



TESIS:

Producción y determinación de la actividad antioxidante del pigmento azul de *Lavandula angustifolia* Mill. mediante células habituadas e inmovilizadas.

QUE PRESENTA:

IIA. ADA LILIA MORALES DIEGO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA ALICIA RODRÍGUEZ MENDIOLA

COORDIRECTOR:

DR. CARLOS ARIAS CASTRO

ASESOR:

DRA. ALEJANDRA MARGALLI MANCILLA

ASESOR:

ASESOR: DR. ISAAC ANDRADE

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN AGROBIOTECNOLOGÍA

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. OCTUBRE, 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tlajomulco
Subdirección académica

Tlajomulco de Zúñiga, Jal. **10/octubre/2025**
No. DE OFICIO: DEPI/124/2025

Asunto: Autorización para presentar examen de grado.

ADA LILIA MORALES DIEGO (M23940442)
CANDIDATA AL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

Me es grato comunicarle que una vez cubiertos todos los requisitos necesarios para presentar el examen de grado de Maestría en Ciencias en Agrobiotecnología, con la tesis titulada **"Producción y determinación de la actividad antioxidante del pigmento azul de *Lavandula angustifolia* Mill. Mediante células habituadas e inmovilizadas"**, dirigida por la Dra. Martha Alicia Rodríguez Mendiola y codirigido por el Dr. Carlos Arias Castro, se AUTORIZA la presentación del mismo el día 27 de octubre del presente año, a las 10:00 hrs. en el AUDITORIO de esta institución.

Aprovecho la ocasión para desearle el mejor de los éxitos en su examen, así como en su vida profesional y agradecerle la confianza depositada en nuestra Institución para la realización de sus estudios

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro



MIGUEL ÁNGEL SEGURA CASTRUITA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEL TecNM CAMPUS TLAJOMULCO

S.E.P.
TECNM
14DIT0003B
IT TLAJOMULCO
DIV. DE ESTUDIOS
DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Ccp.- Luz Elena Alfaro Orozco; Departamento de Servicios Escolares
Expediente
MIBR/RNP/MASC/AIRV.



2025
Año de
La Mujer
Indígena

KM. 10 carretera a San Miguel Cuyutlán, Cto. Vicente Fernández Gómez
C.P.45640 Tlajomulco de Zúñiga, Jal. Tel. 33 29 02 11 30
e-mail: plan_tlajomulco@tecnm.mx www.tlajomulco.tecnm.mx





ACEPTACIÓN DE PROPUESTA DE TESIS

Tlajomulco de Zúñiga, Jal., 02 de octubre del 2025.

MIGUEL ÁNGEL SEGURA CASTRUITA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN Del ITT
PRESENTE

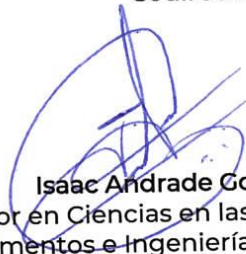
Por este conducto, los integrantes del Comité Tutorial de la **C. Ada Lilia Morales Diego**, con número de control **M23940442**, de la Maestría en Ciencias en Agrobiotecnología (**MCAGB2011-19**), le informamos que hemos revisado el trabajo de tesis profesional titulado: "**Producción y determinación de la actividad antioxidante del pigmento azul de *Lavandula angustifolia* Mill. mediante células habituadas e inmovilizadas**".

Y hemos encontrado que se han realizado todas las correcciones y observaciones que se le indicaron, por lo que hemos acordado aceptar el documento de tesis y le solicitamos la autorización de impresión definitiva.


Martha Alicia Rodríguez Mendiola
Doctora en Ciencias en Agrobiotecnología
7115088
Directora


Carlos Arias Castro
Doctor en Ciencias en Agrobiotecnología
7115190
Codirector


Norma Alejandra Mancilla Margalli
Doctor en Biotecnología de Plantas
6451354
Revisor


Isaac Andrade González
Doctor en Ciencias en las Disciplinas de
Alimentos e Ingeniería Bioquímica
5150025
Revisor

C.c.p.- Luz Elena Alfaro Orozco.- Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p.- Expediente.
AIBR/RNP/MASC/AIRV



2025
Año de
La Mujer
Indígena

KM. 10 carretera a San Miguel Cuyutlán, Cto. Vicente Fernández Gómez
C.P.45640 Tlajomulco de Zúñiga, Jal. Tel. 33 29 02 11 30
e-mail: plan_tlajomulco@tecnm.mx www.tlajomulco.tecnm.mx





Dedicado a ti Álvaro, por enseñarme a buscar siempre la sabiduría.

Agradecimientos:

A mi madre, Delicia Diego Silva, por amarme con una ternura inquebrantable, por enseñarme con el ejemplo lo que significa ser una mujer fuerte, íntegra y decidida, y por sembrar en mí, desde niña, la convicción de que siempre puedo ir más allá de mis propios límites.

A mis hermanos, Elvira, Álvaro y Dalia, por ser mi refugio, mi risa compartida y mis cómplices en cada etapa de la vida. Gracias por caminar a mi lado, incluso cuando los caminos se separan.

A Jorge, por ser ese apoyo inesperado que llegó en el momento justo. Por caminar a mi lado no solo en lo fácil, sino también en lo que yo sola no podía hacer. Gracias por tu paciencia, tu presencia y tu ayuda.

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado a través del Programa de Becas para Estudios de Maestría, el cual hizo posible la realización de este trabajo y mi formación académica en el campo de la agrobiotecnología.

Mi más sincero reconocimiento al Instituto Tecnológico de Tlajomulco, por brindarme las instalaciones, los recursos técnicos y el entorno académico necesario para el desarrollo de esta investigación.

A mi asesora de tesis, la Dra. Martha Alicia Rodríguez Mendiola, por su invaluable orientación, paciencia y constante motivación a lo largo de este proceso. Su conocimiento y dedicación fueron fundamentales para superar los retos técnicos y conceptuales que implicó este proyecto.

Agradezco también al comité tutorial y a los revisores por sus observaciones críticas y constructivas, las cuales enriquecieron significativamente este trabajo.

Finalmente, reconozco a todos los compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, cuyo apoyo y colaboración de equipo hicieron posible no solo la ejecución de los experimentos, sino también el crecimiento profesional y humano que acompaña a toda investigación científica.

Resumen

Este estudio demostró la producción exitosa de un pigmento azul mediante el cultivo de células habituadas de *Lavandula angustifolia* Mill. en medio líquido, sin necesidad de reguladores de crecimiento exógenos. Las células, derivadas de callos habituados, excretaron el pigmento directamente al medio de cultivo, lo que permitió su recuperación mediante una simple filtración.

Por otro lado, la inmovilización celular en matrices de alginato de calcio y espuma de poliuretano, si bien mantuvo una alta viabilidad celular (>80%), no permitió la síntesis del pigmento azul. Esta ausencia de producción se atribuye a la falta del inductor L-cisteína, la quelación de iones Fe^{2+} por el alginato y condiciones de iluminación subóptimas.

El pigmento purificado presentó un máximo de absorción a 660 nm, lo que sugiere una naturaleza fenólica compleja, posiblemente derivada de dímeros de ácido cafeico o de ácido rosmarínico. La evaluación de la actividad antioxidante reveló que, mientras el extracto crudo mostró una inhibición moderada (25.3%) frente al radical DPPH•, la "Fracción Azul" purificada por cromatografía en columna exhibió una actividad excepcional: 88.96% de inhibición del radical ABTS••, equivalente a 24.41 mmol/L de Trolox (TEAC).

Este hallazgo destaca que el pigmento azul obtenido no solo es un colorante natural, sino también un potente antioxidante bioactivo, con un alto potencial para su aplicación como ingrediente funcional y sostenible en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Palabras clave: Pigmento azul, *Lavandula angustifolia*, cultivos celulares habituados, inmovilización celular, actividad antioxidante.

Abstract

This study demonstrated the successful production of a blue pigment through the cultivation of habituated *Lavandula angustifolia* Mill. cells in liquid medium without the need for exogenous growth regulators. Cells derived from habituated calli secreted the pigment directly into the culture medium, enabling its recovery by simple filtration.

On the other hand, cell immobilization in calcium alginate beads and polyurethane foam matrices, although maintaining high cell viability (>80%), did not support blue pigment synthesis. This lack of production was attributed to the absence of the inducer L-cysteine, chelation of Fe^{2+} ions by alginate, and suboptimal lighting conditions.

The purified pigment exhibited an absorption maximum at 660 nm, suggesting a complex phenolic nature, possibly derived from caffeic acid or rosmarinic acid dimers. Antioxidant activity assessment revealed that while the crude extract showed moderate inhibition (25.3%) against the DPPH• radical, the purified "Blue Fraction," obtained by column chromatography, displayed exceptional activity: 88.96% inhibition of the ABTS⁺• radical, equivalent to 24.41 mmol/L Trolox (TEAC).

This finding highlights that the obtained blue pigment is not only a natural colorant but also a potent bioactive antioxidant, with high potential for application as a functional and sustainable ingredient in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries.

Keywords: Blue pigment, *Lavandula angustifolia*, habituated cell cultures, cell immobilization, antioxidant activity.

Índice General

Resumen	6
Abstract	7
Índice General	8
Hipótesis.....	14
Justificación	14
Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos específicos.....	15
Marco Teórico	16
1.- <i>Lavanda angustifolia</i> Mill	16
1.1 Distribución y hábitat.....	17
1.2 Usos Tradicionales y Modernos	18
1.3 Composición Fitoquímica.....	18
1.4 Propiedades biológicas	19
2.- Cultivo in vitro de tejidos vegetales	20
2.1 Micropropagación	21
2.2 Cultivo de Células Vegetales	21
2.3 Cultivo en Suspensión	21
2.4 Células Vegetales Habitadas	22
2.5 Viabilidad Celular	22
3.- Inmovilización de células vegetales	23
3.1. Ventajas de la Inmovilización Celular.....	23
3.2. Requisitos para una Inmovilización Efectiva	23
3.3. Matrices de Inmovilización	24
4.- Pigmentos Naturales	25
4.1. Producción de Pigmentos Naturales en Sistemas de Cultivo Celular Vegetal	25
4.2. Pigmento Azul Producido por Células Vegetales de Cultivos de Lavanda	25

4.3. Encapsulación de Células de Lavanda para la Producción de Pigmentos	26
4.4. Estructuras Moleculares del Pigmento Azul de Lavanda	30
5.- Técnicas de separación del pigmento.	31
5.1. Cromatografía	31
5.1.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	31
5.1.2. Cromatografía en Columna	31
5.1.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	32
5.2. Espectrofotometría UV-Visible.....	32
6. Pruebas antioxidantes.....	34
6.1. Actividad Antioxidante por el Método DPPH•.....	34
6.2. Actividad Antioxidante por el Método ABTS ⁺ •	34
6.3. Actividad Antioxidante de Lavandula spp.	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Material Biológico	36
1.1. Micropropagación in vitro de Lavandula angustifolia.....	36
1.2. Obtención de Callos Habitados.....	39
1.3. Establecimiento de la Suspensión de Células Habitadas	41
1.4. Estimación de la Viabilidad Celular	41
2.-Inmovilización celular	43
2.1. Inmovilización Celular en Soporte de Poliuretano.....	43
2.2. Encapsulación en Perlas de Alginato.....	45
3. Preparación y Purificación del Pigmento Azul	47
3.1. Extracción y Concentración Inicial	47
3.2. Diálisis y Eliminación de Interferentes	47
3.3. Verificación de la Eficacia de la Diálisis por HPLC	47
3.4. Liofilización y Almacenamiento del Pigmento Purificado.....	48
4.1. Determinación Cuantitativa del Pigmento por Espectrofotometría UV-Vis	49
4.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC) Analítica y Preparativa.....	49
4.3. Cromatografía en Columna para Purificación	52

4.4. Análisis Espectrofotométrico de las Fracciones Purificadas	54
5. Evaluación de la Actividad Antioxidante	55
5.1. Ensayo con el Radical DPPH•	55
5.2. Ensayo con el Radical ABTS ⁺ •.....	57
5.3. Evaluación de la Actividad Antioxidante en Fracciones Cromatográficas.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
1.1. Micropropagación de <i>Lavandula angustifolia</i>	60
1.2. Obtención y Establecimiento de Callos Habitados de <i>L. angustifolia</i>	61
1.3. Establecimiento de la Suspensión de Células Habitadas de <i>L. angustifolia</i>	63
2.- Inmovilización celular.....	65
2.1. Inmovilización en Espuma de Poliuretano	65
2.2. Encapsulación en Alginato de Calcio.....	66
3. Preparación y Purificación del Pigmento Azul	68
3.1. Caracterización Visual del Pigmento Purificado	68
3.2. Evaluación de la Eficacia de la Diálisis mediante HPLC	68
4. Cuantificación y Separación del Pigmento.....	71
4.1. Análisis Espectral del Pigmento Azul (190–1100 nm).....	71
4.2. Separación del Pigmento Azul mediante Cromatografía en Capa Fina Preparativa (Prep-TLC).....	75
4.2.1. Análisis Espectrofotométrico de las Fracciones Purificadas	76
4.3. Cromatografía en Columna: Separación del Pigmento Azul	77
4.4. Comparación Espectral de las Fracciones Azules Purificadas	79
5. Actividad antioxidante	81
5.1 Ensayo DPPH•	81
5.2 Ensayo ABTS ⁺ •.....	82
CONCLUSIONES	86
RECOMENDACIONES	87
Referencias bibliográficas.....	88

Índice de figuras

Figure 1 Lavandula angustifolia en floración. Fuente: Badapedia (2020).....	16
Figure 2 Campo de lavanda (Lavandula angustifolia) en plena floración en el sur de Francia. Fuente: Giuseppe Mazza / Mónaco Nature Encyclopedia.....	17
Figure 3 Cultivo in vitro de tejidos vegetales. Fuente: Shutterstock	20
Figure 4 Estructuras propuestas de los precursores fenólicos del pigmento azul en Lavandula spp. (A) Éster enólico del ácido cafeico [(Z,E)-isómero] según Banthorpe et al. (1985).	30
Figure 5 Diagrama esquemático del proceso de micropropagación in vitro de Lavandula angustifolia: 1) Plantas in vitro; 2) Obtención de explantes; 3) Incubación en cámara de crecimiento; 4) Transferencia periódica a nuevo medio MS	38
Figure 6 Diagrama esquemático del proceso de obtención de callos de Lavandula angustifolia: 1) Callos derivados de tejidos vegetales; 2) Transferencia a medio MS sin reguladores de crecimiento; 3) Incubación en cámara de crecimiento; 4) Subcultivo periódico	40
Figure 7 Diagrama esquemático del establecimiento de la suspensión celular de Lavandula angustifolia. 1) Transferencia de callo de medio sólido a medio líquido; 2) Incubación con agitación orbital; 3) Subcultivo periódico	42
Figure 8 Diagrama encapsulación poliuretano. 1) Cubos de espuma; 2) Lavado con agua destilada; 3) Esterilización por autoclave; 4) Transferencia a medio estéril; 5) Adición de células en suspensión; 6) Evaluación de viabilidad por fluorescencia.....	44
Figure 9 Diagrama encapsulación con alginato 1: Preparación de solución de alginato; 2: Lavado de biomasa; 3: Mezcla célula-alginato; 4: Goteo controlado; 5: Gelificación en CaCl ₂ ; 6: Enjuague; 7: Transferencia a medio de cultivo; 8: Incubación bajo agitación y fotoperiodo.....	46
Figure 10 Diagrama de preparación de la muestra	48
Figure 11 Diagrama esquemático del proceso de cromatografía en capa fina (TLC). 1) Placa de sílica; 2) Aplicación de muestra; 3) Desarrollo en cámara saturada; 4) Visualización bajo luz UV; 5) Identificación de bandas	51
Figure 12 Diagrama esquemático del proceso de cromatografía en columna. 1) Columna cargada con gel de sílice; 2) Aplicación de la muestra; 3) Elución por gravedad; 4) Recolección de fracciones; 5) Identificación de fracciones con coloración azul.....	53
Figure 13 Diagrama de prueba DPPH: 1.- Preparación de la solución de DPPH (1M). 2.- Preparación de muestra en diferentes concentraciones. 3.- Adición de muestra a la solución de DPPH. 4.-Incubación. 5.- Medición de la absorbancia a 517 nm. 6.-Cálculo %.....	56
Figure 14 Diagrama ensayo ABTS ⁺ • (1) Preparación de reactivos; (2) Generación del radical ABTS ⁺ •; (3) Preparación de estándar Trolox; (4) Adición de muestras a placa; (5) Lectura de absorbancia a 734 nm	59
Figure 15 Planta de Lavanda Micropropagada en medio MS	60

Figure 16 Callo de Lavándula angustifolia en medio MS sin reguladores de crecimiento tras 12 semanas de cultivo. Se observa tejido compacto, homogéneo y libre de contaminación.....	62
Figure 17 Cultivo en suspensión de células de Lavandula angustifolia tras 14 días de incubación. Se observa la coloración azul intensa del medio, producto de la excreción del pigmento por las células	63
Figure 18 Microfotografía de células en suspensión de Lavandula angustifolia bajo microscopio óptico (×40). Se aprecian agregados celulares y acumulación intracelular del pigmento azul	64
Figure 19 Células de Lavandula angustifolia en soporte de poliuretano.....	65
Figure 20 Microfotografías de células adheridas al soporte de poliuretano bajo microscopio de fluorescencia	65
Figure 21 Perlas de alginato con células de Lavandula angustifolia tras 14 días de cultivo	66
Figure 22 Microfotografía de células encapsuladas en alginato bajo microscopio de fluorescencia.	66
Figure 23 Aspecto físico del pigmento azul purificado de Lavandula angustifolia tras liofilización.	68
Figure 24 Cromatograma HPLC del pigmento no dializado. Se observan picos prominentes de fructanos, sacarosa, glucosa y fructosa, coincidentes con los estándares	70
Figure 25 Cromatograma HPLC del pigmento dializado. Se observa una reducción drástica en los picos de azúcares, indicativa de una eficiente eliminación por diálisis.	70
Figure 26 Fotografía de las cinco soluciones madre del pigmento azul en DMSO. Se observa variabilidad en intensidad de color entre muestras	71
Figure 27 Espectros de absorción de las cinco muestras madre del pigmento azul en DMSO (190–1100 nm). Las líneas de colores corresponden a cada muestra: Muestra 1 (rojo), Muestra 2 (azul), Muestra 3 (verde), Muestra 4 (amarillo), Muestra 5 (rosa).. El pico principal en el rango visible se localiza alrededor de 660 nm.	71
Figure 28 Espectros de absorción en el rango de 540 a 740 nm para las cinco muestras patrón. Se observa el pico máximo alrededor de 660 nm.....	73
Figure 29 Curva de calibración del pigmento azul. Relación entre absorbancia a 660 nm y concentración (µg/mL). La línea sólida representa los datos experimentales; la línea punteada corresponde a la regresión lineal.....	74
Figure 30 Fracciones recogidas en tubos de ensayo: fracción 1 (azul claro), fracción 2 (azul oscuro), fracción 3 (amarilla), fracción 4 (amarilla intensa).	75
Figure 31 Separación por cromatografía en capa fina (TLC) de extractos celulares en placa de sílica gel 60, visualizada en luz visible y bajo fluorescencia UV. Se indican las fracciones separadas con sus respectivos valores de R _f (factor de retención).	76
Figure 32 Espectros de absorción de las fracciones purificadas: F1 (línea roja), F2 (línea azul), F3 (línea verde), F4 (línea amarilla) en el rango de 190 a 1100 nm.	77

Figure 33 Separación del pigmento azul mediante cromatografía en columna. (A) Fracción 1: compuesto aceitoso incoloro (0.047 g). (B) Fracción 2: compuesto amarillo soluble (8 mL). (C) Fracción 3: compuesto aceitoso que aparece tras la evaporación	78
Figure 34 Espectros de absorción UV-Vis de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.....	79
Figure 35 Espectros de absorción UV-Vis comparativos de las fracciones azules purificadas	80
Figure 36 Actividad antioxidante del pigmento azul mediante ensayo DPPH.....	82
Figure 37 Porcentaje de inhibición del radical ABTS ⁺ • por el pigmento azul a diferentes concentraciones.	83
Figure 38 Porcentaje de inhibición del radical ABTS ⁺ • por fracciones de Prep-TLC.	84
Figure 39 Respuesta de inhibición del radical ABTS ⁺ • por concentración de Trolox (30 min).	84
Figure 40 Comparación del % de inhibición del radical ABTS ⁺ • entre el pigmento crudo, fracciones cromatográficas y la fracción purificada (Fracción Azul).	85

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	16
Tabla 2 Cuadro comparativo: Producción de pigmento azul en cultivos in vitro de <i>Lavandula</i> spp	27
Tabla 3 Relación entre la longitud de onda absorbida, el color absorbido y el color complementario observado Fuente: Adaptado de Botello Pozos (s.f.).	33
Tabla 4 Composición del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962)	37
Tabla 5 Eficiencia de la diálisis en la eliminación de azúcares residuales del extracto de pigmento.	69
Tabla 6 Valores de concentración y absorbancia promedio a 660 nm para la curva de calibración.	73
Tabla 7 Cuantificación del pigmento azul en lotes de cultivo de <i>L. angustifolia</i>	74
Tabla 8 Actividad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox (TEAC).	81

Hipótesis

El cultivo en suspensión de células vegetales habituadas e inmovilizadas de *Lavandula angustifolia* Mill. en medio líquido permitirá la producción y excreción continua de un pigmento azul al medio de cultivo.

Justificación

La creciente demanda global de colorantes naturales y sostenibles, impulsada por los efectos adversos asociados a los pigmentos sintéticos en la salud y el medio ambiente, posiciona a los compuestos de origen vegetal como una alternativa segura, biodegradable y socialmente aceptada para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

No obstante, los pigmentos naturales de tonalidad azul son particularmente escasos y de difícil obtención en cantidades viables mediante los métodos de extracción convencionales a partir de plantas enteras. La biotecnología vegetal emerge como una solución innovadora ante este desafío, al permitir la producción controlada y continua de metabolitos secundarios mediante cultivos de células *in vitro*, independizándose de factores climáticos, estacionales y de la sobreexplotación de recursos naturales.

Dentro de este enfoque biotecnológico, la técnica de inmovilización celular en matrices como el alginato de calcio y la espuma de poliuretano mejora la estabilidad del sistema, posibilita la reutilización de la biomasa y facilita la liberación de metabolitos al medio extracelular, optimizando así su recuperación.

Lavandula angustifolia Mill., una especie reconocida por su riqueza en compuestos fenólicos y terpénicos con actividad antioxidante, constituye un sistema modelo prometedor. Sin embargo, la producción de un pigmento azul estable a partir de sus cultivos celulares no ha sido ampliamente reportada. Este trabajo explora de manera pionera esta posibilidad, empleando células habituadas e inmovilizadas para aprovechar la adaptación metabólica de las células a las condiciones de estrés del cultivo *in vitro* como estrategia para inducir la biosíntesis del compuesto de interés.

La confirmación de una actividad antioxidante significativa mediante los ensayos con los radicales DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS•• (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) no solo validará el potencial funcional del pigmento azul obtenido, sino que reforzará su viabilidad como un ingrediente bioactivo y sostenible para diversas aplicaciones industriales.

Objetivos

Objetivo General

Producir un pigmento azul con actividad antioxidante mediante células habituadas e inmovilizadas de *Lavandula angustifolia* Mill.

Objetivos específicos

- Establecer y mantener un cultivo habituado in vitro en suspensión de *Lavandula angustifolia* Mill.
- Evaluar la producción de pigmento azul en un cultivo habituado in vitro en suspensión de *L. angustifolia* Mill.
- Inmovilizar las células habituadas en matrices de alginato de calcio y espuma de poliuretano, evaluando la viabilidad celular.
- Extraer el pigmento azul obtenido de los cultivos in vitro en suspensión.
- Cuantificar la actividad antioxidante del pigmento mediante los ensayos de los radicales DPPH• Y ABTS⁺•.

Marco Teórico

1.- *Lavanda angustifolia* Mill

Lavandula angustifolia Mill., conocida comúnmente como lavanda verdadera, lavanda fina o lavanda inglesa —y también referida en la literatura como *Lavandula vera* Moench. o *Lavandula officinalis* Chaix—, es un arbusto aromático y perenne originario del sur de la región mediterránea. Su belleza y su característico color la han convertido en un ícono botánico (Figura 1) (Sierra Diego, 2022; Plantas medicinales, s.f.).



Figure 1 *Lavandula angustifolia* en floración. Fuente: Badapedia (2020).

Desde el punto de vista taxonómico, pertenece a la familia Lamiaceae, un grupo de plantas aromáticas que incluye también al tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y menta (*Mentha* spp.). Su clasificación sistemática se presenta en la Tabla 1.

Reino	<i>Plantae</i>
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Lavandula</i>
Especie	<i>Lavanda angustifolia</i> Mill.

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Lavandula angustifolia* Mill.

Esta especie alcanza una altura promedio de 50 cm, aunque puede extenderse hasta 1–2 m bajo condiciones óptimas de cultivo (Sierra Diego, 2022; Espina de Castro, 2018). Presenta tallos leñosos y altamente ramificados, con follaje perenne compuesto por hojas estrechas, lineales y cubiertas por una fina pilosidad que le confiere un tacto aterciopelado y un color grisáceo (Sierra Diego, 2022). Sus flores son pequeñas, agrupadas en espigas terminales, y exhiben un tono azul grisáceo característico. Las glándulas secretoras de aceite esencial se localizan en tricomas glandulares distribuidos en tallos, hojas y flores (Sierra Diego, 2022).

El nombre del género *Lavandula* deriva del latín “*lavare*”, que significa “lavar”, en alusión al uso tradicional de sus flores para perfumar el agua de los baños en la antigua Roma (Plantas medicinales, s.f.). El epíteto específico *angustifolia* hace referencia a sus hojas estrechas, mientras que el sinónimo *officinalis* indica su reconocido uso medicinal.

1.1 Distribución y hábitat

Lavandula angustifolia es nativa del área mediterránea occidental, con presencia en el norte de España, los Pirineos, el sur de Francia y otras zonas montañosas del Mediterráneo (Sierra Diego, 2022). Prefiere climas templados y soleados, con inviernos húmedos y veranos secos, y crece óptimamente en suelos bien drenados, ligeramente calcáreos y arenosos. Un ejemplo emblemático de su cultivo exitoso bajo estas condiciones es la región sur de Francia, donde se observan extensos campos de lavanda en floración (Figura 2) (González Puerta & Villegas Rodríguez, 2018).



Figure 2 Campo de lavanda (*Lavandula angustifolia*) en plena floración en el sur de Francia. Fuente: Giuseppe Mazza / Mónaco Nature Encyclopedia.

La especie se desarrolla de manera óptima a altitudes comprendidas entre 600 y 1400 m, donde se obtiene un aceite esencial de mayor calidad, caracterizado por un alto contenido de ésteres, principalmente acetato de linalilo (González Puerta & Villegas Rodríguez, 2018; Espina de Castro, 2018).

Actualmente, *L. angustifolia* se cultiva en diversas regiones del mundo. Francia y Bulgaria son los principales productores, aunque también destacan España, Turquía, Italia y Marruecos por su producción significativa (Sierra Diego, 2022). El género *Lavandula* comprende aproximadamente 39 especies, entre las que sobresalen *L. stoechas*, *L. latifolia* y el híbrido *L. × intermedia* (lavandín). No obstante, *L. angustifolia* es la especie más valorada por la calidad de su aceite esencial, caracterizado por un equilibrio óptimo entre linalool y acetato de linalilo (Sierra Diego, 2022; Espina de Castro, 2018).

1.2 Usos Tradicionales y Modernos

Históricamente, *Lavandula angustifolia* ha sido utilizada por sus propiedades terapéuticas y aromáticas. En la antigüedad, sus flores se empleaban para perfumar armarios, repeler insectos y aromatizar baños, gracias a su aroma fresco y duradero (Plantas medicinales, s.f.). En la medicina tradicional, se utilizaba para tratar:

- Ansiedad, estrés e insomnio.
- Dolores de cabeza y neuralgias.
- Trastornos digestivos, como cólicos y meteorismo.
- Infecciones, debido a sus propiedades antisépticas y antimicrobianas.

En la actualidad, su uso se ha expandido a múltiples industrias:

- Aromaterapia: para reducir síntomas de ansiedad, depresión y estrés (Sierra Diego, 2022).
- Cosmética y perfumería: el aceite esencial es un ingrediente clave en cremas, jabones, perfumes y desodorantes (Sierra Diego, 2022).
- Industria alimentaria: como aromatizante natural y agente conservante.
- Industria farmacéutica: por sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos (Sierra Diego, 2022).

Además, su uso está respaldado por organismos internacionales como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Farmacopea ESCOP, que reconocen su eficacia en el tratamiento de trastornos del sueño, nerviosismo y problemas digestivos (Plantas medicinales, s.f.).

1.3 Composición Fitoquímica

El aceite esencial y los extractos de *Lavandula angustifolia* contienen una amplia diversidad de metabolitos secundarios responsables de sus propiedades biológicas. Entre los más destacados se encuentran:

- Terpenos: Los compuestos volátiles más abundantes son el linalool (26–49 %) y el acetato de linalilo (17,6–53 %). Estos monoterpenos oxigenados son responsables del aroma

característico de la lavanda y poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, sedantes y antimicrobianas (Sierra Diego, 2022; Denner, 2009).

- Compuestos fenólicos: Además de los terpenos, la planta sintetiza compuestos fenólicos con actividad biológica:
 - Flavonoides: como flavonas, flavonoles, flavanonas y antocianinas. Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que confieren el color azul grisáceo a las flores y, además de su función cromática, presentan actividad antioxidante (Sierra Diego, 2022).
 - Ácidos fenólicos: incluyen derivados hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, como el ácido cafeico y el ácido rosmarínico.
 - Cumarinas: presentes principalmente en tallos y hojas (Sierra Diego, 2022).

1.4 Propiedades biológicas

Los fitoquímicos presentes en *L. angustifolia* han demostrado múltiples actividades biológicas, entre las que destacan:

- Actividad antioxidante, evaluada mediante los ensayos DPPH• y ABTS⁺• (Espina de Castro, 2018; Sierra Diego, 2022).
- Propiedades antiinflamatorias, demostradas mediante la inhibición del edema inducido por carragenina (Sierra Diego, 2022).
- Actividad antimicrobiana y antifúngica (Sierra Diego, 2022).
- Efectos neuroprotectores y ansiolíticos, respaldados por estudios preclínicos y clínicos (Sierra Diego, 2022; Plantas medicinales, s.f.).

2.- Cultivo in vitro de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales consiste en el crecimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos de una planta bajo condiciones controladas, en recipientes estériles y en presencia de un medio de cultivo adecuado (Figura 3). Este medio proporciona los nutrientes esenciales, vitaminas, sales minerales y reguladores del crecimiento necesarios para la supervivencia, proliferación y diferenciación del explante. Uno de los requisitos fundamentales de esta técnica es que los tejidos o explantes iniciales estén libres de contaminación microbiana, ya que cualquier presencia de microorganismos puede comprometer el éxito del cultivo (Denner, 2009; Murashige, 1973).



Figure 3 Cultivo in vitro de tejidos vegetales. Fuente: Shutterstock

El éxito del cultivo depende de una serie de variables críticas, entre las que destacan: la composición del medio de cultivo, la temperatura (generalmente entre 22 y 25 °C), el régimen de iluminación (fotoperiodo e intensidad lumínica), la humedad relativa y la concentración y tipo de reguladores de crecimiento (como auxinas y citoquininas). Estas condiciones influyen directamente en la respuesta morfogénica y fisiológica de los tejidos cultivados, determinando procesos como la callogénesis, la organogénesis o la embriogénesis somática (Denner, 2009; Murashige & Skoog, 1962).

Esta técnica se fundamenta en el principio de la totipotencia celular, postulado por Schleiden y Schwann en 1838, el cual establece que cada célula vegetal posee el potencial genético completo para desarrollarse en un organismo completo bajo estímulos adecuados (Denner, 2009).

El cultivo *in vitro* es una estrategia biotecnológica con múltiples aplicaciones, entre las que destacan: la multiplicación masiva de plantas de interés comercial, el mejoramiento genético, la conservación *in vitro* de germoplasma valioso y el estudio de procesos fisiológicos, metabólicos y moleculares en condiciones controladas (Arias et al., s.f.).

2.1 Micropropagación

La micropropagación es la técnica más ampliamente utilizada dentro del cultivo *in vitro*. Consiste en la multiplicación masiva y rápida de plantas a partir de pequeños explantes —como ápices caulinares, yemas axilares o segmentos nodales— bajo condiciones asépticas y controladas (George et al., 2008). Esta técnica permite obtener un gran número de plantas en un periodo relativamente corto, garantizando la uniformidad fenotípica y la identidad genética (clones somáticos) del genotipo original (Murashige, 1973).

Una de las ventajas más significativas es la obtención de plantas libres de patógenos, especialmente virus, hongos y bacterias. Esto se logra mediante el uso de explantes derivados de meristemos, que naturalmente presentan baja carga microbiana, combinado con tratamientos desinfectantes rigurosos y condiciones estériles durante todo el proceso (Denner, 2009).

2.2 Cultivo de Células Vegetales

Los cultivos celulares vegetales son sistemas con un gran potencial comercial y científico para la producción a gran escala de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, terpenoides), muchos de los cuales se encuentran en bajas concentraciones en la planta silvestre (Arias et al., s.f.; Moscatiello et al., 2013). Estos sistemas se basan en el crecimiento de células no diferenciadas. Se dividen en dos tipos principales (Denner, 2009; Universidad de Medellín, 2018):

- Cultivos de callo: Células que proliferan en una masa compacta sobre un medio sólido. Permiten el mantenimiento estable a largo plazo.
- Cultivos en suspensión celular: Células o agregados celulares dispersos en medio líquido con agitación constante.

El establecimiento del cultivo requiere la transferencia periódica de explantes a medios que promuevan la desorganización celular (callogénesis) y la proliferación de células indiferenciadas (George et al., 2008).

2.3 Cultivo en Suspensión

El cultivo en suspensión celular ha demostrado ser una alternativa viable y rentable para la producción de metabolitos secundarios, ofreciendo mayor confiabilidad que la recolección silvestre, cuya disponibilidad es afectada por factores estacionales y ambientales (Arias et al., s.f.). En este sistema, la agitación constante asegura una aireación adecuada y una distribución uniforme de nutrientes y oxígeno, favoreciendo el crecimiento celular (Meins, 1989).

Aunque las suspensiones celulares finas son más frágiles, presentan una alta capacidad proliferativa. Permiten alcanzar mayores tasas de crecimiento y concentraciones celulares en

comparación con los cultivos de órganos (raíces o brotes), lo que los hace ideales para la producción industrial y el escalamiento en biorreactores.

2.4 Células Vegetales Habitadas

La habituación es el fenómeno por el cual las líneas celulares *in vitro* adquieren la capacidad de proliferar en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos (auxinas o citoquininas), un estado denominado autotrofia hormonal (Wu et al., 2021). Este proceso sugiere una producción endógena de las hormonas requeridas para la división celular y está relacionado con cambios en el estado fisiológico y metabólico (Meins, 1989).

Aunque los mecanismos subyacentes son complejos y han mostrado resultados inconsistentes entre estudios (Geier et al., 2011), la habituación es una estrategia biotecnológica prometedora. Las células habitadas suelen exhibir mayor estabilidad fisiológica, tolerancia al estrés y una biosíntesis más eficiente de compuestos bioactivos, lo que las convierte en un sistema idóneo para la producción sostenible de pigmentos y antioxidantes (Wu et al., 2021).

2.5 Viabilidad Celular

La viabilidad celular es un parámetro fundamental para evaluar la salud de las células y la funcionalidad del sistema de producción (Dixon, 2012). Una célula viable mantiene la integridad de su membrana plasmática y la actividad metabólica.

Uno de los métodos más precisos es la combinación de colorantes de Diacetato de Fluoresceína (FDA) y Fenosafranina (Widholm, 1972). El método se basa en lo siguiente:

- FDA: Es hidrolizado por esterasas intracelulares (solo presentes en células metabólicamente activas) liberando fluoresceína. Este compuesto polar queda atrapado, emitiendo una fluorescencia verde brillante bajo luz UV/azul, indicando viabilidad (Li et al., 2020).
- Fenosafranina: Es un colorante que tiñe de rojo las células con la membrana dañada (no viables), actuando como contraste.

Este ensayo exige un manejo cuidadoso y preparación *in situ* de la solución de FDA debido a su inestabilidad (Li et al., 2020).

3.- Inmovilización de células vegetales

Las técnicas de inmovilización celular, definidas como la restricción del movimiento de células vivas mediante medios físicos o artificiales que impiden su libre desplazamiento en el medio líquido (Su, 1999; Lindsey & Yeoman, 1985), han encontrado una amplia aplicación en sistemas vegetales. Sus usos abarcan desde la producción de metabolitos secundarios hasta la generación de semillas sintéticas.

El método más común y eficaz es el atrapamiento o encapsulación de las células dentro de una matriz polimérica tridimensional, como geles o soportes sólidos (Su, 1999). Esta técnica permite mantener la viabilidad celular y sus funciones metabólicas mientras restringe su movilidad.

3.1. Ventajas de la Inmovilización Celular

La implementación de sistemas de inmovilización conlleva múltiples ventajas operativas y fisiológicas:

- **Reutilización y Estabilidad:** Las células inmovilizadas pueden emplearse en procesos de flujo continuo a largo plazo, garantizando una eficiente retención de biomasa (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).
- **Control Proliferativo:** El confinamiento físico limita la división celular, una condición deseable dado que la biosíntesis de metabolitos secundarios a menudo se desacopla del crecimiento celular y se favorece bajo condiciones de estrés o restricción proliferativa (Su, 1999).
- **Reducción de Problemas Operacionales:** Disminuye inconvenientes comunes en los cultivos en suspensión, como la agregación celular, la flotación y el crecimiento adherido a las paredes del biorreactor (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

3.2. Requisitos para una Inmovilización Efectiva

Para que la inmovilización sea efectiva en la producción de metabolitos, se requiere que (Payne et al., 1991):

- a) El producto no esté estrictamente ligado al crecimiento celular.
- b) El crecimiento celular se controle para evitar la ruptura de la matriz.
- c) Las células mantengan una viabilidad prolongada y su capacidad biosintética.
- d) El producto se libere eficientemente al medio de cultivo para facilitar su recuperación.

3.3. Matrices de Inmovilización

La selección de la matriz es crucial para el éxito del proceso. Entre las más utilizadas se encuentran:

- **Alginato de Calcio:** Es la matriz más empleada debido a su facilidad de manejo, biocompatibilidad, baja toxicidad y capacidad para formar geles suaves por gelificación iónica en presencia de iones Ca^{2+} (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). El proceso se basa en la gelificación iónica del alginato —un polisacárido extraído de algas pardas—, lo que permite encapsular células en esferas semipermeables bajo condiciones suaves.
- **Espuma de Poliuretano:** Se ha explorado como un soporte alternativo, poroso y biocompatible, que permite una buena aireación, retención de biomasa y liberación de metabolitos, siendo útil en biorreactores de lecho fijo o de flujo continuo (Lindsey et al., 1983; Su, 1999).
- **Otros Polímeros:** También se han utilizado agar, agarosa, gelatina, carragenina y poliacrilamida, aunque con menor frecuencia debido a limitaciones como alta toxicidad, rigidez excesiva o inestabilidad mecánica.

4.- Pigmentos Naturales

El color es un atributo fundamental en la naturaleza y un elemento de gran impacto en la estética, cultura y tecnología humanas. Técnicamente, los colorantes se clasifican en pigmentos, que son sustancias de baja solubilidad que se dispersan en el medio, y tintes, que son solubles y se fijan al sustrato mediante enlaces físicos o químicos (Mollet & Grubenmann, 2001).

A pesar del dominio histórico de los pigmentos sintéticos por su bajo costo y alta estabilidad, la tendencia global hacia productos sostenibles, biodegradables y no tóxicos ha reactivado el interés por los pigmentos naturales (Bechtold & Mussak, 2009). Estos compuestos, derivados de plantas, microorganismos o insectos, no solo aportan color, sino también propiedades bioactivas como actividad antioxidante, antiinflamatoria y fotoprotectora. Esta funcionalidad dual los convierte en candidatos ideales para alimentos funcionales, cosméticos naturales y productos farmacéuticos.

4.1. Producción de Pigmentos Naturales en Sistemas de Cultivo Celular Vegetal

La biotecnología vegetal ofrece una solución sostenible y avanzada a los desafíos de la extracción tradicional, como la dependencia climática, la variabilidad y las bajas concentraciones. La producción de pigmentos mediante cultivos celulares *in vitro* permite:

- Control y Estandarización: Un control preciso sobre las condiciones de crecimiento (medio, pH, luz), garantizando una calidad de producto consistente (Deroles, 2006).
- Sostenibilidad y Escalabilidad: La producción es independiente de factores geográficos y estacionales. Además, el sistema es escalable mediante biorreactores, lo que reduce la presión sobre los recursos naturales (Marchev & Georgiev, 2020; Vrancheva et al., 2021).

Un ejemplo emblemático de éxito industrial es la producción de shikonina a partir de *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita, 1985).

4.2. Pigmento Azul Producido por Células Vegetales de Cultivos de Lavanda

El pigmento azul generado por células de *Lavandula* spp. es de particular interés debido a su rareza química y potencial industrial. Su biosíntesis se ha logrado principalmente en cultivos de callo, donde puede ser incrementada mediante la optimización del medio, la adición de elicitores y condiciones de estrés fisiológico (Banthorpe, Bilyard, & Watson, 1985).

Un hallazgo crucial es que el color azul no es intrínseco de una molécula, sino el resultado de la quelación de precursores fenólicos incoloros o de color diferente con iones férricos (Fe^{2+} o Fe^{3+}), como se ilustra esquemáticamente en la Figura 4-A (Banthorpe et al., 1985; Arnaldos et al., 2006).

Factores como la luz, la concentración de sacarosa, la disponibilidad de aminoácidos y la presencia de reguladores de crecimiento específicos (como la combinación de cinetina y 2,4-D) influyen drásticamente en la acumulación de estos precursores y, por ende, en la formación del pigmento final (Tsuru & Inoue, 1996).

La producción es a menudo transitoria y fuertemente dependiente de la señalización hormonal. Tsuru & Inoue (1996) demostraron que al eliminar los reguladores de crecimiento en subcultivos sucesivos, la producción disminuye progresivamente hasta desaparecer, lo que indica un fenómeno inducido y no una mutación estable. Esta naturaleza efímera subraya la necesidad de desarrollar estrategias de estabilización, como la habituación o la inmovilización, para mantener la productividad a largo plazo.

4.3. Encapsulación de Células de Lavanda para la Producción de Pigmentos

La inmovilización de células de lavanda se ha estudiado con diversos materiales como una estrategia para mejorar la estabilidad y productividad del pigmento azul. Nakajima (1986) utilizó una resina fotosensible (PVA-SbQ) para inmovilizar células de *L. vera*, observando que, aunque se produjo el pigmento azul, una fracción quedó retenida en la matriz. En contraste, los geles de alginato de calcio han demostrado una difusión más eficiente del producto (Nakajima et al., 1987).

Las condiciones de cultivo modulan drásticamente el color del pigmento. Estudios con alginato han revelado que en oscuridad predominan compuestos marrones, identificados posteriormente como derivados de naftopirano, mientras que la luz combinada con Fe^{3+} induce la conversión de este precursor a la forma azul estable (Nakajima et al., 1990; Arnaldos et al., 2006). La optimización del medio, específicamente las concentraciones de fosfato e iones de hierro, impacta directamente en la productividad final (Trejo-Tapia et al., 2003).

La investigación sobre la producción de este pigmento en sistemas *in vitro* es extensa, como sintetiza la Tabla 2. Los hallazgos clave, extraídos de la tabla, incluyen:

- La L-cisteína es un inductor recurrente y crucial para la biosíntesis del pigmento.
- El ión ferroso (Fe^{2+}) es un componente esencial para la formación del complejo azul, actuando como centro de quelación.
- Las condiciones de iluminación son determinantes, regulando la conversión del precursor a la forma azul final.
- La limitación de nitrógeno y el tipo de fuente de carbono (p. ej., glucosa) pueden influir significativamente en el rendimiento.

Tabla 2 Cuadro comparativo: Producción de pigmento azul en cultivos in vitro de *Lavandula* spp

Autor (Año, País)	Especie	Tipo de cultivo	Color del pigmento	λ máx (nm)	Precursor / Compuesto identificado	Inductores / Condiciones	Localizació n
Watanabe (1985, Japón)	<i>L. vera</i>	Células en suspensión líquida	Azul	460	No caracterizado	L-Cisteína (1 mM), luz	Secretado al medio
Banthorp e (1985, Reino Unido)	<i>L. angustifoli a</i>	Cultivo de callos	Amarillo (precursor) , Azul (complejo con Fe^{2+})	–	Ésteres enólicos del ácido cafeico ((Z,E)- y (E,E)- isómeros)	Fe^{2+} (induce color azul), oscuridad (+), sacarosa, asparagina	Secretado al medio (precursor amarillo → complejo azul)
Nakajima (1986, Japón)	<i>L. vera</i>	Células inmovilizada s (PVA-SbQ)	Azul	640	No caracterizado	L-Cisteína (0.2–0.3 mM), luz	Liberación al medio dependiente del gel
Nakajima (1990, Japón)	<i>L. vera</i>	Células inmovilizada	Azul (luz), Marrón (oscuridad)	600– 700 (pH 5.6)	Compuesto nafto[2,3- b]pirano	Luz (induce azul), Fe^{3+} (conversión	Secretado al medio (ambos colores)

Autor (Año, País)	Especie	Tipo de cultivo	Color del pigmento	λ máx (nm)	Precursor / Compuesto identificado	Inductores / Condiciones	Localización
		s (alginato / PVA-SbQ)			(precursor marrón)	marrón → azul), oscuridad (mantiene color marrón)	
López-Arnaldos (1995, España)	<i>L. x intermedia</i>	Cultivo de callos (derivados de flor y hoja)	Azul	572	Ácido rosmarínico	FeSO ₄ (esencial para color azul), oscuridad	Secretado al medio
Trejo-Tapia (2003, México)	<i>L. spica</i> (= <i>L. latifolia</i>)	Células en suspensión	Azul (con Fe ²⁺), Amarillo (sin Fe ²⁺)	600	No caracterizado (forma amarilla sin Fe ²⁺)	PO ₄ ³⁻ (+), Fe ²⁺ (esencial), bajo NO ₃ ⁻ , sacarosa (30 g/L), L-cisteína (0.5 mM)	Secretado al medio

Autor (Año, País)	Especie	Tipo de cultivo	Color del pigmento	λ máx (nm)	Precursor / Compuesto identificado	Inductores / Condiciones	Localización
Oommen (2009, Nueva Zelanda)	<i>L. angustifolia</i>	Cultivo de callos y suspensión celular	Azul	590 (pH alcalino)	Compuestos amarillos putativos (probable derivado de naftopiranona)	Hormonas (IAA/kinetina óptimas), Fe ²⁺ (presencia implícita)	Intracelular y extracelular

Nota: Adaptado de múltiples fuentes. La tabla consolida los hallazgos más relevantes sobre la producción del pigmento azul en diferentes sistemas de cultivo de *Lavandula*.

En conjunto, la Tabla 2 evidencia que la encapsulación no solo protege y estabiliza las células productoras, sino que, combinada con el control preciso de factores abióticos (luz, composición del medio, iones metálicos), permite modular la producción y el perfil de pigmentos obtenidos. Esto convierte a los sistemas de células inmovilizadas en una herramienta prometedora para la producción *in vitro* de colorantes naturales con aplicaciones sostenibles y de alto valor añadido.

4.4. Estructuras Moleculares del Pigmento Azul de Lavanda

La naturaleza química del pigmento azul es compleja y parece ser especie-dependiente. La evidencia sugiere que diferentes precursores fenólicos biosintetizados por las células de lavanda pueden generar el mismo tipo de pigmento azul mediante el mecanismo común de quelación con hierro.

Los estudios pioneros de Banthorpe et al. (1985) identificaron en *L. angustifolia* que los precursores son los (Z,E)- y (E,E)-ésteres enólicos del ácido cafeico, compuestos amarillos que forman un complejo intensamente azul al quelarse con Fe^{2+} .

Posteriormente, trabajos con *L. vera* revelaron una ruta alternativa. Sonomoto et al. (1990) aislaron de células inmovilizadas un precursor marrón identificado como un derivado de nafto[2,3-b]pirano, cuya estructura se representa en la Figura 4-B. Este compuesto, que se acumula en oscuridad, sufre una conversión fotoquímica mediada por Fe^{3+} para transformarse en la forma azul, lo que subraya la influencia del entorno en la coloración final.

Además, en *L. × intermedia*, López-Arnaldos et al. (1995) confirmaron que el ácido rosmarínico — un éster del ácido cafeico y el ácido dihidroxifenil láctico— también forma un complejo 1:1 con Fe^{2+} , produciendo un pigmento azul con un máximo de absorción a 572 nm.

En conjunto, estas investigaciones pintan un panorama en el que la lavanda posee la capacidad de producir distintos metabolitos fenólicos que, al interaccionar con iones de hierro en el medio de cultivo, convergen en la formación del característico y valioso pigmento azul.

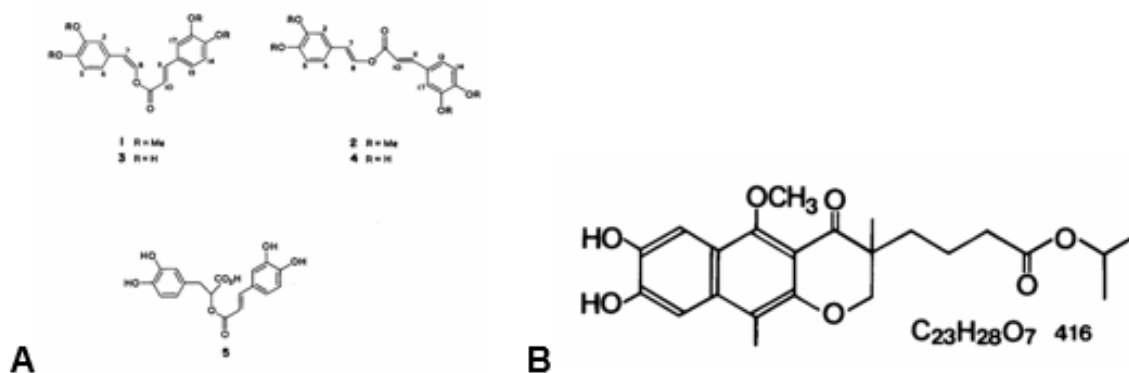


Figure 4 Estructuras propuestas de los precursores fenólicos del pigmento azul en *Lavandula* spp. (A) Éster enólico del ácido cafeico [(Z,E)-isómero] según Banthorpe et al. (1985).

5.- Técnicas de separación del pigmento.

5.1. Cromatografía

La cromatografía comprende un conjunto de técnicas fundamentales para la separación, identificación y cuantificación de compuestos en mezclas complejas, como los extractos de pigmentos naturales. Su principio se basa en la distribución diferencial de los componentes entre una fase estacionaria y una fase móvil (Santos, 2015).

5.1.1. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La Cromatografía en Capa Fina (TLC) es una técnica analítica rápida, versátil y de bajo costo, ampliamente utilizada para la separación, identificación y evaluación de la pureza de pigmentos en extractos complejos (Quiroga, s.f.). Su principio de separación se basa principalmente en la adsorción.

La fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente (como gel de sílice 60) sobre un soporte inerte, mientras que la fase móvil es un disolvente o mezcla orgánica que asciende por capilaridad. Los compuestos se separan según su polaridad: los más polares interactúan fuertemente con la fase estacionaria y migran menos, mientras que los apolares avanzan más rápidamente con la fase móvil (Flores, 2017).

Los parámetros clave para la interpretación son el R_f (Relación de frente) y el R_x (Relación respecto a un estándar), que permiten comparar y identificar compuestos bajo condiciones controladas (Quiroga, s.f.). La reproducibilidad de estos valores depende críticamente de factores como la saturación de la cámara, la pureza de los disolventes y la cantidad de muestra aplicada.

El TLC preparativo, que utiliza capas más gruesas de adsorbente, permite el aislamiento de pequeñas cantidades de compuestos puros para su posterior caracterización (Harborne, 1998; Flores, 2017).

5.1.2. Cromatografía en Columna

La cromatografía en columna es una técnica de purificación preparativa esencial. Se realiza en un tubo de vidrio relleno con la fase estacionaria, donde la muestra se adsorbe en la parte superior y es eluida progresivamente con disolventes de polaridad creciente (Flores, 2017).

Los compuestos menos polares se eluyen primero, mientras que los más polares requieren disolventes más fuertes. En el caso de pigmentos, la formación de bandas coloreadas visibles facilita el monitoreo del proceso. Las fracciones recolectadas se analizan mediante TLC para verificar su pureza. Esta técnica fue fundamental en el presente trabajo para aislar el pigmento azul y obtener fracciones puras para su caracterización (Harborne, 1998; Flores, 2017).

5.1.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) es una técnica analítica avanzada que utiliza columnas empacadas con partículas muy finas ($<10\ \mu\text{m}$) y sistemas de bombeo de alta presión, lo que proporciona una separación de alta resolución, rapidez y reproducibilidad, superando ampliamente a la cromatografía en columna convencional (Skoog et al., 2017).

A diferencia de las técnicas gravitacionales, la HPLC permite un control preciso de los parámetros de separación, como la composición de la fase móvil (isocrática o en gradiente), el flujo y la temperatura de la columna (Sánchez & Fernández, 2020). Esto la convierte en una herramienta fundamental para el análisis cuali y cuantitativo de mezclas complejas, como los extractos vegetales.

La elección de la fase estacionaria es crucial. Para la separación de metabolitos secundarios como los pigmentos, las columnas de fase reversa (C18) son las más utilizadas, donde la separación se basa en la hidrofobicidad de los analitos (Skoog et al., 2017). La detección se realiza comúnmente con detectores de arreglo de diodos (DAD), que permiten obtener espectros de absorción en línea para una identificación preliminar, o acoplada a espectrómetros de masas (HPLC-MS) para una caracterización estructural inequívoca (Miller, 2019).

Por su precisión y sensibilidad, la HPLC es la técnica de referencia para la cuantificación de compuestos específicos en una matriz compleja y para evaluar la pureza de fracciones aisladas (Sánchez & Fernández, 2020).

5.2. Espectrofotometría UV-Visible

La espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis) es un método analítico sensible y no destructivo para la identificación cualitativa y cuantificación de compuestos que absorben radiación entre 190 y 800 nm (Botello Pozos, s.f.).

El color que percibimos de una sustancia es el complementario de la longitud de onda que absorbe. Un compuesto que absorbe en la región del azul (440-470 nm) se verá anaranjado, relación que se resume en la Tabla 3.

Longitud de onda	Color absorbido	Color complementario
400-420	Violeta	Amarillo-verde
420-440	Azul-violeta	Amarillo
440-470	Azul	Anaranjado
470-500	Verde-azul	Rojo
500-520	Verde	Purpura
520-550	Amarillo-verde	Violeta
550-580	Amarillo	Azul-violeta
580-620	Anaranjado	Azul
620-680	Rojo	Verde-azul
680-800	Purpura	Verde

Tabla 3 Relación entre la longitud de onda absorbida, el color absorbido y el color complementario observado

Fuente: Adaptado de Botello Pozos (s.f.).

El espectro de absorción, que representa la absorbancia en función de la longitud de onda, actúa como una "huella dactilar" del compuesto. Parámetros como la posición del máximo de absorción (λ_{max}), la intensidad y la forma de las bandas son característicos y permiten su identificación (Botello Pozos, s.f.).

Para la cuantificación, se aplica la Ley de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$), que establece una relación lineal entre la absorbancia (A) y la concentración (C). Mediante una curva de calibración con estándares de concentración conocida, es posible determinar con precisión la concentración de la muestra problema (Botello Pozos, s.f.).

6. Pruebas antioxidantes

La evaluación de la actividad antioxidante es fundamental para validar el potencial bioactivo de compuestos naturales como el pigmento azul de lavanda. Las metodologías se basan en la capacidad del antioxidante para neutralizar radicales libres mediante mecanismos de transferencia de electrones (ET) o de átomos de hidrógeno (HAT).

6.1. Actividad Antioxidante por el Método DPPH•

El método del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la capacidad antioxidante de extractos vegetales y compuestos puros. Se fundamenta en la reducción del radical DPPH• (color púrpura intenso) a su forma no radical (hidrazina, incolora o amarilla) mediante la donación de un átomo de hidrógeno o un electrón por parte del antioxidante (Malterud, Farbrot, & Huse, 1993).

La disminución de la coloración se cuantifica espectrofotométricamente a 515-517 nm, longitud de onda de máxima absorción del DPPH•. La eficacia se expresa como porcentaje de inhibición o como Concentración Efectiva 50% (CE₅₀), que corresponde a la concentración necesaria para reducir en un 50% el radical inicial (Malterud et al., 1993).

El porcentaje de inhibición se calcula mediante:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) * 100$$

Donde A_{control} es la absorbancia del DPPH• sin muestra y A_{muestra} es la absorbancia en presencia del antioxidante.

Si bien esta técnica es valorada por su simplicidad, rapidez y bajo costo, presenta limitaciones como la necesidad de emplear disolventes orgánicos (metanol o etanol) y la estandarización rigurosa del tiempo de reacción (generalmente 30-60 minutos en oscuridad) debido a la lenta cinética de reacción de algunos compuestos (Hamed, Kalita, Bartolo, & Jayanty, 2019).

6.2. Actividad Antioxidante por el Método ABTS⁺•

El método del radical catiónico ABTS⁺• (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) evalúa la capacidad antioxidante total de muestras tanto hidrofílicas como lipofílicas. El radical catiónico azulado-verdoso ABTS⁺• se genera por oxidación del ABTS con persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y presenta su λ_{max} a 734 nm (Hamed et al., 2019).

Las ventajas clave del método ABTS⁺• incluyen:

- Versatilidad del medio: Aplicable en medios acuosos y orgánicos
- Mayor reactividad: Puede ser neutralizado por diversos mecanismos antioxidantes
- Baja interferencia cromática: La medición a 734 nm reduce interferencias de compuestos coloreados (Hamed et al., 2019)

La actividad se expresa comúnmente como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) o como CE₅₀, comparando la capacidad de la muestra con el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E.

6.3. Actividad Antioxidante de *Lavandula* spp.

6.3.1. Ensayo DPPH• en *Lavanda*

Estudios con *Lavandula angustifolia* han demostrado una alta capacidad de inhibición, alcanzando hasta 86.3% en extractos de flores, superior a la observada en hojas (77.5%) o capullos (85.9%). Esta actividad se atribuye principalmente a los monoterpenos mayoritarios, linalool y acetato de linalilo, y muestra una clara dependencia de la concentración (Nurzyńska-Wierdak & Zawislak, 2016; Da Silva et al., 2015).

6.3.2. Ensayo ABTS⁺• en *Lavanda*

El método ABTS⁺• frecuentemente reporta mayor eficacia en *Lavandula* que el DPPH•. Se han obtenido inhibiciones de 99.48% en aceite esencial de flores secas de *L. angustifolia*, confirmando que las flores presentan la mayor actividad antioxidante, con los menores valores de CE₅₀ (Caprari et al., 2021; Smigielski, Prusinowska, & Śmigielska, 2018).

6.3.3. Factores que Influyen en la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante en lavanda está influenciada por:

- Parte de la planta: Las flores muestran mayor actividad que hojas o tallos
- Estado de la planta: El secado puede concentrar o estabilizar compuestos antioxidantes
- Composición química: La actividad correlaciona con la concentración de monoterpenos y fenoles totales
- Método de extracción: Técnicas como hidrodestilación vs. CO₂ supercrítico afectan significativamente el perfil y actividad del extracto (Danh et al., 2012)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

El material biológico utilizado consistió en plantas de *Lavandula angustifolia* Mill., obtenidas a partir de líneas micropropagadas y mantenidas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

1.1. Micropropagación in vitro de *Lavandula angustifolia*

La micropropagación de *L. angustifolia* se realizó mediante subcultivos sucesivos cada 30 días. Los explantes se transfirieron a frascos de vidrio estériles de 120 mL que contenían 20 mL de medio de cultivo base Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), como se muestra en la Figura 5.

1.1.1. Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo MS se preparó a partir de soluciones *stock* concentradas (10X para sales inorgánicas y 100X para componentes orgánicos y vitaminas), las cuales se almacenaron a 4 °C y -20 °C, respectivamente, hasta su uso. El medio se suplementó con sacarosa al 3% (p/v) como fuente de carbono y se solidificó con GelRite® al 2% (p/v). Previo a la esterilización, el pH se ajustó a 5.7 utilizando NaOH 1 N. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 120 °C y 15 lb/in² de presión durante 20 minutos.

1.1.2. Condiciones de Cultivo

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas: temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperiodo continuo (24 h) de luz LED blanca con una intensidad lumínica de 80 μmol·m⁻²·s⁻¹, y una humedad relativa entre 60% y 70%.

La composición completa y detallada del medio de cultivo MS se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4 Composición del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962)

COMPONENTES INORGÁNICOS	CONCENTRACIÓN FINAL (g/L)
<i>CaCl₂ 2H₂O</i>	0.440
<i>KNO₃</i>	1.9
<i>NH₄NO₃</i>	1.65
<i>KH₂PO₄</i>	0.17
<i>FeSO₄ 7H₂O</i>	27.86
<i>Na₂EDTA 2H₂O</i>	37.25
<i>MnSO₄ 4H₂O</i>	16.88
<i>KI</i>	0.830
<i>ZnSO₄ 7H₂O</i>	8.6
<i>H₃BO₃</i>	6.2
<i>MgSO₄ 7H₂O</i>	0.370
<i>CoCl₂ 6H₂O</i>	0.025
<i>CuSO₄ 5H₂O</i>	0.025
<i>Na₂MoO₄ 2H₂O</i>	0.250

COMPONENTES ORGÁNICOS	CONCENTRACIÓN FINAL (mg/L)
<i>Glicina</i>	2
<i>Mioinositol</i>	100
<i>Tiamina-HCl</i>	0.100
<i>Piridoxina-HCl</i>	0.500
<i>Acido Nicotínico</i>	0.500

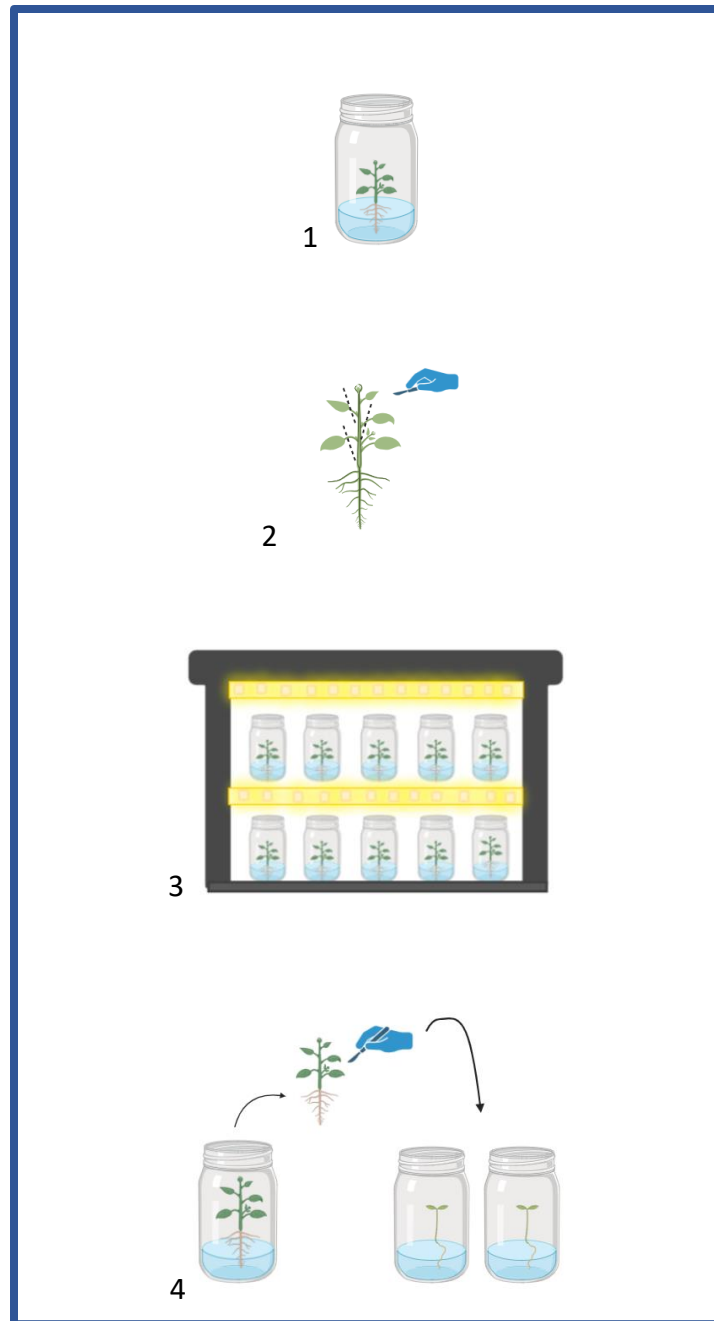


Figure 5 Diagrama esquemático del proceso de micropropagación in vitro de *Lavandula angustifolia*: 1) Plantas in vitro; 2) Obtención de explantes; 3) Incubación en cámara de crecimiento; 4) Transferencia periódica a nuevo medio MS

1.2. Obtención de Callos Habitados

La inducción de callos se realizó a partir de explantes foliares provenientes de los cultivos de micropropagación descritos en la Sección 1.1.

El proceso de callogénesis y habituación se llevó a cabo mediante subcultivos sucesivos en medio MS sólido desprovisto de reguladores de crecimiento exógenos. Esta condición fue fundamental para seleccionar líneas celulares con capacidad de proliferación autónoma (habituación hormonal), favoreciendo la proliferación de tejido no diferenciado, como se muestra en la Figura 6.

Una vez establecida una masa callosa consistente, el tejido fue transferido de manera periódica (cada 4-5 semanas) a frascos de vidrio estériles de 120 mL que contenían 20 mL de medio de mantenimiento. Este medio de mantenimiento consistió en medio MS sólido con la misma composición base, aditivos y condiciones de esterilización descritas en la Sección 1.1.1, manteniendo la ausencia de reguladores de crecimiento para preservar el fenotipo habituado.

El mantenimiento continuo de la línea celular en estas condiciones aseguró la estabilidad del fenotipo habituado para su uso en los experimentos posteriores de cultivo en medio líquido e inmovilización.

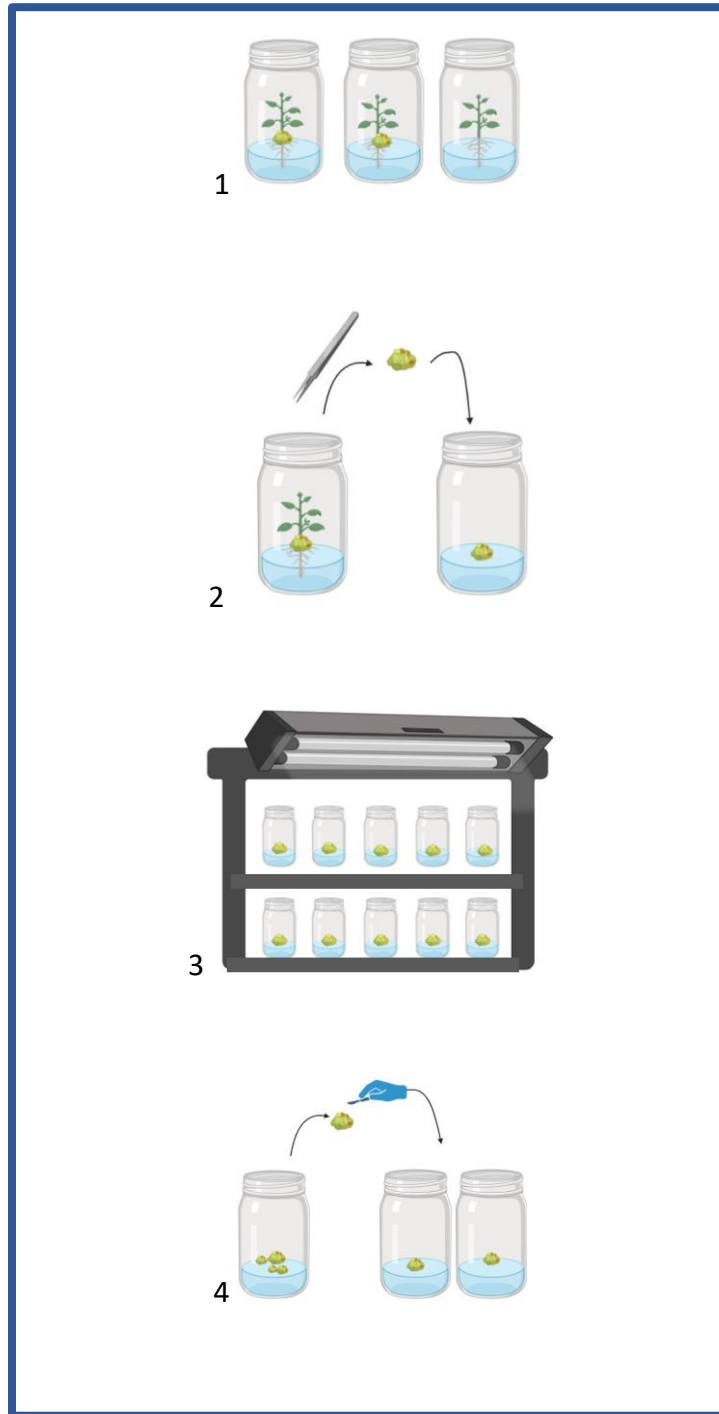


Figure 6 Diagrama esquemático del proceso de obtención de callos de *Lavandula angustifolia*: 1) Callos derivados de tejidos vegetales; 2) Transferencia a medio MS sin reguladores de crecimiento; 3) Incubación en cámara de crecimiento; 4) Subcultivo periódico

1.3. Establecimiento de la Suspensión de Células Habitadas

Las suspensiones celulares habitadas se establecieron a partir de callos previamente habituados de *Lavandula angustifolia* Mill., cedidos por la Dra. Martha Alicia Rodríguez Mendiola del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

El proceso de iniciación se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar. Para ello, se transfirió asépticamente una masa de callo desde el medio sólido de mantenimiento a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio MS líquido estéril, sin la adición de reguladores de crecimiento exógenos.

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C, bajo un fotoperiodo de luz LED blanca continua ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y en una agitadora orbital (marca Lab-Line Instruments) a 100 rpm. El proceso de establecimiento se ilustra en la Figura 7.

Para inducir y mantener el fenotipo habituado, se realizaron subcultivos cada siete días durante un período de aclimatación mínimo de seis semanas. En cada transferencia, se inoculó aproximadamente 1 g de biomasa celular fresca (peso húmedo) en 50 mL de medio MS líquido fresco. Durante este período, se observó una progresiva adaptación al medio líquido, caracterizada por un aumento en la formación de agregados celulares dispersos y una reducción en la adherencia a las paredes del matraz.

1.4. Estimación de la Viabilidad Celular

La viabilidad celular se evaluó periódicamente mediante la técnica de tinción vital con Diacetato de Fluoresceína (FDA), siguiendo el protocolo establecido por Widholm (1972).

Se preparó una solución *stock* de FDA a una concentración de 5 mg/mL en acetona, la cual se almacenó a 4 °C protegida de la luz. Inmediatamente antes del análisis, se preparó una solución de trabajo diluyendo 0.1 mL de la solución *stock* en 5 mL de agua destilada estéril.

Para el ensayo, una alícuota de la suspensión celular se mezcló con un volumen equivalente de la solución de trabajo de FDA en un portaobjetos. La preparación se observó de inmediato bajo un microscopio compuesto equipado con un filtro de fluorescencia. Las células se consideraron viables cuando exhibieron una fluorescencia verde brillante y homogénea, la cual se mantuvo estable durante un período de observación de al menos 15 minutos. Este resultado indica la integridad de la membrana plasmática y la actividad metabólica de esterasas intracelulares, enzimas que hidrolizan el FDA no fluorescente en fluoresceína, el compuesto fluorescente.

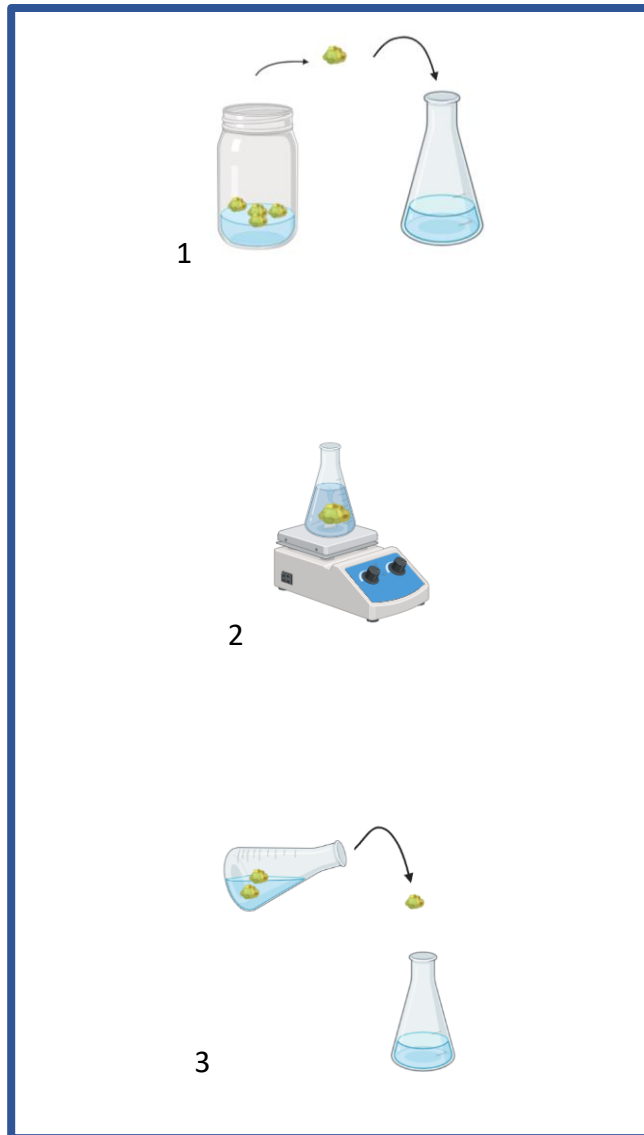


Figure 7 Diagrama esquemático del establecimiento de la suspensión celular de *Lavandula angustifolia*. 1) Transferencia de callo de medio sólido a medio líquido; 2) Incubación con agitación orbital; 3) Subcultivo periódico

2.-Inmovilización celular

Con el objetivo de mejorar la estabilidad y potencial productividad de las células vegetales, se implementó la técnica de inmovilización utilizando células habituadas de *Lavandula angustifolia* Mill. Se evaluaron dos sistemas distintos: la adhesión a espuma de poliuretano (Sección 2.1) y la encapsulación en alginato de sodio (Sección 2.2).

2.1. Inmovilización Celular en Soporte de Poliuretano

2.1.1. Preparación y Esterilización del Soporte

Se utilizó espuma de poliuretano comercial como soporte para la inmovilización por adhesión. A partir de esta, se cortaron cubos de aproximadamente 1 cm³. Estos cubos se sometieron a un lavado exhaustivo con agua destilada para eliminar posibles residuos o impurezas. Posteriormente, se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 15 lb/in² de presión durante 20 minutos.

2.1.2. Protocolo de Inmovilización y Cultivo

Los cubos estériles de poliuretano se transfirieron de manera aséptica en una cabina de flujo laminar a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio MS líquido estéril sin reguladores de crecimiento exógenos. La inmovilización se indujo mediante la adición de una suspensión celular habituada al sistema, permitiendo que las células se adhirieran físicamente a la matriz porosa del soporte.

Los cultivos inmovilizados se incubaron bajo las mismas condiciones establecidas para los cultivos en suspensión: una temperatura de 25 ± 1 °C, iluminación LED continua (80 μmol·m⁻²·s⁻¹) y agitación orbital constante a 100 rpm en una agitadora marca Lab-Line Instruments.

La viabilidad celular y la adhesión al soporte se monitorearon periódicamente mediante la tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA), siguiendo el protocolo descrito en la Sección 1.4. La observación bajo microscopio de fluorescencia confirmó la presencia de células viables (fluorescencia verde) adheridas a la estructura de la espuma, como se ilustra en la Figura 8.

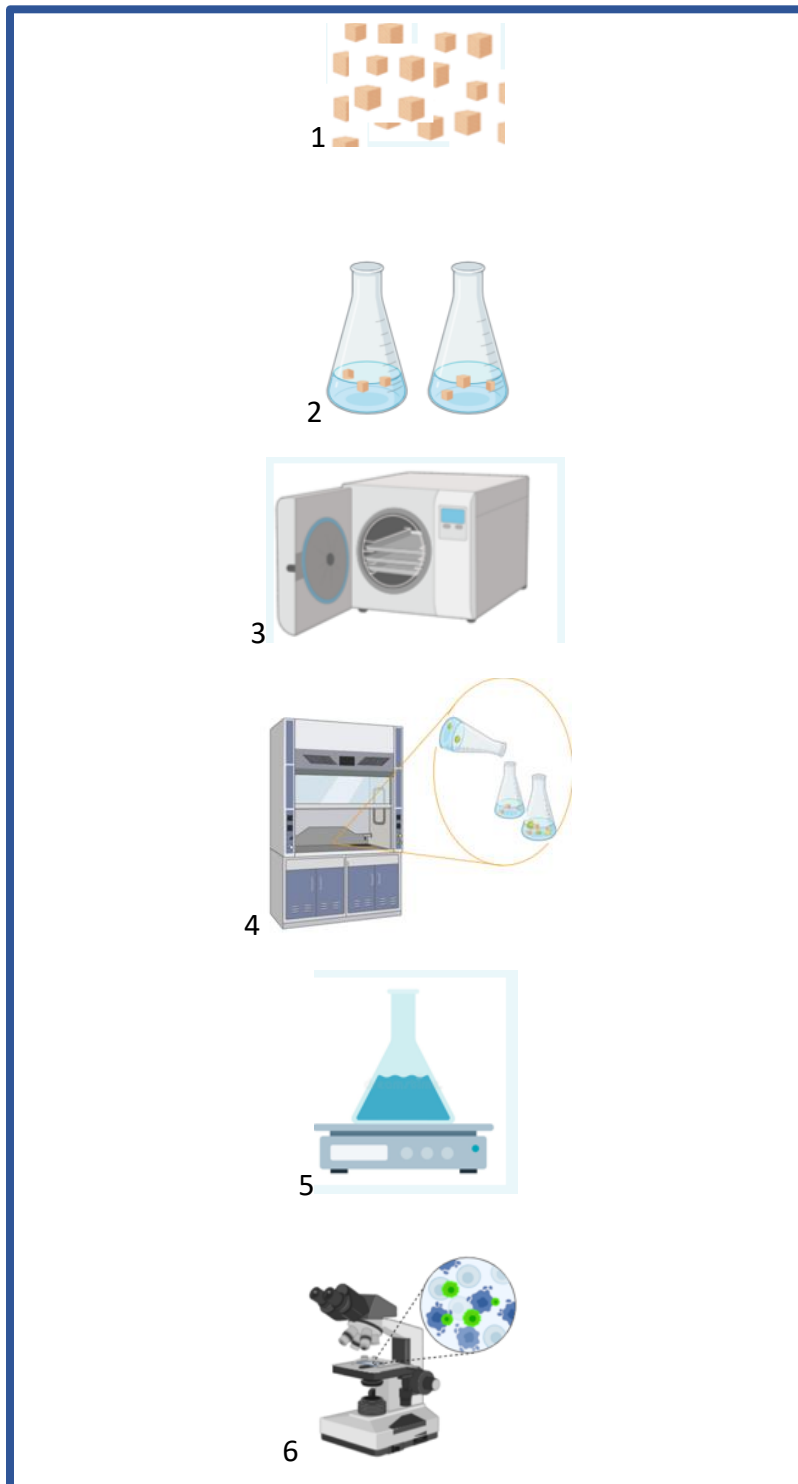


Figure 8 Diagrama encapsulación poliuretano. 1) Cubos de espuma; 2) Lavado con agua destilada; 3) Esterilización por autoclave; 4) Transferencia a medio estéril; 5) Adición de células en suspensión; 6) Evaluación de viabilidad por fluorescencia

2.2. Encapsulación en Perlas de Alginato

La encapsulación de células de *Lavandula angustifolia* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Tapia, Soto, Rojas y Müller (1999), con ligeras modificaciones. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones estrictamente asépticas.

2.2.1. Preparación de la Matriz y las Células

Se preparó una solución de alginato de sodio comercial al 2% (p/v) en medio MS líquido, sin antibióticos ni reguladores de crecimiento exógenos. El pH de esta solución se ajustó a 6.0 para optimizar la formación y estabilidad de las perlas.

Paralelamente, las células habituadas procedentes de la suspensión celular se recolectaron y lavaron con agua destilada estéril, filtrándose para eliminar completamente el medio de cultivo residual. La biomasa celular lavada se mezcló homogéneamente con la solución de alginato en una proporción de 4 g de biomasa fresca por cada 100 mL de solución de polímero.

2.2.2. Formación y Gelificación de las Perlas

La mezcla célula-alginato se cargó en una bomba de infusión para un goteo controlado. Las gotas se dejaron caer sobre una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 100 mM (equivalente a 1.11% p/v), cuyo pH se había ajustado previamente a 7.5. Las perlas se mantuvieron en esta solución de CaCl_2 durante 30 minutos para asegurar la gelificación iónica completa y la formación de una matriz tridimensional estable, como se ilustra en la Figura 9.

2.2.3. Cultivo y Mantenimiento de las Perlas

Tras el período de gelificación, las perlas se recolectaron y enjuagaron cuidadosamente con agua destilada estéril para eliminar el exceso de CaCl_2 . Finalmente, las perlas de alginato que contenían las células inmovilizadas se transfirieron a matraces Erlenmeyer con medio MS líquido estéril para su incubación. Los cultivos se mantuvieron a 25 °C con agitación orbital continua a 100 rpm. A diferencia de los sistemas anteriores, las condiciones de iluminación se establecieron en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

La viabilidad celular dentro de las perlas se monitoreó periódicamente mediante la tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA), de acuerdo con el protocolo descrito en la Sección 1.4.

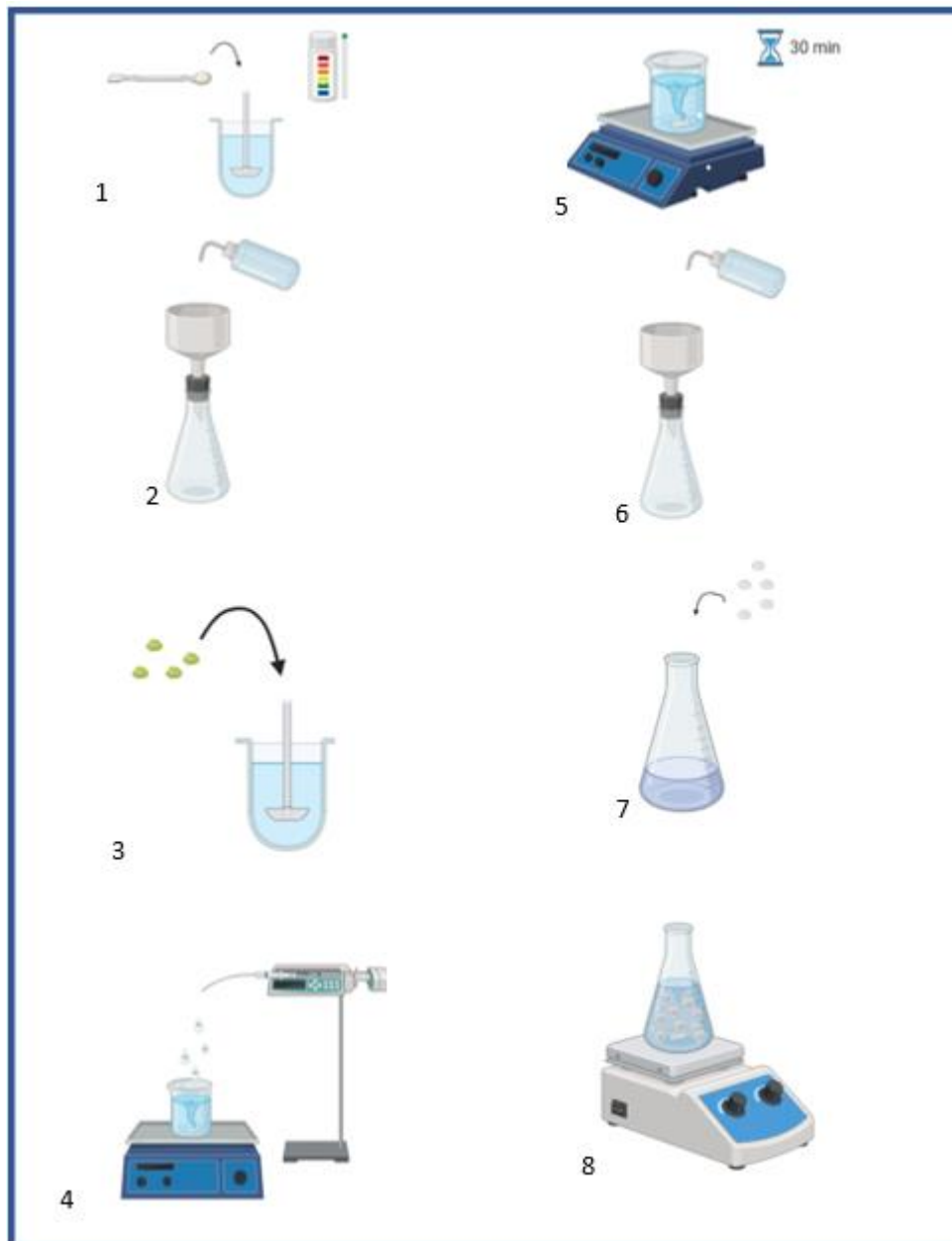


Figure 9 Diagrama encapsulación con alginato 1: Preparación de solución de alginato; 2: Lavado de biomasa; 3: Mezcla célula-alginato; 4: Goteo controlado; 5: Gelificación en CaCl_2 ; 6: Enjuague; 7: Transferencia a medio de cultivo; 8: Incubación bajo agitación y fotoperíodo.

3. Preparación y Purificación del Pigmento Azul

El pigmento azul fue obtenido y purificado a partir del medio de cultivo de las suspensiones celulares habituadas, recolectado tras siete días de incubación.

3.1. Extracción y Concentración Inicial

La separación inicial del pigmento soluble de la biomasa celular se realizó mediante filtración simple con papel filtro, como se ilustra en la Figura 10. El sobrenadante filtrado, con un volumen inicial de 200 mL por lote, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar partículas celulares residuales y concentrar el pigmento. Este proceso permitió obtener un volumen final de 5 mL de extracto concentrado por lote, lo que equivale a un factor de concentración de 40X.

3.2. Diálisis y Eliminación de Interferentes

El extracto concentrado se sometió a diálisis para eliminar azúcares, sales inorgánicas y otros metabolitos de bajo peso molecular que pudieran interferir en los ensayos posteriores. Para ello, se utilizó una membrana semipermeable de acetato de celulosa con un peso molecular de corte (*cut-off*) de 3-10 kDa. El proceso de diálisis se llevó a cabo durante cinco días a temperatura ambiente, con cambios del agua destilada cada 24 horas.

3.3. Verificación de la Eficacia de la Diálisis por HPLC

La eficacia de la diálisis en la eliminación de carbohidratos se evaluó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Las muestras, tanto antes como después de la diálisis, se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0.22 μm . El análisis se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Sistema: HPLC equipado con detector de índice de refracción (RID).
- Columna: Fase reversa C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm).
- Fase Móvil: Gradiente de metanol-agua (v/v).
- Flujo: 1.0 mL/min.
- Tiempo de Corrida: 30 minutos.

Los tiempos de retención de los picos cromatográficos se compararon con los de estándares comerciales de glucosa, fructosa y sacarosa para identificar y confirmar la eliminación de estos azúcares.

3.4. Liofilización y Almacenamiento del Pigmento Purificado

El extracto dializado se congeló rápidamente y se liofilizó mediante sublimación del agua bajo vacío, obteniéndose un polvo de color azul intenso, homogéneo y estable. El pigmento purificado en polvo se almacenó a -20 °C, protegido de la luz, para su conservación a largo plazo.

Para su uso en los ensayos de actividad antioxidante, el pigmento liofilizado se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) estéril, preparando una solución madre a una concentración nominal de 2.5 mg/mL para cada lote analizado.



Figure 10 Diagrama de preparación de la muestra

4. Cuantificación y Separación Analítica del Pigmento

4.1. Determinación Cuantitativa del Pigmento por Espectrofotometría UV-Vis

La cuantificación del pigmento azul se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis, basándose en la Ley de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$). Para incorporar la variabilidad inherente al sistema de producción *in vitro*, la curva de calibración se construyó utilizando cinco muestras independientes de pigmento, obtenidas de distintos lotes y tiempos de cultivo.

A partir de cada muestra, se preparó una solución madre disolviendo el pigmento purificado en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración nominal de 2500 µg/mL. De esta solución, se realizaron tres diluciones seriadas por un factor de 2, obteniendo concentraciones de 1250, 625 y 312.5 µg/mL.

Previo a la cuantificación, se realizó un barrido espectral completo (190–1100 nm) de cada solución madre para caracterizar el perfil de absorción. El análisis reveló que en el rango de 530 a 730 nm todas las muestras presentaban máximos de absorbancia consistentes, por lo que esta se definió como la región de interés espectral. La longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max}) dentro de este rango se seleccionó como punto de lectura para todas las mediciones subsiguientes.

Las absorbancias de las cuatro concentraciones de cada una de las cinco muestras se midieron por triplicado en el rango establecido, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific BioMate 160 UV-Vis y cubetas de cuarzo con una trayectoria óptica de 1 cm, empleando DMSO como blanco. La curva de calibración se generó mediante un ajuste de regresión lineal simple del promedio de las absorbancias versus la concentración. La linealidad del método se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2). La concentración de pigmento en muestras problema se determinó por interpolación de su absorbancia a λ_{max} en esta curva.

4.2. Cromatografía en Capa Fina (TLC) Analítica y Preparativa

La separación preliminar y el fraccionamiento del pigmento se llevaron a cabo mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC).

4.2.1. Separación Analítica

Se utilizaron placas de silica gel 60 como fase estacionaria. En cada placa se aplicaron 4 µL de la muestra preparada (Sección 3). La separación se realizó en una cámara cromatográfica saturada, utilizando una mezcla de tolueno:acetona (1:1, v/v) como fase móvil. El desarrollo se llevó a cabo a temperatura ambiente hasta que el frente del disolvente alcanzó una distancia de 6 cm

(aproximadamente 20-25 minutos). Las placas desarrolladas se visualizaron bajo luz ultravioleta a 254 nm.

4.2.2. Cromatografía Preparativa (Prep-TLC)

Para obtener fracciones enriquecidas, se aplicó la técnica de TLC preparativa sobre las placas desarrolladas. Las bandas cromatográficas correspondientes al pigmento azul fueron delimitadas y raspadas de la capa de sílice utilizando un bisturí estéril. El material recolectado se transfirió a tubos de centrifugación y el pigmento se eluyó con DMSO. Posteriormente, el eluato se centrifugó y filtró a través de una membrana de 0.45 μm para eliminar las partículas de sílice. Las fracciones purificadas resultantes se utilizaron para los análisis espectrofotométricos y ensayos de actividad antioxidante posteriores.

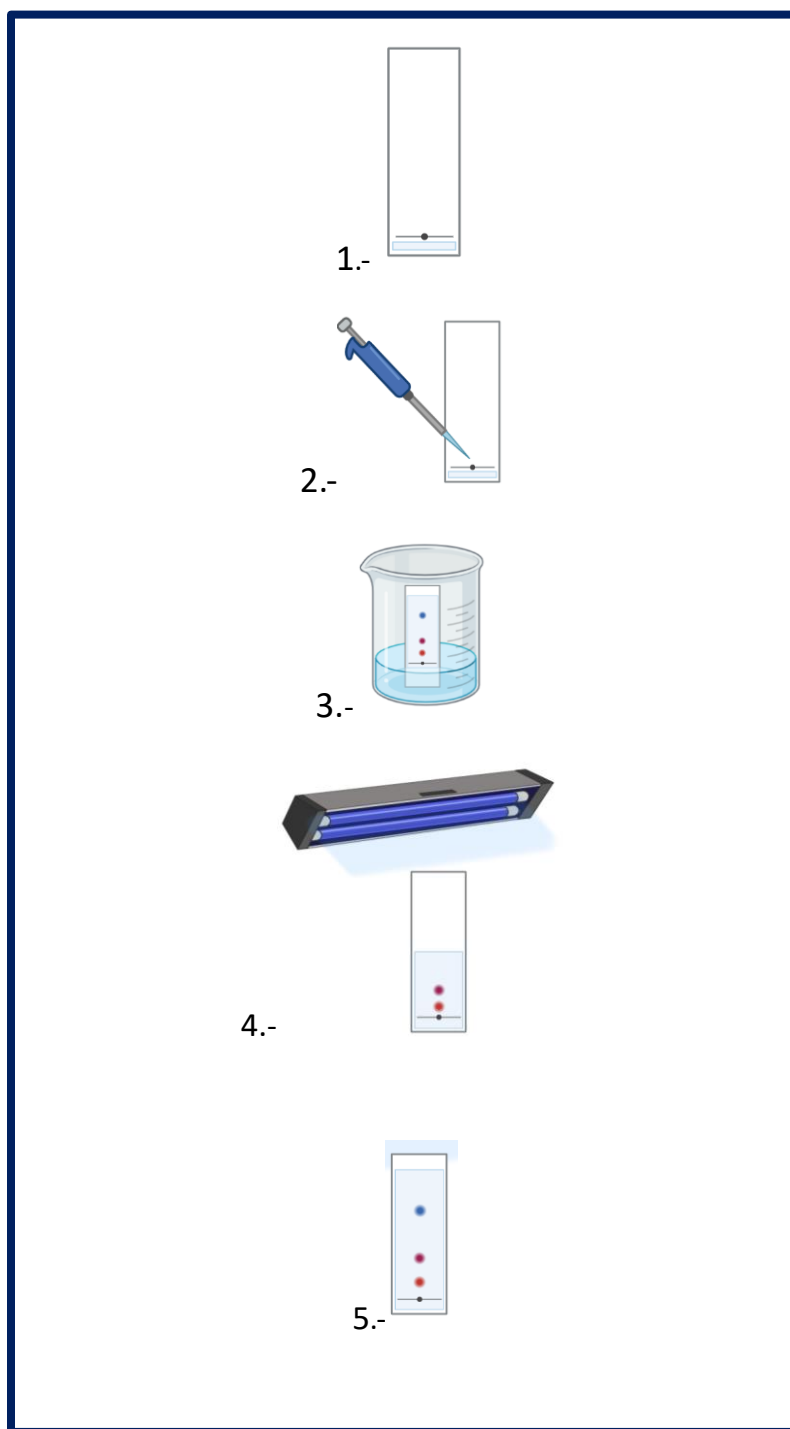


Figure 11 Diagrama esquemático del proceso de cromatografía en capa fina (TLC). 1) Placa de sílica; 2) Aplicación de muestra; 3) Desarrollo en cámara saturada; 4) Visualización bajo luz UV; 5) Identificación de bandas

4.3. Cromatografía en Columna para Purificación

Como etapa complementaria de purificación, se realizó una cromatografía de adsorción en columna con el objetivo de lograr una separación más eficiente de los componentes del extracto crudo y obtener fracciones enriquecidas en el pigmento azul.

4.3.1. *Empaque y Equilibrio de la Columna*

Se utilizó una columna de vidrio de 1 cm de diámetro y 20 cm de longitud, empacada con silica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria. Antes de la aplicación de la muestra, la columna se equilibró con la fase móvil empleada en la cromatografía en capa fina (TLC) —una mezcla de tolueno:acetona (1:1, v/v)— para asegurar una distribución homogénea del solvente y garantizar condiciones cromatográficas estables y reproducibles, como se ilustra en la Figura 12.

4.3.2. *Aplicación de Muestra y Elución*

Una alícuota de 2 mL del extracto crudo se aplicó cuidadosamente sobre la superficie del adsorbente, permitiendo su adsorción completa antes de iniciar la elución. Posteriormente, se procedió con la elución por gravedad, manteniendo un flujo constante y controlado de la fase móvil (tolueno:acetona 1:1, v/v).

4.3.3. *Recolección y Agrupación de Fracciones*

Las fracciones se recolectaron de manera individual en tubos de ensayo, con volúmenes de 2 a 3 mL por fracción. El proceso se guió por los cambios visibles de color en el eluato, los cuales indicaron la presencia y separación de compuestos con distintas propiedades cromatográficas. Aquellas fracciones que exhibieron la coloración azul característica del pigmento de interés fueron identificadas, agrupadas y conservadas para su análisis espectrofotométrico y la posterior evaluación de la actividad antioxidante.

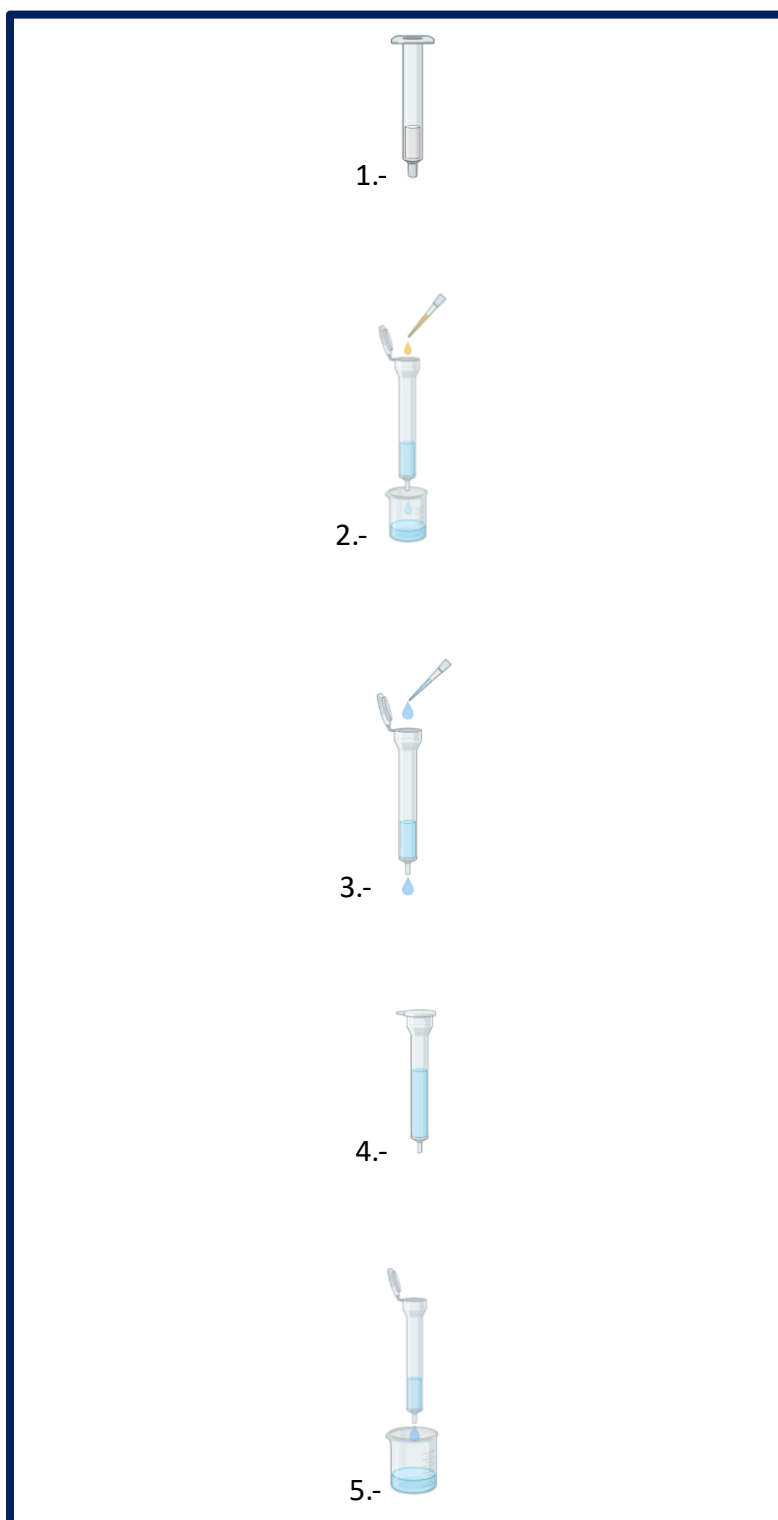


Figure 12 Diagrama esquemático del proceso de cromatografía en columna. 1) Columna cargada con gel de sílice; 2) Aplicación de la muestra; 3) Elución por gravedad; 4) Recolección de fracciones; 5) Identificación de fracciones con coloración azul.

4.4. Análisis Espectrofotométrico de las Fracciones Purificadas

Las fracciones obtenidas mediante cromatografía en capa fina preparativa (Prep-TLC, Sección 4.2.2) y cromatografía en columna (Sección 4.3) fueron analizadas por espectrofotometría UV-Vis con el objetivo de caracterizar su perfil de absorción y evaluar su pureza relativa.

4.4.1. Preparación de Muestras y Condiciones de Medición

Las fracciones procedentes de la cromatografía en columna, eluidas en la mezcla de tolueno:acetona, fueron sometidas a una evaporación suave del solvente orgánico bajo campana de extracción. El residuo se redisolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para garantizar la compatibilidad con el espectrofotómetro. Por su parte, las fracciones provenientes de la Prep-TLC, ya recuperadas en DMSO, se diluyeron según fuera necesario con el mismo solvente para ajustar su absorbancia dentro del rango lineal del instrumento (0.1–1.0). Todos los análisis se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis utilizando cubetas de cuarzo con una trayectoria óptica de 1 cm, registrando los espectros en el rango de 200 a 700 nm.

4.4.2. Caracterización Espectral y Selección de Candidatos

Los espectros de absorción obtenidos mostraron patrones distintivos. La identificación de las longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}) confirmó la presencia del pigmento azul en las fracciones seleccionadas. Además, se observaron bandas características en regiones espectrales asociadas a compuestos fenólicos, lo que sugiere una naturaleza estructural derivada de ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico.

La comparación sistemática de los espectros permitió seleccionar de manera objetiva aquellas fracciones que presentaron la mayor intensidad de absorción en la región del visible (correspondiente al pigmento azul) y la menor interferencia de bandas atribuibles a compuestos secundarios. Estas fracciones, consideradas de la más alta pureza relativa, fueron designadas como los candidatos definitivos para su uso en los subsiguientes estudios de actividad antioxidante y caracterización estructural avanzada. Este análisis no solo verificó la identidad del compuesto de interés, sino que también estableció una base espectroscópica sólida para las investigaciones funcionales posteriores.

5. Evaluación de la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante del pigmento azul purificado se evaluó mediante su capacidad de captación de radicales libres, utilizando los métodos del radical DPPH• y del catión radical ABTS⁺•.

5.1. Ensayo con el Radical DPPH•

La actividad antioxidante se evaluó mediante el ensayo con el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•), el cual se basa en la reducción de este radical (color púrpura) a su forma no radical (incolora o amarilla), cuantificable espectrofotométricamente a 517 nm. El procedimiento siguió la metodología de Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995), con adaptaciones para las propiedades del pigmento.

5.1.1. Preparación de Soluciones y Estándar

Debido a la baja solubilidad del pigmento en solventes polares puros, la solución madre se preparó disolviendo 2.5 mg de pigmento en 1 mL de una mezcla de metanol/dimetilsulfóxido (MeOH/DMSO, 7:3 v/v), obteniendo una concentración de 2.5 mg/mL. A partir de esta solución, se generaron diluciones seriadas en metanol puro para evaluar un rango de concentraciones entre 0.07 y 1.50 mg/mL, manteniendo la concentración final de DMSO por debajo del 10% (v/v) para minimizar interferencias.

No se incluyeron concentraciones superiores a 1.50 mg/mL debido a la intensa coloración intrínseca del pigmento, la cual generó absorbancias ópticas no lineales a 517 nm. Cabe destacar que la concentración de 0.62 mg/mL fue excluida del análisis final, ya que su absorbancia superó la del control, invalidando el cálculo del porcentaje de inhibición.

Como estándar de referencia, se utilizó Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcrómán-2-carboxílico), preparado en la misma mezcla de solventes (MeOH/DMSO, 7:3 v/v), para la construcción de una curva de calibración.

5.1.2. Protocolo y Análisis de Resultados

El porcentaje de inhibición del radical DPPH• se determinó de acuerdo con la fórmula estándar descrita en el Marco Teórico (Sección 6.1).

Aunque se intentó determinar la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) mediante regresión no lineal, no fue posible obtener un valor válido, ya que el pigmento no alcanzó el 50% de inhibición en el rango de concentraciones evaluado. Por lo tanto, la actividad antioxidante se reportó en términos

de Equivalentes Antioxidantes de Trolox (TEAC), lo que permite una comparación relativa de la actividad. Para futuros estudios, se recomienda emplear un blanco de muestra (pigmento sin DPPH•) para una corrección más precisa de la interferencia óptica, como se ilustra en la Figura 13

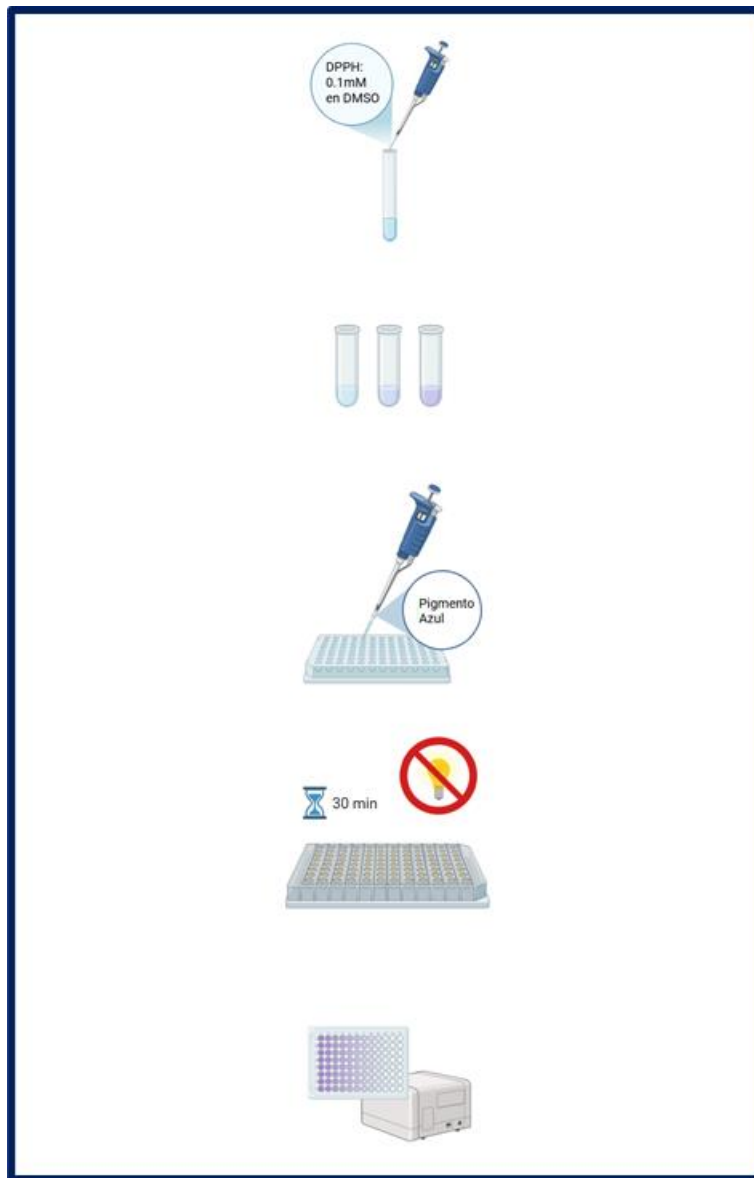


Figure 13 Diagrama de prueba DPPH: 1.- Preparación de la solución de DPPH (1M). 2.-Preparación de muestra en diferentes concentraciones. 3.- Adición de muestra a la solución de DPPH. 4.-Incubación. 5.- Medición de la absorbancia a 517 nm. 6.- Cálculo %

5.2. Ensayo con el Radical ABTS⁺•

La capacidad antioxidante total del pigmento azul se evaluó mediante el ensayo con el radical catiónico ABTS⁺• (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), siguiendo la metodología descrita por Hamed et al. (2019), con adaptaciones para el solvente del pigmento.

5.2.1. Generación del Radical y Preparación de la Solución de Trabajo

El radical ABTS⁺• se generó por oxidación del ABTS con persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Para preparar la solución madre, se mezclaron 7.72 mg de ABTS (8 mM) y 1.62 mg de K₂S₂O₈ (3 mM) en 2 mL de agua destilada. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó durante 12-16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad para garantizar la formación completa del radical, como se muestra en la Figura 14. La solución resultante, de color azul intenso, se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C y se utilizó dentro de las 48-72 horas posteriores.

Previo a cada ensayo, la solución madre de ABTS⁺• se diluyó con una mezcla de metanol:DMSO (7:3, v/v) hasta alcanzar una absorbancia inicial de 0.70 ± 0.02 medida a 734 nm, obteniendo así la solución de trabajo.

5.2.2. Preparación de Muestras y Curva de Calibración

La solución madre del pigmento azul se preparó a una concentración de 2.5 mg/mL en la mezcla metanol:DMSO (7:3, v/v). A partir de esta, se realizaron cinco diluciones seriadas en agua destilada para evaluar la respuesta en función de la concentración.

Como estándar de referencia, se preparó una solución madre de Trolox (10 mM) disolviendo 5.01 mg del compuesto en 2 mL de la mezcla metanol:DMSO (7:3, v/v). A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas en agua destilada para obtener una curva de calibración con concentraciones finales entre 0 y 0.8 mmol/L.

5.2.3. Procedimiento en Microplaca y Cálculos

El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pozos. En cada pozo se adicionaron 15 µL de muestra, estándar (Trolox) o blanco de solvente, seguidos de 285 µL de la solución de trabajo de ABTS⁺•. La placa se agitó suavemente y se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 734 nm utilizando un lector de placas microvolumétrico.

Se incluyeron los siguientes controles para garantizar la precisión de los resultados:

- Blanco de solvente: 15 µL de metanol:DMSO (7:3) + 285 µL de ABTS⁺• diluido.
- Control del radical: 15 µL de agua destilada + 285 µL de ABTS⁺• diluido.

- Blanco de muestra: 15 μ L de muestra + 285 μ L de metanol:DMSO (7:3) sin ABTS⁺•.

La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μ mol TE/g), calculada por interpolación en la curva de calibración del Trolox. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

5.3. Evaluación de la Actividad Antioxidante en Fracciones Cromatográficas

Con el objetivo de correlacionar el grado de purificación con la funcionalidad biológica, las fracciones seleccionadas y enriquecidas en el pigmento azul (obtenidas mediante Prep-TLC y Cromatografía en Columna) fueron sometidas al ensayo con ABTS⁺•. Se aplicaron los mismos protocolos descritos en la sección 5.2, realizando los ajustes de concentración necesarios. Este análisis permitió identificar y seleccionar aquellas fracciones que presentaron la mayor eficacia relativa en la captación de radicales libres, asociando así la actividad antioxidante con el perfil de purificación cromatográfica.

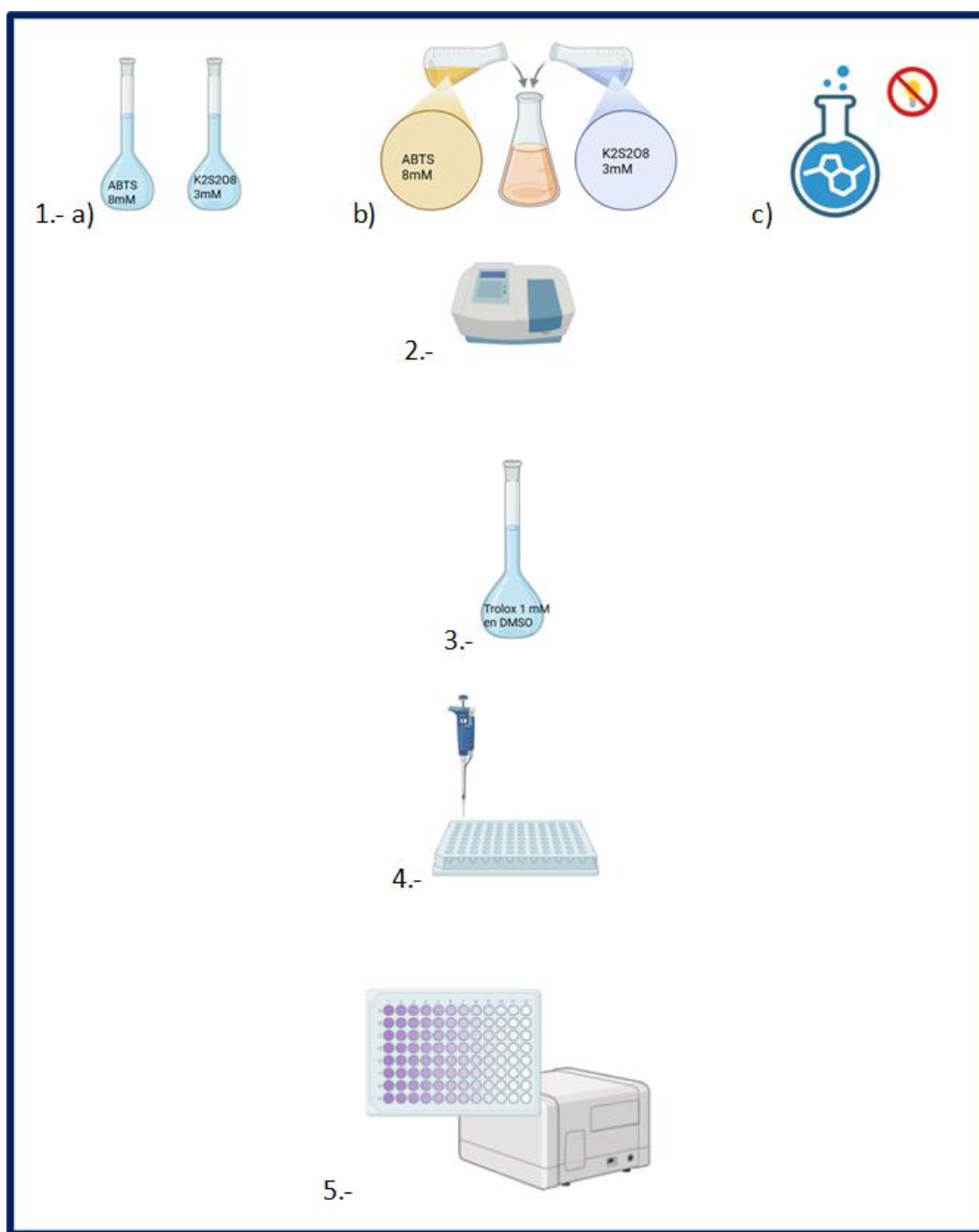


Figure 14 Diagrama ensayo ABTS^{•+} • (1) Preparación de reactivos; (2) Generación del radical ABTS^{•+} •; (3) Preparación de estándar Trolox; (4) Adición de muestras a placa; (5) Lectura de absorbancia a 734 nm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Micropropagación de *Lavandula angustifolia*

El proceso de micropropagación permitió obtener brotes viables, sanos y morfológicamente uniformes de *Lavandula angustifolia* Mill., los cuales constituyeron la fuente de explantes para las etapas posteriores de inducción de callos. Los cultivos mostraron un desarrollo activo de brotes axilares, con ciclos de multiplicación consistentes cada 30 días. La esterilización del medio MS sólido mediante autoclave demostró ser eficaz para mantener la asepsia sin comprometer la integridad de los nutrientes, y los cultivos se desarrollaron libres de contaminación con alta viabilidad tisular, como se confirma en la Figura 15.



Figure 15 Planta de Lavanda Micropropagada en medio MS

El hallazgo más relevante de esta fase fue la capacidad intrínseca de *L. angustifolia* para una micropropagación eficiente en medio MS sin la adición de reguladores de crecimiento exógenos. Este resultado contrasta con lo reportado para otras especies del género, como *L. dentata* y *L. viridis*, donde la suplementación con citoquininas como la benciladenina (BA) en concentraciones cercanas a 8.8 μM resulta necesaria para estimular la multiplicación de brotes (Hernández Amador, 2017; Gonçalves & Romano, 2012). La brotación axilar observada sugiere una alta capacidad inherente en esta especie, posiblemente sustentada por reservas endógenas de fitohormonas o una menor dependencia de las mismas.

Esta característica confiere una ventaja biotecnológica y económica significativa. La eliminación de fitohormonas simplifica drásticamente el protocolo, reduce los costos de producción y minimiza el riesgo de variabilidad genética y alteraciones morfológicas (como hiperhidricidad o somaclonal) asociadas al uso prolongado de reguladores de crecimiento (George et al., 2008). Así,

se establece un sistema de partida óptimo para la producción estandarizada de metabolitos secundarios.

Las condiciones de cultivo implementadas resultaron adecuadas. El fotoperiodo continuo con luz LED blanca ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), aunque potencialmente inductor de estrés en otras especies, ha demostrado ser efectivo en lavandas, lo que se atribuye a una alta eficiencia fotosintética *in vitro* en el género (Zuzarte et al., 2010). Asimismo, el uso de GelRite® como agente solidificante probablemente contribuyó a la calidad del cultivo debido a su mayor transparencia, estabilidad física y menor liberación de compuestos inhibidores en comparación con el agar tradicional (George et al., 2008).

En conjunto, la metodología establecida es robusta, costo-efectiva y proporciona una fuente constante de material vegetal uniforme y libre de patógenos, cumpliendo con los requisitos ideales para el establecimiento de cultivos celulares destinados a la producción de metabolitos secundarios (Andrys et al., 2017; Talić et al., 2023).

1.2. Obtención y Establecimiento de Callos Habitados de *L. angustifolia*

El objetivo de establecer una línea celular con autonomía hormonal fue exitosamente alcanzado. Mediante subcultivos sucesivos cada tres semanas en medio MS sólido sin reguladores de crecimiento exógenos, se logró obtener una línea celular de *Lavandula angustifolia* Mill. con capacidad proliferativa sostenida.

Tras varios ciclos de subcultivo, se observó un incremento progresivo en la proliferación del tejido calloso. Los callos desarrollaron una morfología compacta y homogénea, con una coloración crema-blanquecina característica, como se muestra en la Figura 16. Esta estabilidad en el crecimiento y la consistencia morfológica indican una adaptación fisiológica y metabólica completa al entorno *in vitro* y la consolidación del fenotipo habituado.



Figure 16 Callo de *Lavándula angustifolia* en medio MS sin reguladores de crecimiento tras 12 semanas de cultivo. Se observa tejido compacto, homogéneo y libre de contaminación.

La capacidad de proliferación autónoma observada confirma el establecimiento de una línea celular habituada, un avance fundamental para el enfoque biotecnológico de esta investigación. Este fenómeno sugiere una reorganización interna del metabolismo hormonal, donde las células han desarrollado la capacidad de autorregular sus niveles endógenos de auxinas y citoquininas, posiblemente mediante alteraciones en sus vías de biosíntesis, transporte o señalización (Friml, 2006). El subcultivo repetido en estas condiciones selectivas favorece la proliferación de células con estas adaptaciones, conduciendo a un crecimiento estable y constitutivo (Kreis et al., 2019).

Desde una perspectiva biotecnológica, la habituación presenta ventajas estratégicas decisivas. La eliminación de reguladores de crecimiento exógenos del protocolo simplifica drásticamente el medio de cultivo, reduce costos y elimina una fuente clave de variabilidad experimental. Esta estabilidad inherente es particularmente valiosa para el escalamiento en biorreactores, donde se requiere una cinética de crecimiento predecible.

Es importante destacar que la habituación puede asociarse con la pérdida del potencial morfogénico, como se ha observado en especies como *Digitalis mariana* después de períodos prolongados de cultivo (Kreis et al., 2019). Sin embargo, lejos de ser una limitación, esta característica es altamente deseable para el objetivo específico de esta investigación. Al canalizar su energía metabólica hacia el crecimiento no diferenciado y la biosíntesis de metabolitos secundarios, en lugar de hacia la organogénesis, el tejido calloso habituado se convierte en la materia prima ideal para la producción del pigmento azul.

En conclusión, el éxito en la obtención de esta línea celular estable y autónoma no solo valida la metodología, sino que establece una base robusta y sostenible para las etapas subsiguientes de

cultivo en suspensión e inmovilización, donde se inducirá y aprovechará la producción del metabolito de interés.

1.3. Establecimiento de la Suspensión de Células Habitadas de *L. angustifolia*

El establecimiento de la suspensión celular se realizó exitosamente a partir de callos friables habitados (Sección 1.2), los cuales se transfirieron a medio MS líquido sin reguladores de crecimiento exógenos. El cultivo, mantenido bajo agitación constante (80-100 rpm) y condiciones controladas, mostró una progresiva dispersión de células y agregados, con un crecimiento sostenido y alta viabilidad a lo largo de múltiples subcultivos semanales.

Hallazgo Clave: Producción y Excreción del Pigmento Azul

El resultado más significativo fue la producción y liberación activa de un pigmento azul al medio de cultivo, observable visualmente a partir del tercer subcultivo. El medio de cultivo adquirió una coloración azul intensa (Figura 17), mientras que el análisis microscópico confirmó que el pigmento no se acumulaba de manera significativa en el citoplasma, sino que era excretado directamente al medio extracelular (Figura 18). Esta excreción activa representa una ventaja bioprocesal crucial, ya que facilita la recuperación del compuesto mediante una simple filtración, evitando así steps destructivos como la lisis celular y favoreciendo la escalabilidad industrial del proceso (Kreis et al., 2019).



Figure 17 Cultivo en suspensión de células de *Lavandula angustifolia* tras 14 días de incubación. Se observa la coloración azul intensa del medio, producto de la excreción del pigmento por las células

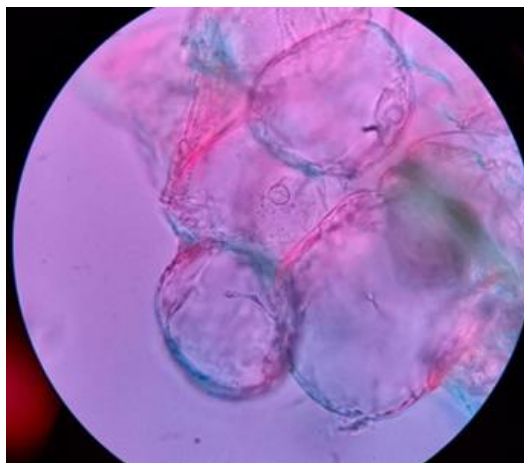


Figure 18 Microfotografía de células en suspensión de *Lavandula angustifolia* bajo microscopio óptico (×40). Se aprecian agregados celulares y acumulación intracelular del pigmento azul

El establecimiento exitoso de la suspensión en condiciones libres de hormonas confirma la estabilidad del fenotipo habituado en *L. angustifolia* y su adaptación al cultivo líquido. Este comportamiento sugiere una reconfiguración profunda del metabolismo hormonal endógeno (Friml, 2006), que no solo asegura la proliferación autónoma, sino que parece redirigir el flujo metabólico.

La producción del pigmento azul bajo estas condiciones constituye un hallazgo de gran relevancia. La evidencia científica disponible sugiere que se trata de un complejo metálico formado entre derivados fenólicos (posiblemente ésteres enólicos del ácido cafeico) y los iones Fe^{2+} presentes en el medio de cultivo (Banthorpe et al., 1985; López-Arnaldos et al., 1995). La ausencia de auxinas exógenas podría actuar como un factor de estrés fisiológico que promueve la activación de la ruta fenilpropanoide, canalizando precursores hacia la biosíntesis de estos compuestos fenólicos en lugar de destinarlos exclusivamente al crecimiento y la división celular (Benjamins & Scheres, 2008). Este "reperfilamiento metabólico" es la justificación fundamental para emplear líneas habituadas en la producción de metabolitos secundarios.

Si bien la producción de pigmentos azules ha sido documentada en otras especies del género, como *L. vera* y *L. spica* (Watanabe et al., 1985; Trejo-Tapia et al., 2003), este trabajo representa el primer reporte en México de la producción y excreción de este compuesto en suspensiones celulares de *L. angustifolia* establecidas sin la adición de reguladores de crecimiento. Este sistema de "biofábrica" celular, viable y autosuficiente, posiciona a *L. angustifolia* como una fuente prometedora y sostenible de colorantes naturales de alto valor añadido con potencial aplicación en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria.

2.- Inmovilización celular

El objetivo de la inmovilización era prolongar la productividad del pigmento azul. Los resultados demuestran que, si bien se logró una alta supervivencia celular en ambos sistemas, estos fueron ineficaces para inducir la síntesis del pigmento en las condiciones experimentales empleadas.

2.1. Inmovilización en Espuma de Poliuretano

Las células de *L. angustifolia* mostraron una excelente capacidad de adhesión e infiltración en la matriz de poliuretano en un lapso de 24 horas (Figura 19). La viabilidad celular, evaluada mediante la tinción con FDA, se mantuvo notablemente alta, con valores superiores al 80% después de cuatro semanas de cultivo (Figura 20), lo que confirma la biocompatibilidad del soporte. Sin embargo, a pesar de la alta viabilidad, no se observó la producción ni liberación del pigmento azul característico.

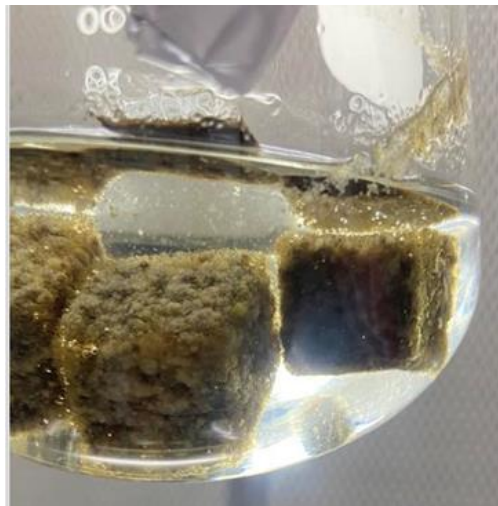


Figure 19 Células de *Lavandula angustifolia* en soporte de poliuretano

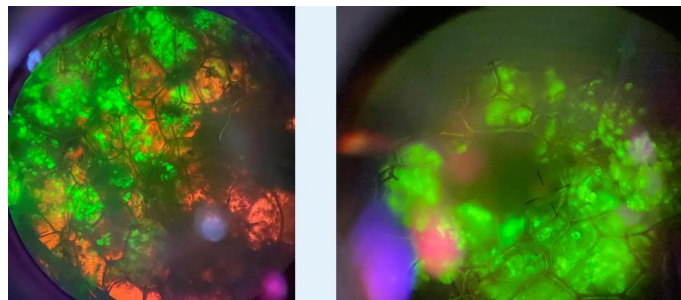


Figure 20 Microfotografías de células adheridas al soporte de poliuretano bajo microscopio de fluorescencia

2.2. Encapsulación en Alginato de Calcio

De manera similar, las células encapsuladas en perlas de alginato de calcio mostraron un crecimiento adecuado y una proliferación sostenida dentro de la matriz (Figura 21), con una viabilidad que también se mantuvo por encima del 80% durante el periodo de cultivo (Figura 22). No obstante, tampoco se detectó la síntesis del pigmento azul. Este resultado contrasta con reportes previos en especies relacionadas, como *Lavandula vera*, donde la inmovilización sí ha permitido la producción de este metabolito (Nakajima et al., 1990).



Figure 21 Perlas de alginato con células de *Lavandula angustifolia* tras 14 días de cultivo

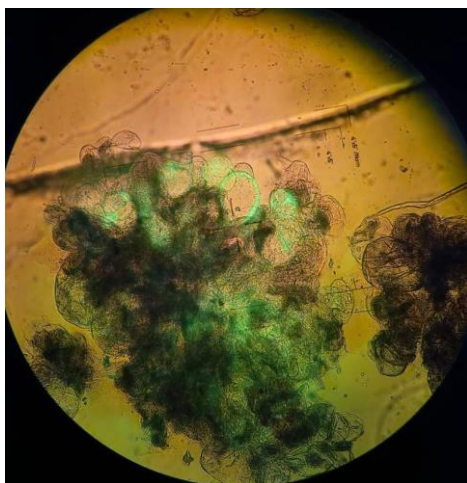


Figure 22 Microfotografía de células encapsuladas en alginato bajo microscopio de fluorescencia.

La ausencia de síntesis de pigmento en ambos sistemas, a pesar de la alta viabilidad celular, es el hallazgo más crítico de esta sección. Esto demuestra que la inmovilización *per se* no garantiza la producción, y que la activación de la vía biosintética es altamente sensible a factores ambientales y de inducción específicos. El resultado puede atribuirse a una combinación de factores, priorizados a continuación:

1. Omisión del Inductor L-Cisteína

La explicación más sólida es la ausencia de L-cisteína en el medio de cultivo. Estudios pioneros en *Lavandula vera* han demostrado que este aminoácido azufrado es indispensable para activar la ruta biosintética en células inmovilizadas (Nakajima et al., 1986; 1990). En su ausencia, las células acumulan un precursor que no se transforma en el pigmento azul. La L-cisteína actúa probablemente como un modulador redox y un posible precursor estructural.

2. Limitación de la Intensidad Lumínica (Factor Universal)

La formación del pigmento a partir de su precursor es un proceso fotoquímico (Sonomoto et al., 1990; Arnaldos et al., 2006). La intensidad lumínica utilizada ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) es significativamente inferior a la empleada en reportes exitosos ($\approx 450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), lo que pudo haber limitado la penetración de la luz en el interior de las matrices e inhibido la activación de enzimas fotosensibles clave.

3. Secuestro de Fe^{2+} por la Matriz de Alginato (Factor Específico)

En el sistema de alginato, un factor adicional fue la potencial quelación de los iones Fe^{2+} por la matriz polimérica (Nakajima et al., 1989). Dado que el pigmento azul es un complejo metálico que requiere Fe^{2+} , es altamente probable que el alginato haya atrapado el hierro disponible, impidiendo la reacción final de coloración con los precursores fenólicos, incluso si estos fueron producidos.

4. Estrés Fisiológico Insuficiente y Restricción de la Difusión

La biosíntesis de metabolitos secundarios es a menudo una respuesta al estrés. La protección celular conferida por la matriz y el uso de un medio MS completo (rico en nutrientes) pudieron haber favorecido el crecimiento primario sobre la producción del metabolito secundario (Nakajima et al., 1989). Adicionalmente, la matriz polimérica pudo restringir la difusión de precursores y iones metálicos, impidiendo su encuentro en el medio extracelular.

En conclusión, el sistema de inmovilización no cumplió el objetivo de mantener la productividad del pigmento. Sin embargo, este estudio aporta un diagnóstico claro y un mapa de ruta para la optimización futura, señalando la necesidad crítica de incorporar inductores químicos como la L-cisteína, aumentar la intensidad lumínica y considerar matrices con menor afinidad por iones metálicos esenciales.

3. Preparación y Purificación del Pigmento Azul

3.1. Caracterización Visual del Pigmento Purificado

El proceso de purificación, que incluyó filtración, concentración, diálisis y liofilización, culminó con la obtención de un polvo sólido de color azul intenso, homogéneo y libre de partículas visibles (Figura 23). Este aspecto sugiere una alta pureza relativa y confirma la eficiencia del protocolo para eliminar sales, solventes y biomasa residual. El producto demostró una buena estabilidad, manteniendo sus características físicas sin cambios apreciables durante más de seis meses de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figure 23 Aspecto físico del pigmento azul purificado de *Lavandula angustifolia* tras liofilización.

3.2. Evaluación de la Eficacia de la Diálisis mediante HPLC

Para verificar la eficacia de la diálisis en la eliminación de azúcares residuales del medio de cultivo —potenciales interferentes en los ensayos antioxidantes— se realizó un análisis cuantitativo por HPLC. Se utilizaron curvas de calibración con estándares comerciales, obteniendo ecuaciones de regresión lineal con coeficientes de determinación (R^2) de 0.999 para fructanos, glucosa y fructosa.

El análisis del extracto no dializado (Figura 24) confirmó la presencia significativa de estos carbohidratos. Tras la diálisis, se observó una reducción drástica en las concentraciones de todos los azúcares, como se resume en la Tabla 5 y se evidencia en el cromatograma de la Figura 25.

Tabla 5 Eficiencia de la diálisis en la eliminación de azúcares residuales del extracto de pigmento.

Azúcar	Concentración Inicial (mg/mL)	Concentración Residual (mg/mL)	Eliminación (%)
Glucosa	0.1027	0.0012	98.8
Fructosa	0.1595	0.0520	67.4
Fructanos	0.1388	0.0872	37.2

La diálisis con una membrana de 3-10 kDa demostró una eficacia diferencial. La eliminación casi total de glucosa (98.8%) y la reducción significativa de fructosa (67.4%) fueron cruciales, ya que estos monosacáridos pueden actuar como agentes reductores y generar falsos positivos en los ensayos de actividad antioxidante. Su remoción permite atribuir con mayor confianza los resultados posteriores al pigmento azul en sí.

La menor eficiencia observada en la eliminación de fructanos (37.2%) sugiere que una fracción de estos polisacáridos posee un tamaño molecular cercano al límite superior de corte de la membrana (10 kDa), o bien, que existen interacciones físico-químicas con la matriz de diálisis o con el propio pigmento que limitaron su difusión.

En conjunto, estos resultados validan el protocolo de purificación, confirmando que el extracto dializado es analíticamente apto para las pruebas funcionales, al haber eliminado eficientemente los principales contaminantes solubles de bajo peso molecular derivados del medio de cultivo.

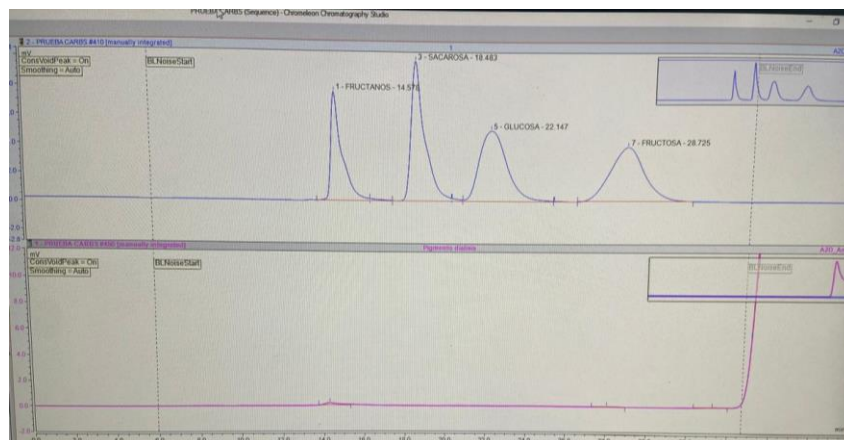


Figure 24 Cromatograma HPLC del pigmento no dializado. Se observan picos prominentes de fructanos, sacarosa, glucosa y fructosa, coincidentes con los estándares

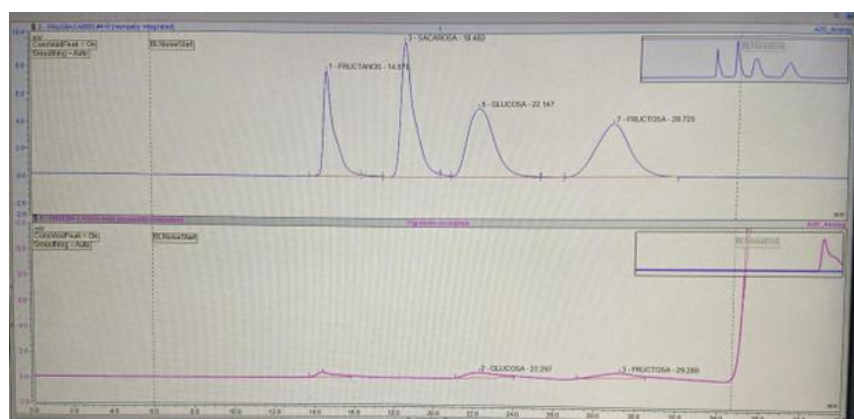


Figure 25 Cromatograma HPLC del pigmento dializado. Se observa una reducción drástica en los picos de azúcares, indicativa de una eficiente eliminación por diálisis.

4. Cuantificación y Separación del Pigmento

4.1. Análisis Espectral del Pigmento Azul (190–1100 nm)

Se realizó un barrido espectral completo (190–1100 nm) de cinco muestras independientes del pigmento azul extraído de células habituadas de *Lavandula angustifolia* Mill. con el objetivo de caracterizar su perfil de absorción y seleccionar la longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max}) para su cuantificación. La variabilidad en la intensidad del color entre las soluciones madre es evidente en la Figura 26.

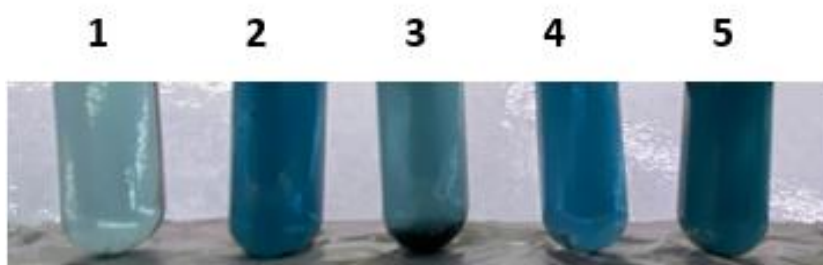


Figure 26 Fotografía de las cinco soluciones madre del pigmento azul en DMSO. Se observa variabilidad en intensidad de color entre muestras

Los espectros obtenidos revelaron un patrón característico con bandas de absorción principales en las regiones ultravioleta (UV) y visible (**Figura 27**). En el rango visible (530–730 nm), asociado a la coloración azul, se identificaron máximos de absorbancia consistentes, lo que permitió definir este intervalo como de interés para la detección específica y reproducible del pigmento.

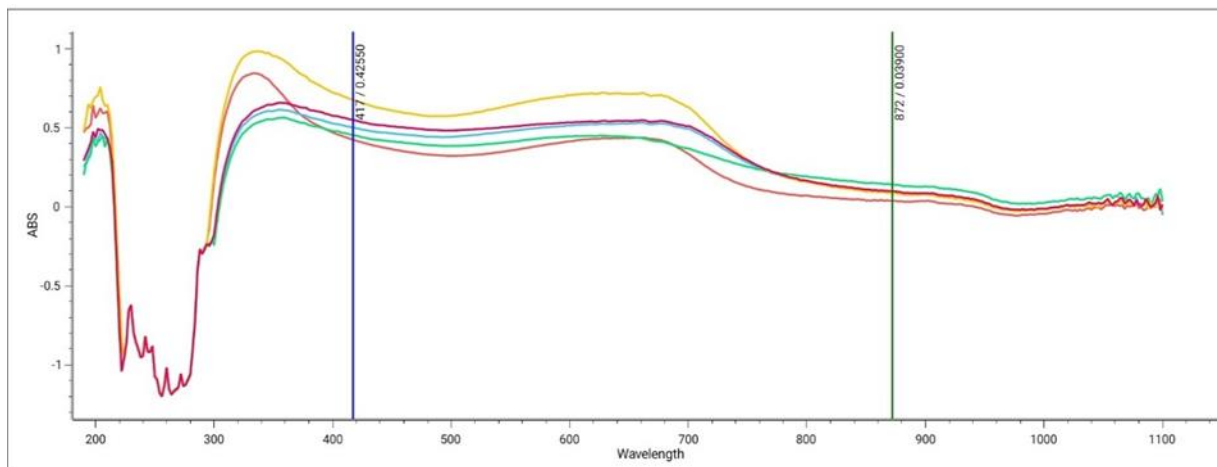


Figure 27 Espectros de absorción de las cinco muestras madre del pigmento azul en DMSO (190–1100 nm). Las líneas de colores corresponden a cada muestra: Muestra 1 (rojo), Muestra 2 (azul), Muestra 3 (verde), Muestra 4 (amarillo), Muestra 5 (rosa).. El pico principal en el rango visible se localiza alrededor de 660 nm.

Sin embargo, se observó variabilidad intermuestral en la posición exacta del λ_{max} dentro de este rango:

- Muestra 1: 654 nm
- Muestra 2: 654 nm
- Muestra 3: 666 nm
- Muestra 4: 654 nm
- Muestra 5: 654 nm

Esta variabilidad sugiere la presencia de diferentes formas moleculares del pigmento, posiblemente debido a distintos grados de glicosilación, metilación o estados de oxidación, fenómenos documentados en flavonoides y otros pigmentos fenólicos (Zagoskina et al., 2023; Munteanu & Apetrei, 2021). Estas modificaciones estructurales pueden ser inducidas por las condiciones específicas del cultivo celular, influyendo directamente en la estabilidad y las propiedades espectrales del pigmento.

En la región UV, el análisis se enfocó en el rango de 280 a 750 nm debido a interferencias del disolvente (DMSO) por debajo de 280 nm. Todos los espectros mostraron:

- Un pico bien definido a approximately 285 nm, característico de estructuras aromáticas en compuestos fenólicos como ácidos hidroxicinámicos y flavonoides
- Un hombro o pico secundario entre 330-350 nm, consistente con grupos fenólicos sustituidos o flavonoides con anillos conjugados

Este perfil espectral refuerza la naturaleza polifenólica del pigmento y es coherente con la composición fitoquímica reportada para el género *Lavandula*.

Dada la ausencia de un λ_{max} único común a todas las muestras, se seleccionó **660 nm** como longitud de onda de referencia para las mediciones cuantitativas posteriores. Esta decisión representa un compromiso óptimo dentro del rango de máximos observados (654-666 nm), garantizando sensibilidad y reproducibilidad analítica.

4.1.2. Construcción de la Curva de Calibración y Cuantificación del Pigmento

Para la cuantificación del pigmento azul, se construyó una curva de calibración midiendo las absorbancias a 660 nm. A partir de cinco muestras independientes, se prepararon cuatro soluciones de concentración conocida por cada una: solución madre (2,500 $\mu\text{g/mL}$) y tres diluciones seriadas (1,250, 625 y 312.5 $\mu\text{g/mL}$). Los espectros de absorción mostraron el pico máximo alrededor de 660 nm (Figura 28). Las mediciones por triplicado se realizaron en un

espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific BioMate 160, calculándose los valores promedio de absorbancia para cada concentración (**Tabla 5**).

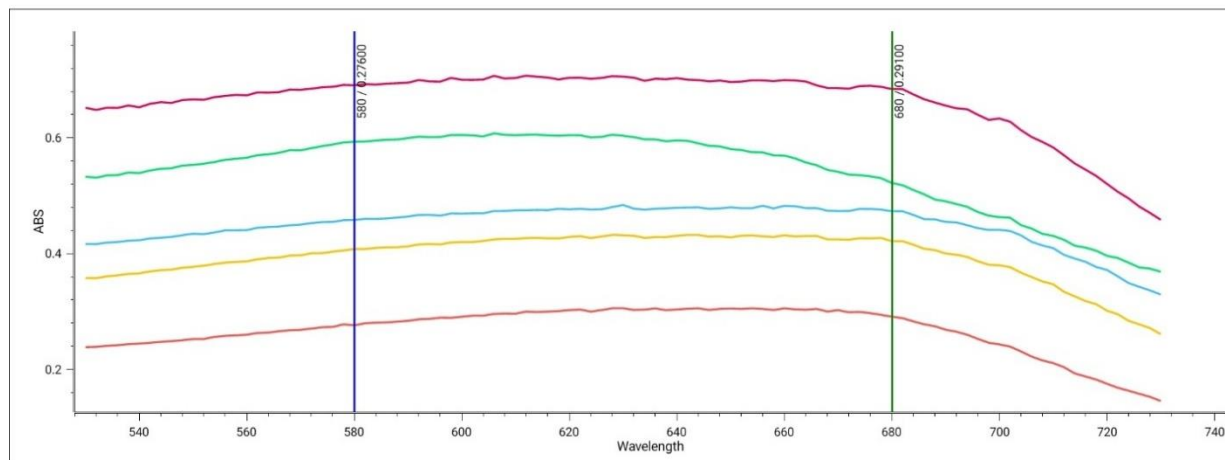


Figure 28 Espectros de absorción en el rango de 540 a 740 nm para las cinco muestras patrón. Se observa el pico máximo alrededor de 660 nm

Tabla 6 Valores de concentración y absorbancia promedio a 660 nm para la curva de calibración.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia Promedio
312.5	0.12275
625.0	0.19996
1,250.0	0.33393
2,500.0	0.45804

El ajuste por regresión lineal (Figura 29) generó la ecuación de calibración:
 $A = 0.000168 \cdot C + 0.0185$

donde A es la absorbancia a 660 nm y C la concentración en µg/mL, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9987 que valida la excelente linealidad del método en el rango evaluado.

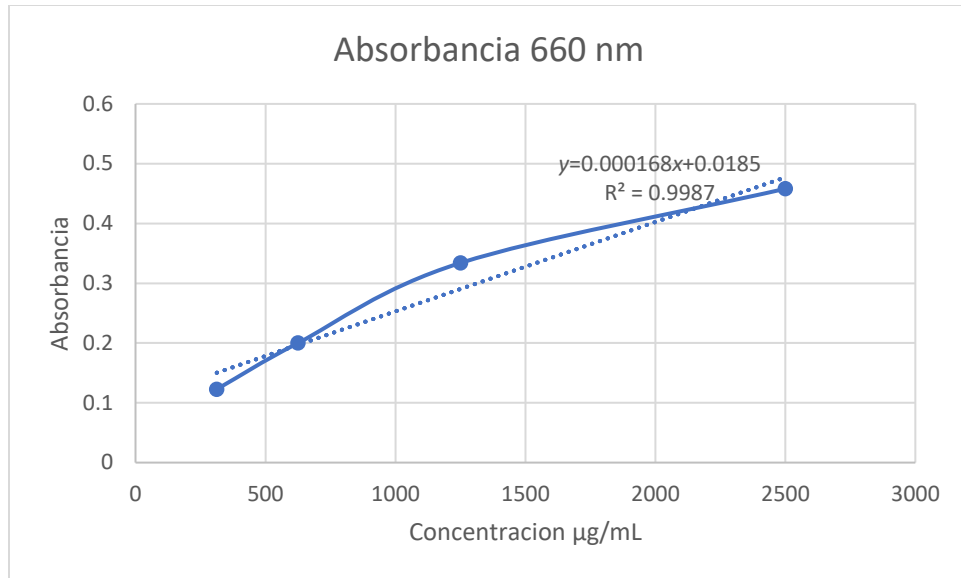


Figure 29 Curva de calibración del pigmento azul. Relación entre absorbancia a 660 nm y concentración (µg/mL). La línea sólida representa los datos experimentales; la línea punteada corresponde a la regresión lineal

4.1.3. Cuantificación en Lotes de Cultivo

La concentración real del pigmento en cinco lotes de cultivo se determinó por interpolación en la curva de calibración. Los resultados (Tabla 6) mostraron un rendimiento promedio de 71.1 ± 22.1 mg de pigmento por litro de medio de cultivo, con una variabilidad interlotes del 30.9%. El Lote 5 presentó el mayor rendimiento (101.2 mg/L) y el Lote 1 el menor (42.6 mg/L). Esta variabilidad puede atribuirse a diferencias en la fase de crecimiento celular, condiciones microambientales o variaciones en el proceso de extracción.

Tabla 7 Cuantificación del pigmento azul en lotes de cultivo de *L. angustifolia*

Muestra	Absorbancia (660 nm)	Conc. Calculada (µg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Rendimiento (mg/L)
1	0.30508	1703.45	1.70	42.6
2	0.48220	2754.17	2.75	68.9
3	0.56899	3271.37	3.27	81.8

Muestra	Absorbancia (660 nm)	Conc. Calculada ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Real (mg/mL)	Rendimiento (mg/L)
4	0.43143	2451.96	2.45	61.3
5	0.69935	4046.73	4.05	101.2
Promedio	0.49743	2845.54	2.85	71.1
D.E.	± 0.15604	± 883.52	± 0.88	± 22.1

4.2. Separación del Pigmento Azul mediante Cromatografía en Capa Fina Preparativa (Prep-TLC)

La separación por Prep-TLC reveló la presencia de cuatro fracciones bien definidas (Figura 30), confirmando que el pigmento azul extraído de células habituadas de *Lavandula angustifolia* Mill. no corresponde a un compuesto único, sino a una mezcla de metabolitos con distintas propiedades cromatográficas.



Figure 30 Fracciones recogidas en tubos de ensayo: fracción 1 (azul claro), fracción 2 (azul oscuro), fracción 3 (amarilla), fracción 4 (amarilla intensa).

Las fracciones identificadas fueron:

- **Fracción 1 (F1):** Azul claro ($R_f = 0.28$)
- **Fracción 2 (F2):** Azul oscuro ($R_f = 0.44$)
- **Fracción 3 (F3):** Amarilla ($R_f = 0.60$)
- **Fracción 4 (F4):** Amarilla intensa ($R_f = 0.68$)

El perfil cromatográfico obtenido (Figura 31) sugiere una naturaleza química compleja, consistente con una mezcla de metabolitos fenólicos como flavonoides o antocianinas con diferentes grados de sustitución (Zagoskina et al., 2023; Dias et al., 2021). La baja movilidad de F1 ($R_f = 0.28$) indica mayor polaridad, posiblemente debido a grupos hidroxilo o carboxilo característicos de flavonoides glicosilados, mientras que la mayor movilidad de F4 ($R_f = 0.68$) sugiere compuestos menos polares, como flavonoides metilados o acilados (Zagoskina et al., 2023; Tsimogiannis et al., 2019).

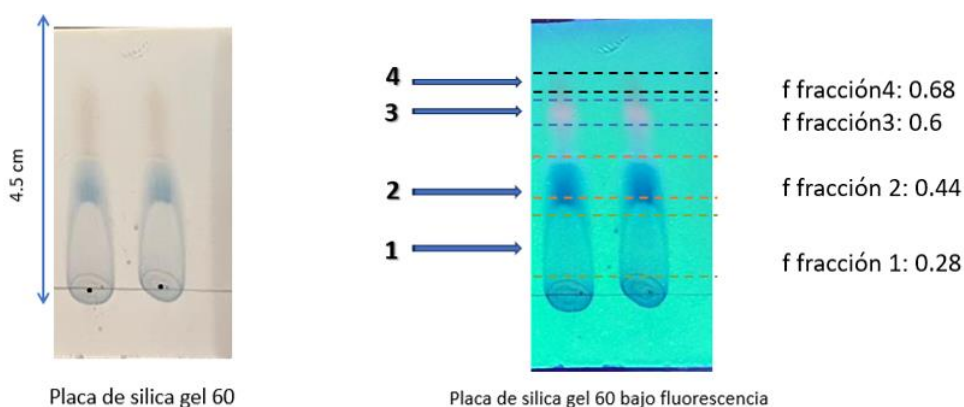


Figure 31 Separación por cromatografía en capa fina (TLC) de extractos celulares en placa de sílica gel 60, visualizada en luz visible y bajo fluorescencia UV. Se indican las fracciones separadas con sus respectivos valores de R_f (factor de retención).

La fluorescencia observada bajo luz UV (365 nm) refuerza la naturaleza flavonoide de las fracciones, propiedad relacionada con su capacidad de absorción de radiación UV y función protectora en condiciones de estrés (Zagoskina et al., 2023; Šamec et al., 2021).

Las fracciones F1 y F2, por su coloración azul característica y presencia de sistemas cromóforos conjugados capaces de absorber en el rango de 600-700 nm, fueron seleccionadas para análisis espectrofotométrico y evaluación de actividad antioxidante posterior (Khoo et al., 2017; Munteanu & Apetrei, 2021).

Esta separación exitosa, aunque preliminar, permitió la purificación parcial de los componentes y sienta las bases para estudios estructurales más avanzados mediante técnicas como HPLC-MS o RMN, necesarias para la identificación precisa de los compuestos.

4.2.1. Análisis Espectrofotométrico de las Fracciones Purificadas

El análisis espectrofotométrico UV-Vis (200-700 nm) de las fracciones purificadas por Prep-TLC reveló perfiles de absorción distintivos que reflejan diferencias estructurales entre los componentes (Figura 32).

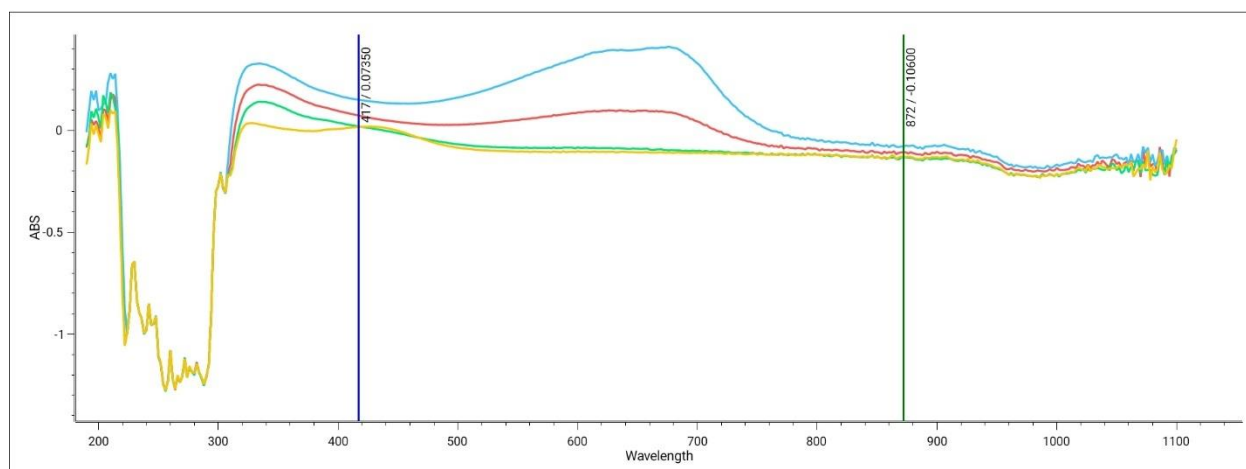


Figure 32 Espectros de absorción de las fracciones purificadas: F1 (línea roja), F2 (línea azul), F3 (línea verde), F4 (línea amarilla) en el rango de 190 a 1100 nm.

La **fracción F2 (azul oscuro)** mostró el perfil más definido, con un λ_{max} a 670 nm (visible) y una banda secundaria a 310 nm (UV), característico de compuestos fenólicos altamente conjugados como derivados del ácido rosmarínico o dímeros de ácido cafeico (Zagoskina et al., 2023). La alta intensidad de absorción sugiere una estructura estable y concentración elevada, indicando su potencial como principal responsable de la coloración azul y de la actividad antioxidante.

La **fracción F1 (azul claro)** presentó un perfil similar ($\lambda_{\text{max}} = 663$ nm) pero con menor intensidad, posiblemente debido a menor concentración, presencia de impurezas o modificaciones estructurales como glicosilación que afectan la eficiencia de absorción (Dias et al., 2021).

Las **fracciones F3 y F4 (amarillas)** mostraron absorción únicamente en la región UV ($\lambda_{\text{max}} \approx 310$ nm), consistente con flavonoides monoméricos o ácidos hidroxicinámicos de baja conjugación, como quercetina, luteolina o ácido cafeico (Tsimogiannis et al., 2019). La ausencia de absorción en el visible explica su coloración amarilla.

La **fracción F2** fue identificada como la de mayor pureza relativa y potencial funcional, siendo seleccionada para los ensayos de actividad antioxidante posteriores. Su sistema cromóforo extensamente conjugado sugiere una alta capacidad de donación de electrones, característica deseable en compuestos antioxidantes (Munteanu & Apetrei, 2021).

4.3. Cromatografía en Columna: Separación del Pigmento Azul

La purificación del pigmento azul se realizó mediante cromatografía en columna de silica gel 60, utilizando tolueno:acetona (1:1, v/v) como fase móvil. Durante la elución se identificaron tres fracciones principales (Figura 33):

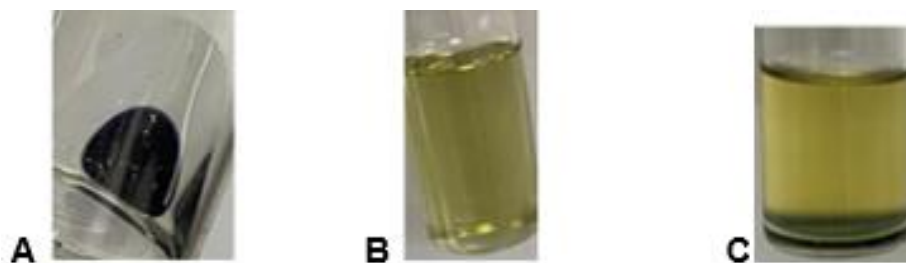


Figure 33 Separación del pigmento azul mediante cromatografía en columna. (A) Fracción 1: compuesto aceitoso incoloro (0.047 g). (B) Fracción 2: compuesto amarillo soluble (8 mL). (C) Fracción 3: compuesto aceitoso que aparece tras la evaporación

- Fracción 1: Compuesto aceitoso incoloro (0.047 g) de baja solubilidad, probablemente terpenoides lipofílicos como linalool o borneol, comunes en *Lavandula* (Tungmunthum et al., 2018).
- Fracción 2: Compuesto amarillo intenso y soluble (8 mL), consistente con flavonoides como luteolina o quercetina, reportados en Lamiaceae (Zagoskina et al., 2023).
- Fracción 3: Compuesto aceitoso que emergió durante la evaporación del solvente, sugiriendo una transformación química (oxidación, isomerización) inducida por las condiciones de procesamiento (Munteanu & Apetrei, 2021).

La aparición de la Fracción 3 resalta la sensibilidad del material biológico a las condiciones de manipulación. Muchos polifenoles son termolábiles y fotosensibles, requiriendo control riguroso de temperatura, pH y exposición al oxígeno durante la concentración y almacenamiento (Šamec et al., 2021).

Estos resultados confirman la naturaleza compleja del extracto, compuesto por múltiples metabolitos secundarios con distintas propiedades físico-químicas. Para futuros estudios de identificación estructural, se recomienda complementar con técnicas de mayor resolución como HPLC-MS o cromatografía de fase reversa (Câmara et al., 2021).

4.3.1. Análisis Espectrofotométrico de las Fracciones Obtenidas por Cromatografía en Columna

El análisis espectrofotométrico UV-Vis (200-700 nm) de las fracciones purificadas por cromatografía en columna reveló perfiles distintivos que confirman la naturaleza química de cada componente (Figura 34).

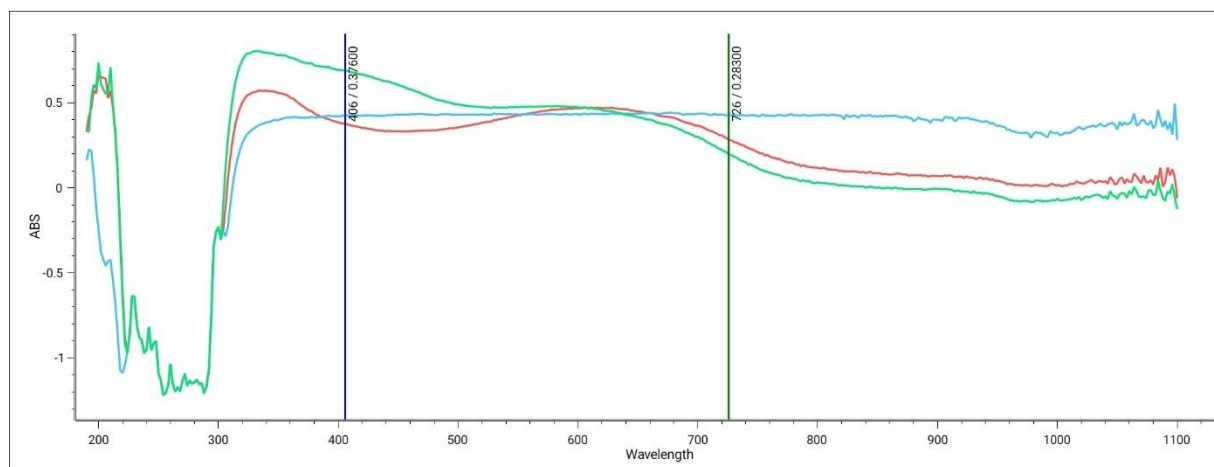


Figure 34 Espectros de absorción UV-Vis de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Fracción F1 (azul): Mostró un λ_{max} a 670 nm (visible) y una banda secundaria a 310 nm (UV), perfil característico de compuestos fenólicos altamente conjugados como dímeros del ácido cafeico o derivados del ácido rosmarínico (Zagoskina et al., 2023). Esta fracción es la principal responsable de la coloración azul del pigmento.

- Fracción F2 (amarilla): Presentó un λ_{max} a 406 nm, típico de flavonoides monoméricos como luteolina o quercetina, sin absorción significativa por encima de 500 nm (Dias et al., 2021).
- Fracción F3 (verdosa): Exhibió alta absorbancia en UV (0.78 a 400 nm) sin máximo definido en el visible, consistente con un producto de degradación como quinonas o compuestos polimerizados formados durante la evaporación del solvente (Arfaoui, 2021).

La aparición de F3 evidencia la sensibilidad de estos compuestos a las condiciones de procesamiento, destacando la necesidad de emplear atmósferas inertes y control estricto de temperatura en futuras purificaciones para preservar la integridad química de los metabolitos (Šamec et al., 2021).

4.4. Comparación Espectral de las Fracciones Azules Purificadas

El análisis comparativo de las fracciones azules purificadas por Prep-TLC y cromatografía en columna reveló diferencias significativas en sus perfiles espectrales (Figura 35).

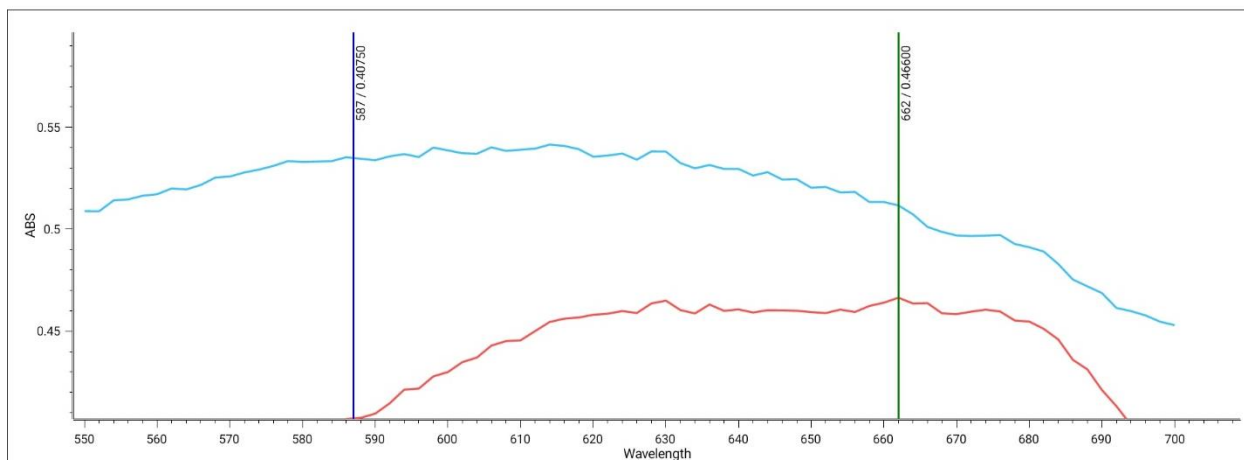


Figure 35 Espectros de absorción UV-Vis comparativos de las fracciones azules purificadas

- Fracción Prep-TLC: $\lambda_{\text{max}} = 663 \text{ nm}$, con banda amplia y bien definida
- Fracción Columna: $\lambda_{\text{max}} = 588 \text{ nm}$, con banda más estrecha y mayor absorbancia

La diferencia de 75 nm en la posición del máximo de absorción representa un desplazamiento hipsocrómico significativo, indicando una alteración estructural del sistema cromóforo. Este fenómeno sugiere que el método de purificación más prolongado (cromatografía en columna) indujo modificaciones químicas como oxidación, isomerización o polimerización del pigmento (Arfaoui, 2021; Šamec et al., 2021).

El método rápido de Prep-TLC, con menor exposición a solventes, oxígeno y temperatura, logró preservar mejor la estructura nativa del compuesto. En contraste, las condiciones más extensas de la cromatografía en columna promovieron transformaciones que redujeron el sistema conjugado, desplazando la absorción hacia longitudes de onda más cortas (Munteanu & Apetrei, 2021).

Este hallazgo subraya la labilidad química del pigmento y la necesidad de optimizar protocolos de purificación mediante el uso de atmósferas inertes, bajas temperaturas y tiempos de procesamiento reducidos para preservar su integridad estructural y, consecuentemente, su potencial actividad funcional.

5. Actividad antioxidante

5.1 Ensayo DPPH•

El pigmento azul obtenido de células habituadas inmovilizadas de *Lavandula angustifolia* Mill. mostró una actividad antioxidante moderada en el ensayo DPPH•, con una inhibición máxima del 25,30% a 1,50 mg/mL. Esta respuesta no alcanzó el 50% de inhibición en el rango de concentraciones evaluado (0,07–1,50 mg/mL), lo que impidió el cálculo de un IC₅₀.

La estimación del IC₅₀ para el estándar Trolox se realizó mediante interpolación lineal entre los puntos adyacentes al 50% de inhibición (0,3125 mM → 53,17%; 0,625 mM → 48,35%), obteniéndose un valor de 0,518 mmol/L. Este resultado se utilizó como referencia para la comparación con el pigmento.

Tabla 8 Actividad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox (TEAC).

Sustancia	Concentración	% Inhibición	TEAC
Trolox	0,625 mM	48,35	1,00
Pigmento azul	0,07 mg/mL	17,26	0,357
Pigmento azul	0,15 mg/mL	9,52	0,197
Pigmento azul	0,30 mg/mL	22,32	0,462
Pigmento azul	1,50 mg/mL	25,30	0,523

TEAC = (% inhibición de la muestra)/(% inhibición de Trolox a 0,625 mM)

Se observó interferencia óptica a 0,62 mg/mL debido a la intensa coloración del pigmento, lo que invalidó la medición a esta concentración. Este fenómeno es común en ensayos con compuestos altamente pigmentados (Andrys et al., 2017).

El valor de TEAC máximo (0,523) indica que el pigmento posee el 52,3% de la actividad antioxidante del Trolox bajo estas condiciones. Esta actividad moderada puede atribuirse a su naturaleza polifenólica —posiblemente derivada de ácido rosmarínico o dímeros de ácido cafeico—, aunque su baja solubilidad en el medio metanol/DMSO (7:3) y su estructura molecular podrían limitar su eficiencia en este sistema.

Cabe destacar que la actividad antioxidante en *L. angustifolia* varía según el tipo de muestra y las condiciones de cultivo (Talić et al., 2023). Estudios previos con extractos etanólicos o acuosos reportan inhibiciones superiores (hasta 78,5%), mientras que el perfil metabólico del pigmento obtenido in vitro —influenciado por la habituación celular, la inmovilización y la ausencia de reguladores hormonales— podría explicar su respuesta diferencial (Andrys et al., 2017; Nitzsche et al., 2004).

Finalmente, la baja actividad en el ensayo DPPH• contrasta con los resultados del ensayo ABTS⁺• (88,96% de inhibición), lo que sugiere que el pigmento es más eficaz en sistemas que involucren radicales catiónicos. Esta discrepancia refuerza la necesidad de emplear múltiples métodos para una caracterización antioxidante completa (Talić et al., 2023).

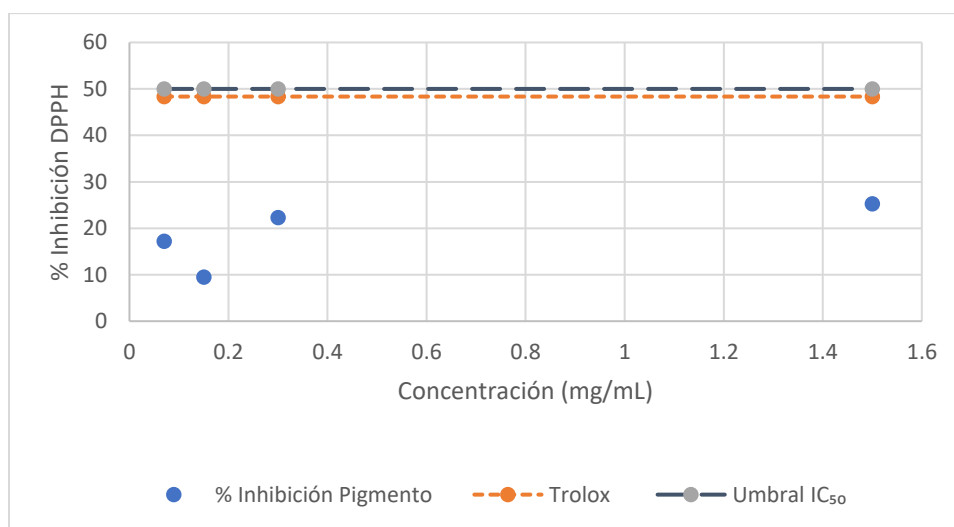


Figure 36 Actividad antioxidante del pigmento azul mediante ensayo DPPH.

5.2 Ensayo ABTS⁺•

La capacidad antioxidante del pigmento azul y sus fracciones se evaluó mediante el ensayo del radical catiónico ABTS⁺•, midiendo el porcentaje de inhibición a los 30 minutos de incubación, punto en el cual se alcanzó el equilibrio de reacción.

5.2.1 Actividad antioxidante del pigmento azul

El pigmento azul mostró una relación dosis-respuesta clara frente al radical ABTS^{•+}, alcanzando una inhibición máxima del 74,2% a 31,2 mg/mL (Figura 37). A concentraciones superiores (62, 125 y 250 mg/mL), la actividad disminuyó significativamente (71,7%, 48,99% y 0%, respectivamente), sugiriendo que 31,2 mg/mL representa la concentración óptima. Esta reducción podría atribuirse a saturación del sistema, interferencia óptica o agregación molecular.

En comparación, el aceite esencial de *Lavandula angustifolia* reporta inhibiciones del 99,48% (Caprari et al., 2021). Esta diferencia refleja la distinta naturaleza química de ambos extractos: mientras el pigmento azul contiene compuestos fenólicos no volátiles que actúan principalmente por donación de electrones, el aceite esencial posee monoterpenos con mecanismos antioxidantes alternativos.

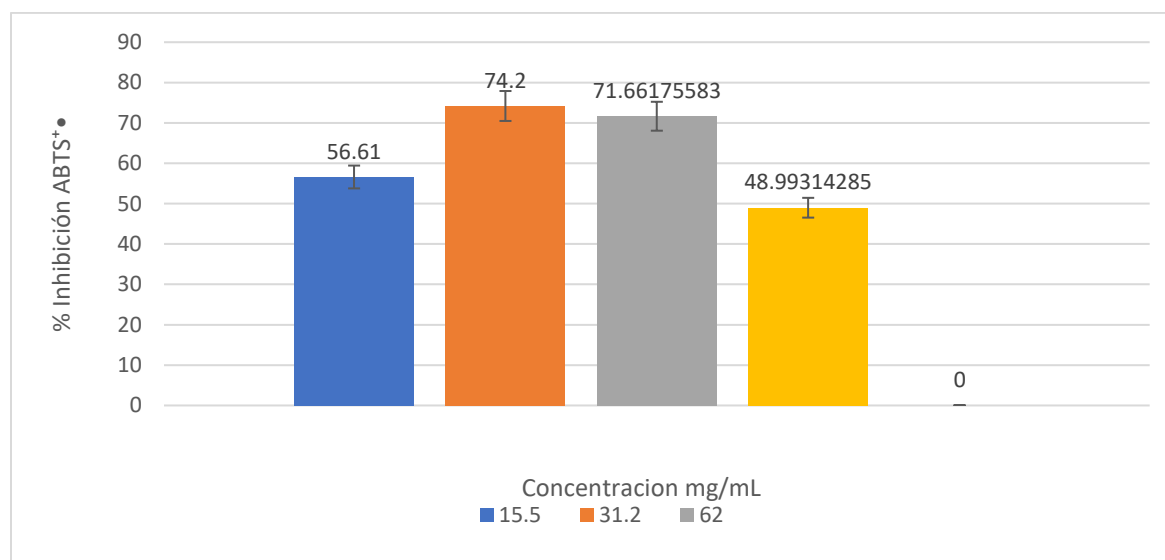


Figure 37 Porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+} por el pigmento azul a diferentes concentraciones.

5.2.2 Evaluación de fracciones por Prep-TLC

El análisis de cuatro fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina preparativa reveló que la fracción 2 presentó la mayor actividad antioxidante (54,5% de inhibición), seguida por la fracción 1 (36,9%). Las fracciones 3 y 4 mostraron actividad mínima (Figura 38). Estos resultados indican que los compuestos responsables de la actividad antioxidante se concentran predominantemente en la fracción 2, posiblemente fenoles, flavonoides o estructuras indigoides con capacidad de transferencia de electrones.

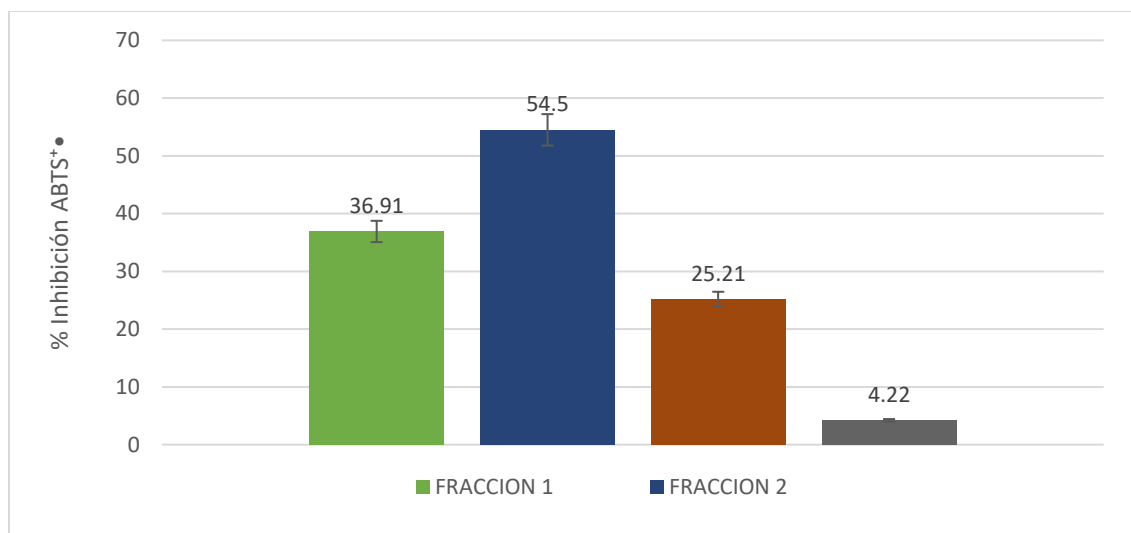


Figure 38 Porcentaje de inhibición del radical ABTS• por fracciones de Prep-TLC.

5.2.3 Evaluación de fracciones de cromatografía en columna

La fracción purificada mediante cromatografía en columna, identificada como "Fracción Azul", mostró una actividad antioxidante excepcional con un 88,96% de inhibición del radical ABTS• a los 30 minutos, superando incluso al estándar Trolox en términos relativos (Figura 39).

Este resultado demuestra que el proceso de purificación permitió enriquecer significativamente los compuestos antioxidantes, eliminando interferentes y concentrando los principios activos. La elevada actividad sugiere la presencia de uno o varios metabolitos secundarios con potente capacidad de captación de radicales libres, posicionando a esta fracción como un candidato prometedor para aplicaciones funcionales.

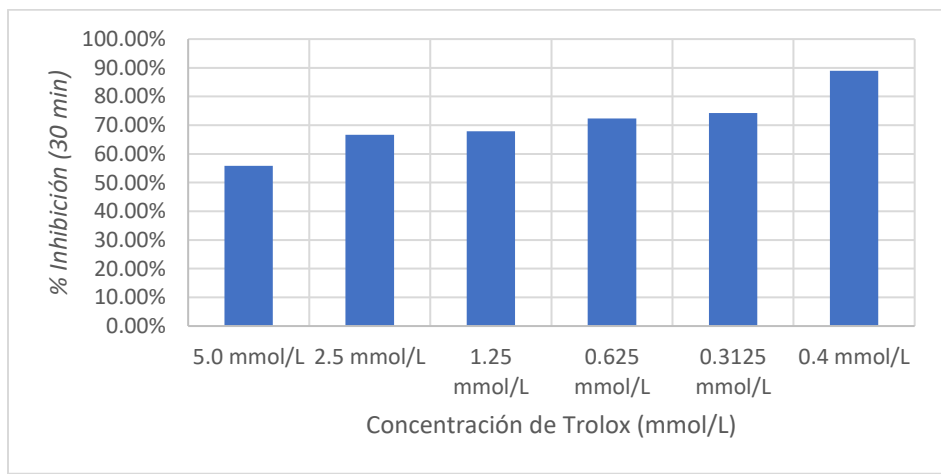


Figure 39 Respuesta de inhibición del radical ABTS• por concentración de Trolox (30 min).

El análisis comparativo del rendimiento antioxidante (Figura 40) revela que:

- El pigmento crudo mostró una actividad máxima del 74% de inhibición a 31,2 mg/mL (TEAC: 2,80 mmol/L Trolox)
- Entre las fracciones de Prep-TLC, la Fracción 2 presentó 54,5% de inhibición
- La Fracción Azul (2.2.1) exhibió la mayor actividad (88,95% de inhibición) con un TEAC de 24,41 mmol/L Trolox ($\approx 244.100 \mu\text{mol TE/g}$)

Este incremento de más de 8 veces en la actividad antioxidante tras la purificación mediante cromatografía en columna confirma la efectividad del proceso para aislar y concentrar los compuestos bioactivos responsables de la capacidad de eliminación de radicales libres.

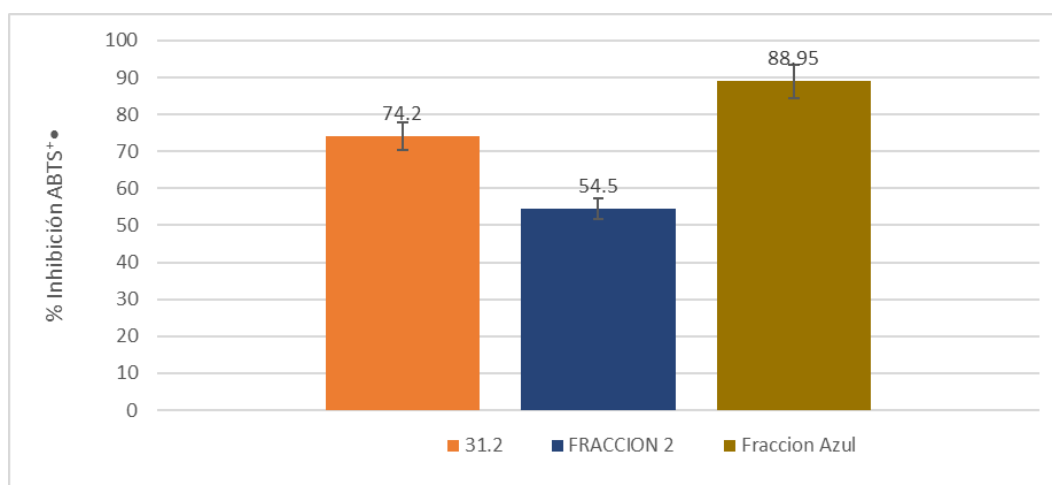


Figure 40 Comparación del % de inhibición del radical ABTS^{•+} entre el pigmento crudo, fracciones cromatográficas y la fracción purificada (Fracción Azul).

CONCLUSIONES

1. Se estableció exitosamente un sistema de cultivo en suspensión de células habituadas de *Lavandula angustifolia* Mill. para la producción de un pigmento azul, sin la necesidad de reguladores de crecimiento exógenos. Este constituye el primer reporte en México de su generación bajo condiciones de autonomía hormonal, lo que representa una alternativa sostenible y escalable para la obtención de colorantes naturales.
2. El pigmento, excretado espontáneamente al medio de cultivo, mostró un perfil espectral característico ($\lambda_{\text{max}} \approx 660 \text{ nm}$), sugiriendo la presencia de estructuras fenólicas conjugadas, probablemente derivadas del ácido rosmarínico. Su formación demostró una dependencia crítica de la suplementación con iones férricos (Fe^{2+}) en el medio.
3. La actividad antioxidante fue altamente dependiente del método de evaluación. Mientras que en el ensayo DPPH• mostró una actividad moderada (25.3% de inhibición), el ensayo ABTS⁺• reveló un potencial excepcional tras la purificación, con la "Fracción Azul" alcanzando un 88.96% de inhibición y un TEAC de 24.41 mmol/L. Esto posiciona al pigmento como un compuesto bioactivo de alto valor.
4. La inmovilización celular en alginato de calcio y espuma de poliuretano, si bien mantuvo la viabilidad celular ($\geq 80\%$), no logró inducir la biosíntesis del pigmento, atribuyéndose este resultado a la ausencia de L-cisteína, la quelación de Fe^{2+} y posibles limitaciones de difusión.
5. En conjunto, este trabajo valida el cultivo en suspensión de células habituadas de *L. angustifolia* como una plataforma biotecnológica eficaz para la producción continua de un pigmento azul natural con doble funcionalidad: colorante y antioxidante. La alta actividad de la fracción purificada justifica estudios futuros dirigidos a su caracterización estructural (HPLC-MS, RMN) y a la evaluación de su estabilidad y toxicidad para aplicaciones específicas.

RECOMENDACIONES

1. Optimización de la producción del pigmento: Se recomienda incorporar L-cisteína (0,2–0,3 mM) al medio de cultivo en suspensión para potenciar la biosíntesis del pigmento azul, basándose en los precursores metabólicos reportados para compuestos similares.
2. Evaluación de sistemas de inmovilización: Es crucial probar matrices alternativas de inmovilización que minimicen la quelación de iones metálicos, como el alcohol polivinílico modificado con grupos stilbazolio (PVA-SbQ) o resinas de poliestireno, para combinar la ventaja operativa de la reutilización celular con la inducción efectiva del pigmento.
3. Caracterización estructural avanzada: Se sugiere realizar la identificación estructural del compuesto activo en la Fracción Azul mediante técnicas analíticas como HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN), lo que permitirá elucidar la relación estructura-actividad antioxidante.
4. Estudios de estabilidad y aplicabilidad: Para viabilizar su uso, es fundamental caracterizar la estabilidad del pigmento frente a factores ambientales (pH, temperatura, luz) y desarrollar formulaciones prototipo (geles, emulsiones) que permitan evaluar su potencial como ingrediente bioactivo en productos cosmecéuticos.

Referencias bibliográficas

1. Andrys, D., Kulpa, D., Grzeszczuk, M., Bihun, M., & Dobrowolska, A. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill. field-grown and propagated in vitro. *Folia Horticulturae*, 29(2), 161–180. <https://doi.org/10.1515/fhort-2017-0016>
2. Arfaoui, L. (2021). Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. *Molecules*, 26(11), 2959.
3. Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., & Restrepo, J. (s.f.). *Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Grupo de Biotecnología Industrial.
4. Arnaldos, T., López-Serrano, M., Ros Barceló, A., Calderón, A. A., & Zapata, J. M. (2006). A blue pigment derived from rosmarinic acid and FeSO_4 is responsible for the blue pigment secreted into the medium by *Lavandula x intermedia* cell cultures grown in the dark. *Natural Product Research*, 19(4), 399–405.
5. Autor desconocido. (s.f.). *Plantas medicinales para alteraciones del sueño, ansiedad y depresión (II): Lavanda* (PDF).
6. Banthorpe, D. V., Bilyard, H. J., & Watson, D. G. (1985). Pigment formation by callus of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry*, 24(10), 2377–2379.
7. Bechtold, T., & Mussak, R. (Eds.). (2009). *Handbook of natural colorants*. Wiley.
8. Benjamins, R., & Scheres, B. (2008). Auxin: The looping star in plant development. *Cell*, 133(3), 385–396.
9. Botello Pozos, J. C. (s.f.). *Conceptos básicos de espectrofotometría ultravioleta-visible*.
10. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28(1), 25–30.
11. Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11).
12. Câmara, J. S., Albuquerque, B. R., Aguiar, J., Corrêa, R. C. G., Gonçalves, J. L., Granato, D., ... & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. *Foods*, 10(1), 37.
13. Chin, S., Behm, C. A., & Mathesius, U. (2018). Functions of Flavonoids in Plant–Nematode Interactions. *Plants*, 7(4), 85. <https://doi.org/10.3390/plants7040085>
14. Denner, S. S. (2009). *Lavandula angustifolia* Miller: English lavender. *Holistic Nursing Practice*, 23(1), 57–64.

15. Deroles, S. (2006). Anthocyanin biosynthesis in plant cell cultures: A potential source of natural colourants. En C. A. Rice-Evans & N. P. Rodrigues (Eds.), *Plant pigments and dyes: Biotechnology and applications* (pp. 115–138). CRC Press.
16. Devasigamani, L., Devarajan, R., Loganathan, R., Rafath, H., Padman, M., GovindaRaju, M. V., Giridhar, L., HC, C., & Kuppan, N. (2020). *Lavandula angustifolia* L. plants regeneration from in vitro leaf explants-derived callus as conservation strategy. *Biotecnología Vegetal*, 20(2), 75–82. Instituto de Biotecnología de las Plantas, UCLV.
17. Dias, M. C., Pinto, D., & Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.
18. Espina de Castro, L. (2018). *Extracción de antioxidantes de los residuos de la destilación a vapor e hidrodestilación de la Lavandula angustifolia* (Trabajo de fin de grado, Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales).
19. Flores, M. L. (2017). *Unidad 2 - Cromatografía – Complemento teórico: Cromatografía de adsorción en columna* [Material de clase]. Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
20. Fujita, Y. (1985). Producción industrial de pigmentos vegetales mediante cultivo celular. *Kagaku Kogaku*, 43(11), 1005–1012.
21. Geier, M., Schumacher, A., & Schmölling, T. (2011). Cytokinin signaling in Arabidopsis and beyond: New insights from tissue culture systems. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6), 855–858.
22. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture: Volume 1. The background* (3ª ed.). Springer.
23. Gonçalves, S., & Romano, A. (2012). In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 30(6), 134–144.
24. González Puerta, N. A., & Villegas Rodríguez, L. C. (2018). *Cultivo in vitro de tejidos vegetales, estrategias y consideraciones*. Universidad de Medellín.
25. Guadarrama-Flores, B., Buendía-González, L., Orozco-VillaFuerte, J., Estrada-Zúñiga, M. E., & Cruz-Sosa, F. (2012). Producción en cultivos in vitro de los componentes principales del aceite esencial de *Lavandula angustifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 66–74.
26. Hamed, M., Kalita, D., Bartolo, M. E., & Jayanty, S. S. (2019). Capsaicinoids, polyphenols and antioxidant activities of *Capsicum annuum*: Comparative study of the effect of ripening stage and cooking methods. *Antioxidants*, 8(9), 344.
27. Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (3ª ed.). Chapman & Hall.

28. Hernández Amador, E. (2017). *Establecimiento in vitro de cultivos de Lavandula dentata* (Trabajo de Fin de Grado, Universidad de La Laguna). Tutores: J. F. Pérez Francés & E. Suárez Toste
29. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779.
30. Kreis, W. (2019). Exploiting plant cell culture for natural product formation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 92, 216–225.
31. Kumar, A., Dixit, U., Singh, K., Gupta, S. P., & Jamal, M. S. (2022). *Structure and properties of dyes and pigments*. Elsevier.
32. Li, S., Liu, C., Zhang, Y., & Tsao, R. (2021). Online coupling of pressurized liquid extraction with two-dimensional countercurrent chromatography for isolation of natural acetylcholinesterase inhibitors from *Astragalus membranaceus*. *Phytochemical Analysis*, 32(5), 745–754.
33. Li, X., Chen, F., Tian, B., & Zhang, D. (2020). A simple and reliable method for assessing cell viability in plant suspension cultures using fluorescein diacetate (FDA) staining. *Plant Methods*, 16(1), 133.
34. Lindsey, K., & Yeoman, M. M. (1985). Immobilized plant cells. En M. M. Yeoman (Ed.), *Plant cell culture technology* (pp. 229–267). Springer.
35. Malterud, K. E., Farbro, T. L., & Huse, A. E. (1993). Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Institute of Pharmacy, University of Oslo*, 77–85.
36. Marchev, A. S., & Georgiev, M. I. (2020). Plant in vitro systems as a sustainable source of active ingredients for cosmeceutical application. *Plants*, 9(4), 536.
37. Marín Muñoz, I. (2015). *Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales ecológicos de hinojo, perejil y lavanda* (Trabajo de máster, Escuela Politécnica Superior de Orihuela).
38. Martín, N., & Viniegra, M. (2020). *Estudio de pigmentos naturales en plantas medicinales mediante técnicas espectroscópicas* (Proyecto de investigación, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa).
39. Mc Caughey-Espinoza, D. M., Ayala-Astorga, G. I., Buitimea-Cantúa, G. V., Buitimea-Cantúa, N. E., & Ochoa-Meza, A. (2021). Propagación y establecimiento de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) bajo malla sombra. *IDESIA (Chile)*, 39(1), 27–35.
40. Meins, F., Jr. (1989). Habituation: Heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. *Annual Review of Genetics*, 23, 395–408.
41. Mollet, H., & Grubenmann, A. (2001). Pigments and dyes. En *Formulation technology: Emulsions, suspensions, solid forms* (pp. 385–408). Wiley-VCH.
42. Mori, T., Sakurai, M., & Sakuta, M. (2000). Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin

- production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Science*, 158(2), 131–138.
43. Moscatiello, R., Baldan, B., & Navazio, L. (2013). Plant cell suspension cultures. En F. J. M. Maathuis (Ed.), *Plant mineral nutrients: Methods and protocols* (pp. 69–78). Springer.
 44. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
 45. Murashige, T. (1973). Nutrition of plant cells and organs in vitro. *In Vitro*, 9(2), 81–86.
 46. Nakajima, H., Sonomoto, K., Morikawa, H., Sato, F., Ichimura, K., Yamada, Y., & Tanaka, A. (1986). Entrapment of *Lavandula vera* cells with synthetic resin prepolymers and its application to pigment production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(4), 266–270.
 47. Nakajima, H., Sonomoto, K., Sato, F., Ichimura, K., Yamada, Y., & Tanaka, A. (1989). Influence of carbon source on pigment production by immobilized cultured cells of *Lavandula vera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 317–321.
 48. Nakajima, H., Sonomoto, K., Sato, F., Yamada, Y., & Tanaka, A. (1987). Pigment synthesis by immobilized cultured cells of *Lavandula vera* and characterization of a component of the pigments. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(11), 2959–2964.
 49. Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder, U., Jeppsson, U., Larsson, P.-O., Mosbach, K., & Brodelius, P. (1983). A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(6), 319–326.
 50. Nurzyńska-Wierdak, R., & Zawislak, G. (2016). Antioxidant activity and phenolic content of essential oils from different parts of *Lavandula angustifolia* Mill. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15(3), 133–145.
 51. Payne, G. F., Bringi, V., Prince, C., & Shuler, M. L. (1991). *Plant cell and tissue culture in liquid systems*. Hanser Publishers.
 52. Piedra Cartuche, G. R. (2019). *Determinación de las propiedades físicas, caracterización química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de lavanda (Lavándula dentata L)* (Trabajo de titulación, Universidad Técnica Particular de Loja).
 53. Prabakaran, M., Kim, S. H., Sasireka, A., Chandrasekaran, M., & Chung, I. M. (2018). Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*. *Food Bioscience*, 26, 23–29.
 54. Prusinowska, R., & Śmiechowska, M. (2014). Composition and biological properties of *Lavandula angustifolia* L. – A review. *Herba Polonica*, 60(2), 56–68.

55. Pzanowski, K., Antkowiak, W., & Kopcewicz, J. (2019). Endogenous auxin and cytokinin levels in habituated and non-habituated plant cell cultures: A comparative study. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 243–250.
- Quiroga, P. (s.f.). *Capítulo 3: Cromatografía en capa fina (TLC)*.
56. Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153. (Corregido: el DOI estaba partido. Ahora está completo y correcto.)
57. Ranjbar, M., Kiani, M., & Gholami, F. (2023). Antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *South African Journal of Botany*, 155, 110–117.
58. Rischer, H. et al. (2013). Plant cells and secondary metabolism: From gene discovery to industrial application. *Biotechnology Advances*, 31(1), 74–82.
59. Ruiz Benítez, M. L. (2020). *Guía de laboratorio: Determinación de la actividad antioxidante*. Universidad Simón Bolívar.
60. Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Bok, V. V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants*, 10(1), 118.
61. Santos, F. A. (2015). Introducción a la cromatografía. *Educación Química*, 26(3), 196–202.
62. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, 24(13), 2452.
63. Sierra Diego, M. (2022). *Determinación de la capacidad antioxidante de plantas aromáticas. Lavandula angustifolia* (Trabajo Fin de Grado, Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales). Repositorio Institucional de la Universidad de Jaén.
64. Silva-Filho, S. E., Silva-Comar, F. M. D. S., Würzler, L. A. M., Cavalcante, H. A. O., Lima, S. B., Cita, P. J., ... Filho, B. P. D. (2015). *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil exhibits anti-inflammatory activity by modulating macrophage migration and cytokine production. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 859083.
65. Smigielski, K., Prusinowska, R., & Śmigielska, H. (2018). Antioxidant activity and chemical composition of essential oils from *Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia*. *Herbal Medicine*, 8(2), 67–72.
66. Sonomoto, K., Nakajima, H., Sato, F., Yamada, Y., & Tanaka, A. (1990). [Título relacionado con naftopirano en *Lavandula*]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 53–59.
67. Stahl, E. (1969). *Thin-layer chromatography: A laboratory handbook* (2ª ed.). Springer-Verlag.

68. Su, W. W. (1999). Encapsulated plant cells: Techniques and applications. En W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza, & W. L. Chick (Eds.), *Cell encapsulation technology and therapeutics* (pp. 307–317). Springer.
69. Talić, S., Odak, I., Marković Boras, M., Smoljan, A., & Martinović Bevanda, A. (2023). Essential oil and extracts from *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in Bosnia and Herzegovina: Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 3(1), 95–103.
70. Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(3), 169–180.
71. Toque-Huaman, E., & Gonzales-Balladares, J. D. (2024). Detección de pigmentos en aceites con un espectrofotómetro de bajo costo: propuesta de un proyecto para la introducción a la espectrometría. *Educación Química*, 35(4).
72. Trejo-Tapia, G., Arias-Castro, C., & Rodríguez-Mendiola, M. (2003). Influence of the culture medium constituents and inoculum size on the accumulation of blue pigment and cell growth of *Lavandula spica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 7–12.
73. Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478.
74. Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Classification of Phenolic Compounds in Plants. En *Polyphenols in Plants* (pp. 263–284). Academic Press.
75. Tsuru, M., & Inoue, M. (1996). Production of blue pigment in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera*). *Breeding Science*, 46(4), 361–366.
76. Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93.
77. Universidad de Medellín. (2018). *Cultivo in vitro de tejidos vegetales, estrategias y consideraciones*. Objeto Virtual de Aprendizaje. <https://www.udemedellin.edu.co>
78. Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005–1016.
79. Vrancheva, R., Petkova, N., & Ivanov, I. (2021). Plant in vitro systems as sources of food ingredients and additives. En R. M. T. Kubo, M. I. Georgiev, & P. N. Solano (Eds.), *Plant cell cultures as a source of aromatic and medicinal compounds* (pp. 305–328). Springer.
80. Watanabe, K., Sato, F., Furuta, M., & Yamada, Y. (1989). Induction of pigment production by Fe²⁺-containing compounds in cultured *Lavandula vera* cells. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 2975–2977.
81. Widholm, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47(4), 189–194.

82. Wu, T., Kerbler, S. M., Fernie, A. R., & Zhang, Y. (2021). Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Communications*, 2(5), 100235.
83. Zagorskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols