



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA  
“PRESIDENTE JUÁREZ”**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“EFECTO DE LA LUZ EN EL PERFIL DE FLAVONOIDES DE  
EXTRACTOS DE *Opuntia* sp. CULTIVADOS EN BIORREACTORES  
DE INMERSIÓN TEMPORAL”**

**TESIS**

**que para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta**

**ING. GIOVANNI ALEJANDRO MAGAÑA ESCOBAR**

**DIRECTOR DE TESIS: DR.  
PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO**

**Uruapan, Michoacán, México, agosto 2024**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN .....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Biotecnología.....	3
2.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	3
2.2.1 Métodos de cultivo de tejidos vegetales.....	4
2.2.2 Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas .....	4
2.2.3 Biorreactores de inmersión temporal.....	5
2.2.4 Parámetros y regulación de biorreactores de inmersión temporal.....	7
2.2.4.1 Frecuencias de inmersión y volumen de medio líquido nutritivo .....	7
2.2.4.2 Hormonas o reguladores de crecimiento vegetal.....	8
2.2.5 Eficiencia de los biorreactores de inmersión temporal.....	9
2.2.6 BIT para la producción de metabolitos secundarios.....	10
2.3 Género <i>Opuntia</i> .....	12
2.3.1 Características del género <i>Opuntia</i> .....	12
2.3.2 Origen y distribución .....	12
2.3.3 Composición nutrimental .....	13
2.3.4 Propiedades nutracéuticas.....	14
2.3.5 Propagación de nopal por cultivo de tejidos vegetales de <i>Opuntia</i> sp. ....	16
2.4 Metabolitos secundarios .....	18
2.4.1 Polifenoles .....	18
2.4.2 Flavonoides.....	20
2.4.3 Biosíntesis de flavonoides .....	21
2.4.4 Influencia de la luz en la producción de flavonoides .....	22
2.4.5 Cromatografía de capa fina (CCF) .....	26
III. JUSTIFICACIÓN .....	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVOS .....	29
5.1 Objetivo general .....	29

5.2	Objetivos específicos .....	29
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
6.1	Recolecta y establecimiento <i>in vitro</i> .....	30
6.2	Optimización de protocolo de micropropagación de <i>Opuntia</i> sp. en biorreactores de inmersión temporal.....	31
6.2.1	Frecuencias de inmersión .....	31
6.2.2	Inducción de brotes axilares en BIT y MSS .....	31
6.2.3	Volumen de medio nutritivo en BIT .....	32
6.3	Longitudes de onda lumínica.....	32
6.4	Extractos de <i>Opuntia</i> sp.....	33
6.4.1	Cuantificación de fenoles totales .....	34
6.4.2	Determinación de flavonoides totales.....	34
6.4.3	Actividad antioxidante.....	35
6.4.3.1	Ensayo antioxidante ABTS.....	35
6.4.3.2	Ensayo antioxidante DPPH .....	35
6.4.3.3	Ensayo antioxidante FRAP.....	36
6.5	Cuantificación de clorofila .....	36
6.6	Extracción y cuantificación de mucílago .....	37
6.7	Cromatografía de capa fina (CCF) .....	37
6.8	Análisis estadístico .....	38
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1	Recolecta y establecimiento <i>in vitro</i> .....	39
7.2	Optimización de protocolo de micropropagación de <i>O. velutina</i> en biorreactores de inmersión temporal.....	40
7.2.1	Frecuencias de inmersión .....	40
7.2.2	Estimulación de la producción de brotes en BIT y MSS.....	41
7.2.3	Volumen de medio nutritivo en BIT .....	43
7.3	Extractos de <i>Opuntia velutina</i> .....	45
7.3.1	Cuantificación de fenoles totales .....	45
7.3.2	Determinación de flavonoides totales.....	50
7.3.3	Actividad antioxidante.....	56
7.3.3.1	Correlaciones de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante..	60

7.4	Efecto del método de cultivo y la longitud de onda lumínica en la clorofila de <i>O. velutina</i> .....	61
7.5	Extracción y cuantificación de mucílago .....	65
7.6	Cromatografía de capa fina (CCF) .....	67
VIII.	CONCLUSIONES .....	72
IX.	LITERATURA CITADA .....	73

### ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Sistemas de inmersión temporal en la multiplicación y producción de metabolitos secundarios en diferentes especies. ....	11
<b>Cuadro 2.</b>	Antecedentes de la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>O. ficus-indica</i> .....	17
<b>Cuadro 3.</b>	Impacto de la irradiación con luz UV-B en la producción de compuestos bioactivos en plantas.....	25
<b>Cuadro 4.</b>	Tratamientos para el establecimiento de <i>Opuntia</i> sp.....	30
<b>Cuadro 5.</b>	Tratamientos para el parámetro frecuencias de inmersión de plántulas de <i>Opuntia</i> sp. en BIT y MSS. ....	31
<b>Cuadro 6.</b>	Tratamientos para el desarrollo de plántulas de <i>Opuntia</i> sp. cultivadas en BIT y MSS.....	32
<b>Cuadro 7.</b>	Tratamientos para el parámetro volumen de medio en BIT.....	32
<b>Cuadro 8.</b>	Tratamientos para el parámetro longitud de onda lumínica en <i>Opuntia</i> sp. cultivado en BIT y MSS. ....	33
<b>Cuadro 9.</b>	Tratamientos formulados para la elaboración de extractos de <i>Opuntia</i> sp. ....	33
<b>Cuadro 10.</b>	Porcentaje de inhibición de los radicales ABTS, DPPH y poder reductor del ion férrico (FRAP) de extractos de <i>O. velutina in situ</i> (PM).....	57
<b>Cuadro 11.</b>	Resultados de actividad antioxidante mediante DPPH, ABTS y FRAP en extractos de <i>O. velutina</i> en BIT, MSS y PM. ....	58
<b>Cuadro 12.</b>	Resultados de actividad antioxidante mediante DPPH, ABTS y FRAP en extractos de <i>O. velutina</i> en BIT y MSS con diferentes longitudes de onda. ....	59
<b>Cuadro 13.</b>	Resultados de cuantificación de clorofilas de <i>O. velutina</i> en métodos de cultivo BIT y MSS expresados en mg/g PF.....	63
<b>Cuadro 14.</b>	Resultados de cuantificación de clorofilas de <i>O. velutina</i> en métodos de cultivo BIT, MSS y PM expresados en mg/g PF. ....	63

<b>Cuadro 15.</b> Valores de Fr obtenidos para cada extracto etanólico bajo diferente sistema de cultivo. Bandas fluorescentes bajo incidencia de luz UV a 365 y 254 nm como reveladores. ....	69
<b>Cuadro 16.</b> Compuestos fenólicos detectados en los extractos de <i>O. velutina</i> bajo diferente sistema de cultivo por comparación de estándares. ....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura general de biorreactor de inmersión temporal conformado por dos recipientes gemelos de vidrio, tubos de silicona grado alimenticio y filtros hidrofóbicos. ...	6
<b>Figura 2.</b> Modo operativo de las frecuencias de inmersión en biorreactor de inmersión temporal. ....	7
<b>Figura 3.</b> Clasificación química de los diferentes polifenoles con ejemplo representativo.	19
<b>Figura 4.</b> Estructura general molecular de un flavonoide. ....	20
<b>Figura 5.</b> Respuesta de los fenilpropanoides a la radiación UV-B en células vegetales. ....	23
<b>Figura 6.</b> Establecimiento en MSS de <i>O. velutina</i> tras los diferentes tratamientos de asepsia. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 7.</b> Respuesta de <i>O. velutina</i> a diferentes frecuencias de inmersión (FI) comparado con MSS a los 30 días de cultivo, letras “FI” BIT y letras “MSS” medio semisólido. ....	41
<b>Figura 8.</b> Efecto de la dosis hormonal en la proliferación de brotes de <i>O. velutina</i> cultivado en BIT y MSS, obtenidos a los 30 días. ....	42
<b>Figura 9.</b> Volumen de medio nutritivo sobre <i>O. velutina</i> cultivado en BIT, obtenidos a los 30 días. ....	44
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de polifenoles totales de cladodios de <i>O. velutina in situ</i> (PM), obtenidos de huerto en Ziracuaretiro. ....	45
<b>Figura 12.</b> Cuantificación de polifenoles totales de cladodios de <i>O. velutina</i> bajo diferentes métodos de cultivo y hormonas. ....	47
<b>Figura 13.</b> Cuantificación de polifenoles totales de cladodios de <i>O. velutina</i> bajo cultivo en BIT, MSS y longitudes de onda. ....	49
<b>Figura 14.</b> Cuantificación de flavonoides totales obtenidos en extractos de cladodios de <i>O. velutina in situ</i> . ....	51

<b>Figura 15.</b> Cuantificación de flavonoides totales obtenidos en extractos de cladodios de <i>O. velutina</i> bajo diferentes técnicas de cultivo y hormonas. ....	53
<b>Figura 16.</b> Cuantificación de flavonoides de cladodios de <i>O. velutina</i> bajo cultivo en BIT, MSS y longitudes de onda. ....	55
<b>Figura 23.</b> Cuantificación de mucílago de <i>O. velutina</i> con diferentes métodos de cultivo. ....	66
<b>Figura 24.</b> CCF de extractos etanólicos de <i>O. velutina</i> , con y sin hidrólisis. ....	68

## DEDICATORIAS

A mis padres: Albino Magaña García y Sandra Edith Escobar Castañeda. En primer lugar, por haberme dado la vida y por el gran esfuerzo que han hecho a lo largo de sus vidas, les doy las gracias por su apoyo incondicional y por toda la confianza que han depositado en mí, por alentarme en los tiempos más difíciles y por enseñarme que solo con trabajo y honradez es la forma de salir adelante.

A mi hermana Karina, por el gran apoyo y comprensión.

A mi pareja Eréndira Rubio Ochoa, por apoyarme en todo este gran proceso, por acompañarme y ser mi confidente en momentos muy difíciles.

A Giovanna y Braulio, mis pequeños que me brinda tanto amor y comprensión.

A mis maestros, gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por los conocimientos que me transmitieron en el desarrollo de formación profesional.

A todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron directa o indirectamente en la elaboración de este proyecto.

A la vida por permitirme llegar a este punto tan importante.

*Giovanni Alejandro Magaña Escobar*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana De San Nicolás de Hidalgo que a través de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, me dio la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

A todos mis maestros de posgrado por ser parte de esta de mi formación profesional, compartirme sus conocimientos.

Al Dr. Pedro Antonio García Saucedo por ser parte integra de mi formación y siempre apoyarme en las aportaciones y correcciones de este proyecto, por su tiempo y amistad.

A la M. C. Teresita del Carmen Ávila Val y M. C. Atahualpa Guzmán de Casa por su gran apoyo para el desarrollo del experimento y sugerencias de este trabajo, por bríndame su tiempo y amistad.

Al grupo de sinodales por sus conocimientos, sugerencias y aportaciones en la revisión de este proyecto.

A todos mis compañeros por su gran amistad y apoyo en las buenas y en las malas y por todos los gratos momentos que pasamos juntos tanto en el laboratorio como en el exterior.

## RESUMEN

El género *Opuntia* es conocido por sus propiedades medicinales y nutricionales. Las pencas o cladodios han despertado un creciente interés en la investigación debido a sus flavonoides, reconocidos por sus efectos antioxidantes y beneficiosos para la salud. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, especialmente en biorreactores de inmersión temporal (BIT), ha emergido como una opción efectiva para producir flavonoides, a menudo superando al cultivo en medio semisólido. No obstante, la información sobre la proliferación de brotes de *Opuntia* en BIT es escasa o nula. La automatización y la capacidad de ajustar factores externos en los BIT ofrecen un potencial significativo para la producción a gran escala de *Opuntia* y de estos compuestos bioactivos, abriendo nuevas oportunidades en las industrias alimentaria y farmacéutica. En ese contexto, este proyecto tuvo como objetivo comparar el perfil de flavonoides de extractos obtenidos de brotes cultivados en medio semisólido y biorreactores de inmersión temporal de *Opuntia*. Inicialmente, se estableció *Opuntia velutina in vitro* mediante una combinación de solución de detergente, biocida, alcohol al 70 % y cloro al 6 %, logrando una supervivencia del 46.67 %. Posteriormente, los cultivos fueron transferidos a BIT, donde se estandarizaron diversos parámetros para la proliferación de brotes, longitud, biomasa, polifenoles totales (PT), flavonoides (FT) y capacidad antioxidante. En cuanto a la estandarización en BIT, se observó que utilizando 3 ciclos/día con una inmersión de 3 min, se obtuvo una longitud promedio de 1.122 cm y una biomasa de 0.773 g. Con 300 mL de medio nutritivo, se registró un promedio de longitud de 1.913 cm, biomasa de 0.719 g y 1.2 brotes. La adición de 1 mg/L de meta-topolina estimuló una proliferación de 1.937, resultados similares a los obtenidos en medio semisólido. En relación con los niveles de PT, FT y capacidad antioxidante, se encontró que los BIT y la luz azul demostraron una mayor acumulación, así como una mayor capacidad antioxidante en comparación con el medio semisólido y la planta madre. Además, se observó un aumento del 216 % en la producción de mucílago en BIT en comparación con la planta madre. Por último, mediante cromatografía de capa fina, se identificaron perfiles de flavonoides diferentes entre los sistemas de cultivo, destacando la presencia de quercetina y ácido p-cumárico en BIT y medio semisólido.

**Palabras clave:** *Opuntia velutina*, flavonoides, biorreactores de inmersión temporal (BIT).

## ABSTRACT

The *Opuntia* genus is known for its medicinal and nutritional properties. The pads or cladodes have sparked growing research interest due to their flavonoids, which are recognized for their antioxidant and health benefits. In vitro plant tissue culture, especially in temporary immersion bioreactors (TIB), has emerged as an effective option for producing flavonoids, often surpassing semi-solid medium culture. However, information on the proliferation of *Opuntia* shoots in TIB is scarce or non-existent. The automation and ability to adjust external factors in TIB offer significant potential for large-scale production of *Opuntia* and these bioactive compounds, opening new opportunities in the food and pharmaceutical industries. In this context, the objective of this project was to compare the flavonoid profile of extracts obtained from shoots cultivated in semi-solid medium and temporary immersion bioreactors of *Opuntia*. Initially, *Opuntia velutina* was established *in vitro* using a combination of detergent solution, biocide, 70% alcohol, and 6% chlorine, achieving a survival rate of 46.67%. Subsequently, the cultures were transferred to TIB, where various parameters were standardized for shoot proliferation, length, biomass, total polyphenols (TP), flavonoids (TF), and antioxidant capacity. Regarding standardization in TIB, it was observed that using 3 cycles/day with a 3-minute immersion, an average length of 1.122 cm and biomass of 0.773 g were obtained. With 300 mL of nutrient medium, an average length of 1.913 cm, biomass of 0.719 g, and 1.2 shoots were recorded. The addition of 1 mg/L of meta-topolin stimulated a proliferation of 1.937, results similar to those obtained in semi-solid medium. Regarding TP, TF, and antioxidant capacity levels, it was found that TIB and blue light demonstrated higher accumulation and greater antioxidant capacity compared to the semi-solid medium and the mother plant. Additionally, a 216% increase in mucilage production was observed in TIB compared to the mother plant. Finally, thin-layer chromatography identified different flavonoid profiles between the cultivation systems, highlighting the presence of quercetin and p-coumaric acid in TIB and semi-solid medium.

**Keywords:** *Opuntia velutina*, flavonoids, temporary immersion bioreactors (TIB).

## I. INTRODUCCIÓN

La familia *Cactaceae* se caracteriza por poseer tallos suculentos y por el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) (Aruwa et al., 2018). Dentro de esta familia se encuentra el género *Opuntia* Mill., que contiene alrededor de 300 especies, 83 a 105 de ellas nativas de México, siendo el territorio con mayor diversidad genética en el mundo; las principales especies seleccionadas para alimento en el país son *O. xocconostle*, *O. megacantha*, *O. streptacantha* y *O. ficus-indica* (Ochoa y Barbera, 2018; Martínez et al., 2021).

*Opuntia ficus-indica* es la especie más representativa para nuestro país, principalmente porque sus tallos (cladodios o nopales) son utilizados como barreras naturales, forraje, biorremediación de suelos y alimento. Además, de ser empleado en la medicina tradicional para el tratamiento de quemaduras, heridas, edemas, hiperlipidemia, obesidad y gastritis catarral. Debido a sus propiedades, antidiarreicas, antihemorroidales, hipercolesterolemias y antioxidantes (El-Mostafa et al., 2014; Amer, 2021; Hernández-Becerra et al., 2022). Atribuidas a sus metabolitos secundarios y que se le ha considerado como un importante alimento funcional, con propiedades nutraceuticas y farmacológicas. Estos beneficios para la salud han contribuido en investigaciones enfocadas en el aumento de metabolitos secundarios como lo son los flavonoides de esta especie (Santos-Díaz et al., 2010). Los flavonoides son fenoles con más de 5,000 compuestos descritos que varían según el cultivo, la madurez, la región de crecimiento y el tipo de tejido vegetal, siendo importante realizar perfiles cualitativos y cuantitativos de éstos (Zeghib et al., 2022).

Con la finalidad de mejorar la producción de metabolitos secundarios de interés, se usan herramientas biotecnológicas importantes para el aprovechamiento de plantas con propiedades nutraceuticas mediante la adopción de técnicas como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que es utilizada para la producción de compuestos bioactivos. Dentro de esta técnica, los sistemas de inmersión temporal recientemente han demostrado ser una herramienta eficaz para la micropropagación y producción de metabolitos secundarios como los flavonoides producidos *in vitro* (De Carlo et al., 2021). Así como, la automatización y versatilidad de modificación de factores extrínsecos que inciden en el desarrollo fisiológico de la planta (Loyola-González et al., 2019). En específico, se utilizan los biorreactores de inmersión temporal (BIT) los cuales, con numerosos reportes, han evidenciado su potencial en la producción de compuestos bioactivos como los flavonoides, como los reportados para

*Lycium barbarum*, *Rosa canina* y *Dracocephalum forrestii* con los cuales se han demostrado mayores resultados en comparación al uso del medio de cultivo semisólido. Sin embargo, no todas las especies han respondido favorablemente a este sistema de propagación. Es así como los BIT tienen un potencial significativo para la producción de compuestos de interés como los flavonoides, además de la facilidad en la operación y automatización, con la posibilidad de aplicar el sistema a gran escala. Por lo cual en esta investigación fue determinar el efecto de una longitud de onda lumínica azul en el perfil de flavonoides de extractos de brotes de *Opuntia* sp, cultivados en biorreactores de inmersión temporal y en medio semisólido.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Biotecnología

La biotecnología se refiere al empleo de organismos vivos o sus derivados para mejorar la vida humana o el medio ambiente, ya sea desarrollando nuevos productos o solucionando problemas específicos. El humano desde hace miles de años utilizó a los organismos para su beneficio. Los estudios históricos han demostrado que la biotecnología se ha usado desde hace 2000 años a. C. y es una disciplina en constante evolución con un rápido crecimiento y potencial ilimitado (Thieman y Palladino, 2010).

La biotecnología se destaca como un área central de investigación en diversos campos, como medicina, farmacia, silvicultura, medio ambiente, agricultura e industrias variadas, la cual se extiende por una amplia gama de áreas de estudio, abordando propiedades fisiológicas y bioquímicas que van desde la manipulación de microorganismos hasta el cultivo de células y tejidos vegetales. Además, se centra en la producción de una variedad de sustancias, como metabolitos secundarios, proteínas, hormonas, antibióticos, vitaminas y vacunas. En términos generales, la biotecnología se dedica a mejorar las propiedades de plantas, animales y microorganismos para aplicaciones específicas, como en el ámbito agrícola (Ozyigit et al., 2023). En este último, se centra en la mejora de las plantas mediante técnicas genéticas y enfoques basados en cultivos de tejidos vegetales, lo cual es fundamental para la producción rápida y durante todo el año de metabolitos secundarios. Esta práctica permite modificar los factores que afectan a la planta *in vitro*, como los nutricionales (fuentes de carbono, macroelementos y microelementos) y los reguladores del crecimiento vegetal, que son clave en la respuesta de las plantas para la producción de metabolitos de interés comercial en cantidad y calidad (Erkoyuncu y Yorgancilar, 2016; Beigmohamadi et al., 2019).

### 2.2 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas biotecnológicas utilizadas para mantener o hacer crecer células, tejidos u órganos vegetales en condiciones asépticas en un medio de cultivo nutritivo de composición conocida (Kundu et al., 2021). Además, controla el desarrollo de las plantas mediante factores extrínsecos como la adición de reguladores de crecimiento vegetal (Phillips y Garda, 2019).

El cultivo de tejidos vegetales tiene aplicación en la propagación masiva de especies de interés comercial libres de enfermedades, modificación del genotipo (fitomejoramiento), multiplicación rápida de genotipos raros, preservación de germoplasma, producción de biomasa y de metabolitos secundarios de importante valor comercial derivados de plantas, entre otros (Espinosa-Leal et al., 2018; Bednarek y Orłowska, 2020). Por lo tanto, facilita la propagación de plantas durante todo el año con grandes tasas de multiplicación en espacios reducidos (Oseni et al., 2018).

### **2.2.1 Métodos de cultivo de tejidos vegetales**

Existen varios métodos disponibles para generar y propagar nuevas plantas por cultivo de tejidos vegetales. El método comúnmente utilizado es la organogénesis, éste se basa en la producción de órganos vegetales a partir de una porción de tejido específico con el fin de que se puedan desarrollar plantas completas; capacidad dada por el potencial de una célula para desarrollar un organismo multicelular que se denomina totipotencia celular (Gupta et al., 2020). La porción de tejido vegetal puede ser polar (órgano aéreo o raíz) y generar una planta nueva. El método cuenta con dos formas de desarrollarse mediante organogénesis directa o indirecta; la organogénesis directa se origina a través de un órgano vegetal (explante) y la organogénesis indirecta ocurre a partir de células desdiferenciadas (callo) previamente creados en los explantes originales (Hasnain et al., 2022). El proceso de embriogénesis somática comienza cuando células somáticas desdiferenciadas experimentan una transición hacia un estado embriogénico, generando estructuras bipolares similares a embriones cigóticos conocidas como embriones somáticos. Estos embriones tienen la capacidad de desarrollarse en plantas completas (Wójcik et al., 2020).

### **2.2.2 Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas**

En las últimas seis décadas, se han desarrollado y perfeccionado métodos avanzados para la multiplicación de cactáceas mediante la micropropagación. Durante ese tiempo, se han explorado diversas técnicas, como la regeneración a través de la formación de embriones somáticos, organogénesis directa o de manera indirecta, así como el injerto en condiciones de laboratorio (Bouzroud et al., 2022). Sin embargo, el proceso de la germinación de cactáceas *in vitro* es lenta, además de requerir condiciones específicas, es así como la germinación es baja debida a la dormancia, impuesta por el tegumento (Gezer, 2020). En

literatura se muestra que uno de los principales métodos utilizados para la micropropagación de cactáceas es injerto *in vitro*, embriogénesis somática y mayormente por organogénesis indirecta y directa, siendo este último el método más efectivo (Bouzroud et al., 2022). Tales métodos han sido implementados con éxito en diferentes cactáceas, como en *Astrophytum*, *Aztekium*, *Cephalocereus*, *Cereus*, *Copiapoa*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Ferocactus*, *Gymnocalycium*, *Leuchtenbergia*, *Mammillaria*, *Nyctocereus*, *Hylocereus*, *Opuntia*, *Rhipsalidopsis*, *Schlumbergera* y *Stenocactus* (Lema-Rumińska y Kulus., 2014; Bouzroud et al., 2020).

El método de cultivo usualmente utilizado en la micropropagación de cactáceas se realiza en frascos pequeños, donde las porciones de tejido vegetal (explantes) son anclados en una base de medio semisólido (Bouzroud et al., 2020; Mirzabe et al., 2022). Además de su uso común en la micropropagación, el cultivo en medio semisólido también se emplea en la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, la investigación predominante se concentra en el cultivo en suspensiones celulares para la producción de estos metabolitos. Esto se debe a que las suspensiones celulares ofrecen un mayor crecimiento y tienen la capacidad de ser ampliadas a sistemas de biorreactores, lo que las convierte en una opción más prometedora para la producción a gran escala de compuestos bioactivos. En este panorama, el uso de cultivo en suspensiones celulares (medio líquido), es un método alternativo que combina este sistema con el uso de biorreactores de inmersión temporal, que pueden mejorar sustancialmente la micropropagación y producción de metabolitos secundarios (Lema-Rumińska et al., 2014; Wawrosch y Zotchev, 2021).

### **2.2.3 Biorreactores de inmersión temporal**

Los biorreactores para el cultivo de tejidos vegetales tuvieron su transición del medio semisólido (MSS) al medio líquido para mejorar varios aspectos como la productividad, velocidad de propagación y acumulación de metabolitos secundarios. Se tienen reportes en el uso de biorreactores para la micropropagación desde el año 1981, cuando investigadores buscaban reducir los costos de propagación de begonia (Yancheva y Konakova, 2018).

Los biorreactores de inmersión temporal (BIT) funcionan mediante un sistema de accionamiento neumático para ejecutar tareas periódicas con el objetivo de garantizar la eficiencia y la eficacia. La estructura de los BIT (**Figura 1**) se basa en dos recipientes de

vidrio o plástico transparente, tubos de silicona de grado alimenticio esterilizables, filtros hidrofóbicos, válvulas solenoides, compresor de aire y un sistema de programación. Un biorreactor de inmersión temporal ideal debe considerar varios factores tales como producción a gran escala en un solo lote, escalabilidad, procesos sencillos de cultivo (inoculación) y extracción de plantas, contacto completo entre las plantas y el medio con la finalidad de mejorar la absorción de nutrientes, por ende beneficia el crecimiento y la morfogénesis del explante, así como proveer la automatización y reducción de costos de producción (Loyola-González et al., 2019; Valdiani et al., 2019). Sin embargo, entre los aspectos negativos se pueden mencionar fenómenos como la hiperhidricidad y malformaciones morfogénicas. Además de que algunas especies pueden ser partícipes de estrés oxidativo inducido por el medio líquido, lo que resulta en cambios anatómicos, fisiológicos y supervivencia de las plantas (Yancheva y Konakova, 2018).



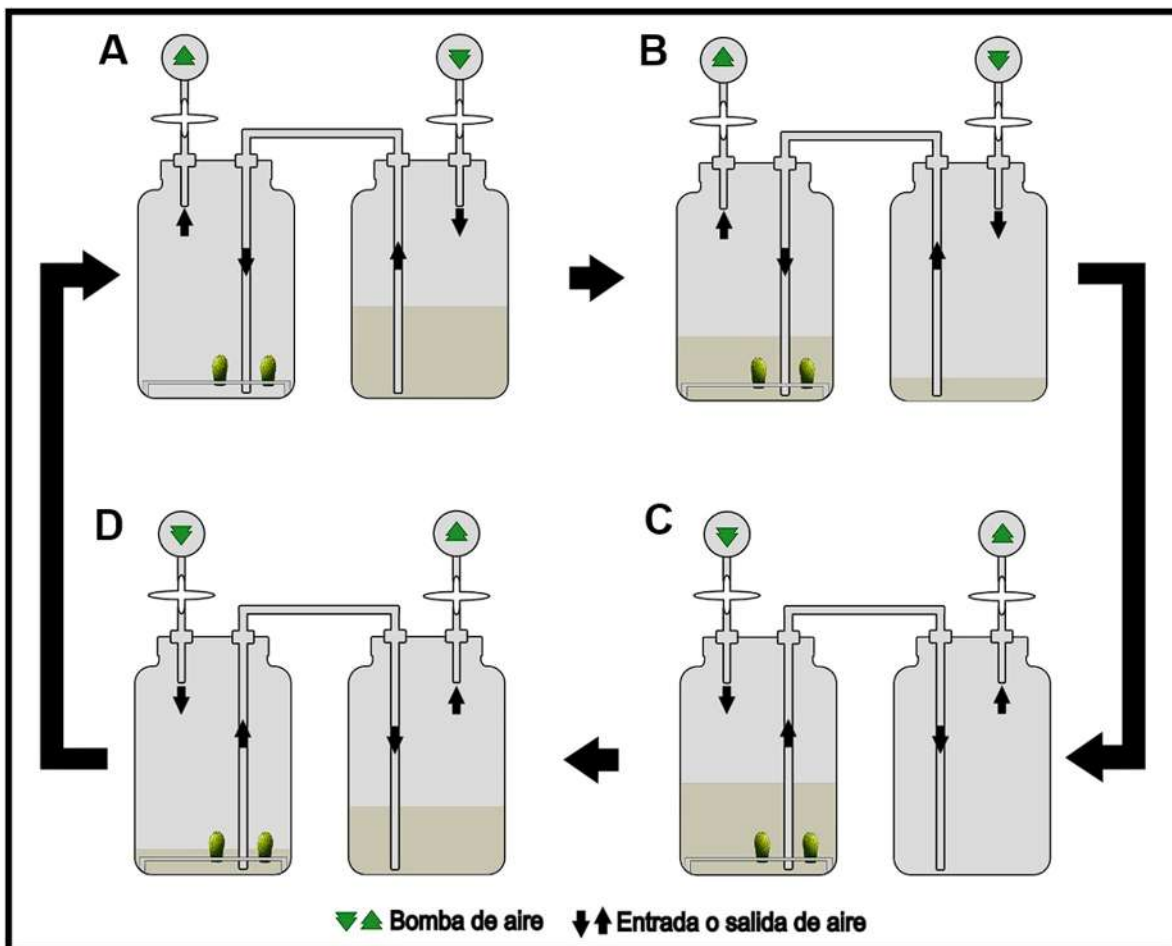
**Figura 1.** Estructura general de biorreactor de inmersión temporal conformado por dos recipientes gemelos de vidrio, tubos de silicona grado alimenticio y filtros hidrofóbicos.

Para la micropropagación en BIT es necesario optimizar y/o regular diferentes parámetros o condiciones para cada especie de planta, condiciones como el flujo de aire, temperatura, agitación, volumen de medio, frecuencias de inmersión (factor crítico de optimización) y hormonas, que requieren una estandarización y control permanente (Yancheva y Konakova, 2018; San José et al., 2020).

## 2.2.4 Parámetros y regulación de biorreactores de inmersión temporal

### 2.2.4.1 Frecuencias de inmersión y volumen de medio líquido nutritivo

La inmersión temporal son los ciclos y tiempo que el explante o tejido vegetal queda en contacto con el medio de cultivo líquido, seguido del drenaje y exposición a un ambiente gaseoso. El período de inmersión suele ser más corto (pocos min), con relación al ciclo prolongado (varias h entre ciclos) en que los explantes están en contacto con el aire (**Figura 2**). Es así como si se modifica el programa de inmersiones suele ser parte importante para la manipulación de los procesos metabólicos de las plántulas, lo cual depende del objetivo que se busque como, micropropagación o acumulación de metabolitos secundarios. También, así como reducir problemas del explante como cambios morfológicos (Cardoso et al., 2018; De Carlo et al., 2021).



**Figura 2.** Modo operativo de las frecuencias de inmersión en biorreactor de inmersión temporal. A) el medio líquido se encuentra en el frasco contenedor; B) la bomba introduce

aire a través de un filtro hidrofóbico hacia el frasco contenedor, transfiriendo el medio líquido al frasco de cultivo; C) los cultivos son expuestos al medio líquido durante varios o pocos min; D) se repite el mismo proceso, se ingresa aire a través del filtro al frasco de cultivo, el cual es redirigido al frasco contenedor donde estará varias h entre cada ciclo.

Con las diversas investigaciones realizadas con BIT, se ha demostrado la importancia que ejerce este factor en el éxito del cultivo; Valdez-Tapia et al. (2014) evaluaron frecuencias de inmersión de 30 y 5 min cada 24 h en brotes de *Castilleja tenuiflora* y destacaron la acumulación de fenoles totales, coincidiendo con mayor actividad antioxidante. En plántulas de *Rosa canina*, con frecuencias de inmersión de 15 min cada 12 h, presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos (15.8 mg/g peso seco) y con frecuencias de inmersión de 15 min cada 6 h produjeron una mayor acumulación de azúcares (9.2 mg/g peso seco) (Malik et al., 2018). En *Salvia viridis* las inmersiones de 10 min cada 80 min, evidenció mayor contenido de ácido fenólico total, feniletanoide total y fenol total (Grzegorzcyk-Karolak et al., 2022).

Además de las frecuencias de inmersión, otro factor crucial en el desarrollo de las plantas en los BIT es el volumen del medio líquido nutritivo, el cual requiere una optimización adecuada. La estandarización de este factor está íntimamente ligada a la especie vegetal bajo estudio, ya que algunas responden mejor a volúmenes de cultivo mayores o menores. Algunas investigaciones han señalado que volúmenes más elevados de medio líquido pueden resultar menos eficientes en términos de la proliferación de brotes (Solórzano-Acosta y Guerrero-Padilla, 2020; Ayub et al., 2021). Esta menor eficiencia se atribuye a la dilución de las moléculas químicas que estimulan la formación de brotes cuando se emplean volúmenes considerables de medio líquido (Berthouly y Etienne, 2005).

#### **2.2.4.2 Hormonas o reguladores de crecimiento vegetal**

Las hormonas o reguladores de crecimiento vegetal (RCV), son sustancias producidas por las plantas o de manera sintética, respectivamente, que funcionan en bajas concentraciones y con la capacidad de actuar en sitios particulares, además de controlar procesos fisiológicos (Tadeu, 2019). En cultivo *in vitro*, el uso de hormonas o RCV resulta una práctica importante. La aplicación puede variar dependiendo de la especie vegetal, su etapa fisiológica y su variedad (Jamwal et al., 2018; Tadeu, 2019). Las hormonas vegetales siguen una

clasificación según su estructura molecular, actividad a nivel vegetal y sus efectos estimulantes o inhibitorios. Los principales RCV comúnmente utilizados en cultivo de tejidos vegetales son: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno. Los RCV además de controlar procesos fisiológicos, han demostrado tener un efecto en el control de la producción de metabolitos secundarios (Alcantara-Cortes et al., 2019).

Dentro de los antecedentes del uso de RCV en sistemas de inmersión temporal (SIT) o BIT, Pramita et al. (2018) reportaron que la producción de biomasa y mayor acumulación de flavonoides en *G. procumbens* se obtuvo con inmersiones de 15 min cada 12 h y con medio nutritivo suplementado con 2 mg/L de AIA + 8 mg/L de BA. Otro trabajo realizado por Gianguzzi et al. (2019), compararon el MSS comparado con SIT, adicionados con BA y meta-Topolin donde el uso de SIT resultó ser superior al MSS y obtuvieron mayor crecimiento (10 veces más que semisólido) y una tasa de proliferación de 7.32 para SIT y 5.24 para semisólido.

### **2.2.5 Eficiencia de los biorreactores de inmersión temporal**

Los BIT ofrecen la ventaja de renovar continuamente el ambiente gaseoso dentro de los frascos de cultivo, lo que resulta en una reducción o eliminación de gases nocivos como el etileno, conocido por su papel en el proceso de senescencia de las plantas. Esta renovación del aire en los frascos conlleva un aumento en la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, mejorando así las condiciones de crecimiento. Además, se ha observado que la regulación del monóxido de carbono (CO) puede enriquecerse, lo que a su vez puede favorecer el desarrollo de las plantas (Ontaneda et al., 2020; Murphy et al., 2023). Investigaciones recientes, como las realizadas por Trauger et al. (2022), respaldan esta idea al demostrar que el aumento de CO<sub>2</sub> durante la etapa de propagación mejora significativamente el desarrollo de las plantas y elimina la necesidad de añadir azúcares al medio de cultivo. Estas mejoras en las condiciones de cultivo pueden tener un impacto positivo en la eficacia y el rendimiento del cultivo en biorreactores de inmersión temporal.

La exposición de los tejidos vegetales a un medio líquido permite la formación de una película protectora que los recubre, evitando así la deshidratación y mejorando la disponibilidad de nutrientes. Este fenómeno se traduce en un notable incremento en el desarrollo y un crecimiento vigoroso de los tejidos vegetales (Ontaneda et al., 2020).

### 2.2.6 BIT para la producción de metabolitos secundarios

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a gran escala puede ser una alternativa al cultivo tradicional en campo para la producción de metabolitos secundarios de plantas (MSP) ya que se obtienen rendimientos controlados. El cultivo de tejidos es una técnica laboriosa de propagación clonal y la implementación de BIT puede ser una estrategia para reducir costos y aprovechamiento de las plantas en la producción de MSP (De Carlo et al., 2021). Se han realizado diversos estudios sobre el uso de BIT en la acumulación de metabolitos secundarios derivados de plantas. En un estudio realizado por Wilken et al. (2005) con plantas de *Hypericum perforatum*, *Cymbopogon citratus* y *Fabiana imbricata* cultivadas en BIT se obtuvo un incremento en el contenido de compuestos bioactivos, siendo inclusive mayores en comparación con cultivo de suspensiones celulares y cultivo de callos. Zobayed et al. (2004) al trabajar con *Scutellaria baicalensis* cultivada en seis sistemas de cultivo para la optimización del contenido fitoquímico, demostraron la eficacia de los BIT para aumentar el contenido de baicaleína, en comparación a sistemas de biorreactores de tipo globo, sin burbujas de aire, recirculación de aire y recipiente magenta con medio gelificado. Así mismo Vives et al. (2017) mostraron el aumento considerable en la formación de glucósidos de esteviol (0.12 g) a partir de brotes de *Stevia rebaudiana* en BIT en comparación con MSS (0.03 g). En el estudio realizado por Pramita et al. (2018), se comparó el contenido de flavonoides de *Gynura procumbens* cultivadas en BIT de frasco gemelo y plantas *in situ* (planta madre) y evidenciaron que el uso de BIT obtuvo un rendimiento de 30.67 mg EC/g de peso seco (miligramos equivalentes de catequina por gramo de peso seco) en comparación a plantas *in situ* con un promedio de 5.78 mg EC/g. Mišić et al. (2013) al trabajar con *Centarium maritimum* en biorreactores, obtuvieron una mayor biomasa y de metabolitos secundarios en raíces de la planta y argumentan que el rendimiento puede estar relacionado a las altas transferencias de oxígeno en los frascos de cultivo, fuerzas hidrodinámicas y mejor disponibilidad de nutrientes. Diferentes autores resaltan la ventaja que brinda un sistema de inmersión temporal en la multiplicación y acumulación de metabolitos secundarios **Cuadro 1.**

**Cuadro 1.** Sistemas de inmersión temporal en la multiplicación y producción de metabolitos secundarios en diferentes especies.

<b>Especies</b>	<b>Biorreactor</b>	<b>Frecuencia de inmersión</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
<i>Capparis spinosa</i> L.	BIT, PlatForm	2 min/ 12 h	SIT suplementado con meta-Topolin, mayor crecimiento (10 veces más que MSS) y tasa de proliferación (7.32 SIT vs 5.24 semisólido)	Gianguzzi et al. (2019)
<i>Corema album</i>	SETIS™	3 min/ 12 h	Generación de 3 veces más brotes que en MSS	Alves et al. (2021)
<i>Lycium barbarum</i>	PlatForm	6 min/ 24 h	Contenido de polifenoles totales aumentó de un 22 % en BIT que en MSS	Ruta et al. (2020)
<i>Rubus idaeus</i> L.	SETIS™	3 min/ 6 h	Tasa de proliferación significativamente mayor (4.02) en comparación con MSS (2.74)	Bošnjak et al. (2021)
<i>Salix viminalis</i>	BIT, PlatForm y RITA®	3 min/ 8 h	Coefficiente de multiplicación mayor en ambos sistemas de inmersión con MS ½ + 0.22 µM BA y 3 % de sacarosa	Regueira et al. (2018)
<i>Stevia rebaudiana</i>	RITA®	10 s/ 1 h	Número de brotes (8.47 brotes por explante) con 300 mL de medio, demostrando un desarrollo 4 veces mayor	Bayraktar (2019)

## **2.3 Género *Opuntia***

### **2.3.1 Características del género *Opuntia***

Dentro de la familia Cactaceae se encuentra el género *Opuntia* Mill., que reconoce alrededor de 188 especies; 66 de ellas, nativas de México (López-Palacios y Peña-Valdivia, 2020). El nopal, *Opuntia ficus-indica*, es el más representativo del género *Opuntia* se caracteriza por presentar un metabolismo tipo CAM (metabolismo ácido crasuláceo), esta adaptación fotosintética se basa en la coordinación temporal de fijación de carbono inorgánico mediada por el reloj circadiano (Niechayev et al., 2019; Ferrari et al., 2020).

*Opuntia ficus-indica*, es una variedad adaptada a condiciones climáticas y edáficas extremas, creciendo en climas secos y cálidos donde las temperaturas varían entre 18 a 25 °C (Astello-García et al., 2012). El nopal se caracteriza por tener tallos modificados llamados cladodios con una cubierta permeable; de igual manera las hojas son transformadas en espinas, mecanismo que les permiten utilizar el agua de manera eficiente (Arba et al., 2017). Los cladodios se identifican por ser ricos en nutrientes, lo que los hace atractivos para su consumo en fresco, mediante ensaladas o en platillos regionales. Las flores de nopal son solitarias y consideradas como sésiles, compuestas por pétalos que cambian de color (blanco a amarillo a rojo) con un pistilo y un estigma lobulado en el ápice (Aruwa et al., 2018). Después de la emisión de botones florales, es seguida por el desarrollo de frutos conocidos como tuna. Sus frutos son carnosos con numerosas semillas de alrededor de 7 cm de largo, con una amplia gama de colores que incluyen verde, blanco y rojizo, además presentan un sabor dulce y agradable para su consumo como fruta de temporal (Kumar et al., 2018; Barba et al., 2020; Martínez et al., 2021; Perucini-Avendaño et al., 2021).

### **2.3.2 Origen y distribución**

El nopal es endémico del continente americano, se distribuye en regiones áridas y semiáridas del mundo, como Australia, África, Estados Unidos, la cuenca del Mediterráneo y el sudeste asiático donde ha sido introducido y cultivado en más de 20 países del mundo. México es considerado el principal centro de diversidad de *Opuntia* ya que cerca de las 300 especies que se encuentran en el planeta, solo entre 83 a 105 se encuentra en nuestro país (Kumar et al., 2018; Martínez et al., 2021; Mouas et al., 2021), las especies de nopal silvestres que predominan son *O. robusta*, *O. leucotricha*, *O. hyptiacantha* y *O. chaveña* que crecen en

zonas semiáridas. Los datos estiman que a nivel comercial las principales especies cultivadas son *O. xocnostle*, *O. megacantha*, *O. streptacantha* y *O. ficus-indica*. En un contexto general los países que reportan mayores territorios cultivados de nopal *Opuntia ficus-indica* son: Túnez 600,000 ha, Brasil 500,000 ha, Etiopía 360,000 ha, Marruecos 120,000 ha y México 70,000 ha. (Ochoa y Barbera., 2018). En nuestro país en los últimos años la producción de nopal verdura ha ascendido a 862,732 toneladas (SIACON, 2022). Con un destino enfocado a la alimentación (nopalitos y tuna), así como forraje o para la producción de grana cochinilla (Martínez et al., 2021).

### **2.3.3 Composición nutrimental**

#### **Cladodio**

El nopal es reconocido en gran medida como la cactácea más empleada en la alimentación humana y animal. Su excepcional versatilidad se debe a las notables características fisicoquímicas, nutricionales y nutracéuticas que posee, lo que lo convierte en una opción altamente adaptable para una amplia gama de aplicaciones en el ámbito de la alimentación (Angulo-Bejarano et al., 2019).

La composición nutrimental de *O. ficus-indica* puede variar dependiendo de la especie, cultivar o variedad, así como de factores bióticos y abióticos conforme a las condiciones climáticas, edáficas, manejo agronómico, etc. (Silva et al., 2021). El nopal exhibe un alto contenido de agua (82-95 %), grasa (0.3-1.8 %), fibra total (15-51.4 %), azúcares (11.2-38 %), proteínas (6.7 - 11.73 %) y carbohidratos (5.6-92 %), así como minerales (potasio, magnesio, calcio y sodio) (Astello-García et al., 2012; Perucini-Avendaño et al., 2021; Silva et al., 2021).

Entre las vitaminas reportadas están la vitamina E, (principalmente  $\alpha$ -tocoferol) y vitamina C, además de aminoácidos como la alanina, isoleucina, asparagina, serina, prolina, arginina, ácido glutámico y taurina (Perucini-Avendaño et al., 2021; Silva et al., 2021). Las proteínas que exhibe el nopal son desaturasa omega-6, isomerasa chalcona-flavonona, proteína de choque térmico Hsp23.5, dedo de zinc tipo CCHC, proteínas NBS-LRR, así como la proteína mitocondrial putativa de la membrana interna (Cruz-Hernández y Paredes-López, 2010).

Sin embargo, la composición de los cladodios varía dependiendo del estado fisiológico, los aminoácidos como la alanina, isoleucina y la asparagina se encuentran presentes en un estado fisiológico joven (Perucini-Avenidaño et al., 2021). Los cladodios maduros son abundantes en ácido cítrico y málico (Andreu et al., 2018). Los minerales más abundantes en este tejido son potasio (224 - 2670 mg/100 g), magnesio (94 - 1120 mg/100 g) y calcio (177 - 640 mg/100 g) (Silva et al., 2021). Un componente característico del nopal que brinda diferentes características nutricionales es el mucílago que es un polisacárido heterogéneo de gran peso molecular que representa el 14 % de peso seco. Es un carbohidrato compuesto por seis monosacáridos, arabinosa (35 - 40 %) galactosa y xilosa (20 - 25 %), ramnosa, ácido galacturónico y urónico (7 - 8 %) (Hernández-Becerra et al., 2022; Herrera-Ibarra et al., 2023). El mucílago exhibe comportamiento de polielectrolito de cadena larga debido a la distribución de grupos funcionales cargados negativamente en toda la molécula, lo que resulta en su característica viscosidad (Ranjan et al., 2016; Luna-Zapién et al., 2023). Las clorofilas presentes en los cladodios tienen diversas aplicaciones, destacando su uso como aditivo alimentario con posibles beneficios para la salud. Se ha comprobado que son valiosas fuentes naturales de vitaminas E, A, C, K y  $\beta$ -caroteno, así como de minerales esenciales como magnesio, potasio, hierro, calcio y ácidos grasos esenciales (Ebrahimi et al., 2023).

### **Fruto**

La tuna, se compone de pulpa (28 - 58 %), cáscara (37 - 67 %) y semillas (2 - 10 %). La pulpa está constituida por glucosa, fructosa y pectina. El contenido de proteínas va de 0,90 g/100 g. Además de presentar ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides, fibras, aminoácidos y compuestos antioxidantes (flavonoides, betalaínas, betaxantinas, betacianinas y fenoles), de los cuales se encuentran relacionados con el color y la especie de nopal (El-Mostafa et al., 2014; Andreu et al., 2018, Silva et al., 2021). En cuanto a vitaminas, que son los constituyentes principales de la tuna, la cáscara es rica en vitamina E. Las semillas son una rica fuente de fibra, grasa, proteína, minerales, principalmente potasio, fósforo, en menor medida magnesio, calcio y sodio (Silva et al., 2021).

#### **2.3.4 Propiedades nutraceuticas**

Un alimento nutraceutico es un producto alimenticio que va más allá de su valor nutricional básico ya que contiene componentes bioactivos que ofrecen beneficios adicionales para la

salud. Estos compuestos bioactivos han sido identificados por sus propiedades terapéuticas y se utilizan para prevenir enfermedades, tratar trastornos específicos y mejorar el funcionamiento del cuerpo. Los compuestos nutraceuticos pueden ser parte de un alimento procesado, una sustancia enriquecida en un alimento o proveerse como suplemento (Egbuna y Dable-Tupas, 2020).

En recientes años el nopal ha resaltado en la industria farmacéutica, en administración como antiulcerogénicos, anti diarreicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos, neuro protectores, etc. (Tilahun y Welegerima, 2018; Aruwa et al., 2019; Perucini-Avenidaño et al., 2021). Estas características comúnmente se basan en su composición y contenido de MSP, atribuidas a los fitoquímicos que presentan sus tejidos, entre ellos se encuentran ácidos grasos, como: ácido palmítico, linolénico y esteárico (Silva et al., 2021); también existen reportes de la presencia de esteroides y carotenoides, además del contenido de múltiples metabolitos secundarios como ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas y estilbenos (Tilahun y Welegerima, 2018). Los compuestos mayormente presentes en la flor de nopal son el ácido gálico y el 3-O-robinobiosido de 6-isoramnetina en concentraciones de 4900 y 4269 mg/100g de materia seca, respectivamente (El-Mostafa et al., 2014).

Las propiedades principales del mucílago incluyen su capacidad para reducir los niveles de glucosa en sangre (hipoglucemiante) y de colesterol (colesterolemia). También se destaca por su capacidad para proteger la mucosa gástrica ulcerada, así como por sus propiedades analgésicas, prebióticas, antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales. Además de sus beneficios en el ámbito de la salud, el mucílago se utiliza en la industria alimentaria como agente espesante, sustituto de grasas, así como para modificar la reología de alimentos. Así mismo, se emplea como biopelículas comestibles para prolongar la vida útil de las frutas (Vargas-Rodríguez et al., 2016; Brindis-Trujillo et al., 2020; Reyes-Buendía et al., 2020; Kassem et al., 2021) .

Además de los compuestos anteriormente mencionados, *Opuntia ficus-indica* contiene diferentes polifenoles, donde se resaltan los flavonoides principalmente del tipo flavonol: isoramnetina (30 - 4269 mg/100 g), quercetina (9 - 447 mg/100 g), kaempferol (1 - 400 mg/100 g), isoquercetina (2.3 - 39.7 mg/100 g), nicotiflorina (2.89 - 146.5 mg/100 g) y rutina (2.36 - 26.17mg/100 g) (Petruk et al., 2017; Aruwa et al., 2019; López-Palacios y Peña-

Valdivia, 2020). En particular los cladodios de nopal presentan glucósidos flavonoides como isoquercetrina, kaempferol-3-O-rutinósido, isorhamnetin-3-O-glucósio e isorhamnetin-3-O-rutinósido en cladodios comerciales cultivados en México (Hernández-Becerra et al., 2022).

### **2.3.5 Propagación de nopal por cultivo de tejidos vegetales de *Opuntia* sp.**

Dentro de la micropropagación de nopal se han realizado diversos estudios con semillas, brotes y areolas de cladodios; en un estudio realizado por Bougdaoua y El Mtili, (2020) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. evaluaron la germinación de semillas cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS) obteniendo una germinación del 57 %, posteriormente las plántulas se subcultivaron en medio MS suplementado con 0.5 mg/L de benciladenina (BA) y obteniendo una proliferación de 12.28 brotes por explante. En otra investigación realizada por El Finti et al. (2012) estudiaron la micropropagación de *Opuntia ficus-indica* cultivado en medio MS suplementado con 0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L de BA, presentando la mayor tasa de multiplicación (15 brotes por explante) en MS con 5 mg/L de BA.

En cuanto a la micropropagación en sistemas de inmersión temporal, Nogueira et al. (2019) evaluaron el cultivo de *Opuntia* y *Nopalea* cv. Miúda, Oreja de elefante mexicana e IPA-Sertânia en BIT, donde 6 frecuencias con 3 min de inmersión por día en medio MS suplementado con 0.5 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 1 mg/L de BA reportaron nula brotación. Es importante considerar los datos reportados para establecimiento en medio semisólido (**Cuadro 2**) como un paso previo al establecimiento en BIT, ya que con ello se asegurará el desarrollo de un protocolo aséptico y potencialmente más productivo para la propagación masiva de *Opuntia* sp.

**Cuadro 2.** Antecedentes de la micropropagación *in vitro* de *O. ficus-indica*.

<b>Especie</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Hormonas</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Tiempo de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
<i>O. ficus-indica</i>	MS semisólido (Brotos de 2 cm)	0.5 mg/L BA	12.28	-	Bougdaoua y El Mtili (2020)
<i>O. ficus-indica</i>	MS semisólido (Brotos de 2 cm)	5 mg/L BA	15	6 semanas de cultivo	El Finti et al. (2010)
<i>O. ficus-indica</i>	MS semisólido	1 mg/L o 2 mg/L Kin	95.75	3 meses	Gebretsadik et al. (2013)
<i>O. ficus-indica</i>	MS semisólido	5 mg/L BA, 1 mg/L AIA 5 mg/L BA, 0.25 mg/L AIA	2.8	8-12 semanas	Ghaffari et al. (2013)
<i>O. ficus-indica</i>	MS semisólido (Brotos de 3 cm)	5 mg/L BA	26.5	-	Khalafalla et al. (2007)
<i>O. ficus-indica</i>	MS semisólido	2 mg/L BA, 0.2 mg/L ANA	5.57	16 semanas	Rodríguez y Ramírez-Pantoja (2020)

(MS) Murashige y Skoog; (-) no mencionado en literatura.

## **2.4 Metabolitos secundarios**

Las plantas cuentan con dos tipos de metabolismo: el primario y el secundario. El metabolismo primario produce compuestos esenciales para su crecimiento y desarrollo, como azúcares, proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos. Por otro lado, el metabolismo secundario les permite sintetizar y acumular una variedad de compuestos de naturaleza química diversa, que no son esenciales para el crecimiento y la reproducción del organismo, pero juegan un papel crucial en su adaptación al estrés ambiental y en su defensa contra predadores y patógenos. Estos compuestos, llamados metabolitos secundarios, son los que dotan a las plantas de características especiales (Yang et al., 2018; Lustre-Sánchez, 2022).

Además de sus funciones en la adaptación al estrés ambiental y la resistencia contra depredadores y fitopatógenos, los metabolitos secundarios de las plantas desempeñan múltiples roles adicionales. Entre ellos, actúan como disuasión de plagas y fitopatógenos, sirven como señales para funciones importantes dentro de la planta y también como señales de comunicación entre las plantas y microorganismos simbióticos, así como atraer polinizadores (Pang et al., 2021).

Durante siglos, los metabolitos secundarios han desempeñado un papel invaluable en la medicina tradicional, la fabricación de perfumes y la industria en general. Con el tiempo, han sido ampliamente utilizados en diversas industrias, como productos farmacéuticos, cosméticos y productos químicos (Yang et al., 2018).

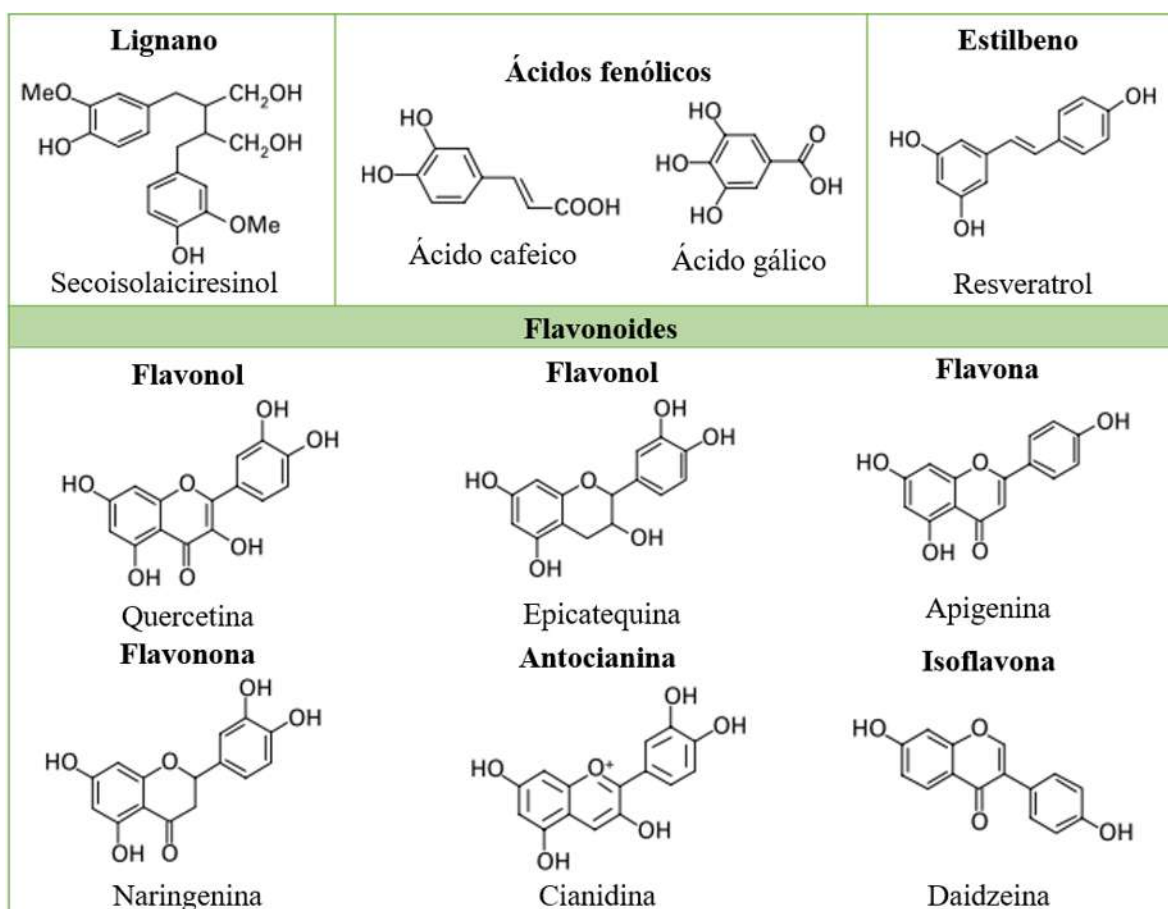
Los metabolitos secundarios como los polifenoles, especialmente los flavonoides, tienen una gran importancia en la dieta humana y, por consiguiente, son comúnmente recomendados como ingredientes en suplementos alimenticios y productos nutracéuticos (Chiocchio et al., 2021). En consecuencia, los metabolitos secundarios han desempeñado un papel esencial en aumentar la importancia comercial y el valor de las plantas (Yang et al., 2018).

### **2.4.1 Polifenoles**

Los polifenoles son compuestos derivados de las plantas mediante las rutas metabólicas: la del ácido shiquímico y del ácido malónico. Su estructura está compuesta por anillos aromáticos con variación de grupos hidroxilados y la mayoría se encuentran en forma conjugada con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático. La diversidad estructural sirve para su clasificación química como lignanos,

ácidos fenólicos, estilbenos y flavonoides (**Figura 3**) (Lizárraga-Velázquez et al., 2018; Ayala-Mata et al., 2019).

Se han descubierto más de 10,000 tipos distintos de polifenoles en los alimentos y sus diferentes modificaciones en la estructura química determinan su biodisponibilidad y eficacia biológica. Estos polifenoles desempeñan un papel fundamental en la apariencia y sabor de los alimentos de origen vegetal, lo que influye directamente en su calidad (Acosta, 2019; Zagorskina et al., 2023).



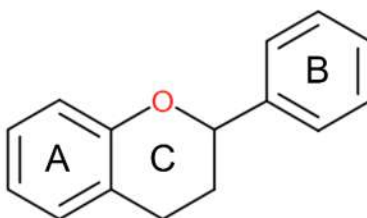
**Figura 3.** Clasificación química de los diferentes polifenoles con ejemplo representativo (Ayala-Mata et al., 2019).

Los efectos benéficos de los polifenoles obtenidos de plantas han sido diversamente publicados por su variedad de efectos anticancerígenos, neuro protectores, antidiabéticos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antitrombóticos, antialérgicos, cardioprotectores, efectos antiperoxidación lipídica, efectos vasodilatadores, así como la capacidad de

neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Ordoñez-Gómez et al., 2018; Fraga et al., 2019; Ordoñez et al., 2019). La actividad antioxidante de polifenoles se encuentra relacionada a su propiedad redox mediante un proceso donde una parte del fenol (grupo hidroxilo en el anillo aromático) funciona como un agente reductor, el cual cede un hidrógeno y quelando oxígeno singlete (Ordoñez-Gómez et al., 2018).

#### 2.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en frutas, verduras, semillas y flores, además de que desempeñan un papel importante en la biología vegetal; la pigmentación que ejercen estos compuestos es útil para la atracción de polinizadores, fotorreceptores, alelopatía y controlan los niveles de auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas (Martínez-Flórez et al., 2002). Los flavonoides, son los polifenoles más ampliamente distribuidos en las plantas, cuentan con una amplia diversidad, donde se han identificado más de 5,000 de ellos. Estos compuestos se caracterizan por tener una estructura esquelética conformada por 15 átomos de carbono, compuesta por dos anillos de benceno (A y B) unidos por un anillo C de pirano de tres átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) (**Figura 4**). La posición del anillo B de catecol en el anillo C de pirano, así como el número y la posición de los grupos hidroxilo en el grupo catecol del anillo B, son determinantes de la capacidad antioxidante de los flavonoides, en cuanto a su clasificación estos se distribuyen en flavonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas, antocianinas y flavononas (Hernández et al., 2019; Días et al., 2021).



**Figura 4.** Estructura general molecular de un flavonoide.

Los flavonoides presentes de manera natural se encuentran almacenados en forma de glucósidos y conjugados no glicosilados. La naturaleza de la fracción puede tener un impacto en la biodisponibilidad de los flavonoides en el organismo humano (Martínez-Flórez et al., 2002; Ayala-Mata et al., 2019; Fraga et al., 2019). Son compuestos altamente valorados en medicina debido a su amplio espectro de propiedades beneficiosas. Estas sustancias exhiben

efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antibacterianos, lo que les confiere la capacidad de neutralizar los radicales libres, reducir la inflamación y combatir patógenos microscópicos. Además, numerosos estudios han respaldado su potencial para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y proteger contra la formación de tumores malignos (Yang et al., 2020; Moreira et al., 2021). Además, tienen la capacidad de quelar o fijar ciertos metales, como el hierro y el cobre. Esta capacidad de interacción con metales puede tener implicaciones significativas en procesos biológicos y en la biodisponibilidad de estos nutrientes en el organismo (Hernández, 2019).

### **2.4.3 Biosíntesis de flavonoides**

En las plantas, la biosíntesis de flavonoides es un proceso fundamental. Estos compuestos no solo se sintetizan internamente, sino que también desempeñan un papel crucial en la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis. En esta fase, los flavonoides catalizan el transporte de electrones, siendo estimulados por el estrés oxidativo. Este último es desencadenado por la producción de especies reactivas de oxígeno, generadas como parte de las funciones metabólicas normales de las plantas (Nabavi et al., 2020). Son sintetizados a partir de flavononas derivadas a su vez de chalconas provenientes de la ruta fenilpropanoide. Los precursores de los flavonoides proceden de la ruta común fenilpropanoide que tiene su inicio con la conversión de fenilalanina en ácido cinámico por la enzima PAL (fenilalanina-amonio liasa). El ácido cinámico es convertido en ácido 4-cumárico (*p*-cumárico) por la cinamato-4 hidroxilasa. En algunas plantas, la PAL exhibe también actividad de TAL (tirosina-amonio liasa) sobre la tirosina para generar directamente ácido 4-cumárico. En el siguiente paso, el ácido 4-cumárico es transformado en 4-cumaroil-CoA por la 4CL (4-cumarato CoA ligasa). La 4-cumaroil-CoA, un producto central de la ruta fenilpropanoide, es condensada con 3 moléculas de malonil CoA para formar naringenina-chalcona o pinocembrina chalcona por la enzima chalcona sintetasa. Después de esta reacción, la chalcona isomerasa (CHI) cíclica a la naringenina o pinocembrina chalcona mediante la isomerización estereoespecífica para formar las flavanonas naringenina o pinocembrina. Las flavanonas son ulteriormente modificadas por enzimas de la ruta flavonoide para generar una amplia diversidad de derivados (Martínez-Flórez et al., 2002; Serrano, 2007).

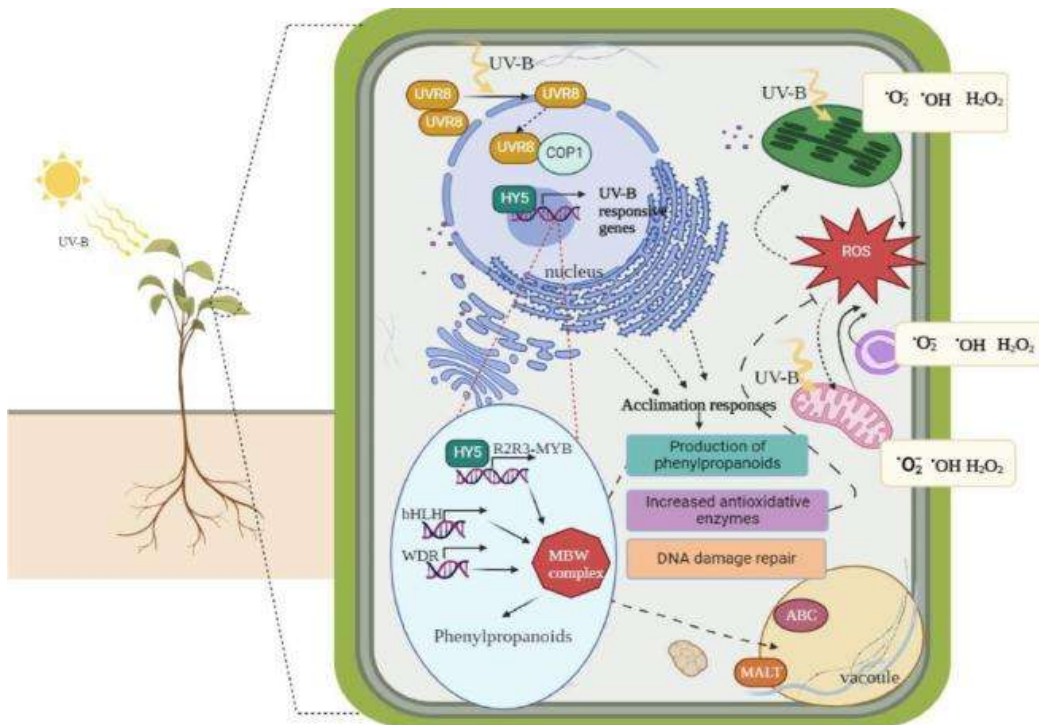
#### **2.4.4 Influencia de la luz en la producción de flavonoides**

La calidad y cantidad de luz a la que las plantas están expuestas juegan un papel crucial en la regulación de los niveles de flavonoides. Las plantas han evolucionado diferentes tipos de fotorreceptores que reaccionan a fotones de longitudes de onda específicas, incluyendo fitocromos que responden a la luz roja/rojo lejano (phyA-E), criptocromos que son sensibles a la luz azul (cry1 y cry2), fototropinas (phot1 y phot2), proteínas de la familia Zeitelupe (ztl, fkl1 y lkp1), así como LOCUS 8 de resistencia UV que detecta la radiación ultravioleta (UV)-B (UVR8) (Hashim et al., 2021; Podolec et al., 2021). Se ha demostrado que el fotorreceptor fitocromo-B (PHYB) y la histona desacetilasa-6 (HDA6) desempeñan un papel crucial en la regulación de la biosíntesis de flavonoides. Estas proteínas están implicadas en la activación de los genes responsables de la síntesis de flavonoides en respuesta a las señales de luz, lo que tiene un impacto directo en la calidad y cantidad de estos compuestos en las plantas (Tessadori et al., 2009).

La exposición intensa a la radiación fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés) puede desencadenar la biosíntesis de flavonoides como una respuesta adaptativa a condiciones ambientales estresantes. Esta respuesta adaptativa permite que la planta funcione como un eliminador de ROS y se proteja de los efectos perjudiciales de la radiación. Los flavonoides actúan como compuestos antioxidantes y ayudan a neutralizar los ROS generados por la radiación, contribuyendo así a la protección y supervivencia de la planta en entornos desafiantes (Ferreira et al., 2021).

La presencia de ciertos flavonoides en el cloroplasto indica que desempeñan una función relacionada con la eliminación del oxígeno singulete generado durante la fotosíntesis. Su papel es crucial para mantener la integridad y eficiencia de la maquinaria fotosintética, asegurando un funcionamiento adecuado del proceso de fotosíntesis en las plantas (Agati et al., 2007). Los flavonoides que se encuentran en niveles elevados en los cloroplastos, como la quercetina y la luteolina, son conocidos por tener sustituciones dihidroxiladas en el anillo B. Estos flavonoides son considerados los inhibidores más efectivos de ROS. Su capacidad para neutralizar y eliminar las ROS dentro de los cloroplastos los convierte en importantes protectores antioxidantes, preservando así la integridad y el funcionamiento eficiente de la maquinaria fotosintética (Ferreira et al., 2021).

La luz UV-B es absorbida por los compuestos fenilpropanoides, incluyendo ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y los flavonoides (**Figura 5**) (Singh et al., 2023). Los factores de transcripción R2R3-MYB controlan la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides. Estos factores de transcripción desempeñan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de flavonoides (Stracke et al., 2007). La radiación UV-B induce la producción de la proteína UVR8, la cual desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica. Se ha observado que UVR8 se une a regiones específicas de la cromatina de varios genes, incluyendo el locus genómico conocido como HY5 (hipocótilo alargado 5). HY5 es considerado un efector clave de la vía UVR8 y tiene la capacidad de controlar la expresión de la mayoría de los genes objetivo de UVR8 (Favory et al., 2009). La interacción entre UVR8 y HY5 es fundamental para la activación de los genes responsables de la síntesis de flavonoides y otros procesos relacionados con la protección y adaptación (Singh et al., 2023). En *Opuntia* sp. la radiación UV-B se detecta a través del fotorreceptor UVR8, el cual activa un compendio de señalizaciones a través de los reguladores como el represor de fotomorfogénesis 1 UV-B (RUP1), COP1 y HY5 (Ortega-Hernández et al., 2019).



**Figura 5.** Respuesta de los fenilpropanoides a la radiación UV-B en células vegetales (Singh et al., 2023).

Diversos trabajos demuestran que cada especie de planta hace uso de una longitud de onda específica, así como la intensidad para la producción de metabolitos secundarios, incluidos los flavonoides, tal como mostraron Fazal et al. (2016), en callo de *Prunella vulgaris* con radiación azul cultivado por 3 semanas, donde se registró un incremento de polifenoles y flavonoides. Taulavuori et al., (2018), en su estudio realizado con diferentes especies de hierbas como albahaca (*Ocimum basilicum*), rúcula (*Eruca sativa*) y romaza roja (*Rumex sanguineus*), evaluaron la exposición con luz azul y azul-violeta, reportaron que en ambos tratamientos se mejoraron la producción de fitoquímicos en albahaca y rúcula en comparación con el control que constó de luz blanca. En albahaca las concentraciones de ácido p-OH-cinámico, derivado de ácido clorogénico 2 y ácido cicórico aumentaron significativamente. En rúcula los derivados de isorhamnetin-diclycoside y luteolin-glucoside tuvieron un aumento en su producción. Kawka et al. (2017), en brotes *in vitro* de *Scutellaria lateriflora* bajo luz azul destacan un incremento de glucurónidos, baicalin, wogonósido y verbascósido. Así mismo Pedroso et al. (2017), en su trabajo con *Hyptis murruboides* cultivado por 30 días bajo luz azul evidenciaron un aumento en el flavonol rutina. Matysiak y Kowalski (2019), en su trabajo con diferentes tipos de iluminación mencionan que los índices de flavonoles en albahaca, canónigo y rúcula se mejoraron tras el uso de iluminación con luz led blanca en comparación con el control con un índice de 0.63 frente a 0.39, 0.11 – 0.02 y 0.46 – 0.11 respectivamente. También mencionan que la luz led azul es eficaz para estimular la biosíntesis de flavonoides. Las plantas cultivadas bajo luz led azul evidenció un aumento de 33 % de flavonoles en caso de albahaca, un 25 % más en lechuga y un 26 % más en rúcula, en comparación al efecto de la luz led blanca. Wang et al. (2018), en su trabajo con *Anoectochilus roxburghii* cultivado en cámara de crecimiento con irradiaciones de luz azul (8 h por 40 días) argumentan un aumento en la concentración de polifenoles y flavonoides en un 24.2 %. Varios estudios demuestran que la luz UV-B es efectiva para inducir la producción de flavonoides, como se muestra en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Impacto de la irradiación con luz UV-B en la producción de compuestos bioactivos en plantas.

<b>Especie</b>	<b>Exposición</b>	<b>Método de cultivo</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pisum sativum</i>	3 h por 60 días después de germinación	<i>ex vitro</i>	Aumento del contenido de kaempferol (72 %) y quercetina (114 %)	Choudhary y Agrawal (2014)
<i>Medicago sativa</i>	8 h por día	<i>ex vitro</i>	Niveles bajos de UV-B mejoraron el contenido de flavonoides	Gao et al. (2019)
<i>Sideroxylon capiri</i>	4 h	<i>in vitro</i> callo, MS, 1 mg/L 2,4-D y 1 mg/L TDZ	Aumento significativo del contenido de fenoles y flavonoides.	Martínez-Silvestre et al. (2022)
<i>Carum copticum</i>	30 min por 15 días	<i>in vitro</i> MS 4 uM BA	Disminución de clorofilas totales, así como carotenoides, aumento en el contenido de fenoles y antocianinas.	Mehranzadeh et al. (2020)
<i>Hypericum retusum Aucher</i>	45 min por 5 días	<i>in vitro</i> MS, 0.5 mg/L BA	Acumulación de fenoles, flavonoides e hipericina	Namlı et al. (2014)
<i>Withania coagulans</i>	4 – 5 h	<i>in vitro</i>	Mejora total de fenoles 1.72 y 1.76 veces más que el control, influencia negativa en el contenido de clorofila y maquinaria fotosintética.	Tripathi et al. (2021)

#### **2.4.5 Cromatografía de capa fina (CCF)**

La mejora del contenido de flavonoides en las plantas se ha convertido en un objetivo atractivo para satisfacer las crecientes demandas alimentarias. Comprender la producción y el perfil de flavonoides en diferentes variedades de plantas, así como las diferencias inducidas por factores genéticos, al ambiente de crecimiento y métodos de cultivo, son necesarias para desarrollar estrategias efectivas de mejora de cultivos y garantizar la seguridad alimentaria. El análisis detallado del perfil de flavonoides permite la identificación precisa de estos compuestos y su variabilidad en respuesta a diversos factores, lo que proporciona información valiosa para la selección y el desarrollo de variedades de plantas con perfiles nutricionales y funcionales mejorados (Fuentes-Alventosa et al., 2008; Sarker y Oba., 2020).

La cromatografía en sentido general se define como un proceso mediante el cual una mezcla es separada en sus diferentes elementos individuales. Este proceso se basa en la distribución de equilibrio entre dos fases (Patel et al., 2022).

La cromatografía de capa fina (CCF) se centra en adsorción sólido-líquido, este proceso ocurre cuando la fase estacionaria (muestra) interacciona con la fase móvil líquida a través de una interacción de alta superficie. Además, una fase gaseosa satura la cámara lo que repercute drásticamente en los resultados de separación (Cai, 2014; Patel et al., 2022). En la técnica, las moléculas son corridas entre dos estados, libre (moléculas disueltas en la fase móvil) y adsorbido (moléculas adheridas temporalmente a la fase estacionaria por fuerzas intermoleculares). El movimiento de las sustancias a través de la placa depende de diferentes fuerzas entre moléculas (Cai, 2014). Esta técnica se enfoca a la regla de solubilidad la cual menciona que “Lo semejante se disuelve en lo semejante”, en este sentido si la muestra comparte compuestos similares a la fase móvil líquida, esta será llevada más lejos en la cromatoplaca. Los compuestos menos afines a la fase móvil líquida y más similar a la cromatoplaca se quedarán en la parte posterior, realizando así la separación de compuestos (Kumar et al., 2013; Patel et al., 2022).

Los compuestos ya separados en la CCF son generalmente visualizados por absorbancia o fluorescencia, ya sea originada por el propio elemento o amplificada por agentes reveladores (Vallejo-Rosero et al., 2021).

Esta técnica es empleada en la industria alimentaria para separar e identificar compuestos orgánicos, estudiar varias reacciones, caracterización y aislamiento de varios compuestos como ácidos, alcoholes, glicoles, amidas, alcaloides, vitaminas, aminoácidos, proteínas, así como en la determinación de pesticidas y/o fungicidas y metabolitos secundarios como los flavonoides (Bele y Khale, 2011; Patel et al., 2022).

### III. JUSTIFICACIÓN

*Opuntia* sp. es un cultivo mundialmente conocido por ser aprovechado como forraje, materia prima para la elaboración de productos con valor agregado, así como su importancia en el área de los alimentos y la salud, debido a su contenido nutricional y tipo y concentración de metabolitos, en donde destacan los flavonoides. Los flavonoides han sido ampliamente reconocidos por sus propiedades bioactivas como anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, entre otras. Por lo cual, la industria farmacéutica y alimentaria han intensificado el interés en productos naturales como éstos.

No obstante, el número de factores que afectan la producción de flavonoides dentro de las cactáceas, en particular en el género *Opuntia*, restringe su obtención en cantidad y calidad adecuada, lo que resulta en un ineficiente aprovechamiento. Así pues, se genera la necesidad de buscar estrategias para controlar y/o aumentar la producción de flavonoides en plantas de *Opuntia* sp.; por ello los biorreactores de inmersión temporal (BIT, herramientas derivadas del cultivo de tejidos vegetales), pueden ser una alternativa para estudiar el efecto de variables en la producción, concentración y tipo de flavonoides a producir. De esta manera el presente proyecto aportó evidencias para el uso de BIT en la mejora alimenticia de especies del género *Opuntia*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La aplicación de una longitud de onda lumínica azul en biorreactores de inmersión temporal incrementa la acumulación de flavonoides totales en brotes de *Opuntia* sp, comparado con el sistema de medio semisólido.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de una longitud de onda lumínica azul en el perfil de flavonoides de extractos de brotes de *Opuntia* sp, cultivados en biorreactores de inmersión temporal y en medio semisólido.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Optimizar un protocolo de biorreactores de inmersión temporal para la proliferación de brotes de *Opuntia* sp.
2. Evaluar y comparar el contenido de mucílago y clorofila en extractos de brotes de *Opuntia* sp., cultivados en medio semisólido, sistema BIT, así como de plantas *in situ*.
3. Determinar el contenido de flavonoides totales y actividad antioxidante por efecto de una onda lumínica en extractos etanólicos de brotes de *Opuntia* sp., cultivados en medio semisólido, sistemas BIT.
4. Analizar el perfil de flavonoides por cromatografía de capa fina de extractos de brotes de *Opuntia* sp. cultivados en medio semisólido y sistema BIT, así como de plantas *in situ*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Recolecta y establecimiento *in vitro*

El material vegetal *Opuntia* sp. de partida para el establecimiento del cultivo *in vitro* se recolectó a partir de plantas madre establecidas en un huerto en Ziracuaretiro, Michoacán (coordenadas 19°24'17.2" N y 101°53'54.2" O). Se seleccionaron cladodios fisiológica y sanitariamente adecuados. Los cladodios fueron colocados en cajas de cartón, para ser trasladados al laboratorio de bromatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en Uruapan, Michoacán.

Se realizó un lavado de los cladodios en una solución de agua con 4 g/L de jabón roma®, 0.1 % de cloro cloralex® y 0.1 % de cloruro de benzalconio durante 40 min posteriormente se aplicó una desinfección con una solución de 5 g/L de oxitetraciclina y 5 g/L de benomilo durante 4 h en constante agitación.

Posteriormente los explantes fueron llevados a campana de flujo laminar donde se realizó la asepsia correspondiente a cada tratamiento (**Cuadro 4**) y se sembraron en medio semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y pH ajustado a 5.7.

**Cuadro 4.** Tratamientos para el establecimiento de *Opuntia* sp.

<b>Tratamiento</b>	<b>Solución detergente 4 g/L y cloro 0.1 %</b>	<b>Solución biocida (oxitetraciclina y benomilo 5 g/L)</b>	<b>Alcohol 70 %</b>	<b>Cloro 6 %</b>
<b>EV-0</b>	40 min	-	-	-
<b>EV-1</b>	40 min	4 h	-	-
<b>EV-2</b>	40 min	4 h	30 s	5 min
<b>EV-3</b>	40 min	4 h	30 s	10 min
<b>EV-4</b>	40 min	4 h	30 s	15 min

Cada tratamiento fue resumido con la letra "EV" seguido del número correspondiente. (-) indica ausencia de exposición a solución.

## 6.2 Optimización de protocolo de micropropagación de *Opuntia* sp. en biorreactores de inmersión temporal

Con los explantes de *Opuntia* sp. establecidos asépticamente se evaluaron los siguientes parámetros, tiempos de inmersión, concentraciones y tipos de hormonas y volumen de medio (mL). Para contrastar resultados se cultivaron explantes en MSS (medio semisólido) con las mismas variantes de hormonas.

### 6.2.1 Frecuencias de inmersión

Se subcultivaron plántulas con una longitud de 1 cm en biorreactores de inmersión temporal. A cada frasco gemelo se le añadió 300 mL de medio MS completo, suplementado con 1 mg/L de BA, 30 g/L de sacarosa y pH ajustado a 5.8. Se evaluó el parámetro de frecuencias de inmersión que constó de los tratamientos representados en el **Cuadro 5**. Las variables evaluadas fueron longitud del cladodio (cm), biomasa (g) y número de brotes.

**Cuadro 5.** Tratamientos para el parámetro frecuencias de inmersión de plántulas de *Opuntia* sp. en BIT y MSS.

Tratamiento	Ciclos por día	Exposición de plantas a medio	Toma de datos (días)
FI-3	3	3 min	30
FI-4	4	3 min	30
FI-6	6	3 min	30
MSS-C	-	24 h	30

Para resumir cada tratamiento se utilizó las letras “FI” (frecuencias de inmersión) y MSS-C (medio semisólido control) seguido del número del tratamiento.

### 6.2.2 Inducción de brotes axilares en BIT y MSS

Para la inducción de brotes en BIT y MSS se evaluó la adición de diferentes hormonas, benciladenina (BA), meta-topolina (mT) y ácido 1-naftalenacético (ANA), para esto se colocaron 5 explantes de 1 cm de longitud previamente establecidos en BIT, con medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, pH ajustado a 5.8 y combinaciones de hormonas correspondientes a cada tratamiento (**Cuadro 6**) así mismo se replicaron los mismos tratamientos en MSS. Se evaluó la longitud de cladodio (cm), biomasa (g), número de brotes así como polifenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante

**Cuadro 6.** Tratamientos para el desarrollo de plántulas de *Opuntia* sp. cultivadas en BIT y MSS.

Tratamiento	BA	mT	ANA
<b>BH-0</b>	-	-	-
<b>BH-1</b>	1 mg/L	-	-
<b>BH-2</b>	-	1 mg/L	-
<b>BH-3</b>	1 mg/L	-	0.5 mg/L
<b>BH-4</b>	-	1 mg/L	0.5 mg/L
<b>MH-0</b>	-	-	-
<b>MH-1</b>	1 mg/L	-	-
<b>MH-2</b>	-	1 mg/L	-
<b>MH-3</b>	1 mg/L	-	0.5 mg/L
<b>MH-4</b>	-	1 mg/L	0.5 mg/L

Para resumir cada tratamiento se utilizó las letras “BH” (BIT) y “MH” (MSS). Los tratamientos utilizados como control en ausencia de hormona se referencian con “BH-0” y “MH-0”. (-) indica ausencia de hormona.

### 6.2.3 Volumen de medio nutritivo en BIT

Para estudiar el desarrollo de *Opuntia* sp. en BIT, se emplearon diferentes volúmenes de medio nutritivo. A cada frasco gemelo se le suministro medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa y 1 mg/L de meta-topolina (mT), con un pH ajustado a 5.8. La variación en el volumen del medio se aplicó según los tratamientos indicados en el **Cuadro 7**. Las variables evaluadas fueron longitud del cladodio (cm), biomasa (g) y número de brotes.

**Cuadro 7.** Tratamientos para el parámetro volumen de medio en BIT.

Tratamiento	Volumen de medio (mL)
<b>VB-1</b>	200
<b>VB-2</b>	300
<b>VB-3</b>	400

Para facilitar la distinción de los tratamientos se colocó la letra “V” de volumen, seguido del número del tratamiento.

### 6.3 Longitudes de onda lumínica

Se investigó el impacto de diferentes longitudes de onda (luz blanca, luz azul y luz ultravioleta B) en cultivos de biorreactores de inmersión temporal (BIT) y medio semisólido

(MS) durante un periodo de 30 días. Se diseñaron cuatro tratamientos, utilizando los cultivos con luz blanca como grupo control (**Cuadro 8**). Al término del período de cultivo, se evaluaron las variables de contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

**Cuadro 8.** Tratamientos para el parámetro longitud de onda lumínica en *Opuntia* sp. cultivado en BIT y MSS; LB (Luz blanca), LA (Luz azul), UVB (Ultravioleta B).

Tratamiento	$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	H luz	H oscuridad	Exposición a UVB
<b>BIT LB</b>	84.74	16	8	-
<b>BIT LA</b>	23.90	16	8	-
<b>BIT UVB</b>	1.94	16	8	15 min
<b>MSS LB</b>	84.74	16	8	-
<b>MSS LA</b>	23.90	16	8	-
<b>MSS UVB</b>	1.94	16	8	15 min

Para distinguir los tratamientos se implementó las literales “BIT” y “MSS” seguido de la longitud de onda específica.

#### 6.4 Extractos de *Opuntia* sp.

Para la estandarización del proceso de extracción de MSP (metabolitos secundarios de plantas), se utilizó planta madre (PM) *in situ* de *Opuntia* sp. las cuales fueron sometidas a extracción etanólica y metanólica, siguiendo los protocolos previamente establecidos por Tranquilino-Rodríguez et al., (2020) y López-Palacios y Peña-Valdivia (2020). Por lo que se deshidrataron cladodios y se trituraron usando una licuadora. Posteriormente se realizaron extractos de polvo de *Opuntia* sp. y solvente en relación 1:10 p/v, posteriormente se llevaron a incubación según tratamiento (**Cuadro 9**). Los extractos fueron centrifugados para recuperar el sobrenadante. Consecuente a la realización del análisis de los extractos, se utilizó el tratamiento que mejores resultados evidenció para la evaluación de los MSP de los sistemas BIT y MSS.

**Cuadro 9.** Tratamientos formulados para la elaboración de extractos de *Opuntia* sp.

Tratamientos	Solvente	Temperatura	Tiempo	Sonicación
<b>E-1</b>	Etanol 79 %	76 °C	2 h	15 min

<b>E-2</b>	Etanol 79 %	76 °C	4 h	15 min
<b>E-3</b>	Etanol 79 %	90 °C	2 h	15 min
<b>E-4</b>	Etanol 79 %	90 °C	4 h	15 min
<b>E-5</b>	Etanol 79 %	76 °C	2 h	-
<b>E-6</b>	Etanol 79 %	90 °C	2 h	-
<b>M-1</b>	Metanol 60 % / HCl 6 M	76 °C	2 h	15 min
<b>M-2</b>	Metanol 60 % / HCl 6 M	76 °C	4 h	15 min
<b>M-3</b>	Metanol 60 % / HCl 6 M	90 °C	2 h	15 min
<b>M-4</b>	Metanol 60 % / HCl 6 M	90 °C	4 h	15 min
<b>M-5</b>	Metanol 60 % / HCl 6 M	76 °C	2 h	-
<b>M-6</b>	Metanol 60 % / HCl 6 M	90 °C	2 h	-

Para la identificación de tratamientos se implementó las letras “E” (Etanol 79 %) y “M” (Metanol 60 % / HCl 6 M) seguido del número de tratamiento.

#### **6.4.1 Cuantificación de fenoles totales**

Los fenoles se ensayaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu, como lo descrito por Tranquilino-Rodríguez et al., (2020) con menores modificaciones. Se añadió una alícuota de 100 µL del extracto a 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 15 % se agitó y se incubó durante 30 min posteriormente se añadieron 800 µL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro SmartSpec Plus. La curva patrón se realizó con solución de ácido gálico con 5 puntos de referencia. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/g PS).

#### **6.4.2 Determinación de flavonoides totales**

La determinación de flavonoides totales se realizó por espectrofotometría basándose en lo reportado por Lindawati (2018) con menores modificaciones; se tomó una alícuota de 70 µL de cada uno de los extractos proveniente de *Opuntia* sp., se le agregó 210 µL de etanol, 14 µL de una solución de AlCl<sub>3</sub> al 10 %, 14 µL de solución de acetato de potasio al 1 M y 392 µL de agua destilada, obteniendo un volumen total de 700 µL; la mezcla se incubó por 30 min. Su absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda 415 nm. La curva patrón se realizó con quercetina utilizando 6 puntos de referencia. Las unidades fueron expresadas en miligramos equivalentes de quercetina (mg EQ/g).

### 6.4.3 Actividad antioxidante

#### 6.4.3.1 Ensayo antioxidante ABTS

La actividad neutralizante del radical ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) fue medida bajo la metodología reportada por Tranquilino-Rodríguez et al. (2020) con menores modificaciones. Se elaboró una solución stock 2:1 v/v de ABTS 7 mM y 2.45 mM de solución de persulfato de potasio y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 12 h, posteriormente se ajustó con etanol hasta una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  nm a 734 nm. Consecuentemente, se mezcló 10  $\mu$ L de cada muestra con 990  $\mu$ L de la solución ABTS preparada hasta completar un volumen total de 1000  $\mu$ L. Pasados 15 min, se midió la absorbancia a 734 nm y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/g PS). La capacidad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición ABTS} = \left[ \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right] * 100$$

Donde:

$A_{\text{blanco}}$  = Absorbancia del blanco.

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra.

#### 6.4.3.2 Ensayo antioxidante DPPH

Para evaluar la capacidad antioxidante se midió la neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) mediante lo reportado por Tranquilino-Rodríguez et al. (2020), con menores modificaciones. Se tomó una alícuota de 30  $\mu$ L de la muestra, se mezcló con 120  $\mu$ L de agua destilada y 350  $\mu$ L de 0.1 mM de solución de etanol 80 %/DPPH, para obtener un volumen de 500  $\mu$ L. Las muestras se agitaron durante 10 seg y se mantuvieron durante 30 min en oscuridad. Se realizó la curva de calibración con ácido gálico utilizando 5 puntos como referencia. Posteriormente se leyó la absorbancia a 517 nm y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/g PS). La capacidad antioxidante se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición DPPH} = \left[ \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right] * 100$$

Donde:

$A_{\text{blanco}}$  = Absorbancia del blanco.

$A_{\text{muestra}}$  = Absorbancia de la muestra.

#### **6.4.3.3 Ensayo antioxidante FRAP**

El poder reductor de ion férrico se basó en lo reportado por Urrea-Victoria et al. (2016). Para esto, se prepararon tres soluciones (A, B y C), las cuales fueron formuladas con los siguientes componentes:

- A) 0.3 M de acetato de sodio disuelto en 230 mL de agua destilada. pH ajustado a 3.6 con 3 mL de ácido acético glacial y aforar volumen a 250 mL.
- B) 10 mM de 2, 4, 6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ), en 5 mL ácido clorhídrico al 40 mM.
- C) 20 mM de cloruro férrico en 5 mL de agua destilada.

Se mezclaron las soluciones anteriores en una proporción 10:1:1. Se tomó 265  $\mu\text{L}$  de esta mezcla y se adiciono 20  $\mu\text{L}$  de extracto con 15  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se incubó durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm. Como estándar se utilizó una solución de ácido gálico usando 5 puntos como referencia.

#### **6.5 Cuantificación de clorofila**

El contenido de pigmentos vegetales (clorofila) se evaluó por el método espectrofotométrico reportado por Hynstova et al., (2018). Se pipetearon 50  $\mu\text{L}$  de extractos ya preparados (10 mg de muestra en 1 mL de acetona) en la celdilla de cuarzo y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de acetona. Obteniendo una dilución 4x del extracto de origen para obtener los valores máximos de absorbancia máximo 1.00 unidades de absorbancia (UA). Se realizaron 4 repeticiones por cada tratamiento. Los diferentes pigmentos; clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), clorofilas totales (Ca+Cb), carotenoides totales (Cx+c) y clorofilas y carotenoides totales (Ccc), se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$Ca = (11.24 * A_{662}) - (2.04 * A_{645}) [\mu\text{g/mL}]$$

$$Cb = (20.13 * A_{645}) - (4.19 * A_{662}) [\mu\text{g/mL}]$$

$$Ca + Cb = (7.05 * A_{662}) + (18.09 * A_{645}) [\mu\text{g/mL}]$$

$$Cx + c = (1000 * A470 - 1.90 * Ca - 63.14 * Cb)/214) [\mu\text{g/mL}]$$

$$Ccc = (Ca + Cb) + (Cx + c) [\mu\text{g/mL}]$$

Feofitinas totales (Cf) con la ecuación a continuación y se expresaron en  $\mu\text{g}$  por mL de solución de extracto de pigmento. Luego, los resultados se informaron en mg/g PF (peso fresco).

$$Cf = (3213 * A653) - (208.4 * A654) [\mu\text{g/mL}]$$

## 6.6 Extracción y cuantificación de mucílago

Para cuantificar el mucílago, se pesaron 5 g de muestra. Posteriormente se agregaron 5 mL de agua destilada y se mantuvieron 15 min a baño María en ebullición; el líquido sobrenadante se sometió a centrifugación por 10 min para su separación, se recuperó el sobrenadante y se repitió el proceso anterior. El producto de la extracción se colectó en un recipiente, se le añadió etanol (enfriado previamente a  $-18^{\circ}\text{C}$ ) en proporción 1:3 (p/v) y se resguardo por 24 h a  $5^{\circ}\text{C}$ . El mucílago se separó por centrifugación a 2500 g (3000 rpm) por 5 min y se colocó en papel filtro y se pesó para su análisis (Maki-Díaz et al., 2015).

## 6.7 Cromatografía de capa fina (CCF)

Esta prueba se realizó a los tratamientos que presentaron mayor acumulación de flavonoides con la metodología establecida en el laboratorio de bromatología de la Facultad de agrobiología “Presidente Juárez”. Se empleó una placa (CCF) de aluminio de gel de sílice recubierto con indicador fluorescente F254 con un tamaño de 10 x 20 cm, a dicha placa se le realizó una línea inferior de 1 cm y en la parte posterior de 0.5 cm como referencia.

Para lograr la migración adecuada de los compuestos fenólicos de los extractos, se llevó a cabo previamente una hidrólisis siguiendo lo reportado de Santos-Zea et al., (2011). Consistió en colocar 50  $\mu\text{L}$  de extracto en un tubo Eppendorf y agregar 3  $\mu\text{L}$  de HCl 3.2 M, luego se llevó a cabo una digestión a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Posteriormente, utilizando tubos capilares de vidrio, se depositaron 7.5  $\mu\text{L}$  de extracto de *Opuntia* sp. con y sin hidrólisis. De la misma manera, se aplicaron 7.5  $\mu\text{L}$  de estándares comerciales de quercetina, kaempferol, catequina, ácido p-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido gálico, todos a concentraciones de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Antes de preparar la CCF, la cámara se saturó con los vapores de la fase móvil líquida

(metanol, acetato de etilo y hexano en relación 1:3:6). Posteriormente se colocó la CCF en la cámara saturada cuidando que la fase móvil no tuviera contacto con la muestra.

La CCF se extrajo cuando la fase móvil alcanzó la línea superior de referencia. El desplazamiento y separación de los compuestos se observó bajo la lámpara UV a 365 nm y 254 nm, además de aplicar DPPH al 10 % y AlCl<sub>3</sub> al 2 % como reveladores. Mediante las distancias recorridas por los compuestos en la CCF, se calcularon los correspondientes valores de Fr (factor de retención) con la siguiente ecuación:

$$Fr = \frac{Dr}{Dt}$$

Donde: Fr (factor de retención), Dr (distancia recorrida por el compuesto) y Dt (distancia total recorrida por el solvente).

## **6.8 Análisis estadístico**

El diseño experimental fue completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza con comparación de medias utilizando la prueba de HSD de Tukey para diferencias mínimas significativas con un intervalo de confianza de 95 %. Se efectuó un análisis de varianza de efectos simples para los parámetros de establecimiento de BIT, MSS y PM. Así como para la comparación de extractos, fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante, clorofilas y mucílago.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico JMP. El ANOVA se aplicó para determinar diferencias significativas entre tratamientos y cuando fueron significativas se sometieron a la prueba de HSD de Tukey al 5 % de probabilidad ( $p \leq 0.05$ ).

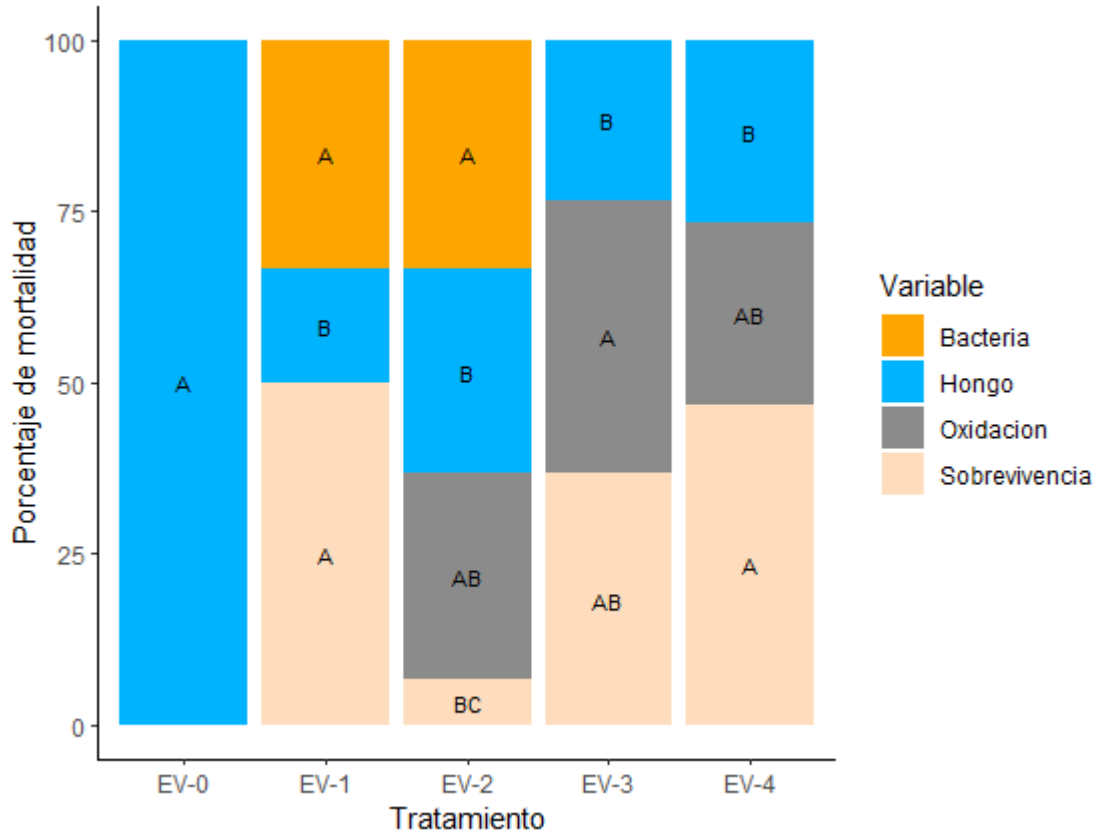
## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Recolecta y establecimiento *in vitro*

El material vegetal para el desarrollo de esta investigación se recolectó de un huerto de nopal ubicado en Ziracuaretiro, Michoacán, con coordenadas 19°24'17.2" N y 101°53'54.2" O. Para el correcto conocimiento del material biológico de partida con el que se trabajó, se mandaron a identificación pencas de nopal previamente deshidratadas las cuales fueron recibidas y depositadas en el Instituto de Ecología, A. C. (INECOL), mismas que fue identificada como *Opuntia velutina* con base a características morfológicas y registrada con número IEB-273300.

Dentro de los resultados para establecimiento *in vitro*, se observaron porcentajes de mortalidad por contaminación de 16.67 a 100 % (**Figura 6**), en el cual EV-0 (control) reportó estadísticamente la mayor pérdida. La mortalidad por oxidación mostró porcentajes entre 26.67 a 40 %, contrario a un porcentaje de explantes establecidos de 0 a 50 %, donde el control (EV-0) obtuvo nulo porcentaje de explantes establecidos *in vitro*, no obstante, los tratamientos EV-1, EV-3 y EV-4 mostraron los mayores valores de sobrevivencia estadísticamente iguales, siendo el EV-1 el adecuado para el protocolo de establecimiento, ya que se reduce la aplicación de solventes, el cual evita la oxidación.

En trabajos reportados en literatura para el establecimiento, Juárez y Passera (2002), al trabajar con *Opuntia ellisiana* Griff reportaron alrededor de un 12 % de explantes contaminados, tras una asepsia que constó de Tween 80, hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio. Además, Mabrouk et al. (2021), al establecer *Opuntia* spp. con hipoclorito de calcio y Tween 20 evidenciaron un promedio de sobrevivencia cerca del 100 % y mediante un perfil de predicción recomiendan una solución de hipoclorito de calcio (4.23 %) y Tween 20 (0.4 %) por un tiempo de 10 min para el establecimiento. Si bien el uso de agentes desinfectantes como hipoclorito de calcio/sodio, cloruro de benzalconio y Tween puede ser una opción para aumentar el porcentaje de establecimiento (sobrevivencia), llegan a tener efectos en el material vegetal como oxidación o necrosis, por lo cual prescindir de ellos se refleja en resultados efectivos, como en el presente trabajo donde con solución jabonosa y biocida se obtuvo un 50 % de explantes establecidos.



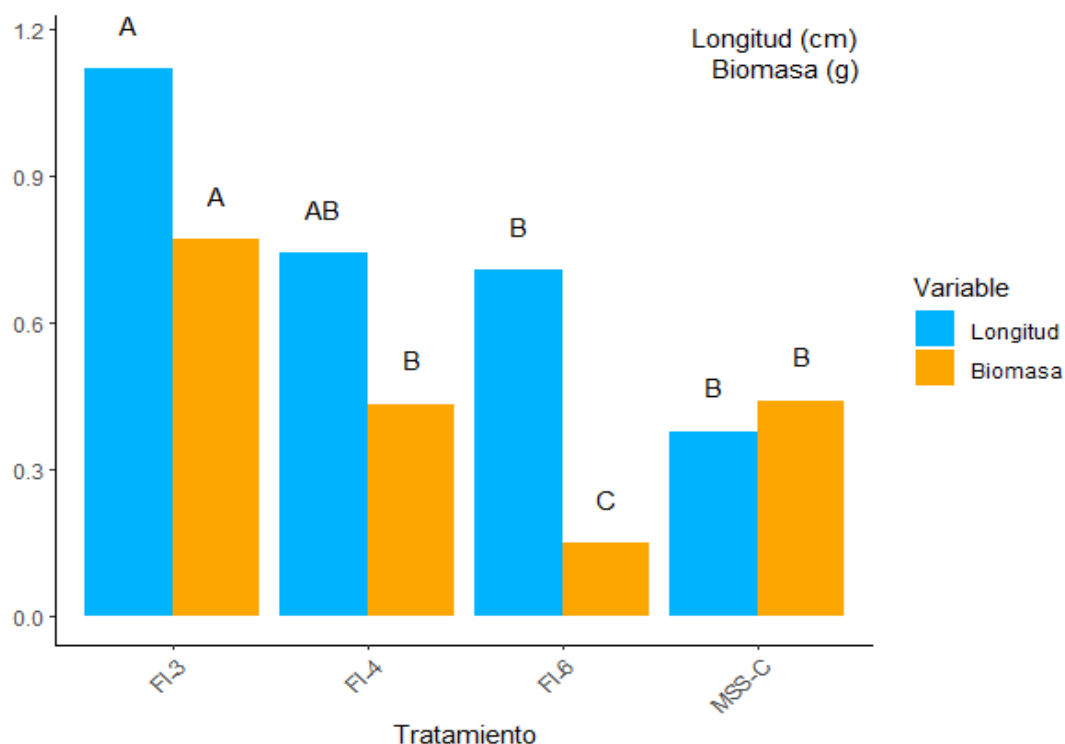
**Figura 6.** Establecimiento en MSS de *O. velutina* tras los diferentes tratamientos de asepsia: EV-0) enjuague con agua y solución de jabón; EV-1) Solución biocida; EV-2) Cloro al 6 % por 5 min; EV-3) Cloro al 6 % por 10 min; EV-4) Cloro al 6 % por 15 min. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre colores a  $p \leq 0.05$ .

## 7.2 Optimización de protocolo de micropropagación de *O. velutina* en biorreactores de inmersión temporal

### 7.2.1 Frecuencias de inmersión

Los resultados de las variables de longitud y biomasa de cladodio a los 30 días mostraron que el tratamiento FI-3 (3 ciclos de inmersión por día) presentó una diferencia contundente en comparación al control (MSS-C) ver **Figura 7**. Con base en trabajos relacionados con el género *Opuntia* cultivado en BIT se reportan resultados similares como lo expuesto por Nogueira et al. (2019), quienes con una frecuencia de 6 veces por día y 3 min de inmersión evidenciaron una longitud y peso de cladodio de 1.73 cm y 0.34 g, en cuanto a MSS mostraron una longitud de 1.4 cm y una biomasa de 0.20 g. Por otro lado, Sani et al. (2020) al trabajar con *Ananas comusus* L. en sistemas de inmersión temporal reportan que al aplicar

BA al medio de cultivo se reduce la longitud de los brotes. En los BIT las frecuencias de inmersión son decisivas ya que este factor determina la asimilación de nutrientes y que se ve reflejado en el aumento de biomasa (Melviana et al., 2021). Para *O. velutina* frecuencias de inmersión de 3 ciclos fue lo adecuado lo cual influyó drásticamente en la longitud y biomasa de cladodio. Este aspecto es crucial durante la transición del cultivo en MSS a BIT y su impacto varía según la especie, dado que frecuencias de inmersión inapropiadas pueden tener consecuencias negativas en el desarrollo del explante (Bello-Bello et al., 2021). El uso de medio líquido junto con la agitación provocada por el ingreso de aire a los frascos reduce la dominancia apical, lo que incide en un aumento de la biomasa (Kikowska et al., 2022).

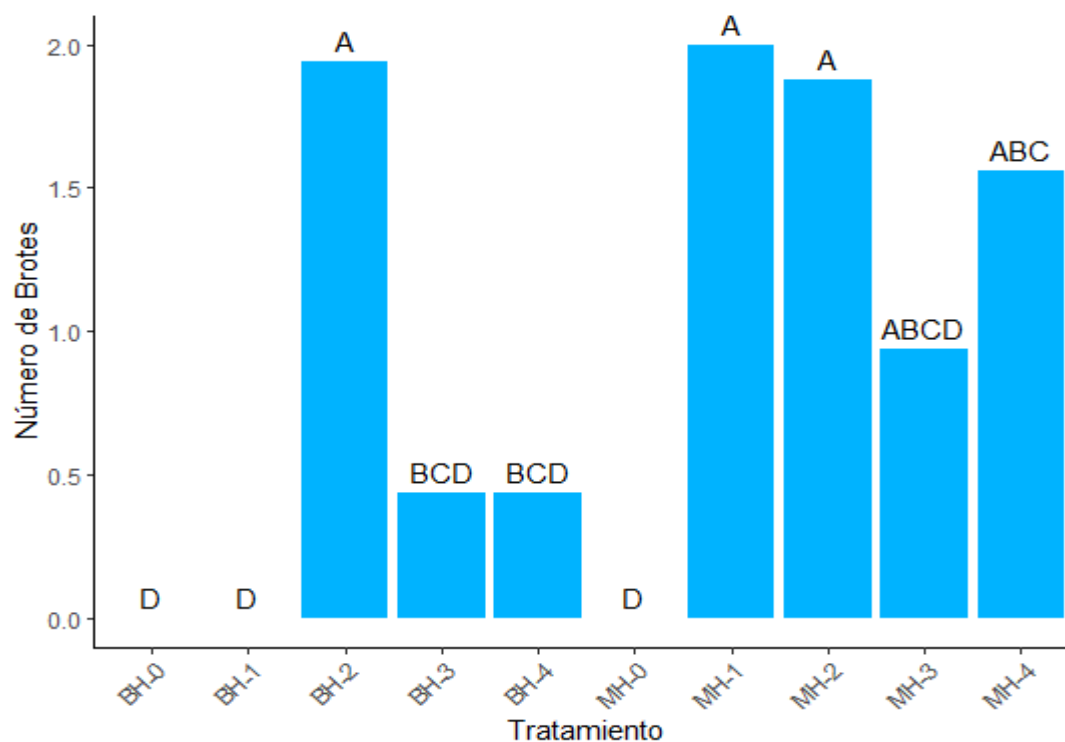


**Figura 7.** Respuesta de *O. velutina* a diferentes frecuencias de inmersión (FI) comparado con medio semisólido control (MSS-C) a los 30 días de cultivo. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre colores a  $p \leq 0.05$ .

### 7.2.2 Estimulación de la producción de brotes en BIT y MSS

El efecto de las diferentes hormonas en la estimulación de la producción de brotes fue evaluado después de 30 días de su cultivo en BIT y MSS (**Figura 8**). Mediante el análisis

estadístico se pudo observar que la mayor proliferación de brotes se encontró en los tratamientos en BH-2 (1 mg/L mT) y en medio semisólido en particular MH-1, MH-2, MH-3 y MH-4, siendo estadísticamente diferentes en contraste a los controles. La regeneración de la planta y multiplicación durante la micropropagación es afectada por el tipo y concentración de la hormona que se utilice, en especial las citoquininas que, si bien tienen un importante papel en la división celular y en parte responsable de la proliferación de brotes, es de importancia ya que determina la respuesta del explante (Aremu et al., 2012).



**Figura 8.** Efecto de la dosis hormonal en la proliferación de brotes de *O. velutina* cultivado en BIT y MSS, obtenidos a los 30 días. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

El limitado desarrollo de brotes en BIT se especula en condiciones de hipoxia generada por el medio líquido ya que el género *Opuntia* es portadora de metabolismo CAM lo que implica la apertura estomática nocturna y al coincidir las inmersiones con los periodos críticos de captación de  $CO_2$  se suscita la reducción en el crecimiento y desarrollo de brotes (Martínez-Arroyo et al., 2023). La regeneración y multiplicación de brotes en etapas de

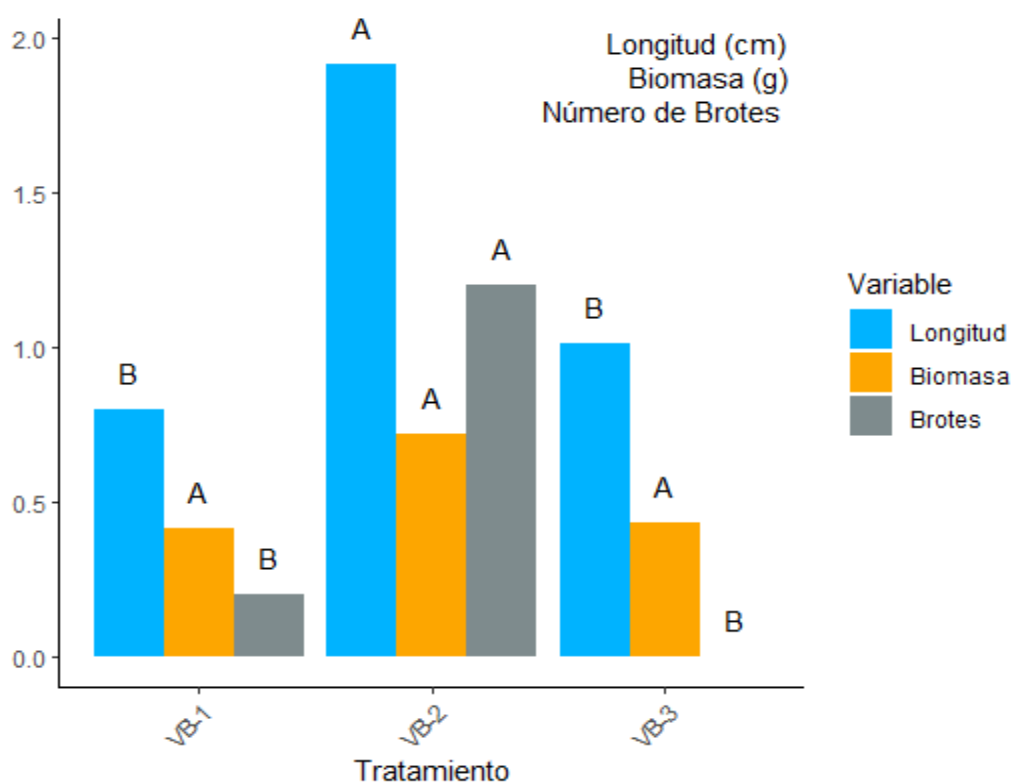
micropropagación se ve afectado por la concentración de citoquininas, como BA, ya que estos reguladores de crecimiento se especializan en procesos de división celular y organogénesis. Así mismo la reducción en la longitud de cladodio se ve relacionada al efecto tóxico que ejerce BA, debido a la acumulación y liberación de metabolitos, lo cual conlleva la inhibición del crecimiento y que puede verse aumentado por la inmersión periódica de los explantes al medio líquido (Aremu et al., 2012; De Souza et al., 2019).

De Souza et al. (2019) evaluaron el uso de mT y BA en el desarrollo de *Opuntia stricta* Haw y reportaron una formación de brotes 10.63 brotes por explante con el uso de mT en MSS, en cambio en los explantes cultivados en medio líquido con mT mostraron un aumento en el índice de formación de brotes (IFB) de 52 % en comparación a BA (0.20 IFB). Por su parte Dewir et al. (2023) afirman que el cultivo en sistemas de inmersión es efectivo para la activación de areolas de *Hylocereus polyrhizus* lo que resulta en una mayor multiplicación de yemas axilares seis veces más que en medio semisólido. De acuerdo con Shekhawat et al. (2021) en su estudio con *Scaevola taccada* el uso de 1 mg/L mT indujo una respuesta de 4.1 brotes por explante en comparación a 1 mg/L de BA que produjo un promedio de 3.6 brotes por explante en MSS siendo estadísticamente diferentes y en medio líquido el uso de 0.25 mg/L de mT indujo la proliferación de brotes de 22 por explante, en cambio el uso de 0.25 mg/L de BA demostró una proliferación de 19.2 brotes por explante. Lo cual evidencia la eficacia de la mT en contraste con BA. Con esto se aporta primeros resultados acerca del cultivo de *O. velutina* cultivado en MSS y BIT, que, si bien se evidenció proliferación de brotes en MSS en BIT con el uso de mT, la proliferación de brotes fue evidente.

### **7.2.3 Volumen de medio nutritivo en BIT**

Los resultados revelaron variaciones significativas al usar diferentes volúmenes de medio en BIT entre tratamientos VB-1, VB-2 y VB-3 (**Figura 9**). El tratamiento VB-2 (300 mL) mostró los mejores resultados en cuanto a longitud, con un promedio de 1.913 cm y una media de brotes de 1.2; mientras que los tratamientos VB-1 y VB-3 fueron estadísticamente iguales en cuanto a biomasa con el tratamiento VB-2, pero estadísticamente menores en las variables de longitud y número de brotes. Estos resultados sugieren que el volumen del medio de cultivo influye significativamente en el crecimiento y desarrollo de *O. velutina*, en contraste Etienne y Berthouly, (2002) argumentan que el volumen de medio no afecta la longitud de

los brotes. Por otro lado, Ayub et al. (2021) mencionan que el volumen de medio en BIT influye en la proliferación de brotes. Así mismo, este factor también es importante ya que controla la respuesta morfogénica y la calidad de los brotes en los sistemas BIT lo que repercute así también en mayor biomasa (Roels et al., 2005). Las plantas cultivadas exudan productos químicos extracelulares que incitan a la formación de brotes, los cuales cuando se usan grandes volúmenes de medio tienden a diluirse (Etienne y Berthouly, 2002). En un estudio de *Ananas comosus* L. Merr en un sistema de inmersión temporal por Escalona et al. (1999), encontraron que para la proliferación de brotes el volumen óptimo es de 200 mL, en su caso volúmenes superiores afectaban negativamente la tasa de proliferación.



**Figura 9.** Volumen de medio nutritivo sobre *O. velutina* cultivado en BIT, obtenidos a los 30 días. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre colores a  $p \leq 0.05$ .

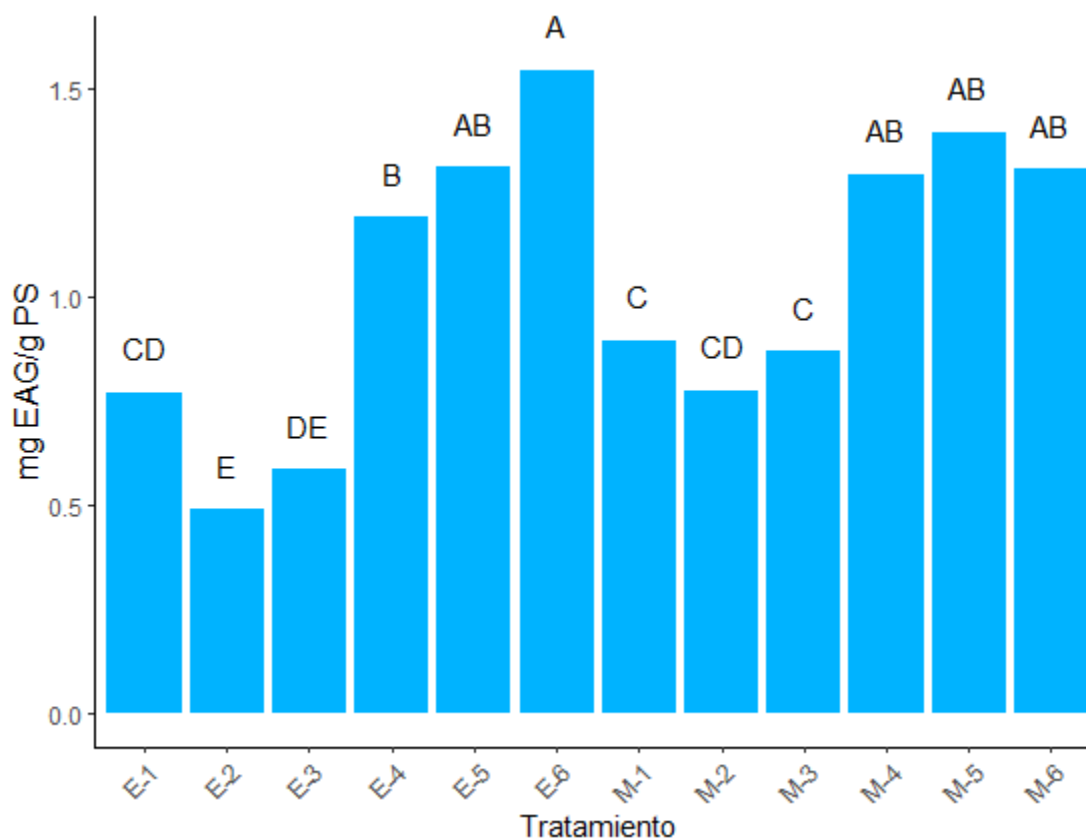
Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron superiores a lo reportado por Nogueira et al. (2019), quienes evaluaron *Opuntia* y *Nopalea* cv. Miúda, Oreja de elefante mexicana e IPA-Sertania cultivado en BIT en 300 mL de medio líquido MS suplementado con 200 mg/L de ácido ascórbico, 0.25 mL de *plant preservation mixture* (PPM) 0.5 mg/L de ácido 1-

naftalenacético (ANA) y 1 mg/L de BA a frecuencias de inmersión cada 4 h por 3 min donde reportaron longitud y peso de cladodio de 1.73 cm y 0.34 g, sin presentar brotación. Para este estudio, el volumen óptimo fue de 300 mL ya que promovió un crecimiento significativo en longitud y un mayor número de brotes en *O. velutina*. Este resultado destaca la importancia de personalizar las condiciones de cultivo para cada especie y sistema.

### 7.3 Extractos de *Opuntia velutina*

#### 7.3.1 Cuantificación de fenoles totales

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre tratamientos donde los tratamientos E-5, E-6, M-4, M-5 y M-6 evidenciaron la mayor extracción de fenoles totales con rangos entre 1.293 y 1.543 mg EAG/g PS de nopal en comparación con los tratamientos E-2 (etanol 79 % a 76 °C por 4 h sonicados) y E-3 (etanol 79 % a 90 °C por 2 h sonicados) que exhibieron la menor extracción de 0.490 y 0.584 mg EAG/g PS de nopal (**Figura 10**).

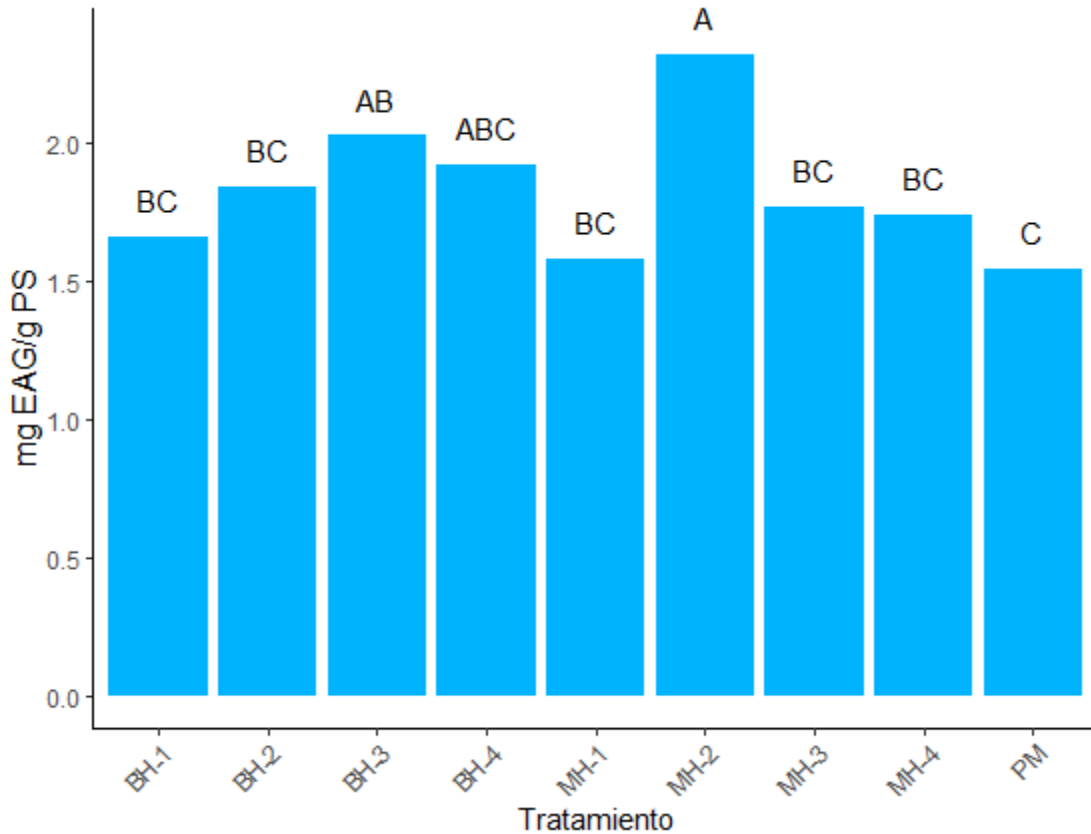


**Figura 10.** Cuantificación de fenoles totales de cladodios de *O. velutina in situ* (PM), obtenidos de huerto en Ziracuaretiro. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales

entre columnas a  $p \leq 0.05$ . E-1) Etanol 76 °C/2 h sonicado; E-2) Etanol 76 °C/4 h sonicado; E-3) Etanol 90 °C/2 h sonicado; E-4) Etanol 90 °C/4 h sonicado; E-5) Etanol 76 °C/2 h sin sonicar; E-6) Etanol 90 °C/2 h sin sonicar; M-1) Metanol 76 °C/2 h sonicado; M-2) Metanol 76 °C/4 h sonicado; M-3) Metanol 90 °C/2 h sonicado; M-4) Metanol 90 °C/4 h sonicado; M-5) Metanol 76 °C/2 h sin sonicar; M-6) Metanol 90 °C/2 h sin sonicar.

Estos resultados fueron superiores a lo reportado por Tranquilino-Rodríguez et al. (2020), quienes reportaron las concentraciones de fenoles totales de 1.039 mg EAG/g de nopal con un método de extracción de etanol 70 % a una temperatura de 76 °C por 2 h. A su vez los resultados reportados por Rocchetti et al. (2018), en extractos hidroalcohólicos de nopal obtuvieron una extracción de fenoles de 2.633 mg EAG/g PF. En otro estudio realizado por Kopjar et al. (2014), en el que trabajaron con diferentes solventes para la extracción de fenoles de puré de cereza agria reportaron valores para etanol (305.11 mg EAG/kg) y metanol / HCl 0.5 % (389.44 mg EAG/kg) argumentando que el metanol es el solvente apropiado. Chirinos et al. (2007), argumentan que la adición de ácido en el solvente de extracción tiene efectos como la disolución de compuestos polifenólicos, que son parte de polímeros relacionados con la pared celular, a través de un mecanismo de hidrólisis y puede actuar en la desintegración de las paredes celulares, dando como resultado la solubilidad de los compuestos polifenólicos.

El tratamiento E-6 (Etanol 79 % a 90 °C por 2h sin sonicación) se seleccionó como el método óptimo para la extracción de fenoles tras analizar los resultados. Este tratamiento se destacó por su alta eficiencia, la seguridad del solvente utilizado (etanol) y la practicidad del proceso. Por esta razón, E-6 se utilizó para extraer compuestos fenólicos de *O. velutina*, cultivada bajo diferentes métodos de cultivo y tratamientos hormonales, obteniéndose valores que oscilaron entre 1.543 y 2.318 mg EAG/g PS (**Figura 11**). Destacaron los tratamientos MH-2, BH-3, BH-4 y BH-2 por su alto contenido de fenoles totales, siendo el tratamiento MH-2 el que mostró el mayor aumento, con un incremento del 50.23 % en comparación con el control PM, que presentó la concentración más baja de fenoles totales.



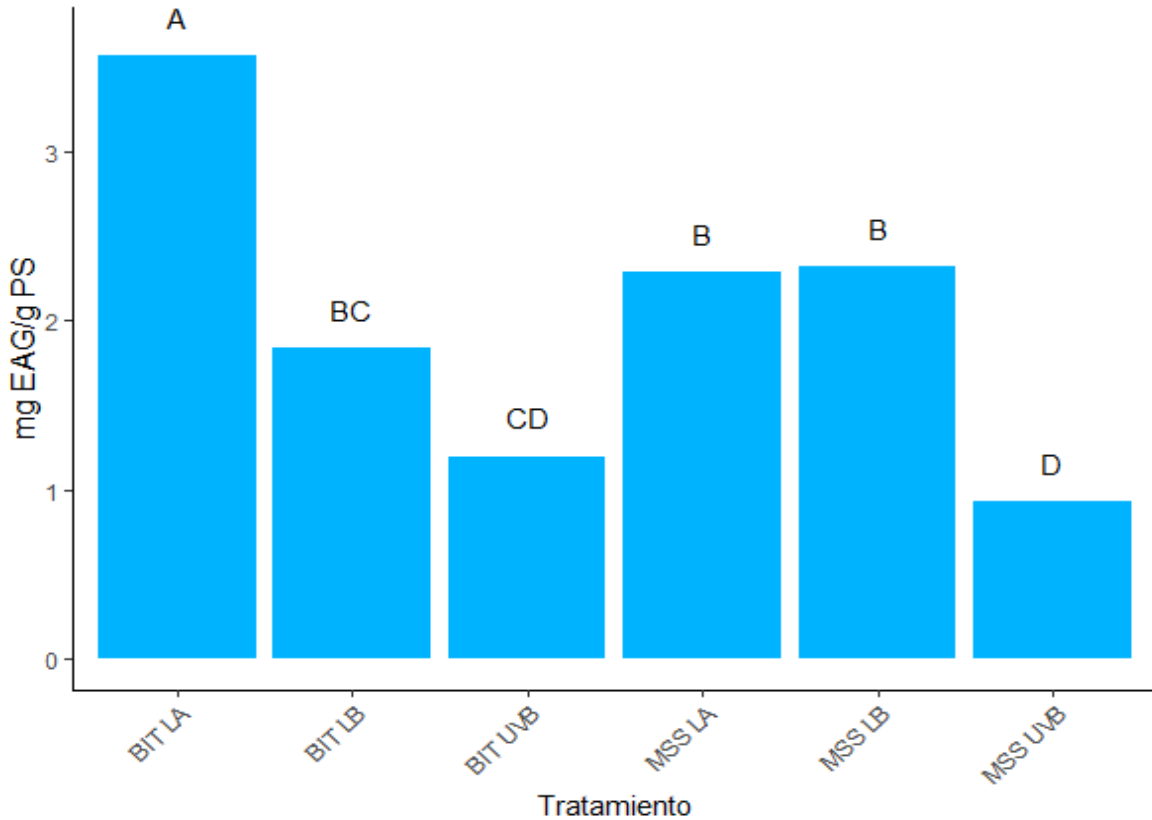
**Figura 11.** Cuantificación de fenoles totales de cladodios de *O. velutina* bajo diferentes métodos de cultivo y hormonas. Para distinguir los tratamientos se implementó las letras “B” (BIT), “M” (MSS) y “PM” (planta madre). Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

En un estudio realizado por Szopa et al. (2019) utilizando extractos de microbrotes de *S. chinensis* mencionan que el uso y tipo de biorreactores aumenta el contenido de fenoles totales. Así mismo Valdez-Tapia et al. (2014) en su trabajo con *Castilleja tenuiflora* cultivada en biorreactores de inmersión temporal tipo RITA reportaron que existe una acumulación de fenoles totales en brotes. Malik et al. (2018) tras su estudio con *Rosa canina* evidenciaron que el uso de BIT incrementa la acumulación de compuestos fenólicos en comparación con MSS, donde obtuvieron una acumulación de 23.40 mg AC/g PS (miligramos de ácido clorogénico por gramo de peso seco) en comparación a MSS que obtuvo 11.4 mg AC/g, también mencionan que incluso las condiciones desfavorables de cultivo aumentan la producción de estos compuestos. En otro estudio realizado por Ruta et al. (2020) con *Lycium barbarum* evaluaron la acumulación de compuestos polifenólicos en BIT y MSS donde

evidenciaron que existió un aumento de 23.6 mg EAG/g PS para BIT en comparación a MSS con 19.4 mg EAG/g PS lo cual evidencia el potencial de los BIT en la producción de fitoquímicos. Por otro lado, Aremu et al. (2012) cuantificaron fenoles totales con el uso de diferentes citoquininas en las que mencionan el uso de mT y BA en cultivos en MSS, tras sus resultados evidencian la diferencia de rendimientos que ejerce la mT en comparación BA, donde mT reportó un 33.7 mg EAG/g PS en comparación a BA con 31.7 mg EAG/g PS de *Musa* spp. Amoo et al. (2012) reportan que el uso de mT en *Aloe arborescens* cultivada en MSS influye en la acumulación de fenoles en comparación a BA, mostrando resultados para mT de 18.1 mg EC/g PS y para BA 17 mg EC/g PS.

En cuanto a las diferentes longitudes de onda lumínica y métodos de cultivo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En la **Figura 12**, se observó que el tratamiento con mayor acumulación de fenoles totales fue el BIT LA, con un promedio de 3.569 mg EAG/g PS de nopal. En comparación al tratamiento MSS UVB quien evidenció la menor acumulación de fenoles totales, siendo estadísticamente inferior. Estos resultados sugieren que tanto la longitud de onda como el método de cultivo pueden influir en la cantidad de fenoles totales producidos por las plantas de *O. velutina*.

La correlación entre los fenoles totales y el tipo de luz empleado, se observó una asociación significativa con una  $R= 0.73$ . Esto indica que aproximadamente el 73 % de la variabilidad en los fenoles totales puede ser atribuida al tipo de luz utilizada en el cultivo de *O. velutina*.



**Figura 12.** Cuantificación de fenoles totales de cladodios de *O. velutina* bajo cultivo en BIT, MSS y longitudes de onda. Para distinguir los tratamientos se implementó las letras “BIT” (biorreactor de inmersión temporal), “MSS” (medio semisólido). Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

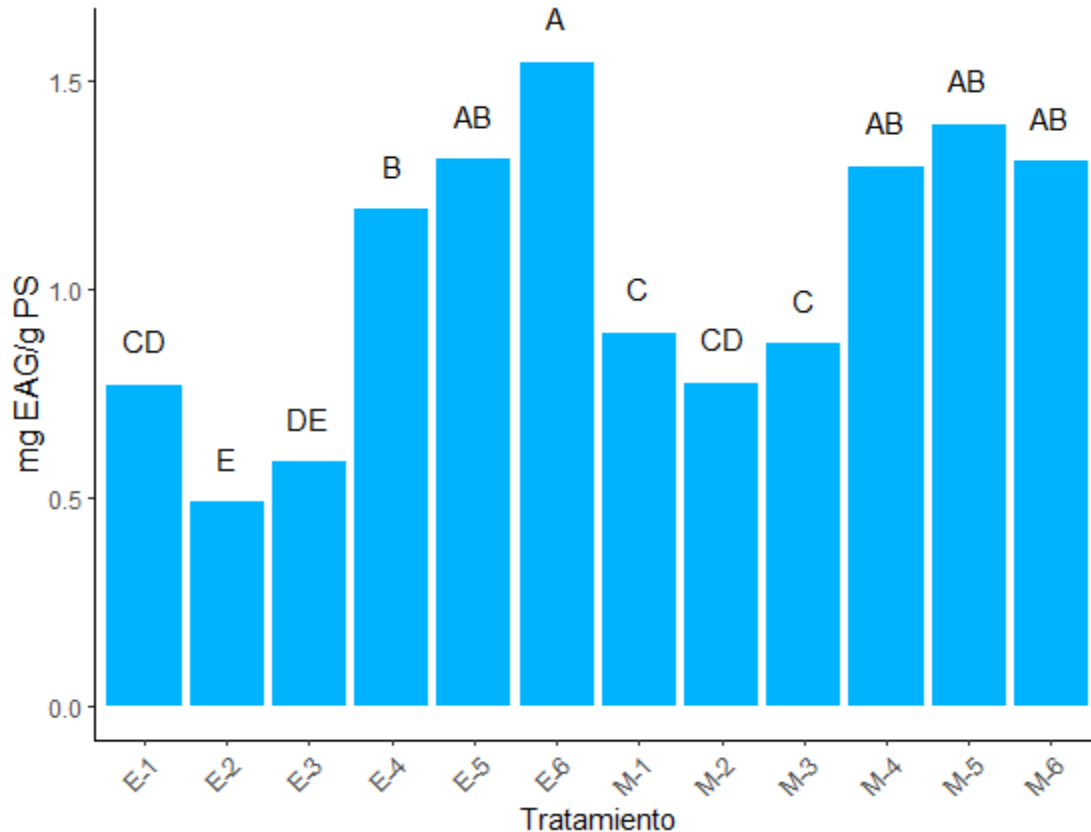
En diversos estudios, se ha mencionado que la exposición a luz UV-B puede influir en la acumulación de fenoles totales. Por ejemplo, Chen et al. (2019) encontraron que el uso de luz UV-B durante 4 h al día durante 3 días en *Triticum aestivum* llevó a un aumento en el contenido total de fenoles totales de 592 mg EAG/100 g, en comparación con el control que presentó una acumulación de 490 mg EAG/100 g. En otro estudio realizado por Mosadegh et al. (2018) con cultivos de *Ocimum basilicum*, también se reportó un aumento en el contenido de fenoles totales después de la exposición a luz UV-B durante 3 días. Asimismo, Dou et al. (2019) informaron un aumento en el contenido de estos compuestos en *Ocimum basilicum*, con un aumento del 28 % al 126 % después de la exposición a luz UV-B. A pesar de que estos estudios han mostrado un aumento en la acumulación de fenoles debido a la exposición a luz UV-B en otras especies, en el presente estudio particular con *O. velutina*, no

se observaron resultados similares. Sin embargo, este efecto puede verse atribuido a la adaptación de *O. velutina* a ambientes de alta radiación.

En relación con la luz azul, los resultados mostraron una mayor concentración de fenoles totales en comparación con el estudio de Jeong et al. (2012) realizado en *Chrysanthemum*; en su investigación, se observó una disminución en la concentración de fenoles totales en las plantas expuestas a luz azul en comparación con las expuestas a luz blanca. En contraste, Johkan et al. (2010) encontraron resultados diferentes en lechuga de hojas rojas, donde la exposición a luz azul condujo a un aumento en la concentración de fenoles en comparación con la luz blanca. En este estudio, se reportaron concentraciones de 118 nmol/mg PS para luz azul y 75.7 nmol/mg PS para luz blanca. En el presente estudio con *O. velutina*, se observó un incremento en la concentración de fenoles con la exposición a luz azul, lo que sugiere una posible respuesta específica de esta planta a esta longitud de onda.

### 7.3.2 Determinación de flavonoides totales

Se determinó la concentración de flavonoides de los extractos de *O. velutina* (PM). Dentro de los resultados, se reportaron valores que oscilaron entre 0.330 a 2.804 mg EQ/g PS de *O. velutina*; donde se evidenció que para la obtención de compuestos el etanol al 79 % presentó los mayores resultados en contraste al metanol 60 % / HCl 6 M, aunado a esto la temperatura no fue un factor determinante, sin embargo se logró identificar que el tiempo de maceración entre 2 y 4 h incidieron en la extracción, en la **Figura 13** se observa que los tratamientos con mayor extracción fueron los tratamientos E-6 (Etanol 79 % a 90 °C por 2 h sonificado) y E-5 (Etanol 79 % a 76 °C por 2 h sin sonificar) este último siendo estadísticamente igual con el tratamiento E-4 (Etanol 79 % a 90 °C por 4 h sonificado). La temperatura tiene un papel importante en la extracción, donde una mayor temperatura de extracción ayuda en la difusión de los compuestos contenidos en las células vegetales y ser disueltos en por el solvente (Wai y Chiang, 2014). En cuanto al tiempo de extracción, se menciona que al aumentar este parámetro los rendimientos aumentarán y después disminuirán, presuntamente a la sobreexposición a la temperatura, por lo cual es importante mantener un equilibrio entre estos dos parámetros (Oliveira et al., 2020). Por su parte, Xu et al., 2013, afirman que en un tiempo de extracción de alrededor de 2 h a 90 °C es óptimo para la extracción de flavonoides en forma de aglicona de *Fructus sophorae*.

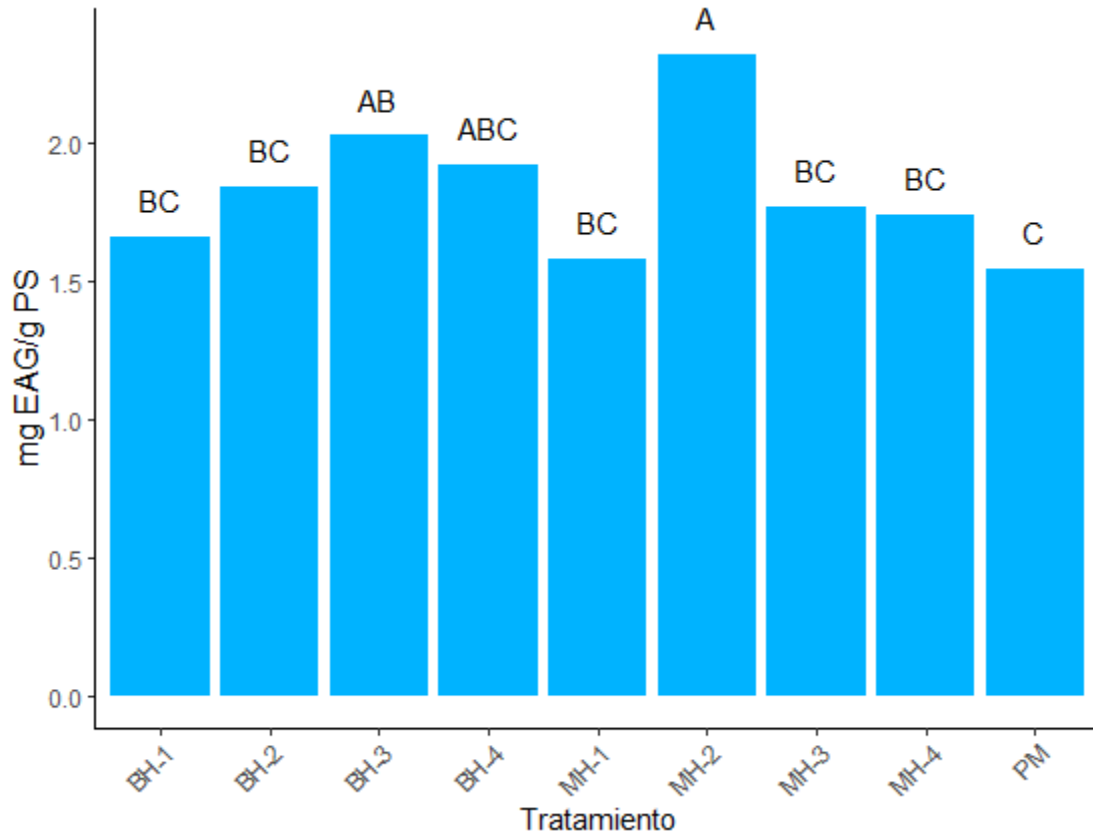


**Figura 13.** Cuantificación de flavonoides totales obtenidos en extractos de cladodios de *O. velutina in situ*. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ . E-1) Etanol 76 °C/2 h sonicado; E-2) Etanol 76 °C/4 h sonicado; E-3) Etanol 90 °C/2 h sonicado; E-4) Etanol 90 °C/4 h sonicado; E-5) Etanol 76 °C/2 h sin sonicar; E-6) Etanol 90 °C/2 h sin sonicar; M-1) Metanol 76 °C/2 h sonicado; M-2) Metanol 76 °C/4 h sonicado; M-3) Metanol 90 °C/2 h sonicado; M-4) Metanol 90 °C/4 h sonicado; M-5) Metanol 76 °C/2 h sin sonicar; M-6) Metanol 90 °C/2 h sin sonicar.

En los resultados del presente trabajo se observó que los tratamientos que presentaron mayor extracción de flavonoides son los constituidos por etanol al 79 %. Los resultados obtenidos fueron inferiores a lo reportado por Tranquilino-Rodríguez et al. (2020) quienes evidenciaron una extracción de flavonoides de 10.39 mg EQ/g PS con extracto etanólico 96 % a 50 °C por 2 h. En un estudio realizado por Saboonchian et al. (2014), se comparó el contenido de flavonoides de hoja y flores de dos variedades de *E. angustifolia* obtenidos de extractos etanólicos y metanólicos en el cual reportaron mayor extracción de flavonoides con solvente de etanol. A su vez, In-Cheol et al. (2010), mencionan que el etanol es el solvente indicado

para la extracción de compuestos flavonólicos en caqui en comparación con otros solventes como metanol. Así mismo Kopjar et al. (2014) indican, que para la extracción de flavonoides el etanol es el solvente indicado.

Se comparó la acumulación de flavonoides de extractos provenientes de BIT, MSS y PM tras los 9 tratamientos. Los resultados obtenidos para flavonoides reportaron valores que van de 2.804 a 4.900 mg EQ/g PS de *O. velutina* (**Figura 14**); siendo los tratamientos BH-2, BH-3 y BH-4 quienes presentaron la mayor acumulación de flavonoides (4.888, 4.900 y 4.757 mg EQ/g PS), aumentándose alrededor de 74.75 % con respecto a PM (control), que evidenció estadísticamente el menor contenido de flavonoides (2.856 mg EQ/g PS). El aumento en la acumulación de flavonoides se puede ver afectada por la aplicación de fuerzas mecánicas ejercida por el ingreso de aire a BIT, las cuales provocan en la planta la generación de una mayor actividad de enzimas peróxido dismutasa y pardeamiento lipídico lo cual genera un estrés y que se relaciona con la producción de MSP como defensa (Escalona et al., 2003; Lattanzio et al., 2018). Se encontró una correlación positiva moderada entre las concentraciones de fenoles totales y flavonoides ( $r = 0.485$ ). Esto sugiere que a medida que la concentración de fenoles totales aumenta, la concentración de flavonoides tiende a aumentar en una relación lineal positiva y significativa.

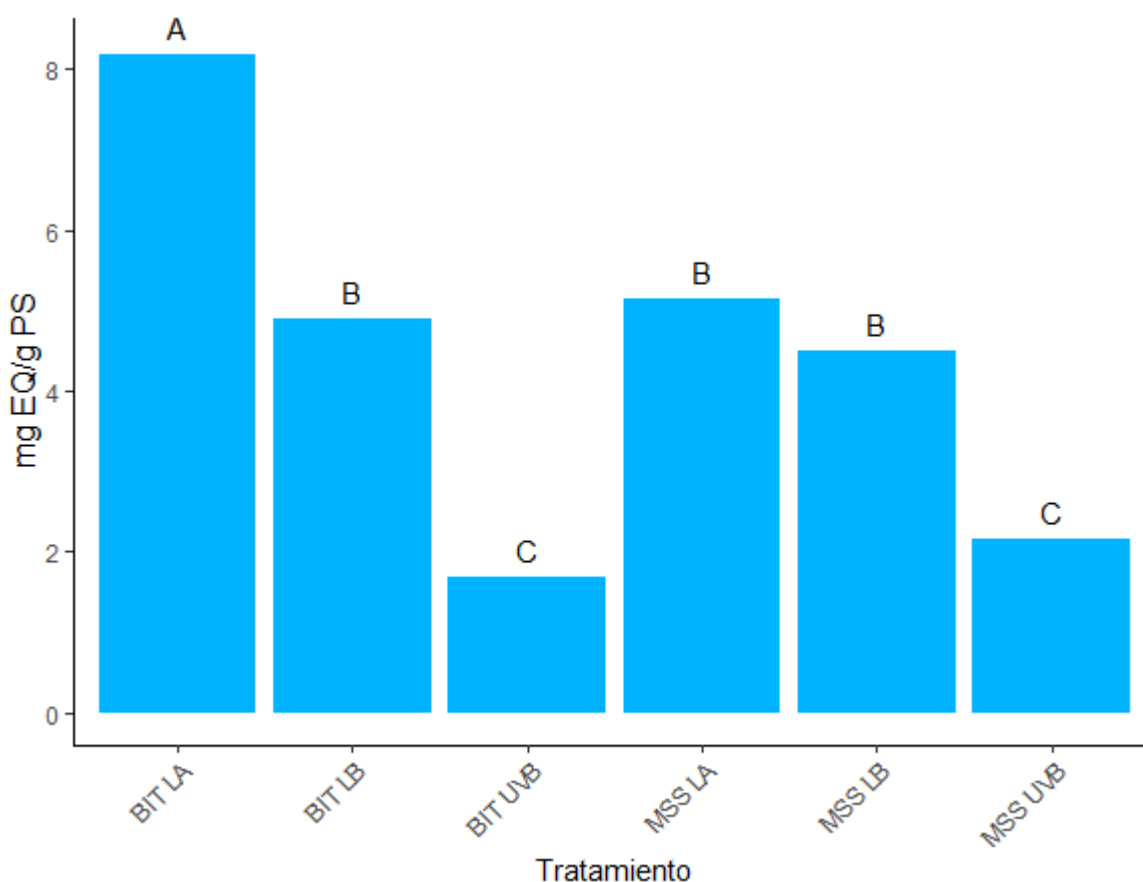


**Figura 14.** Cuantificación de flavonoides totales obtenidos en extractos de cladodios de *O. velutina* bajo diferentes técnicas de cultivo y hormonas. Para distinguir los tratamientos se implementó las letras “B” (BIT), “M” (MSS) y “PM” (planta madre). Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

En el estudio realizado por Pramita et al. (2018), se comparó el contenido de flavonoides de *Gynura procumbens* cultivadas en BIT de frasco gemelo y plantas *ex vitro* (planta madre) y evidenciaron que el uso de BIT obtuvo un rendimiento de 30.67 mg EC/g PS (miligramos equivalentes de catequina por gramo de peso seco) en comparación a plantas *ex vitro* con un promedio de 5.78 mg EC/g lo que significa un aumento de 5 veces más a favor de BIT. Klimek-Szczykutowicz et al. (2020) mencionan que el contenido de flavonoides es comparable o mayor en extractos obtenidos de microbrotes cultivados en biorreactor RITA que en la planta madre de *Nasturtium officinale ex vitro*. Así mismo Szopa et al. (2019) argumenta que el tipo de biorreactor incide en la acumulación de flavonoides de plantas *Schisandra chinensis*. En cuanto al uso de hormonas vegetales como inductores de fitoquímicos, Aremu et al. (2012) en un estudio con *Musa spp.* cultivada en MSS encontraron

que al usar mT a 20  $\mu$ M ejerce un efecto en la acumulación de flavonoides con un promedio de 22.8 mg EAG/g PS en comparación a BA (20  $\mu$ M) que mostró un promedio de 20.68 mg EAG/g PS. En el estudio de Amoo et al. (2012) con *Aloe arborescens* cultivada en MSS reportaron para mT una acumulación de flavonoides de 7.0 mg EC/g PS y para BA 4.4 mg EC/g PS.

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes longitudes de onda lumínica, como se muestra en la **Figura 15**. Destacando entre ellos, el tratamiento BIT LA quien exhibió la mayor acumulación de flavonoides, con un promedio de 8.168 mg EQ/g PS de nopal, lo que representa un aumento de entre 58.64 y 81.96 % en contraparte a BIT LB, MSS LB y MSS LA. Por otro lado, los tratamientos que utilizaron UV-B (BIT UVB y MSS UVB) mostraron acumulaciones bajas, con promedios de 1.684 y 2.147 mg EQ/g PS de nopal, respectivamente.



**Figura 15.** Cuantificación de flavonoides de cladodios de *O. velutina* bajo cultivo en BIT, MSS y longitudes de onda. Para distinguir los tratamientos se implementó las letras “BIT” (biorreactor de inmersión temporal), “MSS” (medio semisólido), “LB” (luz blanca), “LA” (luz azul), “UVB” (luz UV-B). Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

En el análisis de correlación entre las diferentes variables y el tipo de luz utilizado, se encontraron resultados significativos. La producción de flavonoides mostró una fuerte correlación con el tipo de luz utilizada, con una  $r = 0.80$ , lo que indica que aproximadamente el 80 % de la variabilidad en la producción de flavonoides puede ser explicada por el tipo de luz empleada. Además de una correlación positiva y significativa entre los niveles de fenoles totales y flavonoides ( $r = 0.918$ ), lo que sugiere una relación estrecha entre estos compuestos antioxidantes.

Aunque varios estudios han demostrado el potencial de la luz UV-B en la producción de flavonoides. En el cultivo de *Sideroxylon capiri*, Martínez-Silvestre et al. (2022) encontraron un aumento significativo de flavonoides con el uso de luz UV-B. Del mismo modo, Namlı et al. (2014) observaron un incremento en el contenido de flavonoides e hipericina de *Hypericum retusum* Aucher cultivado *in vitro*. Choudhary y Agrawal (2014) reportaron un aumento del 72 % en el contenido de kaempferol y del 114 % en quercetina en *Pisum sativum* debido a la exposición a luz UV-B. Sin embargo, los resultados obtenidos en *O. velutina* contrastan con lo anteriormente señalado. En contraparte, estudios como el de Dutta y Jatothu, (2013) y Fazal et al. (2016) reportaron un aumento en la producción de fitoquímicos en el cultivo de *S. chirata* y en el cultivo de callos de *P. vulgaris*, respectivamente, cultivados bajo incidencia de luz azul. Además, Becker et al. (2013) en su estudio con lechuga de hoja roja bajo luz azul encontraron una correlación positiva entre las concentraciones de quercetina-glucósidos y azúcares reductores, lo que significa que a medida que aumenta la cantidad de azúcares reductores (como la glucosa) también aumentan las concentraciones de quercetina-glucósidos, esto sugiere que la luz azul puede influir en la cantidad de ciertos flavonoides glucósidos, lo cual es importante para poder manipular las condiciones de cultivo y aumentar compuestos bioactivos (Becker et al., 2013), resultados que demuestran que el

efecto del tipo de luz varía según la especie de planta y el método de cultivo, como lo reportado en *O. velutina* (Figura 15).

### 7.3.3 Actividad antioxidante

Para la actividad antioxidante, se presentaron diferencias significativas entre tratamientos de extractos de PM (Cuadro 10); en el ensayo ABTS el mayor porcentaje de inhibición del radical fueron los tratamientos etanólicos al 79 %, específicamente los tratamientos E-4 y E-6 con un  $68.45 \pm 2.276$  y  $72.02 \pm 1.758$  %, incrementando 148.09 % en contraste a los tratamientos en metanol 60 %/ HCl 6 M. Dentro del análisis de compuestos se pudo evidenciar que los tratamientos mencionados mostraron la mayor concentración de flavonoides lo que junto con la selectividad que tienen con el radical ABTS (Wong et al., 2006) podría estar relacionada con este método de extracción, por su parte para DPPH los tratamientos metanólicos 60 %/ HCl 6 M reportaron el mayor porcentaje de inhibición con valores que rondan entre  $84.67 \pm 3.374$  y  $82.39 \pm 1.530$  %, demostrando un aumento en la inhibición del radical de alrededor de 114.09 % con relación a los extractos en etanol 79 % en este sentido la mayor actividad antioxidante ante el radical DPPH puede deberse al efecto que tiene la extracción metanólica hacia compuestos lipofílicos y que se relaciona con la inhibición de DPPH (La et al., 2021). Por su parte FRAP mostró que el tratamiento M-5 presentó mayor capacidad de reducción ( $0.402 \pm 0.018$  mg EAG/g PS), comparado con los tratamientos etanólicos.

Los resultados obtenidos fueron similares para ABTS a lo reportado por Tranquilino-Rodríguez et al. (2020), donde evaluaron la actividad antioxidante de *O. ficus-indica* y reportaron una extracción de 0.644 mg EAG/g con extracto etanólico al 74 % a 62.1 °C por 30 min, para DPPH los resultados fueron superiores donde reportaron una extracción de 0.162 mg EAG/g de extracto etanólico 70 % a 76 °C por 75 min. Por otro lado, Kopjar et al. (2014), argumentan que los solventes de etanol y metanol presentan valores ligeramente superiores al uso de solventes acidificados. En resultados obtenidos por Mushtaq et al. (2015), demostraron que los metabolitos extraídos con metanol acidificado al 0.5 N mostraron una actividad de captación del radical DPPH de entre 79.29 a 92.27 %.

**Cuadro 10.** Porcentaje de inhibición de los radicales ABTS, DPPH y poder reductor del ion férrico (FRAP) de extractos de *O. velutina in situ* (PM).

Tratamientos	% Inhibición ABTS	% Inhibición DPPH	FRAP (mg EAG/g)
<b>E-1</b>	48.623± 4.291 <sup>C</sup>	42.817 ± 17.332 <sup>DE</sup>	0.091 ± 0.014 <sup>D</sup>
<b>E-2</b>	48.502 ± 2.452 <sup>C</sup>	31.654 ± 3.518 <sup>EF</sup>	0.085 ± 0.014 <sup>D</sup>
<b>E-3</b>	52.826 ± 5.086 <sup>C</sup>	32.222 ± 4.143 <sup>EF</sup>	0.080 ± 0.011 <sup>D</sup>
<b>E-4</b>	68.454 ± 2.276 <sup>AB</sup>	51.550 ± 4.530 <sup>CD</sup>	0.131 ± 0.011 <sup>D</sup>
<b>E-5</b>	63.550 ± 5.823 <sup>B</sup>	38.007 ± 9.226 <sup>DEF</sup>	0.146 ± 0.012 <sup>D</sup>
<b>E-6</b>	72.002 ± 1.758 <sup>A</sup>	41.051 ± 3.610 <sup>DE</sup>	0.237 ± 0.011 <sup>C</sup>
<b>M-1</b>	22.899 ± 1.337 <sup>G</sup>	63.566 ± 3.890 <sup>BC</sup>	0.323 ± 0.017 <sup>B</sup>
<b>M-2</b>	23.937 ± 3.396 <sup>FG</sup>	67.881 ± 3.400 <sup>B</sup>	0.307 ± 0.048 <sup>B</sup>
<b>M-3</b>	25.362 ± 3.423 <sup>EFG</sup>	34.367 ± 7.912 <sup>EF</sup>	0.297 ± 0.049 <sup>BC</sup>
<b>M-4</b>	31.135 ± 0.832 <sup>DE</sup>	24.755 ± 6.778 <sup>F</sup>	0.254 ± 0.019 <sup>BC</sup>
<b>M-5</b>	29.663 ± 3.374 <sup>DEF</sup>	84.674 ± 2.787 <sup>A</sup>	0.402 ± 0.018 <sup>A</sup>
<b>M-6</b>	32.557 ± 1.530 <sup>D</sup>	82.391 ± 1.361 <sup>A</sup>	0.093 ± 0.013 <sup>D</sup>

\*Tratamientos: E-1) Etanol 76 °C/2 h sonicado; E-2) Etanol 76 °C/4 h sonicado; E-3) Etanol 90 °C/2 h sonicado; E-4) Etanol 90 °C/4 h sonicado; E-5) Etanol 76 °C/2 h sin sonicar; E-6) Etanol 90 °C/2 h sin sonicar; M-1) Metanol 76 °C/2 h sonicado; M-2) Metanol 76 °C/4 h sonicado; M-3) Metanol 90 °C/2 h sonicado; M-4) Metanol 90 °C/4 h sonicado; M-5) Metanol 76 °C/2 h sin sonicar; M-6) Metanol 90 °C/2 h sin sonicar. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a p≤0.05.

Tras haber realizado las pruebas correspondientes para la actividad antioxidante de la planta madre *in situ*, se continuo con el análisis de la capacidad antioxidante del material vegetal cultivado en diferentes métodos de cultivo y hormonas vegetales y poder realizar la comparación con PM. En cuanto a los resultados se muestra que los explantes cultivados en BIT con diferentes hormonas mostraron el mayor porcentaje de inhibición del radical ABTS con porcentajes que oscilaron entre 84.93, ± 3.768 y 88.55 ± 1.015 %. Así mismo se encontró una inhibición significativa de DPPH en el tratamiento BH-4 (1 mg/L mT + 0.5 mg/L ANA), en contraparte MSS evidenció la mayor actividad antioxidante para FRAP (0.864 ± 0.091 y 0.995 ± 0.031 mg) a diferencia de los tratamientos en BIT y PM. Con base a esto se encontró una correlación altamente significativamente negativa entre el porcentaje de inhibición del radical ABTS y la reducción del ion férrico FRAP de  $r = - 0.707$ , lo que indica que a medida

que aumenta el porcentaje de inhibición del radical ABTS, el valor de FRAP disminuye significativamente. En el presente estudio se encontró la mayor concentración de flavonoides en los tratamientos BIT, lo que indica de acuerdo con lo reportado por Wong et al. (2006) donde mencionan que los flavonoides tienen una alta afinidad en la neutralización del radical ABTS, pero no presentan la misma eficacia en contra a los radicales DPPH.

**Cuadro 11.** Resultados de actividad antioxidante mediante DPPH, ABTS y FRAP en extractos de *O. velutina* en BIT, MSS y PM.

Tratamiento	% de inhibición ABTS	% de inhibición DPPH	FRAP (mg EAG/g PS)
<b>BH-1</b>	88.551 ± 1.015 <sup>A</sup>	34.496 ± 0.233 <sup>E</sup>	0.618 ± 0.050 <sup>D</sup>
<b>BH-2</b>	87.971 ± 1.232 <sup>A</sup>	35.581 ± 4.419 <sup>DE</sup>	0.760 ± 0.105 <sup>CD</sup>
<b>BH-3</b>	86.304 ± 1.014 <sup>A</sup>	38.527 ± 0.853 <sup>CDE</sup>	0.722 ± 0.028 <sup>CD</sup>
<b>BH-4</b>	84.928 ± 3.768 <sup>AB</sup>	73.411 ± 3.101 <sup>A</sup>	0.777 ± 0.041 <sup>BCD</sup>
<b>MH-1</b>	79.493 ± 0.508 <sup>BC</sup>	45.039 ± 0.853 <sup>BC</sup>	0.995 ± 0.031 <sup>A</sup>
<b>MH-2</b>	78.116 ± 3.406 <sup>C</sup>	45.736 ± 1.938 <sup>BC</sup>	0.901 ± 0.136 <sup>ABC</sup>
<b>MH-3</b>	78.768 ± 0.725 <sup>C</sup>	51.240 ± 1.163 <sup>B</sup>	0.963 ± 0.021 <sup>AB</sup>
<b>MH-4</b>	74.058 ± 2.754 <sup>CD</sup>	44.109 ± 1.628 <sup>BC</sup>	0.864 ± 0.091 <sup>ABC</sup>
<b>PM</b>	72.002 ± 1.759 <sup>D</sup>	41.051 ± 3.610 <sup>CD</sup>	0.237 ± 0.011 <sup>E</sup>

\*Para distinguir los tratamientos se implementó las letras “BIT” (biorreactor de inmersión temporal), “MSS” (medio semisólido) y “PM” (planta madre). Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

Con base a los resultados obtenidos para la actividad antioxidante se evidenció una alta capacidad antioxidante en extractos provenientes de cladodios de *O. velutina* cultivados en BIT y MSS en comparación PM; sin embargo, la mejor respuesta de todos los tratamientos fue BH-4 donde registro el mayor porcentaje de inhibición de ABTS y DPPH. Klimek-Szczykutowicz et al. (2020) en su estudio con *Nasturtium officinale* demostraron la actividad antioxidante proveniente de BIT donde mencionan que tras 20 días de ciclo de crecimiento en BIT se obtuvo una actividad antioxidante de 23.79 mmol ET/100 g PS (milimoles equivalentes de trolox por gramo de peso seco) para DPPH en comparación a la planta madre *in situ* que evidenció 26.32 mmol ET/100 g PS. Así mismo se pudo evidenciar resultados superiores a lo reportado por Tranquilino-Rodríguez et al. (2020), quienes evidenciaron una

capacidad antioxidante de cladodios de nopal *in situ* para ABTS de 0.644 mg EAG/g PS y para DPPH 0.162 mg EAG/g PS, lo cual evidencia el potencial de los BIT en la capacidad antioxidante. Por otro lado, evidenciaron que las especies de *Dracocephalum* cultivadas en BIT mostraron una alta capacidad antioxidante en todos los ensayos realizados de FRAP, DPPH y NBT (nitroblue terazinolium).

Tras lo anterior se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de *O. velutina* expuestos a diferentes tratamientos de BIT y MSS con diversas longitudes de onda. En el **Cuadro 12**, se observa que los tratamientos BIT LA y BIT LB mostraron la mayor inhibición del radical ABTS, con valores del 92.222 y 87.971 %, respectivamente. En cuanto a la inhibición del radical DPPH, los tratamientos BIT LB y MSS LA exhibieron la mayor actividad antioxidante con porcentajes del 35.581 y 45.736 % en contraste a los demás tratamientos. Para el ensayo FRAP, el tratamiento BIT LA presentó el mayor valor estadísticamente significativo de 2.742 mg EAG/g de PS, mientras que los tratamientos BIT UVB y MSS UVB obtuvieron los valores más bajos con 0.520 y 0.562 mg EAG/g PS, respectivamente. El tratamiento de BIT LA pudo haberse incrementado debido a que la exposición a luz azul reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno e incrementa la actividad de enzimas antioxidantes (Wu et al., 2020) lo cual se ve reflejado en los resultados del presente trabajo.

**Cuadro 12.** Resultados de actividad antioxidante mediante DPPH, ABTS y FRAP en extractos de *O. velutina* en BIT y MSS con diferentes longitudes de onda.

Tratamiento	% de inhibición ABTS			% de inhibición DPPH			FRAP (mg EAG/g PS)		
	Valor	±	Letra	Valor	±	Letra	Valor	±	Letra
<b>BIT LA</b>	92.222	± 3.123	A	30.248	± 6.754	BC	2.742	± 0.027	A
<b>BIT LB</b>	87.971	± 1.015	AB	35.581	± 0.853	AB	0.759	± 0.028	D
<b>BIT UVB</b>	54.445	± 2.266	C	25.834	± 2.426	BC	0.520	± 0.031	E
<b>MSS LA</b>	78.116	± 3.768	B	45.736	± 3.101	A	0.901	± 0.041	C
<b>MSS LB</b>	51.208	± 3.852	C	19.160	± 6.128	C	1.107	± 0.062	B
<b>MSS UVB</b>	52.947	± 9.346	C	29.315	± 2.001	BC	0.562	± 0.023	E

\*Tratamientos: BIT LA (BIT con luz azul); BIT LB (BIT con luz blanca); BIT UVB (BIT con luz UV-B); MSS LA (MSS con luz blanca); MSS LB (MSS con luz blanca); MSS UVB (MSS con luz UV-B). Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

Se evidenciaron correlaciones significativas entre la actividad antioxidante, medido mediante ABTS y FRAP. La actividad antioxidante medida por ABTS mostró una correlación moderada ( $R= 0.53$ ), mientras que la capacidad antioxidante medida por FRAP también presentó una correlación moderada ( $R= 0.49$ ). Estos resultados indican que aproximadamente el 53 % y el 49 % de la variabilidad en la actividad antioxidante medida por ABTS y FRAP, respectivamente, puede ser atribuida al tipo de luz empleado.

En el estudio realizado por Khurshid et al. (2020) con *E. alba* bajo diferentes longitudes de onda, como la luz azul, se identificó la capacidad antioxidante. Los resultados demostraron que para DPPH, la luz azul (88.4 %) no mostró diferencias significativas en comparación con la luz blanca. De manera similar, para ABTS, la inhibición del radical fue igual para ambas longitudes de onda, al igual que para FRAP, lo que indica que no existen diferencias en la actividad antioxidante al exponerla a luz azul y blanca.

En otro estudio realizado por Ahmad et al. (2016) con cultivos de callos de *Stevia rebaudiana*, por 30 días se observó que la capacidad antioxidante fue potenciada por la luz azul. Asimismo, Kim et al. (2014) trabajaron con *Solanum lycopersicum* bajo emisiones de luz azul y encontraron una mayor capacidad antioxidante en comparación con el control.

Por otro lado, en el estudio de Agarwal (2007) con plántulas de *Cassia* sometidas a luz UV-B, se evidenció un aumento en la capacidad antioxidante de enzimas como SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), POX (peroxidasa) y PPO (polifenol oxidasa) en contraste con los controles. Además, Csepregi et al. (2017) mencionan que la exposición de *Arabidopsis thaliana* a dosis bajas de UV-B tiene efectos positivos en la actividad antioxidante. Sin embargo, en el presente trabajo los resultados obtenidos difirieron de lo reportado.

#### **7.3.3.1 Correlaciones de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante**

Los resultados anteriores pueden ser comparados con lo reportado por Jorge y Troncoso (2016), quienes en el cultivo de *O. ficus-indica* y *O. apurimacensis* demostraron una correlación alta significativa de 0.98 y 0.82 para fenoles y el valor de FRAP siendo resultados similares para esta correlación con lo obtenido en nuestro trabajo. Ordoñez et al. (2019) en el cultivo de nopal encontraron una correlación entre fenoles y la inhibición del radical DPPH en un 0.93. Por otro lado, Torres-Bojórquez et al. (2023) reportaron una correlación positiva entre betalaínas y ABTS ( $r = 0.05$ ) así como en DPPH (0.082) en especies de *O. robusta* y *O.*

*ficus-indica*, sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo una correlación negativa entre ABTS y fenoles de -0.706. Además, Szopa et al. (2019) en su estudio de *Schisandra chinensis* cultivado en biorreactores de agitación y en medio semisólido evidenciaron una correlación negativa entre la actividad antioxidante y la mayoría de los ácidos fenólicos y flavonoides estudiados. En cambio, Tapia et al. (2007) con *Cymbopogon citratus* cultivado en biorreactores de inmersión temporal destacaron que existió una alta correlación positiva entre el contenido de fenoles y la inhibición del radical DPPH con una  $r = 0.705$ , así como en flavonoides y DPPH de 0.535, también mencionan que la actividad antioxidante se principalmente por el aporte de los flavonoides. Kriaa et al. (2012) en el cultivo *Phoenix dactylifera* encontraron una relación positiva entre el contenido de fenoles y flavonoides, tras esto refieren que los altos niveles de estos compuestos explican su fuerte actividad antioxidante.

#### **7.4 Efecto del método de cultivo y la longitud de onda lumínica en la clorofila de *O. velutina***

Los resultados del análisis para las variables de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), clorofilas totales (Ca+b), carotenoides totales (Cx+c), clorofilas y carotenoides totales (Ccc) y feofitinas totales (Cf) mostraron diferencias significativas entre tratamientos (**Cuadro 13**). En el caso de Ca, se observaron diferencias significativas donde el tratamiento C-M-lb (MSS luz blanca) demostró la mayor presencia con valores de  $0.042 \pm 0.006$  mg/g PF. En contraste a los tratamientos en BIT. Para Cb, el tratamiento C-M-lvb tuvo la mayor concentración ( $0.013 \pm 0.001$  mg/g PF) en comparación a C-B-lb que mostró el valor menor ( $0.001 \pm 0.001$  mg/g PF). Por su parte C-M-lb, destacó con la mayor concentración de Ca+b ( $0.047 \pm 0.008$  mg/g PF), mientras que C-B-lb y C-B-la evidenciaron los valores mínimos ( $0.006 \pm 0.001$  y  $0.021 \pm 0.005$  mg/g PF, respectivamente).

Los tratamientos C-M-la y C-M-lb reportaron las concentraciones más altas de Cx+c ( $0.009 \pm 0.001$  y  $0.009 \pm 0.002$  mg/g PF, respectivamente), comparados con C-M-lvb que presentó la menor ( $0.001 \pm 0.001$  mg/g PF). Conjuntamente C-M-lb registró la mayor concentración de Ccc ( $0.057 \pm 0.009$  mg/g PF), en comparación a C-B-lb que tuvo la menor ( $0.008 \pm 0.002$  mg/g PF) y para concentración de Cf el tratamiento C-M-lb alcanzó la concentración más alta ( $0.216 \pm 0.057$  mg/g PF), indicando una diferencia significativa con C-B-lb con el valor

más bajo ( $0.055 \pm 0.036$  mg/g PF). Se encontraron diferentes correlaciones tanto positivas como negativas, en cuanto a luz blanca la presencia de correlaciones moderadas positivas y significativas se dio entre Ca ( $r = 0.483$ ), Ca+b ( $r = 0.417$ ), Ccc ( $r = 0.413$ ) y Cf ( $r = 0.480$ ), lo que sugiere que estos pigmentos están estrechamente influenciados por la luz blanca.

Además, el método de cultivo BIT evidenció correlaciones moderadamente negativas y significativas entre Ca ( $r = -0.606$ ), Ca+b ( $r = -0.581$ ) y Ccc ( $r = -0.594$ ) lo que parece tener un impacto no efectivo en la estimulación de estos pigmentos y que podría ser debido a las condiciones específicas de este método de cultivo.

Así mismo en el **Cuadro 14** se presentan los resultados del análisis de varianza, en la comparación de BIT, MSS y PM donde se observa una diferencia significativa notable de C-PM para el contenido de clorofilas en contraste a los demás tratamientos, a diferencia de los carotenoides.

De acuerdo con Li-li et al. (2021) el contenido de clorofila a, b y carotenoides disminuyen bajo incidencia de luz azul, resultado de la expresión de genes implicados en la descomposición de clorofila. Vidican y Urdea (2011), reportan para *Echinocactus mihanovichii* que la luz azul inhibió la síntesis de pigmentos carotenoides en casi un 50 % en comparación al control. Además, Vidican y Cachita-Cosma (2010), demostraron que vitro plantas de *Opuntia fragilis* bajo emisiones de luz led blanca sintetizaron mayor contenido de clorofilas a, b y carotenoides en comparación a luz azul, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran similitudes con investigaciones previas. Por ejemplo, Maki-Díaz et al. (2015) en nopal reportaron contenidos de clorofila a y clorofila b en cantidades similares a las encontradas a este trabajo, con valores de 0.058 mg/g y 0.027 mg/g, respectivamente. Además, se encontraron diferencias en los contenidos de clorofila a, clorofila b y carotenoides entre cultivos en BIT e invernadero en el estudio realizado por Arigundam et al. (2020) con *Vaccinium vitis-idea* spp; las plantas en invernadero presentaron una mayor concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides con valores de 0.39, 0.11 y 0.50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, en comparación con BIT que mostró contenidos de 0.30, 0.04 y 0.40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

**Cuadro 13.** Resultados de cuantificación de clorofilas de *O. velutina* en métodos de cultivo BIT y MSS expresados en mg/g PF.

Tratamiento	Ca	Cb	Ca+b	Cx+c	Ccc	Cf
<b>C-B-la</b>	0.014 ±	0.007 ±	0.021 ±	0.007 ±	0.028 ±	0.094 ±
	0.006 <sup>CD</sup>	0.001 <sup>AB</sup>	0.005 <sup>BC</sup>	0.003 <sup>AB</sup>	0.008 <sup>BC</sup>	0.024 <sup>BC</sup>
<b>C-B-lb</b>	0.004 ±	0.001 ±	0.006 ±	0.003 ±	0.008 ±	0.055 ±
	0.002 <sup>D</sup>	0.001 <sup>B</sup>	0.001 <sup>C</sup>	0.001 <sup>C</sup>	0.002 <sup>C</sup>	0.036 <sup>C</sup>
<b>C-B-lvb</b>	0.016 ±	0.009 ±	0.025 ±	0.004 ±	0.029 ±	0.146 ±
	0.007 <sup>C</sup>	0.010 <sup>AB</sup>	0.016 <sup>B</sup>	0.002 <sup>BC</sup>	0.018 <sup>B</sup>	0.024 <sup>AB</sup>
<b>C-M-la</b>	0.030 ±	0.008 ±	0.037 ±	0.009 ±	0.046 ±	0.115 ±
	0.003 <sup>B</sup>	0.001 <sup>AB</sup>	0.002 <sup>AB</sup>	0.001 <sup>A</sup>	0.002 <sup>AB</sup>	0.042 <sup>BC</sup>
<b>C-M-lb</b>	0.042 ±	0.006 ±	0.047 ±	0.009 ±	0.057 ±	0.216 ±
	0.006 <sup>A</sup>	0.003 <sup>AB</sup>	0.008 <sup>A</sup>	0.002 <sup>A</sup>	0.009 <sup>A</sup>	0.057 <sup>A</sup>
<b>C-M-lvb</b>	0.016 ±	0.013 ±	0.028 ±	0.001 ±	0.029 ±	0.127 ±
	0.003 <sup>C</sup>	0.002 <sup>A</sup>	0.004 <sup>B</sup>	0.001 <sup>C</sup>	0.004 <sup>B</sup>	0.044 <sup>BC</sup>

\*Tratamientos: C-B-la) Clorofilas BIT luz azul; C-B-lb) Clorofilas BIT luz blanca; C-B-lvb) Clorofilas luz UV-B; C-M-la) Clorofilas MSS luz azul; C-M-lb) Clorofilas MSS luz blanca; C-M-lvb) Clorofilas MSS luz UV-B. Ca: clorofila; Cb: clorofila b; Ca+b: clorofilas totales; Cx+c: carotenoides totales; Ccc: clorofilas y carotenoides totales; Cf: feofitinas totales. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

**Cuadro 14.** Resultados de cuantificación de clorofilas de *O. velutina* en métodos de cultivo BIT, MSS y PM expresados en mg/g PF.

Tratamiento	Ca	Cb	Ca+b	Cx+c	Ccc	Cf
<b>C-B-la</b>	0.014 ±	0.007 ±	0.021 ±	0.007 ±	0.028 ±	0.094 ±
	0.006 <sup>DE</sup>	0.001 <sup>BC</sup>	0.005 <sup>CD</sup>	0.003 <sup>AB</sup>	0.008 <sup>C</sup>	0.024 <sup>C</sup>

<b>C-B-lb</b>	0.004 ± 0.002 <sup>E</sup>	0.001 ± 0.001 <sup>C</sup>	0.006 ± 0.001 <sup>D</sup>	0.003 ± 0.001 <sup>C</sup>	0.008 ± 0.002 <sup>D</sup>	0.055 ± 0.036 <sup>C</sup>
<b>C-B-lvb</b>	0.016 ± 0.007 <sup>D</sup>	0.009 ± 0.010 <sup>BC</sup>	0.025 ± 0.016 <sup>C</sup>	0.004 ± 0.002 <sup>BC</sup>	0.029 ± 0.018 <sup>C</sup>	0.146 ± 0.024 <sup>BC</sup>
<b>C-M-la</b>	0.030 ± 0.003 <sup>C</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>BC</sup>	0.037 ± 0.002 <sup>BC</sup>	0.009 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.046 ± 0.002 <sup>BC</sup>	0.115 ± 0.042 <sup>C</sup>
<b>C-M-lb</b>	0.042 ± 0.006 <sup>B</sup>	0.006 ± 0.003 <sup>BC</sup>	0.047 ± 0.008 <sup>B</sup>	0.009 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.057 ± 0.009 <sup>B</sup>	0.216 ± 0.057 <sup>B</sup>
<b>C-M-lvb</b>	0.016 ± 0.003 <sup>D</sup>	0.013 ± 0.002 <sup>B</sup>	0.028 ± 0.004 <sup>C</sup>	0.001 ± 0.001 <sup>C</sup>	0.029 ± 0.004 <sup>C</sup>	0.127 ± 0.044 <sup>BC</sup>
<b>C-PM</b>	0.087 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.032 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.118 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.000 ± 0.001 <sup>C</sup>	0.119 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.647 ± 0.042 <sup>A</sup>

\*Tratamientos: C-B-la) Clorofilas BIT luz azul; C-B-lb) Clorofilas BIT luz blanca; C-B-lvb) Clorofilas luz UV-B; C-M-la) Clorofilas MSS luz azul; C-M-lb) Clorofilas MSS luz blanca; C-M-lvb) Clorofilas MSS luz UV-B; C-PM) Clorofilas planta madre. Ca: clorofila; Cb: clorofila b; Ca+b: clorofilas totales; Cx+c: carotenoides totales; Ccc: clorofilas y carotenoides totales; Cf: feofitinas totales. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ .

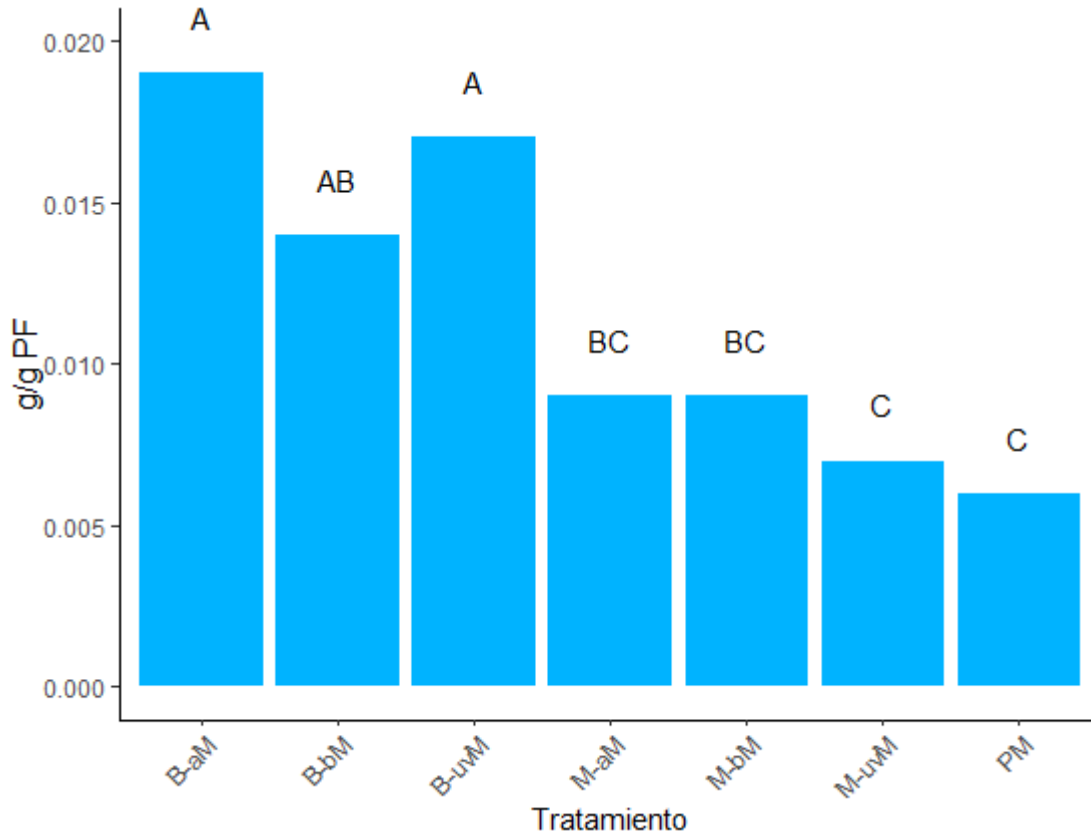
El uso de sistemas de inmersión temporal ha evidenciado el aumento en el contenido de pigmentos tal y como Martínez-Arroyo et al., (2023) que en su estudio con *Hylocereus undatus* mostraron una tasa mayor de clorofilas y carotenoides. Otro estudio realizado por Hwang et al. (2022) con fresa y *C. officinale*, cultivados en medio semisólido y sistemas de inmersión temporal (SIT), reveló que la mayor tasa de pigmentos fotosintéticos se encontró en cultivo en SIT. Sin embargo, para *C. officinale*, el mayor contenido se presentó en medio semisólido. Los autores sugieren que la mayor tasa fotosintética en SIT puede estar relacionada con un mejor intercambio gaseoso.

Shin et al. (2008) llevaron a cabo investigaciones con *Doritaenopsis*, utilizando luz azul y luz blanca en el cultivo *in vitro* en medio semisólido. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los contenidos de clorofila a, clorofila b y carotenoides entre ambos tratamientos. Los valores reportados para clorofila a, clorofila b y carotenoides fueron de 2.3, 1.4 y 0.4 mg/g PF, respectivamente, para el cultivo con luz blanca, mientras que con luz azul se obtuvieron valores de 2.3, 1.5 y 0.4 mg/g PF, respectivamente. En otro estudio

realizado por He et al. (2020) con *Camellia oleifera* cultivada *in vitro* bajo diferentes emisiones de luz azul y luz blanca, se obtuvieron resultados significativamente diferentes en los contenidos de pigmentos fotosintéticos. El tratamiento con luz blanca mostró un contenido mayor de pigmentos fotosintéticos, aproximadamente dos veces más que el tratamiento con luz azul. En el trabajo de Ali et al. (2023) realizado con *Mentha spicata* L., se observó una marcada disminución en los niveles de clorofila y producción de carotenoides como resultado de la exposición a la luz UV-B. Según los investigadores, esta pérdida se origina en la destrucción del cloroplasto ocasionada por la radiación UV-B. Además, la exposición de las plantas a altas dosis de UV-B puede tener un impacto indirecto en la biosíntesis de carotenoides, a través de cascadas de señalización no específicas que están vinculadas con daño significativo en el ADN y la producción excesiva de ROS (Jansen et al., 2008).

#### **7.5 Extracción y cuantificación de mucílago**

En el análisis del contenido de mucílago, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Específicamente, los tratamientos cultivados mediante el método de cultivo BIT presentaron la mayor acumulación de mucílago, con valores que oscilan entre  $0.019 \pm 0.003$  y  $0.014 \pm 0.001$  g /g PF de nopal. Estos valores fueron estadísticamente diferentes en comparación con los tratamientos en medio semisólido, que mostraron concentraciones de mucílago de  $0.009 \pm 0.002$  y  $0.009 \pm 0.002$  g /g PF de nopal y también en comparación con el tratamiento PM, que registró un contenido de  $0.006 \pm 0.001$  g /g PF de nopal (**Figura 16**).



**Figura 16.** Cuantificación de mucílago de *O. velutina* en diferentes métodos de cultivo. Letras iguales indican valores estadísticamente iguales entre columnas a  $p \leq 0.05$ . B-aM) BIT luz azul; B-bM) BIT luz blanca; B-uvM) BIT luz UV-B; M-aM) MSS luz azul; M-bM) MSS luz blanca; M-uvM) MSS luz UV-B; PM) planta madre *in situ*.

Estos resultados representan un aumento significativo de 216 % en el contenido de mucílago en los tratamientos de BIT en comparación con el tratamiento PM y un aumento del 111 % en comparación con los tratamientos en medio semisólido. La función que ejerce el mucílago en *Opuntia* spp. es la de mantener el equilibrio iónico en las células vegetales además del transporte y almacén de agua; Luna-Zapién et al. (2023) reportan que el aumento de mucílago en *Opuntia* spp. esta influenciado por el déficit de agua, lo que indica que a medida que el estrés hídrico incrementa, la cantidad de mucílago en el hidrénquima aumenta. Lo cual sugiere que al exponerse los explantes de *O. velutina* a periodos prolongados de ausencia de medio líquido en BIT repercute en la acumulación de mucílago, lo que puede tener implicaciones importantes para su valor nutricional y aplicaciones en la industria alimentaria.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que el cultivo en biorreactores de inmersión temporal (BIT) mostraron un rendimiento superior, mientras que el cultivo de planta madre *in situ* (PM) presentó un rendimiento inferior en comparación con investigaciones previas. Específicamente, Sepúlveda et al. (2007) obtuvieron una extracción de 0.015 g/g de PF de nopal (*Opuntia* spp.) *in situ*, demostrando una mayor eficiencia en ese estudio particular. En otra investigación realizada por Reyes-Buendía et al. (2020), se lograron rendimientos de 0.005 g/g PF, resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio para el mismo medio de cultivo (PM). Por otro lado, en el estudio de González (2011) sobre el cultivo de nopal *in situ* *O. ficus-indica*, se encontró un rendimiento más bajo de 0.001 g/g PF.

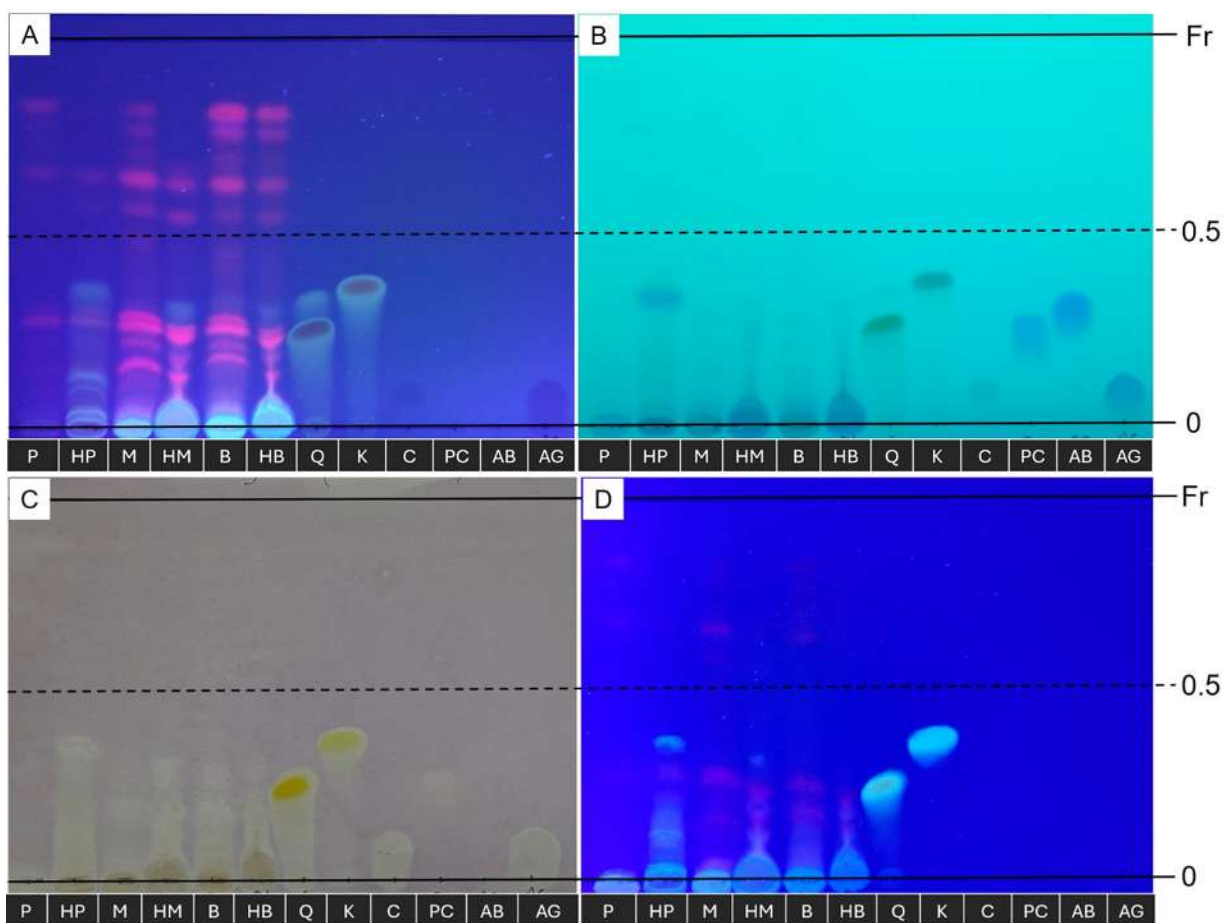
Estos resultados indican que el cultivo en biorreactores de inmersión temporal (BIT) puede ser una estrategia prometedora para mejorar el rendimiento en la producción no solo de *O. velutina*, sino de diversas especies de *Opuntia*, en comparación con los métodos tradicionales como el cultivo *in situ* (PM).

## 7.6 Cromatografía de capa fina (CCF)

Con el fin de identificar los compuestos fenólicos en las muestras que mostraron una mayor concentración de flavonoides, se llevó a cabo una CCF. En esta técnica, se empleó una mezcla de metanol, acetato de etilo y hexano (1:3:6) como fase móvil y se reveló mediante luz UV a longitudes de onda de 365 y 254 nm. Los extractos de *O. velutina* utilizados en esta parte correspondieron a los tratamientos de luz BIT luz azul, MSS luz azul y como control, la planta madre (PM). Los extractos fueron obtenidos mediante etanol al 79 %. Al emplear estándares de quercetina, kaempferol, catequina, ácido p-cumárico, ácido 4-hidroxybenzoico y ácido gálico, se pudo especular la presencia de algunos de estos compuestos en los extractos de *O. velutina*.

La CCF de la **Figura 24A**, de los extractos etanólicos de *O. velutina*, muestra bandas fluorescentes de color violeta, azul y turquesa al observarse mediante la presencia de luz UV a 365 nm. En la **Figura 24B**, se pueden visualizar bandas de color violeta y amarillo con incidencia de luz UV a 254 nm. Se encontraron bandas para cada uno de los tratamientos con excepción de P (**Cuadro 15**), para HP se encontraron bandas con Fr de 0.38, 0.09 y 0.31, los cuales corresponden a kaempferol, catequina, ácido 4-hidroxybenzoico y ácido gálico. Las bandas de M, HM y B presentaron un Fr de 0.26 indicando la presencia de quercetina y ácido

p-cumárico y en HB se exhibió un Fr de 0.31 presunta a ácido 4-hidroxybenzoico (**Cuadro 16**).



**Figura 17.** CCF de extractos etanólicos de *O. velutina*, con y sin hidrólisis. A) Incidencia de luz UV 365 nm. B) Incidencia de luz UV 254 nm. C) Revelado con DPPH 10 % luz visible. D) Revelado con  $\text{AlCl}_3$  2 % UV 365 nm. P (planta madre); HP (planta madre hidrolizada); M (medio semisólido); HM (medio semisólido hidrolizado); B (biorreactor de inmersión temporal); HB (biorreactor de inmersión temporal hidrolizado); Q (quercetina); K (kaempferol); C (catequina); PC (ácido p-cumárico); AB (ácido 4-hidroxybenzoico); AG (ácido gálico).

Al realizar el revelado con DPPH al 10 % se pudo observar en la **Figura 24C** la presencia de compuestos fenólicos en las diferentes bandas al reaccionar con el radical DPPH tornándose de color amarillo tenue hasta amarillo fuerte lo que indica la actividad antioxidante de los diferentes extractos (Souleymane et al., 2016). Por otro lado, para el revelado con  $\text{AlCl}_3$  al 2

% bajo luz UV 365 nm (**Figura 24D**) las bandas se pigmentaron de un color azul turquesa a amarillo verdoso que, comparado con los flavonoides de referencia, indica la presunta presencia de flavonoides.

Cabe destacar que la presencia de bandas en cada una de las muestras puede indicar la presencia de compuestos fenólicos diferentes, así como flavonoides que no se pudieron identificar mediante los estándares, lo que abre una perspectiva de los diferentes perfiles de *O. velutina* bajo diferentes sistemas de cultivo.

**Cuadro 15.** Valores de Fr obtenidos para cada extracto etanólico bajo diferente sistema de cultivo. Bandas fluorescentes bajo incidencia de luz UV a 365 y 254 nm como reveladores.

<b>Extractos etanólicos de <i>O. velutina</i>, con y sin hidrólisis</b>						
<b>Fr</b>	<b>P</b>	<b>HP</b>	<b>M</b>	<b>HM</b>	<b>B</b>	<b>HB</b>
<b>0.04</b>			x			
<b>0.05</b>		x				
<b>0.06</b>				x		x
<b>0.07</b>				x		
<b>0.08</b>		x				
<b>0.12</b>		x				
<b>0.13</b>				x		
<b>0.14</b>		x				x
<b>0.15</b>					x	
<b>0.16</b>			x			
<b>0.18</b>				x	x	x
<b>0.21</b>			x			
<b>0.22</b>						x
<b>0.24</b>				x		
<b>0.26</b>			x	x	x	
<b>0.27</b>		x				
<b>0.28</b>	x		x		x	
<b>0.29</b>				x		
<b>0.31</b>		x				x
<b>0.32</b>	x			x		
<b>0.33</b>		x				
<b>0.36</b>		x				
<b>0.48</b>			x			
<b>0.54</b>						x
<b>0.55</b>				x	x	
<b>0.58</b>		x				
<b>0.60</b>	x					

<b>0.61</b>						x
<b>0.62</b>					x	
<b>0.64</b>			x	x		
<b>0.67</b>	x					
<b>0.71</b>			x		x	
<b>0.73</b>	x					
<b>0.75</b>					x	x
<b>0.78</b>	x		x			
<b>0.82</b>	x	x	x		x	x
<b>Bandas totales</b>	7	10	10	10	9	8

**Cuadro 16.** Compuestos fenólicos detectados en los extractos de *O. velutina* bajo diferente sistema de cultivo por comparación de estándares.

Extracto de <i>O. velutina</i> con y sin hidrólisis	Estándares de compuestos fenólicos					
	Q (0.26)	K (0.38)	C (0.09)	PC (0.26)	AB (0.31)	AG (0.09)
<b>P</b>	-	-	-	-	-	-
<b>HP</b>	-	+	+	-	+	+
<b>M</b>	+	-	-	+	-	-
<b>HM</b>	+	-	-	+	-	-
<b>B</b>	+	-	-	+	-	-
<b>HB</b>	-	-	-	-	+	-

Q: quercetina, K: kaempferol, C: catequina, PC: ácido p-cumárico, AB: ácido 4-hidroxybenzoico y AG: ácido gálico. (+) presente; (-) ausente.

La detección de flavonoides y ácidos fenólicos en cladodios de la especie de *O. velutina* tras la evaluación de ácidos fenólicos mediante CCF pueden ser verificados por lo reportado por diferentes autores que mencionan la presencia de compuestos que en el presente trabajo presuntamente se identificaron como quercetina, kaempferol, catequina, ácido 4-hidroxybenzoico y ácido p-cumárico (Guevara-Figueroa et al., 2010; Silva et al., 2021; Hernández-Becerra et al., 2022).

La coloración verde-amarillenta que se aprecia en las CCF reveladas con AlCl<sub>3</sub> al 2 % bajo luz UV a 365 nm podría estar asociada a la presencia de glucósidos de biflavonoides, flavonas y flavonoides. La detección de bandas azuladas podría ser atribuida a la existencia de 5-desoxiisoflavonas y 7,8-dihidroxiiflavanonas (Koua et al., 2011; Gwatidzo et al., 2018). La presencia de bandas de color violeta y azul indican existencia de flavonoides en cada una

(Syarifah y Retnowati, 2019; Lakhdari et al., 2023). Por otro lado, en la parte superior de la CCF, se logran observar varias bandas, lo que sugiere la presencia de pigmentos vegetales como clorofilas a y b,  $\beta$ -caroteno y feofitinas debido a su naturaleza no polar (Adiga et al., 2023). Estos compuestos migraron hacia la parte superior debido a la interacción con la fase móvil de la CCF, compuesta principalmente por hexano (no polar), acetato de etilo (medianamente polar) y metanol (polar). La combinación de esta fase móvil facilitó la migración de los pigmentos. La presencia mayoritaria de hexano, junto con acetato de etilo y metanol, permitió la elusión efectiva de compuestos no polares, como los pigmentos.

Existen otros flavonoides que constituyen los extractos analizados de *O. velutina*, pero solo se logró identificar los anteriormente referenciados mediante los estándares, sin embargo, en literatura no existe un análisis de los compuestos fenólicos de *O. velutina* cultivado *in vitro* en medio semisólido y biorreactores de inmersión temporal, lo que abre camino a seguir investigando los compuestos que esta planta posee.

## VIII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados alcanzados en el presente trabajo, se alcanzaron importantes avances en la identificación y propagación de la especie *Opuntia velutina*, la cual no había sido reportada en la literatura como nopal verdura. Se desarrollo y optimizó un protocolo de micropropagación en BIT, con una proliferación de brotes al usar de meta-topolina. Además, se observó que el cultivo en BIT incrementó significativamente el contenido de mucílago y favoreció la acumulación de flavonoides, lo cual se correlacionó con una mayor capacidad antioxidante. Se mostró que el medio semisólido influyó en la producción de clorofilas a diferencia de los BIT, no obstante, la planta madre mantuvo el mayor contenido de estos pigmentos. Finalmente, los BIT junto con la exposición de una longitud de onda lumínica azul no solo aumentaron la cantidad de flavonoides, sino que también diversificaron el perfil de compuestos fenólicos, como se analizó en la cromatografía de capa fina. Estos hallazgos destacan el potencial de los BIT para mejorar tanto la calidad como la diversidad de compuestos bioactivos en *O. velutina*.

## IX. LITERATURA CITADA

- Acosta, M. L. C. (2019). Polifenoles: compuestos bioactivos con efectos benéficos en la prevención de diabetes tipo 2. *REDCieN*, 1, 6-6.
- Adiga, V., P. S. C., Kikkeri, V. V., Praveen, C., and Senapati, S. (2023). Developing a novel solvent system to isolate plant pigments of different polarities using thin layer chromatography. *Qeios*. <https://doi.org/10.32388/I14RGE>
- Agarwal, S. (2007). Increased antioxidant activity in *Cassia seedlings* under UV-B radiation. *Biologia plantarum*, 51(1), 157–160. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0030-z>
- Agati, G., Matteini, P., Goti, A., and Tattini, M. (2007). Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*, 174(1), 77-89.
- Ahmad, N., Rab, A. and Ahmad, N. (2016). Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 154, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015>
- Alcantara-Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D. y Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Ali, A., Santoro, P., Mori, J., Ferrante, A. and Cocetta, G. (2023). Effect of UV-B elicitation on spearmint's (*Mentha spicata* L.) morpho-physiological traits and secondary metabolites production. *Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s10725-023-01028-7>
- Alves, V., Pinto, R., Debiasi, C., Santos, M. C., Gonçalves, J. C. and Domingues, J. (2021). Micropropagation of *Corema album* from adult plants in semisolid medium and temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 145(3), 641-648.
- Amer, A. (2021). Biotechnology approaches for *in vitro* production of flavonoids. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 457-468.

- Amoo, S. O., Aremu, A. O. and Van Staden, J. (2012). *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 111(3), 345-358.
- Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Carbonell-Barrachina, Á. A., Legua, P. and Hernández, F. (2018). Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(4), 1566–1573. doi:10.1002/jsfa.8628
- Angulo-Bejarano, P. I., Gómez-García, M. del R., Valverde, M. E. and Paredes-López, O. (2019). Nopal (*Opuntia* spp.) and its Effects on Metabolic Syndrome: New Insights for the Use of a Millenary Plant. Current Pharmaceutical Design, 25(32), 3457–3477. <https://doi.org/10.2174/1381612825666191010171819>
- Arba, M., Falisse, A., Choukr-Allah, R. and Sindic, M. (2017). Biology, flowering and fruiting of the cactus *Opuntia* spp.: a review and some observations on three varieties in Morocco. Brazilian Archives of Biology and Technology, 60.
- Aremu, A. O., Bairu, M. W., Szüčová, L., Doležal, K., Finnie, J. F. and Van Staden, J. (2012). Assessment of the role of meta-topolins on *in vitro* produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated ‘Williams’ banana. Acta physiologiae plantarum, 34(6), 2265-2273.
- Arigundam, U., Variyath, A. M., Siow y. L., Marshall, D. and Debnath, S. C. (2020). Liquid culture for efficient *in vitro* propagation of adventitious shoots in wild *Vaccinium vitis-idaea* ssp. Minus (lingonberry) using temporary immersion and stationary bioreactors. Scientia Horticulturae, 264, 109199. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109199>
- Aruwa, C. E., Amoo, S. and Kudanga, T. (2019). Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. LWT, 111, 337-344 Pp.
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O. and Kudanga, T. (2018). *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects—A comprehensive review. Food Research International, 112, 328-344.

- Astello-García, M. G., Santos Díaz, M. D. S., Reyes-Agüero, A. and Barba de la Rosa, A. P. (2012). *Opuntia* spp. as a Source of Bioactive Compounds. In *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds* (pp. 101-111). American Chemical Society.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., and Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373–378. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.162
- Ayala-Mata, F., Barrera-Mendoza, C. C., Cortés-Rojó, C., Montoya-Pérez, R. D. C., García-Pérez, M. E. y Rodríguez-Orozco, A. R. (2019). Antioxidantes en asma: polifenoles. *Medicina interna de México*, 35(2), 223-234.
- Ayub, R. A., Pereira, A. B., Santos, J. N. D., Silva, D. M. D., and Pessenti, I. L. (2021). Sucrose concentration and blueberry plant density in temporary immersion systems (TIS). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 43, e-166.
- Azmi, N. S., Ahmad, R. and Ibrahim, R. (2016). Fluorescent light (fl), red led and blue led spectrums effects on *in vitro* shoots multiplication. *Jurnal Teknologi*, 78(6–6), Article 6–6. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.9032>
- Barba, F. J., Garcia, C., Fessard, A., Munekata, P. E., Lorenzo, J. M., Aboudia, A., Ouadia, A. and Remize, F. (2020). *Opuntia ficus-indica* edible parts: A food and nutritional security perspective. *Food Reviews International*, 1-23.
- Bayraktar, M. (2019). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni using RITA® bioreactor. *HortScience*, 54(4), 725-731.
- Bednarek, P. T., and Orłowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi) genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(2), 245-257 Pp.
- Beigmohamadi, M., Movafeghi, A., Sharafi, A., Jafari, S., and Danafar, H. (2019). Cell suspension culture of *Plumbago europaea* L. towards production of plumbagin. *Iranian Journal of Biotechnology*, 17(2).
- Bele, A. A. and Khale, A. (2011). An overview on thin layer chromatography. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 2(2), 256.

- Bello-Bello, J. J., Schettino-Salomón, S., Ortega-Espinoza, J. and Spinoso-Castillo, J. L. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, *11*(10), 437.
- Berthouly, M. and Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11)
- Bošnjak, D., Marković, M., Agić, D., Vinković, T., Tkalec Kojić, M., Ravnjak, B. and Stanisavljević, A. (2021). The influence of nutrient media modification on the morphological parameters in raspberry (*Rubus idaeus* L.) micropropagation in the liquid and semi-solid media. *Poljoprivreda*, *27*(1), 22-29.
- Bougdaoua, H., and El Mtili, N. (2020). *In vitro* regeneration of two northern Moroccan *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. genotypes. *Moroccan Journal of Biology* No. 17. 36-42 Pp.
- Bouzroud, S., El Maaiden, E., Sobeh, M., Devkota, K. P., Boukcim, H., Kouisni, L., and El Kharrassi, Y. (2022). Micropropagation of *Opuntia* and Other Cacti Species Through Axillary Shoot Proliferation: A Comprehensive Review. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 926653.
- Brindis-Trujillo, R. A., Salinas-Hernández, R. M., Brito-Vega, H., Gómez-Méndez, E., Salaya-Domínguez, J. M., Mercado-Ruíz, J. N., García-Robles, J. M., Corzo-Sosa, C. A. y Ulín-Montejo, F. (2020). Efecto del recubrimiento con mucílago de nopal *Opuntia ficus-indica* en la conservación de Rambután (*Nephelium lappaceum* L.) mínimamente procesado. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, *21*(1).
- Cai, L. (2014). Thin Layer Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, *8*(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0603s08>
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T. y Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the twenty-first century. *Plant cell culture protocols*, 17-46.

- Chen, Z., Ma y., Weng y. yang, R., Gu, Z. y Wang, P. (2019). Effects of UV-B radiation on phenolic accumulation, antioxidant activity and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Food Bioscience*, 30, 100409. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.010>
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L. y Poli, F. (2021). Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. *Molecules*, 26(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules26020495>
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., and Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217–225. doi:10.1016/j.seppur.2006.12.005
- Choudhary, K. K. y Agrawal, S. B. (2014). Ultraviolet-B induced changes in morphological, physiological and biochemical parameters of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.032>
- Cruz-Hernández, A. y Paredes-López, O. (2010). Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 110-126.
- Csepregi, K., Coffey, A., Cunningham, N., Prinsen, E., Hideg, É. y Jansen, M. A. K. (2017). Developmental age and UV-B exposure co-determine antioxidant capacity and flavonol accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 140, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.009>
- Cybularz-Urban, T., Hanus-Fajerska, E. y Bach, A. (2015). Callus induction and organogenesis *in vitro* of cattleya from protocorm-like bodies (PLBs) under different light conditions. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(6), Article 6.
- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M. y Benelli, C. (2021). Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Agronomy*, 11(12), 2414.

- De Souza, L. M., Ribeiro Barbosa, M., Zárata-Salazar, J. R., Lozano-Isla, F. y Rangel Camara, T. (2019). Uso de meta-topolina, una citoquinina no convencional en la multiplicación *in vitro* de *Opuntia stricta* Haw. *Biotecnología Vegetal*, 19(2), 85-97.
- Dewir, Y. H., Habib, M. M., Alaizari, A. A., Malik, J. A., Al-Ali, A. M., Al-Qarawi, A. A., and Alwahibi, M. S. (2023). Promising Application of Automated Liquid Culture System and Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Large-Scale Micropropagation of Red Dragon Fruit. *Plants*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/plants12051037>
- Días, M. C., Pinto, D. C. y Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.
- Donaldson, M. S. (2004). Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-19>
- Dou, H., Niu, G. y Gu, M. (2019). Pre-Harvest UV-B Radiation and Photosynthetic Photon Flux Density Interactively Affect Plant Photosynthesis, Growth, and Secondary Metabolites Accumulation in Basil (*Ocimum basilicum*) Plants. *Agronomy*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080434>
- Dutta G, S., and Jatothu, B. (2013). Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant biotechnology reports*, 7, 211-220.
- Ebrahimi, P., Shokramraji, Z., Tavakkoli, S., Mihaylova, D. y Lante, A. (2023). Chlorophylls as Natural Bioactive Compounds Existing in Food By-Products: A Critical Review. *Plants*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/plants12071533>
- Egbuna, C. y Dable-Tupas, G. (2020). Functional foods and nutraceuticals. Springer Nature Switzerland AG, 1, 1-632.
- El Finti, A., El Boullani, R., Belayadi, M., Ait Aabd, N., and El Mousadik, A. (2010). Micropropagation in vitro of *Opuntia ficus-indica* in Southern Morocco. In VII International Congress on Cactus Pear and Cochineal 995 (pp. 93-98).

- El Finti, A., El Boullani, R., El Ayadi, F., Ait Aabd, N., and El Mousadik, A. (2012). Micropropagation *in vitro* of *Opuntia ficus-indica* in south of Morocco. *International Journal of Chemical and Biochemical Science*, 1, 6-10 Pp.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M. H. S., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B. y Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus *Opuntia ficus-indica* as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.
- Erkoyuncu, M. T., and Yorgancilar, M. (2016). Plant tissue culture for the production of secondary metabolites. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(1), 66-76.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y. and Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743–748.
- Escalona, M., Samsom, G., Borroto, C., and Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets, *In vitro cellular and Development Biology - Plant*, 39(6), 651-656
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A. y García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18.
- Etienne, H. and Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231.
- Favory, J.-J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravecz, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G. I., Oakeley, E. J., Seidlitz, H. K., Nagy, F. y Ulm, R. (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 28(5), 591–601. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.4>
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, S. S., Akbar, F. y Kanwal, F. (2016). Correlation of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L.

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 159, 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.008>

Ferrari, R. C., Bittencourt, P. P., Rodrigues, M. A., Moreno-Villena, J. J., Alves, F. R., Gastaldi, V. D., Boxall, S. F., Dever, L. V., Demarco, D., Andrade, S. C., Edwards, E., Hartwell, J. y Freschi, L. (2020). C4 and crassulacean acid metabolism within a single leaf: deciphering key components behind a rare photosynthetic adaptation. *New Phytologist*, 225(4), 1699-1714.

Ferreira, M. L. F., Serra, P., and Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 736-749.

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O. y Tomás-Barberán, F. A. (2019). Los efectos de los polifenoles y otros bioactivos en la salud humana. *Alimentos y funciones*, 10 (2), 514-528.

Fuentes-Alventosa, J. M., Jaramillo, S., Rodríguez-Gutiérrez, G., Cermeño, P., Espejo, J. A., Jiménez-Araujo, A., Guillén-Bejarano, R., Fernández-Bolaños, J., and Rodríguez-Arcos, R. (2008). Flavonoid Profile of Green Asparagus Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6977–6984. doi:10.1021/jf8009766

Gao, L., Liu y., Wang, X., Li y., Han, R., Gao, L., Liu y., Wang, X., Li y. y Han, R. (2019). Lower levels of UV-B light trigger the adaptive responses by inducing plant antioxidant metabolism and flavonoid biosynthesis in *Medicago sativa* seedlings. *Functional Plant Biology*, 46(10), 896–906. <https://doi.org/10.1071/FP19007>

García-Saucedo, P. A., Valdez-Morales, M., Elena Valverde, M., Cruz-Hernandez, A., and Paredes-Lopez, O. (2005). Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 215-219.

Gebretsadik, G., Animut, G., and Tegegne, F. (2013). Assessment of the potential of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) as livestock feed in Northern Ethiopia. *Livestock research for rural development*, 25(2), 1-10.

- Gezer, R. (2023). Tissue culture of ornamental succulent plants. *Advances Plant Research*, 107-125
- Ghaffari, A., Hasanloo, T., and Nekouei, M. K. (2013). Micropropagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and effect of medium composition on proliferation and rooting. *Int. J. Biosci*, 3, 129-139.
- Gianguzzi, V., Inglese, P., Barone, E. y Sottile, F. (2019). *In vitro* regeneration of *Capparis spinosa* L. by using a temporary immersion system. *Plants*, 8(6), 177.
- González G., L. R. (2011). Desarrollo y evaluación de una película comestible obtenida del mucílago de nopal *Opuntia ficus-indica* utilizada para reducir la tasa de respiración de nopal verdura. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, 10, 14.
- Grzegorzcyk-Karolak, I., Staniewska, P., Lebelt, L. y Piotrowska, D. G. (2022). Optimization of cultivation conditions of *Salvia viridis* L. shoots in the Plantform bioreactor to increase polyphenol production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1), 269-280.
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., De León-Rodríguez y Barba R. A. P. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 525-532.
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R., and Devi, S. (2020). A review on micropropagation culture method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86-93.
- Gwatidzo, L., Dzomba, P., and Mangena, M. (2018). TLC separation and antioxidant activity of flavonoids from *Carissa bispinosa*, *Ficus sycomorus*, and *Grewia bicolor* fruits. *Nutrire*, 43(1). doi:10.1186/s41110-018-0062-5
- Hahn, E.-J., Kozai, T. y Paek, K.-Y. (2000). Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect *in vitro* Growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. *Journal of Plant Biology*, 43(4), 247–250. <https://doi.org/10.1007/BF03030425>

- Hashim, M., Ahmad, B., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B. H. y Anjum, S. (2021). Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants *in vitro* cultures. *Plants*, 10(8), 1521.
- Hasnain, A., Naqvi, S. A. H., Ayesha, S. I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Zeeshan H., N., Abbas, A., Adamske, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M. E. and Abdelhamid, M. (2022). Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1009395.
- He, C., Zeng, Y., Fu, Y., Wu, J., and Liang, Q. (2020). Light quality affects the proliferation of *in vitro* cultured plantlets of *Camellia oleifera* Huajin. *PeerJ*, 8, e10016.
- Hernández G., S. N., Marino, L., Isern, D. M., Coria, I. D., y Irurzun, I. M. (2019). Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales. *Invenio*, 22.
- Hernández-Becerra, E., de los Angeles Aguilera-Barreiro, M., Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E. y Rodríguez-García, M. E. (2022). Nopal cladodes *Opuntia ficus-indica*: Nutritional properties and functional potential. *Journal of Functional Foods*, 95, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105183>
- Herrera-Ibarra, E., Salazar-Hernández, M., Talavera-López, A., Solís-Marcial, O. J., Hernández-Soto, R., Ruelas-Leyva, J. P. y Hernández, J. A. (2023). Preparation of Surgical Thread from a Bioplastic Based on Nopal Mucilage. *Polymers*, 15(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/polym15092112>
- Hwang, H.-D., Kwon, S.-H., Murthy, H. N. yun, S.-W., Pyo, S.-S. y Park, S.-Y. (2022). Temporary Immersion Bioreactor System as an Efficient Method for Mass Production of *In vitro* Plants in Horticulture and Medicinal Plants. *Agronomy*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020346>
- Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D. y Adam, V. (2018). Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108–118 Pp.

- In-Cheol, J., Eun-Kyung, J., Myung-Suk, B., Hyun-Jung, L., Gyeong-Im, J., Eunju, P., Hyun-Gyun, Y. Gwang-Hwan, A., and Seung-Cheol, L. (2010). Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruit. *J. Med. Plants Res*, 4(2), 155-160.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. y Puri, S. (2018). Consecuencias mediadas por reguladores del crecimiento vegetal de metabolitos secundarios en plantas medicinales. *Revista de Investigación Aplicada sobre Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, 26–38.
- Jansen, M. A. K., Hectors, K., O'Brien, N. M., Guisez y. y Potters, G. (2008). Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Science*, 175(4), 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.04.010>
- Jao, R.-C., Lai, C.-C., Fang, W. y Chang, S.-F. (2005). Effects of Red light on the Growth of *Zantedeschia* Plantlets *in vitro* and Tuber Formation Using Light-emitting Diodes. *HortScience*, 40(2), 436–438. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.2.436>
- Jeong, S. W., Park, S., Jin, J. S., Seo, O. N., Kim, G.-S., Kim, Y.-H., Bae, H., Lee, G., Kim, S. T., Lee, W. S. and Shin, S. C. (2012). Influences of Four Different Light-Emitting Diode Lights on Flowering and Polyphenol Variations in the Leaves of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9793–9800. <https://doi.org/10.1021/jf302272x>
- Johkan, M., Shoji, K., Goto, F., Hashida, S. y Yoshihara, T. (2010). Blue Light-emitting Diode Light Irradiation of Seedlings Improves Seedling Quality and Growth after Transplanting in Red Leaf Lettuce. *HortScience*, 45(12), 1809–1814. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.12.1809>
- Jorge, P. y Troncoso, L. (2016). Capacidad antioxidante del fruto de la *Opuntia apurimacensis* (ayrampo) y de la *Opuntia ficus-indica* (tuna). In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 77, No. 2, pp. 105-109). UNMSM. Facultad de Medicina.
- Juárez, M. C. y Passera, C. B. (2002). *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell*, 26(3), 319-324.

- Kassem, I. A. A., Joshua Ashaolu, T., Kamel, R., Elkasabgy, N. A., Afifi, S. M. y Farag, M. A. (2021). Mucilage as a functional food hydrocolloid: Ongoing and potential applications in prebiotics and nutraceuticals. *Food y Function*, 12(11), 4738–4748. <https://doi.org/10.1039/D1FO00438G>
- Kawka, B., Kwiecień, I. y Ekiert, H. (2017). Influence of Culture Medium Composition and Light Conditions on the Accumulation of Bioactive Compounds in Shoot Cultures of *Scutellaria lateriflora* L. (American Skullcap) Grown *In vitro*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(4), 1414–1425. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2508-2>
- Khalafalla, M.M., Abdellatef, E., Mohameed Ahmed, M.M. and Osman, M.G. 2007. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 2(4):1-8.
- Khurshid, R., Ullah, M. A., Tungmunnithum, D., Drouet, S., Shah, M., Zaeem, A., Hameed, S., Hano, C. y Abbasi, B. H. (2020). Lights triggered differential accumulation of antioxidant and antidiabetic secondary metabolites in callus culture of *Eclipta alba* L. *PLOS ONE*, 15(6), e0233963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233963>
- Kikowska, M., Danek, K., Gornowicz-Porowska, J. and Thiem, B. (2022). Application of temporary immersion system RITA® for efficient biomass multiplication and production of artificial seeds for ex situ conservation of *Linnaea borealis* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(3), 673-680.
- Kim, E.-Y., Park, S.-A., Park, B.-J., Lee y. y Oh, M.-M. (2014). Growth and antioxidant phenolic compounds in cherry tomato seedlings grown under monochromatic light-emitting diodes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55(6), 506–513. <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0121-7>
- Klimek-Szczykutowicz, M., Dziurka, M., Blažević, I., Đulović, A., Granica, S., Korona-Głowniak, I., Ekiert, H. and Szopa, A. (2020). Phytochemical and biological activity studies on *Nasturtium officinale* (watercress) microshoot cultures grown in RITA® temporary immersion systems. *Molecules*, 25(22), 5257.

- Kopjar, M., Orsolich, M., and Pilizota, V. (2014). Anthocyanins, phenols, and antioxidant activity of sour cherry puree extracts and their stability during storage. *International journal of food properties*, 17(6), 1393-1405.
- Koua, F. H. M., Babiker, H. A., Halfawi, A., Ibrahim, R. O., Abbas, F. M., Elgaali, E. I., and Khlafallah, M. M. (2011). Phytochemical and biological study of *Striga hermonthica* (Del.) Benth callus and intact plant. *Research In Pharmaceutical Biotechnology*, 3(7), 85-92.
- Kriaa, W., Fetoui, H., Makni, M., Zeghal, N. y Drira, N. E. (2012). Phenolic contents and antioxidant activities of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves. *International journal of food properties*, 15(6), 1220-1232.
- Kumar K., Singh D. and Singh R.S. (2018). Cactus pear: Cultivation and Uses. ICAR-Central Institute for Arid Horticulture, Bikaner, Rajasthan, India, CIAH/Tech./Pub. No73, 5 P.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K. y Sarangi, M. (2013). Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 18(1). 126-132.
- Kundu, S., Sindhusa, P. y Kumar, A. (2021). Micro-propagation techniques in horticultural crops and various factors affecting it: A review.
- Lakhdari, W., Benyahia, I., Bouhenna, M. M., Bendif, H., Khelafi, H., Bachir, H., Ladjal, A., Hammi, H., Mouhoubi, D., Khelil, H., Alomar, T. S., AlMasoud, N., Boufafa, N., Boufahja, F., and Dehliz, A. (2023). Exploration and evaluation of secondary metabolites from *Trichoderma harzianum*: GC-MS analysis, phytochemical profiling, antifungal and antioxidant activity assessment. *Molecules*, 28(13), 5025.
- Lattanzio, V., Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., and Mita, G. (2018). Signal transduction in artichoke [*Cynara cardunculus* L. subsp. scolymus (L.) Hayek] callus and cell suspension cultures under nutritional stress. *Plant physiology and biochemistry*, 127, 97-103.
- Lema-Rumińska, J., and Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti—a Review. *Haseltonia*, 19, 46–63. doi:10.2985/026.019.0107Pp.

- Li y., Cui y., Hu, X., Liao, X. y Zhang y. (2019). Chlorophyll Supplementation in Early Life Prevents Diet-Induced Obesity and Modulates Gut Microbiota in Mice. *Molecular Nutrition y Food Research*, 63(21), 1801219. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801219>
- Lindawati, N. Y. (2018). Determination of Total Flavonoid Levels on Leaf Stalks Ethanol Extract of Taro (*Colocasia Esculenta* [L.] schott). *Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy)*, 1(1), 58-66.
- Lizárraga-Velázquez, C. E., Hernández, C., González-Aguilar, G. A. y Basilio-Heredia, J. (2018). Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. *CienciaUAT*, 12(2), 127-136.
- López-Palacios, C. y Peña-Valdivia, C. B. (2020). Screening of secondary metabolites in cladodes to further decode the domestication process in the genus *Opuntia* (Cactaceae). *Planta*, 251(4), 1-14.
- Loyola-González, O., Medina-Pérez, M. A., Hernández-Tamayo, D., Monroy, R., Carrasco-Ochoa, J. A. y García-Borroto, M. (2019). A pattern-based approach for detecting pneumatic failures on temporary immersion bioreactors. *Sensors*, 19(2), 414.
- Luna-Zapién, E. A., Zegbe, J. A., Meza-Velázquez, J. A. y Minjares-Fuentes, R. (2023). Mucílago de nopal (*Opuntia* spp.) y su aplicación como aditivo alimentario: una visión general. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 46(1), Article 1. <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.1.51>
- Lustre Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: Los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
- Mabrouk, A., Abbas y., El Goumi y., El Maaiden, E., El Kharrassi y., Antry-Tazi, S. E., El Mzouri, H. y Fakiri, M. (2021). Optimization of prickly pear cacti (*Opuntia* spp.) micropropagation using an experimental design method. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(3), e1577-e1577.
- Maki-Díaz, G., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, R., Arévalo-Galarza, M. L., Calderón-Zavala, G. y Anaya-Rosales, S. (2015). Características físicas y químicas de nopal

- verdura *Opuntia ficus-indica* para exportación y consumo nacional. *Agrociencia*, 49(1), 31-51.
- Malik, M., Warchoń, M. y Pawłowska, B. (2018). Liquid culture systems affect morphological and biochemical parameters during *Rosa canina* plantlets *in vitro* production. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 58-64.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park y. G., Wei, H., Kim, S. H. y Jeong, B. R. (2017). Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0051-2>
- Martínez F., H. E., Garnica R., M. G. y Zavala M., E. (2021). Georreferenciación y caracterización de cinco especies silvestres de *Opuntia* localizadas en Michoacán, México. *Opuntia género americano, su cultura prehispánica, innovaciones desarrolladas y la propiedad intelectual en su entorno*. Universidad de Guadalajara, México. 8-9 Pp.
- Martinez-Arroyo, M. C., Mancilla-Álvarez, E., Spinoso-Castillo, J. L. and Bello-Bello, J. J. (2023). Evaluation of the effect of different culture systems on photomixotrophic capacity during *in vitro* multiplication of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *South African Journal of Botany*, 159, 396-404.
- Martínez-Arroyo, M. C., Mancilla-Álvarez, E., Spinoso-Castillo, J. L., and Bello-Bello, J. J. (2023). Evaluation of the effect of different culture systems on photomixotrophic capacity during *in vitro* multiplication of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *South African Journal of Botany*, 159, 396-404.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez-Silvestre, K. E., Santiz-Gómez, J. A., Luján-Hidalgo, M. C., Ruiz-Lau, N., Sánchez-Roque y. y Gutiérrez-Miceli, F. A. (2022). Effect of UV-B Radiation on Flavonoids and Phenols Accumulation in Tempisque (*Sideroxylon capiri* Pittier) Callus. *Plants*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/plants11040473>

- Matysiak, B. y Kowalski, A. (2019). White, blue and red LED lighting on growth, morphology and accumulation of flavonoid compounds in leafy greens. *Zemdirbyste-Agriculture*, 106(3).
- Mehranzadeh, G., Forghani, A. H. y Razavizadeh, R. (2020). The Impact of UV-B Radiation on Some Metabolites and Pigments of *Carum Copticum* Under *In vitro* Culture. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 10(4), 3325–3332. <https://doi.org/10.30495/ijpp.2020.1895289.1210>
- Melviana, A. C., Esyanti, R. R., Mel, M. and Setyobudi, R. H. (2021). Biomass enhancement of *Stevia rebaudiana bertonii* shoot culture in temporary immersion system (TIS) RITA® bioreactor optimized in two different immersion periods. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 226, p. 00007). EDP Sciences.
- Mirzabe, A. H., Hajiahmad, A., Fadavi, A., and Rafiee, S. (2022). Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. *Journal of Biotechnology*.
- Mišić, D., Šiler, B., Skorić, M., Djurickovic, M. S., Živković, J. N., Jovanović, V. y Giba, Z. (2013). Secoiridoid glycosides production by *Centaureum maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochemistry*, 48(10), 1587-1591.
- Moreira Brito, J. C., Lima, W. G. y da Cruz Nizer, W. S. (2021). La Quercetina como un potencial nutracéutico contra la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 62(1), 85-89.
- Mosadegh, H., Trivellini, A., Ferrante, A., Lucchesini, M., Vernieri, P. y Mensuali, A. (2018). Applications of UV-B lighting to enhance phenolic accumulation of sweet basil. *Scientia Horticulturae*, 229, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.043>
- Mouas, N. T., Kabouche, Z., Bellel, N. y Chertout, L. K. (2021). *Opuntia ficus-indica* a Mediterranean Diet Product. *Proceedings 2021*, 68, x.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Copenhagen. Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., and Park, S. Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in plant science*, 14, 1159588.
- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., and Batool, S. (2015). Antimutagenic and antioxidant potential of aqueous and acidified methanol extracts from *Citrus limonum* fruit residues. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60(2), 2979-2983.
- Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., Suntar, I., Rastrelli, L., Daglia, M., Xiao, J., Giampieri, F., Battino, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F. yousefi, B., Jeandet, P., Xu, S. y Shirooie, S. (2020). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology advances*, 38, 107316.
- Namli, S., Işıkalın, Ç., Akbaş, F., Toker, Z. y Tilkat, E. A. (2014). Effects of UV-B radiation on total phenolic, flavonoid and hypericin contents in *Hypericum retusum* Aucher grown under *in vitro* conditions. *Natural Product Research*, 28(24), 2286–2292. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.940588>
- Niechayev, N. A., Pereira, P. N. y Cushman, J. C. (2019). Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM). *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 74-85.
- Nogueira L., L. C., Viana, W. S., Rocha, S. S., de Araújo, Guerra C., J., Gomes P., J. C. y Poubel G., N. (2019). Use of temporary immersion bioreactors on *in vitro* culture of cactus pear. *African Journal of Agricultural Research*, 14(32), 1487-1492 Pp.
- Ochoa, M. J. y Barbera, G. (2018). Historia e importancia agroecológica y económica del nopal. *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y el Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma. 1-12 Pp.
- Ontaneda, A. L. C., Herrera, A. M., y Batista, R. M. G. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173-182.

- Ordoñez, E. S., Leon-Arevalo, A., Rivera-Rojas, H. y Vargas, E. (2019). Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus-indica* Mill), uva (*Vitis Vinifera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 175-183.
- Ordoñez-Gómez, E.S, Reátegui-Díaz, D y Villanueva-Tiburcio, J.E. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 113-121.
- Ortega-Hernández, E., Nair, V., Welti-Chanes, J., Cisneros-Zevallos, L., and Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). Wounding and UVB Light Synergistically Induce the Biosynthesis of Phenolic Compounds and Ascorbic Acid in Red Prickly Pears (*Opuntia ficus-indica* cv. Rojo Vigor). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms20215327>
- Oseni, O. M., Pande, V. y Nailwal, T. K. (2018). A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 7(7), 3778-3786 Pp.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E. and Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1132555.
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J. y Cheng y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.621276>
- Patel, K., Patel, D., Panchal, D., Patel, K., and Upadhyay, U. (2022). A Review on High Performance liquid Chromatography. 10, 2320–2882.
- Pedroso, R. C. N., Branquinho, N. A. A., Hara, A. C. B. A. M., Costa, A. C., Silva, F. G., Pimenta, L. P., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., Pauletti, P. M. y Januario, A. H. (2017). Impact of light quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marrubioides* seedlings cultivated *in vitro*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 466–470. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.004>

- Perucini-Avenidaño, M., Nicolás-García, M., Jiménez-Martínez, C., Perea-Flores, M. D. J., Gómez-Patiño, M. B., Arrieta-Báez, D. y Dávila-Ortiz, G. (2021). Cladodes: Chemical and structural properties, biological activity, and polyphenols profile. *Food Science y Nutrition*, 9(7), 4007-4017.
- Petruk, G., Di Lorenzo, F., Imbimbo, P., Silipo, A., Bonina, A., Rizza, L., Piccoli, R., Monti, D. M. y Lanzetta, R. (2017). Protective effect of *Opuntia ficus-indica* L. cladodes against UVA-induced oxidative stress in normal human keratinocytes. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 27(24), 5485–5489.
- Phillips, G. C., and Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 242-257.
- Podolec, R., Demarsy, E., and Ulm, R. (2021). Perception and signaling of ultraviolet-B radiation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 72, 793-822.
- Pramita, A. D., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W. y Manuhara y. S. W. (2018). Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 639-643.
- Queiroz-Zepka, L., Jacob-Lopes, E. y Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.004>
- Rai, K. y Agrawal, S. B. (2017). Effects of UV-B radiation on morphological, physiological and biochemical aspects of plants: an overview. *Journal of Scientific Research*, 61, 87–113.
- Ranjan, P., Ranjan, J. K., Misra, R. L., Dutta, M. y Singh, B. (2016). Cacti: Notes on their uses and potential for climate change mitigation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(5), 901–917. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0394-z>
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B., Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C. y Vidal, N. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 32(1), 61-71.

- Reyes-Buendía, C., Corrales-García, J. J. E., Peña-Valdivia, C. B., Hernández-Montes, A. y Ybarra-Moncada, M. C. (2020). Sopa de elote (*Zea mays*) tipo crema con mucílago de nopal (*Opuntia* spp.) como espesante, sus características físicas y aceptación sensorial. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23(1), 1–14.
- Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., and Lucini, L. (2018). Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*, 7(2), 24.
- Rocha, S. S., Nogueira L., L. C., Guerra C., J., Gomes P., J. C., Batista M., M. C., Viana, W. S., Neres F., R. A. and Nunes X, N. (2018). Effect of lighting spectrum and naphthaleneacetic acid (NAA) on 'in vitro' development of cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]. *Australian Journal of Crop Science*, 12(12), 1837-1843.
- Rodríguez-de la OJL and Ramírez-Pantoja, P. E. (2020). PE. Micropropagation of selected materials of *Opuntia ficus indica* l through culture in vitro of areols. *J Appl Biotechnol Bioeng*, 7(3), 121-126.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J. y Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 57-66.
- Ruta, C., De Mastro, G., Ancona, S., Tagarelli, A., De Cillis, F., Benelli, C. y Lambardi, M. (2020). Large-scale plant production of *Lycium barbarum* L. by liquid culture in temporary immersion system and possible application to the synthesis of bioactive substance. *Plants*, 9(7), 844.
- Saboonchian, F., Jamei, R., and Sarghein, S. H. (2014). Phenolic and flavonoid content of *Elaeagnus angustifolia* L. (leaf and flower). *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(4), 231.
- San José, M. C., Blázquez, N., Cernadas, M. J., Janeiro, L. V., Cuenca, B., Sánchez, C., and Vidal, N. (2020). Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. doi:10.1007/s11240-020-01937-9

- Sani, L. A., Usman, I. S., Nasir, A. U. y Abdulmalik, M. M. (2020). Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne) in temporary immersion bioreactor system (TIPS). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(2), 207-209.
- Santos-Díaz, M. S., Pérez-Molphe, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G. y Ochoa-Alejo, N. (2010). Mexican threatened cacti: current status and strategies for their conservation. *Species diversity and extinction*. Nova Science, New York, NY, USA, 1-60.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A. and Serna-Saldivar, S. O. (2011). Comparative Analyses of Total Phenols, Antioxidant Activity, and Flavonol Glycoside Profile of Cladode Flours from Different Varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7054-7061.
- Sarker, U., and Oba, S. (2020). Polyphenol and flavonoid profiles and radical scavenging activity in leafy vegetable *Amaranthus gangeticus*. *BMC Plant Biology*, 20, 1-12.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E. y Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68(4), 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.08.001>
- Serrano, M. E. D. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4), 42-47.
- Sharma, S., Katoch, V., Kumar, S. y Chatterjee, S. (2021). Functional relationship of vegetable colors and bioactive compounds: Implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 92, 108615. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108615>
- Shekhawat, M. S., Priyadarshini, S., Jogam, P., Kumar, V. y Manokari, M. (2021). Metatoplin and liquid medium enhanced *in vitro* regeneration in *Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb. *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 57(2), 296-306.

- Shin, K. S., Murthy, H. N., Heo, J. W., Hahn, E. J. y Paek, K. Y. (2008). The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 339–343. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0128-0>
- SIACON. (2022). Producción de nopal nacional. Recuperado del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Silva, M. A., Albuquerque, T. G., Pereira, P., Ramalho, R., Vicente, F., Oliveira, M. B. P. y Costa, H. S. (2021). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.: A multi-benefit potential to be exploited. *Molecules*, 26(4), 951.
- Singh, P., Singh, A. y Choudhary, K. K. (2023). Revisiting the role of phenylpropanoids in plant defense against UV-B stress. *Plant Stress*, 7, 100143. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100143>
- Solórzano-Acosta, R., and Guerrero-Padilla, M. (2020). Design and Construction of a Pneumatic Temporary Immersion Bioreactor System for the Multiplication of *Ananas comosus* var. Trujillana Red. *American Journal of Plant Sciences*, 11(9), 1429-1442.
- Souleymane, F., Charlemagne, G., Baptiste, N. J., Pierre, G. I., and Jacques, S. (2016). DPPH radical scavenging and lipoxygenase inhibitory effects in extracts from *Erythrina senegalensis* (Fabaceae) DC. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(11), 185-191.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huep, G., Barsch, A., Mehrtens, F., Niehaus, K. y Weisshaar, B. (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 50(4), 660–677. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03078.x>
- Syarifah, A. L., and Retnowati, R. (2019). Characterization of secondary metabolites profile of flavonoid from salam leaves (*Eugenia polyantha*) using TLC and UV Spectrophotometry. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 4.
- Szopa, A., Klimek-Szczykutowicz, M., Kokotkiewicz, A., Dziurka, M., Luczkiewicz, M. y Ekiert, H. (2019). Phenolic acid and flavonoid production in agar, agitated and

- bioreactor-grown microshoot cultures of *Schisandra chinensis* cv. Sadova No. 1 – A valuable medicinal plant. *Journal of Biotechnology*. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.08.021
- Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Bednarz, M., Jaferník, K., Luczkiewicz, M. y Ekiert, H. (2019). Bioreactor type affects the accumulation of phenolic acids and flavonoids in microshoot cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(1), 199-206.
- Tadeu D., J. P. (2019). Reguladores de crecimiento vegetal en horticultura: prácticas y perspectivas. *Biocnología Vegetal*, 19(1), 3-14.
- Tapia, A., Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., Schmeda-Hirschmann, G., Gerth, A., Wilken, D., Jordan, M., Jiménez-González, Gomez-Kosky, R., and Mendoza, E. Q. (2007). Free Radical Scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Plants Cultivated in Bioreactors by the Temporary Immersion (TIS) Principle. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 62(5-6), 447–457. doi:10.1515/znc-2007-5-620
- Taulavuori, K., Pyysalo, A., Taulavuori, E. y Julkunen-Tiitto, R. (2018). Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on
- Tessadori, F., van Zanten, M., Pavlova, P., Clifton, R., Pontvianne, F., Snoek, L. B., Millenaar, F. F., Schulkes, R. K., van Driel, R., Voeselek, L. A., Spillane, C., Pikaard, C. S., Fransz, P. and Peeters, A. J. (2009). Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 5(9), e1000638.
- Thieman, W. J., y Palladino, M. A. (2010). Introducción a la biocnología (Vol. 7). Pearson educación.
- Tilahun y. y Welegerima, G. (2018). Pharmacological potential of cactus pear *Opuntia ficus-indica*: A review. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 7(3), 1360-1363 Pp.
- Torres-Bojórquez, A. E., García-Rubio, O. R., Miranda-López, R. y Cardador-Martínez, A. (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante, características fisicoquímicas y perfil sensorial de *Opuntia robusta* y *O. ficus-indica*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 67(4), 291-299.

- Tranquilino-Rodríguez, E., Martínez-Flores, H. E., Rodiles-López, J. O., Dios Figueroa-Cárdenas, J. D., and Pérez-Sánchez, R. E. (2020). Optimization in the extraction of polyphenolic compounds and antioxidant activity from *Opuntia ficus-indica* using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(6), e14485.
- Trauger, M., Hile, A., Sreenivas, K., Shouse, E. M., Bhatt, J., Lai, T., Mohandass, R., Tripathi, L., Ogden, A. J., and Curtis, W. R. (2022). CO<sub>2</sub> supplementation eliminates sugar-rich media requirement for plant propagation using a simple inexpensive temporary immersion photobioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 57-71.
- Tripathi, D., Meena, R. P. y Pandey-Rai, S. (2021). Short term UV-B radiation mediated modulation of physiological traits and withanolides production in *Withania coagulans* (L.) Dunal under *in-vitro* condition. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(8), 1823–1835. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01046-7>
- Urrea-Victoria, V., Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C. y Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociências: Universidade de São Paulo.
- Valdez-Tapia, R., Capataz-Tafur, J., López-Laredo, A. R., Trejo-Espino, J. L. y Trejo-Tapia, G. (2014). Effect of immersion cycles on growth, phenolics content, and antioxidant properties of *Castilleja tenuiflora* shoots. *In vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 50(4), 471-477.
- Valdiani, A., Hansen, O. K., Nielsen, U. B., Johannsen, V. K., Shariat, M., Georgiev, M. I., Omidvar, V., Ebrahimi, M., Tavakoli, D. and Abiri, R. (2019). Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. *Critical reviews in biotechnology*, 39(1), 20-34.
- Vallejo-Rosero, Y., Barrios-Correa, L. y Anaya-Gil, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*, 35(2), 19-25.

- Vargas-Rodríguez, L., Figueroa, G. A., Méndez, C. H. H., Nieto, A. P., Vieyra, M. I. G. y Núñez, J. R. R. (2016). Propiedades físicas del mucílago de nopal. *Acta Universitaria*, 26, 8–11. <https://doi.org/10.15174/au.2016.839>
- Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J. C., Concepción, O., Hernández, M. y Escalona, M. (2017). Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(1), 195-199.
- Wang, W., Su, M., Li, H., Zeng, B., Chang, Q. y Lai, Z. (2018). Effects of supplemental lighting with different light qualities on growth and secondary metabolite content of *Anoectochilus roxburghii* [PeerJ]. <https://peerj.com/articles/5274/>
- Wawrosch, C. and Zotchev, S. B. (2021). Production of bioactive plant secondary metabolites through *in vitro* technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6649-6668.
- Wilken, D., Jiménez González, E., Hohe, A., Jordan, M., Gomez Kosky, R., Schmeda Hirschmann, G. y Gerth, A. (2005). Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 525-537). Springer, Dordrecht.
- Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., and Gaj, M. D. (2020). Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1333.
- Yancheva, S., and Kondakova, V. (2018). Plant Tissue Culture Technology: Present and Future Development. *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, 39–63. doi:10.1007/978-3-319-54600-1\_16
- Yang, D., Wang, T., Long, M. y Li, P. (2020). Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao y.-X., Wei, F. y Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 23(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zagoskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N. and Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in plants: Structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13874.
- Zeghib, W., Boudjouan, F., Vasconcelos, V. y Lopes, G. (2022). Phenolic Compounds' Occurrence in Opuntia Species and Their Role in the Inflammatory Process: A Review. *Molecules*, 27(15), 4763.
- Zobayed, S. M. A., Murch, S. J., Rupasinghe, H. P. V., De Boer, J. G., Glickman, B. W. y Saxena, P. K. (2004). Optimized system for biomass production, chemical characterization, and evaluation of chemo-preventive properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Plant Science*, 167(3), 43.
- Wai T., M., and Chiang L., K. (2014). Influence of different extraction temperatures and methanol solvent percentages on the total phenols and total flavonoids from the heartwood and bark of *Acacia auriculiformis*. *European Journal of Wood and Wood Products*, 72(1), 67-72.
- Xu, Q., Shen, Y., Wang, H., Zhang, N., Xu, S., & Zhang, L. (2013). Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae. *Food Chemistry*, 138(4), 2122–2129.
- Oliveira C., J., Correa de S., M., Capelasso da S., L., Lachos-Pérez, D., Torres-Mayanga, P. C., da Fonseca M., A. P., Foster-Carneiro, T., Vázquez-Espinoza, M., González-de-Peredo, A. V., Fernández B., G. and Ariel R., R. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Frontiers in chemistry*, 8, 507887.
- Becker, C., Kläring, H. P., Kroh, L. W., & Krumbein, A. (2013). Temporary reduction of radiation does not permanently reduce flavonoid glycosides and phenolic acids in red lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 154-160.

- Wong L., B., Hwan L., J., Wan G., S., Hwang M., Y. and Hun P., K. (2006). Selective ABTS radical-scavenging activity of prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(2), 427-432.
- La, J., Kim, M. J., and Lee, J. (2021). Evaluation of solvent effects on the DPPH reactivity for determining the antioxidant activity in oil matrix. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 367–375.
- Wu, Q., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, T., Jiang, Y., Gao, H., & Yun, Z. (2020). Effect of blue light on primary metabolite and volatile compound profiling in the peel of red pitaya. *Postharvest Biology and Technology*, 160, 111059.
- Luna-Zapién, E. A., Zegbe, J. A., Meza-Velázquez, J. A., Contreras-Esquivel, J. C. and Morales-Martínez, T. K. (2023). Mucilage Yield, Composition, and Physicochemical Properties of Cultivated Cactus Pear Varieties as Influenced by Irrigation. *Agronomy*, 13(2):419.
- Li-li, C., Hao-ying, W., Xiao-chen, G., Zhao-hai, Z., Xu-zhang and Yue-gao, H. (2021). Transcriptome analysis reveals effects of red and blue light-emitting diodes (LEDs) on the growth, chlorophyll fluorescence and endogenous plant hormones of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets cultured in vitro. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(11), 2914-2931.
- Vidican, T. I. and Urdea, O. (2011). Determination in assimilating pigment content of the *Echinocactus* (pfiiff.) *mihanovichii* from exposed vitrocultures to light of different colors and wavelengths emitted by fluorescent tubes or light-emitting diode (led). *Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*, Vol. XVII.
- Vidican, T. I. and Cachita-Cosma, D. (2010). Determination of assimilator pigment content in cladodes of *Opuntia fragilis* var. *fragilis* exposed to light of different colors emitted by LEDs. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 20(2).

NOMBRE DEL TRABAJO

**Efecto de la luz en el perfil de flavonoides de extractos de Opuntia sp. cultivados en Biorreactore**

AUTOR

**Giovani Alejandro Magaña Escobar**

RECUENTO DE PALABRAS

**32109 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**175118 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**109 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**1.7MB**

FECHA DE ENTREGA

**Aug 7, 2024 8:22 AM GMT-6**

FECHA DEL INFORME

**Aug 7, 2024 8:23 AM GMT-6**

● **39% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 38% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 0% Base de datos de trabajos entregados
- 28% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Efecto de la luz en el perfil de flavonoides de extractos de <i>Opuntia</i> sp. cultivados en biorreactores de inmersión temporal	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Giovanni Alejandro Magaña Escobar	1584648f@umich.mx
Director	Dr. Pedro Antonio García Saucedo	antonio.garcia@umich.mx
Codirector	No	No
Coordinador del programa	Dra. Martha Elena Pedraza Santos	martha.elena.pedraza@umich.mx


Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	No se implementó durante la redacción de la tesis

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	No se implementó durante la redacción de la tesis
Traducción a otra lengua	Sí	Se implementó para la traducción del resumen al idioma inglés
Revisión y corrección de estilo	No	No se implementó durante la redacción de la tesis
Análisis de datos	No	No se implementó durante la redacción de la tesis
Búsqueda y organización de información	No	No se implementó durante la redacción de la tesis
Formateo de las referencias bibliográficas	No	No se implementó durante la redacción de la tesis
Generación de contenido multimedia	No	No se implementó durante la redacción de la tesis
Otro	No	No se implementó durante la redacción de la tesis

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Giovanni Alejandro Magaña Escobar 
Lugar y fecha	Uruapan, Michoacán de Ocampo, México, lunes 5 de agosto del 2024