



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Evaluación del contenido del verbascósido, compuestos fenólicos totales y
capacidad antioxidante en plantas de *Buddleja cordata* Kunth propagadas
*in vitro***

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

Biol. Exp. Rayn Clarenc Aarland

Comité tutorial:

Codirector: Dr. Francisco Cruz Sosa.

Codirector: Dr. Fernando Rivera Cabrera.

Asesora: Dra. María Elena Estrada Zúñiga.

México, D.F., 12 de Diciembre del 2012

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Este proyecto se realizó en los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales y en el de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de los Departamentos de Biotecnología y Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Durante el transcurso de la Maestría (periodo 2010-2012) en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario 248821.

COMITÉ TUTORAL

Codirector:

Dr. Francisco Cruz Sosa

Profesor Titular "C" T.C. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, R-003.

Depto. Biotecnología. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa.

cuhp@xanum.uam.mx

Codirector:

Dr. Fernando Rivera Cabrera

Profesor Titular "C" T.C. Laboratorio de Fisiología,

Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, S-253.

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa.

frc@xanum.uam.mx

Asesora:

Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Profesora-Investigadora

Facultad de Química

Universidad Autónoma del Estado de México

lena21382@yahoo.com.mx

Los miembros del jurado de examen, designado por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Evaluación del contenido del verbascósido, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en plantas de *Buddleja cordata* Kunth propagadas *in vitro***”. Presentada por **Rayn Clarenc Aarland** quien realizó la disertación pública el miércoles 12 de diciembre del 2012, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

Dra. Laura Josefina Pérez Flores
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa

SECRETARIO

Dra. Clara Pelayo Zaldivar
Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa

VOCAL

Dra. María Elena Estrada Zúñiga
Facultad de Química
Universidad Autónoma del Estado de
México

VOCAL

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza
Colegio de Ciencia y Tecnología
Universidad Autónoma de la Ciudad de
México



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Fecha : 05/12/2012
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno RAYN CLARENC AARLAND , matrícula 210389513, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha doce de diciembre del 2012 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

EVALUACION DEL CONTENIDO DEL VERBASCOSIDO, COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DE *Buddleja Cordata* KUNTH PROPAGADAS *in vitro*

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBADO

JURADO

Presidenta

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

Secretaria

DRA. CLARA PELAYO ZALDIVAR

Vocal

DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

Vocal

DR. JOSE ALBERTO MENDOZA ESPINOZA

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, DF, CP 09340 Apdo. Postal 555-320-9000, Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax: 5804-4876



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

El Comité Académico del **Posgrado en Biología Experimental** de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, otorga el presente reconocimiento y felicita orgullosamente a:

M EN B. EXP. AARLAND RAYN CLARENC

En virtud de haber aprobado el examen de grado de **Maestría en Biología Experimental**, presentando y defendiendo el tema:

“Evaluación del contenido del verbascósido, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en plantas de *Buddleja cordata* Kunth propagadas *in vitro*.”

llevado a cabo el día 12 de diciembre de 2012.



Dr. Fernando Rivera Cabrera
Dr. Francisco Cruz Sosa
Co-Directores de Tesis



Dra. Laura Josefina Pérez Flores
Presidenta del Jurado



Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Coordinador del Posgrado

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mi casa de estudios la Universidad Autónoma Metropolitana por brindarme la oportunidad de seguir creciendo y desarrollándome como profesionista y también como persona.

Al Dr. Francisco Cruz Sosa, Panchito, por abrirme las puertas del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y facilitarme las herramientas necesarias para la conclusión adecuada de este proyecto, así mismo por todos los consejos y palabras de aliento que como persona me hacen cada día mejor.

Al Dr. Fernando Rivera Cabrera, Fer, mi padre académico y amigo. Gracias por acompañarme y dirigir adecuadamente este proyecto, en cual doy gracias por todos los consejos, por ser parte de mi formación, por las enseñanzas, la paciencia y tu amistad. Lo valoro mucho.

A la Dra. María Elena Estrada Zúñiga, Male, por siempre ser tan acertada y con esa disponibilidad para ayudar. Gracias por los comentarios, por tu ojo analítico y las enseñanzas.

A mis papás Anita Aarland y Kenneth Luckson. Gracias por ser mis profesores en la vida, por su amor y apoyo incondicional. Gracias a mis hermanos Ruth, Earl, Patrick, Cheralyn y Saskia por siempre creer en mí. Ik hou heel veel van jullie.

Un agradecimiento especial a mis dos mujeres Lucía y Kyara. Gracias por su paciencia y por siempre estar ahí. Por todo el apoyo y por soportarme en las buenas y en las malas. Parte de este triunfo es de ustedes. Las amo.

A mi familia surinamesa y mexicana que siempre me apoyan y siempre están ahí para lo que sea.

A mis profesores de la maestría. Gracias por compartir sus conocimientos y preocuparse por hacer de mí un mejor científico.

A la Dra. Laura Pérez y el Dr. Fernando Díaz de León por su apoyo, buenos comentarios y palabras de aliento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales: Lety, Juan, Toño, Hypatia, Amalia, Bere, Lilia, Alexa, Aurelio, Manuel, Edson y el de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: Xóchil, Juan, Omar, Denise, Max, Fátima, Yoali, Caro, Joana, Rigel, Laurita, Alma, Oscar, Alex. Ustedes con sus risas y apoyo hicieron más llevadera mi estancia en este proyecto. Son familia.

A todos aquellos que por falta de memoria, mas no de cariño no están mencionados.

Abreviaturas

APX	Ascorbato peroxidasa
BA	Benciladenina
CAT	Catalasa
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
ERO	Especies reactivas de oxígeno
AG ₃	Ácido Giberélico
AIB	Ácido Indol Butírico
RVC	Regulador(es) de crecimiento vegetal
SOD	Superóxido dismutasa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 ANTECEDENTES.....	3
1.1 Metabolitos secundarios.....	3
1.1.1 Compuestos fenólicos	6
1.2 Capacidad antioxidante.....	9
1.3 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	11
1.3.1 Aplicación del cultivo de tejidos vegetales.....	12
1.3.2 Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos vegetales	13
1.4 Buddleja cordata (Tepozán).....	15
1.4.1 Botánica.....	15
1.4.2 Usos y fitoquímica	16
1.4.3 Fenilpropanoides de <i>Buddleja cordata</i>	17
1.4.4 Cultivo de tejidos en familias relacionadas a Buddleja	18
2 JUSTIFICACIÓN.....	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares.....	21
4 HIPÓTESIS.....	22
5 METODOLOGÍA.....	23
5.1 Obtención del material biológico y protocolo de micropropagación	23
5.1.1 Establecimiento de cultivos asépticos	23

5.1.2	Multiplicación de los brotes.....	26
5.1.3	Inducción de raíces.....	26
5.1.4	Aclimatación	27
5.2	Análisis fitoquímico.....	28
5.2.1	Procesamiento del material vegetal.....	28
5.2.2	Determinación de compuestos fenólicos	28
5.2.3	Determinación de la capacidad antioxidante	29
5.2.4	Cuantificación de fenilpropanoides	29
5.2.5	Análisis estadístico	32
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1	Establecimiento cultivos asépticos.....	33
6.2	Multiplicación de los brotes	35
6.2.1	Alargamiento de los brotes	38
6.3	Inducción de raíces	39
6.4	Aclimatación.....	41
6.5	Compuestos fenólicos.....	41
6.6	Capacidad antioxidante.....	44
6.7	Fenilpropanoides.....	47
7	CONCLUSIONES	51
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los metabolitos secundarios en tres grupos.	4
Figura 2. Principales compuestos fenólicos.	7
Figura 3. Subclases de flavonoides.....	9
Figura 4. Etapas de la micropropagación.....	14
Figura 5. Clasificación taxonómica de <i>B. cordata</i>	15
Figura 6. Establecimiento de cultivos asépticos.	25
Figura 7. Metodología para el análisis fitoquímico.	31
Figura 8. Multiplicación de los brotes de <i>B. cordata</i> en respuestas a distintas concentraciones de BA y después de 2 subcultivos a 4.44 μM de BA.	37
Figura 9. Alargamiento de los brotes inducidos en explantes nodales de <i>B. cordata</i> en respuesta a 8.67 μM de ácido giberélico (AG_3).	38
Figura 10. Inducción de raíces en brotes de <i>B. cordata</i> tratados con ácido giberélico (AG_3).....	39
Figura 11. Inducción de raíces en los brotes de <i>B. cordata</i> tratados con ácido indol butírico (AIB) 2.45 μM	41
Figura 12. Contenido de fenólicos totales en extractos de hojas de <i>B. cordata</i> provenientes de la planta fuente de explantes.....	43
Figura 13. Contenido de fenólicos totales en extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas de <i>B. cordata</i>	44
Figura 14. Capacidad antioxidante en extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes de <i>B. cordata</i>	46

Figura 15. Capacidad antioxidante en extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas de <i>B. cordata</i>	47
Figura 16. Concentraciones de verbascósido y linarina en extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes de <i>B. cordata</i>	48
Figura 17. Concentraciones de verbascósido y linarina en extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas de <i>B. cordata</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos ejemplos de micropropagación exitosa llevada a cabo en plantas medicinales.....	6
Tabla 2. Concentraciones de fungicida y antibióticos para el establecimiento de cultivos asépticos.....	24
Tabla 3. Concentraciones y tiempos de inmersión en la solución NaClO para el establecimiento de cultivos asépticos.....	24
Tabla 4. Concentraciones de BA para la inducción de brotes.....	26
Tabla 5. Gradiente de elución para la determinación de los fenilpropanoides en <i>B. cordata</i> por HPLC.....	30
Tabla 6. Efecto del tratamiento con NaClO y tiempo de inmersión sobre la asepsia y oxidación de los explantes nodales de <i>B. Cordata</i>	34
Tabla 7. Efecto del tratamiento con agentes antimicrobianos sobre la asepsia de los explantes nodales de <i>B. cordata</i>	35

INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos que aparentemente no tienen un efecto directo sobre su crecimiento y desarrollo, compuestos que se conocen como metabolitos secundarios. Sin embargo, actualmente se sabe que existen compuestos del metabolismo secundario como algunos terpenos (giberelinas y brasinoesteroides) que tienen un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de las plantas al actuar como hormonas vegetales. En la actualidad, el interés por las plantas productoras de metabolitos secundarios bioactivos sigue presente y un gran número de investigaciones se han enfocado en profundizar el conocimiento fisiológico, bioquímico y molecular que se tiene de ellas, con el fin de fundamentar recomendaciones del manejo de especies con importancia económica. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta de la biotecnología fundamentada en la capacidad totipotencial de las células vegetales, que permite desarrollar cualquier tipo de células e incluso la regeneración de una planta completa a partir de una sola célula. Dentro de las aplicaciones del CTV se pueden mencionar la micropropagación de especies medicinales, ornamentales y aquellas que están en peligro de extinción (Smetanska, 2008).

Buddleja cordata Kunth es una planta utilizada en la medicina tradicional de México y que se emplea en el tratamiento de un gran número de padecimientos y enfermedades (Houghton, 1984; Ávila *et al.*, 1999; Mendoza, 2003; Romero *et al.*, 2003). Además, estudios fitoquímicos de sus hojas, corteza y raíces han evidenciado sus actividades bactericidas, amebicidas, analgésicas, eupépticas, diuréticas,

antisépticas, citotóxicas, entre otras, actividades que han sido asociadas a metabolitos secundarios del tipo fenilpropanoide (Ordaz, 1996; Ortiz, 1996). No obstante, no existen reportes con respecto a la micropropagación de esta especie, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar las condiciones químicas y fisiológicas para establecer un protocolo de micropropagación de *Buddleja cordata*, así como determinar el contenido de los compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante, el verbascósido y la linarina presentes en las plántulas micropropagadas.

1 ANTECEDENTES

1.1 *Metabolitos secundarios*

Las propiedades biológicas y químicas de las plantas dependen de muchos factores, entre los cuales figuran la genética, las propiedades edáficas de la región de cultivo, las condiciones del clima, fase vegetativa, componentes del suelo, así como variaciones incontrolables en la calidad de los cultivos (Puertas *et al.*, 2009). Algunas plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos que se consideraba no tenían un efecto directo sobre su crecimiento y desarrollo, estos compuestos se conocen como metabolitos secundarios o productos secundarios. Sin embargo, en la actualidad se sabe que existen algunos compuestos del metabolismo secundario como las hormonas vegetales giberelinas y brasinoesteroides que provienen de la ruta del ácido mevalónico. Estos compuestos son importantes reguladores del crecimiento vegetal además de funcionar como mediadores en respuestas de las plantas a estrés biótico y abiótico (Santner *et al.*, 2009).

A diferencia de los metabolitos primarios como la clorofila, los aminoácidos, los nucleótidos etc., los metabolitos secundarios no tienen un papel fundamental en procesos tales como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la asimilación de nutrientes y la diferenciación. Durante muchos años se pensó que los metabolitos secundarios no tenían función alguna o que eran productos finales o de desecho del metabolismo de la planta. Sin embargo, en los dos últimos siglos (XIX y XX) estos compuestos llamaron la atención de los químicos

por su importancia como sustancias medicinales, venenos, saborizantes y material industrial. Diversos autores han sugerido que muchos de los metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en las plantas protegiéndolas contra el ataque de herbívoros, insectos, y microorganismos patógenos, además de servir como sustancias atrayentes para polinizadores (Wittstock y Gershenzon, 2002; Taiz y Zeiger, 2006; Tahara, 2007; Bhooshan y Rizvi, 2009; Kennedy y Wightman, 2011; Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Kliebenstein y Osbourn, 2012).

Desde el punto de vista de la biosíntesis es posible clasificar a los metabolitos secundarios en tres grupos distintos (fig. 1). Terpenos o terpenoides, alcaloides (compuestos que contienen nitrógeno) y los fenólicos o fenilpropanoides.

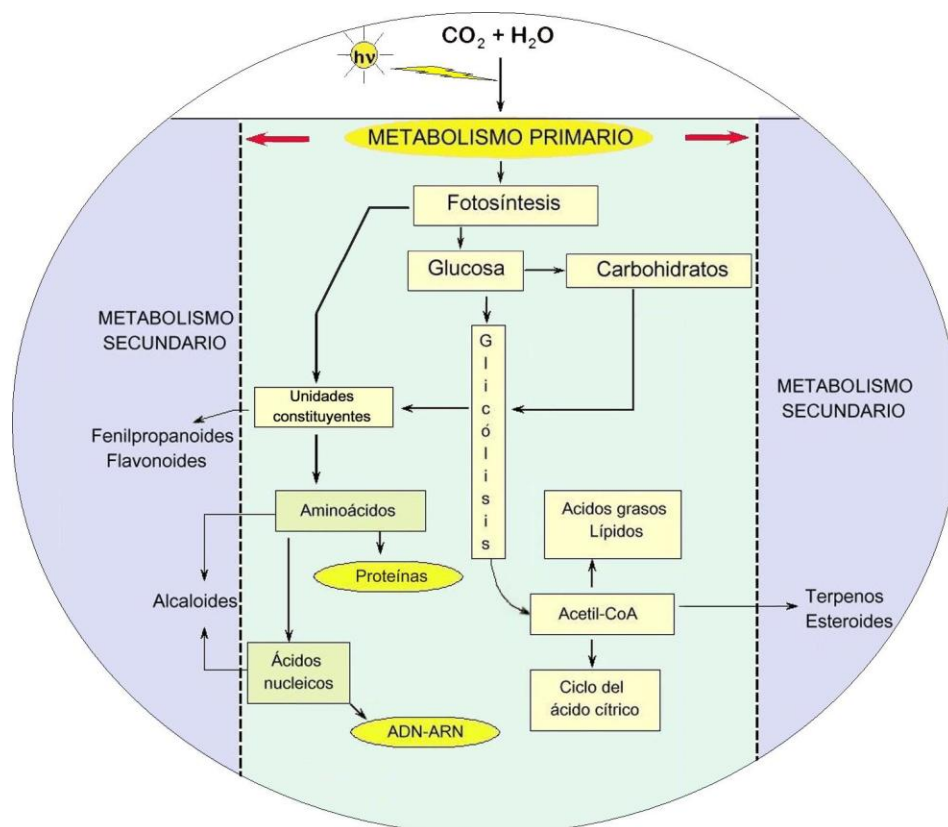


Figura 1. Clasificación de los metabolitos secundarios en tres grupos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Como se mencionó anteriormente, algunos terpenos tienen un papel en el crecimiento y desarrollo (giberelinas, brassinosteroides) y en la defensa contra herbívoros en algunas plantas (Santner *et al.*, 2009). Entre estos mecanismos de defensa se encuentra la síntesis de sustancias potencialmente tóxicas. Entre ellas, algunos compuestos nitrogenados por ejemplo los alcaloides que tienen efectos fisiológicos dramáticos en animales y los glucósidos cianogénicos que permiten la liberación de ácido cianhídrico por un proceso enzimático en respuesta al estrés por herida, ataque de herbívoros o patógenos (Wittstock y Gershenzon, 2002; Gatehouse, 2002; Innes, 2004; Howe y Jander, 2008; Koo y Howe, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que las plantas cultivadas *in vitro* en comparación con las plantas silvestres, producen cantidades y perfiles químicos diferentes, además estas características cuantitativas y cualitativas pueden cambiar con el tiempo (Tepe y Sokmen, 2007). El CTV a través de la micropropagación ha logrado incrementar el contenido de metabolitos secundarios específicos en plantas medicinales de interés económico. En la tabla 1, se muestran algunos ejemplos de plantas medicinales en las que mediante la micropropagación se logró el incremento en la cantidad de un metabolito secundario en específico. (Chaturvedi *et al.*, 2007).

Tabla 1. Algunos ejemplos de micropropagación exitosa llevada a cabo en plantas medicinales.

Nombre común (Especie)	Origen explante	Referencias
Ajo (<i>Allium sativum</i> L.)	Meristemos apicales	Ayabe y Sumi, 1998
Aloe (<i>Aloe vera</i> L.)	Brotos apicales	Cavallini, 1991
Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss)	Nodales	Chaturvedi <i>et al.</i> , 2004
Papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	Puntas de los brotos	Agnihotri <i>et al.</i> , 2004
Menta japonesa (<i>Mentha arvensis</i> L.)	Brotos axilares	Dhawan <i>et al.</i> , 2003
Piña (<i>Ananas comosus</i> L.)	Hojas	Sripaoraya <i>et al.</i> , 2003
Ginseng (<i>Panax ginseng</i> Mey.)	Cotiledones	Choi <i>et al.</i> , 1998

* Datos tomados y modificados de Chaturvedi *et al.*, 2007

1.1.1 Compuestos fenólicos

Las plantas producen una gran cantidad de productos secundarios que contienen un grupo fenol que químicamente es un grupo funcional hidroxilo unido a un anillo aromático. Estos compuestos se clasifican como compuestos fenólicos y son biosintetizados en la vía de los fenilpropanoides/ ácido shikímico. Los fenoles vegetales son un grupo químicamente heterogéneo de alrededor de 10,000 compuestos y en la naturaleza pueden existir como derivados glucosilados o acilados o como estructuras polimerizadas. También pueden encontrarse como componentes de estructuras celulares como la pared celular, o bien, asociados a moléculas como carbohidratos o proteínas (Manach *et al.*, 2004; Serafini *et al.*, 2010; Tarascou *et al.*, 2010; Pérez-Jiménez y Torres, 2011; Santos-Buelga *et al.*, 2012). Algunos son

solubles sólo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos o glucósidos solubles en agua y otros son polímeros grandes e insolubles. Algunos compuestos fenólicos tienen una función alelopática inhibiendo el crecimiento de plantas competitivas (Zhao *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos se pueden dividir en varios grupos dependiendo del número de anillos fenoles que contengan y los elementos estructurales que los mantengan unidos. Los grupos más importantes son flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos y antocianinas, entre otros (fig. 2) (Kruse *et al.*, 2000; Manach *et al.*, 2004; Taiz y Zeiger, 2006; D'Archivio *et al.*, 2007; Dai y Mumper, 2010).

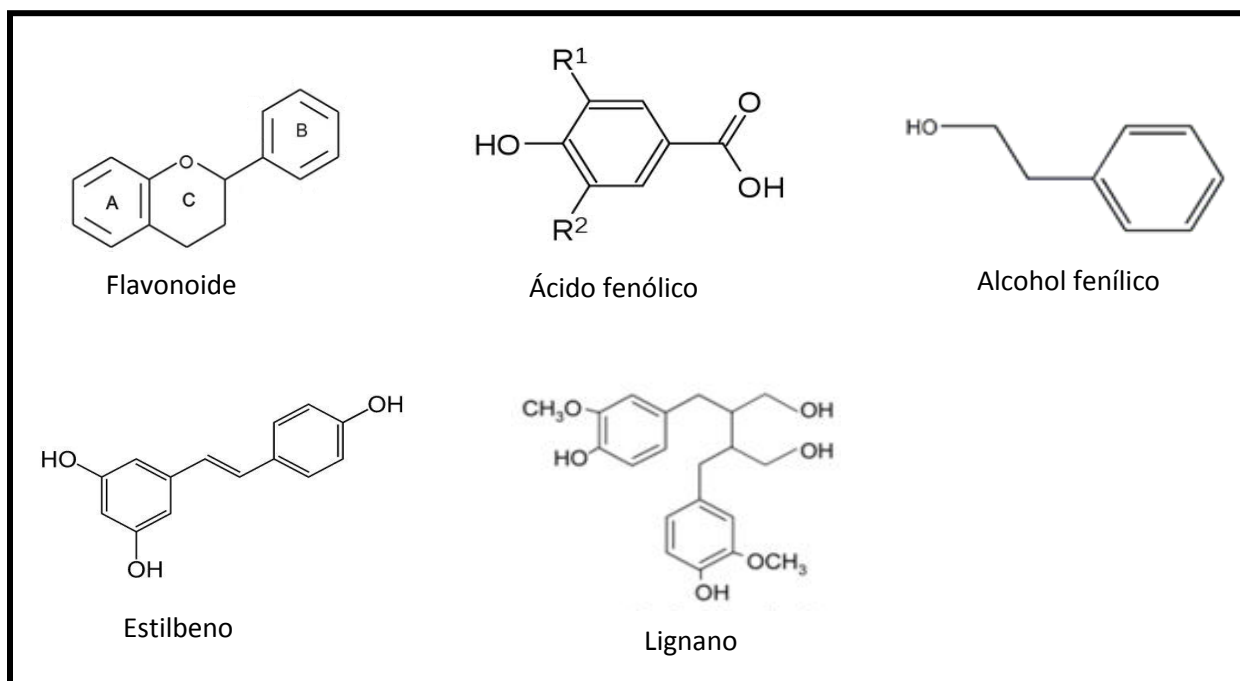


Figura 2. Principales compuestos fenólicos (tomada de Oregon State University: <http://lpi.oregonstate.edu/>).

1.1.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes presentes en la dieta humana y representan una clase de moléculas caracterizadas por un esqueleto de difenilpropano (C6-C3-C6), dos anillos benceno unidos a una cadena lineal de carbono (Manach *et al.*, 2004; Prasain *et al.*, 2010). Esta cadena central podría formar un anillo pirano con uno de los anillos benceno. En las plantas estos compuestos son especialmente importantes como mecanismos de defensa contra el daño oxidativo y proveen a la planta de color atractivo para polinizadores, repelen ataques de insectos y microbios. Investigaciones recientes sugieren que los flavonoides son benéficos para la salud humana principalmente en padecimientos tales como: el síndrome metabólico y diversos tipos de cáncer, además refuerzan el sistema inmune. Estos compuestos pueden ser encontrados en la mayoría de los alimentos de origen vegetal, así como en los alimentos y bebidas derivados de estos y están presentes en altas concentraciones en manzanas, cebollas, uvas, moras y cítricos (Serafini *et al.*, 2010). Se estima que el consumo de flavonoides en la dieta humana es de aproximadamente de 1 g por día (Galleano *et al.*, 2012). Los flavonoides pueden ser divididos en seis subclases (fig. 3), dependiendo del estado de oxidación de su anillo pirano. Estas subclases son flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles. Se han identificado más de 4000 flavonoides en plantas y este número sigue en aumento porque existe un gran número de sustituciones primarias (Harborne y Williams, 2000; D'Archivio *et al.*, 2007).

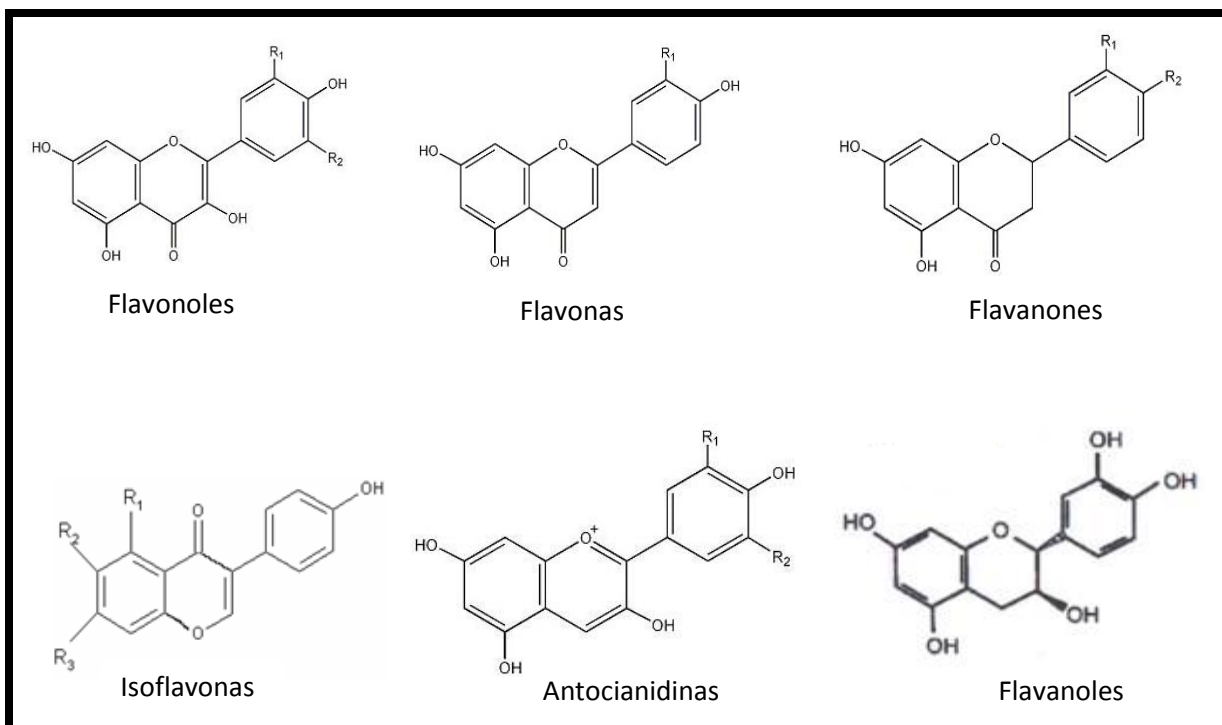


Figura 3. Subclases de flavonoides (tomada de Oregon State University: <http://lpi.oregonstate.edu/>).

1.2 Capacidad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas, inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Moon y Shibamoto, 2009). Algunos de los antioxidantes son vitaminas A, C y E, carotenoides, tocoferoles, compuestos fenólicos simples (ácido cafeico y ácido clorogénico) o complejos como los flavonoides (quercetina, catequina) y antocianinas (Turyanitsa *et al.*, 2006; Gülçin, 2012). Otros antioxidantes están involucrados en mecanismos de defensa no enzimáticos como el caso del glutatión y la propia vitamina C (ácido ascórbico) (Noctor y Foyer, 1998; Mitler, 2002). La capacidad antioxidante se considera como la actividad biológica responsable del efecto preventivo del daño celular (Heo *et al.*, 2007). Para prevenir el daño oxidativo,

las células y los organismos utilizan tres estrategias de defensa. La primera consiste en el uso de mecanismos no enzimáticos en los que se utilizan antioxidantes de bajo peso molecular, como los carotenoides (β -caroteno) y las vitaminas (C o ácido ascórbico y E o α -tocoferol). La segunda estrategia comprende la reparación de daños causados por las ERO en componentes celulares y macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, a través de enzimas reparadoras. Finalmente, el tercer mecanismo es la transformación de las ERO a través de enzimas que son capaces de remover, neutralizar o depurar radicales libres o sus intermediarios (Mohamed *et al.*, 2007; Tavarini *et al.*, 2008). La actividad antioxidante total es una estimación fiable y global de la capacidad antioxidante de un alimento, además de ser un parámetro interesante para valorar la calidad nutracéutica del producto en cuestión (Arnao *et al.*, 1996).

Las defensas antioxidantes en plantas forman un sistema complejo, el cual incluye dos clases generales de antioxidantes no enzimáticos: 1) antioxidantes asociados a la membrana liposoluble (α -tocoferol y carotenoides) y 2) reductores solubles en agua (glutación y ácido ascórbico o vitamina C). Los mecanismos enzimáticos de eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las plantas incluyen, entre otros, las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutación peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Liu *et al.*, 2009). La SOD y la CAT son las enzimas antioxidantes más eficientes, y son las primeras en actuar durante la defensa contra las ERO, convirtiendo el $\cdot O_2$ en H_2O y O_2 . Posteriormente, las enzimas APX, GPX y CAT eliminan el H_2O_2 (Scandalios, 1993; Liu *et al.*, 2009). Existen otros antioxidantes en las plantas, como los isoflavonoides, fenoles,

poliaminas y aminoácidos específicos, particularmente la cisteína y la metionina (Aqil *et al.*, 2006).

Los compuestos antioxidantes utilizados como aditivos alimentarios o suplementos farmacéuticos, pueden neutralizar el efecto dañino de los radicales libres en las células del organismo, antes de que causen la oxidación de las biomoléculas y, por tanto, pudieran ayudar a la prevención de muchas de las enfermedades asociadas a las ERO (Shewfelt y del Rosario, 2000; Elkahoui *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005; Moon y Shibamoto, 2009). Sin embargo, factores varietales y medioambientales pueden iniciar cambios desfavorables en la composición química en los alimentos de origen vegetal (Abushita *et al.*, 1997). En este sentido, se ha reportado que la variación de las condiciones climáticas puede influir significativamente en los perfiles de composición química y nutracéutica de diferentes frutas, hortalizas y plantas medicinales (Raffo *et al.*, 2006).

1.3 Cultivo de Tejidos Vegetales

La tecnología del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta que permite producir y estudiar metabolitos secundarios así como incrementar su producción (Zhong, 2001; Smetanska, 2008). Por lo que los sistemas de CTV representan una fuente potencial para producir metabolitos secundarios importantes, que pueden ser utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica tales como: colorantes, saborizantes y sustancias con propiedades biológicas como los compuestos antioxidantes (Zhong, 2001). Las propiedades biológicas y químicas de las plantas medicinales dependen de muchos factores, entre los cuales figuran las propiedades

edáficas de la región de cultivo, las condiciones del clima, fase vegetativa así como variaciones en la calidad de los cultivos, entre otros. Por ello, es importante el estudio de la flora en diferentes sitios, países y zonas geográficas (Puertas *et al.*, 2009).

1.3.1 Aplicación del cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales tiene tres principales aspectos de aplicación:

1. La reproducción vegetativa o micropropagación y mejora genética, 2. Como sistema modelo para estudiar aspectos genéticos, fisiológicos, bioquímicos y patológicos de la célula vegetal, 3. Para la producción de metabolitos secundarios de interés comercial. Estos tres aspectos permiten producir una gran cantidad de individuos idénticos, selección de características ventajosas, entrecruzamiento de especies relacionadas por fusión de protoplasmas, transformación y remoción de virus, entre otros (Mistretta *et al.*, 1991; Csabai *et al.*, 2011). Los primeros cultivos de tejidos vegetales fueron establecidos en 1930, sin embargo fue hasta 1956 que Pfizer Inc. patentó por primera vez la obtención de metabolitos secundarios mediante cultivos de tejidos (Ratledge y Sasson, 1992). En la actualidad, el cultivo de tejidos vegetales tiene aplicaciones comerciales, en la investigación básica en biología celular, genética y bioquímica (Zhong, 2001; Tasheva y Kosturkova, 2012). Existe una gran diversidad de plantas que son difíciles de cultivar y que contienen compuestos con propiedades biológicas de interés farmacéutico y alimentario (Rates, 2001). Al mismo tiempo, no siempre es viable sintetizar estos productos en un laboratorio, debido a su estructura compleja y características estereoquímicas. El cultivo de tejidos es una tecnología que permite incrementar el contenido de

metabolitos secundarios en comparación con el rendimiento obtenido utilizando plantas silvestres (Verpoorte *et al.*, 2002).

1.3.2 Ventajas y desventajas del cultivo de tejidos vegetales

El uso de cultivo de tejidos vegetales como tecnología biotecnológica tiene algunas ventajas sobre la producción convencional de plantas:

1. Es independiente de variaciones geográficas y factores ambientales.
2. Ofrece un sistema de producción definida que asegura un suministro continuo de productos, así como una calidad y rendimiento uniformes.
3. Permite seleccionar líneas celulares con una alta producción de metabolitos secundarios.
4. Permite producir nuevos compuestos que en condiciones silvestres no se encuentran en la planta.
5. Puede haber una disminución en los costos y un aumento en la productividad.

Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología depende del tipo de planta utilizada y a pesar de las ventajas existen algunos problemas que deben ser resueltos antes de poder utilizarla exitosamente en la producción de metabolitos secundarios de importancia económica (Smetanska, 2008). En general, los problemas con los cultivos de tejidos vegetales pueden ser del tipo biológicos (crecimiento lento, heterogeneidad fisiológica, inestabilidad genética, bajo contenido de metabolitos) y

operacionales (requerimiento de luz, condiciones asépticas y agentes oxidantes) (Zhong, 2001; Raghavan, 2003).

La micropropagación es un proceso que consiste en generar clones de especies vegetales en peligro de extinción y aquellas de interés ornamental y medicinal; que implica 4 etapas (fig. 5): 1) Establecimiento de cultivos asépticos (iniciación), 2) Multiplicación de brotes, 3) Inducción de raíces, y 4) Aclimatación (Bhojwani y Razdan, 1983; Pierik, 1990; Gamborg y Phillips, 1995; Trigiano y Gray, 2000; George y Debergh, 2008; Gonçalves y Romano, 2012).



Figura 4. Etapas de la micropropagación (imagen tomada de Métodos de Propagación Vegetal: <http://metodosdepropagacion.blogspot.mx/>).

1.4 *Buddleja cordata* (Tepozán)

1.4.1 Botánica

El género *Buddleja* está ampliamente distribuido en el mundo y comprende alrededor de 100 especies arbóreas y arbustivas. El 50% ellos crece en el continente americano y en México existen aproximadamente 15 especies con algunos representantes de amplia distribución (Norman, 2000).

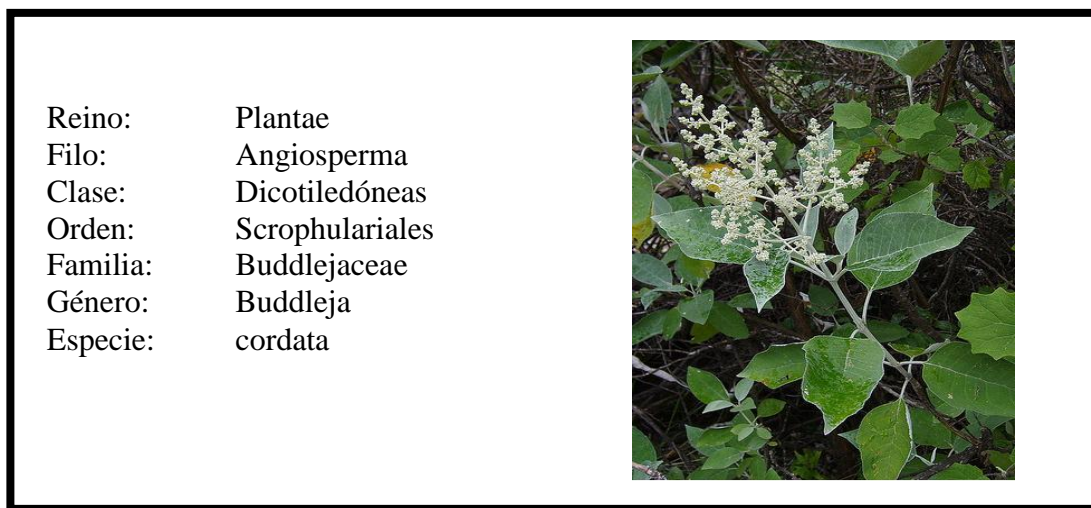


Figura 5. Clasificación taxonómica de *B. cordata*.

Buddleja cordata Humb. Bonpl. & Kunth es una especie, dioica, perenne que va de arbustos a árboles, midiendo de 1 a 20m de altura y de 10 a 45 cm de diámetro en la base. Sin embargo, hay árboles individuales que llegan a medir 80 cm en su diámetro (Norman, 2000; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). Pertenece al orden de las Scrophulariales y a la familia Buddlejaceae (fig. 4). Sus hojas son de 10 a 15 cm de largo, pecioladas, de base ancha generalmente redondeada en la punta, el haz de color verde claro y envés peludo. Tiene flores pequeñas, amarillas y

aromáticas agrupadas en amplias terminales (Martínez, 1979; Sánchez, 1980; Gallardo-Vázquez, 1994).

Tiene una amplia distribución en México, desde los estados del norte de Sinaloa, Chihuahua y Durango hasta los estados del sur de Oaxaca y Chiapas (Aguilar *et al.*, 2006). Esta especie crece en tanto bosques de *Quercus*, como de coníferas, mesófilo de montaña y en vegetación secundaria (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005), tolera condiciones de sequía, por lo que también se desarrolla en matorrales xerófilos y en suelos erosionados, en altitudes de 1500 a 3000m.

1.4.2 Usos y fitoquímica

Es una especie de crecimiento rápido que se ha utilizado como planta ornamental (Martínez y Chacalo, 1994). En la medicina tradicional se tienen registros sobre su empleo para diversas enfermedades. Se le atribuyen propiedades analgésicas, eupépticas, diuréticas y antisépticas, además, se emplea en el tratamiento de cirrosis, problemas de la bilis, del útero y ojos; también ayuda a sanar zonas afectadas por tumores y úlceras (Ortiz, 1996). Los estudios fitoquímicos de sus hojas, corteza y raíces han evidenciado sus propiedades bactericidas y amebicidas (Ordaz, 1996). Las hojas son empleadas para tratar la diarrea, el dolor de cabeza, el reumatismo, el dolor de cintura, los calambres musculares, las enfermedades de la piel e inflamaciones, las hemorragias nasales y las infecciones intestinales (Gallardo, 1994; Rodríguez *et al.*, 1999); la decocción de raíces y corteza son usadas como diurético y para tratar infecciones de riñón (Martínez, 1989). Como plaguicida, el extracto acuoso de la planta es utilizado como repelente del gusano cogollero, contra

algunas enfermedades de animales, como forraje complementario de ganado ovino, caprino y vacuno y también para la restauración ecológica ya que produce una gran cantidad de materia orgánica.

1.4.3 Fenilpropanoides de *Buddleja cordata*

Los estudios fitoquímicos reportan que entre los componentes aislados de *B. cordata* se encuentran los fenilpropanoides aislados principalmente de partes aéreas tales como el verbascósido (Arciniegas *et al.*, 1997; Ávila *et al.*, 1999) o acteósido (Andary, 1982; Petit *et al.*, 1990), los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Harborne, 1990) y el flavonoide linarina (Houghton, 1984; Rodríguez *et al.*, 1999; Martínez-Vázquez, 1996 y 1998). Las propiedades terapéuticas de la planta se han asociado principalmente con los compuestos del tipo fenilpropanoide (Houghton y Mensah, 1999) por presentar una o varias de las siguientes actividades: parasiticida, antimicrobiana, analgésica, antiviral, antiproliferativa o citotóxica, antihipertensiva, antioxidante, antipirética y anti-inflamatoria. También se han identificado metabolitos del tipo terpenoide como el sesquiterpeno buddledina A, con actividad plaguicida y antifúngica (Yoshida *et al.*, 1978; Devivar *et al.*, 1995; Houghton y Mensah, 1999; Houghton *et al.*, 2003), y el iridoide aucubina con actividad antibacterial y antioxidante (Recio *et al.*, 1994).

1.4.4 Cultivo de tejidos en familias relacionadas a *Buddleja*

Las plantas medicinales generalmente son usadas con fines terapéuticos, por lo que el establecimiento del CTV ha sido evaluado mayoritariamente con la finalidad de producir metabolitos secundarios y para micropropagar estas especies. En el caso específico de la familia *Buddleja* (*officinalis*, *albiflora*, *dauidii* y *brasiliensis*) se ha observado la producción de un fenilpropanoide conjugado conocido como verbascósido (Tai *et al.*, 2009; Zhang y Tao, 2010; Vertuani *et al.*, 2011; Filho *et al.*, 2012). A este compuesto se le atribuyen muchos de los efectos benéficos en la salud, por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y hepatoprotectoras (He *et al.*, 2000; Chiou *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Zúñiga *et al.*, 2009). En este sentido, diversos autores han reportado que la manipulación de las condiciones del CTV (como la composición del medio, los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa, etc.) incrementó la producción del verbascósido en cultivo de callos, células en suspensión y raíces transformadas de diferentes especies vegetales tales como: *Aphelandra*, *Campsis*, *Catalpa*, *Cistanche*, *Clerodendron*, *Digitalis*, *Eremophila*, *Hygrophilia*, *Leucosceptrum*, *Osmanthus*, *Paulownia*, *Penstemon*, *Rehmannia*, *Syringa*, *Tecoma* (Shoyama *et al.*, 1986; Inagaki *et al.*, 1991; Pletsch *et al.*, 1993; Wysokińska y Rozga, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998; Nezbedová *et al.*, 1999; Skrzypek y Wysokińska, 1999; Wysokińska *et al.*, 2001; Lu y Mei, 2003; Dhakulkar *et al.*, 2005).

Por otra parte, existen un gran número de trabajos que se han llevado a cabo con la finalidad de micropropagar diferentes especies mediante la multiplicación *in vitro* (Sudha y Seeni, 1994; Bhattacharya y Bhattacharya, 1997; Hoshino y Mii, 1998; Braga *et al.*, 2012). Sin embargo, es importante resaltar que los únicos datos sobre el cultivo de tejidos vegetales con *B. cordata* fueron reportados por Estrada Zúñiga *et al.*, (2009) para la producción de fenilpropanoides en cultivos de callo y de células en suspensión.

2 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los productos herbolarios que se venden en México se contemplan como suplementos alimenticios y no como medicamentos o remedios herbolarios, por lo tanto no se les exige un control de calidad. *Buddleja cordata* es una planta silvestre utilizada en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades. En la actualidad no existen cultivos comerciales, por lo que es importante profundizar en el conocimiento químico de la composición de *B. cordata* mediante la técnica de micropropagación, con el fin de obtener plantas homogéneas con un contenido químico uniforme, lo cual permitirá generar extractos estandarizados que pudieran utilizarse en ensayos clínicos, como paso fundamental para desarrollar fitofármacos, a partir de esta planta medicinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer un protocolo de micropropagación de *Buddleja cordata* y determinar el contenido del verbascósido, de los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante.

3.2 Objetivos particulares

1. Establecer cultivos asépticos de explantes nodales de *B. cordata*.
2. Evaluar el efecto del regulador de crecimiento vegetal (RCV) 6-benciladenina (BA) a distintas concentraciones en la inducción de brotes en los explantes nodales.
3. Evaluar el efecto del RCV Ácido Giberélico (AG_3) sobre el alargamiento de los brotes multiplicados
4. Evaluar el efecto del RCV ácido indol butírico (AIB) sobre el porcentaje de inducción de raíces en los brotes alargados.
5. Evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas aclimatadas.
6. Cuantificar el contenido de los compuestos fenólicos totales, la capacidad antioxidante, el verbascósido y la linarina en plántulas de *B. cordata* micropropagadas y plantas fuente de explantes.

4 HIPÓTESIS

La aplicación de los RCVs citocinina [6-benciladenina (BA)], giberelina [ácido giberélico (AG₃)] y auxina [ácido indol butírico (AIB)] sobre los explantes nodales de *B. cordata* en las distintas etapas de micropropagación permitirá la obtención de un número significativo de plántulas capaces de producir fenilpropanoides, presentando capacidad antioxidante.

5 METODOLOGÍA

5.1 *Obtención del material biológico y protocolo de micropropagación*

Se obtuvieron plantas de *B. cordata* de aproximadamente 2 años de edad originarias de Santa María Apaxco, Estado de México, las cuales fueron identificadas y registradas en el herbario de la UAM-Iztapalapa con el registro No. 61170.

5.1.1 Establecimiento de cultivos asépticos

Explantes nodales juveniles de aproximadamente 0.3-0.5 cm fueron removidos de plantas silvestres de *B. cordata*, previamente fertilizadas. Se desinfestaron superficialmente siguiendo los siguientes pasos:

- a) Inmersión en una solución de detergente comercial al 1% (p/v) durante 15 min.
- b) Inmersión en distintas soluciones de agentes antimicrobianos (Tabla 2) durante 30 min.
- c) Inmersión en solución de EtOH al 70% (v/v) durante 45 s.
- d) Inmersión en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a diferentes concentraciones y tiempos adicionada de 3 gotas de *Tween 20* por cada 100 mL de solución preparada (Tabla 3).
- e) Lavados con agua destilada estéril (4) en condiciones asépticas.
- f) Inmersión en solución antioxidante (150 y 100 mg L⁻¹ de ácidos ascórbico y cítrico, respectivamente) durante 20 min.

Tabla 2. Concentraciones de fungicida y antibióticos para el establecimiento de cultivos asépticos.

Tratamiento	Agente antimicrobiano	Concentración
A0	0	0
A1	Bravo 720	1 % (v/v)
A2	Mezcla de Antibióticos: Ampicilina, tetraciclina, cefotaxime	100 mg L ⁻¹ , 10 mg L ⁻¹ , 10 mg L ⁻¹
A3	A1+A2	A1+A2

Tabla 3. Concentraciones y tiempos de inmersión en la solución NaClO para el establecimiento de cultivos asépticos.

Tratamiento	NaClO (% p/v)	Tiempo (min)
N1	0.6	10
N2	0.6	15
N3	0.6	30
N4	0.9	15

Una vez desinfectados superficialmente, los explantes nodales fueron sembrados (3 explantes por frasco) en medio de cultivo basal, el cual consistió de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y phytigel 2 g L⁻¹ (fig. 6). Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 10 días, monitoreándose diariamente la presencia de microorganismos, y una vez transcurrido el tiempo de incubación se evaluó el porcentaje de contaminación en referencia al número de explantes contaminados con respecto al total de explantes

sembrados en cada tratamiento. Se seleccionó el tratamiento que presentó el porcentaje de contaminación menor ($0\pm 1\%$) para la obtención de los cultivos asépticos.

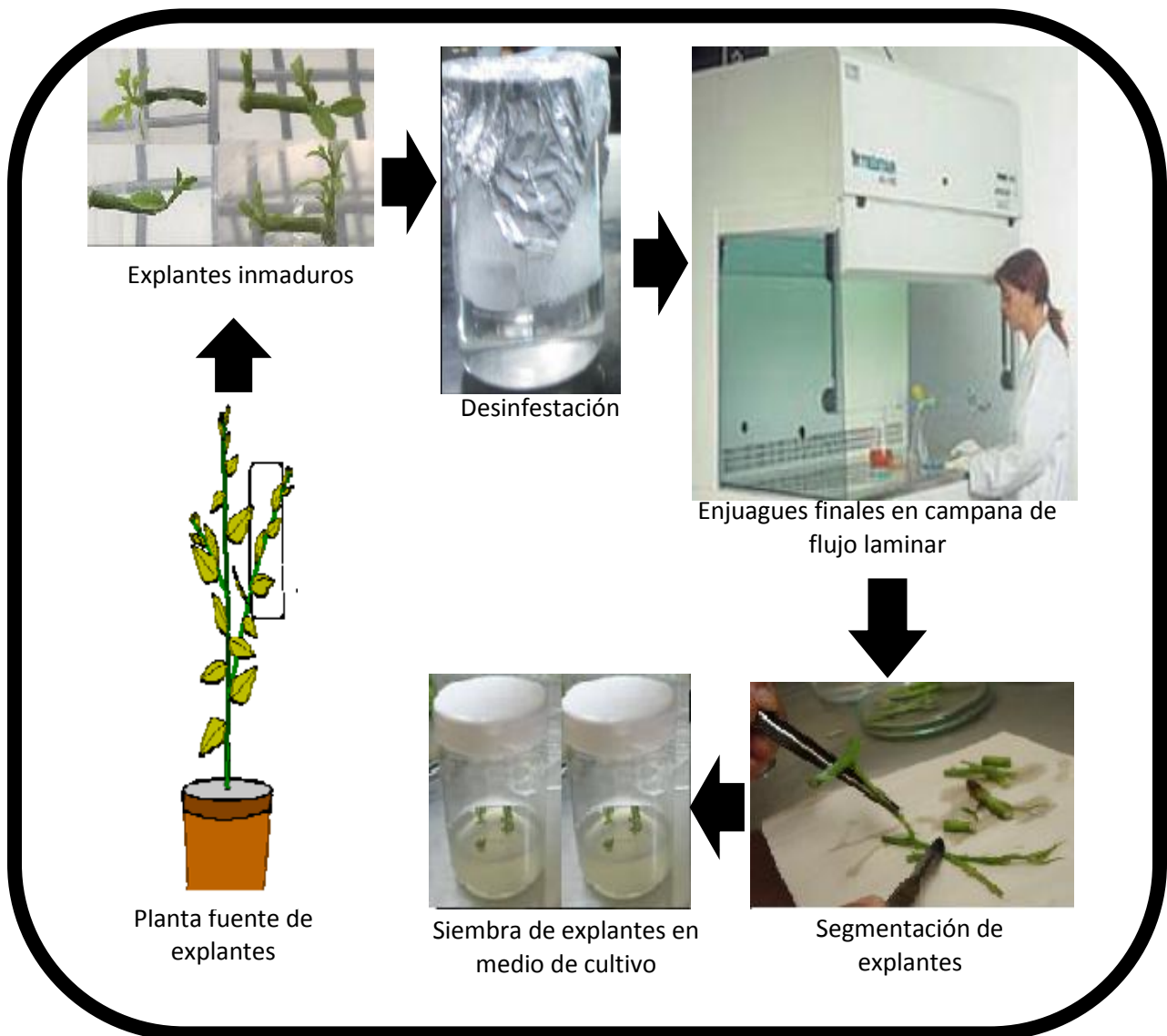


Figura 6. Establecimiento de cultivos asépticos (imagen tomada y modificada de Estrada Zúñiga, 2010).

5.1.2 Multiplicación de los brotes

Una vez establecidas las condiciones de asepsia, se sembraron los explantes nodales en medio de cultivo basal adicionado de 6-benciladenina (BA) a distintas concentraciones (Tabla 4)

Tabla 4. Concentraciones de BA para la inducción de brotes.

BA (μM)				
0	0.44	2.22	4.44	13.32
B0	B1	B2	B3	B4

Los cultivos fueron incubados por 30 días. Los explantes nodales que presentaban inducción de brotes fueron transferidos a un nuevo medio de cultivo para su alargamiento, el cual consistió de medio de cultivo basal adicionado de ácido giberélico (AG_3) a una concentración de $8.67 \mu\text{M}$ (1 explante nodal por frasco). Los cultivos fueron incubados por 30 días, tiempo en el que se determinó el número de brotes inducidos por explante nodal.

5.1.3 Inducción de raíces

Se removieron los brotes alargados de los nodos para su individualización. Los brotes fueron transferidos a medio de cultivo basal adicionado de ácido indol butírico (AIB) a una concentración de $2.45 \mu\text{M}$ y fueron incubados por 30 días, tiempo en

que se procedió a evaluar el porcentaje de inducción de raíces de acuerdo al número de brotes presentando la formación de raíces con respecto al total de brotes sembrados.

Las condiciones de incubación para las etapas 1-3 (establecimiento del cultivo aséptico, multiplicación de brotes e inducción de raíces) consistieron en: temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo un fotoperiodo de 16 h luz ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; luz fluorescente blanca). Cada tratamiento que se llevó a cabo para las etapas 1-3 consistió de 5 frascos y 3 réplicas.

5.1.4 Aclimatación

Las plántulas enraizadas fueron transferidas a macetas conteniendo como sustrato una mezcla de peat moss y agrolita (1:1), previamente esterilizada, cuya parte superior fue cubierta con una bolsa de plástico transparente. Se colocaron bajo una lámpara de luz fluorescente blanca ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bajo un fotoperiodo de 16 h luz a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. La humedad relativa se disminuyó gradualmente durante un mes por medio de la perforación del plástico, hasta su completa eliminación. Durante dicho proceso, las macetas fueron irrigadas con agua destilada y con una solución de Bravo 720 al 1% (v/v) para evitar el crecimiento de hongos. Una vez eliminada la cubierta plástica se procedió a transferir las plántulas al invernadero, y cuando las plántulas desarrollaron nuevo material vegetal se determinó el porcentaje de sobrevivencia (número de plántulas vivas con respecto al total de plántulas transferidas a maceta).

5.2 Análisis fitoquímico

5.2.1 Procesamiento del material vegetal

Una vez que se obtuvieron las plántulas micropropagadas, se procedió al procesamiento de las mismas. Este procesamiento se realizó de manera paralela con las plantas que se usaron como fuentes de explantes (silvestre). La parte de las plantas que se utilizó fueron las hojas y se utilizaron tres tipos de procesamiento: procesado en fresco, liofilizado, secado tradicional (a la sombra por 10 días). El tejido fresco fue congelado con nitrógeno líquido y macerado con un mortero para obtener un polvo. Una parte de este polvo se utilizó para las determinaciones en fresco y la otra parte para la liofilización. En cuanto al secado tradicional, las hojas se secaron a la sombra durante 10 días y se maceraron. A continuación se preparó el extracto crudo de *B. cordata* mezclando 0.5g de material vegetal procesado con 20 mL de metanol al 60% v/v. Esta mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas a 40°C (fig. 7A). Finalmente, los extractos se filtraron con papel filtro Whatman No. 1 y fueron empleados en la determinación de fenoles totales, capacidad antioxidante, verbáscosido y linarina (Crozier *et al.*, 1997; Mustafa *et al.*, 2010).

5.2.2 Determinación de compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó usando el reactivo de Folin–Ciocalteu mediante la técnica descrita por Singlenton y Rossi (1965). Se utilizó una alícuota de 1 mL del extracto crudo de *B. cordata* diluido 1:10 (v/v) con metanol

al 80% v/v. Esta dilución se mezcló con 1 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu (previamente diluido con agua a 1:10 v/v) y se incubó por 1 min antes de adicionarle 0.8 mL de carbonato de sodio 7.5% p/v. La mezcla de reacción se incubó por 1 h a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 765 nm (fig. 7B). El contenido total de compuestos fenólicos se reportó como equivalentes de ácido gálico (EAG) en mg g^{-1} de tejido vegetal de *B. cordata*.

5.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se basó en la evaluación de la capacidad del extracto de *B. cordata* para secuestrar radicales libres de acuerdo al método descrito por Brand-Williams y colaboradores (1995). Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrácil) 0.1mM en metanol al 100%. La mezcla de reacción contuvo 50 μL del extracto vegetal de *B. cordata* y 950 μL de la solución de DPPH 0.1mM. La capacidad antioxidante fue determinada mediante el decremento de la absorbancia a 515 nm (fig. 7B). Los resultados se reportaron como la capacidad antioxidante equivalente del Trolox $\mu\text{M g}^{-1}$ de tejido vegetal.

5.2.4 Cuantificación de fenilpropanoides

Se cuantificaron los fenilpropanoides verbascósido y linarina usando un equipo HPLC Agilent 1100 con una columna C_{18} , fase-reversa con las siguientes dimensiones: 3.9 x 300 mm y 10 μm de diámetro interno (Waters, Milford, Mass., USA) y con un

detector de arreglo de fotodiodos (fig. 7C). Antes de ser inyectado, el extracto crudo fue filtrado con un filtro de nylon de 0.45 μm .

Se utilizó como fase móvil una mezcla de (A) ácido fosfórico 0.3% (v/v) y (B) acetonitrilo. Se manejó un gradiente de elución (Tabla 5) con un flujo de 1 mL min^{-1} . Se manejó una temperatura de 30°C (Mustafa *et al*; 2010).

Tabla 5. Gradiente de elución para la determinación de los fenilpropanoides en *B. cordata* por HPLC.

TIEMPO (MIN)	AC. FOSFÓRICO 0.3%	ACETONITRILO
0	100	0
5	87	13
38	78.2	21.8
71	65	35
75	65	35

Se utilizaron estándares de los fenilpropanoides verbascósido y linarina para identificarlos por el tiempo de retención y cuantificarlos a través del área. La concentración de los fenilpropanoides en los extractos se determinó mediante la elaboración de curvas patrón de los estándares.

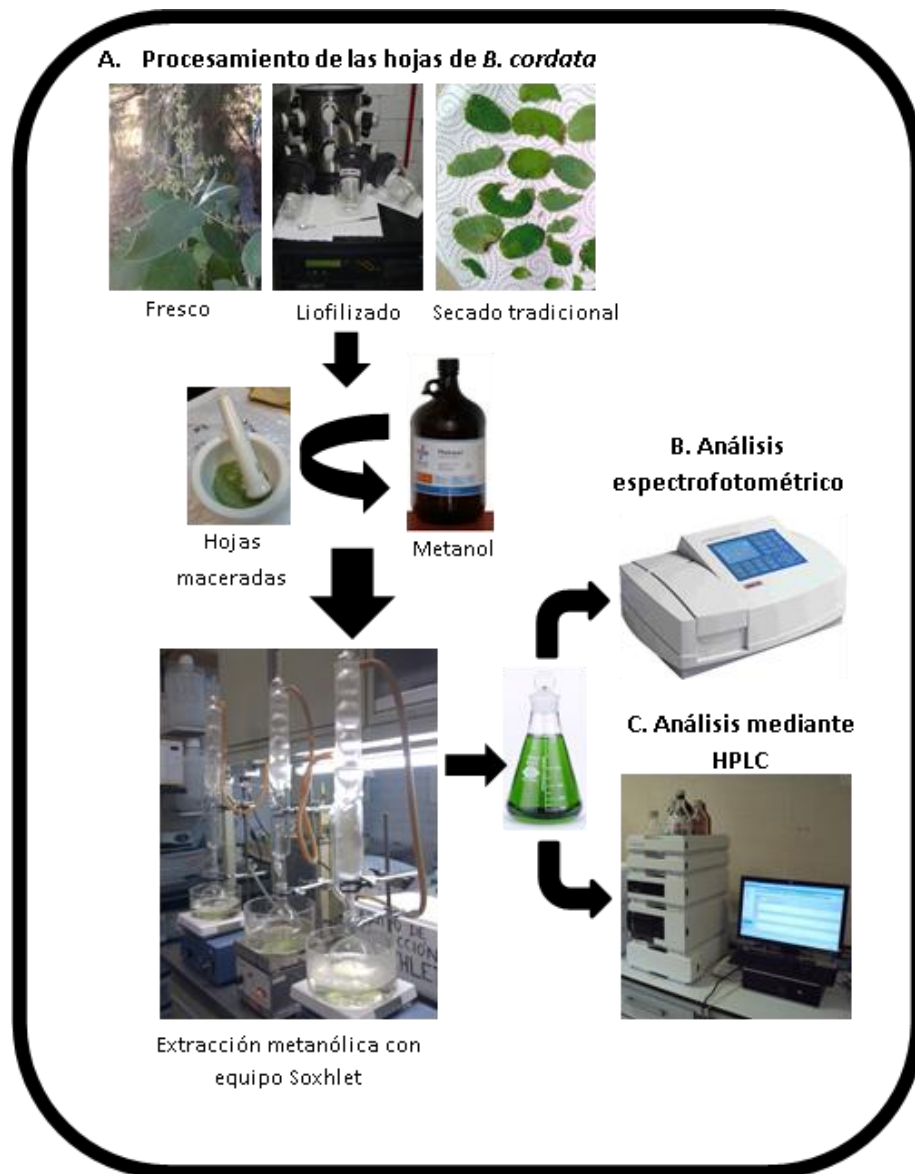


Figura 7. Metodología para el análisis fitoquímico.

5.2.5 Análisis estadístico

Se empleó el software estadístico NCSS (2001) para efectuar el análisis estadístico de los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de contaminación, número de brotes inducidos, porcentaje de: inducción de raíces y sobrevivencia de plántulas. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple de medias, fijando a 0.05 el nivel de significancia.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento cultivos asépticos

El establecimiento de los cultivos asépticos consistió en evaluar el tiempo de aplicación y el efecto de los agentes antimicrobianos y antioxidantes en los explantes nodales. Después de una inmersión en detergente durante 15 minutos, los explantes fueron sumergidos en una solución de NaClO a concentración porcentual 0.6 y 0.9 (p/v) por diferentes tiempos.

Después de tratar con NaClO al 0.6% (p/v) durante 10 y 15 minutos, se seguía observando una alta contaminación de los explantes (77 y 38%, respectivamente). Al prolongar el tiempo de exposición durante 30 minutos, la contaminación disminuyó al 20%, sin embargo la oxidación aumentó considerablemente (80%), después de haber estado alrededor de 5% en las condiciones previas. Con base en estos resultados, se decidió aumentar el porcentaje de NaClO a 0.9% (p/v), con una exposición de 15 minutos. Bajo estas condiciones, la oxidación disminuyó al 20% y la contaminación se mantuvo alrededor del 20% (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del tratamiento con NaClO y tiempo de inmersión sobre la asepsia y oxidación de los explantes nodales de *B. Cordata*.

Tratamiento		Respuesta en explantes nodales	
Solución de NaOCl comercial	Tiempo (min)	% contaminación	% oxidación
0.6 %	10	77± 5.98 ^a	5± 0.31 ^A
0.6 %	15	38.5± 4.23 ^b	4± 0.52 ^B
0.6 %	30	20± 1.62 ^c	80± 4.67 ^C
0.9 %	15	22.5± 2.35 ^c	20± 0.18 ^D

Cada valor es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

Con el fin de disminuir aún más la contaminación, se aplicaron diferentes tratamientos con agentes antimicrobianos (Tabla 7). Los resultados mostraron que la aplicación del fungicida Bravo 720 al 1 % (v/v) y la mezcla de antibióticos (ampicilina, tetraciclina, cefotaxime) disminuyeron la contaminación en un 21.3 y 9.7%, respectivamente con respecto al testigo (Tabla 7). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre el testigo (A0) y la mezcla de antibióticos (A2). Finalmente el tratamiento que incluía el fungicida Bravo 720 al 1 % (v/v) y la mezcla de antibióticos (tratamiento A3) disminuyó la contaminación de los explantes de *B cordata* en un 99.11 %, obteniéndose una contaminación final del 0.2%.

Una vez establecidas las condiciones asépticas, se incubaron los explantes nodales por un periodo de aproximadamente 30 días para su crecimiento y con el fin de obtener brotes y continuar con el proceso de micropropagación.

Tabla 7. Efecto del tratamiento con agentes antimicrobianos sobre la asepsia de los explantes nodales de *B. cordata*.

Tratamiento	Agente antimicrobiano	Concentración	% Contaminación
A0	0	0	22.5 ± 2.35 ^a
A1	Bravo 720	1 % (v/v)	17.7 ± 1.24 ^b
A2	Mezcla de Antibióticos: Ampicilina, tetraciclina, cefotaxime	100 mg L ⁻¹ ; 10 mg L ⁻¹ , 10 mg L ⁻¹	20.3 ± 1.44 ^a
A3	A1+A2	A1+A2	0.2 ± 0.03 ^c

Cada valor es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

6.2 Multiplicación de los brotes

Las citocininas son hormonas vegetales ampliamente usadas en la multiplicación de brotes. El tipo y la concentración utilizada son parámetros importantes para el éxito del cultivo *in vitro*. Existen dos grupos importantes de citocininas de acuerdo a la estructura química de su cadena lateral, las isoprenoides y las aromáticas. Estos dos grupos difieren en sus receptores, actividad biológica y su metabolismo. Las citocininas aromáticas contienen en su estructura química un grupo bencilo y son utilizadas con mayor frecuencia en CTV que las isoprenoides (Werbrouck *et al.*, 1996; Strnad *et al.*, 1997; Van Staden *et al.*, 2008; Csabai *et al.*, 2011). La Benciladenina (BA) es una citocinina aromática que se utiliza de manera regular en CTV (Strnad *et al.*, 1997). En este experimento se aplicaron diferentes concentraciones de BA (0, 0.44, 2.22, 4.44 y 13.32 μM) en un primer subcultivo (subcultivo 0) para determinar la concentración a la cual se obtenía el mayor número

de brotes. Los resultados obtenidos de esta fase experimental mostraron que el mayor número de brotes (4.13) se obtuvo aplicando la concentración 4.44 μM de BA (fig. 8), mientras que a una concentración mayor (13.32 μM), la respuesta fue una disminución en el número de brotes, lo que pudo deberse a una inhibición por la alta concentración de BA. Esto puede ser explicado por el concepto de sensibilidad diferencial de las hormonas vegetales en las plantas, ya que las respuestas son tejido específicas y tienen una concentración óptima para la respuesta y muchas veces a una mayor concentración de hormona se inhibe el proceso en vez de promoverlo (Santner *et al.*, 2009).

Una vez establecida la concentración óptima (4.44 μM de BA), se realizó un segundo subcultivo (subcultivo 1), transfiriéndose los mismos brotes obtenidos del subcultivo 0 en todas las concentraciones utilizadas, sin embargo en el subcultivo 1 sólo se aplicó la concentración de BA previamente establecida como óptima (4.44 μM). En general, se observó un incremento en el número de brotes en todas las concentraciones utilizadas, sin embargo en los brotes tratados con la concentración óptima se observó un aumento de 7.5 veces.

Posteriormente, se realizó un tercer subcultivo bajo las mismas condiciones mencionadas (subcultivo 2) y la tendencia fue la misma que la observada en los dos anteriores, donde el mayor incremento en el número de brotes se observó en los tratados con la concentración óptima (fig. 8). El tiempo de evaluación de cada subcultivo fue de 30 días.

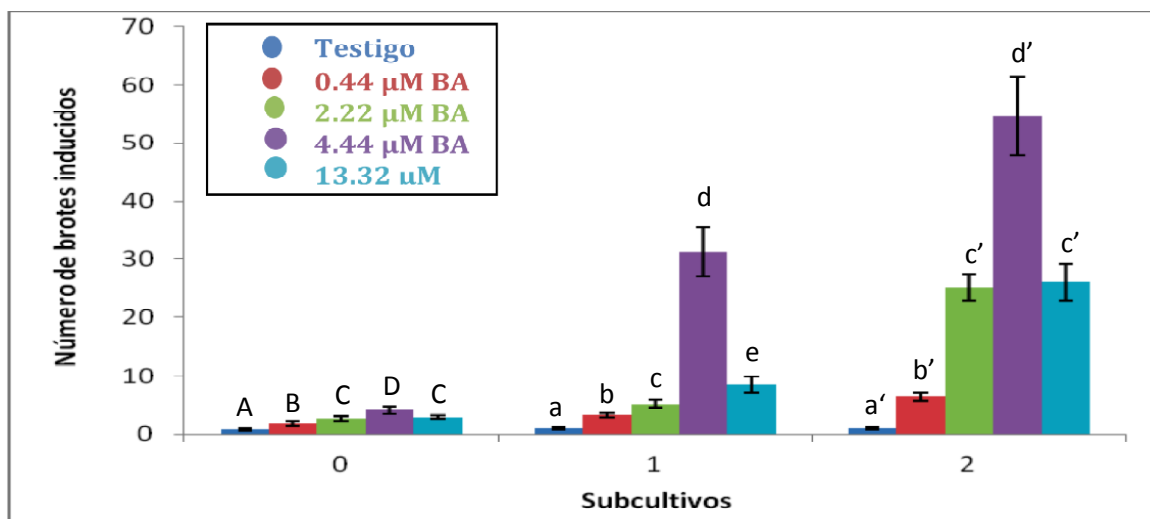


Figura 8. Multiplicación de los brotes de *B. cordata* en respuesta a distintas concentraciones de BA y después de 2 subcultivos a 4.44 μM de BA. Cada valor es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p=0.05$).

Los resultados obtenidos de esta fase experimental concuerdan con los reportados por diferentes autores en la multiplicación de brotes de plantas medicinales en respuesta a BA (Andrade *et al.*, 2009; Csabai *et al.*, 2011; Khalafalla *et al.*, 2011; Braga *et al.*, 2012). Sin embargo es importante resaltar que el efecto de los RCV en la multiplicación de los brotes depende de la especie estudiada (por la influencia de la absorción del RCV, su metabolismo, su transporte dentro de la planta y su interacción con las citocininas endógenas y con otras hormonas endógenas). (Werbrouck *et al.*, 1996; Strnad *et al.*, 1997; Van Staden *et al.*, 2008; Csabai *et al.*, 2011).

6.3 Alargamiento de los brotes

El ácido giberélico estimula el alargamiento vegetal, la floración e interrumpe la latencia en semillas. Además puede interactuar con las auxinas para promover el alargamiento rápido y la división de tallos (Santner *et al.*, 2009; Wang e Irving, 2011). Después de la multiplicación de los brotes, se aplicó ácido giberélico (AG₃) 8.67 μM, para promover su alargamiento. El tratamiento con el AG₃ provocó un aumento significativo de 1.62 veces en la longitud de los brotes en comparación con los brotes testigo (sin RCV) (fig. 9).

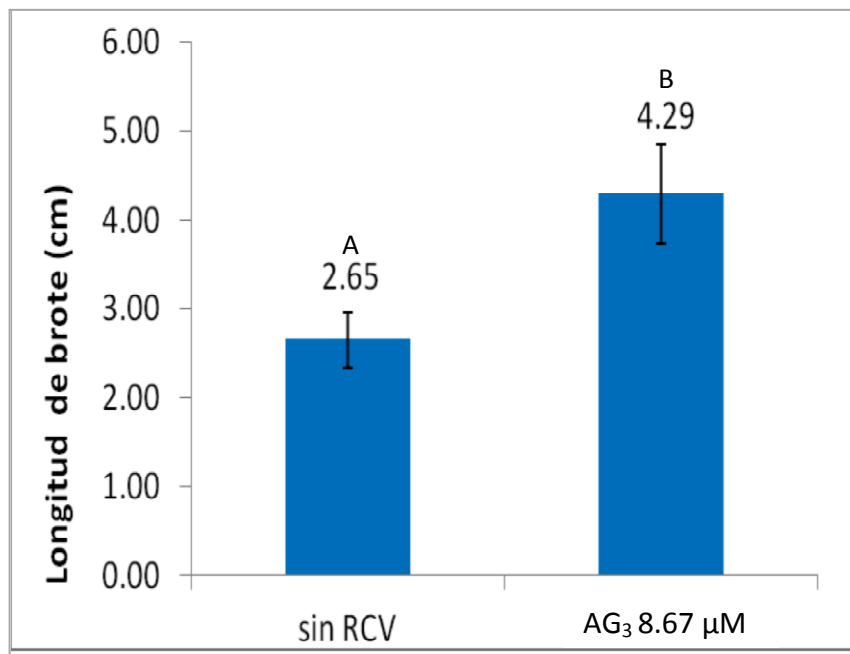


Figura 9. Alargamiento de los brotes inducidos en explantes nodales de *B. cordata* en respuesta a 8.67 μM de ácido giberélico (AG₃). Cada valor es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey (p= 0.05).

Además se observó una inducción de raíces en los brotes alargados (fig. 10). Sin embargo, estos resultados podrían deberse a los niveles endógenos de auxinas presentes (Zuzarte *et al.*, 2010), ya que no existe evidencia en la literatura de la inducción de raíces con el uso de AG₃. No se observaron diferencias significativas

($p > 0.05$) con respecto a la inducción de raíces entre los brotes tratados con AG_3 y los brotes testigo (sin RCV) después de 30 días de tratamiento (fig. 10).

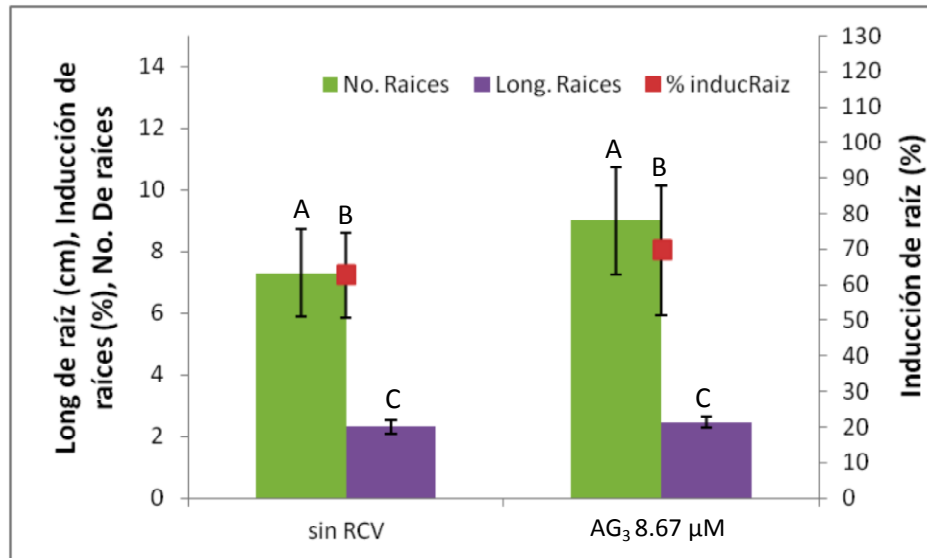


Figura 10. Inducción de raíces en brotes de *B. cordata* tratados con ácido giberélico (AG_3). Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p = 0.05$).

6.4 Inducción de raíces

Las auxinas regulan un gran número de procesos biológicos: división y expansión celular, flujo de iones, iniciación de raíces, foto y geotropismos, dominancia apical etc. (Santner *et al.*, 2009; Wang e Irving, 2011). En la micropropagación se hace uso de las auxinas para la inducción de raíces, que es un paso importante en el éxito del establecimiento de las plántulas, ya que no se pueden transferir a otro sustrato sin la presencia de éstas (Gonçalves y Romano, 2012). Los brotes tratados con AIB 2.45 μ M mostraron un incremento de 1.4 veces en la inducción de raíces (89%) con respecto a los brotes testigo (62%) (fig. 11). De igual manera, se observó un

incremento de 3.3 veces en el número de raíces en los brotes tratados con AIB en comparación al observado en los brotes testigo (fig. 11). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios autores donde la aplicación de concentraciones similares de AIB promovieron la inducción y número de raíces en CTV de plantas medicinales tales como *Lavandula vera* DC y *Boscia senegalensis*, (Andrade *et al.*, 1999; Khalafalla *et al.*, 2011). Por otra parte, existen reportes de trabajos de micropropagación en plantas medicinales, en los cuales no se aplican auxinas exógenas para la inducción de raíces y el porcentaje de inducción obtenido fue de entre el 70 y 100% (Calvo y Segura 1989; Sagare *et al.* 2001; Zuzarte *et al.*, 2010). Sin embargo en el caso específico de *B cordata* en ensayos preliminares, se observó que era necesario adicionar al medio de cultivo auxinas exógenas para incrementar el porcentaje de inducción de raíces hasta en un 89%, garantizando así el éxito de la plántula.

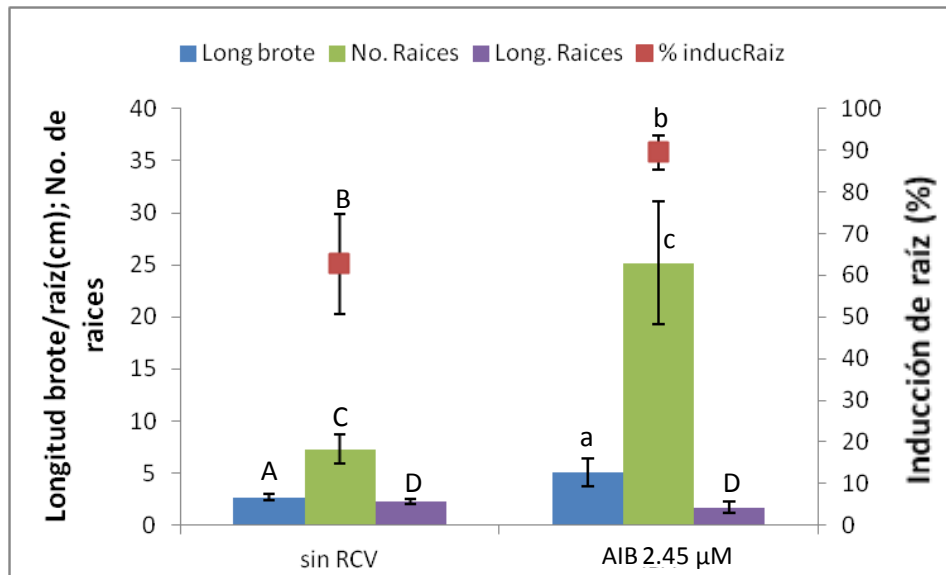


Figura 11. Inducción de raíces en los brotes de *B. cordata* tratados con ácido indol butírico (AIB) 2.45 μM. Cada valor es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey (p= 0.05).

6.5 Aclimatación

Después de la obtención de las raíces, las plántulas fueron transferidas a macetas y llevadas al invernadero para su aclimatación. Después de 45 días y tras haber desarrollado nuevo material vegetal, se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 91.7 ± 11.8 .

6.6 Compuestos fenólicos

La función de los antioxidantes naturales y su contenido de compuestos fenólicos en los alimentos y sistemas biológicos han recibido mucha atención durante los últimos años. Las frutas, hortalizas y las plantas medicinales tienen un papel significativo en la dieta humana brindando protección contra el daño celular causado por la

exposición a altos niveles de radicales libres. Estos beneficios a la salud se atribuyen al hecho de que los alimentos proveen una mezcla óptima de antioxidantes tales como compuestos fenólicos, vitaminas C y E, carotenoides y carbohidratos complejos. Los compuestos fenólicos han sido asociados con la prevención de enfermedades como cardiovasculares, cáncer e inflamación que se piensa son inducidas por estrés oxidativo (Tezcan *et al.*, 2009; Fernández-López *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Ruikar *et al.*, 2011; Vanzani *et al.*, 2011; Barrett y Lloyd, 2012).

Se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de los fenoles totales en los extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes liofilizadas y con secado tradicional de 2.46 y 2.44 veces, respectivamente con respecto a las muestras procesadas en fresco. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras liofilizadas y con secado tradicional (fig. 12). En este sentido, diversos autores han reportado que durante el proceso de secado, existen cambios enzimáticos y no enzimáticos que pueden modificar el contenido de los compuestos fenólicos (Nindo *et al.*, 2003; Arcan y Yemenicioglu 2009). Sin embargo, es importante considerar que las muestras procesadas en fresco de *B. cordata* presentaron un 75% más de humedad en comparación con las muestras liofilizadas y con secado tradicional, por lo que el incremento observado en estas muestras sería equivalente a la cantidad de agua perdida durante el procesamiento.

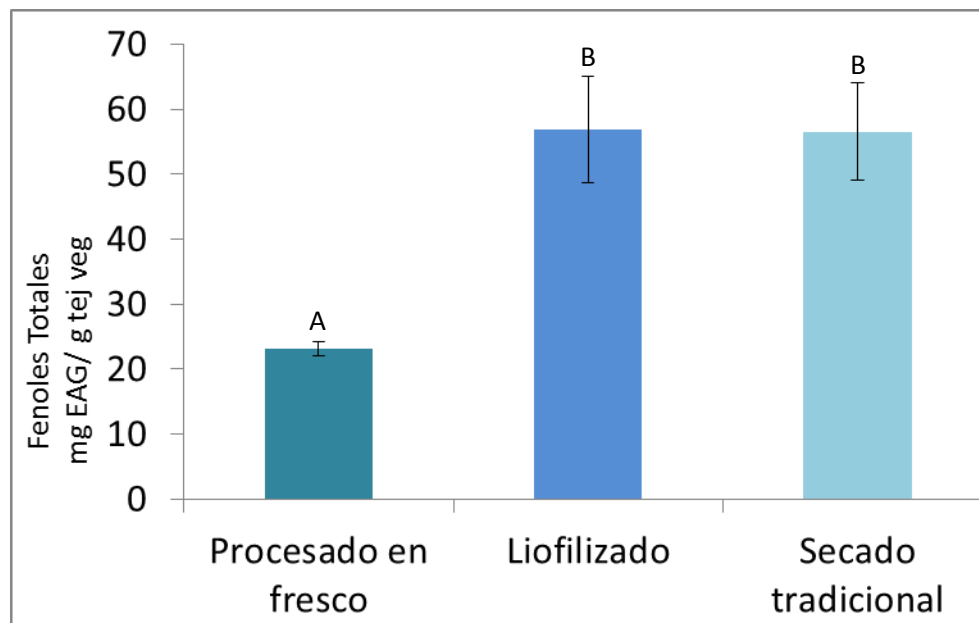


Figura 12. Contenido de fenólicos totales en extractos de hojas de *B. cordata* provenientes de la planta fuente de explantes. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

En los extractos de hoja provenientes de las plántulas micropropagadas se observó la misma tendencia que en la planta fuente de explantes. Observándose un incremento de 4.18 y 4.77 en los niveles de compuestos fenólicos en los extractos provenientes de las plántulas micropropagadas liofilizadas y con secado tradicional, respectivamente en comparación con las muestras procesadas en fresco de *B. cordata*. Este incremento puede ser explicado por la pérdida de agua en las muestras liofilizadas y con secado tradicional. Es importante señalar que el porcentaje de humedad en las muestras micropropagadas fue de 90% (de 1g de tejido fresco se obtuvo 0.1g de tejido seco o liofilizado), superior al observado en las muestras frescas obtenidas de las plantas silvestres. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las muestras liofilizadas y con secado tradicional (fig. 13).

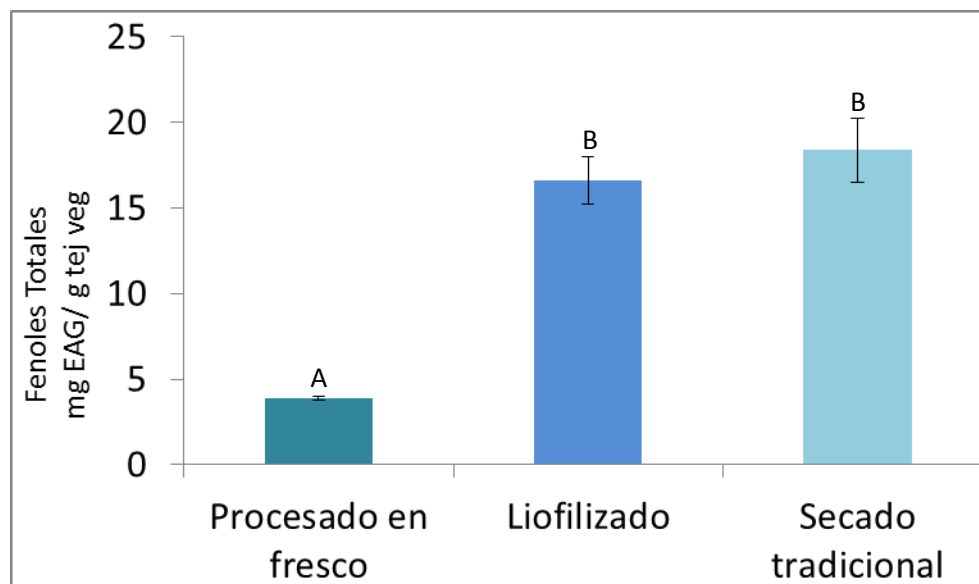


Figura 13. Contenido de fenólicos totales en extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas de *B. cordata*. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

6.7 Capacidad antioxidante

En la actualidad, se han desarrollado muchos métodos para cuantificar la capacidad antioxidante total, basados en diferentes mecanismos de reacción tal como 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC), Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) y Poder Antioxidante de Reducción del Ión Férrico (FRAP). El ensayo de DPPH es un método simple y confiable para determinar la capacidad antioxidante en extractos vegetales.

Al igual que el caso de los compuestos fenólicos totales, se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en la capacidad antioxidante en los extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes liofilizadas y con secado tradicional

(3.02 y 2.68 veces, respectivamente) en comparación con las muestras procesadas en fresco. Estos resultados coinciden con los reportados por diversos autores, ya que existe una correlación entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Tosun *et al.*, 2009; Carlsen *et al.*, 2010). Sin embargo, a diferencia de los resultados observados en los niveles de compuestos fenólicos, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la capacidad antioxidante entre las muestras liofilizadas y con secado tradicional provenientes de la planta fuente de explantes. Las muestras con secado tradicional disminuyeron de 1.13 veces con respecto a las muestras liofilizadas (fig 14). Estos resultados se podrían explicar tomando en cuenta que la capacidad antioxidante depende de diferentes moléculas, incluidas las enzimas y que el proceso de secado tradicional pudiera tener un efecto negativo en la capacidad antioxidante determinada. En este sentido, se ha reportado que durante el proceso de secado, existen cambios enzimáticos y no enzimáticos que pueden modificar el contenido de compuestos fenólicos y por lo tanto modificar su capacidad antioxidante (Nindo *et al.*, 2003; Arcan y Yemenicioglu 2009).

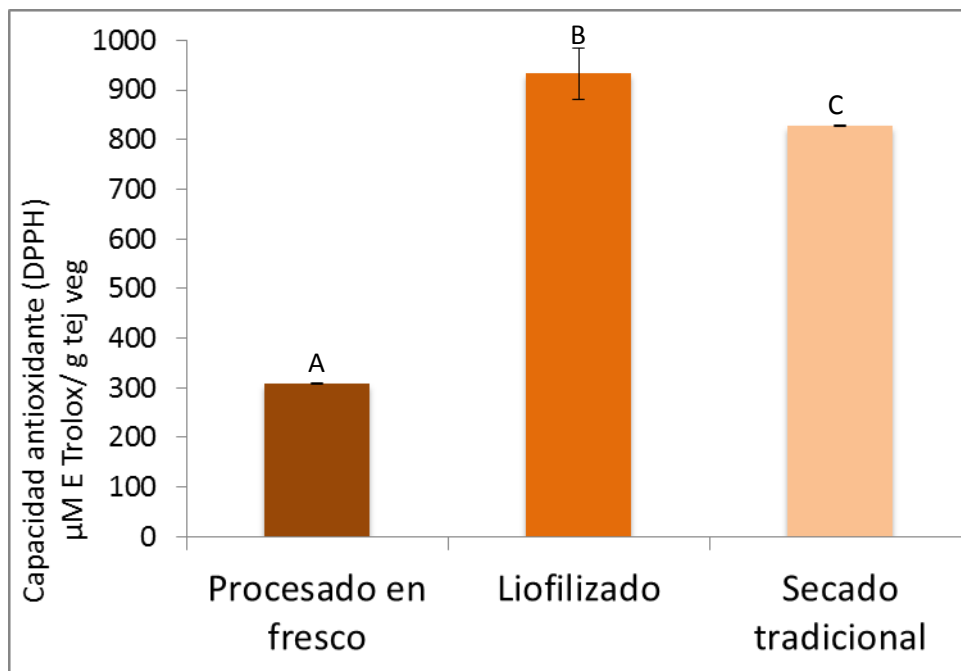


Figura 14. Capacidad antioxidante en extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes de *B. cordata*. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

En el caso de las plántulas micropropagadas, se observó la misma tendencia que la observada en los extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes. Observándose un incremento significativo ($p<0.05$) en las muestras liofilizadas y con secado tradicional con respecto a la muestra procesada en fresco (8.5 y 9.3 veces, respectivamente). No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las muestras liofilizadas y con secado tradicional provenientes de las plántulas micropropagadas (fig. 15).

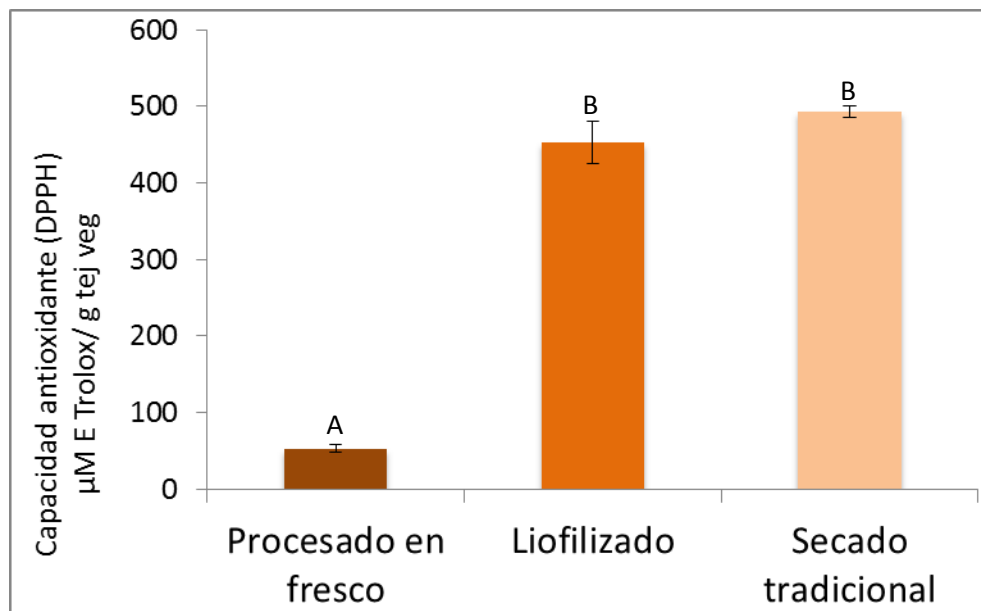


Figura 15. Capacidad antioxidante en extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas de *B. cordata*. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

6.8 Fenilpropanoides

El verbascósido y la linarina son dos de los principales metabolitos secundarios a los que se les atribuyen las propiedades medicinales de la planta *B. cordata* (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). El mayor contenido de verbascósido (0.41 mg g^{-1} de tejido) se observó en los extractos de hoja de *B. cordata* provenientes la planta fuente de explantes con secado tradicional en comparación con las muestras procesadas en fresco y liofilizadas (fig. 16). No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el contenido del verbascósido entre las muestras procesadas en fresco y liofilizadas.

Con respecto al contenido de linarina, se observaron diferencias significativas entre los tres tipos de procesamiento (muestras procesadas en fresco, liofilizadas y con secado tradicional). El mayor contenido de linarina (0.23 mg g^{-1} de tejido) se observó

en las muestras procesadas en fresco en comparación con las muestras liofilizadas y con secado tradicional (fig. 16). El contenido de linarina en las muestras procesadas en fresco fue 11.5 y 5.7 veces más, en comparación con las muestras liofilizadas y con secado tradicional respectivamente (fig. 16).

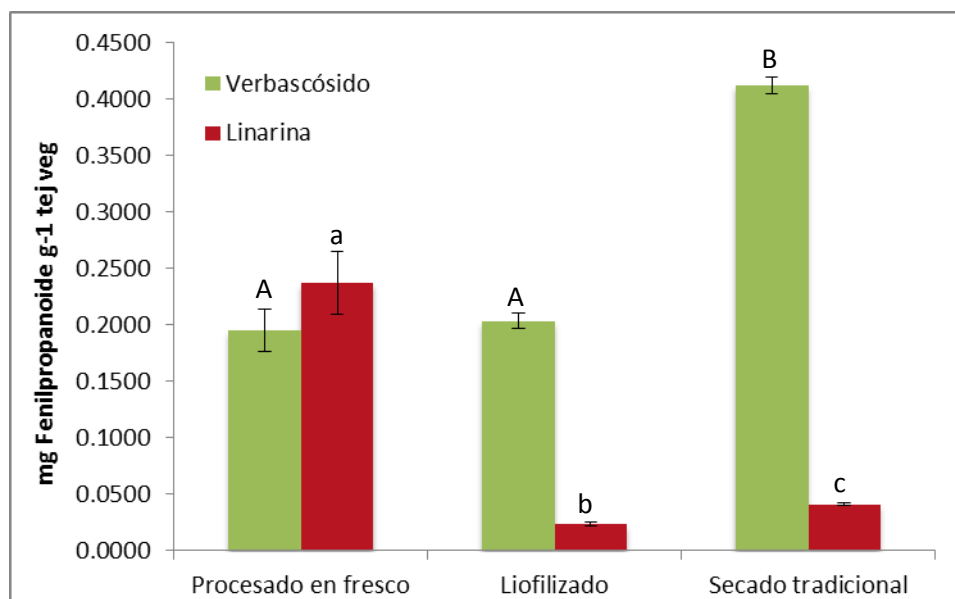


Figura 16. Concentraciones de verbascósido y linarina en extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes de *B. cordata*. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

El contenido del verbascósido en las muestras provenientes de las plántulas micropropagadas (fig. 17) mostraron que el mayor contenido del verbascósido se observó en las muestras procesadas (liofilizadas y con secado tradicional, 0.024 y 0.027 mg g⁻¹ tejido, respectivamente) en comparación con las muestras procesadas en fresco. No se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre las muestras liofilizadas y con secado tradicional. Con respecto al contenido de la linarina, no se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre las muestras procesadas en fresco, liofilizadas y con secado tradicional (fig. 17).

De la misma manera como se observó en los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, el mayor contenido con respecto a los fenilpropanoides (verbascósido y linarina) se encontró en los extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes (fig. 16).

A diferencia del comportamiento de todos los metabolitos estudiados en este trabajo, la linarina no presentó un aumento en las muestras liofilizadas y con secado tradicional tanto en los extractos de hojas provenientes de la planta fuente de explantes como en los extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas (fig. 16 y 17). Las plántulas micropropagadas produjeron los fitoquímicos verbascósido y linarina aunque en menor proporción que los niveles obtenidos en la planta fuente de explantes. Estos resultados pudieran ser atribuidos a la edad de las plántulas micropropagadas utilizadas (6 meses). En este sentido, Nicasio-Torres *et al.*, (2009) reportaron que los niveles de metabolitos secundarios (ácido clorogénico e iso-orientina) obtenidos en plantas micropropagadas de *Cecropia obtusifolia* y *C. peltata* fueron similares que los observados en la planta fuente de explantes solo después de 12 meses. Además algunos autores han sugerido el uso de diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, con el fin de incrementar metabolitos secundarios de interés comercial (Oksman-Caldentey e Inze 2004; Nezbedova *et al.* 1999; Skrzypek y Wysokinska 1999). Por lo que resultaría interesante evaluar el efecto de estos, en plántulas micropropagadas de *B. cordata*.

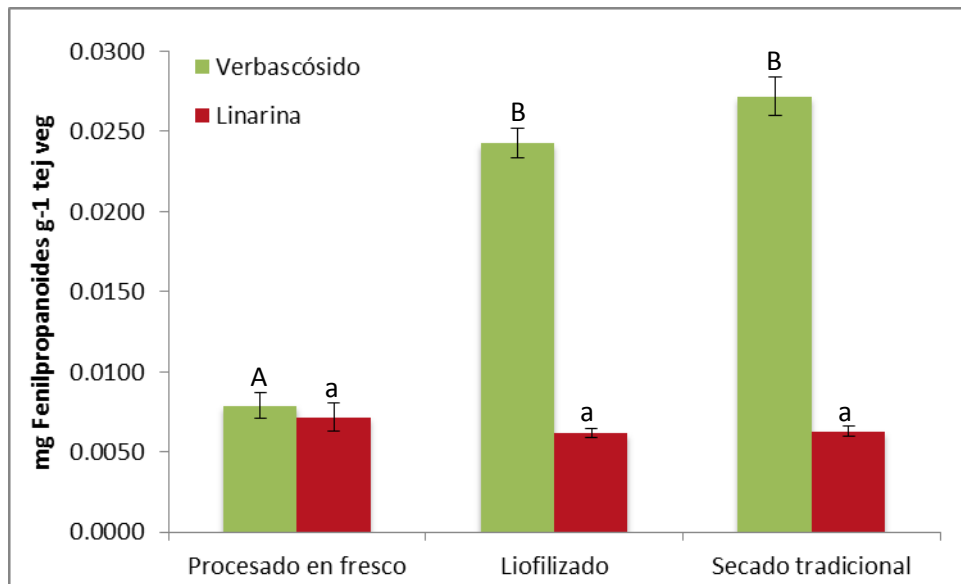


Figura 17. Concentraciones de verbascósido y linarina en extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas de *B. cordata*. Cada valor es la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p= 0.05$).

7 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se logró el establecimiento del cultivo aséptico de los explantes reduciendo la oxidación (20 %) y eliminando la contaminación (0.2%). La adición de RCV permitió establecer la micropropagación de *B. Cordata* encontrando que: a) la concentración 4.44 μM de BA promovió el mayor número de brotes (4.13), b) la aplicación de 4.44 μM de BA en los subcultivos 1 y 2 incrementó 7.5 y 12.8 veces más la inducción de estos brotes, c) AG_3 tuvo un efecto sobre el alargamiento de los brotes, incrementando su longitud a 1.62 veces, d) AIB tuvo efecto sobre la inducción de raíces (89%), en comparación con los brotes testigo (62%), e) finalmente se obtuvo un 91.7% de sobrevivencia de las plántulas micropropagadas aclimatadas. La manera de procesar las muestras tanto en la planta fuente de explantes como en las plántulas micropropagadas modificó la cantidad de fotoquímicos (compuestos fenólicos totales, contenido de verbascósido y linarina) presentes y los análisis, derivados de estos (capacidad antioxidante) siendo mayor cuando el material vegetal fue liofilizado o con secado tradicional. Con excepción del contenido de linarina tanto los extractos de hojas provenientes la planta fuente de explantes como en los extractos de hojas provenientes de las plántulas micropropagadas, donde no se observaron diferencias significativas entre los tres procesos evaluados. Las plántulas obtenidas por micropropagación mantuvieron la capacidad de sintetizar los fenilpropanoides, asociados a la capacidad medicinal de la planta.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abushita A., Hebshi E., Daood H., Biacs P. (1997). Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry* 2: 207- 212.

Aguilar- Rodríguez S., Terrazas T., López- Mata L. (2006). Anatomical wood variation of *Buddleja cordata* (Buddlejaceae) along its natural range in Mexico. *Trees* 20: 253- 261.

Andary C., Wylde R., Laffite G. (1982). Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis condensate*. *Phytochemistry* 10: 2401- 2402.

Andrade L., Echeverrigaray S., Fracaro F., Pauletti G., Rota L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56:79-83.

Aqil F., Ahmad I., Mehmood Z. (2006). Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology* 30: 177- 183.

Arcan I., Yemenicioglu A. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:184-188.

Arciniegas A., Avendaño A., Pérez-Castorena A.L., Romo de Vivar A. (1997). Flavonoids from *Buddleia parviflora*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25 (2): 185-186.

Arnao M., Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., Acosta M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalysed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry* 236:255-261.

Ávalos A., Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

Ávila J., Liverant J., Martínez A., Martínez G., Muñoz J., Arciniegas A., Romo de Vivar A. (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 75-78.

Barrett D., Lloyd B. (2012) Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food Agriculture* 92:7-22.

Bhattacharya S., Bhattacharya S. (1997). Rapid multiplication of *Jasminum officinale* L. by *in vitro* culture of nodal explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 51: 57-60.

Bhojwani S., Razdan M. (1983). Plant tissue culture: theory and practice. *Elsevier Science Publishers*, New York, U.S.A.

Bhooshan Pandey K., Rizvi S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278.

Braga V., Mendes G., Oliveira R., Soares C., Resende C., Pinto L., De Santana R., Viccini L., Raposo N., Peixoto P. (2012). Micropropagation, anticonceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbenia litoralis* Kunth (Verbenaceae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 84(1): 139-147.

Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28: 25-30.

Calvo M., Segura J. (1989). *In vitro* propagation of Lavender. *Hortscience* 24: 375-6.

Carlsen M., Halvorsen B., Holte K., Bøhn S., Dragland S., Sampson L., Willey C., Senoo H., Umezono Y., Sanada C., Barikmo I., Berhe N., Willett W., Phillips K., Jacobs Jr, D., Blomhoff R. (2010) The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutritional Journal* 9:1-11.

Chaturvedi H., Madhu J., Kidwai N. (2007). Cloning of medicinal plants through tissue culture- A review. *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 937-948.

Chiou W., Lin L., Chen C. (2004). Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56(6), 743-748.

Crozier A., Jensen E., Lean M., McDonald M. (1997). Quantitative analysis of flavonoids by reversed- phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 761: 315-321.

Csabai J., Nagy Z., Mandy A. (2011). *In vitro* shoot proliferation of *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. Induced by different cytokinins. *Acta Biologica Hungarica* 62(4):453-62.

Dai J., Mumper R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313- 7352.

Devivar A., Nieto D., Gavino R., Perez A. (1995). Isocapnell-9-en-8-one and 6 α -hydrocycapnell-9-en-one, sesquiterpenes from *Buddleia* species. *Phytochemistry* 42: 167- 170.

Dhakulkar S., Ganapathi T., Bhargava S., Bapat V. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* 169: 812- 818.

Dicosmo F, Misawa M. (1995) Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances* 13: 425- 435.

D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 43: 348- 361.

Elkahoui S., Hernández J., Abdelly C., Ghrir R., Limam F. (2005). Effects of salt on lipoperoxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharantus roseus* suspension cells. *Plant Science* 168: 607- 613.

Estrada- Zúñiga M. (2010). Producción de fenilpropanoides en cultivos celulares y rizogénicos de *Buddleja cordata* Kunth, planta empleada en la Medicina Tradicional Mexicana. Tesis de Doctorado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana. Distrito Federal, México.

Estrada- Zuñiga M., Cruz- Sosa F., Rodríguez- Monroy M., Verde- Calvo J., Vernon- Carter E. (2009). Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 97: 39–47.

Fernández-López J., Almela L., Obón J., Castellar R. (2010) Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods and Human Nutrition* 65:253-259.

Filho A., Morel A., Adolpho L., Ilha V., Giralt E., Tarragó T., Dalcol I. (2012). Inhibitory Effect of Verbascoside Isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytotherapy Research* 26 (10): 1472-5.

Fujita Y., Tabata M. (1987). Secondary metabolites from plant cells: pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds) *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan R. Liss, New York, pp 169–185.

Gallardo- Vázquez A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana vol. 3, Instituto Indigenista, México, D.F.

Galleano M., Calabro V., Prince P., Litterio M., Piotrkowski B., Vazquez-Prieto M., Miatello R., Oteiza P., Fraga C. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1259, 87-94.

Gamborg O., Phillips G. (1995). *Plant cell, tissue and organ culture, fundamental methods*. Springer-Verlag, Alemania.

Gatehouse J. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*. 156, 145-169.

George E., Debergh P. (2008). Micropropagation: uses and methods. *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht: Srpinger.

Gonçalves S., Romano A. (2012). In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* S0734-9750 (12) 00156-5.

Gülçin İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology* 86: 354-391.

Harborne J. (1990). *Ethnopharmacology*. Chapman and May Publisher. London (UK).

Harborne J., Williams C. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481- 504.

HE Z., Lau K., Xu H., Li P., But P. (2000). Antioxidant activity of phenyletanoid glycosides from *Brandisia hancei*. *Journal of Ethnopharmacology* 71 (3) 483-486.

Heo H., Kimb Y., Chung D., Kimd D. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry* 104: 87- 92.

Hoshino Y., Mii M. (1998). Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 17: 256- 261.

Houghton P. (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *Journal of ethnopharmacology* 11: 293- 308.

Houghton P., Mensah A. (1999). Biologically-active compounds from *Buddleia* species, capítulo 13, pp. 343-368, en: Recent Advances in Phytochemistry Vol 33: Phytochemicals Human Health Protection, Nutrition and Plant Defense, editado por John T. Romeo, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, NY, United States of America.

Houghton P., Mensah A., Iessa N., Hong L. (2003). Terpenoids in *Buddleia*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry* 64: 385-393.

Howe G., Jander G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of plant Biology* 59, 41-66

Inagaki N., Nishimura H., Okada M., Mitsuhashi H. (1991). Verbascoside production by plant cell cultures. *Plant Cell Reports* 9: 484-487.

Innes R. (2004). Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiology* 135: 695-701.

Kennedy D., Wightman E. (2011). Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition* 2: 32-50.

Khalafalla M., Daffalla H., Abdellatef E., Agabna E., El-Shemy H. (2011). Establishment of an in vitro micropropagation protocol for *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex Poir. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 12(4): 303-312.

Kim D., Chang H. (1990) Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by *in situ* extraction and calcium alginate immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 36(5): 460– 466.

Kim I., Yang M., Goo T., Jo C., Ahn D., Park J., Lee O., Kang S. (2011) Radical scavenging-linked antioxidant activities of commonly used herbs and spices in Korea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. doi:10.3109/09637486.2011.641942.

Kliebenstein D.; Osbourn A. (2012). Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:415–423.

Knorr D., Caster C., Dörnenburg H., Dorn R., Gräf S., Havkin-Frenkel D., Podstolski A., Werrmann U. (1993). Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue culture. *Food Technology* 47(12):57–63.

Koo A., Howe G. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70, 1571-1580.

Kruse M., Strandberg M., Strandberg, B. (2000). Ecological Effects of Allelopathic Plants. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark. 66 pp.

Lee C., Shuler M. (2000). The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnology and Bioengineering* 67: 61–71.

Lee J., Lee J., Kang H., Jeong C., Moon H., Whang W., Kim C., Sim S. (2006). The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Archives of Pharmacal Research* 26(6) 508-513.

Lee J., Woo E., Kang K. (2005). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of ATP-1 activation. *Journal of Ethnopharmacology* 97 (3) 561-566.

Liu Z., He X., Chen W., Yuan F., Yan K., Tao D. (2009). Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a potential hyperaccumulator-*Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Hazardous Materials* 169:170-175.

Lu C., Mei X. (2003). Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *Biotechnology Letters* 25: 1437-1439.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-47.

Mantell S., Pearson D., Hazell L., Smith H. (1983). The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Reports* 2:73–83.

Martínez M. (1989). Las plantas medicinales de México. 6ª edición, Botas, México, D.F.

Martínez M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México.

Martínez G. y Chacalo A. (1994). “Los árboles de la Ciudad de México”. Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco. 351 pp.

Martínez-Vázquez M., Ramírez T., Aguilar H., Bye R. (1996). Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 62: 137-140.

Martínez-Vázquez M., Ramírez T., Lastra A., Bye R. (1998). A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 64: 134-137.

Matsubara K., Shigekazu K., Yoshioka T., Fujita Y., Yamada Y. (1989). High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 46: 61– 69.

Mendoza P. (2003). El tepozán del herbario. *Ciencias* 70: 32-33.

Mistretta O., Rieseberg L., Elias T. (1991) Botanic gardens and the preservation of biological diversity. *Evolutionary Trends in Plants* 5, 19–22.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405- 410.

Mohamed R., Pineda M., Aguilar M. (2007). Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the Mediterranean region. *Journal of Food Science* 72: 59-63.

Moon J., Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1655- 1666.

Moreno P., Van der Heijden R., Verpoorte R. (1995). Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42(1):1–25.

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.

Mustafa R., Abdul Hamid A., Mohamed S., Bakar F. (2010). Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of food science* 75(1):C28-35.

Nezbedová L., Hesse M., Dusek J., Werner C. (1999). Chemical potential of *Aphelandra* sp. cell cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58:133-140.

Nicasio-Torres M., Erazo_Gómez J., Cruz-Sosa F. (2009). *In vitro* propagation of two antidiabetic species known as guarumbo: *Cecropia obtusifolia* and *Cecropia peltata*. *Acta Physiologiae Plantarum* 31:905-914.

Nindo C., Sun T., Wang S., Tang J., Powers J. (2003). Evaluation of drying technologies for retention of physical quality and antioxidants in asparagus. *LWT-Food Science and Technology* 36:507-516.

Noctor G., Foyer C. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249- 279.

Norman M. (2000) *Buddlejaceae*. Flora Neotropica Monograph 81. The New York Botanical Garden, Bronx, New York.

Oksman-Caldentey K., Inze D. (2004). Plant cell factories in the postgenomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9:433–440.

Ordaz P. (1996). “Evaluación *in vitro* de la actividad amebicida de compuestos obtenidos de *Buddleia cordata* sobre varias especies de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*”. Tesis licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. 59 pp.

Ortiz Z. (1996). “Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*”. Tesis licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. 75 pp.

Pérez- Jiménez J., Torres J. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 12713- 12724.

Petersen M., Simmonds M. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62(2):121–125.

Petit G., Numata A., Takemura T. (1990). Antineoplastic agents 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. *Journal of Natural Products* 53: 456-458.

Pierik R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa, España.

Pletsch M., Piacente S., Pizza C., Charlwood B. (1993). The accumulation of phenylpropanoid glycosides in tissue cultures of *Tecoma sambucifolium*. *Phytochemistry* 34: 161-165.

Prasain J., Carlson S., Wyss J. (2010). Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas* 66, 163-171.

Puertas- Mejía M., Gómez Chabala L., Rojano B., Sáez- Vega J. (2009). *In vitro* antioxidant capacity of fractions from *Piper peltatum* L. leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14: 2- 11.

Raffo A., La Malfa G., Fogliano F., Maiani G., Quaglia G. (2006). Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1), en: *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 11- 19.

Raghavan V. (2003). One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular and Development Biology- Plant*, 39 (5):437-442.

Ramakrishna A.; Ravishankar G, (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6:11, 1720-1731.

Rates S. (2001). Plants as sources of drugs. *Toxicon* 39: 603– 613.

Ratledge C, Sasson A. (1992). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. Cambridge University Press, Cambridge, p 402.

Recio M., Giner R., Máñez S., Rios J. (1994). Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica* 60: 232-234.

Rodríguez- Zaragoza S., Ordaz C., Avila G., Muñoz J., Arciniegas A., Romo de Vivar A. (1999). *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Buddleja cordata* (Loganiaceae, H.B.K) on several strains of *Acanthamoeba*. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 327- 334.

Romero S., Aguilar S., Rojas E. (2003). *Buddleja cordata* H.B.K. ssp. *cordata* (buddlejaceae): propagación y anatomía de la madera. *Polibotánica* Núm.16, pp.63-78.

Ruikar A., Khatiwora E., Ghayal N., Misar A., Mujumdar A., Puranik V., Deshpande N. (2011) Studies on aerial parts of *Artemisia pallens* wall for phenol, flavonoid and evaluation of antioxidant activity. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science* 3:302-305.

Rzedowski J., Calderon de Rzedowski G. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. 2^a. Ed. CONABIO, Instituto de Ecología A.C., Pátzcuaro, Michoacán, México.

Sagare A., Kuo C., Chueh F., Tsay H. (2001). *De Novo* regeneration of *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki (Scrophulariaceae) and quantitative analysis of harpagoside, an iridoid glucoside, formed in aerial and underground parts of *in vitro* propagated and wild plants by HPLC. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 24(11) 1311-1315.

Sánchez O. (1980). La flora del Valle de México. 6ª edición, La Prensa, México.

Santner A., Calderon L., Estelle M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5:5 301-307.

Santos-Buelga C., Gonzalez-Manzano S., Dueñas M., Gonzalez-Paramas A. (2012). Natural products isolation: extraction and isolation of phenolic compounds. *Methods in Molecular Biology*. 864: 427-464.

Scalbert A., Johnson I., Saltmarsh M. (2005). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 215S– 217S.

Scandalios J. (2003). The rise of ROS. *Trend in Biochemical Sciences* 27 (9): 483-486

Serafini M., Peluso I., Raguzzini A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*: 69, 273- 278.

Shewfelt R., Del Rosario B. (2000). The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *Horticultural Science*. 35: 575- 579.

Shoyama Y., Matsumoto M., Nishioka I. (1986). Four caffeoyl glycosides from callus tissue of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry* 25: 1633-1636.

Singleton V., Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144- 158.

Sinha S., Saxena R., Singh S. (2005). Chromium induced lipoperoxidation in plants of *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidants and antioxidants enzymes. *Chemosphere* 58: 595- 604.

Skrzypek Z., Wysokińska H. (1999). Accumulation of phenylethanoids in suspension cultures of *Penstemon serrulatus* Menz. *Biotechnology Letters* 21:691- 693.

Smetanska Y. (2008). Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 111: 187–228.

Strnad M., Hanuš J., Vaněk T., Kaminek M., Ballantine J., Fussel B., Hanke D. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. *robusta*). *Phytochemistry* 45, 213–218.

Sudha C., Seeni S. (1994). *In vitro* multiplication and field establishment of *Adhatoda beddomei* C.B Clarke, a rare medicinal plant. *Plant Cell Reports* 13: 203-207.

Tahara S. (2007). A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71:1387–1404.

Tai B., Jung B., Cuong N., Linh P., Tung N., Nhiem N., Huong T., Anh N., Kim J., Kim S., Kim Y. (2009). Total peroxynitrite scavenging capacity of phenyletanoid and flavonoid glycosides from the flowers of *Buddleja officinalis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32(12): 1952-6.

Taiz L., Zeiger E. (2006) *Plant Physiology*, 4^a edición. Sinauer Associates, Sunderland.

Tasheva K., Kosturkova G. (2012). The role of biotechnology for conservation and biologically active substances production of *Rhodiola rosea*: endangered medicinal species. *Scientific World Journal*; 2012: 274942.

Tarascou I., Souquet J., Carillo S., Coq S., Canon F., Fulcrand H., Cheynier V. (2010). The hidden face of food phenolic composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 501, 16-22.

Tavarini S., Degl'Innocenti E., Remorini D., Massai R., Guidi L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food chemistry* 107: 282-288.

Tee E., Lim C. (1990). Development of a HPLC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruits. *Food Chemistry and Engineering*.

Tepe B., Sokmen A. (2007) Production and optimization of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Natural Product Research* 21: 1133–1144.

Tezcan F., GÜltekin-Özgüven M., Diken T., Özcelik B., Erim FB. (2009) Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chem* 115:873-877.

Tosun M., Ercisli S., Sengul M., Ozer H., Polat T., Ozturk E. (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research* 42: 175-181.

Trigiano R., Gray D. (2000). Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 2^a edición, CRC Press. United States of America.

Turyanitsa I., Baloghova M., Paulovicsova B., Burdova M., Hudec J., Balint L. (2006). Antioxidant and antiradical activity of plant resources as indicators of food value. *Annales Universitatis Mariae E. Curie – Skłodowska*. Lublin-Polonia. Vol. XIX, N.1, 15. P: 91-94.

Vanzani P., Rosseto M., De Marco V., Sacchetti L., Paoletti M., Rigo A. (2011). Wild Mediterranean plants as traditional food: A valuable source of antioxidants. *Journal of Food Science* 76:46-51.

Van Staden J., Zazimalova E., George E. (2008). Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. *Plant Propagation by Tissue Culture* 3, 205-226.

Verpoorte R., Contin A., Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1: 1, 13-25.

Vertuani S., Beghelli E., Scalambra E., Malisardi G., Copetti S., Dal Toso R., Baldisserotto A., Manfredini S. (2011). Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules* 16(8): 7068-80.

Wang H., Xu Y., Yan J., Zhao X., Sun X., Zhang Y., Guo J., Zhu C. (2009). Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell injury. *Brain research* 1283 pp 139-147.

Wang Y., Irving R. (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signaling & Behavior* 6:4, 494-500.

Werbrouck S., Strnad M., Van Onckelen H., Debergh P. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physical Plant* 98, 291-297

Wittstock U., Gershenzon J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 300-307.

Wysockińska H., Rozga M. (1998). Establishment of transformed root cultures of *Paulownia tomentosa* for verbascoside production. *Journal of Plant Physiology* 152: 78-83.

- Wysokińska H., Lisowska K., Floryanowicz-Czekalska K.** (2001). Transformation of *Catalpa ovata* by *Agrobacterium rhizogenes* and phenylethanoid glycosides production in transformed root cultures. *Zeitschrift für Naturforschung C – A Journal of Biosciences* 56: 375-381.
- Yamamoto H., Yoshida K., Kondo Y., Inoue K.** (1998). Production of cornoside in *Abeliophyllum distichum* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 48: 273-277.
- Yoon M., Sim S., Whang W., Choi B.** (2009). Antioxidant activity and whitening effects of acteoside and isoacteoside. *Yakhak Hoeji*, 53, 1-5.
- Yoshida T., Nobuhara J., Okuda T.** (1978). Studies on the constituents of *Buddleia* species. I. Structures of Buddledin A and B, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleia davidii* Franch. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 26: 2535-254.
- Zenk M.** (1977) Plant tissue culture and its bio-technological application. Springer, Berlin, Heidelberg, p 27.
- Zhao J., Liu T., Ma L., Yan M., Zhao Y., Gu Z., Huang Y.** (2009). Protective effects of acteoside on immunological liver injury induced by Bacillus Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide. *Planta Medica* 75 (14): 1463-1469.
- Zhao-Hui L., Qiang W., Xiao R., Cun-De P., De-An J.** (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15, 8933-8952.
- Zhang H., Tao L.** (2010). Studies on the chemical constituents of *Buddleja albiflora* (II). *Journal of Chinese Medicinal Materials* 33(6): 922-4.
- Zhong J.** (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 72: 1-26.
- Zuzarte M., Dinis A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Canhoto J.** (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* 32, 580-587.