



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Cultivo de brotes de *Tecoma stans* para la producción de compuestos fenólicos en sistema de inmersión temporal automatizado.

TESIS

Para obtener el grado de:

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

ABRIL CRISÁLIDA DÍAZ TORAL

Director de Tesis

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca 2019.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/038
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 26 de marzo de 2019

C. ABRIL CRISÁLIDA DÍAZ TORAL
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Adolfo López Torres	UNPA	Presidente
Dr. Paúl Mauricio Sanchez Ocampo	Cátedras CONACYT	Vocal
Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García	UNPA	Secretario
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	1er Suplente
Dr. Lemuel Pérez Picaso	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi jí jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/226
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 14 de mayo de 2019

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología de la **C. Abril Crisálida Díaz Toral**, matrícula **16140004**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Cultivo de brotes de *Tecoma stans* para la producción de compuestos fenólicos en sistemas de inmersión temporal automatizado**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Abril Crisálida Díaz Toral
C.c.p. Archivo



RECONOCIMIENTO



Esta tesis fue realizada en los Laboratorios de Cultivo de Células Vegetales y Análisis Instrumental de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo. Se contó con la asesoría de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur en los experimentos en RITA® y actividad antioxidante *in situ*, del Dr. Juan Gabriel Torruco Uco para la cuantificación de la actividad antioxidante por el método ABTS* y del Dr. Adolfo López Torres para el análisis químico mediante UPLC-PDA-HRMS.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto CB-CONACyT N° 18395, e INFRA 255514 y 252013; y es parte de la investigación enmarcada dentro del proyecto Cátedras-CONACyT “3212 Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos”. Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 783615 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.



“Cada año, los árboles pierden las hojas con las primeras escarchas y, también cada año, vuelven a brotar con el buen tiempo, de manera que los principales acontecimientos que marcan el ritmo de la vida del mundo natural evocan, por así decirlo, nuestros recuerdos. Por decirlo aún más simple: no hay ninguna posibilidad de que olvidemos, y si por casualidad ése fuera el caso volverían por sí mismos a nuestra mente. Por el contrario, en el mundo humano, toda pasa, todo es perecedero, la muerte y el olvido terminan por llevárselo todo: las palabras que se pronuncian, así como las acciones que se llevan a cabo. Nada es duradero... Salvo la escritura”

*Luc Ferry
La sabiduría de los mitos, 2008.*

AGRADECIMIENTOS

Siempre estaré agradecida con Dios por regalarme a dos mujeres importantes en mi vida, gracias a ustedes por formar parte de lo que soy, Abuela (†) y tía. Las llevo en mi mente y corazón siempre. Gracias a mi padre y hermano por todo su apoyo.

A Abimelek, Gracias por siempre estar y ser el ingrediente perfecto para poder culminar una vez más con una de mis metas, por entenderme y apoyarme incondicionalmente, por ser un gran compañero, pero sobre todo por ayudarme a ser más fuerte, de corazón disfruto compartir el privilegio de ser agradecida contigo, Te amo.

Mi más sincero agradecimiento, a mi director de tesis Dr. Paul M. Sánchez Ocampo y a la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por todo el apoyo y confianza brindados, en la realización de esta tesis y a lo largo de estos años de formación académica.

De igual forma agradezco sinceramente a los profesores que han contribuido en esta tesis, que incentivaron en muchos sentidos a seguir adelante. Al Dr. Adolfo por todo su apoyo, tiempo y asesoría en la culminación de este trabajo. A los revisores de tesis y que formaron parte del comité tutorial: el Dr. Edgar B. Sepúlveda, Dra. Janet M. León, Dr. Enrique Villalobos A. y al Dr. Lemuel Pérez P. pues sin su apoyo no habría sido posible este resultado.

Mi afecto y cariño para mis amigas de vida y hermanas de corazón: Viridiana y Marly, gracias por esas palabras en el momento preciso. A las personas que encontré en el camino y en estos dos años en la maestría, gracias por su amistad, a mis compañeros de laboratorio, los que aún siguen cumpliendo sus objetivos y a los que están en búsqueda de sus sueños, mis mejores vibras. Les quiero!

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

Díaz-Toral A.C, Santiago-Velasco M, Capataz-Tafur J, Sanchez-Ocampo P. M. Multiplicación de brotes *in vitro* de *Tecoma stans* en cultivo sólido y líquido. VI Encuentro Internacional sobre Biotecnología, 03-06 de diciembre de 2017, Tlaxcala, México.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Tecoma stans</i>	5
2.2 Cultivo de tejidos vegetales	9
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de especies leñosas.....	13
2.4 Reguladores de crecimiento	15
2.5 Sistema de Inmersión Temporal Automatizado.....	18
2.6 Técnicas para la detección de compuestos antioxidantes.....	24
2.6.1 Método ABTS+	26
2.6.2 Método DPPH.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo General.....	30
5.2 Objetivos Específicos	30
6. MATERIALES Y METODOS.....	31
6.1 Material biológico.....	31
6.2 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Tecoma stans</i>	31
6.2.1 Método de desinfección de semillas	31
6.2.2 Germinación de semillas	32
6.2.3 Propagación de plántulas.....	32
6.3 Cultivo de brotes de <i>T. stans</i> en sistema de inmersión temporal automatizado (RITA®).....	32
6.3.1 Condiciones experimentales.....	32
6.3.2 Influencia de la duración y frecuencia de inmersión	33
6.4 Preparación de extractos hidroalcohólicos.....	34
6.5 Evaluación de la actividad antioxidante.....	35
6.5.1 Ensayo cualitativo <i>in situ</i> de la actividad antioxidante.....	35

6.5.2 Actividad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)	35
6.5.3 Actividad antioxidante por el método ABTS ⁺	36
6.6 Análisis químicos	37
6.6.1 Análisis fitoquímico por cromatografía en capa fina	37
6.6.2 Cuantificación de fenoles totales	38
6.6.3 Cuantificación de flavonoides totales	38
6.6.4 Instrumentación y condiciones de análisis de metabolitos en <i>T. stans</i> mediante UPLC-PDA-HRMS	39
6.7 Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. stans</i> en medio semisólido	41
7.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. stans</i> en Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®)	42
7.3 Actividad antioxidante	45
7.3.1 Actividad antioxidante <i>in situ</i>	45
7.3.2 Cuantificación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	46
7.4 Análisis químico	47
7.4.1 Detección de metabolitos por cromatografía en capa fina	47
7.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales	48
7.4.3 Cuantificación del feniletanoide verbascósido por UPLC	49
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIONES	59
10. REFERENCIAS	61
11. ANEXOS	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar de <i>Tecoma stans</i>	5
Figura 2. Principales alcaloides y compuestos fenólicos de <i>T. stans</i>	8
Figura 3. Técnicas <i>in vitro</i> en el cultivo de tejidos vegetales..	11
Figura 4. Funcionamiento de un Reactor de inmersión temporal.	21
Figura 5. Ubicación geográfica Universidad del Papaloapan.	31
Figura 6. Germinación de semillas de <i>T. stans in vitro</i> . A. Inoculación de semillas B. Semillas germinadas.	41
Figura 7. Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> en medio semisólido	41
Figura 8. Resultados del experimento RTsI, con 5 min y 3 h de tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión, respectivamente.	42
Figura 9. Hojas de los brotes de <i>T. stans</i> cultivadas en condiciones de RITA a los 21 días de cultivo. A. Hojas normales del tratamiento Rtl (5min cada 3h) . B. Hojas con vitrificación de brotes bajo el tratamiento RtlV (5 min cada 12h).....	45
Figura 10. Ensayo <i>in situ</i> para la detección de la actividad antioxidante utilizando DPPH, en extractos de brotes de <i>T. stans</i> cultivados en RITA®.....	46
Figura 11. CCF de los extractos de <i>T. stans</i> . de extractos de plántulas <i>in vitro</i> , RTsI y RTsII.	47
Figura 12. Cromatogramas UPLC correspondientes a la cuantificación de verbascósido. A. Estandar a diferentes concentraciones de 10 (—), 100 (—) y 200 (—) ppm del estándar de verbascósido; y espectro de absorción UV-Vis correspondiente a la solución de verbascósido de 200 ppm.	49
Figura 13. Cromatogramas UHPLC correspondientes a la cuantificación de verbascósido. A.. Tratamiento RTsI, B. Tratamiento RtsII.	50
Figura 14. Cromatogramas UHPLC correspondientes a la cuantificación de verbascósido. A.. Tratamiento RTsI, B. Tratamiento RtsII.	50
Figura 15. Espectro de masas ESI-HRMS obtenido del pico cromatográfico con Rt 26 min.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción Taxonómica de <i>Tecoma stans</i>	5
Tabla 2. Actividad biológica de <i>T. stans</i>	7
Tabla 3. Antecedentes fitoquímicos de <i>T. stans</i>	7
Tabla 4. Antecedentes cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Tecoma</i>	12
Tabla 5. Antecedentes cultivo <i>in vitro</i> de especies leñosas.	14
Tabla 6. Antecedentes de propagación de diferentes especies vegetales en Sistemas de Inmersión Temporal.....	23
Tabla 7. Antecedentes Sistema de Inmersión Temporal Automatizado RITA®....	24
Tabla 8. Diseño de experimentos para evaluar la influencia de la duración (t_{inm}) y la frecuencia de inmersión (F_{inm}).	33
Tabla 9. Características de los brotes de <i>T. stans</i> desarrollados en cultivo de inmersión temporal con diferente tiempo inmersión (t_{inm}) y frecuencia de inmersión (F_{inm}) después de 21 días de cultivo.....	43
Tabla 10. Efecto significativo de los factores duración y frecuencia de inmersión en el cultivo de brotes de <i>T. stans</i>	45
Tabla 11. Actividad antioxidante de extractos de brotes de <i>T. stans</i> obtenidos por cultivo en inmersión temporal.....	47
Tabla 12. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de extractos obtenidos en RITA® de <i>T. stans</i>	49
Tabla 13. Cuantificación de verbascósido de extractos obtenidos en RITA® de <i>T. stans</i>	52

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AB: Altura de brotes	OMS: Organización Mundial de la Salud
ABTS•: Ácido 2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]	m/v: masa/volumen
AIB: Ácido indol butírico	Rf: Factor de retención
AIA: Ácido indol acético	RNS: Especies reactivas de Nitrógeno
BAP: Bencil amino purina	ROS: Especies reactivas de oxígeno
BF: Biomasa fresca	<i>spp</i> : Especies de o especies no identificadas
B5: Medio de cultivo Gamborg	RITA®: Reactor de Inmersión Temporal Automatizado
CCF: Cromatografía en capa fina	t_{inm} : Tiempo de inmersión
CMs: Control medio sólido	UHPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography
DPPH: 1,1-difenil2-picrilhidracil	UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
EAG: Equivalentes de ácido gálico	UV: Luz ultravioleta
EC: Equivalente de catequina	RTsI: Experimento en RITA de <i>T. stans</i> con t_{min} : 5 min y F_{inm} : 3 h
EFR: Eficiencia de formación de raíz	RtsII: Experimento en RITA de <i>T. stans</i> con t_{min} : 2 min y F_{inm} : 4 h
ES: Extracto seco	RTsIII: Experimento en RITA de <i>T. stans</i> con t_{min} : 1 min y F_{inm} : 4 h
ET: Equivalente de Trolox	RTsIV: Experimento en RITA de <i>T. stans</i> con t_{min} : 3 min y F_{inm} : 12 h
EQ: Equivalente de quercetina	VB: Vitricación
F_{inm} : Frecuencia de inmersión	WPM: Woody Plant Medium
HA: Hidroalcohólico	λ : Longitud de onda
HI: Hiperhidratación	
IC ₅₀ : Concentración inhibitoria cincuenta	
IMB: Índice de multiplicación de brote	
MS: Medio Murashige and Skoog	
m.s.n.m: metro sobre el nivel del mar	
ND: No detectado	
NR: No reportado	

RESUMEN

Tecoma stans (Bignoniaceae), “tronadora, alancrancillo” es una planta medicinal que produce alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides, con actividad hipoglucemiante, citotóxica, inmunoestimulante y antioxidante. El objetivo de este trabajo fue implementar el cultivo de brotes de *T. stans* en un biorreactor de inmersión temporal automatizado y evaluar la concentración de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Para ello, se evaluó la influencia de la duración (1, 2, 3 y 5 min) y la frecuencia de inmersión (3, 4 y 12 h) en el índice de multiplicación de brotes (IMB) y las características de los brotes utilizando medio MS suplementado con 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA) y 1 mg/L de bencilaminopurina (BAP) y 30 g/L de sacarosa. Los resultados indicaron que la duración de inmersión tuvo un efecto significativo sobre el IMB, la altura, la producción de biomasa fresca, seca y sobre la %HI de los brotes. Mientras que la frecuencia de la inmersión solo tuvo efecto significativo en la altura y sobre la producción de biomasa fresca. En la condición RTsI (5 min de inmersión cada 3 h) se obtuvo un IMB de 3 brotes/explante, un $5\pm 0.43\%$ de vitrificación y un 20% de formación raíz. Bajo esta condición se obtuvo la mayor actividad antioxidante contra ABTS (811.91 ± 0.38 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto) y DPPH (643.16 ± 0.40 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto) la cual coincidió con el mayor contenido de compuestos fenólicos totales (73.1 ± 2.9 mg equivalentes de ácido gálico/g extracto) y flavonoides (97.4 ± 4.7 mg equivalentes de quercetina/g de extracto). Los análisis por UPLC mostraron que los brotes cultivados en RTsI (5 min de inmersión cada 3 h) y RTsII (2 min de inmersión cada 4 h) acumularon la misma cantidad de Verbascósido. Estos resultados muestran que el cultivo de brotes en sistemas de inmersión temporal representa un método eficiente para la micropropagación de *T. stans*.

ABSTRACT

Tecoma stans (Bignoniaceae), "tronadora, alancrancillo" is a medicinal plant that produces compounds like alkaloids, phenolic and essentially flavonoids, with hypoglycaemic, cytotoxic, immunostimulant and antioxidant activity. The objective of this work was to implement the culture of *T. stans* shoots in a temporary immersion bioreactor and evaluate the concentration of phenolic compounds, flavonoids and their antioxidant activity. For this, the influence of the duration (1, 2, 3 y 5 min)) and the immersion frequency (3, 4 and 12 h) on the shoot multiplication index (IMB) and the characteristics of the shoots using MS medium MS medium supplemented with 0.5 mg/L of indoleacetic acid (IAA) and 1 mg/L of benzylaminopurine (BAP) and 30 g/L of sucrose were evaluated. The results indicated that the immersion time had a significant effect on the IMB, the height, the production of fresh and dry biomass and on the HI% of the shoots. While the frequency of the dive only had a significant effect on the height and production of fresh biomass. In the RTsI condition (5 min of immersion every 3 h), an IMB of 3 shoots / explant was obtained, $5 \pm 0.43\%$ of vitrification and 20% of root formation. Under the condition RTsI was obtained with the maximum antioxidant activity against ABTS (811.91 ± 0.38 $\mu\text{mol Trolox / g}$ extract) and DPPH (643.16 ± 0.40 $\mu\text{mol Trolox / g}$ extract) that coincided with the highest content of phenolic compounds (73.1 ± 2.9 mg equivalents of gallic acid / g extract) and flavonoids (97.4 ± 4.7 mg quercetin equivalents / g extract). The analysis by UPLC that the shoots grown in RTsI (5 min of immersion every 3 h) and RTsII (2 min of immersion every 4 h) they accumulated the same content of verbascoside. These results show that the culture of shoots in temporary immersion systems represents an efficient method for the micropropagation of *T. stans*.

1. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una amplia biodiversidad de especies vegetales que oscila de 3000 a 5000 plantas con potencial de tipo terapéutico, sin embargo, de esta cantidad solo se ha estudiado y caracterizado el 5% (CONABIO, 2016). Según la OMS la medicina alternativa representa una opción para las personas que no cuentan con los recursos necesarios para adquirir un servicio médico o medicamentos que alivien sus malestares, es por eso que acuden al uso de plantas medicinales al menos el 80 % de las personas en regiones menos desarrolladas (Mendoza y Schlaepfer, 2010). Por otra parte, se conoce a la Medicina Tradicional como el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, usados para el mantenimiento de la salud, para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de distintas enfermedades ya sean del tipo físicas o mentales (OMS,2017).

Dentro de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional mexicana está *T. stans*, usada principalmente para el tratamiento de la diabetes. *T. stans* (conocida comúnmente como: tronadora, sauco amarillo, alacrancillo) se encuentra en los estados del norte, centro y sur del país donde es utilizada para el tratamiento de distintas enfermedades como la diabetes, padecimientos digestivos, inflamaciones, trastornos ginecológicos, entre otros (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En la actualidad se favorece el desarrollo de métodos para la micropropagación en el que se utiliza medios líquidos. Sus principales características es que son más baratos y permiten el escalamiento de la micropropagación mediante el uso de sistemas estacionarios o con agitación, ya sean del tipo biorreactores o sistemas de inmersión temporal (Eide *et al*, 2003).

Una alternativa biotecnológica es el Reactor de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®), el cual permitirá la obtención de brotes en mayor cantidad y en un sistema

controlado, además de proveer material vegetal constante. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar los extractos obtenidos de brotes por un sistema de inmersión temporal (RITA®), medir su capacidad de producción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, y la detección de compuestos fenólicos por UPLC.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Tecoma stans*

Tecoma stans (sinonimia *Bignonia stans* L., *Tecoma incisa* Sweet) es conocida comúnmente como tronadora, trompetilla, alacrancillo, canario (Figura 1).



Figura 1. Ejemplar de *T. stans*. Tomado de: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.

Pertenece a la familia de las bignoniáceas, al género *Tecoma* y a la especie *stans* (tabla 1).

Tabla 1. Descripción taxonómica de *T. stans* (CONABIO, 2017)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Bignoniaceae
Género	<i>Tecoma</i>
Especie	<i>stans</i>

Es un árbol o arbusto leñoso, originario de América, se encuentra principalmente en México y Sudamérica. Crece en climas cálidos, semicálidos, seco y templado, desde el nivel del mar hasta los 2500 MSN, en bosques tropicales caducifolio y perennifolio, pastizal y bosques espinosos. Llega a medir de 1 a 8 metros de altura, las hojas están divididas de 5 a 13 folíolos con o sin vellosidades en el reverso.

Las flores se parecen a pequeñas campanas amarillas y están agrupadas en racimos ubicados en las puntas de las ramas, los frutos son cápsulas alargadas de hasta 21 centímetros, color verde y cuando están maduros se tornan a cafés, además, contienen muchas semillas aplanadas y provistas de alas de color blanco.

En nuestro país, es utilizada como planta ornamental y en la medicina tradicional, principalmente en los estados de San Luis Potosí, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Yucatán. Sus propiedades medicinales son utilizadas para el tratamiento de distintos padecimientos del tipo gastrointestinal, dolor de muelas, inflamaciones, trastornos ginecológicos y la diabetes. Esta última, es el principal padecimiento para el que se utiliza *T. stans*. Para ello, se utilizan partes de la planta como: las hojas, tallos o ramas, la raíz o la flor en algunos casos. El modo de preparación es mediante infusiones y es administrada generalmente por vía oral (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La actividad farmacológica de *T. stans* ha sido demostrada por diversos estudios, por mencionar en 1985, Lozoya-Meckes y Mellardo-campos realizaron pruebas con perros a los que se les suministraba vía intravenosa infusión de tallos y hojas de *T. stans*, encontrando que la infusión administrada produjo una respuesta hiperglucémica temprana e hipotensión arterial seguida de una disminución lenta de los valores de glucosa en sangre. Los efectos observados en la sangre parecen estar relacionados con el metabolismo hepático del glucógeno y representa el primer estudio al que se le atribuye el efecto antidiabético de la planta (Lozoya-Meckes, *et al* 1985).

En cuanto a la actividad biológica de esta especie, se han reportado varios estudios enfocados principalmente a la actividad hipoglucemiante y antioxidante, utilizando hojas de la planta silvestre que posteriormente se procesaron para obtener extractos del tipo metanólico, etanólico y acuoso (tabla 2).

Tabla 2. Actividad biológica de *T. stans*

Parte vegetal	Extractos	Actividad biológica	Referencias
Hojas	Etanólico	Inhibición de α -glucosidasa	Álvarez-Delgado <i>et al</i> , 2018
Hojas	Hidroalcohólico	Actividad inhibitoria de lipasa	Ramírez, <i>et al</i> , 2016
Hojas	Acuoso, etanol	Hipoglucemiante y antioxidante	Rodríguez-Carmona, 2015
Hojas	Acuoso, etanol, hexano	Hipoglucemiante	Ibarra-Salas, 2009
Hojas	Acuoso	Antidiabética	Aguilar-Santamaría, <i>et al</i> , 2009
Hojas tallos	Metanol	Antioxidante	López-Laredo, <i>et al</i> , 2008
Hojas	Etanol	Antidiabética	Costantino <i>et al.</i> , 2003

Debido al interés de esta especie, diversos estudios se han realizado en torno a la evaluación fitoquímica y su posterior actividad biológica de los extractos de *T. stans*, obtenido de distintas partes de la planta crecidas de manera silvestre. En la Tabla 3 se describen los diversos estudios en fitoquímico en donde realizan técnicas de reacciones por colorimetría para identificar los compuestos presentes en el extracto de la planta. Siendo los alcaloides, triterpenoides y fenilpropanoides, los principales grupos que han demostrado tener actividad biológica importante y dentro de los cuales se han encontrado metabolitos que han presentado actividad antihipoglucemiante.

Tabla 3. Antecedentes fitoquímicos de *T. stans*

Parte vegetal	Extractos	Compuestos	Referencias
Hojas	Etanólico	Tecomina y tecostamina	Hammouda y Khalafallah, 1963
Hojas y frutos	Etanólico	Alcaloides	Lins y Felicio, 1993
Hojas	Etanólico	Flavonoides, Alcaloides	Corral Salvadó, <i>et al</i> , 2002
Hojas	Etanólico Acuoso	Alcaloides	Ibarra, <i>et al</i> , 2009
Hojas	Hidroalcohólico	Flavonoides, fenólicos, saponinas, cumarinas	Torres Xocua, <i>et al</i> , 2017

Los alcaloides que se han logrado aislar en *T. stans* son tecomanina (III), tecostanina (IV), tecostidina (V), Boschniakina (VI), 4-noractidina (VII), Nnormetileskitantina (VIII), 5-dehidroeskitantina (IX), 9-hidroxieskitantina (X), Δ^5 -dehidroskitantina (XI) y δ -skitanthina (XII), (Dohnal, 1976) (Dickinson y Jones, 1968) (Rojo, Barbas, y Rupérez, 2014). Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran el ácido ursólico, oleanólico, α -amirina y β -sitosterol (Castro, *et. al.*, 2014), de los cuales el ácido clorogénico, se le ha atribuido el efecto hipoglucémico (Raju 2011) (Figura 2).

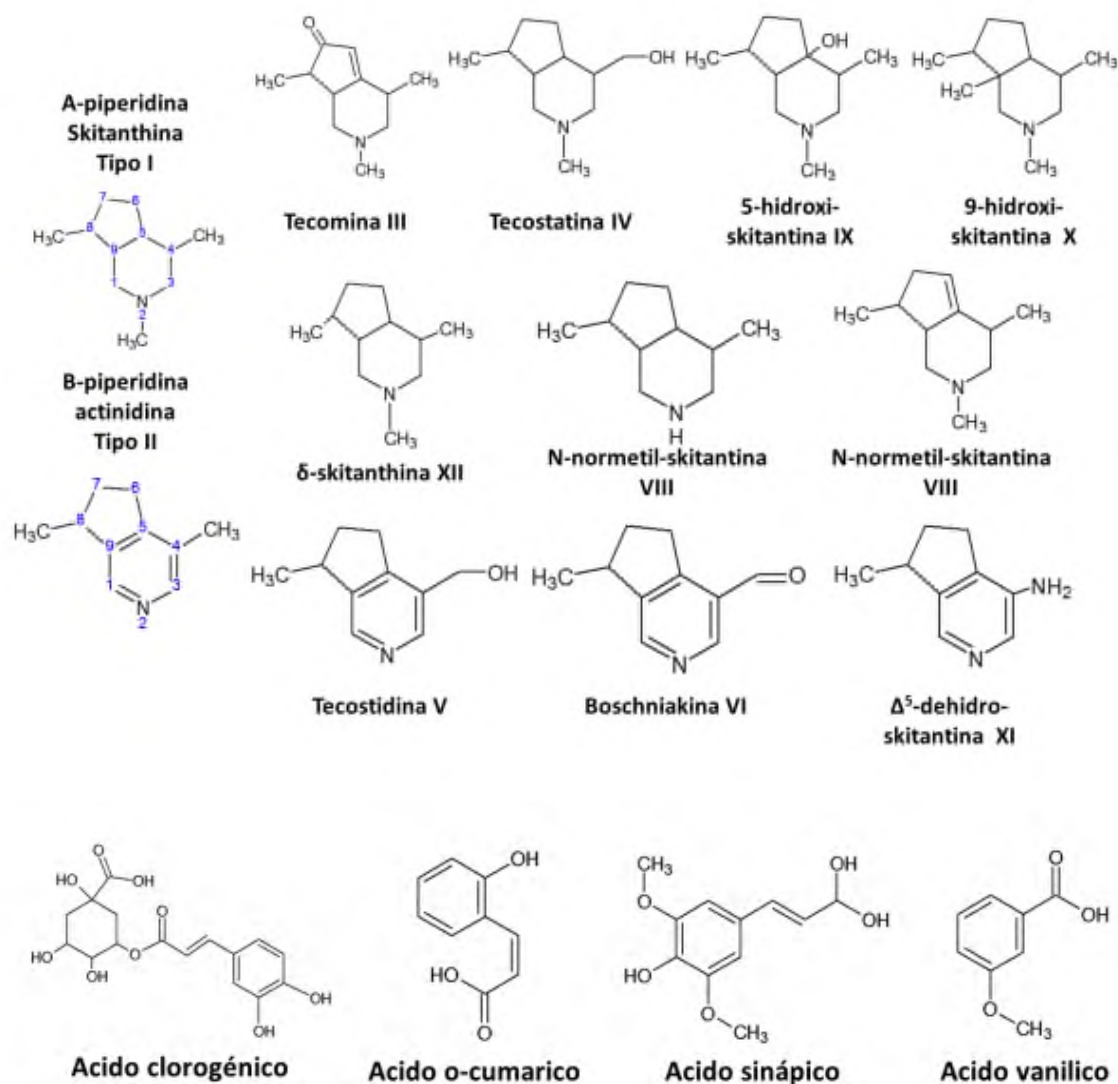


Figura 2. Principales alcaloides y compuestos fenólicos de *T. stans* (Dohnal, 1976; Castro, *et. al.*, 2014)

Por su parte, Ramírez *et al.*, (2016) reportaron que la purificación química bio-dirigida del extracto hidroalcohólico de *T. stans* produjo una fracción orgánica (acetato de etilo, TsEA), fracciones de flavona (TsC1F13), (TsC1F15), (TsC1F16) y compuestos aislados (crioseriol, apigenina, luteolina y verbascósido) con la capacidad de inhibir la actividad de la lipasa pancreática.

De lo antes mencionado, *T. stans* ha demostrado ser un recurso biótico de gran interés para la investigación básica en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, esto con la finalidad de obtener una mayor producción de material vegetal que se asocie con una alta producción de metabolitos secundarios.

2.2 Cultivo de tejidos vegetales

Una planta al crecer va aumentando su población de células, las cuales se especializan en diferentes funciones. El aumento de la población de células se realiza por medio de la división celular. Antes de que una célula madre se divida en dos células hijas, hace una copia exacta de su primer genoma, como resultado se tienen dos células hijas que tienen exactamente la misma composición genética como la de su célula madre. En efecto, todas las células de la planta deben contener los mismos genes y por lo tanto, tiene la capacidad de generar una planta completa. A esto se lo conoce como: célula totipotencial (Tobar, 2011).

Se define como cultivo de tejidos vegetales al conjunto de técnicas en las que se utiliza una parte de la planta, denominado explante, estos a su vez, pueden ser protoplastos, células, y/o tejidos, los cuales son cultivados asépticamente en un medio artificial de composición química definida e incubado en condiciones ambientales controladas, por lo tanto, cada explante origina una planta idéntica a la de origen. Estas técnicas tienen múltiples utilidades como herramientas para micropropagación, propagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, genética y producción de semillas sintéticas (Verpoorte, R. *et al*, 2002).

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales surge a partir de la investigación de hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología como la producción e identificación de microorganismos a partir de cultivos *in vitro* (Salazar, 2010). Es también una herramienta que permite la manipulación de células, tejido, órganos y organismos completos a partir, por mencionar alguno, de cultivos *in vitro* para la obtención de productos deseados (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células, a partir de explantes (material vegetal), los cuales pueden ser células, tejidos, órganos o plantas completas. Para ello se emplean diversas condiciones ambientales que permiten la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas (Hoxterman, 1997). El éxito de esta técnica radica en el principio de totipotencialidad de las células vegetales para generar tejidos nuevos o un organismo completo, sin embargo, esta característica disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por la célula, no obstante, puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivos a la que esté sometido (Predieri, 2001).

Dependiendo del material vegetal a utilizar, la técnica de propagación *in vitro* puede ser de tipo: cultivo de órganos (yemas axilares y apicales, nodos en tallos), cultivo de tejidos (hojas, peciolo, meristemas) y cultivo de células (células y protoplastos), utilizando o no, reguladores de crecimiento. En todos los casos se puede lograr plantas enraizadas como producto final, las cuales, pueden ser aclimatadas y posteriormente pasar a la etapa de desarrollo en viveros como una aplicación de la técnica (Figura 3).

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, las células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Así, las células vegetales crecidas en

condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- Organogénesis/embriogénesis directa. Una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones somáticos, a partir de una sección de tejido o explante.
- Organogénesis/embriogénesis indirecta. Desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada “callo”, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos (llamados así porque son estructuras similares a un embrión pero que no se originaron por unión de gametos).

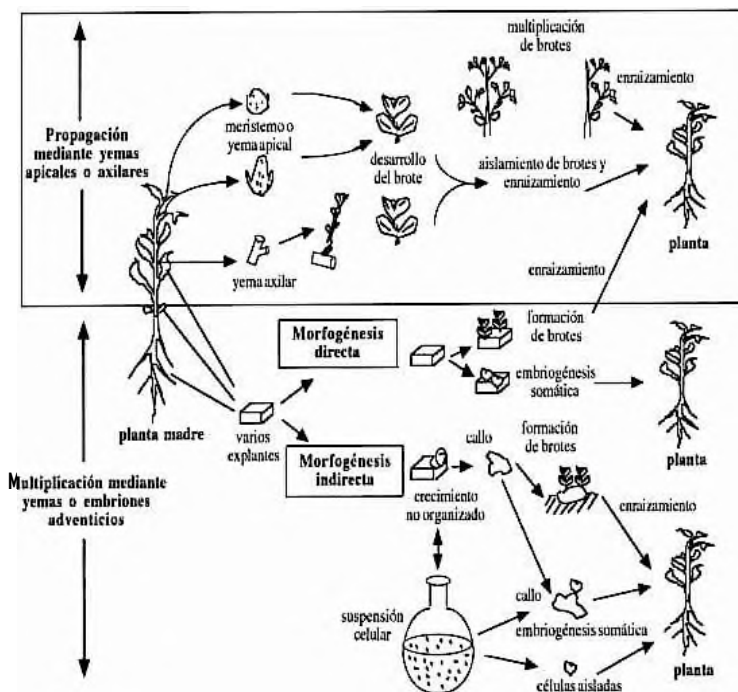


Figura 3. Técnicas *in vitro* en el cultivo de tejidos vegetales. Recuperado de: Lindsey y Jones, 1989.

En todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser

modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Esos compuestos, denominados reguladores del crecimiento, son los que se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta (Calva *et al*, 2005).

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos secundarios e investigación (Fowler 1987, Carpita y McCann, 2000).

En la tabla 4, se muestran ejemplos de cultivo *in vitro* realizado en el género *Tecoma*: *T. stans* y *T. sambucifolium*, en los cuales se han obtenido en su mayoría callos, a partir de explante de hojas y tallos.

Tabla 4. Antecedentes cultivo *in vitro* del género *Tecoma*

Especie	Parte Vegetal	Obtención	Referencias
<i>T. stans</i>	Semillas	Plántulas	Donhal 1976
<i>T. stans</i>	Hojas	Callos	Donhal 1976
<i>T. sambucifolium</i>	Tallos	Callos	Pletsch, <i>et al</i> , 1993
	Hoja		
<i>T. stans</i>	Tallo	Callos	López, <i>et al</i> , 2008
	Hipocotílo		
<i>T. stans</i>	Semillas	Callos	López-Laredo, <i>et al</i> , 2009
<i>T. stans</i>	Hojas	Callos	Namde y Wani, 2014
<i>T. stans</i>	Semillas	Plántulas	Torres Xocua, <i>et al</i> , 2018

Una planta que se ha originado por medio del cultivo *in vitro*, difiere en muchos aspectos a una planta que crece *in vivo*, esto, debido a factores ambientales, sustrato, luz y nutrición, mientras que en un ambiente *in vitro* que presenta características como: alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período de incubación, producción de etileno y baja densidad fotosintética, inducen perturbaciones en las plantas.

Por su parte, la micropropagación *in vitro* es una de las técnicas más usadas de cultivo para erradicar patógenos de las plantas, propagar clones sanos en grandes cantidades y en corto tiempo, multiplicar plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales, facilitar el transporte del material *in vitro* de un lugar a otro y posibilitar la multiplicación rápida de una variedad de plantas con ejemplares cada día más escasos.

2.3 Cultivo *in vitro* de especies leñosas

El tratamiento de especies de interés forestal mediante técnicas de cultivos de tejidos comenzó hace más de 50 años, pero hasta la fecha los resultados son limitados a pesar del gran número de especies estudiadas. La aplicación comercial del cultivo de tejidos a especies de interés forestal aumenta continuamente, pudiendo citarse ejemplos satisfactorios para especies del género *Populus*, *Eucalyptus*, *Pinus*, *Sequoias* (Fachinello, *et al*, 2006).

Las especies leñosas se caracterizan por tener tejido lignificado, el cual les proporciona rigidez a la pared celular y resistencia al ataque de diversos microorganismos, impidiendo así, la penetración de las enzimas destructivas a la célula. Las plantas del tipo leñosas son de crecimiento lento y de ciclo vegetativo muy largo. El establecimiento del cultivo *in vitro* de especies de plantas leñosas está en gran medida limitado por la ocurrencia de ciertas características como el oscurecimiento letal en los explantes y en el medio del cultivo, constituyendo un serio y frecuente problema desde el inicio y durante el mantenimiento del tejido cultivado de forma *in vitro* (Leukkanen *et al*, 2000; Cabrera, 2003). Sin embargo, la mayoría de estas especies presentan baja eficiencia en la micropropagación *in vitro*, razón por la cual se le conocen como plantas recalcitrantes (Alexander *et al*, 2000).

El mejor medio reportado por diversos autores para el desarrollo de brotes es el WPM (Wood Plant Medium) suplementado con sacarosa (30 g/L). WPM tiene concentración baja de sales, haciendo favorable al enraizamiento de los explantes

(Aguilar *et al.*, 2010; Ocampo y Núñez, 2007, Yaya *et al.*, 2005). Otros medios utilizados en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas son los de sales basales Murashige Skoog (MS), el medio Murashige Skoog con mínimo orgánico (MSMO) y sacarosa, el medio B5 de Gamborg *et al.*, 1968 y sus derivados (López, 2009).

La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas. Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la aclimatación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a condiciones naturales (Perugorría *et al.*, 2005).

Las actividades de micropropagación *in vitro* de especies leñosas y forestales se iniciaron con estudios de organogénesis y embriogénesis de diferentes especies tales como, cafeto (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo, *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, *Coffea canephora* var, Robusta), guayaba (*Psidium guajava* L.), teca (*Tectona grandis* L.), pino (*Pinus caribaea*), caoba (*Swietenia macrophylla*), majagua (*Hibiscus elatus* L.), morera (*Morus alba* L.) y *Eucaliptus spp.* Hoy en día esta técnica se aplica a más de 140 especies leñosas con mucho éxito, siendo la embriogénesis somática la técnica más importante para este tipo de plantas con la cual se logra un gran número de plantas en periodos cortos de tiempo (Corbino, 2005). En la tabla 5, se muestran algunos de los avances que se han realizado en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas.

Tabla 5. Antecedentes del cultivo *in vitro* de especies leñosas.

Especie vegetal	Tipo de explante	Referencia
<i>Psidium guayaba</i> L.	Brotes o microesquejes	Laffitte, <i>et al.</i> , 2004
<i>Cedrela odorata</i> L.	Semillas	Aponte S. 2008
<i>Gyrocarpus americanus</i> H.	Semilla, tallo y hoja	Sánchez, <i>et al</i> 2012
<i>Quillaja saponaria</i> , M.	Ápices	Vidal Cob, <i>et al</i> , 2016
<i>Juglans neotrópica</i>	Embriones cigóticos	Rocano, M., <i>et al</i> 2017

En los últimos años, la creciente demanda de producción de productos naturales con interés farmacéutico por las grandes industrias, aunado a que el desarrollo de la planta solo aparece una vez al año, es complejo conseguir las hojas, o en algunos casos flores, para realizar las infusiones pertinentes para cada tratamiento que se utiliza. Todo esto hacen necesarios aplicar los avances de la biotecnología vegetal en el cultivo de células y tejidos, como alternativa para producir metabolitos secundarios de interés comercial (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

2.4 Reguladores de crecimiento

El crecimiento y desarrollo de un organismo multicelular no sería posible sin la comunicación entre células, tejidos y órganos. En las plantas superiores, la regulación y coordinación del metabolismo, el crecimiento y morfogénesis suelen depender de señales que van de una parte de la planta a otra. Estas moléculas de señalización, son llamadas “hormonas” y tienen efectos importantes en el desarrollo, a concentraciones muy bajas. Anteriormente, se creía que el desarrollo vegetal estaba regulado solo por cinco grupos de hormonas, auxinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico y giberelinas, sin embargo, existen evidencias de nuevas hormonas esteroides como las estrigolactonas que tienen un amplio rango de efectos a nivel morfológico en el desarrollo vegetal y no actúan solamente como moléculas de señalización celular en la rizosfera, sino que también tienen una función endógena (Gómez-Roldan *et al*, 2008; Umehara *et al*, 2008). Existen también moléculas de señalización que participan en la resistencia a patógenos y defensa contra herbívoros, ejemplo de ellos son el ácido jasmónico, ácido salicílico, entre otros, considerados del tipo elicitores.

Las fitohormonas (Del griego antiguo *φυτόν* (*phuton*, "planta" y hormon "excitado"), son producidas por las células vegetales en sitios específicos, las cuales actúan como mensajeros, regulan los fenómenos fisiológicos de las plantas y son producidas en pequeñas cantidades en los tejidos. Existen varios tipos de fitohormonas con diferentes actividades, por ejemplo, las auxinas, giberelinas, citocininas y etileno, regulan el crecimiento mientras que el ácido abscísico es un

inhibidor del crecimiento. La concentración del regulador de crecimiento es a menudo un factor crucial en la acumulación de productos secundarios. Por ejemplo, para el caso de las auxinas y citoquininas; el tipo y la concentración de auxina o citoquinina o la relación de auxina/citoquinina alteran dramáticamente el crecimiento y producción de metabolitos secundarios en células vegetales, tomando en cuenta que a concentraciones más o menos iguales de las dos hormonas, hace que las células sigan indiferenciadas formando callos, por otra parte, cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado se organiza en raíces y en el caso de que la concentración de citoquinina sea superior, se forman yemas. Con un cuidadoso equilibrio de las dos hormonas se puede producir raíces y yemas, y por lo tanto obtenemos una planta incipiente. (Rost, T. *et al*, 1998; Srivastava, L. *et al* 2002).

Las auxinas pertenecen a la familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, y están relacionadas con la elongación, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y diferenciación de tejidos vasculares. Las más utilizadas son el AIB (ácido indol 1-3 butírico), AIA (ácido indol-3- acético) producidas naturalmente por la planta y el ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) producidas de manera sintética (Remache, 2011). Por su parte el AIA, es la auxina más conocida, producida naturalmente en los ápices adultos de los tallos, meristemas y hojas jóvenes de la yema terminal; desde ahí puede migrar por el floema al resto de la planta en dirección hacia arriba y abajo durante su circulación. La auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical (Suárez, 2011).

Las citoquininas o citocininas, son derivados de la adenina que están asociadas con el proceso de división celular. Entre las más utilizadas, bencil amino purina (BAP) o Bencil adenina (BA), Kinetina (KIN), N6- (delta 2-isopentenil) -adenina (2 IP), Zeatina. (Remache, 2011). BA y KIN son citocininas de tipo sintéticas, mientras que las demás son producidas naturalmente. Generan efectos fisiológicos como división

celular, regulación de la morfogénesis, retraso de la senescencia foliar, rompimiento de la dominancia apical y promueve la maduración de los cloroplastos; en interacción con las auxinas, regulan la diferenciación *in vitro*, mientras que una relación elevada de citiquininas/auxinas da como resultado tallos, por su parte una relación baja de citiquininas/auxinas favorece la producción de raíces (Krikorian, 1995). Estas hormonas son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemas, en la punta de las raíces y son transportadas de abajo hacia arriba, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema, estimulando la división celular en tejidos no meristemáticos (Rojas *et al*, 2004).

Por otra parte, están también las giberelinas que son fitohormonas reguladoras del crecimiento de las plantas, provocan elongamiento de las células y aumentan la extensibilidad de la pared celular (Castro, 2006). La más utilizada es el ácido giberélico (GA₃), usado para estimular la elongación de tallos o la conversión de brotes a tallos, también puede reducir la formación de brotes *in vitro* si se aplica a cultivo de tejidos en la etapa de iniciación (Orozco, 2012). También es un inhibidor de crecimiento que reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo, como formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz (Quemada, 2006).

Otra fitohormona es el etileno, el cual interviene en procesos como la liberación de la dormancia, crecimiento y diferenciación de brotes y raíces, formación de raíces adventicias, abscisión de hojas, flores y frutos, inducción de la floración en algunas plantas, senescencia de hojas, flores y maduración de frutos (Méndez, 2012).

Cada uno de los reguladores de crecimiento, no solo influyen en las respuestas de muchas partes de la planta, sino que todas estas respuestas dependen tanto de la especie, del órgano vegetal, el estado de desarrollo, las concentraciones endógenas y exógenas, las interacciones entre reguladores de crecimiento y los diversos factores ambientales. Por lo tanto, es muy riesgoso generalizar acerca de

los efectos de los reguladores de crecimiento, los procesos de crecimiento y el desarrollo de un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross, 1994).

2.5 Sistema de Inmersión Temporal Automatizado

La producción de tejidos vegetales en cultivo *in vitro* y la multiplicación de plantas en medio líquido, se realiza generalmente por medio de biorreactores, los cuales, representan una mayor posibilidad de generar un mayor número de plantas en menos tiempo y con costos inferiores, si se comparan con los sistemas de producción en medio sólido (Mehrotra S. *et al*, 2007).

Los problemas a superar con la utilización de este sistema, en cuanto a su uso en la multiplicación de plantas, se encuentra, la contaminación por microorganismos (hongos y bacterias) y la deformación de los tejidos causada por la hiperhidricidad o vitrificación, efectos que sufren los explantes sumergidos en el medio de cultivo, afectando la anatomía y la fisiología de las plantas, y por consecuencia, su sobrevivencia (Watt, M.P. 2012).

Debido al constante desarrollo de las técnicas biotecnológicas, se desea lograr un proceso más efectivo en cuanto a la producción de un gran número de plantas, a bajos costos, esto ha traído consigo la necesidad de crear sistemas automatizados que se apliquen al proceso de micropropagación de plantas. Este sistema entonces, ha logrado obtener una mayor tasa de multiplicación y desarrollo de plantas, además, evita que los explantes se sequen y estén en contacto directo con el medio líquido rico en vitaminas y minerales (Cárdenas, 2003).

Los sistemas que utilizan medio líquido son una opción en el proceso de micropropagación, cultivos de células en suspensión, cultivo de raíces (Células, tejidos y órganos), ya que permiten una mayor automatización de la producción masiva de plantas. La eliminación de agentes gelificantes, reduce el costo de los medios de cultivo y la filtración de los mismos elimina la necesidad de esterilizar con ayuda del autoclave. Por otra parte, hablando de la densidad del cultivo, en medio

líquido es mucho mayor que en medio semisólido, esto hace que el espacio necesario para su operación sea mucho menor. La reducción en espacio conlleva a una disminución en los requerimientos de energía para iluminación y refrigeración, lo cual, en forma conjunta, a la disminución de la mano de obra hacen que los costos de operación sean menores (Ewind, G. *et al*, 2008).

Los medios líquidos estacionarios o en agitación pueden ser muy eficientes para algunas especies de plantas, y, además, que poseen la ventaja de no requerir equipos sofisticados para los costos de producción.

Los sistemas de inmersión temporal son una alternativa para evitar los problemas de aireación producidas por el uso de medio líquido, ya que no exponen al explante al medio nutritivo constantemente, sino que consisten en sumergir los explantes durante periodos breves de tiempo y frecuencia, además que se utiliza inyecciones frecuentes de CO₂, favoreciendo el desarrollo y crecimiento de las plantas, e incrementando a su vez, el porcentaje de sobrevivencia y capacidad de fotosíntesis durante la aclimatación (Quiroga, 2005).

Dentro de las principales limitantes de la multiplicación *in vitro* en biorreactores, se encuentran:

Hiperhidricidad: definido como el desorden fisiológico que puede ocurrir en el cultivo de tejidos, frecuentemente observadas en plantas leñosas y herbáceas. Los tejidos que presentan este desorden, muestran una serie de características bioquímicas, anatómicas y morfológicas que los diferencian de los tejidos no hiperhidratados. Los efectos visibles de estos tejidos se describen como una apariencia vítrea con brotes suculentos o turgentes, y carente de sistema radicular. Siendo las hojas los órganos que se muestran más afectados al cultivarse en medios líquidos. Lamentablemente la hiperhidricidad afecta la capacidad de las plantas para sobrevivir luego de trasplantarse, a causa del mal funcionamiento de la actividad fotosintética y del fenómeno de transpiración (Preil, W. 2005).

Estrés oxidativo: Si bien, el oxígeno atmosférico no es una especie reactiva, este puede ser transformado por sistemas metabólicos, en moléculas altamente reactivas, estas especies químicas son conocidas como radicales libres y se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas (Diamantidis *et al*, (2006). Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo el radical hidroxilo, anión superóxido, y peróxido de hidrógeno, como respuesta a estímulos externos e internos, estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares, la inmunidad, y la defensa contra microorganismos. Sin embargo, altas dosis o una eliminación ineficiente de ROS dan lugar a estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas. El peróxido de hidrógeno, no es un radical libre, pero cae en la categoría de las especies reactivas de oxígeno por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los radicales libres, puede difundirse rápidamente a través de membranas celulares y desde ahí causar estrés oxidativo lejos de su sitio de formación.

Daño celular: Diferentes factores ambientales pueden generar ROS, que causan daños oxidativos a las células vegetales. Estos factores incluyen contaminación (contaminación) del aire, daños por anóxicos (anaerobios), congelamiento, temperaturas extremas, alta intensidad de luz y periodos de sequía. Esta última induce cambios fisiológicos como disminución en el potencial hídrico y cierre estomático que resulta en una baja disponibilidad de CO₂, favoreciendo a la reacción en la cual resulta la generación de superóxido, y también se induce la actividad de la glicolato oxidasa, generando así peróxido de hidrogeno. El daño celular producido por las especies reactivas de oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Delgado Olivares, *et al*, 2010).

El Sistema de Inmersión Temporal (RITA®) fue desarrollado en el CIRAD Francia en 1997, este fue logrado a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de los

recipientes, el cual hacia subir el medio de cultivo para bañar así a los explantes que contenían los recipientes, después el medio descendía a la parte inferior por gravedad. Las ventajas del sistema RITA® son simples y confiables, en cuanto a la operación, el poco espacio necesario para el alojamiento que necesitan y el apoyo de los niveles de separación en las dos fases en el sistema, sin embargo, las principales desventajas de estos sistemas están relacionados a la incapacidad para la renovación del medio de nutriente y la falta de opciones para la aireación forzada y enriquecimiento de CO₂.

El funcionamiento del sistema de Inmersión temporal (Figura 4) cuenta de cuatro fases:

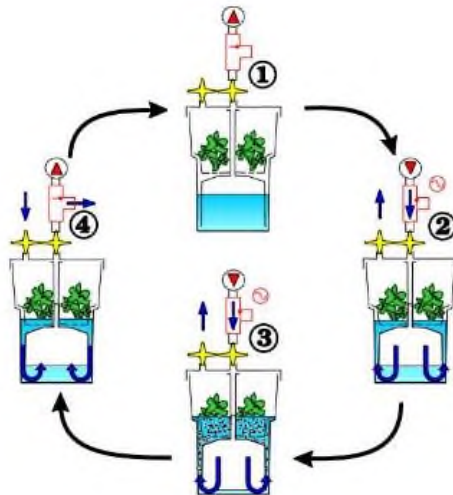


Figura 4. Funcionamiento de un Reactor de inmersión temporal. Recuperado de: <http://www.vitropic.fr/rita>

1. Fase emergida, en este los explantes están libres de medio de cultivo y se encuentran sobre una base rígida.
2. Fase sumergida, está determinada por un periodo corto que es ajustado experimentalmente.
3. En la fase tres se ingresa aire estéril hacia el interior a través de una válvula.
4. En la fase final la presión de aire desplaza al medio hacia la parte alta a los explantes, en este momento se detiene el suministro de aire, la presión se equilibra y el medio baja.

Dicho de otra forma, en el compartimento superior se deposita el material vegetal y en el inferior se encuentra el medio de cultivo. La presión de aire aplicada al sistema empuja el medio de cultivo del compartimento inferior hacia arriba. El material vegetal en la parte superior se mantiene sumergido durante el tiempo que se mantiene la presión del aire aplicada, durante ese tiempo de inmersión, el aire burbujea el medio de cultivo permitiendo oxigenarlo y al mismo tiempo permite renovar el aire acumulado en el espacio de la parte superior por el tubo de escape en la parte superior del biorreactor. Este sistema ha sido ampliamente usado para la propagación de diversos cultivos dentro de los que se pueden mencionar algunos como banana, eucalipto, ñame, entre otros. (Posada *et al*, 2003; Pérez *et al*, 2013).

En cuanto a la operación de estos sistemas, los vasos tipo RITA®, deben ser esterilizados con el medio de cultivo en el compartimento inferior (volumen dependiente del cultivo) son llevados a la cámara de flujo para manipular el material vegetal, el cual debe ser depositado en el compartimento superior y debe asegurarse que la tapa y los filtros deben estar asegurados, posteriormente es conectado al compresor, por una manguera con filtro. Por último, se programan los tiempos y frecuencias de inmersión, en el cual los cultivos estarán en inmersión y no inmersión, respectivamente, generando así un ciclo programado.

En la actualidad se buscan métodos de micropropagación efectivos, algunos de los estudios que se han realizado en sistemas de inmersión temporal se muestran en la Tabla 6. Por ejemplo, especies como *Eucalyptus sp.*, donde el objetivo fue la propagación de brotes y el resultado obtenido fue favorable. Sin embargo, no se muestran cuáles fueron los parámetros exitosos en estos, en la Tabla 6 se enlista de igual forma los estudios aplicados a sistemas de inmersión temporal, con el objetivo principal de propagación o multiplicación de brotes, a partir de semillas o de brotes para la micropropagación de los mismos. En estos estudios mostrados destaca el de Medina-Pérez *et al.*, (2015), donde como resultado de la propagación de brotes de *Castilleja tenuiflora* en condiciones de reducción de nitrógeno, se determinó el efecto en la acumulación de compuestos fenólicos.

Tabla 6. Antecedentes de propagación de diferentes especies vegetales en Sistemas de Inmersión Temporal

Planta	Parte vegetal	Finalidad	Referencias
<i>Saccharum spp</i> <i>Musa sp</i>	--	Propagación	Pérez <i>et al</i> , 2003
<i>Eucalyptus sp</i>	Brotes	Propagación	Mcalister <i>et al</i> , 2005
<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	Semillas	Propagación	Jorge Vílchez <i>et al</i> , 2011
<i>Banbusa vulgaris S.</i>	Brotes	Propagación	González <i>et al</i> , 2012
<i>Psidium guayaba L.</i>	Brotes	Multiplicación	Vílchez y Albany, 2014
<i>Castilleja tenuiflora Benth</i>	Brotes	Estudio del efecto de reducción de N ₂	Medina-Pérez <i>et al</i> , 2015
<i>Pronus avium L.</i>	Brotes	Propagación	Godoy <i>et al</i> , 2017

La duración (t_{inm}) y la frecuencia (F_{inm}) de inmersión son muy importantes para establecer procedimientos de multiplicación eficientes, ya que determinan la absorción de nutrientes y el control de la hiperhidricidad. Etienne y Berthouly (2002) mencionan que la inmersión debe ser corta y espaciada, ya que el contacto prolongado de los tejidos con el medio de cultivo líquido provoca la vitrificación. Además, está reportado que algunas especies no deben ser humedecidas en exceso (Rittershausen y Rittershausen, 2004). Cabe destacar que, los parámetros antes mencionados (F_{inm} y T_{inm}) representan uno de los aspectos más importantes en el funcionamiento, y por ende en la obtención de plantas con características favorables, incluyendo el índice de multiplicación de las mismas, la hiperhidricidad, rendimiento y la calidad, por mencionar algunos.

Diversas especies vegetales se han evaluado con respecto a diferentes tiempos y frecuencias de inmersión, para encontrar el tratamiento más adecuado y así obtener el índice de multiplicación de brotes favorable para cada especie de planta (Tabla 7).

Tabla 7. Antecedentes en Sistema de Inmersión Temporal Automatizado RITA®

Especie vegetal	Material vegetal	Condiciones de operación		IMB	Referencia
		T _{inm} (min)	F _{inm} (h)		
<i>Hevea brasiliensis</i>	Callos embriogénicos	1	1, 12, 24	NR	Martre, <i>et al</i> , 2001
<i>Hypericum perforatum</i>	Brotes meristemáticos	5	3, 24	21	Sobayet, <i>et al</i> , 2003
<i>Scutellaria baicalensis</i> G.	Segmentos nodales	5	3	NR	Sobayet, <i>et al</i> , 2004
<i>Phalaenopsis spp.</i>	Protocormos	1	4	8	Tirado, <i>et al</i> , 2005
<i>Camportheca acuminata</i>	Segmentos de hipocotilo	1	6	22	Sankar-Thomas, <i>et al</i> , 2008
<i>Castilleja tenuiflora</i> B.	Brotes	5	12	9	Valdez-Tapia, <i>et al</i> , 2014
<i>Stevia rebaudiana</i>	Brotes	2	12	20	Rosales, <i>et al</i> 2018

IMB: índice de multiplicación de brotes (por explante) reportado. NR: No reportado

2.6 Técnicas para la detección de compuestos antioxidantes

Se le llama radical libre (RL) a cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que llega a presentar uno o más electrones desapareados en su estructura, estos se caracterizan por ser altamente reactivos, lo que hace que tengan una vida media corta (milisegundos). Los radicales libres también se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS). A concentraciones bajas los radicales libres son necesarios para el buen funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular o actuando como mediadores para la activación de las células. Sin embargo, un desbalance entre la generación y eliminación puede llegar a ocasionar acumulación hasta niveles tóxicos, dando como resultado la oxidación de macromoléculas, daño a las membranas e induciendo la muerte celular. La capacidad que pueda tener cada radical libre para actuar como un agente oxidante, está determinado por factores como su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. Son los responsables del daño oxidativo de

macromoléculas biológicas como el DNA, lípidos, carbohidratos y proteínas, participan también en los mecanismos fisiopatológicos de distintas enfermedades, como algunos tipos de cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares y patologías gastroentéricas, por mencionar algunos (Agudo-Medina, 2002).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se fundamentan en compuestos generadores de radicales libres. Dichos radicales reaccionan con la muestra y en relación a la capacidad antioxidante de esta, se inhibe la generación de radicales y de esta forma se neutralizan los radicales libres. Lo ideal sería medir la actividad antioxidante de cada componente de la muestra por separado, sin embargo, en el caso de extractos vegetales, es difícil determinar el número y concentración de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra. Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, es por esto que con un solo método no es posible evaluar el mecanismo diferente de acción de un compuesto antioxidante, por lo que es de gran ayuda trabajar con varios métodos, para facilitar la comparación e interpretación de los datos.

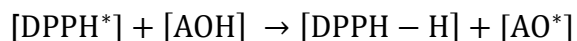
2.6.1 Método del ABTS⁺ (Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6- sulfónico).

El radical ABTS⁺ es generado a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible.

Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación *in vivo*, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68 V). La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso (Ronald L. Prior, 2005).

2.6.2 DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

El ensayo se basa en la medición de la capacidad de eliminación de los antioxidantes. El electrón extraño del átomo de nitrógeno en el DPPH• se reduce para recibir un átomo de hidrógeno de los oxidantes a la hidracina correspondiente. El DPPH• se caracteriza por ser un radical libre, estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su totalidad, de modo que las moléculas no se dimerizan, como la mayoría de los otros radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta, con la absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm, al mezclar la solución de DPPH• con una sustancia que pueda donar un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida y el color violeta desaparece. El esquema de reacción entre el DPPH• y un antioxidante, podemos representarla de la siguiente manera:



Es utilizado para evaluar el efecto antioxidante y actividad de compuestos o extractos específicos, para el caso de los extractos se dejan reaccionar con un radical estable, el DPPH• en una solución de metanol. La reducción de DPPH• es el control de la disminución de su absorbancia a una longitud característica de onda

durante la reacción. En su forma radical, el DPPH absorbe a 515 nm, sin embargo, muestra una fuerte banda de absorción a 517 nm debido a su extraño electrón y la solución tiene un color violeta intenso, la absorción se desvanece cuando el electrón desaparece (Brand-Williams, 1995). Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH• (Ramos-Llica, *et al* , 2008).

Se considera un método rápido, simple, económico y ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos para actuar como eliminadores de radicales libres, o bien, como donantes de hidrógeno y para evaluar la actividad antioxidante de alimentos. Este ensayo también se ha utilizado con éxito para investigar las propiedades antioxidantes del grano de trigo, las verduras, ácido linolécicos conjugados, los aceites de semillas comestibles, y harinas en varios solventes, incluidos etanol, metanol, alcohol y benceno. Es importante resaltar que se debe llevar a cabo la reacción de la muestra con DPPH• diluido en metanol/agua, lo que facilitaría la extracción de compuestos antioxidantes de la muestra. La ventaja de este método es que se permite que el DPPH• reaccione con toda la muestra y en el tiempo suficiente, dado que el método permite que este reaccione lentamente incluso con antioxidantes débiles, la eficiencia del antioxidante se mide a temperatura ambiente para eliminar el riesgo de degradación térmica de las moléculas analizadas.

La concentración eficiente 50 (CE₅₀), es utilizada para la interpretación de los resultados del método de DPPH. Esta se define como la concentración de sustrato que causa una reducción del 50% en el color del DPPH•. Sin embargo, este parámetro tiene el inconveniente de que, a mayor actividad antioxidante, menor es el valor de la EC₅₀.

3. JUSTIFICACIÓN

Tecoma stans es una planta ampliamente usada en la medicina tradicional para el tratamiento de distintas afecciones, principalmente la diabetes, padecimientos digestivos como dolor de estómago y gastritis, por mencionar algunos. Es por eso que resulta de gran interés para aplicaciones comerciales, la obtención de nuevos metabolitos implicados en el tratamiento de distintas enfermedades.

Diversos estudios se han realizado en cuanto a identificación fitoquímica y de evaluación de actividad biológica de los metabolitos presentes en las distintas partes de *T. stans*, el interés principal para generar estos estudios es que existen grupos de compuestos de las plantas implicadas en el tratamiento de la diabetes, como son los compuestos fenólicos y flavonoides conocidos por sus propiedades antioxidantes, por lo que es de interés para este estudio producir estos compuestos de la planta utilizando una alternativa biotecnológica como lo es el cultivo *in vitro*, además de ser esta una alternativa sustentable, nos proporcionará una cantidad de planta adecuada para realizar nuestro estudio, con crecimiento rápido, aumentando el rendimiento la planta y asegurando así un material vegetal constante libre de cualquier patógeno o contaminante, utilizando la herramienta de Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®) debido a que este es automatizado, permitirá la multiplicación de nuestros brotes en un tiempo corto y la obtención de compuestos de interés como son los compuestos fenólicos, con la metodología propuesta.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos de brotes de *T. stans* en un reactor de inmersión temporal automatizado (RITA®), incrementan el índice de multiplicación de brotes, la producción de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Establecer el cultivo de brotes de *T. stans* en un reactor de inmersión temporal automatizado (RITA®) y evaluar la producción de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la influencia del tiempo y frecuencia de inmersión en sistema RITA® en la multiplicación y características de los brotes de *T. stans*.
2. Cuantificar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de extractos hidroalcohólicos de brotes de *T. stans* obtenidos bajo las mejores condiciones del sistema RITA®.
3. Analizar el perfil cromatográfico por UPLC de extractos hidroalcohólicos de brotes de *T. stans* obtenidos de las mejores condiciones del sistema RITA®

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Las semillas fueron recolectadas de ejemplares de *T. stans* que se encuentran en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, en los meses de Abril y Mayo del año 2017, en el Municipio de San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca. Localizada en Avenida Circuito Central #200, Colonia Parque Industrial (Figura 5).

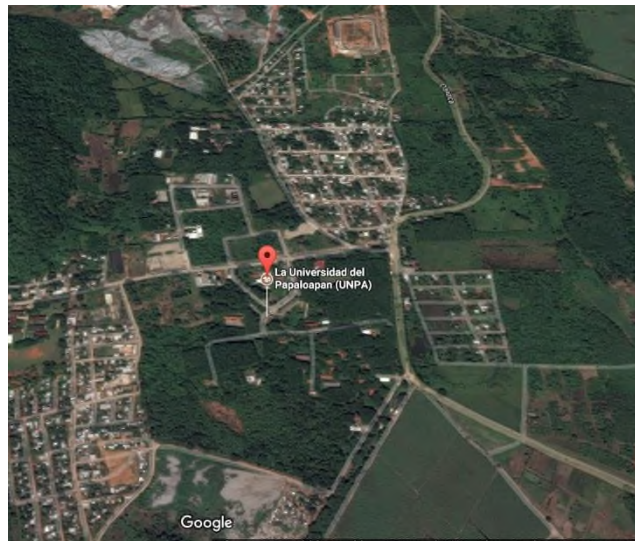


Figura 5. Ubicación geográfica Universidad del Papaloapan. El punto rojo muestra la ubicación de la zona de recolección del material vegetal. (Fuente: Google Maps).

5.2 Establecimiento del cultivo *in vitro* de *T. stans*

5.2.1 Método de desinfección de semillas

Las semillas fueron desinfectadas, se le retiró mecánicamente la capa que cubre a la semilla, posteriormente se lavaron con 100 mL de una solución de jabón comercial (marca Roma) de 2 a 3 veces, hasta haberse asegurado de retirar toda la capa que cubre la semilla, posteriormente se enjuagaron con 200 mL de agua por cada 50 semillas utilizadas. En campana de flujo laminar, las semillas fueron

desinfectadas con NaOCl 2% durante 2 min aproximadamente, se lavaron con agua estéril de dos a tres veces previa a ser puestas en medio de cultivo.

5.2.2 Germinación de semillas

El medio de cultivo para germinación de las semillas fue 4.4 g/L de medio basal con vitaminas Murashige y Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962) mínimo orgánico, se añadió 30 g/L de sacarosa como fuente de carbono y 2.7 g/L de Phytigel®, ajustando el pH a 5.8, previo a la esterilización (121 °C por 15 min con presión interna de 124 kPa ó 18 Psi). Las semillas se incubaron a condiciones de 25 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad (López-Laredo, *et al*, 2009).

5.2.3 Propagación de plántulas

Después del tiempo de germinación de las semillas (5 días), los germinados se expusieron a la luz (condiciones del fotoperiodo) hasta que alcanzaron un tamaño aproximado de 3 a 5 cm. Después se trasplantaron a medio para crecimiento de plántulas, el cual consistió de 4.4 g/L de medio MS con mínimos orgánicos, sacarosa 3 g/L, 2.7 g/L de Phytigel®, 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA) y 1 mg/L de bencilaminopurina (BAP). El pH fue ajustado a 5.8 previamente en condiciones de esterilización (121 °C por 15 min con presión interna de 124 kPa o 18 psi).

5.3 Cultivo de brotes de *T. stans* en sistema de inmersión temporal automatizado (RITA®)

5.3.1 Condiciones experimentales

Se utilizaron biorreactores de inmersión temporal de plástico polisulfona de 0.9 L de volumen nominal (cámara superior con capacidad de 0.4 L y una capacidad de cámara inferior de 0.5 L) (Sigma No. Cat. Z373206) y 0.2 L de volumen de trabajo. Para ello, se implementó el sistema de trabajo que constó principalmente del biorreactor, el suministro de aire y un temporizador digital programable para

controlar la duración y la frecuencia de la inmersión. El aire se suministró mediante bombas Elite Máxima R, con capacidad de 30 gal/min para 3 biorreactores cada una; el flujo de aire fue de 0.8 a 1 L/min que se reguló con un medidor de flujo de área variable de 150 mm con válvulas y cuerpo de aluminio, conexión de 1/8" y máximo flujo de aire de 1682 mL/min, flotador de acero inoxidable 316 (Cole-Parmer). El sistema implementado permitió trabajar hasta seis biorreactores de manera simultánea.

Cada unidad RITA® fue inoculado con 20 explantes de tamaño uniforme de 1.0 cm a 1.5 cm por cada 200 mL de medio MS suplementado con 0.5 mg/L de ácido indolacético (IAA), 1 mg/L de bencilaminopurina (BAP) y 30 g/L de sacarosa. Los explantes utilizados fueron obtenidos de la propagación de plántulas previamente descrita. Todos los cultivos se mantuvieron a 26 ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad.

5.3.2 Influencia de la duración y frecuencia de inmersión

Se evaluó el efecto de la duración de la inmersión (t_{inm}) y la frecuencia de inmersión (F_{inm}) (Tabla 8). Cada experimento se realizó por triplicado cada 3 semanas.

Tabla 8. Diseño de experimentos para evaluar la influencia de la duración (t_{inm}) y la frecuencia de inmersión (F_{inm}).

Experimento	Duración, t_{inm}	Frecuencia, F_{inm}	Tiempo total de inmersión por día
RtsI	5 min	3 h	40 min
RtsII	2 min	4 h	12 min
RTsIII	1 min	4 h	6 min
RtsIV	3 min	12 h	6 min

Después de 21 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables de respuesta:

- Número total de brotes
- IMB: Número de brotes cosechados / Número de brotes inoculados
- Altura de los brotes (cm)
- Cantidad de biomasa (fresca y seca, en gramos)
- Eficiencia de formación de raíz (EFR%): (Número de brotes con raíz/Número total de brotes) x 100 (Murch *et al.*, 2004)
- Vitrificación* (%): (Número de hojas vitrificadas/Número de hojas totales) x 100 (Jausoro *et al.*, 2010).

*Se evaluó la vitrificación de acuerdo a las características que presentaban los brotes a través de la observación.

Al término del periodo de cultivo de cada uno de los biorreactores, se cosechó toda la biomasa, se lavó con agua destilada, se removió el excedente de agua con papel previamente esterilizado y se pesó (base fresca). Posteriormente, se conservó a 4 °C hasta su análisis.

5.4 Preparación de los extractos hidroalcohólicos

Los extractos hidroalcohólicos se obtuvieron pesando 20 mg de muestra (brotes provenientes de los biorreactores secados en liofilización para posteriormente ser pulverizados y tamizados) y mezclando con 100 mL de etanol-agua (1:1), posteriormente la mezcla se colocó en un recipiente de extracción con camisa y se sometió a tratamiento de ultrasonido por 15 min a amplitudes que corresponde a 100 % de potencia de salida (400 W). Después de la extracción, se centrifugó la mezcla por 10 min. El sobrenadante obtenido se concentró en un Rotavapor / Evaporador Rotatorio (RE100-PRO DragonLab), posteriormente a sequedad mediante liofilización (Liofilizadora LABCONCO FreeZone 4.5 L) y finalmente se almacenó en viales ámbar a 4 °C hasta su análisis.

5.5 Evaluación de la actividad antioxidante

5.5.1 Ensayo cualitativo *in situ* de la actividad antioxidante

La actividad de eliminación de radicales libres de los extractos obtenidos a partir de los brotes se determinó cualitativamente por CCF, usando como revelador DPPH• (Anandjiwala *et al.* 2007). Se colocó una alícuota de 5 μ L aproximadamente de extracto (50 μ g/mL) en una placa de CCF de 5x5 cm (gel de sílice 60 F254, Merck), la fase móvil utilizada fue la mezcla de acetona:acetato de etilo: metanol: agua (100: 13: 5: 10, v/v/v). La capa de sílice fue teñida, con ayuda de un rodillo de algodón sumergido en la solución de DPPH•, se dejó secar por 5 min para lograr observar las bandas de la muestra, las cuales mostraron un fondo púrpura y bandas amarillas que corresponden a los componentes de los extractos con capacidad antioxidante.

5.5.2 Actividad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

La capacidad antioxidante se analizó con base en el método Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución al 60 mM de DPPH (D9132-1G, Sigma-Aldrich) en 2 mL de metanol absoluto (se colocó en tubo de vidrio ámbar porque el reactivo es fotosensible), a partir de esta solución se tomaron 0.8 mL y se agregaron 39.2 mL de metanol y se llevó a un volumen final de 40 mL con la finalidad de que la concentración inicial de DPPH fuera de 60 μ M (absorbancia de 0.78 a 0.82 a $\lambda=515$ nm). La mezcla de reacción consistió en 100 μ L de muestra de extracto (partiendo de un stock de 2.5 mg/mL) más 3.9 mL de DPPH; se agitó en un vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente y oscuridad por 6 min. Transcurrido el tiempo de reposo se midió su absorbancia a 515 nm. El blanco consistió en 100 μ L de metanol. Se construyó una curva patrón de Trolox entre 0-25 μ M. Todas las determinaciones de cada muestra se hicieron por triplicado. La actividad antioxidante fue expresada como μ mol Trolox/g extracto seco y como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH•

neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\%Inhibición = \frac{A_b - A_m}{A_b} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

A_b = Absorbancia del blanco

A_m = Absorbancia de la muestra

5.5.3 Actividad antioxidante por el método ABTS[•]

La cuantificación de la actividad antioxidante por ABTS[•] se llevó a cabo utilizando el método propuesto y descrito por Li *et al.* (2008). Se prepararon 5 mL de una solución de ABTS 7 mM disolviendo el reactivo en persulfato de potasio a 2.45 mM; inmediatamente se dejó incubar la reacción a temperatura ambiente y oscuridad toda la noche. Una vez formado el radical se tomaron de esta mezcla 1.5 mL y se diluyó adicionando metanol absoluto hasta obtener lecturas de 0.7 + 0.05 a $\lambda=734$ nm. La mezcla de reacción consistió en 50 μ L de muestra (partiendo de una solución de 2.5 mg/mL) más la adición de 1.9 mL de ABTS[•] diluido; se agitó en un vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad por 6 min, transcurrido el tiempo de reposo se midió la absorbancia a 734 nm. El blanco consistió en 50 μ L de metanol más todo el tratamiento. Se construyó una curva patrón de Trolox entre 0-2.5 μ M. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. La actividad antioxidante fue expresada como μ mol de Trolox/g extracto seco y porcentaje de inhibición de ABTS[•] fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Dónde:

A_c : Absorbancia control

A_m : Absorbancia de la muestra

5.6 Análisis químicos

5.6.1 Análisis fitoquímico por cromatografía en capa fina

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se emplearon placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck (20 x 20 cm, 2 mm de espesor). El seguimiento de la separación de los compuestos se llevó a cabo a través de la observación de los perfiles cromatográficos bajo la luz ultravioleta (longitud de onda corta ($\lambda = 254$ nm y longitud de onda larga $\lambda = 365$) con una lámpara (UVP J-124, USA).

Para la visualización de los grupos de metabolitos en los extractos se utilizaron los siguientes reveladores:

- Solución 4-hidroxibenzaldehído: 0.5 mg de 4-hidroxibenzaldehído (Merck), 90 mL de etanol y 10 mL de ácido sulfúrico al 98%: La coloración azul Copenhague y café indicó la presencia de iridoides, magenta y amarillo ocre feniletanoides (Wagner et al., 1996)
- Solución vainillina-H₂SO₄: 0.5 mg de vainillina (marca), 100 mL de etanol y 5 mL de ácido sulfúrico (10%). La coloración café y azul indicaron la presencia de terpenos, coloración amarilla feniletanoides y coloración purpura y rosado compuestos de aceite esencial.
- Luz UV de longitud de onda de 254 nm y Luz UV de longitud de onda de 365 nm.

$R_f = L_1/L_2$; en donde L1 corresponde a la distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente y L2 es la distancia del frente del solvente (Lorenzo, *et al.*, 2006), (Ramirez, 2009).

5.6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu reportado Shohael *et al*, (2006) con algunas modificaciones. Se mezclaron 10 mg de brotes con 2.5 mL de agua desionizada después se le adicionó de 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 6 min antes de añadir 0.5 mL de carbonato sódico (20% p/v), seguido de una mezcla suave. El extracto sin el reactivo se utilizó como blanco. Después de 30 min, se presencié el color característico y se midió la absorbancia a $\lambda = 760$ nm. El contenido total de compuestos fenólicos se determinó usando una curva estándar preparada con ácido gálico (0-25 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados que se obtuvieron, se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto seco. Las muestras biológicas se analizaron por triplicado.

5.6.3 Cuantificación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se determinó mediante un ensayo colorimétrico (Shohael *et al.*, 2006). Se mezcló la muestra de extracto de 10 mg 1.25 mL de agua desionizada y 0.075 mL de NaNO_2 (5%, m/v), seguido de otra mezcla lenta en un vórtex y se mantuvo a temperatura ambiente durante 6 min. Después se añadió 0.15 mL de AlCl_3 (10%, m/ v). Pasado 5 min, se añadió 0.5 mL de NaOH (1 M) y 2.5 mL de agua desionizada. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la absorbancia a $\lambda = 510$ nm. El extracto se utilizó como un blanco. Se utilizó quercetina y catequina para hacer las curvas de calibración y los resultados del contenido total de flavonoides se expresaron como mg equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de extracto seco. Las muestras se analizaron por triplicado.

5.6.4 Instrumentación y condiciones de análisis de metabolitos en *T. stans* mediante UPLC-PDA-HRMS

Para la determinación de verbascósido y análisis de metabolitos en extractos de cultivos de *T. stans*, se utilizó el sistema cromatográfico UHPLC Acquity (Waters), equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador, automuestrador, horno de columna y detector de fotoarreglo de diodos (PAD). La manipulación instrumental y el análisis de datos cromatográficos y espectrales se llevó a cabo con el programa Empower 3 (Waters). Los datos espectrales fueron capturados en el intervalo de 200 a 600 nm y los cromatogramas fueron registrados a 330 nm. Para la cuantificación de verbascósido se inyectaron soluciones conteniendo este estándar en metanol acuoso al 20 % (v/v) con las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 y 200 ppm (Anexo 3).

Para la determinación de la masa exacta de los metabolitos presentes en dichos extractos, se utilizó un sistema cromatográfico UPLC Class I (Waters) equipado con una bomba binaria, desgasificador, automuestrador, horno de columna; acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Synapt G2-Si (Waters) equipado con fuente de ionización por electronebulización, filtro de masas de cuadrupolo sencillo, celda de colisiones CID y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF). La programación instrumental, el análisis de datos cromatográficos y espectrales se llevó a cabo con el programa Masslynx 4.1 (Waters). Las condiciones de operación del espectrómetro de masas fueron las siguientes: ionización en modo negativo, voltaje de capilar 3000 V, voltaje de cono 40 V, temperatura del capilar 120 °C, temperatura de desolvatación 350 °C, gas de cono 50 L/h, gas de desolvatación 800 L/h, presión del nebulizador 6 Bar. La adquisición de datos espectrales se realizó en modo centroide con una ventana espectral de 50 a 1000 m/z, con una resolución de 25,000, velocidad de adquisición de 0.4 s. Para la corrección de masa exacta se introdujo continuamente el compuesto de referencia Leucina-Encefalina ($m/z = 554. 2615$).

El desarrollo de las condiciones de separación se llevó a cabo a una temperatura de 40 °C con una columna Luna Omega 1.6 µm C18 (150 x 2.1mm, Phenomenex). Para lograr la separación de los analitos hasta línea base, se inyectó 1 µL de muestra y se utilizaron dos fases móviles con un flujo de 180 µL/min: A) ácido acético acuoso al 1 % (v/v) y B) metanol:acetonitrilo 1:1; con el siguiente gradiente: min 0, 90 % A; min 25, 70 % A; min 26, 50 % A; min 27, 90 % A, min 40 90 % A.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa SigmaStat v. 3.5. En aquellos casos en los que los datos presentaron una distribución normal, fueron analizados de acuerdo con un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia de 95%. Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey en aquellos casos en los que los datos no presentaron una distribución normal.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo *in vitro* de *T. stans* en medio sólido

Con el objetivo de obtener plántulas de *T. stans* y de explorar la factibilidad de establecer el cultivo *in vitro* de esta especie, se utilizaron 240 semillas (Figura 6A) obteniendo un porcentaje de germinación del 81.25% (195 semillas germinadas) (Figura 6B).

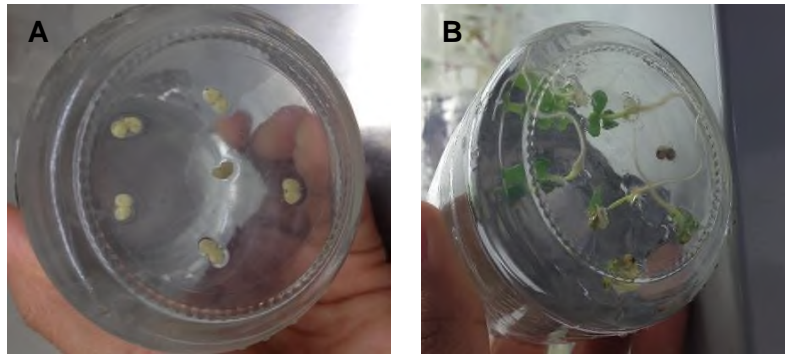


Figura 6. Germinación de semillas de *T. stans* *in vitro*. A. Inoculación de semillas B. Semillas germinadas.

Después de la germinación de semillas las plántulas fueron sembradas en medio MS sin reguladores de crecimiento, para evaluar su desarrollo. Se observaron que a la tercera semana las plantas alcanzaban la altura aproximada de 10 cm, con formación de raíces y presentaban un aspecto saludable (sin marchitez, necrosis, vitrificación, contaminación u oxidación.) (Figura 7).



Figura 7. Establecimiento de cultivo de *T. stans* *in vitro* en medio sólido

6.2 Cultivo *in vitro* de *T. stans* en Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®)

Para definir las condiciones de operación en el biorreactor de inmersión temporal, en esta etapa del trabajo se evaluó la influencia de la duración y la frecuencia de la inmersión en las características de los brotes (Figura 8, Tabla 9). Se observó que el IMB varió entre 3 y 2 brotes/explante dependiendo de la condición de operación sin haber diferencia significativa (Tabla 9) ($p > 0.05$). Lo que en forma práctica implica que el número de brotes que se obtienen por cada biorreactor varía entre 45 y 30 brotes cada 21 días de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos Tabla 9, se tiene que los brotes de *T. stans* midieron entre 4.6 y 3.5 cm de altura (RTsI y RTsII, respectivamente) fue en la condición RTsI (5 min cada 3 h) donde se presentó la mayor altura ($p < 0.05$). Dicha condición, fue la de mayor tiempo total de inmersión (40 min/día), sin embargo presentó baja vitrificación (5%) lo que coincide con la mayor cantidad de biomasa fresca ($p < 0.05$), puesto que a menor presencia de vitrificación los brotes obtenidos pueden desarrollarse favorablemente y no presentar daño o muerte de tejido, característico de esta condición. En RTsI y RTsII se obtuvo la mayor cantidad de biomasa seca, 0.64 g y 0.49 g, respectivamente. En RTsIII y RTsIV se presentó el menor número de brotes y la mayor vitrificación. Los brotes obtenidos en RTsI presentaron un 20% de EFR ($p < 0.05$).



Figura 8. Resultados del experimento RTsI, con 5 min y 3 h de tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión, respectivamente.

Tabla 9. Características de los brotes de *T. stans* desarrollados en cultivo en inmersión temporal con diferente duración (t_{inm}) y frecuencia de inmersión (F_{inm}) después de 21 días de cultivo.

Tratamiento	Duración, t_{inm}	Frecuencia, F_{inm}	IMB	Altura de brotes (cm)	Biomasa fresca (g)	Biomasa seca (g)	% EFR	%HI
RtsI	5 min	3 h	3.00±0.40 ^a	4.60±0.30 ^a	14±0.67 ^a	0.64±0.03 ^a	20.00±0.40 ^a	5±0.43 ^a
RtsII	2 min	4 h	1.80±0.80 ^{ab}	3.50±0.90 ^b	9±0.92 ^b	0.49±0.05 ^b	9.00±0.12 ^b	8±0.12 ^b
RTsIII	1 min	4 h	0.60±0.20 ^b	0.70±0.12 ^c	3±0.70 ^c	0.16±0.04 ^c	0.00±0.00 ^c	45±0.62 ^c
RtsIV	3 min	12 h	0.88±0.08 ^{bc}	0.30±0.07 ^c	5±0.32 ^d	0.27±0.02 ^d	0.00±0.00 ^c	57±0.77 ^d

IMB (índice de multiplicación de brotes) = Número de brotes cosechados del sistema RITA® / Número de brotes iniciales en el sistema RITA®. **EFR** (Eficiencia de formación de raíz) = (Número de brotes con raíz/ Número total de brotes) x100%. **HI** (Hiperhidricidad/ Vitrificación) = (Numero de hojas hiperhidratadas /Número de hojas totales) x 100 %. **Altura de brotes:** Representa la altura del brote medida al final del experimento. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. Altura: n=40, IMB, biomasa: n=3; EFR: n=40. En cada columna, letras iguales indican que no hay diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

La Figura 9 muestra hojas de los brotes sin y con vitrificación obtenidas en los biorreactores de inmersión temporal. Los síntomas de hiperhidricidad en los brotes, se observaron después de 1 semana hasta el final del cultivo, cuando comenzaron a mostrar hojas frágiles, translúcidas y rizadas con un color verde más pálido que el de los brotes normales.

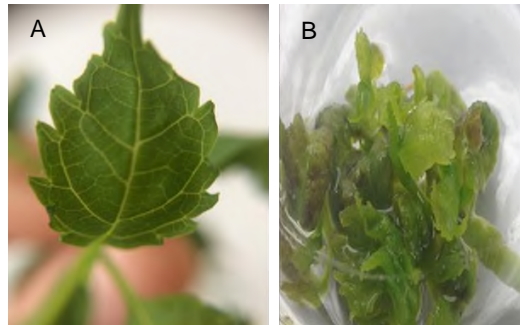


Figura 9. Hojas de los brotes de *T. stans* cultivadas en condiciones de RITA a los 21 días de cultivo. A. Hojas normales del tratamiento Rtl (5min cada 3h). B. Hojas con vitrificación de brotes bajo el tratamiento RtlV (5 min cada 12h).

El análisis estadístico de la duración y frecuencia de inmersión involucrados en las variables de respuesta IMB, altura, producción de biomasa fresca, producción de biomasa seca y en la EFR se realizó mediante un ANOVA de una vía, realizado de forma independiente buscando la mejor duración de inmersión y posteriormente la mejor frecuencia de inmersión sobre las variables de respuesta evaluadas. Se observó que el factor duración presentó una mayor influencia sobre IMB, altura, BF, BS y %HI con una F mayor a 149.9 y una $P < 0.001$ (Tabla 10), de forma similar el factor frecuencia de inmersión mostró el mismo efecto en las mismas variables evaluadas antes mencionadas. La interacción duración-frecuencia no fue evaluada dado que solo se realizó un primer acercamiento sobre los posibles efectos del tiempo y frecuencia de inmersión en un cultivo de *T. stans* en RITA.

Tabla 10. Efecto significativo de los factores duración y frecuencia de inmersión en el cultivo de brotes de *T. stans*.

Variable	Factor	
	Duración (t_{\min})	Frecuencia (F_{imm})
IMB	SI (F=10.57, P=0.004)	SI (F=7.82, P=0.011)
Altura	SI (F=286.6, P<0.001)	SI (F=10.42, P=0.005)
Biomasa fresca	SI (F=149.9, P<0.001)	SI (F=12.32, P=0.003)
Biomasa seca	SI (F=255.1, P<0.001)	SI (F=6.15, P=0.021)
%HI	SI (F=5190, P<0.001)	SI (F=42.81, P<0.001)

Las dos mejores condiciones de operación de los biorreactores: RTsI (5 min cada 3 h) y RTsII (2 min cada 4h) fueron seleccionadas con base en los resultados para la variable IMB para continuar el trabajo.

6.3 Actividad antioxidante

6.3.1 Actividad antioxidante *in situ*

Con la finalidad de detectar si los extractos de brotes de *T. stans* cultivados en las dos mejores condiciones de los reactores de inmersión temporal utilizando los tratamientos RTsI (5 min cada 3 h) y RTsII (2 min cada 4h) presentaban actividad antioxidante, se realizó un ensayo *in situ* con DPPH. La Figura 10 muestra que en los extractos de las dos condiciones de cultivo en el biorreactor analizadas (RTsI y RTsII) se revelaron bandas que reaccionaron con el DPPH reduciéndolo a un compuesto de color amarillo en contraste con el fondo morado del DPPH observándose la presencia de compuestos con capacidad antioxidante. Para el tratamiento RTsI se observaron tres bandas definidas, mientras que para el extracto del tratamiento RTsII se pudieron observar dos bandas. El efecto de los antioxidantes en la eliminación de radicales DPPH, se debe a su capacidad de donación de H^+ o la capacidad de eliminación de radicales. Este resultado indica

que los extractos presentan actividad antioxidante *in situ* por lo que se procedió a cuantificarla.

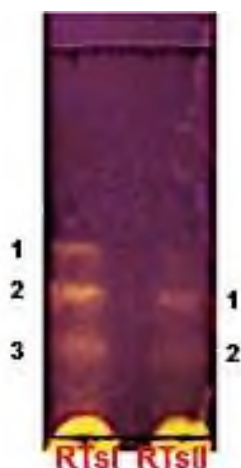


Figura 10. Ensayo *in situ* para la detección de la actividad antioxidante utilizando DPPH, en extractos de brotes de *T. stans* cultivados en RITA®.

6.3.2 Cuantificación de la capacidad antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante se determinó por dos modelos *in vitro*, de los cuales dos están fundamentados en la captura de radicales libres (DPPH y ABTS). La capacidad de captura de radicales libres de los extractos de acuerdo con el método de DPPH varió entre 550.19-643.16 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto, mientras que según el método de ABTS es de 668.15-811.91 $\mu\text{mol Trolox/g}$ extracto (Tabla 11). Dependiendo del método de medición, los valores más altos de este atributo correspondieron a condiciones de cultivo diferente. Debido a que los extractos analizados eran ricos en clorofilas (hojas y tallos) es probable que esta molécula haya interferido con la reacción de DPPH• (Sudhakar and Singh, 2008) por lo que es más conveniente apoyarse en el resultado obtenido por ABTS• (Re *et al.*, 1999; Pulido *et al.*, 2003).

Tabla 11. Actividad antioxidante de extractos de brotes de *T. stans* obtenidos por cultivo en inmersión temporal.

Tratamiento	Duración, t_{inm}	Frecuencia, F_{inm}	DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g E.S}$)	% Inhibición	ABTS ($\mu\text{mol Trolox/g E.S}$)	% Inhibición
RtsI	5 min	3 h	643.16 \pm 0.40 ^a	77.50	811.91 \pm 0.38 ^a	96.07
RtsII	2 min	4 h	550.19 \pm 0.38 ^b	67.76	668.15 \pm 0.23 ^b	99.28

Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar (n=3). En cada columna, letras iguales indican que no hay diferencias significativas según la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

6.4 Análisis químico

6.4.1 Detección de metabolitos por cromatografía en capa fina

Los brotes de *T. stans* fueron cultivados en las dos mejores condiciones de los reactores de inmersión temporal utilizando los tratamientos RTsI (5 min cada 3 h) y RTsII (2 min cada 4h) y se comparó el perfil fitoquímico por CCF, con los brotes de plántulas en medio sólido, con 2 meses de edad, proveniente de extracto hidroalcohólico de cada una de ellas (Figura 11). En este análisis se identificó la presencia de varios grupos de compuestos como feniletanoides, terpenos y aceites esenciales.

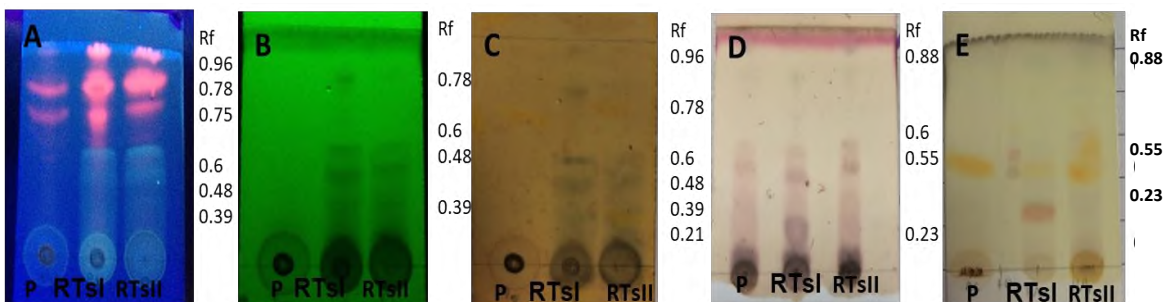


Figura 11. CCF de los extractos de *T. stans* revelados y observados con: A. Luz UV 245 nm, B. luz UV 365 nm, C. cloruro férrico, D. vainillina- H_2SO_4 , E. 4-Hidroxibenzaldehído. P. Extracto de plántulas *in vitro*, RTsI: 5 min cada 3 h; RTsII: 2 min cada 4 h.

Así mismo estos compuestos se hicieron visibles dependiendo del tipo de revelador utilizado, con ayuda de Luz UV (A y B) se observó una cantidad de bandas diferentes en los dos casos, 6 y 4 bandas, respectivamente. Coincidiendo en 3 con su mismo Rf. Mientras que al ser revelados con Vainillina-H₂SO₄ y 4-Hidroxibenzaldehído (D y E); la coloración café y azul indicó la presencia de compuestos del tipo terpenos, en color púrpura compuestos de aceite esencial, y para la placa E, las bandas de color magenta y amarillo indicaron la presencia de feniletanoides.

Se calculó también el factor de retención (Rf), de cada una de las bandas visualizadas en las placas cromatográficas, el número total de bandas para cada placa fue distinta, sin embargo entre ellas coincidían según el valor del Rf, esto debido a que como se describió anteriormente, cada tratamiento proviene de un experimento en condiciones distintas, podemos observar que la placa A y C tienen el mismo número de bandas pero los Rf distintos, no obstante en todas las placas existe la presencia del mismo compuesto que tiene un Rf de 0.6.

7.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

De acuerdo a los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 12 y con base en el análisis estadístico, los brotes de *T. stans* obtenidos mediante la condición RTsI acumularon 2.1 más de compuestos fenólicos totales (73.1 ± 2.9 mg EAG/g de extracto, $p < 0.05$) en comparación a la condición RTsII (33.8 ± 4.4 mg EAG/g de extracto). De manera similar, en los brotes de RTsI se presentó la mayor concentración de flavonoides (97.4 ± 4.7 mg EC/g) seguido del tratamiento RTsII (54.2 ± 0.2 mg EC/g). De las dos condiciones de cultivo, la RTsI corresponde a una duración de inmersión más alta (40 min/día) (Tabla 12).

Tabla 12. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de extractos obtenidos en RITA® de *T. stans*.

Tratamiento	Duración, t_{inm}	Frecuencia, F_{inm}	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g ES)	Flavonoides totales (mg EQ/g ES)
RtsI	5 min	3 h	73.1±2.9 ^a	97.4±4.7 ^a
RtsII	2 min	4 h	33.8±4.4 ^b	54.2±0.2 ^b

EAG: Equivalentes de ácido gálico, EQ: Equivalentes de quercetina, ES: Extracto seco. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. En cada columna, letras iguales indican que no hay diferencias significativas según la prueba de comparación de medias de Tukey $p < 0.05$. (n=3).

7.4.3 Cuantificación de Verbascósido por UPLC

En la Figura 12 se muestran los cromatogramas representativos obtenidos del análisis por UPLC-PDA de las soluciones estándar obtenidas del Verbascósido con las concentraciones 10, 100 y 200 ppm. Se puede observar un pico cromatográfico bien definido en el R_t de 26 min y el espectro de absorción UV-Vis del Verbascósido con dos picos de máxima absorción alrededor de 224 y 331 nm (Figura 12) (Esposito *et al.*, 2009).

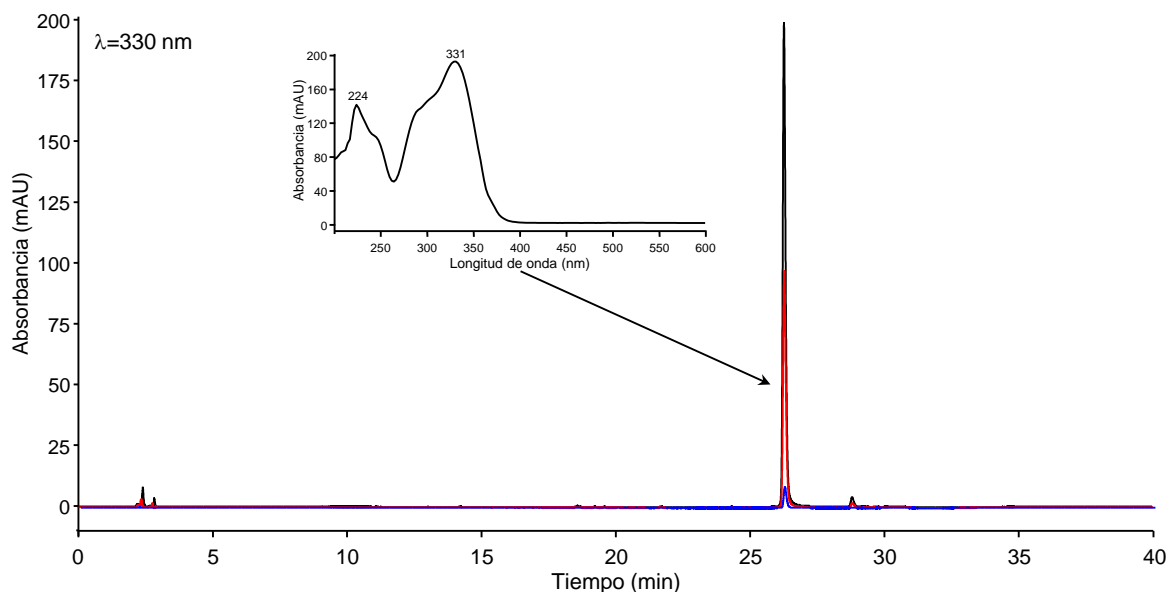


Figura 12. Cromatogramas UPLC correspondientes a la cuantificación de verbascósido. A. Soluciones estándar a diferentes concentraciones de 10 (—), 100 (—) y 200 (—) ppm de verbascósido; y espectro de absorción UV-Vis correspondiente a la solución de verbascósido de 200 ppm.

En las Figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas representativos obtenidos del análisis por UPLC-PDA de los extractos hidroetanólicos obtenidos de los cultivos de brotes de *T. stans* en los sistemas de inmersión temporal. Se puede observar un pico cromatográfico bien definido en el R_t de 26 min y el espectro de absorción UV-Vis, los cuales coinciden con el estándar de verbascósido. Es importante señalar que los espectros de absorción UV-Vis de los compuestos eluidos con los tiempos de retención 8.1, 12.7, 15.6, 15.9, 18.9, 19.2, 22.3, 28.2, 28.5 y 29, en el análisis de las muestras de RTsI y RTsII; son prácticamente parecidos al espectro UV-Vis del verbascósido. Esto indica que los compuestos desconocidos están relacionados con el Verbascósido y podría tratarse de moléculas involucradas en la ruta metabólica.

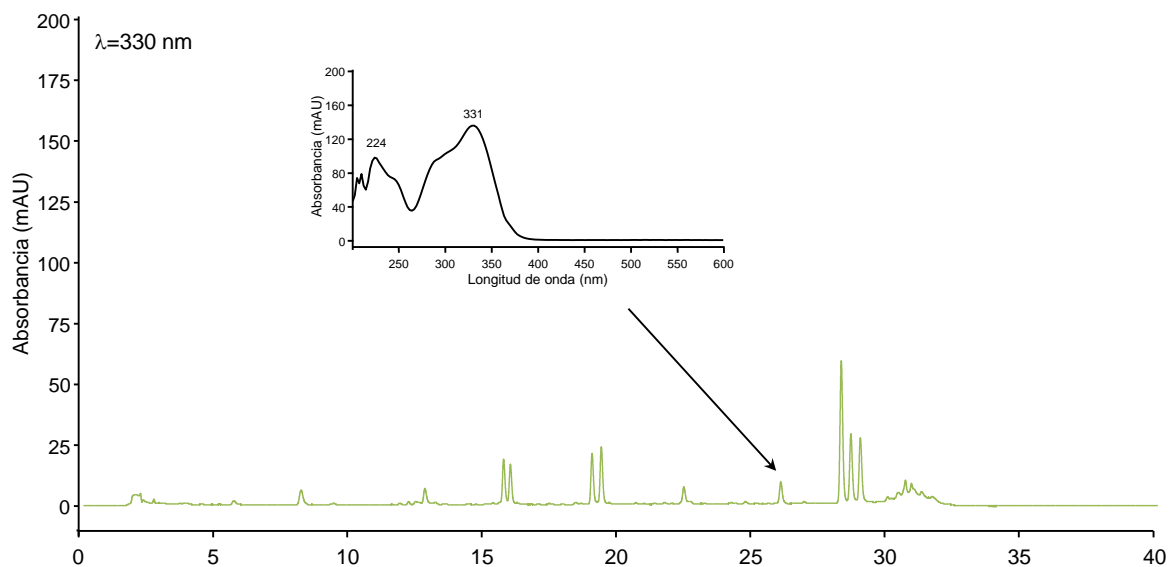


Figura 13. Cromatograma UPLC representativo del extracto hidroetanólico obtenido del cultivo por inmersión RTsI de *T. stans*; y espectro UV-Vis del compuesto con R_t de 26 min.

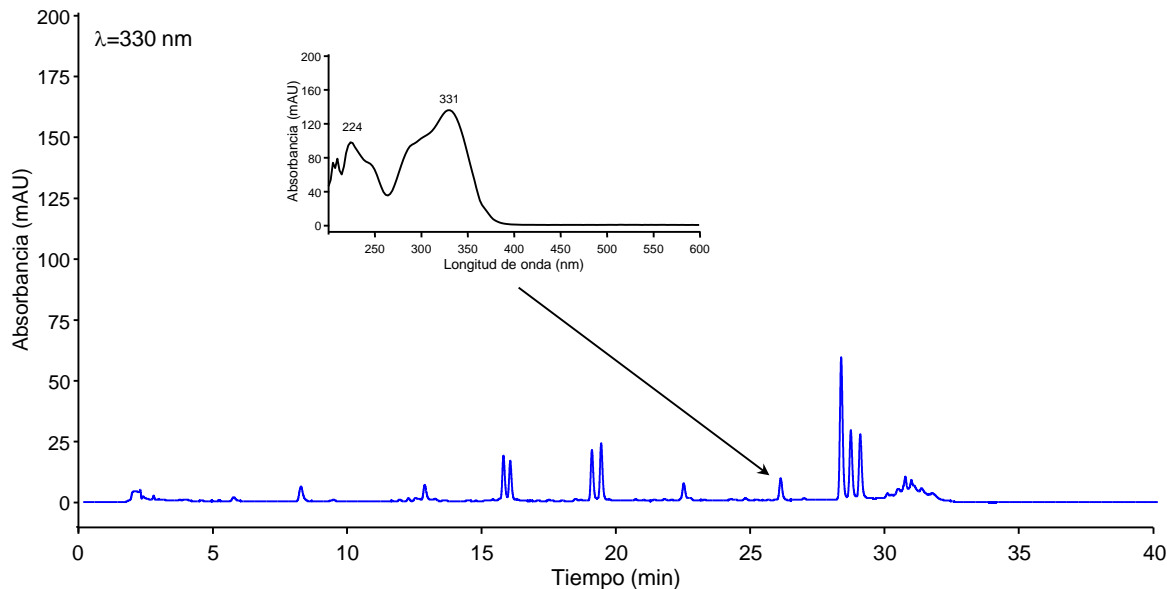


Figura 14. Cromatograma UPLC del extracto hidroetanólico obtenido del cultivo por inmersión RTsII de *T. stans*; y espectro UV-Vis del compuesto con Rt de 26 min.

En la Figura 15 se muestra el espectro ESI (-)-HRMS obtenido del análisis de compuesto eluido al minuto 26 por UPLC-MS. La masa exacta correspondiente al compuesto Verbascósido con la fórmula molecular $C_{29}H_{35}O_{15}$, se determinó con ayuda de la herramienta que tiene el software en donde se llevó a cabo el análisis. Estos resultados ratifican la identidad y presencia del Verbascósido en dichos extractos.

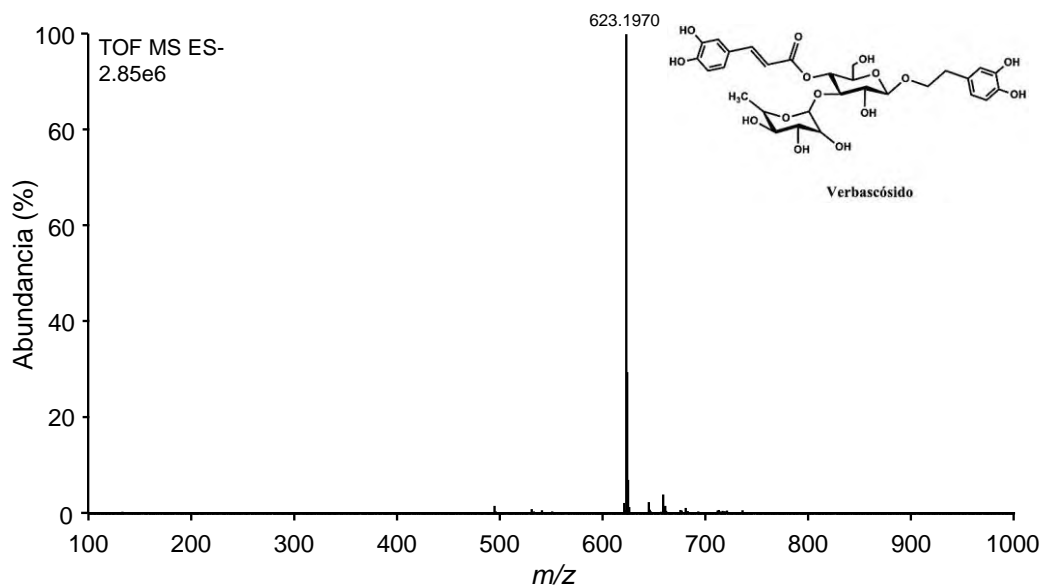


Figura 15. Espectro de masas ESI(-)-HRMS obtenido del pico cromatográfico con Rt de 26 min.

Después de la identificación y ratificación de la presencia de Verbascósido en los extractos de *T. stans*, se procedió a cuantificar este analito. Bajo los tratamientos RTsI y RTsII se acumuló la misma cantidad de Verbascósido, no encontrándose diferencia significativa entre ellos (Tabla 13).

Tabla 13. Cuantificación de Verbascósido de extractos obtenidos en RITA® de *T. stans*.

Tratamiento	Duración, t_{inm}	Frecuencia, F_{inm}	Verbascósido (ppm)	Verbascósido ($\mu\text{g/g P.S}$)
RTsI	5 min	3 h	10.33 \pm 0.01 ^a	1057.68 \pm 15.49 ^a
RTsII	2 min	4 h	10.58 \pm 0.05 ^a	1077.81 \pm 50.07 ^a

Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. En cada columna, letras iguales indican que no hay diferencias significativas según la prueba de comparación de medias de Tukey $p < 0.05$. (n=3).

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se implementó el cultivo en inmersión temporal de brotes de *T. stans* y se evaluó la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Como parte de la implementación del cultivo se definió la duración y frecuencia de la inmersión. Es importante señalar que no se encontraron referencias que utilicen el cultivo en inmersión temporal para la multiplicación de los brotes de *T. stans* hasta ahora, y no se han descrito antecedentes de la aplicación de este tipo de cultivo a especies de la familia Bignoniaceae. Por lo que la discusión que se presenta se realiza con especies de otras familias.

Varios autores han descrito que la duración y la frecuencia de inmersión son dos factores clave para establecer el cultivo en inmersión temporal de una especie vegetal. Algunas especies vegetales requieren de tiempos cortos y frecuencias espaciadas de inmersión para una multiplicación eficiente, pero otras especies, tal como *Hydrastis canadensis* L. (Ranunculaceae) necesitan estar en contacto con medio líquido por mayores periodos de tiempo (Shan-Shan *et al.*, 2007). En el presente trabajo, la duración de inmersión, tuvo mayor influencia sobre todas las variables de respuesta y en particular sobre el %HI seguido de la altura de los brotes. Posteriormente, la frecuencia de inmersión también presentó efecto en menor proporción solo encontrando diferencias en el tratamiento RTsI y RTsII con el resto de los tratamientos (Tabla 10). Esto coincide con los resultados para el cultivo en inmersión temporal de especies vegetales estudiadas como: *Stevia rebaudiana*, *Castilleja tenuiflora*, *Hypericum perforatum*, (Rosales *et al.*, 2018. Valdez-Tapia *et al.*, 2014. Sobayet *et al.*, 2003). Por otro lado, se observó que los brotes de *T. stans* cultivados en un sistema en inmersión temporal necesitan ser humedecidos constantemente, se requieren tiempos largos y frecuencias cortas (Tabla 8). Sin embargo, la duración y la frecuencia de inmersión van a depender de la especie como se observa en el Tabla 7.

La mejor condición para mantener una multiplicación de *T. stans* de 3 brotes/explante y fomentar la formación de raíz (20%) de los brotes fue una inmersión de 5 minutos cada 3 horas. El sistema de inmersión temporal es ampliamente utilizado para micropropagar con éxito diferentes especies medicinales, frutales y ornamentales. Por ejemplo, Murch *et al.* (2004) reportaron para la multiplicación de la planta medicinal *Crescentia cujete* (Bignoniaceae) el mayor IMB (8 a 9 brotes/explante) se obtuvo con inmersiones de 3 min cada 3 h (24 min/día); con una altura de 8 cm y un 80% de EFR. En otro trabajo, Sankar-Thomas *et al.* (2008) que cultivaron brotes de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) con tiempos y frecuencias de 1 min cada 6 h obteniendo IMB de 21 a 22 brotes/explante, observando 3 cm de altura, 70% en EFR; por otro lado, los brotes presentaron sobrevivencia del 90%. Valdez-Tapia *et al.* (2014) en cultivos de brotes de *C. tenuiflora* un ciclo de inmersión de 5 min cada 24 h (5 min/día) obtuvieron un IMB de 6 brotes/explante, no se presentó vitrificación y todos los brotes formaron raíz. Por otro lado, Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) micropropagaron brotes de *S. rebaudiana* encontrando que con inmersiones de 2 minutos cada 8 h (6 min/día) se obtuvieron 18.37 brotes/explante de 3.76 cm de alto y su EFR fue de 100%. Otro ejemplo, es Gonzaga *et al.* (2016) quienes observaron que el ciclo de inmersión de 2 min cada 6 h (8min/día) para *Guadua angustifolia* fue el mejor para incrementar el IMB (2.7 brotes/explante).

Los brotes de *T. stans* obtenidos por cultivo en inmersión temporal presentaron actividad antioxidante medida como capacidad de captura de radicales libres: DPPH• y ABTS•. Estos dos métodos son de los más empleados para medir actividad antioxidante en extractos vegetales y son recomendados para muestras que contienen compuestos fenólicos y flavonoides (Marwah *et al.*, 2007). En este trabajo se observó que la capacidad de captura de radicales ABTS• fue mayor a la de radicales DPPH•; este comportamiento ha sido descrito en otras plantas como *Amaranthus cruentus* o *Chenopodium quinoa* (Amaranthaceae) (Paskó *et al.*, 2009) y se atribuye a la interferencia de compuestos como clorofilas, carotenos o antocianinas con el DPPH•, en este mismo sentido Frankel and Meyer (2000),

mencionan que la evaluación de la capacidad antioxidante de un extracto debe realizarse por varios métodos debido a que está determinada por la mezcla de diferentes antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, entre los cuales puede haber interacciones sinérgicas. La capacidad de captura de radicales ABTS• obtenida en este trabajo para RTsl (643.16 $\mu\text{mol Trolox/g E.S}$) fue 1.04 veces mayor a lo encontrado en los brotes de *T. stans* cultivados en medio semisólido (619.32 $\mu\text{mol Trolox/g E.S}$, usado en este trabajo con fines de comparación).

Las capacidades de captación de radicales del DPPH• de los extractos de brotes desarrollados por inmersión temporal en RTsl y RTslI fueron de 77.50% y 67.76%, respectivamente. Estos valores fueron mayores a lo descrito por Govindappa *et al.* (2011) en extractos de etanol y metanol de plantas silvestre de *T. stans*, los cuales presentaron una actividad de captación de radicales DPPH• del 56.88% y el 58.92% respectivamente, en comparación al extracto acuoso (39.23%) y por López-Laredo *et al.* (2009) quienes reportaron que los callos provenientes de hojas de *T. stans* cultivados en fotoperiodo (16h luz/8 h oscuridad) presentaron una capacidad de captura de radicales DPPH• y ABTS• de 478.05 $\mu\text{g Trolox/g E.S}$ y 350.45 $\mu\text{g Trolox/g E.S}$, respectivamente. Estos valores son menores a los encontrados en este estudio. Los resultados de este estudio mostraron que los extractos tienen la capacidad de donar protones y podrían servir como inhibidores de radicales libres o eliminadores, actuando posiblemente como antioxidantes primarios.

En el sistema inmersión temporal las referencias de la capacidad de captura de radicales DPPH• y ABTS• son escasas. Valdez-Tapia *et al.* (2014) reportaron que los brotes de *C. tenuiflora* en inmersión durante 30 min cada 24 h presentaron la mayor actividad antioxidante contra ABTS• (161.74 \pm 10.06 $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$). Sin embargo, la mayor actividad contra DPPH• (1.62 \pm 13.59 $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$) se obtuvo en inmersión 5 min cada 24h.

El cultivo *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal, con tiempo y frecuencia óptimos de inmersión, es un buen método para aumentar la producción de material

vegetal y de metabolitos secundarios de plantas con alto valor comercial (Ivanov *et al.* 2012; Georgiev *et al.* 2014). Los brotes desarrollados por inmersión temporal en RTsl presentaron el mayor contenido tanto de compuestos fenólicos totales y flavonoides (73.1 ± 2.9 mg EAG/g E.S y 97.4 ± 4.7 mg EQ/g E.S, respectivamente). Estos valores fueron mayores al encontrado para esta especie cultivada en medio de cultivo semisólido (55.11 ± 4.0 mg EAG/g de extracto y 85.11 ± 0.3 mg EQ/g de extracto, utilizados en este trabajo con fines de comparación) esto es debido al régimen de cultivo y edad de los brotes. Sin embargo, fueron menores a lo reportado por López-Laredo *et al.*, (2009) a partir de callos de *T. stans* cultivados en fotoperiodo (97.03 ± 0.02 mg EAG/g E.S y 395.69 ± 0.01 EC/g E.S, respectivamente).

Utilizando la parte aérea (hojas y tallos) de plantas de *T. stans*, Arbale *et al.* (2011) reportaron que los extractos etanólicos presentaron un contenido de compuestos fenólicos de 60.238 mg EC/g de extracto y de 6.545 mg EQ/g de flavonoides totales.

Por otro lado, puede mencionarse que los brotes de *T. stans* de RTsl presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos totales en comparación a lo reportado por Li *et al.* (2008) para 45 plantas medicinales; observando que obtuvieron los valores para compuestos fenólicos totales entre 1.15 a 52.35 mg GAE/g de extracto. Dentro de la familia Begoniaceae se han reportado el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides para algunas especies. Para *Begonia trichocarpa* Dalzell el contenido de compuestos fenólicos fue de 49.96 mg EAG/g de extracto (Sindhu Jose *et al.* 2016).

El contenido de flavonoides de los extractos metanólicos obtenidos de brotes de *Artemisia judaica* L. cultivados en reactores de inmersión temporal (3 min/3 h) fue de 50 mg EC/g de extracto, observándose un contenido mayor en comparación a los resultados del presente trabajo (Liu *et al.* 2014). De forma similar Valdez-Tapia *et al.* (2014), obtuvieron la mayor producción de compuestos fenólicos y flavonoides, con las mejores condiciones de tiempo y frecuencia de inmersión (30 min cada 24h)

en extractos obtenidos de *C. tenuiflora* (30.58 ± 2.39 mg EAG/g ES y 45.83 ± 4.2 μ g EC/g ES, respectivamente).

Podemos observar que el contenido de compuestos fenólicos totales cuantificados es mayoritario en el tratamiento correspondiente a RTsI, esto hace referencia con los resultados obtenidos en la cantidad de biomasa que se produjo en este tratamiento en particular, y se hace evidente en la cantidad de compuestos fenólicos producidos. Cabe destacar que toda la extracción se realizó con una mezcla de etanol-agua (hidroalcohólico), asumiendo así que debido a la naturaleza polar de los extractos favorecieron la acumulación de dichos compuestos por su naturaleza polar de la mayoría de los compuestos fenólicos. Se considera que entre los solventes más eficientes para la extracción de compuestos fenólicos se encuentra el metanol y el etanol, sin embargo, este último es favorecido debido a su baja toxicidad (Siddhuraju y Becker, 2003; Tung *et al*, 2007).

En este trabajo, se observó que en los brotes de *T. stans* desarrollados por inmersión temporal se identificó al Verbascósido, cuya acumulación fue de (1.06 ± 0.001 - 1.08 ± 0.05 mg/g P.S) en ambos ciclos de inmersión (RTsI y RTsII). Este feniletanoide es uno de lo más estudiados y se ha demostrado que es un poderoso antioxidante y fotoprotector (Alipieva *et al.* 2014). Sin embargo, su producción es menor a lo encontrado en plántulas cultivadas en medio semi-sólido (24.52 ± 0.43 mg/g P.S) usadas en este trabajo con fines de comparación (Anexo 6). En sistemas de inmersión temporal, Medina-Pérez *et al*, (2015) reportaron que los brotes de *C. tenuiflora* cultivados con una frecuencia de inmersión de 5 min cada 24 h bajo deficiencia de nitrógeno (1.32 mM) acumularon Verbascósido $113.9 \pm 0.8.6$ mg /g P.S a los 21 día de cultivo. Por otro lado, Córtes-Morales *et al.* (2018) encontraron que bajo 0.66 mM de nitrógeno alcanzaron concentraciones máximas de Verbascósido de 283 ± 0.5 mg /g P.S.

Finalmente, cabe destacar que este trabajo es el primer informe para la micropropagación *in vitro* de brotes de la especie *T. stans* implementando un

sistema de inmersión temporal RITA® y la cuantificación de sus compuestos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante, así como la identificación de Verbascósido, demostrando la aplicabilidad del sistema en inmersión temporal para la especie.

8. CONCLUSIONES

El cultivo en inmersión temporal de *T. stans*, con un tiempo de inmersión de 5 minutos cada 3 horas, permitió obtener IMB de 3 brotes por explante, 5 % vitrificación y un 20% de EFR.

La duración de inmersión tuvo un efecto significativo sobre el IMB, la altura, la producción de biomasa fresca, seca y sobre la %HI de los brotes. Mientras que la frecuencia de la inmersión solo tuvo efecto significativo en la altura y sobre la producción de biomasa fresca.

Los brotes de *T. stans* desarrollados con un tiempo de inmersión de 5 minutos cada 3 horas, presentaron mayor actividad antioxidante medida como capacidad de captura de radicales ABTS. Esto coincidió con el mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

Bajo los ciclos de 5 minutos cada 3 h y 2 minutos cada 4 h, los brotes de *T. stans* acumularon igual contenido de Verbascósido identificado por UPLC.

El cultivo de *T. stans* en RITA permite obtener metabolitos que no han sido descritos en este sistema biológico.

9. PERSPECTIVAS

Evaluar otras combinaciones de reguladores de crecimiento para mejorar la micropropagación de brotes.

Evaluar condiciones diferentes en el sistema RITA® aumentando el tiempo y frecuencia de inmersión para cada tratamiento.

Identificar y cuantificar los compuestos intermediarios o metabolitos precursores del Verbascósido.

10. REFERENCIAS

1. Agudo-Medina, L. (2002). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Autodidacta*, 27–34.
2. Aguilar, M., Villalobos, V., y Salgado, R. (2010). Cultivo *in vitro* de *Paulownia tomentosa*. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Campo experimental Uruapan, México. Recuperado el 25/08/17:<http://agroforestal.com.mx/content/cultivo-vitro-de-paulonia>.
3. Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C., and Herrera-Arellano, A. (2009). Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 284–288.
4. Aksoy, L., Kolay, E., Ağılönü, Y., Aslan, Z., and Kargioğlu, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi journal of biological sciences*, 20(3), pp 235-239..
5. Alexander, P., Bahret, M., Chaves, J., Courts, G., and D'Alessio, N. (2000). *Biología*. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. Needham, Massachusetts. USA.
6. Álvarez-Delgadillo A., Villavicencio-Nieto Miguel A., Pérez-Escandón B. and Octavio-Aguilar, P. (2018). *Tecoma stans*: associated variation with inhibition of α -glycosidase to the diabetes treatment. 7. 2037-2048
7. Anandjiwala S.; Srinivasa H.; Kalola J.; Rajani M. (2007) Free-radical scavenging activity of *Bergia suffruticosa* (Delile) Fenzl. *J. Nat. Med.* 61: 59–62.
8. Aponte Shupingahua, F. (2008). Determination of the protocol of disinfection of seeds of Bolaina blanca (*Guazuma critina*, MART.) and Cedro americano (*Cedrela odorata*, L.) for *in vitro* germination. Universidad Nacional de Ucayali, Facultad de Ciencias Forestales. Escuela Profesional de Ingeniería Forestal. Pucallpa, Peru.

9. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, 2009 .Desde: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3yt=yid=7502> Consultado el 05 Diciembre 2016.
10. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Tronadora *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, UNAM, 2009. Desde: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3yt=yid=7502> Consultado el 29 de Noviembre 2016.
11. Brand-Williams, Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.*, 28, 25–30.
12. Cabrera, A. (2003). Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón (*Prunus pérsica* L.) Batsch var. Salcajá. Universidad de San Carlos. Guatemala.
13. Calva, C.G.;Pérez, V. J. 2005. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro. Revista Digital Universitaria. México.
14. Cárdenas, E. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal, (1), 69–72.
15. Castro, F. (2006). Establecimiento *in vitro* microporagacion de Frambuesa (*Rubus idaeus* L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
16. Comision Nacional para el Cooximiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), *Tecoma stans* (L.) Juss.ex Kunth (1819).BIGNONIACEAE Publicado en: Nova Genera et Species Plantarum 3: 144. 1819.Fecha de consulta:16 de Enero 2017. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/12-bigno8m.PDF.
17. Corbino, G.B. (2005). Micropropagación de plantas leñosas. Instituto de Ingeniería Rural del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Argentina.pp 43-51

18. Cortes-Morales J.A., López-Laredo A. R., Zamilpa A., Bermúdez-Torres K., Trejo-Espino J. L., Trejo-Tapia G. Morphogenesis and secondary metabolites production in the medicinal plant *Castilleja tenuiflora* Benth. under nitrogen deficiency and starvation stress in a temporary immersion system. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 17, No. 1 (2018) 229-242
19. Corral Salvadó, A., Jiménez Rivero, G., y De La Paz Naranjo, J. (2002). Droga cruda y extracto fluido de *Tecoma stans* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(3), 138–141.
20. Costantino, L., Raimondi, L., Pirisino, R., Brunetti, T., Pessotto, P., Giannesi, F., ... El-Abady, S. A. (2003). Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. *Farmaco*, 58(9), 781–785.
21. Delgado Olivares, Luis, Betanzos Cabrera, Gabriel, Sumaya Martínez, Ma. Teresa (2010) Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*.
22. Diamantidis G, Molassiotis A, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G and Therios I. (2006). Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple root stock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia plantarum* 50 (3): 331-338.
23. Dohnal, B. 1976. Investigations on some metabolites of *Tecoma stans* Juss. callus tissue. Part II. Chromatographical analysis of alkaloid and quinone compounds. *Acta Soc. Bot. Polon.* 45:369–381
24. Eide, C. Munster, P.H. Heyerdahl, R. Lyngved, O.A.S. Olsen. (2003) "Liquid Culture Systems For Plant Propagation". *ISHS Acta Horticulturae* 625:XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural crop Improvement: Achievements, Oportunities and Limitations. pp.19-25.
25. Ewind G., Hall M. and Klerk D. 2008. *Plant Propagation by tissue culture* Volume 1. Ed. Klerk.
26. Godoy, S., Tapia, E., Seit, P. et al. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* (2017) 53: 494.
27. Gonzaga Gutiérrez L., López-Franco R., and Morales-Pinzón T. (2016) Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA. *African Journal of Biotechnology* Vol 15(28): 1503-

1510).

28. Govindappa M, Sadananda TS, Channabasava R, Jeevitha MK, Pooja KS and Vinay B. Raghavendra. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex Kunth. Journal of Phytology 2011, 3(3): 68-76
29. Fachinello R. J. (2006) Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Mass propagation by cuttings, biotechnologies, and the capture of genetic gain. Bordeaux, Francia.
30. Hammouda, Y., and Khalafallah, N. (n.d.). Stability of Tecomine, the Major Antidiabetic Factor of, 1142–1145.
31. Ibarra, M. D. J., Cantú, P. C., y Verde, M. J. (2009). Caracterización Fitoquímica y Efecto Hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su Relación con la Presencia del Cromo como Factor de Tolerancia a la Glucosa 20(5), 55–64.
32. Ibarra-Salas, M. de J. (2009). Efecto hipoglucemiante de *tecoma stans* en presencia del cromo como factor de tolerancia a la glucosa . Ma . De Jesús Ibarra Salas, Como requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en ciencias biológicas con acentuación, pp 1–106.
33. Kedare S.B., Singh R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J. Food Sci. Technol. 2011;48:412–422.
34. Laffitte, O., Borrero, N., Pérez, A., Peralta, N., Trujillo, R. (2004). Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología. Volumen 6, No. 2, 2004.
35. Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., and Hohtola, A. (2000). Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. Tree Physiology. England.
36. Lins, A. P., and Felicio, J. D. A. (1993). Monoterpene alkaloids from *Tecoma stans*. Phytochemistry, 34(3), 876–878.
37. Liu, C. Z., Murch, S. J., El-Demerdash, M. and Saxena, P. K. (2004). *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. J. Biotechnol. 110:63-71).
38. López, A. R., Ramírez, F. D., y Ramírez, S. I. (2008). Acumulacion de

compuestos antioxidantes en callos de *Tecoma stans* L (copa de oro) y análisis químico preliminar.

39. López-Laredo, A. R., Ramírez-Flores, F. D., Sepúlveda-Jiménez, G., and Trejo-Tapia, G. (2009). Comparison of metabolite levels in callus of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. cultured in photoperiod and darkness. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(5), 550–558.
40. López, R. (2010). Micropropagación *in vitro* de cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) por meristemos y yemas. Tesis de grado. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.
41. Lorenzo, M. (2006). Detección por cromatografía de capa fina (CCF) de metabolitos antifúngicos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS.
42. Lozoya-Meckes, M., and Mellardo-campos, V. (1985). Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy?, 14, 1–9.
43. Mamone, L., Di Venosa, G., Sáenz, D., Batlle, A., and Casas, A. (2016). Methods for the detection of reactive oxygen species employed in the identification of plant photosensitizers. *Methods*, 109, 73–80.
44. Mcalister, B., Finnie, J., Watt, M. P., and Blakeway, F. (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA), 347–358.
45. Medina-Pérez, V., López-Laredo, R.A., Sepúlveda- Jiménez, G., Zamilpa, A., Trejo-Tapia, G. (2015). Nitrogen deficiency stimulates biosynthesis of bioactive phenylethanoid glycosides in the medicinal plant *Castilleja tenuiflora* Benth. *Acta Physiologiae Plantarum* 37, 93.
46. Mehrotra, S.; Goel, M.K.; Kukreja, A.K. y Mishra, B.N.(2007). “Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization”, African Journal of Biotechnology, vol. 6, no. 13.
47. Mendoza-Espinoza, A., y Schlaepfer, L. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer , relevancia para México Medicinal plants as potential agents against cancer , relevance for Mexico. *Redalyc.org*. pp. 34.67
48. Murashige T.; Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays

- with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473– 497; 1962.
49. Ocampo, F., y Núñez, V. (2007). Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajaba*), mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Ciencia y tecnología agropecuaria. Revista ICA. Bogotá
 50. Orozco, P. W. (2012). Establecimiento del protocolo de micropropagación de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Q. Escuela Politécnica del Ejército.
 51. OMS (Organización Mundial de la Salud), Temas de Salud, 2017. Consultado el 18 Enero 2017, Desde http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
 52. Pérez, L. P., Kosky, R. G., Reyes, M., Alvares, L., y Autor, D. (2003). Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA®) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos, 3(1), 3–8.
 53. Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), 195–211.
 54. Perugorría, M. (2005). Desarrollo de una técnica para la micropropagación de especies leñosas en biorreactores. Facultad de Ciencias. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay.
 55. Pierik, R. (1990). *In vitro*. Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher.
 56. Pletsch, M., Piacente, S., Pizza, C., and Charlwood, B. V. (1993). The accumulation of phenylpropanoid glycosides in tissue cultures of *Tecoma sambucifolium*. *Phytochemistry*, 34(1), 161–165.
 57. Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En A.K. Hvoslef-Eide y W.Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 1-18). Dordrecht, Holanda: Springer.
 58. Quiroga, J. (2005). Con Biotecnología Vegetal Aceleran la Reproducción de

- Plantas. Archivo de Noticias de FUCOA. Ministerio de Agricultura de Chile.
59. Ramachandra Rao, S., and Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2),
60. Ramírez, L. (2009). Metodologías para evaluar *In vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. (42), 263-268.
61. Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu G., Ramírez-Madero, G., and Hernández-Rincón U. 2016. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany* 106: 238-243).
62. Ramos-Llica, E., Castañeda, B., y Vásquez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Perú Salud*, 15(1), 42–46.
63. Ramirez, G., Zamilpa, A., Zavala, M., Perez, J., Morales, D., and Tortoriello, J. (2016). *Chrysoeriol and other polyphenols from Tecoma stans with lipase inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology*, 185, 1–
64. Remache, L. (2011). Desarrollo de técnicas de micropropagación *in vitro* de Cedro (*Cedrela montana*) a partir de apices, hojas y entrenudos. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
65. Re R., Pelligrini N., Proteggente A., Pannall A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231–1237.
66. Rocano, Mélida N., Villena, Paulina G., Peña, Denisse F. (2017) Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*. *Maskana*, revista científica Universidad de la Cuenca, Vol. 8 No. 1, pp.103-109.
67. Rodríguez-Carmona, O. (2015). “*Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, wereque y raíz de nopal.*
68. Rojas, S; García, J; Alarcon, M. 2004. Propagación asexual de plantas. CORPOICA, Ministerio de agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, PRONATTA. Colombia. pp 14-18
69. Ronald L. Prior. (2005) Standardized methods for the determination of

- Antioxidant Capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 53, 4290-4302.
70. Salazar, R. (2010). Historia del cultivo de tejidos vegetales. Recuperado el 27/09/18 de: Cultivo de tejidos vegetales/ Robinson Salazar Díaz.
71. Salisbury, F., y Ross, C. (1994). Fisiología vegetal. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. México. D.F..
72. Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A., and Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric. 76: 270–276; 1998
73. Sánchez, L., Rozo, G., y Montiel, J. (2012). Cultivo *in vitro* de *Gyrocarpus americanus* (Hernandiaceae). Universidad del Tolima. Ibagué.
74. Siddhuraju, P. ; Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. J. Agric. Food Chem., 51 (8): 2144-2155.
75. Shohael A. M.; Chakrabarty D.; Ali M. B.; Yu K. W.; Hahn E. J.; Lee H. L.; Paek K. (2006). Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. Process Biochem. 41: 512– 518.
76. Suárez, F. (2011). Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
77. Tung, Y.-T., Wu, J.-H., Kuo, Y.-H., and Chang, S.-T. (2007). Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. Bioresource Technology, 98(5), 1120–1123.
78. Vandana A Arbale, S.M. Lavate, R.B. Jadha, G.S. Kamble. 2011. Evaluation of phenol and flavonoid content from aerial parts of *Tecoma stans*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3:126-127).
79. Verpoorte, R., Contin, A. and Memelink, J.(2002). Phytochemistry Reviews 1: 13.pp13-25.
80. Vidal Cob Uicab, J., Ríos Leal, D., Sabja, Ana M., Cartes Riquelme, P., y

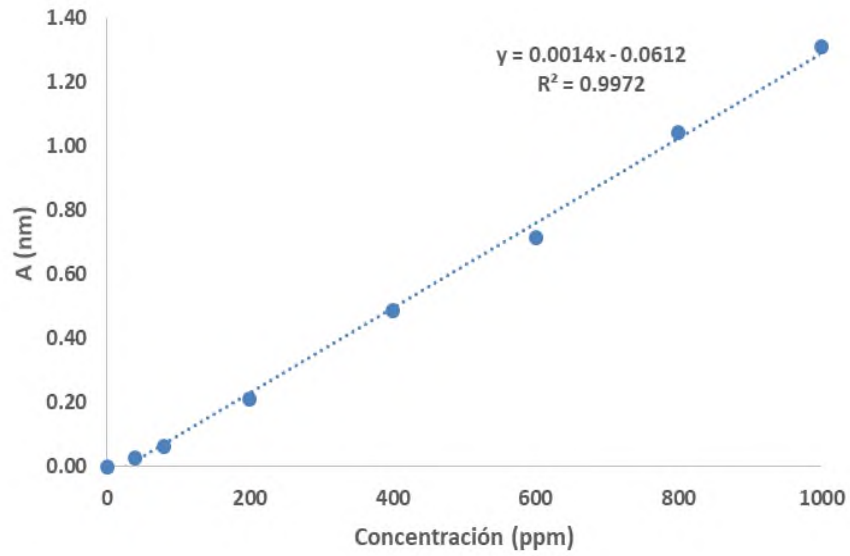
Sánchez Olate, M. (2016). Organogénesis directa para la propagación *in vitro* de Quillaja saponaria Molina en Sudamérica Austral. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(34), 57-68.

81. Watt, M.P. "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation", *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 76, 20 de septiembre de 2012, ISSN 16845315, DOI 10.5897/AJB12.1693.

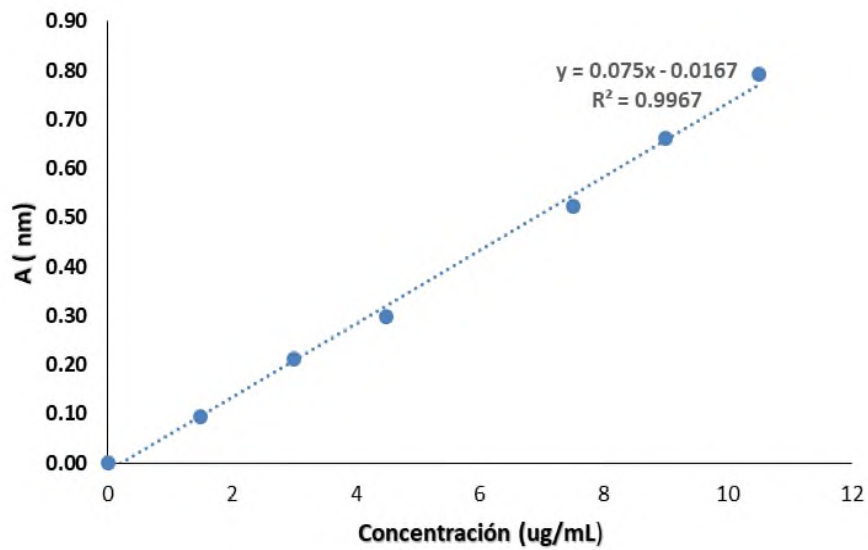
82. Yaya, L; Rodríguez, O; Usaquén, W; Chaparro, A. (2005). Inducción de organogénesis indirecta de Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.). *Revista Agronomía Colombiana*. Volumen 23, N° 1. Bogotá, Enero/Julio.

11. ANEXOS

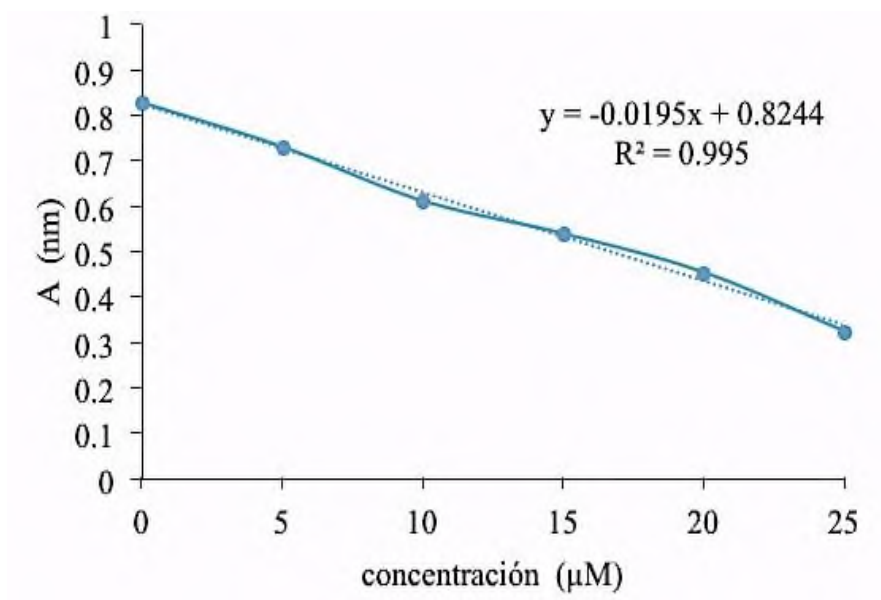
Anexo 1. Curva de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales



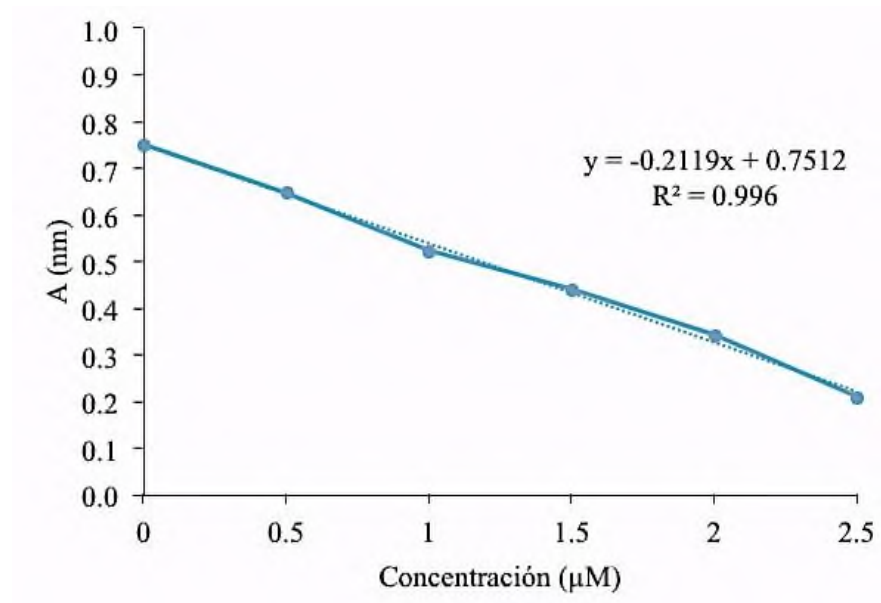
Anexo 2. Curva de quercetina para cuantificación de flavonoides totales



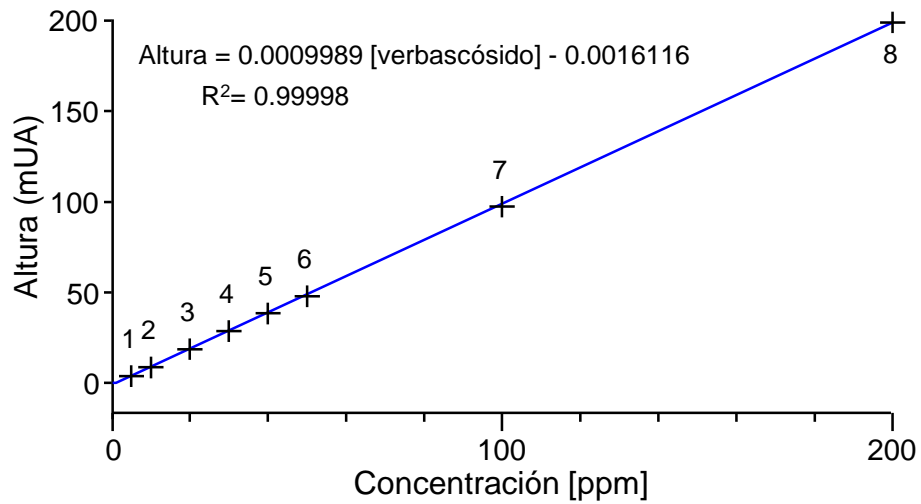
Anexo 3. Curva Trolox para el ensayo de captación del DPPH



Anexo 4. Curva Trolox para el ensayo de captación del radical ABTS⁺



Anexo 5. Curva de calibración de Verbascósido mediante UPLC



Anexo 6. Cromatograma UPLC correspondiente a la muestra CtMs; y espectro de absorción UV-Vis correspondiente al compuesto con Rt de 26 min.

