaluar la capacidad antioxidante (captación de radicales libres) de muestras complejas, como lo son extractos naturales que contienen una gran variedad de metabolitos secundarios, sin embargo, la capacidad antioxidante de los extractos varía al ser

evaluada en sistemas *in vivo*, puesto que el medio de reacción es diferente y los mecanismos de acción diversos (311). Esta técnica también tiene la ventaja de que el DPPH reacciona con toda la muestra permitiendo detectar antioxidantes débiles, hidrofílicos y lipofílicos, sin embargo, una de sus limitantes es la interacción del DPPH con otros radicales, solamente es soluble en solventes orgánicos y no puede emplearse en emulsiones que contengan proteínas debido a la precipitación de estas con los alcoholes (312).

En cuanto a los resultados, se observó que los extractos de hexano no presentaron potencial inhibitorio del radical DPPH, sin embargo, existen diferencias entre los tratamientos ya que se evaluaron los extractos a diferentes concentraciones. Destaca el extracto de tallo con AcOEt a una concentración de 1000 ppm que presentó inhibición significativa de la estructura DPPH en más de un 70% (Tabla 16), sin embargo, los controles de Quercetina, en sus tres concentraciones presentan los porcentajes más altos de inhibición del radical DPPH, además fueron significativamente diferentes los porcentajes de inhibición obtenidos por la quercetina y el extracto de tallo de AcOEt.

Tabla 16. Efecto antioxidante de los extractos orgánicos de tallo y hoja de la planta silvestre.

Muestra	Concentración		
	10ppm	100ppm	1000ppm
Quercetina	92.199±0.1	95.6±0.356	97.5±0.001
Extracto Hoja-Hex	-13.454±0.001*	-12.04±0.0005*	8.422±0.25*
Extracto Tallo-Hex	-17.128±0.002*	-11.814±0.0005*	2.148±0.05*
Extracto Hoja-AcOEt	0.059±0.0005*	0.067±0.001*	-2.152±0.001*
Extracto Tallo-AcOEt	-14.584±0.0005*	6.727±0.001*	74.618±0.001*

Reportado como porcentaje de inhibición del radical libre (DPPH) ± desviación estándar, n=3. *: diferentes del control (Quercetina) con un p-value < 0.001. Kruskal-Wallis y Tukey.

Se ha reportado este efecto con anterioridad para las fracciones ricas en polisacáridos y el extracto de inflorescencias de *E. canadensis* inhibiendo la oxidación de proteínas por el peroxinitrito (125,130), sin embargo, el efecto también se ha demostrado en la inhibición del

radical DPPH en un 70.6% con la fracción de AcOEt obtenida del extracto metanólico de la parte aérea de la planta a una concentración de 100 µg/mL (100 ppm) (137).

Por otra parte, los aceites esenciales extraídos con hexano de las partes aéreas de asteráceas como *Aster albescens*, *Erigeron annuus*, *E. karwinskianus*, *E. mucronatus*, *E. multiradiatus* y *Senecio nudicaulis* si han presentaron capacidad antioxidante sobre el radical DPPH mostrando CI_{50} de 1.2 mg/mL (1200 ppm) y 1.1 mg/mL (1100 ppm) para *E. mucronatus* y *E. multiradiatus* respectivamente, siendo las especies con los aceites esenciales con mejor actividad antioxidante (313), sin embargo, en los extractos hexánicos de *E. canadensis* colectada en México no se encuentran los aceites esenciales reportados para la variedades de Europa y Asia.

Mientras que los extractos en acetona 70% de la parte aérea de *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae) también presentan potencial antioxidante, pero su IC_{50} fue mucho menor que en otras especies, de 0.027 mg/mL (27 ppm) (314), al ser la IC_{50} más baja implica que tienen mayor eficacia en la inhibición del radical DPPH, ya que a esta concentración de logra inhibir un 50% del radical DPPH.

En el caso del extracto de hojas de *Ageratum houstonianum* (Asteraceae) con AcOEt, se obtuvo un 88.26% de inhibición del radical DPPH a una concentración de 0.5 mg/mL (500ppm), siendo un valor de inhibición más alto que el obtenido en los extractos con metanol (315). Por otra parte, los extractos con etanol de las hojas de *Ageratum conyzoides* y *Mikania cordifolia* (ambas asteráceas), a una concentración de 0.1 mg/mL (100ppm) ya mostraban inhibición del radical DPPH en un 91.72% y 85.12% respectivamente (316).

Es notorio que los extractos de metanol no fueron evaluados debido a que la técnica estandarizada emplea etanol absoluto como disolvente de los extractos y los extractos metanólicos de la hoja y tallo de *E. canadensis* formaron precipitados al contacto con el etanol, aunado a esto,

el DPPH solo es soluble en medio orgánico, por lo que esta técnica es utilizada para la medición de la capacidad antioxidante de compuestos poco polares, para los compuestos de mayor polaridad se recomienda el uso de la técnica de ABTS (317).

Puesto que los extractos metanólicos contienen compuestos muy polares, entre los cuales se podrían encontrar los derivados de los ácidos cinámico y benzoico reportados en los extractos de plantas colectadas en Serbia (81,89), además de que dos de los compuestos identificados en el extracto de tallo mediante GC-MS (2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona y ácido fólico) han sido reportados con capacidad antioxidante, de los cuales la 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona es capaz de inhibir el radical DPPH en más de un 80% en una concentración de 1000 µg/mL (1000ppm), se esperaba un gran potencial antioxidante, por lo que se plantea el uso de otras técnicas y la estandarización con metanol como solvente para la técnica de DPPH y evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en la planta silvestre de *E. canadensis* con mayor certeza, puesto que en el ensayo de DPPH con los extractos de hoja y tallo en metanol de *Lagascea decipiens* (Asteraceae) se encontró una mayor capacidad antioxidante de los compuestos acumulados en la hoja mediante la técnica de DPPH (318).

8.7.1.2. Actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de la planta silvestre

En cuanto a la actividad antimicrobiana, se determinó que para *E. coli* (ATCC 25922 por método de difusión Kirby-Bauer y ATCC 8739 por método de microdilución en caldo) y *S. typhimurium* (ATCC 14028 por método de microdilución en caldo) ninguno de los tratamientos con los extractos orgánicos presentó actividad, sin embargo, en la evaluación de susceptibilidad por disco difusión, los extractos de hoja obtenidos con hexano y AcOEt presentaron actividad antifúngica contra la levadura *C. albicans*, presentando halos de inhibición superiores a los 10mm,

a diferencia de los extractos de tallo, en los cuales no se apreció la formación de halos en ninguna de las concentraciones evaluadas (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto antifúngico de los extractos orgánicos de la planta silvestre sobre Candida albicans.

Tratamiento	Concentración (mg/mL)			
	12.5	25	50	100
Fluconazol (2mg/mL)	21.20±0.26^a			
Hexano (10µl/disco)	0±0 ^d			
AcOEt (10µl/disco)	0±0 ^d			
Agua (10µl/disco)	0±0 ^d			
Extracto Hoja-Hex	0±0 ^d	0±0 ^d	14.26±1.19^b	20.02±0.54^a
Extracto Hoja-AcOEt	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d	11.88±1.63^c
Extracto Hoja-MeOH	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d
Extracto Tallo-Hex	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d
Extracto Tallo-AcOEt	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d
Extracto Tallo-MeOH	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d

Reportado como la medida del halo de inhibición (mm) a las 24 h ± desviación estándar, n=5. ^a: media más alta, letras similares indican que no hay diferencias significativas entre dichos valores, p-value<0.0001). ANOVA y Tukey.

Cabe destacar que el extracto de hoja obtenido con hexano a una concentración de 100 mg/mL y el control positivo de fluconazol 2 mg/mL no presentaron diferencias significativas, por lo que se supone un efecto del extracto similar al del fármaco de referencia, teniendo los halos de inhibición de mayor tamaño, seguidos del extracto hexánico de hoja a 50 mg/mL, el cual fue significativamente diferente a los dos anteriores, y finalmente, el extracto de AcOEt de hoja a 100 mg/mL presentó el halo de inhibición más pequeño y significativamente diferente a los halos obtenidos de los extractos hexánicos.

Por otra parte, en la evaluación por disco difusión no se observaron halos de inhibición para *S. aureus* (ATCC 25923), sin embargo, al realizar las diluciones de los extractos y el ensayo MTT se observó efecto sobre dos serotipos de *S. aureus* (ATCC 6538 y ATCC 43300), una de ellas resistente, como se muestra en la Figura 44.

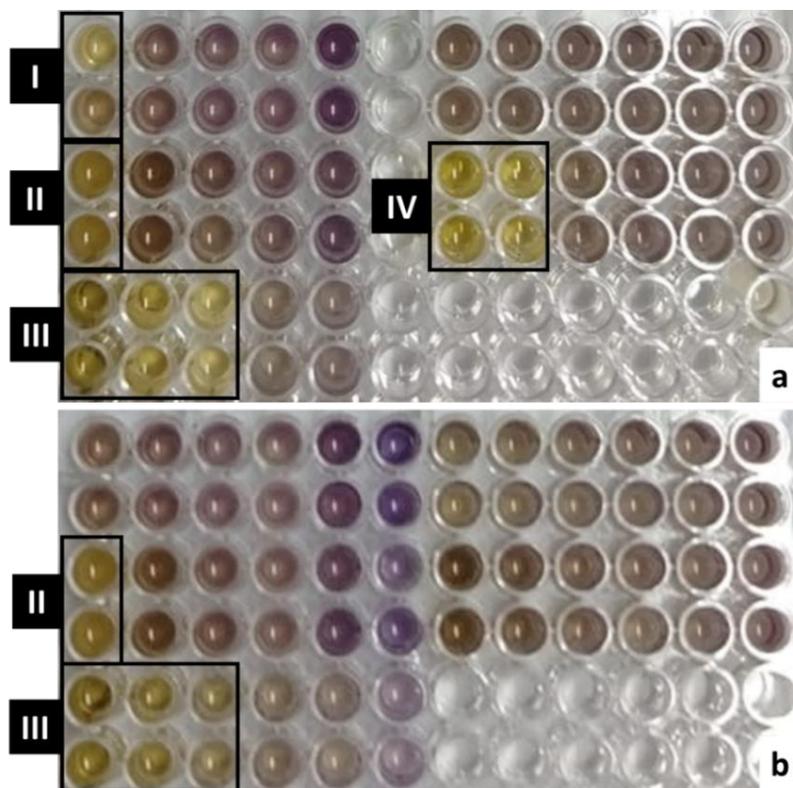


Figura 44. Ensayo MTT de los extractos orgánicos de la planta silvestre. *Staphylococcus aureus* metiliclin-resistente (a). Extractos: Tallo-Hex (I) a 500 $\mu\text{g/mL}$, Hoja-Hex a 500 $\mu\text{g/mL}$ Tallo-AcOEt (III) a 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ (izquierda a derecha) y Hoja-MeOH (IV) a 500 y 250 $\mu\text{g/mL}$ (izquierda a derecha). *S. aureus* (b). Extractos: Hoja-Hex (II) a 500 $\mu\text{g/mL}$ y Tallo-AcOEt (III) a 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ (izquierda a derecha).

Además, la colorimetría MTT permitió identificar las CMI, haciendo evidente que todos los extractos presentaron actividad antibacteriana al menos contra una de las cepas evaluadas, como se muestra en la Tabla 18. Entre ellos destacan los extractos de menor polaridad que presentaron actividad contra tres de las cepas, una de ella resistente, además y el extracto de hoja de mediana polaridad que presentó la menor CMI al inhibir el crecimiento de *S. pyogenes*. Además, el extracto de tallo de menor polaridad fue el único de los extractos capaz de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Tabla 18. Efecto antibacteriano de los extractos orgánicos de la planta silvestre.

Tratamiento	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>S.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>S.a.</i>	<i>S.a.rm</i>
Gentamicina	3.1	≤ 0.78	≤ 0.78	12.5
Extracto Hoja-Hex	500	SE	500	500
Extracto Hoja-AcOEt	62.5	SE	SE	SE
Extracto Hoja-MeOH	250	SE	SE	250
Extracto Tallo-Hex	250	500	SE	500
Extracto Tallo-AcOEt	SE	SE	125	125
Extracto Tallo-MeOH	500	SE	SE	SE

SE: Sin efecto; *S.p.:* *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); *P.a.:* *Pseudomonas aeruginosa* (aislado clínico); *S.a.:* *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *S.a.rm:* *Staphylococcus aureus* metilcilin-resistente (ATCC 43300).

Algunas de las cepas evaluadas en este trabajo también fueron evaluadas con los extractos hidroalcohólicos y en metanol de las hojas, flores y tallos de *Lagascea decipiens* (Asteraceae), pero estos extractos no mostraron efectos sobre ninguna de las cepas para las que los extractos de *E. canadensis* si mostraron inhibición (318).

En otro estudio con *Helichrysum odoratissimum* (Asteraceae), se encontró que la fracción de AcOEt de un extracto etanólico de la parte aérea de la planta muestra actividad antifúngica contra *C. albicans* y actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*, con una CMI de 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (319). Mientras que los extractos con hexano y diclorometano de la raíz de *Thymophylla pentachaeta* (Asteraceae) mostraron tener actividad contra *C. albicans* con una concentración mínima fungicida (MFC) de 7.81 $\mu\text{g/mL}$, también los extractos de la parte aérea de la planta obtenidos con hexano y diclorometano mostraron actividad en menor medida (MFC de 62.5 y 15.63 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (320).

Por otra parte, los aceites esenciales de los brotes florales de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) y hojas de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) mostraron CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. pyogenes* (321), mientras que el extracto etanólico de hoja de *Helianthus annuus* (Asteraceae) mostró actividad contra esta bacteria en concentraciones superiores a los 60 $\mu\text{g/mL}$ (322) y los extractos en éter de

petróleo, acetona y metanol de la raíz de *Pentanema confertiflorum* (Asteraceae) inhibieron el crecimiento de *S. pyogenes*, *S. aureus* y *E. coli* (323).

Mientras que, el extracto etanólico de las partes aéreas y sus fracciones (cloroformo, AcOEt y agua) de *Acroptilon repens* (Asteraceae) mostraron actividad contra *P. aeruginosa* (324), la cual también fue susceptible a los aceites esenciales de *Artemisia campestris* subsp. *campestris* (Asteraceae), así como las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, sin embargo, estas cepas fueron menos susceptibles (325). Los aceites esenciales de *Baccharis coridifolia* presentaron actividad contra cepas resistentes de *P. aeruginosa* y *S. aureus* con CMI de 512 y 128 µg/mL, respectivamente (326).

El efecto observado sobre *C. albicans* ha sido previamente reportado para los aceites esenciales, extractos acuosos y los compuestos aislados (conyzolido y conyzoflavona) de *E. canadensis*, así como para otras cepas de hongos patógenos de plantas y humanos (124,135,138,147), sin embargo, no han sido evaluados los compuestos de menor polaridad de forma individual y solamente se cuenta con el antecedente de las fracciones menos polares de un extracto de la planta completa con actividad contra *Candida albicans*, *C. glabrata* y *Aspergillus niger* (136).

En cuanto a las cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* ha sido anteriormente evaluado sin mostrar efectos al utilizar glucopiranosidos aislados (133), mientras que el extracto etanólico de la planta completa muestra efecto contra *P. aeruginosa* (135), al igual que el extracto metanólico y las fracciones de baja y media polaridad derivadas de este mismo extracto (136). Por otra parte, el extracto de flores con etanol y metanol han inhibido el crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente (140). Cabe destacar que el efecto antibacteriano contra *S. pyogenes* no ha sido reportado con anterioridad para la especie.

De los compuestos identificados en GC-MS en el extracto hexánico de hoja se encontraron compuestos antimicrobianos, como son el acetato de fitol que mostró una CMI de 16 $\mu\text{g/mL}$ contra *Mycobacterium tuberculosis* (199), el α -curcumeno inhibió el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* a una CMI de 13 $\mu\text{g/mL}$ en los tres casos y de 6.4 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. albicans*, además este compuesto podría estar rompiendo las membranas celulares de estos microorganismos debido a su hidrofobicidad (200), también se identificó el estigmasterol como antibacteriano debido a la formación de halos de inhibición en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (226).

Mientras que en el extracto de AcOEt de hoja también se encontró el acetato de fitol y fitol como compuesto antimicrobiano contra *M. tuberculosis* a CMI's de 16 $\mu\text{g/mL}$ y 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (199), sin embargo, el fitol también posee actividad contra *E. coli* (CMI de 600 $\mu\text{g/mL}$) y *P. aeruginosa* (CMI de 60 $\mu\text{g/mL}$) (263), además se identificó el τ -cadinol que mostró actividad contra diferentes cepas de *S. aureus* con CMI's que van de 64 a 256 $\mu\text{g/mL}$ (265).

8.7.2. Pruebas in vivo

8.7.2.1. Actividad cicatrizante

Finalmente, de forma adicional se evaluó el posible efecto cicatrizante de dos extractos de diferentes partes de la planta silvestre, ya que esta actividad no ha sido evaluada con anterioridad para la especie, sin embargo, su uso etnomedicinal sugiere que interviene como desinfectante de heridas y reducción de la irritación ((79,80).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p\text{-value} < 0.05$) en el efecto de los extractos de metanol de tallo y AcOEt de hoja evaluados a 1 y 5 mg/mL respecto a los controles negativos (agua y DMSO respectivamente), a pesar de ello, existen diferencias significativas entre las distintas mediciones por día en la cinética de evolución de cada tratamiento (Tablas 19 y 20).

En el caso del extracto con metanol se observa que en el día uno no hay un efecto cicatrizante del extracto en ninguna de las dos concentraciones y que el control positivo es el que presenta un área de herida de menor tamaño, sin embargo, en los días 3 y 6 el efecto de ambas concentraciones del extracto y el control negativo es similar y a partir del día 8 el efecto es similar entre los tratamientos, siendo solamente el control negativo el que presenta un área de herida mayor (Tabla 19).

Tabla 19. Reducción de la herida por el extracto de Tallo-MeOH en modelo de cicatrización en ratones CD1 machos.

Día	Tratamiento			
	KitosCell-Q	Agua	Tallo-MeOH 1mg/mL	Tallo-MeOH 5mg/mL
0	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a
1	21.38±3.24 ^a	34.21±12.52 ^{a,b}	46.20±9.56 ^{b,c}	60.89±4.86 ^c
3	13.02±9.86 ^a	35.17±5.90 ^b	41.38±10.17 ^b	38.26±10.07 ^b
6	5.93±4.55 ^a	20.30±5.95 ^b	24.03±9.10 ^b	19.33±2.92 ^b
8	3.09±1.78 ^a	10.97±5.89 ^b	2.24±1.03 ^a	5.02±3.93 ^{a,b}
10	1.77±1.00 ^{a,b}	4.25±3.26 ^b	0.54±0.47 ^a	0.2±0.17 ^a
13	0.10±0.10 ^a	3.72±2.25 ^b	0±0 ^a	0±0 ^a

Representado la media del porcentaje del área normalizada de la herida en cada día de evaluación ± desviación estándar, n=5. ^a: indica las medias más altas por día, letras similares son valores sin diferencias significativas entre ellos, p-value < 0.02. Kruskal-Wallis y Tukey.

Por otra parte, en el extracto de hoja obtenido con AcOEt se observa que nuevamente es el control positivo el que reduce significativamente la herida en el día uno, mientras que ambas concentraciones del extracto presentan efecto similar al control negativo, destacando que en el día tres el extracto a 5 mg/mL tiene actividad similar al control positivo, mientras que en el día seis es la concentración de 1 mg/mL la que se equipara al efecto de dicho control (Tabla 20).

Tabla 20. Reducción de la herida por el extracto de Hoja-AcOEt en un modelo de cicatrización en ratones CD1 machos.

Día	Tratamiento			
	KitosCell-Q	DMSO	Hoja-AcOEt 1mg/mL	Hoja-AcOEt 5mg/mL
0	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a

1	21.38±3.24 ^a	41.75±10.70 ^b	75.14±7.41 ^c	60.51±9.76 ^c
3	13.02±9.86 ^a	32.83±7.18 ^b	39.82±4.05 ^b	22.81±10.10 ^{a,b}
6	5.93±4.55 ^a	21.13±6.66 ^b	12.61±3.40 ^{a,b}	17.34±5.85 ^b
8	3.09±1.78 ^a	6.53±6.01 ^a	7.35±5.25 ^a	4.23±4.74 ^a
10	1.77±1.00 ^a	2.80±4.64 ^a	1.43±2.05 ^a	0.43±0.51 ^a
13	0.10±0.10 ^a	0.19±0.11 ^a	0.12±0.23 ^a	0.05±0.11 ^a

Representado la media del porcentaje del área normalizada de la herida en cada día de evaluación \pm desviación estándar, $n=5$. ^a: indica las medias más altas por día, letras similares son valores sin diferencias significativas entre ellos, p -value < 0.02. Kruskal-Wallis y Tukey.

A pesar de no poseer un efecto cicatrizante, los extractos evaluados no retardan o impiden la cicatrización, puesto que el cierre de la herida se da dentro de los 13 días de monitoreo, en el caso de los controles negativos (vehículo) el cierre de la herida no fue total, a diferencia de los extractos evaluados y el control positivo (Figura 45).

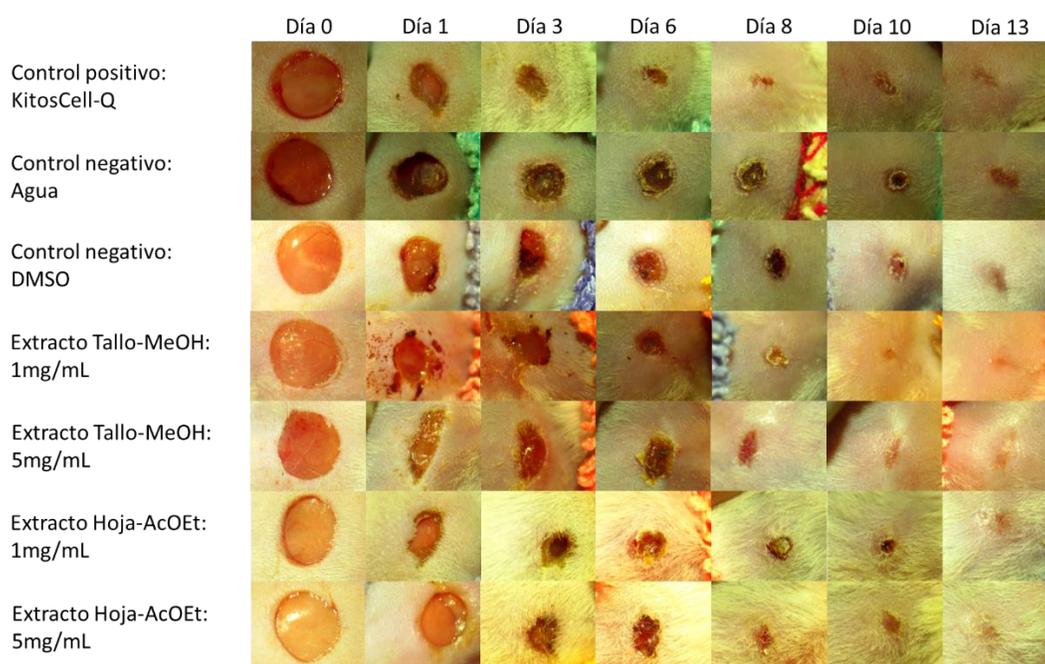


Figura 45. Reducción de la incisión dorsal.

No se descarta la posibilidad de que alguno de los extractos de la planta silvestre presente actividad cicatrizante, ya que los extractos obtenidos de otras especies de la familia Asteraceae han mostrado actividad cicatrizante, tal es el caso del extracto etanólico de *Elephantopus scaber*,

el cual mostró actividad cicatrizante en los modelos de excisión, incisión y espacio muerto en ratas Wistar, logrando el cierre completo de la herida en 16 días aproximadamente (327). Mientras que la fracción de AcOEt de un extracto de hojas de *Wedelia trilobata* promovió la supervivencia de fibroblastos L929 en un 90% en un ensayo *in vitro* (328). El extracto metanólico de *Helichrysum graveolens* también presentó actividad cicatrizante en los modelos excisional e incisional, sin embargo, el efecto fue mayor en la fracción de AcOEt obtenida del mismo (329).

9. CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de la especie *E. canadensis* puede establecerse desde semillas colectadas en campo, pasando por un sistema de desinfección con etanol al 70% (30 s) e hipoclorito de sodio a 0.1% (20 min). Además, las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro*, poseen la morfología adecuada para la toma de explantes de hoja, raíz e internodo, de los cuales se puede inducir callo mediante RCV; sin embargo, para el establecimiento de líneas de callo friable que permita la extracción de compuestos bioactivos, el explante de internodo cultivados en medio MS con 0.1 mg/L de PIC, 1.0 o 2.0 mg/L de BAP y sacarosa o glucosa al 3% muestra mejor respuesta a los subcultivos constantes, mayor producción de biomasa y mayor acumulación de agua.

Por otra parte, el análisis de GC-MS de los extractos seriados de baja, media y alta polaridad de la planta silvestre permitió identificar similitudes entre la variedad colectada en México y la variedad colectada en Europa y Asia respecto a los compuestos bergamoteno, farneseno, curcumeno, cubebeno y estigmasterol. Se identificaron un total de 42 compuestos mediante GC-MS, de los cuales 14 han sido reportados con alguna actividad biológica; sin embargo, la 8-metilcumarina fue encontrada en los extractos de hexano y AcOEt de la hoja de individuos crecidos en el Estado de Morelos, siendo este compuesto uno de los mayoritarios en ambos extractos y que además no cuenta con reportes en cuanto a presencia en la especie ni actividad biológica.

Dicho compuesto podría encontrarse también en los extractos de las líneas de callo, ya que los perfiles realizados de los callos y la planta silvestre mediante CCF exhiben similitudes en cuanto a los compuestos mayoritarios, sin embargo, la investigación en cuanto a la fitoquímica de la planta silvestre mexicana y las líneas de callo obtenidas por primera vez de esta especie, requiere ser ampliada para conocer con certeza los compuestos presentes y su abundancia, así como su actividad biológica.

Las actividades biológicas *in vitro* mostraron que el extracto de AcOEt de tallo exhibe potencial antioxidante, mientras que los extractos de hoja de hexano y AcOEt revelaron sobresaliente actividad antifúngica contra *Candida albicans*, así mismo todos los extractos inhibieron al menos una de las cepas bacterianas evaluadas (*Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *S. aureus* metilcilin-resistente) destacando que el extracto de hoja de AcOEt que presenta la menor CMI (62.5 µg/mL) de todos los extractos, y por primera vez se identifica inhibición contra *S. pyogenes*, cepa contra la cual no se ha demostrado la actividad de las variedades Europeas y Asiáticas de *E. canadensis*. Finalmente, ningún extracto mostró efecto cicatrizante en el modelo evaluado, lo que pudo ser consecuencia del sinergismo o antagonismo entre los compuestos, se requiere ampliar el estudio de la actividad biológica que presentan los extractos de la planta silvestre, lo que también sienta las bases para la comparación de la actividad de los extractos de las líneas de callo.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio biodirigido de la planta silvestre en función de la actividad antimicrobiana, asimismo determinar su actividad antiinflamatoria y capacidad antioxidante
- Realizar la cinética de crecimiento de las diferentes líneas de callo establecidas y obtener sus perfiles por cromatografía en capa fina para conocer el momento adecuado para realizar el subcultivo del callo y en el que la producción de compuestos bioactivos es mayor.
- Establecer el cultivo de células en suspensión, determinar sus parámetros cinéticos y comparar su contenido químico con los cultivos de callos y la planta silvestre.

11. ANEXOS.

Anexo 1. Eventos académicos en los que fue presentado el proyecto

- Simposio de perspectivas en biotecnología 2023 organizado por la UAM Iztapalapa y celebrado en mayo del 2023.
- Jornada a puertas abiertas de la Maestría en Medicina Molecular organizado por la Facultad de Medicina de la UAEM y celebrado en octubre del 2023.
- XXVIII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud organizado por la UAM Iztapalapa y celebrado en noviembre del 2023.
- 3^{er}. Congreso Internacional de Biotecnología Aplicada CIBTA 2023 organizado por la UTC y celebrado en noviembre-diciembre del 2023.
- 19^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales organizada por la AMIPRONAT en colaboración con la UAEM y celebrada en mayo del 2024.
- XXXIV Congreso Nacional de Bioquímica organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. y celebrado en octubre del 2024.

12. REFERENCIAS

1. Adetunji CO, Palai S, Ekwuabu CP, Egbuna C, Adetunji JB, Ehis-Eriakha CB, et al. General principle of primary and secondary plant metabolites: Biogenesis, metabolism, and extraction. En: Egbuna C, Mishra AP, Goyal MR, editores. Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders. Elsevier; 2021. p. 3–23.
2. Singh S, Bashri G, Prasad SM. Introduction to herbs and their therapeutical potential: Recent trends. En: Swamy MK, Patra JK, Rudramurthy GR, editores. Medicinal Plants : Chemistry, Pharmacology, and Therapeutic Applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2019. p. 71–7.
3. Saddiqe Z. Medicinal plants biotechnology. Canadá: Delve Publishing; 2019.
4. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. Biotechnology Reports. junio de 2020;26.
5. Kurhekar JV. Ancient and modern practices in phytomedicine. En: Egbuna C, Mishra AP, Goyal MR, editores. Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders. Elsevier; 2021. p. 55–75.
6. Wagner ML, Anconatani LM, Ricco RA, Varela BG, Giberti GC. The path of ethnopharmacobotany. En: Martinez JL, Munoz-Acevedo A, Rai M, editores. Ethnobotany: Local Knowledge and Traditions. 1a ed. CRC Press; 2019. p. 34–49.
7. Adelakun OE, Bolarinwa IF, Adejuyitan JA. Bioactive compounds in plants and their antioxidant capacity. En: Goyal MR, Ayeleso AO, editores. Bioactive Compounds of Medicinal Plants. 1a ed. Apple Academic Press; 2018. p. 13–34.

8. Sangamithra A, Chandrasekar V, John SG. Extraction methods for bioactive compounds from plants: an overview. En: Goyal MR, Joy PP, Suleria HAR, editores. *Plant Secondary Metabolites for Human Health*. 1a ed. Apple Academic Press; 2019. p. 3–36.
9. Gouveia SC, Spínola V, Castilho PC. Phenolic compounds and antioxidant capacity of medicinal plants: A review. En: Pereira DAM, editor. *Medicinal Plants: Antioxidant Properties, Traditional Uses and Conservation Strategies*. Nueva York: Nova Science Publishers, Inc.; 2014. p. 1–40.
10. Sharma A, Flores-Vallejo R del C, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. agosto de 2017;208:264–329.
11. Gutiérrez-Rebolledo GA, Pérez-González MZ, Zamilpa A, Jiménez-Arellanes MA. Anti-inflammatory evaluation and acute toxicity of three food supplements that contain *Moussonia deppeana*. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(2):141–7.
12. Pérez-González MZ, Jiménez-Arellanes MA. Biotechnological processes to obtain bioactive secondary metabolites from some Mexican medicinal plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. el 20 de agosto de 2021;105(16–17):6257–74.
13. Nigam M. *Phytomedicine: Scope and current highlights*. En: Egbuna C, Mishra AP, Goyal MR, editores. *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*. Elsevier; 2021. p. 39–54.
14. Calzada F, Bautista E. Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican flora with amoebicidal and giadicial activity, and their phytochemical constituents. *J Ethnopharmacol*. mayo de 2020;253:112676.

15. Morales G. La regulación de los productos herbolarios en México. *Ciencia Cofepris*. 2022;(7):7–13.
16. Quiñonez-Bastidas GN, Navarrete A. Mexican plants and derivatives compounds as alternative for inflammatory and neuropathic pain treatment—A Review. *Plants*. el 25 de abril de 2021;10(5):865.
17. SEMARNAT. Plantas medicinales de México [Internet]. 2021 [citado el 8 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>
18. Ley General de Salud. *Diario Oficial de la Federación México*; may 16, 2022.
19. Reglamento de Insumos para la Salud. *Diario Oficial de la Federación México*; may 31, 2021.
20. Fonseca RE, Rivera LA, Vázquez L. Guía ilustrada de plantas medicinales en el Valle de México. México: Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas (INPI); 2020.
21. Guzmán SH, Díaz RS, González MM. *Plantas Medicinales: La realidad de una tradición ancestral*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (inifap); 2017.
22. Abdulhafiz F, Mohammed A, Reduan MFH, Kari ZA, Wei LS, Goh KW. Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. *Arabian Journal of Chemistry*. noviembre de 2022;15(11).
23. Erb M, Kliebenstein DJ. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: The blurred functional trichotomy. *Plant Physiol*. septiembre de 2020;184(1):39–52.

24. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. octubre de 2001;161(5):839–51.
25. Research Analysis Insights. Global botanical and plant derived drugs market growth, share, size, trends and forecast (2024-2030). 2024 sep.
26. Muhammad KK, Farid C, Sattar S, Imran M. Extraction of bioactive molecules: Conventional versus novel methods. En: Suleria HAR, Barrow C, editores. *Bioactive Compounds from Plant Origin*. 1a ed. New York: Apple Academic Press; 2019. p. 3–44.
27. Ferreira Guiné R de P. Bioactive phenolic compounds: Extraction procedures and methods of analysis. En: Garde-Cerdán T, Gonzalo-Diago A, Pérez-Álvarez EP, editores. *Phenolic Compounds Types, effects and research*. Nova Science Publishers; 2017. p. 57–89.
28. Masyita A, Mustika Sari R, Dwi Astuti A, Yasir B, Rahma Rumata N, Emran T Bin, et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X*. marzo de 2022;13.
29. Qin Y, Zhang Y, Zhang S, Wu T. Induction of callus and establishment of cell suspension and effects on tea polyphenols in the cell suspension system of tea plants by PGRs. *Sci Hortic*. febrero de 2023;310.
30. Coqueiro A, Verpoorte R. Alkaloids—Liquid Chromatography. En: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier; 2019.
31. Zhang YQ, Zhang M, Wang ZL, Qiao X, Ye M. Advances in plant-derived C-glycosides: Phytochemistry, bioactivities, and biotechnological production. *Biotechnol Adv*. noviembre de 2022;60.

32. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. abril de 2011;72(6):435–57.
33. Dumancas GG, Viswanath L, Wang R, Gondek E, Lageshetty SK, Solivio B, et al. Quinone. En: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier; 2022.
34. Silva TL, de Azevedo M de LSG, Ferreira FR, Santos DC, Amatore C, Goulart MOF. Quinone-based molecular electrochemistry and their contributions to medicinal chemistry: A look at the present and future. *Curr Opin Electrochem*. diciembre de 2020;24:79–87.
35. Rodríguez-Arce E, Saldías M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. noviembre de 2021;143:112236.
36. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. el 22 de diciembre de 2014;6(12):6020–47.
37. Graßmann J. Terpenoids as plant antioxidants. En 2005. p. 505–35.
38. Slámová K, Kapešová J, Valentová K. “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-Catalyzed Modifications. *Int J Mol Sci*. el 21 de julio de 2018;19(7):2126.
39. de Souza RFV, De Giovanni WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*. el 19 de abril de 2004;9(2):97–104.
40. de Melo LFM, Martins VG de QA, da Silva AP, Rocha HA de O, Scortecci KC. Biological and pharmacological aspects of tannins and potential biotechnological applications. *Food Chem*. febrero de 2023;135645.

41. Adamczyk B, Simon J, Kitunen V, Adamczyk S, Smolander A. Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes: old paradigms versus recent advances. *ChemistryOpen*. el 16 de octubre de 2017;6(5):610–4.
42. Sirin S, Nigdelioglu Dolanbay S, Aslim B. Role of plant derived alkaloids as antioxidant agents for neurodegenerative diseases. *Health Sciences Review*. marzo de 2023;6:100071.
43. Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *Int J Biol Macromol*. abril de 2023;233:123470.
44. Lima MC, Paiva de Sousa C, Fernandez-Prada C, Harel J, Dubreuil JD, de Souza EL. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microb Pathog*. mayo de 2019;130:259–70.
45. Ogodo AC, Sandeep Veda Narayana MS, Vardhan PS, Gupta RK, Gautam AK, Egbuna C, et al. Principles of applied microbiology and biotechnology: Technique for the screening of antimicrobial herbs. En: Egbuna C, Mishra AP, Goyal MR, editores. *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*. Elsevier; 2021. p. 185–214.
46. Zhou X, Zeng M, Huang F, Qin G, Song Z, Liu F. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect. *Appl Microbiol Biotechnol*. el 5 de julio de 2023;107(14):4471–92.
47. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents*. noviembre de 2014;44(5):377–86.
48. Won TH, Jeon J eun, Lee SH, Rho BJ, Oh KB, Shin J. Beta-carboline alkaloids derived from the ascidian *Synoicum* sp. *Bioorg Med Chem*. julio de 2012;20(13):4082–7.

49. Sharma RK, Micali M, Rana BK, Pellerito A, Singla RK. Indian herbal extracts as antimicrobial agents. En: Indian Herbal Medicines. Springer; 2021. p. 31–40.
50. Mssillou I, Bakour M, Slighoua M, Laaroussi H, Saghrouchni H, Ez-Zahra Amrati F, et al. Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review. J Ethnopharmacol. noviembre de 2022;298:115663.
51. Romo-Rico J, Krishna SM, Bazaka K, Golledge J, Jacob M V. Potential of plant secondary metabolite-based polymers to enhance wound healing. Acta Biomater. julio de 2022;147:34–49.
52. Álvarez-Santos N, García-Bores AM, Barrera-Oviedo D, Hernández-Delgado CT, Estrella-Parra EA, Avila-Acevedo JG. Secondary metabolites in wound healing: a review of their mechanisms of action. En 2023. p. 403–40.
53. Acharjee S, Kumar R, Kumar N. Role of plant biotechnology in enhancement of alkaloid production from cell culture system of *Catharanthus roseus*: A medicinal plant with potent anti-tumor properties. Ind Crops Prod. febrero de 2022;176.
54. Sulaiman MB, Adamu AM, Ali SB, Ezenobi UV, Gimba AM, Akinlotan OO, et al. Heavy metal contamination in medicinal plants: assessing carcinogenic and non-carcinogenic health risks. Discover Environment. el 22 de febrero de 2024;2(1):11.
55. George EF. Plant tissue culture procedure - Background. En: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editores. Plant Propagation by Tissue Culture. 3a ed. Dordrecht, Países Bajos: Springer; 2008. p. 1–28.
56. Iftikhar R. Recent advances in plant *in vitro* culture. Canadá: Delve Publishing; 2019.
57. Smith RH. Media components and preparation. En: Plant Tissue Culture. Elsevier; 2013. p. 31–43.

58. Ramawat KG. An introduction to the process of cell, tissue and organ differentiation, and production of secondary metabolites. En: Ramawat KG, Ekiert HM, Goyal S, editores. Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Springer; 2021. p. 1–22.
59. Sehgal H, Joshi M. The journey and new breakthroughs of plant growth regulators in tissue culture. En: Advances in Plant Tissue Culture. Elsevier; 2022. p. 85–108.
60. Sudheer WN, Praveen N, Al-Khayri JM, Jain SM. Role of plant tissue culture medium components. En: Advances in Plant Tissue Culture. Elsevier; 2022. p. 51–83.
61. Smith RH. Callus induction. En: Plant Tissue Culture. 3a ed. Elsevier; 2013. p. 63–79.
62. Cabañas-García E, Areche C, Gómez-Aguirre YA, Borquez J, Muñoz R, Cruz-Sosa F, et al. Biomass production and secondary metabolite identification in callus cultures of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose (Cactaceae), a traditional medicinal plant. South African Journal of Botany. marzo de 2021;137:1–9.
63. Guimarães Sobrinho AC, Silva Corpes R, Portilho dos Santos KI, Menezes Barra IM, Kiyoshi Miyagawa H, Silva Santos A. Untargeted GC-MS metabolomics applied to wild leaves and callus produced by plant tissue culture of *Hibiscus sabdariffa* L. Arabian Journal of Chemistry. septiembre de 2022;15(9).
64. Budzianowski J, Romaniuk-Drapała A, Kikowska M, Budzianowska A, Thiem B, Lisiak N, et al. Rosmarinic acid 4'-O- β -glucoside – A compound with prospective medicinal and cosmetological applications - its isolation from callus and root cultures of *Eryngium* species and biological activity. Ind Crops Prod. marzo de 2023;193.
65. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. Engineering. febrero de 2019;5(1):50–9.

66. Pérez-González MZ, Gutiérrez-Rebolledo GA, Jiménez-Arellanes MA, Cruz-Sosa F. The chemical constituents and biological activities of *Cnidocolus chayamansa* McVaugh, a Mexican medicinal species, and plant cell cultures for the production of bioactive secondary metabolites. En: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry Bioactive Natural Products*. Elsevier; 2021. p. 317–46.
67. Andi SA, Gholami M, Ford CM, Maskani F. The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *J Photochem Photobiol B*. octubre de 2019;199.
68. Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *J Chromatogr A*. enero de 2021;1635:461770.
69. Jha AK, Sit N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends Food Sci Technol*. enero de 2022;119:579–91.
70. Patnala S, Kanfer I. Quality control, extraction methods, and standardization: Interface between traditional use and scientific investigation. En: *Herbal Medicine in Andrology*. Elsevier; 2021. p. 175–87.
71. Argueta A, Gallardo MC. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. 1a ed. Argueta A, Cano L, editores. México: Instituto Nacional Indigenista; 1994.
72. Vibrans H. *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. 2009. *Malezas de México*.
73. Missouri Botanical Garden. *Tropicos.org* [Internet]. 2024 [citado el 4 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/name/2700697>

74. Royal Botanic Gardens Kew. Plants of the World Online. [citado el 4 de junio de 2024]. *Erigeron canadensis* L. Disponible en: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:203653-1>
75. Palma-Bautista C, Cruz-Hipólito HE, Alcántara-de la Cruz R, Vázquez-García JG, Yannicari M, De Prado R. Comparison of premix glyphosate and 2,4-D formulation and direct tank mixture for control of *Conyza canadensis* and *Epilobium ciliatum*. Environmental Pollution. julio de 2021;281:117013.
76. Wang C, Cheng H, Wu B, Jiang K, Wang S, Wei M, et al. The functional diversity of native ecosystems increases during the major invasion by the invasive alien species, *Conyza canadensis*. Ecol Eng. enero de 2021;159:106093.
77. Calderón G, Rzedowski J. Flora fanerogámica del Valle de México. México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2001. 826–827 p.
78. McVaugh R. Compositae. En: Flora Novo-Galiciana A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan; 1984.
79. Nawaz H, Hanif MA, Rehman R, Kowalski R. Horseweed. En: Medicinal plants of South Asia Novel sources for drug discovery. Amsterdam, Holanda: Elsevier; 2020. p. 393–405.
80. Yan MM, Li TY, Zhao DQ, Shao S, Bi SN. A new derivative of triterpene with anti-melanoma B16 activity from *Conyza canadensis*. Chinese Chemical Letters. julio de 2010;21(7):834–7.
81. Djurdjević L, Gajić G, Kostić O, Jarić S, Pavlović M, Mitrović M, et al. Seasonal dynamics of allelopathically significant phenolic compounds in globally successful invader *Conyza*

- canadensis* L. plants and associated sandy soil. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. noviembre de 2012;207(11):812–20.
82. Luo D, Bai Z, Bai H, Liu N, Han J, Ma C, et al. A first-in-class dimethyl 2-acetamido terephthalate inhibitor targeting *Conyza canadensis* SHMT1 with a novel herbicidal mode-of-action. *J Adv Res*. octubre de 2023;
 83. Soós V, Jóri B, Páldi E, Szegő D, Szigeti Z, Rácz I, et al. Ferritin2 gene in paraquat-susceptible and resistant biotypes of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *J Plant Physiol*. septiembre de 2006;163(9):979–82.
 84. Dinelli G, Marotti I, Bonetti A, Minelli M, Catizone P, Barnes J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pestic Biochem Physiol*. septiembre de 2006;86(1):30–41.
 85. Dauer JT, Mortensen DA, Luschei EC, Isard SA, Shields E, Van-Gessel MJ. *Conyza canadensis* seed ascent in the lower atmosphere. *Agric For Meteorol*. marzo de 2009;149(3–4):526–34.
 86. Zaplata MK, Winter S, Biemelt D, Fischer A. Immediate shift towards source dynamics: The pioneer species *Conyza canadensis* in an initial ecosystem. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. noviembre de 2011;206(11):928–34.
 87. Yan H, Feng L, Zhao Y, Feng L, Zhu C, Qu Y, et al. Predicting the potential distribution of an invasive species, *Erigeron canadensis* L., in China with a maximum entropy model. *Glob Ecol Conserv*. marzo de 2020;21:e00822.
 88. Wang C, Cheng H, Wei M, Wang S, Wu B, Du D. Plant height and leaf size: Which one is more important in affecting the successful invasion of *Solidago canadensis* and *Conyza canadensis* in urban ecosystems? *Urban For Urban Green*. abril de 2021;59:127033.

89. Djurdjević L, Mitrović M, Gajić G, Jarić S, Kostić O, Oberan L, et al. An allelopathic investigation of the domination of the introduced invasive *Conyza canadensis* L. Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. noviembre de 2011;206(11):921–7.
90. Song X ling, Wu J jun, Zhang H jun, Qiang S. Occurrence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) population in China. Agric Sci China. julio de 2011;10(7):1049–55.
91. González-Torralva F, Rojano-Delgado AM, Luque de Castro MD, Mülleder N, De Prado R. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. J Plant Physiol. noviembre de 2012;169(17):1673–9.
92. Norsworthy JK, McClelland M, Griffith GM. *Conyza canadensis* (L.) Cronquist response to pre-plant application of residual herbicides in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Crop Protection. enero de 2009;28(1):62–7.
93. Jóri B, Soós V, Szegő D, Páldi E, Szigeti Z, Rácz I, et al. Role of transporters in paraquat resistance of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Pestic Biochem Physiol. mayo de 2007;88(1):57–65.
94. Váradi G, Darkó É, Pölös E, Szigeti Z, Lehoczki E. Xanthophyll cycle patterns and in vivo photoinhibition in herbicide-resistant biotypes of *Conyza canadensis*. J Plant Physiol. noviembre de 1994;144(6):669–74.
95. Szigeti Z, Darkó É, Nagy E, Lehoczki E. Diquat resistance of different paraquat resistant *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. J Plant Physiol. noviembre de 1994;144(6):686–90.

96. Turcsányi E, Surányi G, Lehoczki E, Borbély G. Superoxide dismutase activity in response to paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. J Plant Physiol. octubre de 1994;144(4–5):599–606.
97. Lehoczki E, Pölös E, Laskay G, Farkas T. Chemical compositions and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in *Conyza canadensis* L. Plant Science. diciembre de 1985;42(1):19–24.
98. Pölös E, Mikulás J, Szigeti Z, Matkovics B, Do Quy Hai, Párducz Á, et al. Paraquat and atrazine co-resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Pestic Biochem Physiol. febrero de 1988;30(2):142–54.
99. Pölös E, Szigeti Z, Váradi Gy, Lehoczki E. Diquat resistance in paraquat/atrazine coresistant *Conyza canadensis*. En: Herbicide Resistance in Weeds and Crops. Elsevier; 1991. p. 468–9.
100. Szigeti Z, Richter P, Lichtenthaler HK. Fluorescence emission spectra of paraquat resistant *Conyza canadensis* during the chlorophyll fluorescence induction as determined by the CCD-OMA system. J Plant Physiol. enero de 1996;148(5):574–8.
101. Yamasue Y, Kamiyama K, Hanioka Y, Kusanagi T. Paraquat resistance and its inheritance in seed germination of the foliar-resistant biotypes of *Erigeron canadensis* L. and *E. sumatrensis* Retz. Pestic Biochem Physiol. septiembre de 1992;44(1):21–7.
102. Turcsányi E, Darkó É, Borbély G, Lehoczki E. The activity of oxyradical-detoxifying enzymes is not correlated with paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Pestic Biochem Physiol. junio de 1998;60(1):1–11.
103. d’Avignon DA, Ge X. *In vivo* NMR investigations of glyphosate influences on plant metabolism. Journal of Magnetic Resonance. julio de 2018;292:59–72.

104. Yu Y, Zhong S, Xu Z, Xu Z, Wang C, Du D. Does the salt stress intensify the independent allelopathy and the co-allelopathy of *Solidago canadensis* L. and *Conyza canadensis* (L.) Cronq.? South African Journal of Botany. febrero de 2023;153:37–45.
105. Mei Y, Xu Y, Wang S, Qiu L, Zheng M. Investigation of glyphosate resistance levels and target-site based resistance (TSR) mechanisms in *Conyza canadensis* (L.) from apple orchards around areas of Bohai seas and Loess Plateau in China. Pestic Biochem Physiol. abril de 2018;146:7–12.
106. Mora DA, Cheimona N, Palma-Bautista C, Rojano-Delgado AM, Osuna-Ruiz MD, Alcántara de la Cruz R, et al. Physiological, biochemical and molecular bases of resistance to tribenuron-methyl and glyphosate in *Conyza canadensis* from olive groves in southern Spain. Plant Physiology and Biochemistry. noviembre de 2019;144:14–21.
107. Arán D, García-Duro J, Reyes O, Casal M. Fire and invasive species: Modifications in the germination potential of *Acacia melanoxylon*, *Conyza canadensis* and *Eucalyptus globulus*. For Ecol Manage. agosto de 2013;302:7–13.
108. Leroux GD, Benoît DL, Banville S. Effect of crop rotations on weed control, *Bidens cernua* and *Erigeron canadensis* populations, and carrot yields in organic soils. Crop Protection. marzo de 1996;15(2):171–8.
109. Zhang HY, Goncalves P, Copeland E, Qi SS, Dai ZC, Li GL, et al. Invasion by the weed *Conyza canadensis* alters soil nutrient supply and shifts microbiota structure. Soil Biol Biochem. abril de 2020;143:107739.
110. Yang JX, Peng Y, He WM. Organic and inorganic phosphorus differentially influence invasive forbs. Flora. febrero de 2020;263:151532.

111. Řezáčová V, Řezáč M, Gryndler M, Hršelová H, Gryndlerová H, Michalová T. Plant invasion alters community structure and decreases diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied Soil Ecology*. noviembre de 2021;167:104039.
112. Duarte LL, Santos FMC, Barreto RW. Mycobiota of the weed *Conyza canadensis* (Asteraceae) in Brazil. *Fungal Biol*. septiembre de 2016;120(9):1118–34.
113. Todero I, Confortin TC, Luft L, Brun T, Ugalde GA, de Almeida TC, et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. *Sci Hortic*. noviembre de 2018;241:285–92.
114. Yu S, Sheng L, Mao H, Huang X, Luo L, Li Y. Physiological response of *Conyza canadensis* to cadmium stress monitored by Fourier transform infrared spectroscopy and cadmium accumulation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. marzo de 2020;229:118007.
115. Wei S, Zhou Q, Saha UK, Xiao H, Hu Y, Ren L, et al. Identification of a Cd accumulator *Conyza canadensis*. *J Hazard Mater*. abril de 2009;163(1):32–5.
116. Wang Q, Wang B, Ma Y, Zhang X, Lyu W, Chen M. Stabilization of heavy metals in biochar derived from plants in antimony mining area and its environmental implications. *Environmental Pollution*. mayo de 2022;300:118902.
117. Lu Y, Wang Y, Wu B, Wang S, Wei M, Du D, et al. Allelopathy of three Compositae invasive alien species on indigenous *Lactuca sativa* L. enhanced under Cu and Pb pollution. *Sci Hortic*. junio de 2020;267:109323.
118. Jalali J, Gaudin P, Capiiaux H, Ammar E, Lebeau T. Fate and transport of metal trace elements from phosphogypsum piles in Tunisia and their impact on soil bacteria and wild plants. *Ecotoxicol Environ Saf*. junio de 2019;174:12–25.

119. Dede G, Ozdemir S. Effects of elemental sulphur on heavy metal uptake by plants growing on municipal sewage sludge. *J Environ Manage.* enero de 2016;166:103–8.
120. Lenfeld J, Motl O, Trka A. Anti-inflammatory activity of extracts from *Conyza canadensis*. *Pharmazie.* 1986;41(4):268–9.
121. Hrutfiord BF, Hatheway WH, Smith DB. Essential oil of *Conyza canadensis*. *Phytochemistry* [Internet]. enero de 1988;27(6):1858–60. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942288804618>
122. Czeczot H, Tudek B, Kuzstelak J, Szymczyk T, Dobrowolska B, Glinkowska G, et al. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutation Research/Genetic Toxicology.* marzo de 1990;240(3):209–16.
123. Mukhtar N, Iqbal K, Anis I, Malik A. Sphingolipids from *Conyza canadensis*. *Phytochemistry.* diciembre de 2002;61(8):1005–8.
124. Curini M, Bianchi A, Epifano F, Bruni R, Torta L, Zambonelli A. Composition and *in vitro* antifungal activity of essential oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. *Chem Nat Compd.* 2003;39(2):191–4.
125. Olas B, Saluk-Juszczak J, Pawlaczyk I, Nowak P, Kolodziejczyk J, Gancarz R, et al. Antioxidant and antiaggregatory effects of an extract from *Conyza canadensis* on blood platelets *in vitro*. *Platelets.* el 7 de enero de 2006;17(6):354–60.
126. Réthy B, Csupor-Löffler B, Zupkó I, Hajdú Z, Máthé I, Hohmann J, et al. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phytotherapy Research.* el 27 de diciembre de 2007;21(12):1200–8.

127. Saluk-Juszczak J, Olas B, Pawlaczyk I, Gancarz R, Wachowicz B. Effects of the extract from *Conyza canadensis* on human blood platelet aggregation. *General Physiology Biophysics*. 2007;26(2):150–2.
128. Choi HJ, Wang HY, Kim YN, Heo SJ, Kim NK, Jeong MS, et al. Composition and cytotoxicity of essential oil extracted by steam distillation from Horseweed (*Erigeron canadensis* L.) in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2008;51(1):55–9.
129. Hong ES, Nguyen DTM, Nguyen DH, Kim EK. Inhibition of melanogenesis by *Erigeron canadensis* via down-regulating melanogenic enzymes in B16F10 melanoma cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2008;25(6):1463–6.
130. Saluk-Juszczak J, Olas B, Nowak P, Wachowicz B, Bald E, Głowacki R, et al. Extract from *Conyza canadensis* as a modulator of plasma protein oxidation induced by peroxy nitrite *in vitro*. *Open Life Sci*. el 1 de diciembre de 2010;5(6):800–7.
131. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Zupkó I, Molnár J, Forgo P, Vasas A, et al. Antiproliferative constituents of the roots of *Conyza canadensis*. *Planta Med*. el 3 de julio de 2011;77(11):1183–8.
132. Hayet LE, Gutman L, Aouni M, Maha M. Antiviral activity of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist extracts grown in Tunisia. *Afr J Biotechnol*. el 17 de agosto de 2011;10(45):9097–100.
133. Liu BL, Wang GC, Liu HL, Dai Y, Ye WC, Li YL. Pyromeconic acid derivatives from *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Chinese Chemical Letters*. junio de 2011;22(6):694–6.
134. Pawlaczyk I, Czerchawski L, Kuliczkowski W, Karolko B, Pilecki W, Witkiewicz W, et al. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated

- from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. Thromb Res. abril de 2011;127(4):328–40.
135. Shakirullah M, Ahmad H, Shah MR, Ahmad I, Ishaq M, Khan N, et al. Antimicrobial activities of Conyzolide and Conyzoflavone from *Conyza canadensis*. J Enzyme Inhib Med Chem. el 1 de agosto de 2011;26(4):468–71.
 136. Shah NZ, Khan MA, Muhammad N, Azeem S. Antimicrobial and phytotoxic study of *Conyza canadensis*. Middle-East Journal of Medicinal Plants Research. 2012;1(3):63–7.
 137. Shah NZ, Muhammad N, Azeem S, Rauf A. Studies on the chemical constituents and antioxidant profile of *Conyza canadensis*. Middle-East Journal of Medicinal Plants Research. 2012;1(2):32–5.
 138. Veres K, Csupor-Löffler B, Lázár A, Hohmann J. Antifungal activity and composition of essential oils of *Conyza canadensis* herbs and roots. The Scientific World Journal. 2012;2012:1–5.
 139. Park WS, Bae JY, Chun MS, Chung HJ, Han SY, Ahn MJ. Suppression of gastric ulcer in mice by administration of *Erigeron canadensis* extract. Proceedings of the Nutrition Society. el 30 de agosto de 2013;72(OCE4):E263.
 140. Biswas K, Sinha SN. Evaluation of antibacterial activity of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist collected from Nainital, Uttarakhand, India. International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences . 2014;3(1):46–53.
 141. Sung J, Sung M, Kim Y, Ham H, Jeong HS, Lee J. Anti-inflammatory effect of methanol extract from *Erigeron Canadensis* L. may be involved with upregulation of heme oxygenase-1 expression and suppression of NFκB and MAPKs activation in macrophages. Nutr Res Pract. 2014;8(4):352.

142. Liu K, Qin YH, Yu JY, Ma H, Song XL. 3- β -Erythrodiol isolated from *Conyza canadensis* inhibits MKN-45 human gastric cancer cell proliferation by inducing apoptosis, cell cycle arrest, DNA fragmentation, ROS generation and reduces tumor weight and volume in mouse xenograft model. *Oncol Rep.* abril de 2016;35(4):2328–38.
143. Ali J, Irshad R, Li B, Tahir K, Ahmad A, Shakeel M, et al. Synthesis and characterization of phytochemical fabricated zinc oxide nanoparticles with enhanced antibacterial and catalytic applications. *J Photochem Photobiol B.* junio de 2018;183:349–56.
144. Aslam H, Khan A ullah, Naureen H, Ali F, Ullah F, Sadiq A. Potential application of *Conyza canadensis* (L) Cronquist in the management of diabetes: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* el 8 de agosto de 2018;17(7):1287.
145. Azeem M, Zaman T, Tahir M, Haris A, Iqbal Z, Binyameen M, et al. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. *Ind Crops Prod.* noviembre de 2019;140:111609.
146. Szejka-Arendt M, Czubak-Prowizor K, Macieja A, Poplawski T, Olejnik AK, Pawlaczyk-Graja I, et al. Polyphenolic-polysaccharide conjugates from medicinal plants of Rosaceae/Asteraceae family protect human lymphocytes but not myeloid leukemia K562 cells against radiation-induced death. *Int J Biol Macromol.* agosto de 2020;156:1445–54.
147. Azeem M, Zaman T, Abbasi AM, Abid M, Mozūratīs R, Alwahibi MS, et al. Pesticidal potential of some wild plant essential oils against grain pests *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) and *Aspergillus flavus* (Link, 1809). *Arabian Journal of Chemistry.* enero de 2022;15(1):103482.
148. El-Akhal J, Oliveira AP, Bencheikh R, Valentão P, Andrade PB, Morato M. Vasorelaxant mechanism of herbal extracts from *Mentha suaveolens*, *Conyza canadensis*, *Teucrium*

- polium* and *Salvia verbenaca* in the aorta of Wistar rats. *Molecules*. el 9 de diciembre de 2022;27(24):8752.
149. Paulovičová E, Paulovičová L, Pawlaczyk-Graja I, Gancarz R, Kopáčová M, Capek P. Effectivity of polyphenolic polysaccharide-proteins isolated from medicinal plants as potential cellular immune response modulators. *Biologia (Bratisl)*. el 16 de agosto de 2022;77(12):3581–93.
150. Polat DÇ, İlğün S, Karatoprak GŞ, Akkol EK, Capasso R. Phytochemical profiles, antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of traditional medicinal plants: *Centaurea pichleri subsp. pichleri*, *Conyza canadensis* and *Jasminum fruticans*. *Molecules*. el 26 de noviembre de 2022;27(23):8249.
151. Šutovská M, Kocmálová M, Mažerik J, Pawlaczyk-Graja I, Gancarz R, Capek P. Chemical characteristics and significant antitussive effect of the *Erigeron canadensis* polyphenolic polysaccharide-protein complex. *J Ethnopharmacol*. febrero de 2022;284:114754.
152. Phillips GC, Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. el 15 de junio de 2019;55(3):242–57.
153. Soto MC. Establecimiento de cultivos celulares de *Conyza filaginoides* para la producción de metabolitos secundarios bioactivos. [Ciudad de México]: Universidad Autónoma de México Unidad Iztapalapa; 2020.
154. Winson KWS, Chew BL, Sathasivam K, Subramaniam S. The establishment of callus and cell suspension cultures of *Hylocereus costaricensis* for the production of betalain pigments with antioxidant potential. *Ind Crops Prod*. noviembre de 2020;155:112750.
155. Salehi M, Moieni A, Safaie N. A novel medium for enhancing callus growth of hazel (*Corylus avellana* L.). *Sci Rep*. el 15 de noviembre de 2017;7(1):15598.

156. Thapa CB, Bhattarai HD, Pant KK, Pant B. Comparative antioxidant, antibacterial, and antidiabetic activities of *in vitro*-grown callus and wild-grown various parts of *Piper longum* L. *Phytomedicine Plus*. agosto de 2024;4(3):100586.
157. Flores-Morales V, Castañeda-Hernández O, Montiel-Santillán T, Hernández-Delgadillo GP. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus* una especies endémica de México. *Investig Cienc*. 2014;22(63):18–23.
158. Domínguez-Villegas V, Domínguez-Villegas V, García ML, Calpena A, Clares-Naveros B, Garduño-Ramírez ML. Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxicity activities of methanolic extract and prenylated flavanones isolated from leaves of *Eysehardtia platycarpa*. *Nat Prod Commun*. 2013;8(2).
159. Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. agosto de 2009;27(7):406–11.
160. Wang Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*. el 19 de mayo de 2015;6(4):307–8.
161. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. 2009;
162. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30a ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
163. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. junio de 2009;72(2):370–7.
164. Valencia-Gómez LE, Martel-Estrada SA, Vargas-Requena CL, Acevedo-Fernández JJ, Rodríguez-González CA, Hernández-Paz JF, et al. Characterization and evaluation of a

- novel O-carboxymethyl chitosan films with *Mimosa tenuiflora* extract for skin regeneration and wound healing. *J Bioact Compat Polym.* el 13 de enero de 2020;35(1):39–56.
165. Lallana VH, García LF. Efecto de pretratamientos en la prueba de viabilidad de semillas de *Trichocentrum jonesianum* (Orchidaceae). *Investigación agraria.* 2013;15(2):129–32.
166. Billard CE, Dalzotto CA, Lallna VH. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. *Polibotanica.* 2014;(38):145–57.
167. Yildiz M, Er C. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften.* el 1 de junio de 2002;89(6):259–61.
168. Restrepo R, Ortiz MC, Reyes D. Pruebas de ecotoxicidad para establecer el potencial genotóxico del hipoclorito de sodio, mediante bulbos de cebolla *Allium cepa* L y semillas de lechuga *Lactuca sativa* L como bioindicadores. *ITECKNE.* 2011;8(1):7–14.
169. García AI, Jiménez-Alfaro B, Fernández E. Implicaciones de la viabilidad y germinación de semillas en la conservación de *Aster pyrenaicus* Desf. ex DC. (Asteraceae). *Actes del IX Coloquio Internacional de Botánica Pirenaico-cantábrica a Ordino, Andorra.* 2011;147–54.
170. Merino Manzanares ME. Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas. En: Hurtado D V, Merino ME, editores. *Cultivo de tejidos vegetales.* México: Trillas; 2014. p. 44–7.
171. Ciocan AG, Mitoi EM, Helepciuc FE, Neguț D, Moldovan RC, Petrache AM, et al. Is acute low-dose gamma irradiation an effective elicitor for secondary metabolism in *Leontopodium alpinum* (Cass.) callus culture? *Ind Crops Prod.* julio de 2023;197:116547.

172. Misyri V, Tsekouras V, Iliopoulos V, Mavrikou S, Evergetis E, Moschopoulou G, et al. Farm or lab? Chamazulene content of *Artemisia arborescens* (Vill.) L. essential oil and callus volatile metabolites isolate. *Ind Crops Prod.* febrero de 2021;160:113114.
173. Montero-Carmona W, Jiménez VM. Floración in vitro - revisión de literatura. *Biotechnol Veg.* 2009;9(1):3–18.
174. Chóez-Guaranda I, García J, Sánchez C, Pesantes C, Flores J, Manzano P. Identification of lupeol produced by *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaf callus culture. *Nat Prod Res.* el 1 de febrero de 2021;35(3):503–7.
175. Gharari Z, Hanachi P, Sadeghinia H, Walker TR. *Cichorium intybus* bio-callus synthesized silver nanoparticles: A promising antioxidant, antibacterial and anticancer compound. *Int J Pharm.* septiembre de 2022;625:122062.
176. Kothari SL, Chandra N. Adventitious shoot production from stem internode and callus cultures of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. *J Plant Physiol.* julio de 1986;124(5):409–12.
177. Sánchez-Ramos M, Berman-Bahena S, Alvarez L, Sánchez-Carranza JN, Bernabé-Antonio A, Román-Guerrero A, et al. Effect of plant growth regulators on different explants of *Artemisia ludoviciana* under photoperiod and darkness conditions and their influence on achillin production. *Processes.* el 23 de julio de 2022;10(8):1439.
178. Lee DJ, Senseman SA, Sciumbato AS, Jung SC, Krutz LJ. The effect of titanium dioxide alumina beads on the photocatalytic degradation of picloram in water. *J Agric Food Chem.* el 1 de abril de 2003;51(9):2659–64.
179. Rakesh B, Srinatha N, Rudresh Kumar KJ, Madhu A, Suresh Kumar MR, Praveen N. Antibacterial activity and spectroscopic characteristics of silver nanoparticles synthesized

- via plant and *in vitro* leaf-derived callus extracts of *Mucuna pruriens* (L.) DC. South African Journal of Botany. agosto de 2022;148:251–8.
180. Gantait S, Mahanta M. Picloram-induced enhanced callus-mediated regeneration, acclimatization, and genetic clonality assessment of gerbera. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. diciembre de 2021;19(1):175.
181. Partap M, Kumar P, Kumar P, Pal PK, Kumar D, Warghat AR, et al. Fruit derived callus and cell suspension culture as promising alternative sources for mogrosides production in *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey: a zero-caloric natural sweetener. Journal of Food Composition and Analysis. mayo de 2022;108:104450.
182. Sharif Hossain ABM, Haq I, Ibrahim NA, Aleissa MS. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP in vitro culture: Its biochemical and antioxidant properties. Data Brief. marzo de 2016;6:214–20.
183. Ahmad N, Rab A, Ahmad N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). J Photochem Photobiol B. enero de 2016;154:51–6.
184. Tariq U, Ali M, Abbasi BH. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. J Photochem Photobiol B. enero de 2014;130:264–71.
185. Lucchesini M, Bertoli A, Mensuali-Sodi A, Pistelli L. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. Sci Hortic. octubre de 2009;122(3):484–90.

186. Shah D, Sajjad N, Ali R, Nazir N, Hassan S, Shah S. Sugar regulates plant growth and development under *in vitro* conditions. En: Plant Signaling Molecules. Elsevier; 2019. p. 257–68.
187. Sharma P, Kapoor N, Dhiman S, Kour J, Singh AD, Sharma A, et al. Role of sugars in regulating physiological and molecular aspects of plants under abiotic stress. En: The Role of Growth Regulators and Phytohormones in Overcoming Environmental Stress. Elsevier; 2023. p. 355–74.
188. Khan T, Abbasi BH, Zeb A, Shad Ali G. Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. Ind Crops Prod. diciembre de 2018;126:168–76.
189. Park YG, Kim SJ, Kang YM, Jung HY, Prasad DT, Kim SW, et al. Production of ginkgolides and bilobalide from optimized the *Ginkgo biloba* cell culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering. febrero de 2004;9(1):41–6.
190. Wahyuni DK, Huda A, Faizah S, Purnobasuki H, Wardoyo BPE. Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm.f. Biotechnology Reports. septiembre de 2020;27:e00473.
191. Tilkat E, Süzerer V, Asan HS, Ertaş A, Yılmaz MA, Demir E, et al. Enhanced production of anticancer triterpenoids in optimized *Pistacia lentiscus* L. callus cultures via methyl jasmonate and silver nitrate elicitation. South African Journal of Botany. diciembre de 2023;163:65–74.

192. Cravotto C, Fabiano-Tixier AS, Claux O, Abert-Vian M, Tabasso S, Cravotto G, et al. Towards substitution of hexane as extraction solvent of food products and ingredients with no regrets. *Foods*. el 28 de octubre de 2022;11(21):3412.
193. Baltés MRH, Dubois JG, Hanocq M. Ethyl acetate extraction procedure and isocratic high-performance liquid chromatographic assay for testosterone metabolites in cell microsomes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. marzo de 1998;706(2):201–7.
194. Asmah N, Suniarti D, Margono A, Mas'ud Za, Bachtiar E. Identification of active compounds in ethyl acetate, chloroform, and N-hexane extracts from peels of *Citrus aurantifolia* from Maribaya, West Java, Indonesia. *J Adv Pharm Technol Res*. 2020;11(3):107.
195. Kumar A, P N, Kumar M, Jose A, Tomer V, Oz E, et al. Major phytochemicals: recent advances in health benefits and extraction method. *Molecules*. el 16 de enero de 2023;28(2):887.
196. Domovs KB, Freund EH. Methanol-soluble complexes of lactose and of other carbohydrates. *J Dairy Sci*. septiembre de 1960;43(9):1216–23.
197. Shellie RA, Heng WS. Gas Chromatography. En: *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Third Edition. Elsevier; 2023. p. 1–9.
198. Hopfer H. Gas Chromatography. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier; 2022. p. 382–90.
199. Rajab M, Cantrell C, Franzblau S, Fischer N. Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: A preliminary structure-activity study. *Planta Med*. el 4 de febrero de 1998;64(01):2–4.

200. Narjara G, Pozzatti P, Rigatti F, Hörner R, Hartz S, Augusto C, et al. Antimicrobial evaluation of sesquiterpene α -curcumene and its synergism with imipenem. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. el 1 de abril de 2015;4(5):434–6.
201. Podlogar JA, Verspohl EJ. Antiinflammatory effects of ginger and some of its components in Human Bronchial Epithelial (BEAS-2B) Cells. *Phytotherapy Research*. el 23 de marzo de 2012;26(3):333–6.
202. Nishikawa K, Aburai N, Yamada K, Koshino H, Tsuchiya E, Kimura K ichi. The bisabolane sesquiterpenoid endoperoxide, 3,6-Epidioxy-1,10-bisaboladiene, isolated from *Cacalia delphiniifolia* inhibits the growth of human cancer cells and induces apoptosis. *Biosci Biotechnol Biochem*. el 23 de septiembre de 2008;72(9):2463–6.
203. Le TB, Beaufay C, Nghiem DT, Pham TA, Mingeot-Leclercq MP, Quetin-Leclercq J. Evaluation of the anti-trypanosomal activity of Vietnamese essential oils, with emphasis on *Curcuma longa* L. and its components. *Molecules*. el 23 de marzo de 2019;24(6):1158.
204. Samarasinghe WMP, Ranasinghe C, Jayawardana KH, Somaratne S, Gunaherath GMKB. *In vitro* cell migration enhancing and pro-angiogenic active secondary metabolites from *Jeffreyia zeylanica* (L.) H. Rob., S.C. Keeley & Skvarla (Asteraceae). *Nat Prod Res*. el 17 de noviembre de 2023;37(22):3821–5.
205. Santhosh KH, Krishna V, Kemparaju K, Manjunatha H, Shashi Kumar R, Mukherjee A, et al. β -keto amyirin isolated from *Cryptostegia grandiflora* R. br. inhibits inflammation caused by *Daboia russellii* viper venom: Direct binding of β -keto amyirin to phospholipase A2. *Toxicon*. abril de 2024;241.
206. Cai Z, Liu J, Bian H, Cai J. β -amyirin ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting inflammatory response and oxidative stress in mice. *Pak J Pharm Sci*. 2023;36(2):431–6.

207. da Silva Júnior WF, Bezerra de Menezes DL, de Oliveira LC, Koester LS, Oliveira de Almeida PD, Lima ES, et al. Inclusion complexes of β and HP β -cyclodextrin with α , β amyryn and *in vitro* anti-inflammatory activity. *Biomolecules*. el 21 de junio de 2019;9(6):241.
208. Cimanga RK, Nsaka SL, Tshodi ME, Mbamu BM, Kikweta CM, Makila FBM, et al. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of extracts and isolated constituents of *Alstonia congensis* root bark. *J Ethnopharmacol*. octubre de 2019;242.
209. Kim S, Chung W, Kim S, Ko S, Um J. Antiinflammatory effect of *Oldenlandia diffusa* and its constituent, hentriacontane, through suppression of Caspase-1 activation in mouse peritoneal macrophages. *Phytotherapy Research*. el 11 de octubre de 2011;25(10):1537–46.
210. Khajuria V, Gupta S, Sharma N, Kumar A, Lone NA, Khullar M, et al. Anti-inflammatory potential of hentriacontane in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. agosto de 2017;92:175–86.
211. Chen Z, Liu YM, Yang S, Song BA, Xu GF, Bhadury PS, et al. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L) Meeb. *Bioorg Med Chem*. el 1 de febrero de 2008;16(3):1337–44.
212. Akande RT, Fouche G, Famuyide IM, Makhubu FN, Nkadimeng SM, Aro AO, et al. Anthelmintic and antimycobacterial activity of fractions and compounds isolated from *Cissampelos mucronata*. *J Ethnopharmacol*. junio de 2022;292:115130.
213. Antwi AO, Obiri DD, Osafo N, Forkuo AD, Essel LB. Stigmasterol inhibits lipopolysaccharide-induced innate immune responses in murine models. *Int Immunopharmacol*. diciembre de 2017;53:105–13.

214. Antwi AO, Obiri DD, Osafo N, Essel LB, Forkuo AD, Atobiga C. Stigmasterol alleviates cutaneous allergic responses in rodents. *Biomed Res Int.* el 24 de julio de 2018;2018:1–13.
215. Ahmad M, Sarwar AHMdG, Rahat R, Ahmed RS, Umar S. Stigmasterol protects rats from collagen induced arthritis by inhibiting proinflammatory cytokines. *Int Immunopharmacol.* agosto de 2020;85.
216. Jie F, Yang X, Yang B, Liu Y, Wu L, Lu B. Stigmasterol attenuates inflammatory response of microglia via NF- κ B and NLRP3 signaling by AMPK activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* septiembre de 2022;153.
217. Feng S, Dai Z, Liu A, Wang H, Chen J, Luo Z, et al. β -sitosterol and stigmasterol ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice fed a high fat western-style diet. *Food Funct.* 2017;8(11):4179–86.
218. Wen S, He L, Zhong Z, Zhao R, Weng S, Mi H, et al. Stigmasterol restores the balance of Treg/Th17 cells by activating the Butyrate-PPAR γ axis in colitis. *Front Immunol.* el 6 de octubre de 2021;12.
219. Zhang J, Zhang C, Miao L, Meng Z, Gu N, Song G. Stigmasterol alleviates allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in asthma mice through inhibiting substance-P receptor. *Pharm Biol.* el 31 de diciembre de 2023;61(1):449–58.
220. Ward MG, Li G, Barbosa-Lorenzi VC, Hao M. Stigmasterol prevents glucolipototoxicity induced defects in glucose-stimulated insulin secretion. *Sci Rep.* el 25 de agosto de 2017;7(1).
221. Ahamed JI, K F, Priya AV, PremaKumari J, Steiny RP, Kamalarajan P, et al. Computational and biological efficacy of stigmasterol against HeLa cells and Vero cells- first time isolated

- from the ethanolic extract of *Annona muricata* Linn leaves. J Mol Struct. marzo de 2022;1252.
222. Khan I, Zahoor M, Zeb A, Sahibzada MUK, Bari WU, Naz S. Isolation, characterization, pharmacological evaluation and in silico modeling of bioactive secondary metabolites from *Ziziphus oxyphylla* a member of Rhamnaceae family. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. el 9 de abril de 2020;19(2):351–9.
223. Pandey P, Bajpai P, Siddiqui MH, Sayyed U, Tiwari R, Shekh R, et al. Elucidation of the chemopreventive role of stigmaterol against Jab1 in Gall Bladder Carcinoma. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. el 3 de septiembre de 2019;19(6):826–37.
224. Kurniasih N, Supriadin A, Harneti D, Abdulah R, Taib MNA bin M, Supratman U. Ergosterol peroxide and stigmaterol from the stem bark of *Aglaia simplicifolia* (Meliaceae) and their cytotoxic against HeLa Cervical Cancer Cell Lines. Jurnal Kimia Valensi. el 9 de junio de 2021;7(1):46–51.
225. Aminu R, Umar IA, Rahman MdA, Ibrahim MA. Stigmaterol retards the proliferation and pathological features of *Trypanosoma congolense* infection in rats and inhibits trypanosomal sialidase *in vitro* and *in silico*. Biomedicine & Pharmacotherapy. mayo de 2017;89:482–9.
226. Ayele TT, Gurmessa GT, Abdissa Z, Kenasa G, Abdissa N. Oleanane and stigmaterol-type triterpenoid derivatives from the stem bark of *Albizia gummifera* and their antibacterial activities. J Chem. el 18 de febrero de 2022;2022:1–7.
227. Palaniyandi T, Sivaji A, Thiruganasambandam R, Natarajan S, Hari R. *In Vitro* antigastric cancer activity of squalene, a triterpenoid compound isolated from *Rhizophora mucronata mangrove* plant leaves against AGS cell line. Pharmacogn Mag. 2018;14(57):369.

228. Sakul A, Ozansoy M, Elibol B, Ayla Ş, Günal MY, Yozgat Y, et al. Squalene attenuates the oxidative stress and activates AKT/mTOR pathway against cisplatin-induced kidney damage in mice. *Turkish Journal of Biology*. el 13 de junio de 2019;43(3):179–88.
229. Widyawati T, Syahputra RA, Syarifah S, Sumantri IB. Analysis of antidiabetic activity of squalene via *in silico* and *in vivo* assay. *Molecules*. el 27 de abril de 2023;28(9):3783.
230. Nachar A, Saleem A, Arnason JT, Haddad PS. Regulation of liver cell glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) a plant of the Eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Phytochemistry*. septiembre de 2015;117:373–9.
231. Neto SF, Prada AL, Achod LDR, Torquato HFV, Lima CS, Paredes-Gamero EJ, et al. α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. julio de 2021;139.
232. Nohong, Soekanto NH, Ahmad A, Sahidin. α -amyrin and β -sitosterol from bark extract of *Rhizophora mucronata* Lamk. and their cytotoxic activities against HELA cell line. *International Research Journal Of Pharmacy*. el 13 de octubre de 2018;9(9):75–9.
233. Lee RHC, Couto e Silva A, Possait HE, Lerner FM, Chen PY, Azizbayeva R, et al. Palmitic acid methyl ester is a novel neuroprotective agent against cardiac arrest. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. agosto de 2019;147:6–14.
234. Shen YJ, Shen YC, Lee WS, Yang KT. Methyl palmitate protects heart against ischemia/reperfusion-induced injury through G-protein coupled receptor 40-mediated activation of the PI3K/AKT pathway. *Eur J Pharmacol*. agosto de 2021;905.

235. Rayar A, Manivannan R. Evaluation of antidiabetic activity of ethyl linoleate isolated from *Decalepis hamiltonii* wight and arn seed. Int Res J Pure Appl Chem. el 10 de enero de 2015;9(2):1–9.
236. Teng H, Fan X, Lv Q, Zhang Q, Xiao J, Qian Y, et al. Folium nelumbinis (*Lotus leaf*) volatile-rich fraction and its mechanisms of action against melanogenesis in B16 cells. Food Chem. noviembre de 2020;330.
237. Ma J, Xu RR, Lu Y, Ren DF, Lu J. Composition, antimicrobial and antioxidant activity of supercritical fluid extract of *Elsholtzia ciliata*. Journal of Essential Oil Bearing Plants. el 4 de marzo de 2018;21(2):556–62.
238. Karmakar E, Das P, Yatham P, Kumar D, Mukhopadhyay S, Roy SS. Seedpod extracts of *Wrightia tinctoria* shows significant anti-inflammatory effects in HepG2 and RAW-264.7 cell lines. Nat Prod Res. el 17 de septiembre de 2023;37(18):3158–62.
239. Osman Widdat Allah M. Phytochemical screening, chemical composition and antioxidant activity of leaves and bark extracts from *Khaya senegalensis*. Adv Biochem. 2018;6(4):32.
240. Kristiani EBE, Nugroho LH, Moeljopawiro S, Widayarni S. Characterization of volatile compounds of *Albertisia papuana* Becc root extracts and cytotoxic activity in breast cancer cell line T47D. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. el 30 de mayo de 2016;15(5):959.
241. Hernández-García E, García A, Garza-González E, Avalos-Alanís FG, Rivas-Galindo VM, Rodríguez-Rodríguez J, et al. Chemical composition of *Acacia farnesiana* (L) wild fruits and its activity against *Mycobacterium tuberculosis* and dysentery bacteria. J Ethnopharmacol. febrero de 2019;230:74–80.

242. Sillapachaiyaporn C, Rangsinth P, Nilkhet S, Ung AT, Chuchawankul S, Tencomnao T. Neuroprotective effects against glutamate-induced HT-22 hippocampal cell damage and *Caenorhabditis elegans* lifespan/healthspan enhancing activity of *Auricularia polytricha* mushroom extracts. *Pharmaceuticals*. el 29 de septiembre de 2021;14(10).
243. Musthafa KS, Sianglum W, Saising J, Lethongkam S, Voravuthikunchai SP. Evaluation of phytochemicals from medicinal plants of Myrtaceae family on virulence factor production by *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. mayo de 2017;125(5):482–90.
244. Basting RT, Abreu PMB de, Sousa IM de O, de Carvalho JE, Carvalho PRN, Foglio MA. *Bixa orellana* L. by-products' fractions from an industrial process: antiproliferative activity on tumor cells and chemical profile. *Nat Prod Res*. el 17 de diciembre de 2021;35(24):6106–11.
245. Horng JS, Smits SE, Wong DT. The binding of the optical isomers of methadone, alpha-methadol, alpha-acetylmethadol and their N-demethylated derivatives to the opiate receptors of rat brain. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* . 1976;14(4):621–9.
246. Alam S, Rashid MA, Sarker MdMR, Emon NU, Arman M, Mohamed IN, et al. Antidiarrheal, antimicrobial and antioxidant potentials of methanol extract of *Colocasia gigantea* Hook. f. leaves: evidenced from *in vivo* and *in vitro* studies along with computer-aided approaches. *BMC Complement Med Ther*. el 12 de diciembre de 2021;21(1):119.
247. Beg MA, Shivangi, Afzal O, Akhtar MS, Altamimi ASA, Hussain A, et al. Potential efficacy of β -amyrin targeting mycobacterial universal stress protein by *in vitro* and *in silico* approach. *Molecules*. el 18 de julio de 2022;27(14):4581.
248. Kumar SB, Krishna S, Pradeep S, Mathews DE, Pattabiraman R, Murahari M, et al. Screening of natural compounds from *Cyperus rotundus* Linn against SARS-CoV-2 main

- protease (Mpro): An integrated computational approach. *Comput Biol Med.* julio de 2021;134:104524.
249. Oyebode O, Erukainure OL, Zuma L, Ibeji CU, Koorbanally NA, Islam MdS. *In vitro* and computational studies of the antioxidant and anti-diabetic properties of *Bridelia ferruginea*. *J Biomol Struct Dyn.* el 13 de junio de 2022;40(9):3989–4003.
250. Mostafa NM. β -amyirin rich *Bombax ceiba* leaf extract with potential neuroprotective activity against scopolamine-induced memory impairment in rats. *Records of Natural Products.* el 5 de mayo de 2018;12(5):480–92.
251. Li H, Ge Y, Luo Z, Zhou Y, Zhang X, Zhang J, et al. Evaluation of the chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of distillate and residue fractions of sweet basil essential oil. *J Food Sci Technol.* el 8 de junio de 2017;54(7):1882–90.
252. Ha TJ, Lee MH, Lee JH. Comparison of antioxidant activities and volatile components using GC/MS from leaves of Korean purple perilla (*Perilla frutescens*) grown in a greenhouse. *Food Sci Biotechnol.* el 31 de diciembre de 2015;24(6):1979–86.
253. Liao H, Zhu D, Bai M, Chen H, Yan S, Yu J, et al. Stigmasterol sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing Nrf2 signal pathway. *Cancer Cell Int.* el 6 de diciembre de 2020;20(1):480.
254. Ayaz M, Sadiq A, Wadood A, Junaid M, Ullah F, Zaman Khan N. Cytotoxicity and molecular docking studies on phytosterols isolated from *Polygonum hydropiper* L. *Steroids.* enero de 2019;141:30–5.
255. Li M, Zhang W, Yang L, Wang H, Wang Y, Huang K, et al. The mechanism of Xiaoyao San in the treatment of ovarian cancer by network pharmacology and the effect of stigmasterol on the PI3K/Akt pathway. *Dis Markers.* el 29 de junio de 2021;2021:1–10.

256. Ravi Kumar S, Narayan B, Sawada Y, Hosokawa M, Miyashita K. Combined effect of astaxanthin and squalene on oxidative stress in vivo. *Mol Cell Biochem.* el 17 de junio de 2016;417(1–2):57–65.
257. Sánchez-Quesada C, Gutiérrez-Santiago F, Rodríguez-García C, Gaforio JJ. Synergistic effect of squalene and hydroxytyrosol on highly invasive MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Nutrients.* el 7 de enero de 2022;14(2):255.
258. Tatewaki N, Konishi T, Nakajima Y, Nishida M, Saito M, Eitsuka T, et al. Squalene Inhibits ATM-Dependent Signaling in γ IR-Induced DNA Damage Response through Induction of Wip1 Phosphatase. *PLoS One.* el 29 de enero de 2016;11(1).
259. Sri Charan Bindu B, Mishra DP, Narayan B. Inhibition of virulence of *Staphylococcus aureus* – a food borne pathogen – by squalene, a functional lipid. *J Funct Foods.* octubre de 2015;18:224–34.
260. Labbozzetta M, Poma P, Tutone M, McCubrey JA, Sajeva M, Notarbartolo M. Phytol and heptacosane are possible tools to overcome multidrug resistance in an *in vitro* model of Acute Myeloid Leukemia. *Pharmaceuticals.* el 15 de marzo de 2022;15(3):356.
261. Raza C, Dildar A, Inam L, Parsa D, Muhammad S. Study of bioactivities of lipid content of fresh *Lagenaria siceraria* seeds pulp and identification of its chemical constituents. *Journal of Medicinal Plants Research.* el 31 de agosto de 2014;8(31):1014–20.
262. Singh T, Wahla V. GC–MS analysis of antifungal compounds derived from soil actinobacteria. *International Research Journal Of Pharmacy.* el 29 de marzo de 2018;9(2):81–4.

263. Jirovetz L, Buchbauer G, Schweiger T, Denkova Z, Slavchev A, Stoyanova A, et al. Chemical composition, olfactory evaluation and antimicrobial activities of *Jasminum grandiflorum* L. Absolute from India. *Nat Prod Commun.* el 25 de abril de 2007;2(4).
264. dos Santos AL, Amaral M, Hasegawa FR, Lago JHG, Tempone AG, Sartorelli P. (-)-T-Cadinol—a sesquiterpene isolated from *Casearia sylvestris* (Salicaceae)—displayed *in vitro* activity and causes hyperpolarization of the membrane potential of *Trypanosoma cruzi*. *Front Pharmacol.* el 3 de noviembre de 2021;12.
265. Rahman MM, Garvey M, Piddock LJV, Gibbons S. Antibacterial terpenes from the oleoresin of *Commiphora molmol* (Engl.). *Phytotherapy Research.* el 20 de octubre de 2008;22(10):1356–60.
266. Terzioglu S, Yasar A, Yayli N, Yilmaz N, Karaoglu S, Yayli N. Antimicrobial activity and essential oil compositions of two *Ranunculus species* from Turkey: *R. constantinopolitanos* y *R. arvensis*. *Asian Journal of Chemistry.* 2008;20(4):3277–83.
267. Dibwe DF, Sun S, Ueda J ya, Balachandran C, Matsumoto K, Awale S. Discovery of potential antiausterity agents from the Japanese cypress *Chamaecyparis obtusa*. *Bioorg Med Chem Lett.* noviembre de 2017;27(21):4898–903.
268. Alamgir ANM. Secondary metabolites: Secondary metabolic products consisting of C and H; C, H, and O; N, S, and P elements; and O/N heterocycles. En: *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts.* Springer, Cham; 2018. p. 165–309.
269. Jiménez-Varo E, Cañadas-Garre M, Aguilera M, Callejas DG, Ramirez CP, Hernández MAC. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. En: Barh D, Dhawan D, Ganguly N, editores. *Omics for Personalized Medicine.* New Delhi: Springer India; 2013. p. 435–67.

270. Zagorac D, Jakovcevic D, Gebremedhin D, Harder DR. Antiangiogenic effect of inhibitors of cytochrome P450 on rats with glioblastoma multiforme. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. el 16 de agosto de 2008;28(8):1431–9.
271. Yu X, Zhao M, Liu F, Zeng S, Hu J. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. *Food Research International*. abril de 2013;51(1):397–403.
272. Chen Z, Liu Q, Zhao Z, Bai B, Sun Z, Cai L, et al. Effect of hydroxyl on antioxidant properties of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4 H -pyran-4-one to scavenge free radicals. *RSC Adv*. 2021;11(55):34456–61.
273. Hiramoto K, Nasuhara A, Michikoshi K, Kato T, Kikugawa K. DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. diciembre de 1997;395(1):47–56.
274. Ban JO, Hwang IG, Kim TM, Hwang BY, Lee US, Jeong HS, et al. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF- κ B in Human Colon Cancer Cells. *Arch Pharm Res*. noviembre de 2007;30(11):1455.
275. Ting PC, Lee WR, Huo YN, Hsu SP, Lee WS. Folic acid inhibits colorectal cancer cell migration. *J Nutr Biochem*. enero de 2019;63:157–64.
276. Cui S, Lv X, Li W, Li Z, Liu H, Gao Y, et al. Folic acid modulates VPO1 DNA methylation levels and alleviates oxidative stress-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro*. *Redox Biol*. octubre de 2018;19:81–91.

277. Zhang Q, Wu H, Zou M, Li L, Li Q, Sun C, et al. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *J Nutr Biochem.* septiembre de 2019;71:98–109.
278. Cianciulli A, Salvatore R, Porro C, Trotta T, Panaro MA. Folic acid is able to polarize the inflammatory response in LPS activated microglia by regulating multiple signaling pathways. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:1–10.
279. Koohepyma H, Goudarzi I, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Shabani M. Postnatal administration of homocysteine induces cerebellar damage in rats: Protective effect of folic acid. *Neurotox Res.* el 15 de abril de 2019;35(3):724–38.
280. Davis CK, Nampoothiri SS, Rajanikant GK. Folic acid exerts post-ischemic neuroprotection *in vitro* through HIF-1 α stabilization. *Mol Neurobiol.* el 14 de noviembre de 2018;55(11):8328–45.
281. Budni J, Molz S, Dal-Cim T, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Lopéz MG, et al. Folic acid protects against glutamate-induced excitotoxicity in hippocampal slices through a mechanism that implicates inhibition of GSK-3 β and iNOS. *Mol Neurobiol.* el 10 de febrero de 2018;55(2):1580–9.
282. Zhu M, Li B, Ma X, Huang C, Wu R, Zhu W, et al. Folic acid protected neural cells against aluminum-maltolate-induced apoptosis by preventing miR-19 downregulation. *Neurochem Res.* el 25 de agosto de 2016;41(8):2110–8.
283. Zhou D, Lv X, Wang Y, Liu H, Luo S, Li W, et al. Folic acid alleviates age-related cognitive decline and inhibits apoptosis of neurocytes in senescence-accelerated mouse prone 8: deoxythymidine triphosphate biosynthesis as a potential mechanism. *J Nutr Biochem.* noviembre de 2021;97:108796.

284. Jerez S, Sierra L, Peral de Bruno M. 17-Octadecynoic acid improves contractile response to angiotensin II by releasing vasoconstrictor prostaglandins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* enero de 2012;97(1–2):36–42.
285. Li W, Liu H, Yu M, Zhang X, Zhang M, Wilson JX, et al. Folic acid administration inhibits amyloid β -peptide accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *J Nutr Biochem.* agosto de 2015;26(8):883–91.
286. Li W, Jiang M, Zhao S, Liu H, Zhang X, Wilson J, et al. Folic acid inhibits amyloid β -peptide production through modulating DNA methyltransferase activity in N2a-APP cells. *Int J Mol Sci.* el 20 de octubre de 2015;16(10):25002–13.
287. Samblas M, Martínez JA, Milagro F. Folic acid improves the inflammatory response in LPS-activated THP-1 macrophages. *Mediators Inflamm.* el 4 de julio de 2018;2018:1–8.
288. Tang Y, Li Y, Xu R, Li S, Hu H, Xiao C, et al. Self-assembly of folic acid dextran conjugates for cancer chemotherapy. *Nanoscale.* 2018;10(36):17265–74.
289. Xu J, Xu B, Shou D, Qin F, Xu Y, Hu Y. Characterization and evaluation of a folic acid receptor-targeted cyclodextrin complex as an anticancer drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* febrero de 2016;83:132–42.
290. Jaimes-Aguirre L, Morales-Avila E, Ocampo-García BE, Medina LA, López-Téllez G, Gibbens-Bandala B V., et al. Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide)/poly(L- γ -glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin. *Materials Science and Engineering: C.* julio de 2017;76:743–51.
291. Hijaz M, Das S, Mert I, Gupta A, Al-Wahab Z, Tebbe C, et al. Folic acid tagged nanoceria as a novel therapeutic agent in ovarian cancer. *BMC Cancer.* el 15 de diciembre de 2016;16(1):220.

292. Li L, Liang N, Wang D, Yan P, Kawashima Y, Cui F, et al. Amphiphilic polymeric micelles based on deoxycholic acid and folic acid modified chitosan for the delivery of paclitaxel. *Int J Mol Sci.* el 12 de octubre de 2018;19(10):3132.
293. Ren X, He L, Tian X, Zhang P, Chen Z, Mei X. pH and folic acid dual responsive polysaccharide nanospheres used for nuclear targeted cancer chemotherapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* junio de 2019;178:445–51.
294. Borah PK, Das AS, Mukhopadhyay R, Sarkar A, Duary RK. Macromolecular design of folic acid functionalized amylopectin–albumin core–shell nanogels for improved physiological stability and colon cancer cell targeted delivery of curcumin. *J Colloid Interface Sci.* noviembre de 2020;580:561–72.
295. Song Y, Zhou B, Du X, Wang Y, Zhang J, Ai Y, et al. Folic acid (FA)-conjugated mesoporous silica nanoparticles combined with MRP-1 siRNA improves the suppressive effects of myricetin on non-small cell lung cancer (NSCLC). *Biomedicine & Pharmacotherapy.* mayo de 2020;125.
296. Lu T, Nong Z, Wei L, Wei M, Li G, Wu N, et al. Preparation and anti-cancer activity of transferrin/folic acid double-targeted graphene oxide drug delivery system. *J Biomater Appl.* el 22 de julio de 2020;35(1):15–27.
297. Sathiyaseelan A, Saravanakumar K, Manivasagan P, Jeong MS, Jang ES, Wang MH. Folic acid conjugated chitosan encapsulated palladium nanoclusters for NIR triggered photothermal breast cancer treatment. *Carbohydr Polym.* marzo de 2022;280:119021.
298. Igartúa DE, Azcona PL, Martínez CS, Alonso S del V, Lassalle VL, Prieto MJ. Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility

- studies on Zebrafish embryo and larvae. *Toxicol Appl Pharmacol.* noviembre de 2018;358:23–34.
299. Qiu J, Zhang H, Wang Z, Liu D, Liu S, Han W, et al. The antitumor effect of folic acid conjugated-*Auricularia auricular* polysaccharide-cisplatin complex on cervical carcinoma cells in nude mice. *Int J Biol Macromol.* febrero de 2018;107:2180–9.
300. Cui S, Li W, Wang P, Lv X, Gao Y, Huang G. Folic acid inhibits homocysteine-induced cell apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* el 18 de julio de 2018;444(1–2):77–86.
301. Cheng F, Lan J, Xia W, Tu C, Chen B, Li S, et al. Folic acid attenuates vascular endothelial cell injury caused by hypoxia via the inhibition of ERK1/2/NOX4/ROS pathway. *Cell Biochem Biophys.* el 23 de junio de 2016;74(2):205–11.
302. Cui S, Li W, Lv X, Wang P, Gao Y, Huang G. Folic acid supplementation delays atherosclerotic lesion development by modulating MCP1 and VEGF DNA methylation levels *in vivo* and *in vitro*. *Int J Mol Sci.* el 5 de mayo de 2017;18(5):990.
303. Chalupsky K, Kračun D, Kanchev I, Bertram K, Görlach A. Folic acid promotes recycling of tetrahydrobiopterin and protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension by recoupling endothelial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal.* el 10 de noviembre de 2015;23(14):1076–91.
304. Zhang L, Hu Y, Duan X, Tang T, Shen Y, Hu B, et al. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thirteen boletus mushrooms. *Int J Biol Macromol.* julio de 2018;113:1–7.

305. He TB, Huang YP, Huang Y, Wang XJ, Hu JM, Sheng J. Structural elucidation and antioxidant activity of an arabinogalactan from the leaves of *Moringa oleifera*. *Int J Biol Macromol.* junio de 2018;112:126–33.
306. Zhang Q, Xu Y, Lv J, Cheng M, Wu Y, Cao K, et al. Structure characterization of two functional polysaccharides from *Polygonum multiflorum* and its immunomodulatory. *Int J Biol Macromol.* julio de 2018;113:195–204.
307. Li H, Xie W, Qiao X, Cui H, Yang X, Xue C. Structural characterization of arabinogalactan extracted from *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai and its immunomodulatory effect on RAW264.7 macrophages. *Int J Biol Macromol.* enero de 2020;143:977–83.
308. Saitman A. Overview of analytical methods in drugs of abuse analysis. En: *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*. Elsevier; 2019. p. 157–71.
309. Hmood AK, Salim HA. Effect of different concentrations of sucrose on alkaloids and steroids production *in vitro* from *Withania somnifera* (L) Dunal (Ashwagandha). *Emergent Life Sciences Research.* 2017;
310. Sarmadi M, Karimi N, Palazón J, Ghassempour A, Mirjalili MH. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry.* noviembre de 2018;132:271–80.
311. Avelino F. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). En: *Antioxidant Methods*. Elsevier; 2024. p. 79–93.
312. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* el 25 de agosto de 2011;48(4):412–22.

313. Kumar V, Mathela CS, Kumar M, Tewari G. Antioxidant potential of essential oils from some Himalayan Asteraceae and Lamiaceae species. *Med Drug Discov.* marzo de 2019;1:100004.
314. Maksimović Z. *In vitro* antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. *Ind Crops Prod.* noviembre de 2008;28(3):356–60.
315. Tennyson S, Balaraju K, Park K, Ravindran KJ, Eapen A, William SJ. *In vitro* antioxidant activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae). *Asian Pac J Trop Dis.* enero de 2012;2:S712–4.
316. Dewan SMR, Amin MN, Adnan T, Uddin SMN, Shahid-Ud-Daula AFM, Sarwar G, et al. Investigation of analgesic potential and *in vitro* antioxidant activity of two plants of Asteraceae family growing in Bangladesh. *J Pharm Res.* junio de 2013;6(6):599–603.
317. Mercado-Mercado G, de la Rosa Carrillo L, Wall-Medrano A, López Díaz JA, Álvarez-Parrilla E. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutr Hosp.* 2013;28(1).
318. Parada-Flores O, López-Cervantes J, Isabel Sánchez-Machado D, Ramírez-Wong B, Nydia Campas-Baypoli O, del Rosario Martínez-Macias M, et al. Biochemical profile and antioxidant activity of *Lagascea decipiens*, a native Asteraceae plant. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.* febrero de 2023;22(2):89–97.
319. Sinda PVK, Tchuengem RT, Ponou BK, Kühlborn J, Kianfé BY, Dzoyem JP, et al. Antimicrobial activities of extract, fractions and compounds from the medicinal plant *Helichrysum odoratissimum* (L.) Sweet (Asteraceae). *South African Journal of Botany.* julio de 2022;147:937–41.

320. Cordisco E, Petenatti E, Svetaz L, Sortino M. Evaluation of the antifungal photodynamic activity of *Thymophylla pentachaeta* extracts against *Candida albicans* and its virulence factors. *Phytomedicine*. septiembre de 2021;90:153608.
321. Wijesundara NM, Rupasinghe HPV. Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microb Pathog*. abril de 2018;117:118–27.
322. Alshahrani MY, Ibrahim EH, Asiri M, Kilany M, Alkhathami AG, Alshahrani MN, et al. Lycopene augments and enhances anti-oxidant/antibacterial efficiency of ethanolic leaf extract of *Helianthus annuus* over multidrug-resistant bacterial isolates. *J King Saud Univ Sci*. octubre de 2022;34(7):102250.
323. Birhan YS, Bishaw WA, Mengesha NM. Appraisal of phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of folkloric *Pentanema confertiflorum* rootbark extracts. *Ecological Frontiers*. febrero de 2024;44(1):15–22.
324. Akhgari Z, Nazari R, Zargar M, Tanomand A. Antibacterial and antibiofilm properties of *Acroptilon repens* (L.) Dc extract and its effect on exotoxin A gene expression of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Rep*. diciembre de 2021;25.
325. Bendifallah L, Merah O. Phytochemical and biocidal properties of *Artemisia campestris subsp. campestris* L. (Asteraceae) essential oil at the southern region of Algeria. *Journal of Natural Pesticide Research*. junio de 2023;4:100035.
326. Freitas PR, de Araújo ACJ, dos Santos Barbosa CR, Muniz DF, Rocha JE, de Araújo Neto JB, et al. Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. *Microb Pathog*. agosto de 2020;145:104223.

327. Krishna V, Mankani K, Manjunatha B, Vidya S, Manohara Y, Singh SJ. Wound healing activity of the leaf extracts and deoxyelephantopin isolated from *Elephantopus scaber* Linn. Indian J Pharmacol. 2005;37(4):238.
328. Balekar N, Katkam NG, Nakpheng T, Jehtae K, Srichana T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. J Ethnopharmacol. junio de 2012;141(3):817–24.
329. Süntar I, Küpeli Akkol E, Keles H, Yesilada E, Sarker SD. Exploration of the wound healing potential of *Helichrysum graveolens* (Bieb.) Sweet: Isolation of apigenin as an active component. J Ethnopharmacol. agosto de 2013;149(1):103–10.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00317

Matricula: 2223801912

Establecimiento de cultivos de *callo de Erigeron canadensis* y evaluación de su actividad antioxidante y antimicrobiana.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 11 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
DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ REBOLLEDO
DRA. VIRGINIA MANDUJANO GONZALEZ
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: ANDREA RUIZ BETANCOURT

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.

2024



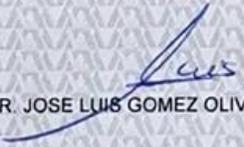

ANDREA RUIZ BETANCOURT
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



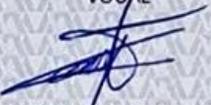
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL



DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ REBOLLEDO

VOCAL



DRA. VIRGINIA MANDUJANO GONZALEZ

SECRETARIA



DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS