



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**Centro de Desarrollo de Productos Bióticos**

**EFFECTO DE LA REDUCCIÓN DE NITRÓGENO EN EL  
METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN BROTES DE  
*Castilleja tenuiflora* Benth. CULTIVADOS EN BIORREACTOR DE  
INMERSIÓN TEMPORAL**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

**P R E S E N T A**

**I.B.Q. Virginia Medina Pérez**

Directoras de tesis

Dra. Gabriela Trejo Tapia

M. en C. Alma Rosa López Laredo



Yautepec, Morelos, Diciembre 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 15:00 horas del día 3 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:

EFFECTO DE LA REDUCCIÓN DE NITRÓGENO EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN BROTES DE *Castilleja tenuiflora Benth.* CULTIVADOS EN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL

Presentada por el alumno:

Medina Pérez Virginia  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	3	8	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Directores de tesis

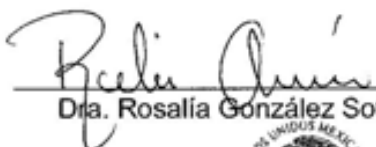
  
Dra. Gabriela Trejo Tapia

  
M. en C. Alma Rosa López Laredo

  
Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

  
Dra. Silvia Evangelista Lozano

  
Dra. Edith Agama Acevedo

  
Dra. Rosalía González Soto

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio



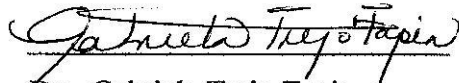
## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD


Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE NITRÓGENO EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN BROTES DE *Castilleja tenuiflora* Benth. CULTIVADOS EN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL” es responsabilidad de la Dra. Gabriela Trejo Tapia, M. en C. Alma Rosa López Laredo y Virginia Medina Pérez, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos, a 14 de Noviembre del 2011

ATENTAMENTE

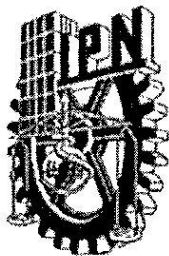
Directoras de Tesis

  
Dra. Gabriela Trejo Tapia

  
M. en C. Alma Rosa López Laredo

Alumno

  
Virginia Medina Pérez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Yautepec, Morelos siendo el día 14 del mes de Noviembre del año 2011, el que suscribe Virginia Medina Pérez alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, con número de registro B091383, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Gabriela Trejo Tapia y M. en C. Alma Rosa López Laredo y cede los derechos del trabajo intitulado “EFECTO DE LA REDUCCIÓN DE NITRÓGENO EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN BROTES DE *Castilleja tenuiflora* Benth. CULTIVADOS EN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle Ceprobi número 8; Colonia San Isidro, C.P. 62731 Yautepec, Morelos, México, Fax: 01-(52Intl.) (735) 394 20 20 ó 01-(55) 57 29 70 00 extensión 82512, e-mail: ceprobi@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Virginia Medina Pérez

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Gabriela Trejo-Tapia y la M. en C. Alma Rosa López Laredo, por la confianza, el asesoramiento y dirección del presente trabajo; además agradezco profundamente todo el apoyo y consejos que me dieron en los momentos difíciles que tuve, durante la realización del proyecto.
- A la comisión revisora de la presente tesis (Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez, Dra. Silvia Evangelista Lozano, Dra. Edith Agama Acevedo y Dra. Rosalía González Soto) por enriquecer el trabajo con sus aportaciones.
- Al Dr. Victor Rogelio Castrejón Gómez compañero y amigo, gracias por su apoyo, compañía, comprensión, paciencia y, particularmente por estar a mi lado en esos días tan difíciles.
- A la Dra. Gabriela Sepúlveda por sus consejos académicos y personales e inyectarme ánimos para salir adelante.
- A mis padres por su ayuda y apoyo en todo lo que hago.
- A mis compañeros Víctor Alcantar, Lupita, Yadira, Mario, Sandra, Fernando, Israel, Luz, Viridiana, Isai. A Blanca, Sandra, Toñita y Lupita Salcedo. Así como a Gloria, Toñita, Elvia, Vanesa. A Michel, Marce y Vero.
- A Yenni por su valiosa ayuda en mi estancia y por sus aportaciones para este trabajo.
- Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez por sus enseñanzas y apreciables aportes a la presente tesis.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por el apoyo económico brindado en la elaboración de esta tesis.

## DEDICATORIA

*A mis hijos Eridiana, Juan Miguel, Noé Francisco y al responsable principal, que me ha impulsado desde que inicie éste proyecto y que cada día me impresiona con su fortaleza, mi hermoso Lafet. Gracias a todos por su amor, paciencia, apoyo y por el tiempo que les robé.*

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Gabriela Trejo Tapia y de la M. en C. Alma Rosa López Laredo. El análisis por cromatografía se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la asesoría del Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

Para la realización de los estudios se contó con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (330720) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN (PIFI-IPN).

La investigación fue realizada con financiamiento de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN (Proyectos SIP2010308 y 20110153) y del Fondo de Investigación Básica del CONACyT (Proyecto 100202).

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Índice de cuadros	iv
Índice de figuras	v
Notación	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Castilleja tenuiflora</i> Benth.	3
2.1.1. Descripción y usos	3
2.1.2. Antecedentes fitoquímicos	4
2.1.3. Actividad biológica de <i>C. tenuiflora</i> y de sus compuestos químicos	6
2.2. Compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides y feniletanoides	10
2.2.1. Características químicas	10
2.2.2. Funciones en las plantas	11
2.2.3. Actividad biológica	12
2.2.4. Biosíntesis	13
2.2.5. Factores que influyen en la biosíntesis	15
2.3. Influencia de la reducción de nitrógeno en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en el metabolismo de compuestos fenólicos	16
2.3.1. Crecimiento y desarrollo	16



2.3.2. Metabolismo de compuestos fenólicos	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos específicos	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Material biológico	21
6.2. Cultivo en biorreactor de inmersión temporal	21
6.3. Diseño de experimentos	23
6.4. Evaluación del crecimiento, desarrollo y contenido de clorofila	23
6.5. Evaluación de la actividad enzimática	24
6.5.1. Obtención de extractos enzimáticos	24
6.5.2. Determinación de proteína	25
6.5.3. Actividad enzimática de fenilalanina amonioliasa	25
6.5.4. Actividad enzimática de peroxidasa	26
6.6. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides	26
6.6.1. Obtención del extracto metanólico	26
6.6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales	27
6.6.3. Cuantificación de flavonoides totales	27
6.6.4. Identificación y cuantificación de antocianinas	27
6.7. Identificación y cuantificación de feniletanoides	28

6.7.1. Obtención del extracto metanólico	28
6.7.2. Perfil cromatográfico por capa fina	28
6.7.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia	29
6.8. Análisis estadísticos	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Crecimiento, desarrollo y contenido de clorofila	31
7.2. Actividad de la enzima PAL	34
7.3. Análisis fitoquímico	35
7.3.1. Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales	35
7.3.2. Identificación y cuantificación de antocianinas	37
7.3.3. Análisis y cuantificación de feniletanoides	38
7.3.4. Actividad de la enzima POD	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	48
10. PERSPECTIVAS	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50

## ÍNDICE DE CUADROS

		<b>Páginas</b>
1	Antecedentes fitoquímicos de <i>C. tenuiflora</i>	5
2	Actividad biológica de extractos metanólicos de <i>C. tenuiflora</i>	7
3	Actividad biológica de los iridoides y feniletanoides identificados en <i>C. tenuiflora</i>	9
4	Efecto de la disminución de nitrógeno en eventos relacionados con el metabolismo de compuestos fenólicos en diferentes especies vegetales	18
5	Tratamientos	23
6	Variables de crecimiento y desarrollo de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal durante 21 días con dos concentraciones iniciales de N	31
7	Concentración de verbascósido e isoverbascósido en brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
1	<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth. 3
2	Estructura general de ácido fenólico, flavonoide, antocianina y feniletanoide. 10
3	Ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos como flavonoides y feniletanoides. 14
4	Sistema de biorreactores de inmersión temporal con brotes de <i>C. tenuiflora</i> . 22
5	Reacción de la enzima fenilalanina amonio liasa, utilizando como sustrato a la fenilalanina para sintetizar ácido cinámico. 25
6	Reacción de la enzima peroxidasa oxidando el guayacol a tetra guayacol. 26
7	Cambios en la concentración de clorofila total de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. 32
8	Brotes de <i>C. tenuiflora</i> desarrollados en cultivo en inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. 33
9	Actividad de la enzima PAL de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. 34
10	Compuestos fenólicos totales, de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos diferentes concentraciones iniciales de N.. 35
11	Contenido de flavonoides totales de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. 36
12	Espectro de absorción VIS de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados durante 11 días en biorreactor de inmersión. 37
13	Contenido de antocianinas de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados durante 11 días en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. 38

14	Cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados durante 21 días en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N.	39
15	Perfil Cromatográfico por HPLC de extractos metanólicos de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados durante 21 días en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N.	40
16	Actividad de la enzima POD de brotes de <i>C. tenuiflora</i> cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N.	42

## NOTACIÓN

BF	Biomasa fresca
BS	Biomasa seca
B5	Gamborg's B5, medio de cultivo basal
CCF	Cromatografía en capa fina
DOPA	3-4,-dihidroxifenilalanina
EAC	Equivalentes de ácido cinámico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EFR	Eficiencia de formación de raíz
IMB	Índice de multiplicación de brotes
N	Nitrógeno
PAL	Fenilalanina amonioliasa
POD	Peroxidasa

## RESÚMEN

*Castilleja tenuiflora* Benth. (“hierba del cáncer”) es recomendada por la medicina tradicional Mexicana para tratar síntomas asociados con el cáncer, que podrían deberse a que acumula compuestos fenólicos como flavonoides y feniletanoides. El nitrógeno (N) es un elemento fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas y, su deficiencia provoca el incremento en la concentración de compuestos fenólicos y de la actividad de enzimas claves de su biosíntesis como es la fenilalanina amonio liasa (PAL). En el presente trabajo se evaluó el efecto de la reducción de N sobre el metabolismo de compuestos fenólicos de *C. tenuiflora*. Los brotes de *C. tenuiflora* se cultivaron en biorreactores de inmersión temporal con medio de cultivo B5 con 25.74 mM de N total (control) y en medio en el que se redujo la concentración de N al 5% (1.32 mM N), sin afectar la relación nitrato:amonio. Los resultados mostraron que la reducción de N provocó una disminución significativa en la altura y biomasa de los brotes, en la concentración total de clorofila, así como en su capacidad de multiplicación y de formación de raíz. La máxima actividad de la enzima PAL fue 2.5 veces mayor en los brotes cultivados con la reducción de N (1.45  $\mu\text{mol}$  equivalentes de ácido cinámico (EAC)/h/mg proteína) que en el control (0.36  $\mu\text{mol}$  EAC/h/mg proteína). De manera similar, la concentración de compuestos fenólicos totales y de flavonoides fue 1.7 y 1.8 veces mayor a lo obtenido en el control, respectivamente. Además a partir del día 9, bajo reducción de N se acumularon antocianinas en los brotes. Se analizaron los extractos metanólicos de 11 y 21 días por HPLC; en todos los extractos se encontraron los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido como compuestos mayoritarios, que se acumularon mayormente en los brotes con reducción de N. La actividad de la enzima peroxidasa (POD) fue mayor en los brotes bajo reducción de N lo que sugiere una condición de estrés. En conclusión, la reducción de N afectó de manera negativa el crecimiento y desarrollo de los brotes de *C. tenuiflora*. En respuesta al estrés por deficiencia de N, los brotes de *C. tenuiflora* acumularon mayor concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides. En específico, aumentó la concentración de los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido y de las antocianinas. Estos cambios en la concentración de compuestos químicos estuvieron asociados con el incremento en la actividad de la enzima PAL.

## ABSTRACT

*Castilleja tenuiflora* Benth. (“hierba del cáncer”) is recommended by the Mexican traditional medicine to treat symptoms associated with cancer, which could be due to accumulation of phenolic compounds, such as flavonoids and phenylethanoids. Nitrogen (N) is an essential element for growth and development of plants and its deficiency causes an increase in the concentration of phenolic compounds and on the activity of key enzymes of its synthesis such as the phenylalanine ammonia lyase (PAL). The aim of this study was to evaluate the effect of the reduction of N on the metabolism of phenolic compounds in *C. tenuiflora*. Shoots of *C. tenuiflora* were cultivated in temporary immersion bioreactors with B5 medium and 25.74 mM of total N (control) or reducing the concentration of N at 5% (1.32 mM N), without affecting the nitrate:ammonium rate. The results showed that the reduction of N caused a significant decrease in height and biomass of shoots, total concentration of chlorophyll, as well as their ability to multiply and root formation. The maximum activity of the enzyme PAL was 2.5 times higher in the shoots grown with reduced N (1.45  $\mu\text{mol}$  cinnamic acid equivalents (CAE)/h/mg protein) than in the control (0.36  $\mu\text{mol}$  CAE/h/mg protein). Similarly, the concentration of total phenolics and flavonoids was 1.7 and 1.8 times higher than that obtained in the control, respectively. Also from day 9, under reduced N, shoots accumulated anthocyanins. Methanol extracts were analyzed by HPLC, and found that phenylethanoids verbascoside and isoverbascoside are the main compounds, which mostly accumulated in the shoots with reduced N. The activity of the enzyme peroxidase was higher in the shoots under N reduction suggesting a stress condition. In conclusion, the reduction of N significantly affected the shoot growth of *C. tenuiflora*. In response to N deficiency stress, the shoots of *C. tenuiflora* accumulate higher concentrations of total phenolics and flavonoids. Specifically, concentration of phenylethanoid verbascoside and isoverbascoside and, anthocyanins were increased. Changes in the concentrations of the chemical compounds were associated with increased activity of the enzyme PAL.



## 1. INTRODUCCIÓN

*Castilleja tenuiflora* Benth. es una planta silvestre hemiparásita de la familia Orobanchaceae que crece en bosques de pino-encino a altitudes mayores a los 1600 m. Esta especie es recomendada en la medicina tradicional Mexicana para tratar síntomas asociados con el cáncer, lo cual podría deberse a que acumula compuestos fenólicos, como flavonoides derivados de la quercetina y feniletanoides como verbascósido e isoverbascósido, así como iridoideas glicosilados. En particular, los feniletanoides constituyen un grupo de compuestos químicos de interés para la industria por presentar una amplia gama de actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatoria o citotóxica, pero cuya función en las plantas así como su biosíntesis o factores que la regulan han sido poco estudiados.

Como una alternativa para la generación de material vegetal fuente de los principios activos así como una herramienta para la investigación sobre su metabolismo secundario y actividades biológicas, se implementó un sistema de propagación *in vitro* de brotes de *C. tenuiflora* utilizando biorreactores de inmersión temporal. Los brotes micropropagados mediante este sistema acumulan flavonoides y los feniletanoides identificados en la planta silvestre (Valdez, 2011). Además, presentan actividad antirradical y poder reductor en niveles superiores a los de cultivados en otros sistemas *in vitro*.

El nitrógeno es un elemento fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas porque es componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y, otros metabolitos esenciales para la sobrevivencia de la misma. La deficiencia de este elemento puede representar una condición de estrés abiótico para la planta teniendo efecto en el metabolismo secundario, en particular el de los compuestos fenólicos. En respuesta a la deficiencia de nitrógeno, se ha reportado el incremento en la concentración de compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoles, antocianinas o cumarinas, o bien, la modificación del perfil de estos metabolitos secundarios sin afectar el contenido total. El incremento en la biosíntesis de los compuestos fenólicos está asociada comúnmente con un incremento rápido y transitorio en la actividad de enzimas claves como la fenilalanina amonio liasa.

El efecto de la reducción de nitrógeno en *C. tenuiflora* no ha sido estudiado y no existen antecedentes en especies de la familia Orobanchaceae. Así mismo, se desconoce el efecto que podría tener la disminución de N en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, en particular en compuestos de interés biológico como los feniletanoides. Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la reducción de N sobre el metabolismo de compuestos fenólicos en brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactores de inmersión temporal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Castilleja tenuiflora* Benth.

#### 2.1.1. Descripción y usos

*Castilleja tenuiflora* Benth. es una planta silvestre que fue reclasificada recientemente de la familia Scrophulariaceae a la familia Orobanchaceae con base en su naturaleza hemiparásita y sus características moleculares (Tank y Olmstead, 2008). Crece en bosques de pino-encino a altitudes de 1680-3250 m.s.n.m. Se encuentra distribuida a lo largo del país pero es más abundante en el área Central y Sur (Rosas, 2007). *C. tenuiflora* (Figura 1) es una planta herbácea que tiene flores que forman inflorescencias racemosas, pedicelos de 3 a 5 mm de largo, brácteas lanceoladas de 1.2 a 4 cm de largo, con ápice agudo teñido de rojo, cáliz de 2 a 3 cm de largo de color amarillo a tonalidades anaranjado, gálea verdosa, puberulenta de 1.5 a 2 cm de largo, anteras de 2 a 3 mm de largo, pistilos de 3 a 4 cm de largo, estigma bilobulado, cápsula ovoide de 9 a 14 mm de largo. Las hojas son sésiles, levemente auriculadas en la base y linear-lanceoladas que miden de 1 a 4.5 cm de largo, ápice agudo. El tallo es erecto y mide de 30 cm a 1 m de altura, es ramificado y está cubierto con pelos ásperos y rígidos. Cuenta con semillas elipsoides de 1.8 mm de largo color café (Rzedowski y Rzedowski, 2001).



**Figura 1.** *Castilleja tenuiflora* Benth.

En las regiones urbanas y rurales utilizan los diferentes órganos de la planta (raíz, tallo, hoja y flor) en forma de infusión para tratamientos de cáncer, disentería, alteraciones nerviosas, náuseas, vómitos y enfermedades gastrointestinales (Bejar *et al.*, 2000; Alonso-Castro *et al.*, 2011).

### **2.1.2. Antecedentes fitoquímicos**

En *C. tenuiflora* se han identificado compuestos químicos de diferentes grupos como iridoides glicosilados, feniletanoides y flavonoides. Los estudios fitoquímicos se han realizado en planta silvestre, en plantas micropropagadas y en cultivos *in vitro* de raíces y brotes (Cuadro 1).

En las partes aéreas de plantas silvestres se han identificado los siguientes iridoides glicosilados: aucubina, bartsiósido, metil éster del ácido geniposídico, metil éster del ácido mussaenosídico y metil éster de shanzhisida (Jiménez *et al.*, 1995). De estos iridoides, la aucubina también se encuentra en la raíz silvestre, en cultivos *in vitro* de raíces (Rosas, 2007), en cultivos de brotes (Trejo-Tapia *et al.*, 2011) y en plantas micropropagadas, ya sea desarrolladas en hidroponía o en sustrato sólido (López-Laredo *et al.*, 2009; Medina, 2008).

Gómez-Aguirre *et al.* (2012) identificaron por primera vez la presencia de feniletanoides en plantas silvestres de *C. tenuiflora*, siendo los mayoritarios el verbascósido y el isoverbascósido. Asimismo desarrollaron un método de HPLC para su cuantificación y determinaron que el verbascósido se encuentra principalmente en la raíz y en las inflorescencias (9.23 y 7.89 mg/g biomasa seca (BS), respectivamente), mientras que el isoverbascósido se acumula mayoritariamente en la raíz (7.13 mg/g BS). Valdez (2011) detectó mediante HPLC estos compuestos en cultivos de brotes en biorreactores de inmersión temporal pero no determinó su concentración (datos no publicados).

En plantas silvestres, en plantas micropropagadas mediante biorreactores y en cultivo *in vitro* de raíces y brotes se cuantificó la concentración de compuestos fenólicos totales y de flavonoides (Medina, 2008; López-Laredo *et al.*, 2009; Trejo-Tapia *et al.*, 2011; Valdez, 2011). De acuerdo con el análisis químico, los brotes de *C. tenuiflora* acumulan flavonoles,

siendo uno de los principales un derivado de quercetina (Trejo-Tapia *et al.*, 2011). Por otro lado, se observó que la concentración de los compuestos fue diferente dependiendo de la parte de la planta y de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, en plantas silvestres el mayor contenido de compuestos fenólicos se presentó en tallos (17.84 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g BS) en comparación a las hojas (9.13 mg EAG/g BS) (López-Laredo *et al.*, 2009).

**Cuadro 1.** Antecedentes fitoquímicos de *C. tenuiflora*.

Fuente	Parte de la planta	Estudio	Referencia
Planta silvestre	Parte aérea	Identificación de los iridoides glicosilados aucubina, bartsiósido, metil éster del ácido geniposídico, metil éster del ácido mussaenosídico y metil éster de shanzhisida	Jiménez <i>et al.</i> , 1995
	Raíz	Identificación de aucubina y bartsiósido	Rosas, 2007
	Raíz	Identificación de los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido	Gómez-Aguirre <i>et al.</i> , 2012
	Raíz, tallo, hoja y flor	Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides	López-Laredo <i>et al.</i> , 2009
	Raíz, tallo, hoja y flor	Cuantificación de aucubina y apigenina	Gómez, 2011
Plántula <i>in vitro</i>	Raíz, tallo y hoja	Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides	López-Laredo <i>et al.</i> , 2009
Cultivos <i>in vitro</i> de raíces		Identificación de aucubina	Rosas, 2007
		Cuantificación de feniletanoides verbascósido e isoverbascósido	Gómez-Aguirre <i>et al.</i> , 2012
Cultivos <i>in vitro</i> de brotes en inmersión permanente		Cuantificación de iridoides totales, compuestos fenólicos totales y flavonoides	Trejo-Tapia <i>et al.</i> , 2011
Cultivo <i>in vitro</i> de brotes en biorreactores de inmersión temporal		Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides	Valdez, 2011

En cuanto a las condiciones de crecimiento, se ha observado que las plantas micropropagadas y crecidas en invernadero acumulan en el tallo el doble de compuestos fenólicos (37.95 mg EAG/g BS) en comparación con plantas silvestres. De manera contraria, los tallos de plantas silvestres presentaron mayor contenido de flavonoides totales (62.77  $\mu$ g equivalentes de catequina (EC)/g BS) en comparación a los de plantas crecidas en invernadero (40.19  $\mu$ g EC/g BS). Mientras que en cultivo *in vitro* de brotes se reportan 10.58 mg EAG/g BS y 12.07  $\mu$ g EC/g BS (Trejo-Tapia *et al.*, 2011).

### **2.1.3. Actividad biológica de *C. tenuiflora* y de sus compuestos químicos**

Sobre la actividad biológica de esta especie se han realizado pocas investigaciones y han incluido dos tipos: actividad citotóxica y actividad antioxidante (Cuadro 2). En el primer caso, los extractos metanólicos obtenidos de plantas colectadas en Ocuilán (Estado de México) presentaron actividad citotóxica en las líneas de cáncer cérvico-uterino (Ca Ski) y de mama (MCF7) (Moreno-Escobar *et al.*, 2009). En este estudio no se asoció la actividad biológica con algún compuesto químico. Sin embargo, podría atribuirse a los iridoides como la aucubina o el ácido geniposídico (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Actividad biológica de extractos metanólicos de *C. tenuiflora*.

Fuente	Actividad biológica	Referencia
Planta silvestre (planta completa)	Actividad citotóxica en líneas de cáncer cérvico uterino (Ca Ski) y de mama (MCF7)	Moreno-Escobar <i>et al.</i> , 2009
Planta silvestre (Raíz, tallo, hoja y flor)	Actividad anti-radical (ABTS y DPPH) Poder reductor (Fosfomolibdeno)	López-Laredo <i>et al.</i> , 2009
Plántula <i>in vitro</i>	Actividad anti-radical (ABTS y DPPH) Poder reductor (Fosfomolibdeno)	López-Laredo <i>et al.</i> , 2009
Planta crecida en invernadero (Raíz, tallo, hoja y flor)	Actividad anti-radical (ABTS y DPPH) Poder reductor (Fosfomolibdeno)	Medina, 2008; López-Laredo <i>et al.</i> , 2009
Cultivos de brotes en biorreactor de inmersión temporal	Actividad anti-radical (ABTS y DPPH) Poder reductor (Fosfomolibdeno)	Valdez, 2011

La actividad antioxidante de *C. tenuiflora* se ha medido utilizando tres modelos *in vitro*: ácido 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>), 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el de fosfomolibdeno. De estos métodos, los de ABTS<sup>•+</sup> y DPPH determinan la capacidad de capturar radicales libres, mientras que el método de fosfomolibdeno mide el poder reductor.

Al igual que para la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, la actividad antioxidante fue diferente según el origen del material vegetal y la parte de la planta analizada; también se encontraron diferencias según el método utilizado. En tallo de plantas silvestres la actividad antioxidante según la prueba de ABTS fue 42.39  $\mu\text{mol trolox/g BS}$  mientras que en este tejido pero de plantas crecidas en invernadero fue de 46.70  $\mu\text{mol trolox/g BS}$ . Por otro lado, en las hojas de plantas crecidas en invernadero la actividad antioxidante medida por ABTS fue 10 veces mayor a la de hojas de plantas silvestres (López-Laredo *et al.*, 2009). En las plantas de invernadero se encontró la mayor actividad antioxidante en la hoja (102.01  $\mu\text{mol trolox/g BS}$ ) seguida del tallo, la raíz y por último la flor. A partir de los datos obtenidos se determinó que existe una correlación estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides (López-Laredo *et al.*, 2009). Así mismo, se midió la actividad antioxidante en brotes cultivados en biorreactores de inmersión temporal por DPPH, ABTS y fosfomolibdeno obteniéndose 289.99, 343.98 y 989.04  $\mu\text{moles trolox/g}$  de extracto, respectivamente (Valdez, 2011).

Entre los compuestos químicos identificados en *C. tenuiflora* se encuentran los iridoides glicosilados aucubina y ácido geniposídico y, los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido a los cuales se les han comprobado actividades biológicas importantes (Cuadro 3). Bartholomaeus y Ahokas (1995) realizaron un estudio en hígado de ratas y observaron que la aucubina inhibe el sistema enzimático a nivel del citocromo P<sub>450</sub> impidiendo el desarrollo de células cancerígenas. Kang *et al.* (1997) comprobaron que el genipósido tiene la habilidad de inhibir el citocromo P<sub>450</sub> y la enzima monooxigenasa que inducen a la muerte celular, y por otra parte, favorece la acción de la enzima glutatión-S-transferasa la cual detoxifica los carcinógenos; este efecto tuvo como consecuencia la inhibición de la tumorigénesis en el hígado de los ratones.

El verbascósido por su parte, muestra un amplio espectro de actividades biológicas (Gyurkovska *et al.*, 2011); acción antioxidante ya que inhibe la peroxidación lipídica (Esposito *et al.*, 2009), además tiene efecto antimetástico ya que suprime la metástasis (propagación de células cancerosas a órganos distintos de aquel en que se inició) de pulmón en células de melanoma B16 (Ohno *et al.*, 2002). Díaz *et al.*, (2004) comprobaron la acción anti-inflamatoria del verbascósido en los macrófagos peritoneales de ratas; estos autores observaron que el compuesto inhibía los lipopolisacáridos (LPS) inducidos por la prostaglandina E<sub>2</sub>, el óxido nítrico (NO) y el factor pro-inflamatorio TNF- $\alpha$  (Hee Lee *et al.*, 2006). El isoverbascósido por su parte muestra actividad neuroprotectora ya que produce toxicidad en cultivos de células corticales de ratas (Ah Koo *et al.*, 2005).



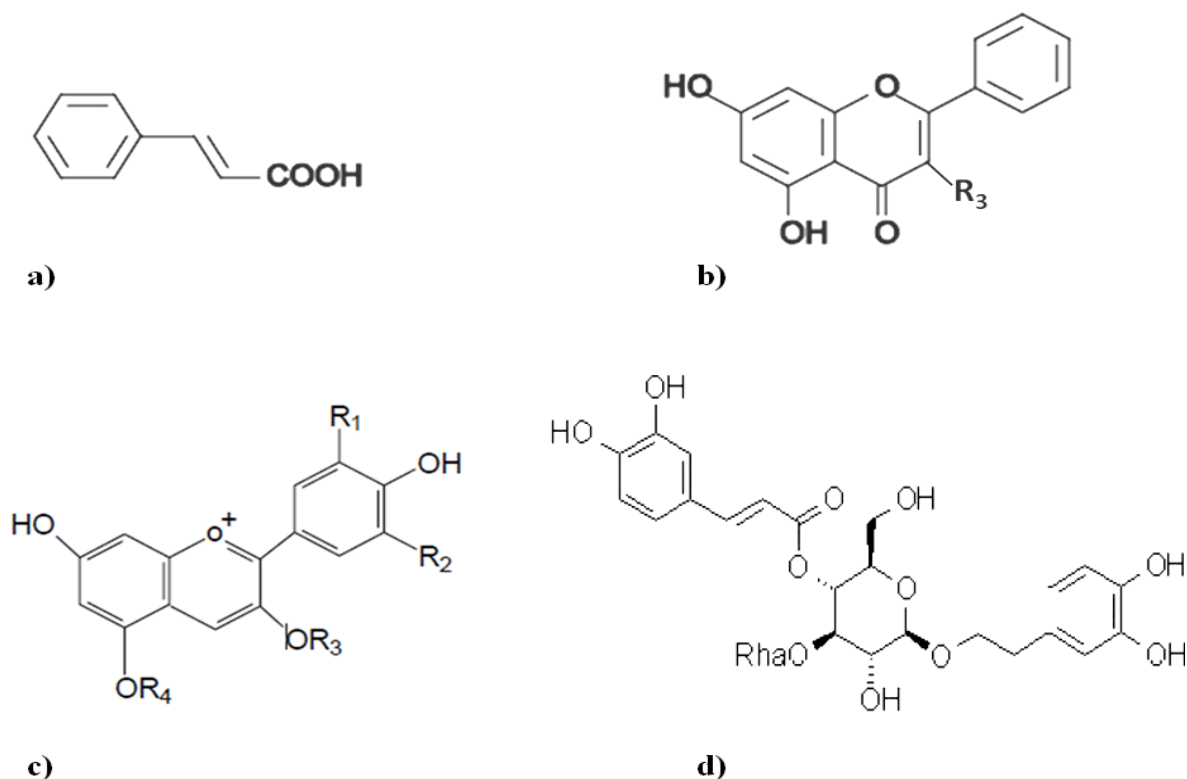
**Cuadro 3.** Actividad biológica de los iridoïdes y feniletanoides identificados en *C. tenuiflora*.

Compuesto químico	Actividad biológica	Referencia
<b>Aucubina</b>	Anticancerígena	Bartholomaeus y Ahokas, 1995
	-Inhibe la enzima citocromoP <sub>450</sub>	
<b>Ácido geniposídico</b>	Antitumoral	Jeong <i>et al.</i> , 2002
	Antitumoral	Wang <i>et al.</i> , 1991
	-Inhibe el citocromo P <sub>450</sub> y la enzima monooxigenasa	
	Anticancerígena	Kang <i>et al.</i> , 1997
<b>Verbascósido</b>	Actividad antioxidante y antimutagénica	Nakamura <i>et al.</i> , 1997
	Antioxidante, Antihipertensiva, antimicrobiano.	Saimaru y Orihara, 2010
	Antitrombótica, cardioprotectora, quimiopreención de tumores.	Esposito <i>et al.</i> , 2010
	Citotóxico, analgésico e hipotensor.	Díaz-Sánchez <i>et al.</i> , 2000
	Antiinflamatorio	Díaz <i>et al.</i> , 2004
	- Inhibe lipopolisacáridos	
	Antimetástico	Ohno <i>et al.</i> , 2002
- Elimina la metástasis de pulmón en células de melanoma B16		
<b>Isoverbascósido</b>	Neuroprotectora, antioxidante	Ah Koo <i>et al.</i> , 2005
	-Inhibe las células corticales	

## 2.2. Compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides y feniletanoides

### 2.2.1. Características químicas

Los compuestos fenólicos son compuestos químicos que tienen en su estructura uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático (Figura 2). Existen varias formas de clasificarlos; con base en el número de subunidades de fenol, se clasifican como polifenoles (al menos dos subunidades de fenol) y fenoles simples. Según el número de átomos de carbono y las sustituciones se clasifican en: fenólicos simples ( $C_6$ ), ácidos fenólicos y sus derivados ( $C_6-C_1$ ), ácidos cinámicos y sus derivados ( $C_6-C_3$ ) o flavonoides ( $C_{15}$ ), entre otros (Harborne y Simmonds, 1964). Los flavonoides a su vez se dividen en varias clases: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavonoles, antocianidinas, auronas, isoflavonoides o pterocarpanos, dependiendo de las sustituciones en el anillo aromático central (Martínez, 2005).



**Figura 2.** Estructura general de un ácido fenólico (ácido cinámico) (a), un flavonoide (b), antocianina (c) y feniletanoide (d) (Martínez, 2005).

Los feniletanoides son compuestos fenólicos que se caracterizan por tener en su estructura un residuo de ácido cafeico y un residuo de 4,5-hidroxifeniletanol enlazados a un  $\beta$ -D-glucopiranosido (Figura 2d) (Esposito *et al.*, 2009). Este tipo de compuestos químicos son característicos de plantas del Orden Lamiales por lo que son considerados marcadores taxonómicos (Gyurkovska *et al.*, 2011).

### **2.2.2. Funciones en las plantas**

En la naturaleza se encuentran distribuidos aproximadamente 8000 compuestos fenólicos. Son metabolitos secundarios que se sintetizan en una gran variedad de plantas vasculares y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en los diferentes órganos de las plantas, especialmente en las partes aéreas y raíces (Martínez, 2005). Representan un gran grupo de moléculas con gran variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Estos compuestos incluyen moléculas de señalización, pigmentos y sabores que pueden atraer o repeler; además pueden proteger a la planta de insectos, hongos, bacterias y virus (Vermerris y Nicholson, 2006). Los ácidos fenólicos son inhibidores potentes del estrés oxidativo, varias moléculas incluyendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) son implicadas en la señalización entre la percepción del estrés y la expresión de la PAL (Dixon y Paiva, 1995). Entre los flavonoides se encuentran las antocianinas que son un grupo de compuestos solubles en agua que le confieren diferentes coloraciones como rojo, rosa, azul, morado, amarillo a las flores, frutas y verduras; estos compuestos le sirven a la planta para protegerla de varios tipos de estrés tanto biótico como abiótico y también para atraer insectos participando así en la polinización y la dispersión de semillas (Yuan *et al.*, 2009). Además las antocianinas actúan como un "protector solar" de las hojas, protegen el aparato fotosintético del fotoenvejecimiento y facilitan la recuperación de nutrientes, especialmente del N, a partir de hojas senescentes (Peng *et al.*, 2008).

El interés en los feniletanoides ha estado centrado en su aplicación farmacológica, por lo que la mayoría de los estudios se han dirigido a la identificación de fuentes para obtenerlos, la elucidación de nuevas estructuras y la evaluación de su actividad biológica. Sin embargo, la

función de estos compuestos en las plantas ha sido escasamente estudiada y no es del todo clara. Con base en algunas de sus actividades biológicas, principalmente la antioxidante, los feniletanoides pudieran estar relacionados con la defensa de las plantas ante el ataque de patógenos o de herbívoros. Por ejemplo, en raíces de *Rehmannia glutinosa* (Scrophulariaceae) se acumuló el verbascósido en respuesta al ataque microbiano (Shoyama *et al.*, 1986). Una fracción obtenida del extracto metanólico de *Buddleja cordata* (Buddleiaceae) rica en verbascósido tuvo efecto parasiticida contra *Costia necatrix* (Díaz-Sánchez *et al.*, 2000). Así mismo, los feniletanoides como el verbascósido e isoverbascósido son excelentes antioxidantes ya que inhiben la formación de radicales libres (Smejkal *et al.*, 2007) y de ésta manera forman parte de la defensa química de las plantas contra los patógenos y otros tipos de estrés (Díaz-Sánchez *et al.*, 2000).

También existen trabajos que sugieren que los feniletanoides forman parte de la respuesta de las plantas a estrés nutrimental. En hojas de *Matricaria chamomilla* (Asteraceae) la deficiencia de N en el medio de cultivo provocó el incremento en la concentración de compuestos fenólicos derivados del ácido cinámico entre los que se encontraba el ácido cafeico, el cual es uno de los precursores de la biosíntesis de feniletanoides (Kovacik *et al.*, 2007).

### **2.2.3. Actividad biológica**

Los fenoles tienen una gran importancia dentro de la salud humana ya que poseen una importante actividad antioxidante y esta actividad está muy relacionada con la cura y tratamiento de enfermedades degenerativas, cardiovasculares, diabetes o cáncer que tienen a los radicales libres como común denominador (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

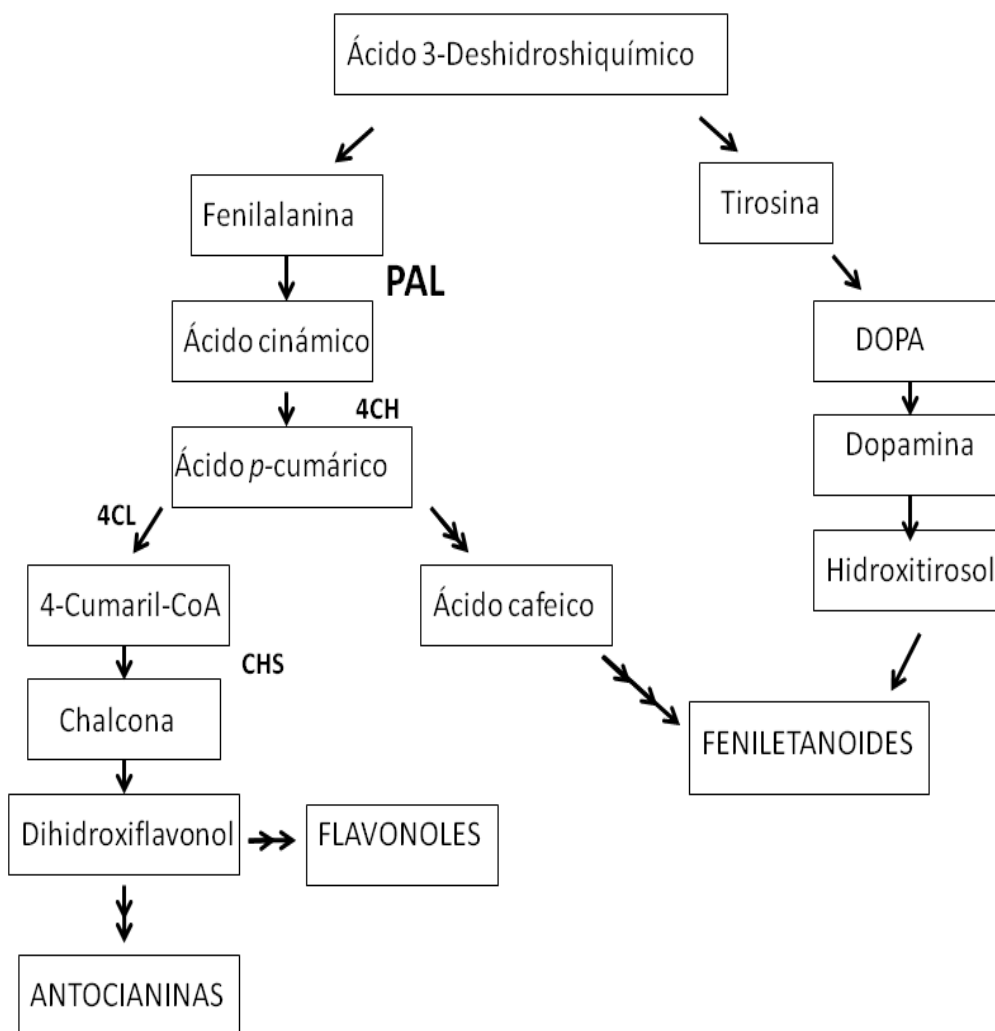
Particularmente, los feniletanoides como el verbascósido (acteósido) tienen una acción agonista de la acción antitemblor de la DOPA (3-4,-dihidroxifenilalanina), es analgésico, hipotensor, citotóxico y antimicrobiano (Díaz-Sánchez *et al.*, 2000); tienen poder antioxidante, son efectivos en la quimiopreención de tumores; presentan actividad antiinflamatoria y cardioprotectora (Esposito *et al.*, 2009) y, suprimen la metástasis (Ohno *et al.*, 2002).

Los flavonoides como luteolina y apigenina identificados en *Veronica chamaedrys* L. (Scrophulariaceae) son responsables de las propiedades farmacológicas antiinflamatorias; actúan como espasmolíticos, sedantes, anti-bacterianos y tienen propiedades antifúngicas (Queiroz *et al.*, 2009). Así mismo, las antocianinas poseen efecto anticarcinogénico, antioxidante y antiviral (Mendes *et al.*, 2010).

#### 2.2.4. Biosíntesis

La figura 3 presenta la propuesta de ruta de biosíntesis de los compuestos fenólicos de interés de este trabajo. La ruta inicia con el ácido 3-deshidroshiquímico de donde se derivan los tres aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano. La fenilalanina es sustrato de la enzima clave para la biosíntesis de los compuestos fenólicos, la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5) que cataliza la reacción de desaminación no oxidativa de *L*-fenilalanina para sintetizar el ácido trans-cinámico y amoníaco. La actividad de ésta enzima clave, está estrechamente relacionada con el estado fisiológico o de desarrollo de una planta (Lister *et al.*, 1996). El ácido cinámico es convertido a ácido *p*-cumárico a través de la enzima cinamato 4 hidroxilasa (4CH, EC 1.14.13.11), en el siguiente paso el *p*-cumárico es transformado en 4 cumaril-CoA por la 4-cumarato CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12). El paso central para la biosíntesis de flavonoides, es la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con una molécula de *p*-cumaril-CoA, catalizado por la enzima chalcona sintasa (CHS) para la formación del primer flavonoide que es la chalcona (Lister *et al.*, 1996). Posteriormente, la enzima chalcona isomerasa (CHI, EC 5.5.1.6) cataliza la ciclización intramolecular de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (chalcona) y de la 6'-deoxichalcona (4,2',4'-trihidroxichalcona), ambas producto de la acción de la enzima chalcona sintasa, a (2*S*)-naringenina (5,7,4'-trihidroxiflavanona) y (2*S*)-5-deoxiflavanona (7,4'-dihidroxiflavanona), respectivamente (Jez y Noel 2002). La reacción que cataliza la CHI es única en las plantas y puede ocurrir espontáneamente a pH celular por lo existe controversia sobre su papel como enzima limitante en la biosíntesis de flavonoides. Finalmente de la chalcona se dan acilaciones y glicosilaciones en el carbono 3 para estabilizar el catión flavilio y dar como productos a las antocianinas (Peng *et al.*, 2008).

Los estudios sobre la biosíntesis de los feniletanoides son escasos. Se propone que la fracción de hidroxitirosol es biosintetizado de la tirosina través de DOPA y la dopamina. La amina de la dopamina se oxida a aldehído, posteriormente se reduce a alcohol, y luego es  $\beta$ -glicosilada. Para obtener los feniletanoides, el hidroxitirosol se une a 3 moléculas de azúcares y a una molécula del ácido cafeico este último es biosintetizado a partir de fenilalanina (Saimaru y Orihara, 2010).



**Figura 3.** Ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos como flavonoides y feniletanoides. PAL: Fenilalanina amonio-liasa; CHS: Chalcona Sintasa; 4CH: cinamato 4 hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; DOPA: 3-4,-dihidroxifenilalanina.

### 2.2.5. Factores que influyen en la biosíntesis

Existen muchos factores que influyen en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, estos pueden ser tanto bióticos como abióticos. El estrés biótico es aquel que es producido por la acción de otro ser vivo como patógenos, animales u otras plantas; el abiótico es provocado por factores ambientales, físicos, químicos y nutricionales. El estrés ejerce una influencia considerable sobre los niveles de metabolitos secundarios en las plantas; los metabolitos sintetizados normalmente están involucrados en las respuestas de defensa de la misma. Las plantas sometidas a situaciones desfavorables, desencadenan una serie de mecanismos que pueden ser incluidos como reacciones ante el estrés. Muchos agentes ambientales y genéticos pueden afectar los niveles de los principios activos del material vegetal (Dixon y Paiva, 1995).

La biosíntesis de fenoles es regulada por una enzima clave que es la fenilalanina amonio liasa (PAL); la actividad de la enzima PAL suele aumentar cuando las plantas están expuestas a situaciones de estrés, como puede ser la falta de agua ("estrés hídrico"), infecciones fúngicas o bacterianas, radiaciones UV, frío y disminución nutrimental como nitrógeno (N), fósforo (P), magnesio (Mg) y potasio (K) (Reuber *et al.*, 1996).

Cuando existen condiciones severas de estrés, la generación de ROS aumenta y se inicia la señalización de las respuestas para activar el sistema antioxidante que está integrado por: 1) moléculas antioxidantes como ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol, flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros; y 2) las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (EC. 1.11.1.6), glutatión peroxidasa y peroxidasa (POD) (EC. 1.11.1.7), entre otras (Tewari *et al.*, 2007).

En las plantas se desencadenan reacciones de oxido-reducción y se producen una gran variedad de moléculas entre las cuales se encuentra el  $H_2O_2$ , sin embargo cuando existe estrés, esta molécula se produce de manera excesiva, causando daño a las biomoléculas incluyendo a la membrana lipídica. La enzima peroxidasa (POD) actúa sobre las moléculas de  $H_2O_2$  utilizándolo como sustrato y de esta manera detoxifica a la planta (Kovacik *et al.*, 2007).

## **2.3. Influencia de la reducción de nitrógeno en el crecimiento y desarrollo de las plantas y, en el metabolismo de compuestos fenólicos**

### **2.3.1. Crecimiento y desarrollo**

Los nutrientes son fundamentales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y su deficiencia ocasiona efectos adversos en los procesos celulares y fisiológicos, incluyendo al metabolismo secundario. En las plantas se presentan alrededor de 60 elementos en los diferentes tejidos, de los cuales solo 17 son esenciales para el crecimiento y metabolismo. Según la concentración en que son requeridos han sido clasificados en dos grupos: macro y micronutrientes. Ahora bien, según su naturaleza química se han dividido en cuatro grupos. El primer grupo incluye al C, H, O, N y S los cuales en su forma reducida se unen de forma covalente a la materia orgánica. Otro grupo incluye a K, Na, Ca, Mg, Mn y Cl los cuales están asociados al balance osmótico e iónico (Reddy, 2006).

El nitrógeno es el macronutriente más importante para el crecimiento de la planta y es componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y otros metabolitos esenciales para su sobrevivencia. Está disponible para las plantas en cuatro formas diferentes:  $N_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  y  $NH_4^+$ . Muchos estudios han mostrado que el nitrógeno es uno de los factores más importantes que limitan el crecimiento vegetal. La deficiencia de éste elemento influye de manera importante en la morfología y en la fisiología. En condiciones de deficiencia de N, las plantas detienen su crecimiento y desarrollan hojas pequeñas, inhiben el crecimiento de la raíz, se presenta clorosis la cual se manifiesta con una coloración verde pálido en comparación con plantas que han sido crecidas en condiciones favorables; se induce la desintegración de los cloroplastos y hay pérdida de clorofila; se puede llegar a la necrosis y finalmente a la muerte (Reddy, 2006).



### 2.3.2. Metabolismo de compuestos fenólicos

La reducción de nutrientes en las plantas, la cual puede llegar a representar una condición de estrés abiótico, tiene un efecto en el metabolismo secundario, en particular en el metabolismo de los compuestos fenólicos. En la mayoría de los casos, la reducción de nutrientes provoca el incremento en la concentración de compuestos fenólicos simples, flavonoles, antocianinas o cumarinas (Kovacik *et al.*, 2007). También puede ocurrir que se modifique el perfil de estos metabolitos secundarios sin que se afecte el contenido total. El incremento en la biosíntesis de los compuestos fenólicos está asociada comúnmente con un incremento rápido y transitorio en la actividad de enzimas claves como la fenilalanina amonio liasa (Dixon *et al.*, 2002).

En el cuadro 4, se presentan algunos de los trabajos en los que se evaluó las respuestas en el metabolismo de compuestos fenólicos en diferentes especies vegetales ante la reducción de nitrógeno. Kovacik *et al.* (2007) estudiaron en *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), el efecto de la deficiencia (disponibilidad insuficiente de nutrimentos) de N. Las plantas fueron expuestas a la eliminación de N del medio hidropónico Hoagland por 12 días; se observó un incremento en la concentración de compuestos fenólicos (6 derivados del ácido benzoico y 5 del ácido cinámico) en las rosetas de las hojas con respecto al control. Así mismo, el incremento de la concentración de los compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico y cinámico estuvo relacionado con el aumento en la actividad de la enzima PAL. Por otra parte, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) y *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) se observó que al eliminar completamente el N y P del medio hidropónico Murashige & Skoog (MS), la concentración total de flavonoles aumentó 4 veces con respecto al control y la proporción quercetina:kamferol cambió. De los dos elementos, el nitrógeno tuvo un efecto más severo. Así mismo, las plántulas que fueron expuestas a cantidades menores de N presentaron menor tamaño y coloraciones púrpura en tallo y hojas, dichas coloraciones se las atribuyeron al aumento de la síntesis de antocianinas (Stewart *et al.*, 2001).

Por su parte, Bongue-Bartelsman y Phillips (1995) comprobaron que al disminuir la concentración de N en el medio hidropónico de plántulas de *Lycopersicon esculentum* la concentración de antocianinas en las hojas aumentó de 3 a 4 veces y el flavonol quercetina-3-

O-glucósido aumentó al doble. Shin *et al.* (2005) realizaron estudios en raíces de *Arabidopsis* disminuyendo la concentración de N en el medio de cultivo hidropónico y observaron que se incrementaba la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad de la enzima peroxidasa. En *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) la concentración de flavonoides en las hojas disminuyó al incrementar los niveles de elementos como N y P lo cual estuvo asociado con la disminución en la actividad de la enzima PAL (Strissel *et al.*, 2005).

**Cuadro 4.** Efecto de la disminución de nitrógeno en eventos relacionados con el metabolismo de compuestos fenólicos en diferentes especies vegetales.

Especie vegetal	Respuesta	Parte de la planta	Referencia
<i>Matricaria chamomilla</i>	Acumulación de compuestos fenólicos (derivados de ácido benzoico y ácido cinámico) Aumento en la actividad de la enzima PAL	Hojas	Kovacik <i>et al.</i> , 2007
<i>Arabidopsis</i>	Incremento en la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Raíces	Shin <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis</i> y <i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumento en la concentración de flavonoides (quercetina, kamferol e isoramnetina) y de antocianinas	Planta completa	Stewart <i>et al.</i> , 2001
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Aumento de la concentración de flavonoides y aumento de actividad PAL	Hojas	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Aumento en antocianinas y flavonol (quercetina-3-O-glucósido)	Hojas	Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995
<i>Morus alba</i> L. cv. Kanva-2)	Aumento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y de la actividad enzimática de POD, Disminución de masa seca, clorofila y proteína.	Planta completa	Tewari <i>et al.</i> , 2007

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Castilleja tenuiflora* es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratamientos relacionados con el cáncer, las enfermedades respiratorias y gastrointestinales. Sus efectos podrían deberse a la presencia de compuestos fenólicos como los feniletanoides y los flavonoides. Dentro de los factores abióticos que se conocen que influyen en el metabolismo de compuestos fenólicos se encuentra la deficiencia de nutrientes. En específico, el nitrógeno es uno de los macronutrientes fundamentales para las plantas cuya deficiencia ocasiona estrés y cambios en la actividad de enzimas de la biosíntesis de compuestos fenólicos, así como en la concentración y perfil de los mismos. En *C. tenuiflora* se desconoce el efecto que causa la reducción de N y tampoco existen antecedentes en especies de la familia Orobanchaceae. Los estudios sobre la biosíntesis de feniletanoides son escasos. Este conocimiento podría ser útil para implementar estrategias que incrementen la producción de los compuestos bioactivos de *C. tenuiflora*.

#### **4. HIPÓTESIS**

La reducción de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo B5 incrementará la concentración de compuestos fenólicos y modificará la actividad de las enzimas PAL y peroxidasa en brotes de *C. tenuiflora*.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la influencia de la reducción de nitrógeno sobre el metabolismo de compuestos fenólicos en brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactores de inmersión temporal.

##### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el crecimiento, desarrollo y concentración total de clorofilas de brotes de *C. tenuiflora* cultivados bajo reducción de nitrógeno.
- Evaluar la actividad de las enzimas PAL y peroxidasa en brotes de *C. tenuiflora* cultivados bajo reducción de nitrógeno.
- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides de brotes de *C. tenuiflora* cultivados bajo reducción de nitrógeno.
- Analizar el perfil cromatográfico por HPLC de extractos metanólicos obtenidos de los brotes de *C. tenuiflora* cultivados bajo reducción de nitrógeno.

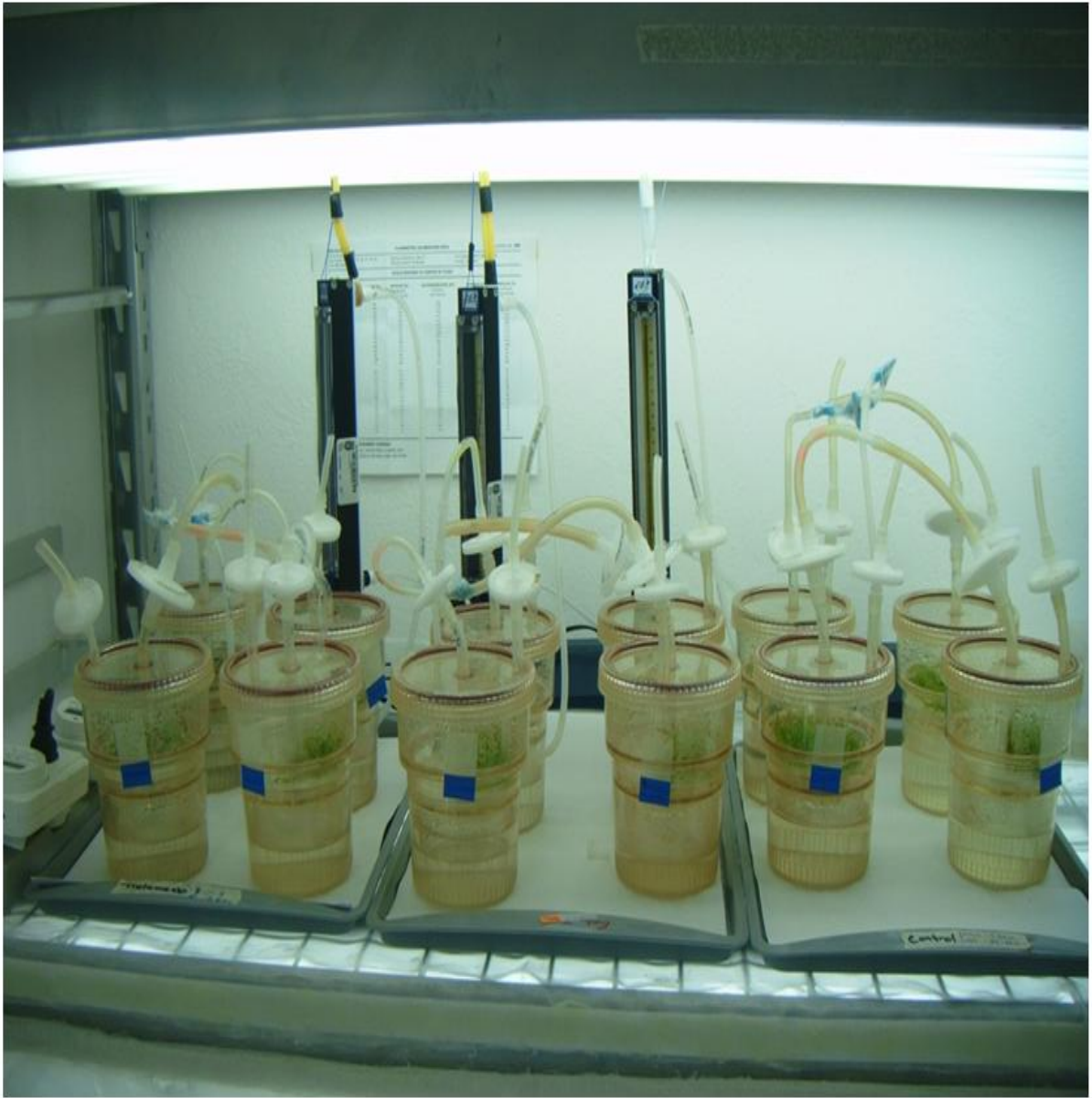
## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Material biológico**

El material biológico consistió en cultivos *in vitro* de brotes de *C. tenuiflora* (línea CtBra-1) pertenecientes al Departamento de Biotecnología del CeProBi, los cuales fueron obtenidos a partir de brotes adventicios formados en cultivos *in vitro* de raíces (Rosas, 2007). Los brotes se mantuvieron mediante resiembra periódica cada 21 días en medio de cultivo líquido B5 (Gamborg *et al.*, 1968), suplementado con sacarosa (30 g/L), sin reguladores de crecimiento y un pH de 5.8. Las condiciones de cultivo fueron temperatura controlada a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, intensidad de 200-300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  y agitación constante a 110 rpm (Valdez, 2011).

### **6. 2 Cultivo en biorreactor de inmersión temporal**

Para los experimentos se utilizó el sistema de cultivo en biorreactores de inmersión temporal implementado por Valdez (2011). Este sistema consiste de biorreactores de inmersión temporal (Sigma No. Cat. Z373206) de volumen nominal de 0.9 L y volumen de operación de 0.2 L. Los biorreactores son de plástico polisulfona con dos compartimentos, uno superior en el que se colocan los brotes y uno inferior con el medio de cultivo. En la figura 4 se muestra el sistema de trabajo, el cual está formado por biorreactores conectados a bombas de aire ELITE (Maxima-R; Mod.A-806; México), filtros para introducir aire estéril y de un temporizador digital programable para controlar la duración y la frecuencia de la inmersión que en este caso fue de 5 min cada 24 horas. El flujo de aire fue de 0.8 a 1 L/min y estuvo controlado mediante un flujómetro. Durante la inmersión, los brotes se agitaron suavemente, y se renovó la atmósfera dentro del frasco. Se podía operar hasta 13 biorreactores de forma simultánea. Los brotes fueron incubados en una cámara de cultivo, con temperatura de  $21\pm^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad e intensidad luminosa de 200-300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .



**Figura 4.** Sistema de biorreactores de inmersión temporal con brotes de *C. tenuiflora*.

### 6.3. Diseño de experimentos

Se probaron dos concentraciones de nitrógeno: 25.74 mM (control) y 1.32 mM (reducción N), manteniendo la relación nitrato:amonio constante en 24:1 (Cuadro 5). Se operaron de manera simultánea seis biorreactores para cada uno de los tratamientos. Dependiendo de la variable a analizar, se cosechó la biomasa total del biorreactor o se tomó una muestra en condiciones de asepsia.

Cuadro 5. Tratamientos.

Tratamientos	N total (mM)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mM)	KNO <sub>3</sub> (mM)
Control	25.74	0.99	24.75
Reducción	1.32	0.09	1.23

### 6.4. Evaluación del crecimiento, desarrollo y contenido de clorofila

Después de 21 días de cultivo en el biorreactor, se midieron las siguientes variables de crecimiento: tamaño de los brotes (cm) y longitud de las raíces (cm), para lo cual se utilizó un Vernier. La biomasa fresca se determinó registrando su peso usando una balanza analítica. En cuanto a las variables de desarrollo se midieron la eficiencia de formación de raíz (EFR) y el índice de multiplicación de los brotes (IMB). Dichas variables fueron calculadas con base a las ecuaciones (1) y (2):

$$\text{EFR} = \frac{\text{Número de brotes con raíz}}{\text{Número total de brotes}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{IMB} = \frac{\text{Número de brotes cosechados}}{\text{Número de brotes inoculados}} \quad (2)$$

La determinación de la concentración de clorofila total se realizó mediante el método de Lichtenthaler y Wellburn (1987). Se tomaron 15 mg de tejido fresco y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar su degradación. La muestra congelada se pulverizó y se le agregó 1 mL de acetona al 80% (v/v). Para eliminar los sólidos, la muestra se centrifugó a 13,500 g por 10 min a 10°C. Posteriormente, se leyó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro UV/VIS (Modelo UV 160-A, Shimadzu, Japón) a 663.2 y 646.8 nm. La concentración de clorofilas se calculó mediante las ecuaciones (3), (4) y (5):

$$\text{Clorofila } a = 12.12 * A_{663.2} - 2.79 * A_{646.8} \quad (3)$$

$$\text{Clorofila } b = 21.50 * A_{646.8} - 5.1 * A_{663.2} \quad (4)$$

$$\text{Clorofila total} = \text{clorofila } a + \text{clorofila } b \quad (5)$$

En donde:

$A_{663.2}$  = Lectura de absorbancia a 663.2 nm

$A_{646.8}$  = Lectura de absorbancia a 646.8 nm

La concentración de clorofila fue expresada en  $\mu\text{g}$  por mg de biomasa fresca ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  BF).

## **6.5. Evaluación de la actividad enzimática**

### **6.5.1. Obtención de extractos enzimáticos**

Los extractos enzimáticos se obtuvieron siguiendo la metodología de Yan *et al.*, (2006). Se tomaron 200 mg de tejido fresco, se congelaron inmediatamente con N líquido y se pulverizaron utilizando un mortero de porcelana, agregando 40 mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). Una vez hecha la mezcla, se agregaron a 3 mL de una solución de extracción la cual consistió en buffer de fosfatos de sodio 100 mM (pH 6.0), 2 mM del ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) y 4 mM de ditioneitol (DTT). Posteriormente se centrifugó a 13,500 g por 15 min a una temperatura de 4°C. Se separó el sobrenadante y se mantuvo el extracto a 4°C.

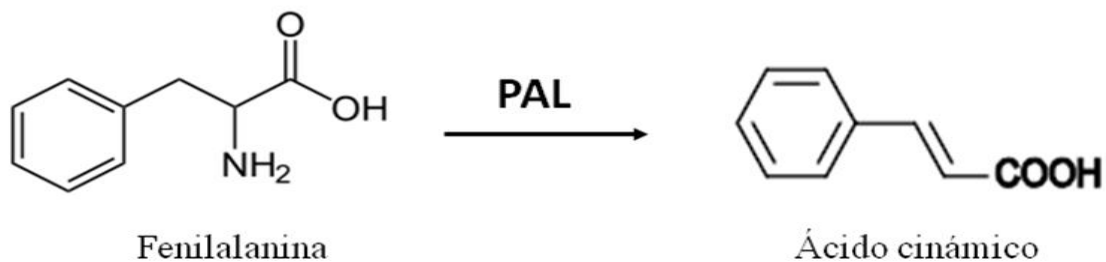


### 6.5.2. Determinación de proteína

La concentración de proteína en el extracto enzimático se determinó mediante el método de Bradford (1976). Se tomó 200  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y se le agregó 600  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos de sodio 100 mM (pH 6.0) y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, 500-0006). Se agitó suavemente y se dejó reposar por 10 min. Se leyó la absorbancia a 595 nm. Se preparó un blanco el cual contenía todos los reactivos excepto el extracto enzimático. Se elaboró una curva patrón con suero de albúmina bovina (BSA) entre 0-16 mg/mL disuelto en el buffer de fosfatos. El resultado de proteína fue utilizado para expresar las unidades de PAL y POD.

### 6.5.3. Actividad enzimática de fenilalanina amonioliasa (PAL)

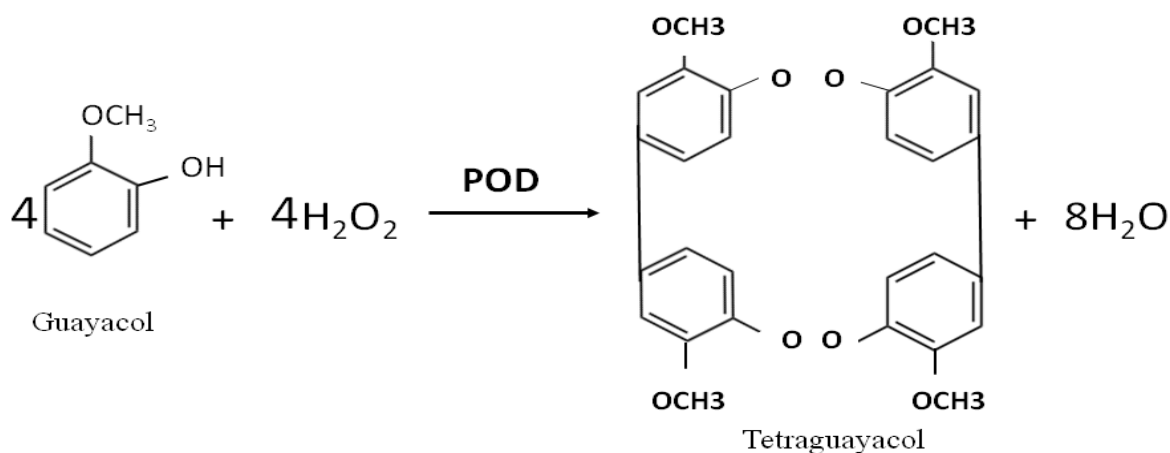
El fundamento de la técnica se basa en la capacidad de la enzima PAL de sintetizar ácido cinámico a partir de la fenilalanina (Figura 5). La determinación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Yan *et al.*, (2006). La mezcla de reacción en un volumen final de 1 mL contenía extracto enzimático (intervalo de proteína 2-16  $\mu\text{g}$ ), Tris-HCl 50 mM a pH 8.8 y  $L$ -fenilalanina (Sigma P-2126) 20 mM pH 8.8. La mezcla se incubó por 60 min a 40°C, agitando de manera suave y constante. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo agregando 50  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 5 N y se leyó la absorbancia a 290 nm, utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (Modelo UV 160-A, Shimadzu, Japón). El blanco se preparó con extracto enzimático pero sin fenilalanina; esto con el fin de evitar la interferencia por  $L$ -fenilalanina endógena. La actividad de la enzima PAL se expresó como  $\mu\text{mol EAC/h/mg}$  proteína.



**Figura 5.** Reacción de la enzima fenilalanina amonio liasa, utilizando como sustrato a la fenilalanina para sintetizar ácido cinámico.

#### 6.5.4. Actividad enzimática de peroxidasa

El fundamento de la técnica se basa en la capacidad que tiene la enzima peroxidasa en oxidar el guayacol a tetra guayacol (Figura 6). La determinación de la actividad de la peroxidasa se realizó de acuerdo al método descrito por Frik (1976). La mezcla de reacción con un volumen final de 1 mL contenía extracto enzimático (intervalo de proteína 2-16  $\mu\text{g}$ ), buffer de extracción (buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0; EDTA 2 mM y DTT 4 mM), buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, peróxido 0.3% y guayacol 100 mM. Se determinó la absorbancia a 470 nm cada 30 s durante 6 min. El control fue una mezcla de reacción sin extracto. La actividad de la enzima POD fue expresada como mM tetraguayacol/min/mg proteína tomando como base el coeficiente de extinción molar del tetraguayacol ( $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



**Figura 6.** Reacción de la enzima peroxidasa (POD) oxidando el guayacol a tetra guayacol.

#### 6.6. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides

##### 6.6.1 Obtención de extractos metanólicos

Los extractos se obtuvieron tomando 200 mg de tejido fresco. Se congelaron inmediatamente con N líquido y se molieron. Una vez pulverizado, se realizó la extracción agregando 1 mL de metanol. Posteriormente se centrifugó a 13,000 g por 15 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se determinó la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides totales.

### **6.6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales**

La cuantificación se realizó siguiendo el método colorimétrico descrito por Shohael et al. (2006). La mezcla de reacción (volumen final 2.6 mL) se preparó con 100  $\mu$ L de cada uno de los extractos metanólicos más 2.5 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregó 0.1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu y se agitó suavemente dejándose reposar por 6 min. Transcurrido el tiempo, se le adicionó 0.5 mL de carbonato de sodio al 20%, se agitó, se dejó reposar por 30 min y se midió la absorbancia a 760 nm. La curva patrón se elaboró con ácido gálico en un intervalo de 0-25  $\mu$ g/mL disueltos en metanol. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de biomasa seca (mg EAG/g BS).

### **6.6.3. Cuantificación de flavonoides totales**

La cuantificación de flavonoides se realizó por el método de Shohael et al. (2006). Se elaboró una mezcla de reacción con 250  $\mu$ L de cada uno de los extractos metanólicos más 1.25 mL de agua desionizada. A la mezcla se le añadió 75  $\mu$ L de nitrito de sodio al 5% (p/v) se agitó suavemente y se dejó reposar por 6 min. Una vez transcurrido el tiempo se le adicionó 150  $\mu$ L de cloruro de aluminio al 10% (p/v), se agitó nuevamente y se dejó en reposo por 5 min. Posteriormente, se le agregó 0.5 mL de hidróxido de sodio 1 M y 2.5 mL de agua desionizada, se agitó suavemente y se dejó reposar por 30 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 510 nm. Se elaboró una curva patrón con catequina en un intervalo de 0-100  $\mu$ g/mL. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de catequina por g de biomasa seca (mg EC/g BS).

### **6.6.4. Identificación y cuantificación de antocianinas**

Para realizar la cuantificación de antocianinas se siguió la metodología de Rapisarda *et al.*, (2000). Se pesaron dos muestras de 100 mg de tejido fresco cada una. Por separado, se congelaron inmediatamente con N líquido y se molieron. Una vez pulverizadas, se tomó una muestra y se realizó la extracción con 2 mL de un buffer con pH 1.0, que contenía 50 mM de KCl y 150 mM de HCl. La extracción de la segunda muestra se realizó agregando 2 mL de un buffer de pH 4.5 que contenía 400 mM de acetato de sodio y 240 mM de HCl. Las mezclas

fueron centrifugadas a 12,000 g por 15 min a 4°C. La absorbancia de cada uno de los sobrenadantes se midió a 510 nm.

La concentración de antocianinas se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas} = \left[ \text{Abs}_{510\text{nm}} (\text{pH } 1) - \text{Abs}_{510\text{nm}} (\text{pH } 4.5) \right] \times \frac{M}{\varepsilon} \times \text{factor de dilución}$$

Donde:

M = Masa molecular (Cianidina 3-glucósido) = 484.8 g/gmol

$\varepsilon$  = Absortividad molar a 510 nm = 24,825 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

La concentración de antocianinas fue expresada en mg por g de biomasa fresca (mg/g BF).

## **6.7. Identificación y cuantificación de feniletanoides**

### **6.7.1. Obtención de extractos metanólicos**

Los extractos metanólicos se prepararon a partir del material vegetal secado por liofilización (Liofilizadora Labconco Freezer, Dryer 18) y pulverizado. Por cada 100 mg de material vegetal seco se añadieron 10 mL de metanol y se agitó durante 24 h. La mezcla se filtró al vacío y el filtrado se evaporó bajo vacío a 210 mbar, 40°C y rotación de 50 rpm. El extracto obtenido se resuspendió con 2 mL de metanol y se llevó a un volumen de 30 mL con agua desionizada, para posteriormente congelarlo a -70°C. Los extractos congelados se liofilizaron hasta obtener un polvo fino. Finalmente los extractos secos se almacenaron a temperatura ambiente hasta el análisis correspondiente (Herrera, 2010).

### 6.7.2. Perfil cromatográfico por capa fina

Para realizar el análisis cromatográfico se utilizaron placas de sílica gel 60F<sub>254</sub> (Merck). Se prepararon “stocks” de 10 mg/mL de cada uno de los extractos a analizar y de las referencias, las cuales fueron el ácido cafeico y la fracción aislada de la raíz de *C. tenuiflora* correspondiente al verbascósido (Gómez-Aguirre *et al.*, 2012). Posteriormente, se tomaron 5 µL de los “stock” antes mencionados y se aplicaron en el borde inferior de las placas. La fase móvil fue una mezcla agua:metanol (7:3). Las placas fueron observadas bajo luz UV a 366 nm y 254 nm y, posteriormente se revelaron con 4-hidroxibenzaldehído (Gómez, 2011). El reactivo revelador fue preparado mezclando 0.5 mg de 4-hidroxibenzaldehído (Merck), 10 mL de ácido sulfúrico y 90 mL de etanol (Wagner, 1996). Una vez reveladas las placas fueron secadas a temperatura ambiente. Las bandas de color café oscuro indican feniletanoides (Martínez, 2005).

### 6.7.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

El análisis de HPLC se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur del IMSS. Se utilizó un equipo de HPLC Waters 2695 con detector de arreglo de diodos y el software Empower (Waters Corporation, USA). Se utilizó una columna RP-18 de fase reversa (Lichrospher 100, 250 × 4 mm, RP 18, 5 µm) (Merck, Darmstadt, Alemania) conectada a una columna guarda. La fase móvil consistió en: agua (pH 3.5, con 5% de ácido trifluoroacético) (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El sistema de gradiente fue de la siguiente manera: 0–2 min, 100–0% B; 2–10 min, 77–23% B; 12–13 min, 70–30% B; 14–15 min, 100% B; 16–17 min, 0% B. El flujo se mantuvo en 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL. La detección se realizó a 330 nm para feniletanoides y a 360 nm para flavonoides. Los cromatogramas fueron analizados tomando en cuenta tanto el tiempo de retención de los picos como el espectro de absorción de los compuestos de referencia. El tiempo de retención del isoverbascósido fue 7.5 min y el del verbascósido de 7.9 min ( $\lambda = 218, 247, 292$  y  $331$  nm). La concentración de feniletanoides fue estimada con base en una curva de calibración de verbascósido ( $y = 22144x - 161443, R^2 = 0.999$ ) y expresada como mg/g BS (Gómez-Aguirre *et al.*, 2012).

## **6.8. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA de una vía, para determinar si la concentración de N tenía influencia significativa en las variables de respuesta. Para las comparaciones entre medias se hizo una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Todas las pruebas se realizaron con STATGRAPHICS Plus 5.1 para Windows.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Crecimiento, desarrollo y contenido de clorofila

Se midieron variables indicativas tanto de crecimiento como del desarrollo de los brotes de *C. tenuiflora* cultivados con dos concentraciones de N total (Cuadro 6). La biomasa desarrollada con 1.32 mM de N (reducción de N) fue 5.6 g/reactor, 50% menor a la del control (12.9 g/reactor) ( $P<0.05$ ). La altura de los brotes tuvo un comportamiento similar. Los brotes cultivados bajo reducción de N no formaron raíz, a diferencia de los brotes cultivados con 25.74 mM (control) que formaron raíz en 100%. El IMB bajo reducción de N fue tres veces menor al control.

**Cuadro 6.** Variables de crecimiento y desarrollo de brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal durante 21 días con dos concentraciones iniciales de N.

Tratamiento (mM N)	Biomasa fresca (g/reactor)	Altura (cm)	EFR (%)	IMB
Control (25.74)	12.9±0.2 <sup>A</sup>	3.5±0.1 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	6±0.4 <sup>A</sup>
Reducción de N (1.32)	5.6±0.3 <sup>B</sup>	2.3± 0.3 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	2± 0.4 <sup>B</sup>

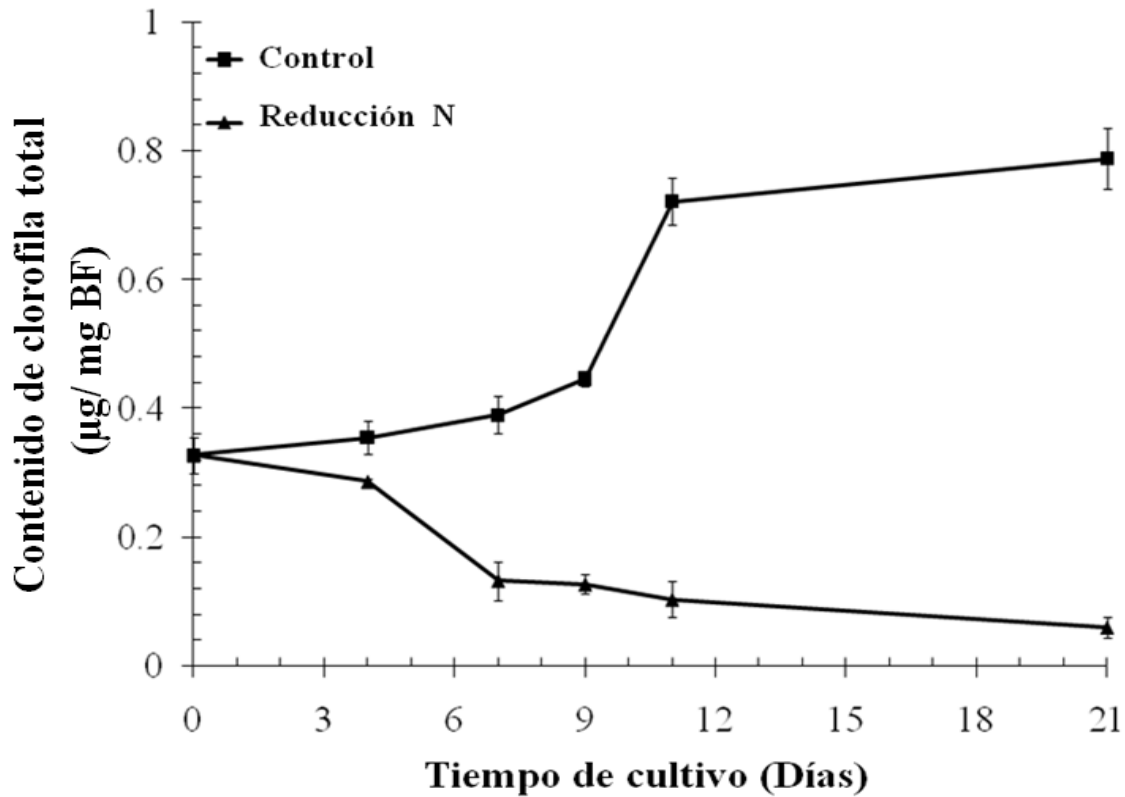
Los valores corresponden al promedio ± error std. Altura: n=15; biomasa e IMB: n=5.

En cada columna, letras diferentes indican que hay diferencias significativas según la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P<0.05$ ).

EFR= Eficiencia de formación de raíz (%).

IMB=Índice de multiplicación de brotes.

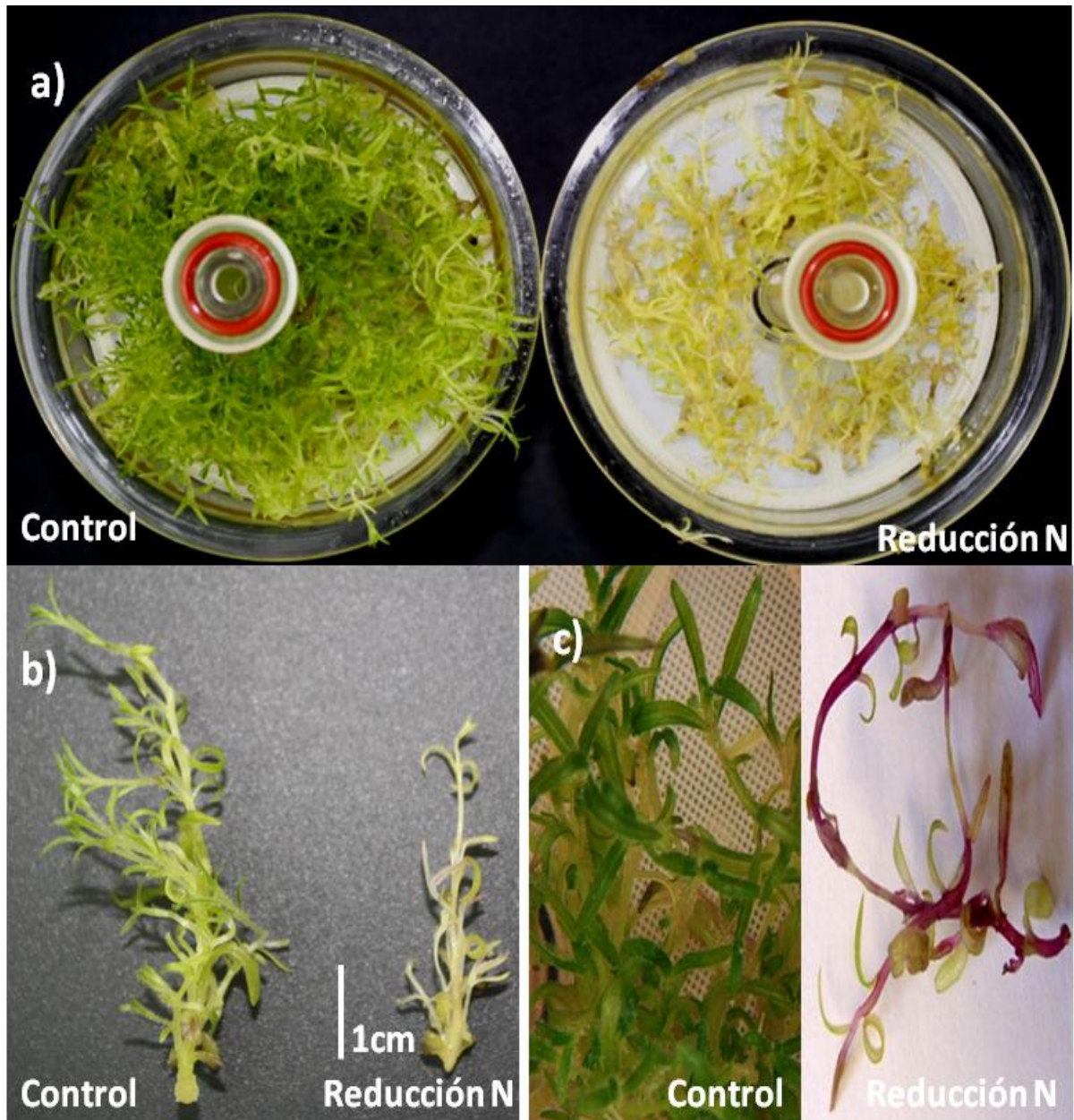
La figura 7 muestra que la concentración de clorofila en los brotes cultivados en el medio control se incrementó conforme avanzó el tiempo de cultivo llegando a 0.79 µg/mg BF a los 21 días. Mientras que bajo reducción de N, el comportamiento fue inverso, la concentración de clorofila comenzó a disminuir a partir del día 4; en el día 7 fue de 0.13 µg/mg BF y en el día 21 fue de 0.06 µg/mg BF lo que representa 3 y 13 veces menos que el control, respectivamente ( $P<0.05$ ).



**Figura 7.** Cambios en la concentración de clorofila total de brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N.

Los cambios en la concentración de clorofila se evidenciaron en la coloración de los brotes, ya que bajo reducción de N presentaron clorosis (amarillamiento del tejido de las hojas debido a la carencia de clorofila) a diferencia del control (Figura 8a). En la figura 8b, se evidencia la diferencia en la altura de los brotes cultivados en el control y bajo reducción de N. Por otro lado, en el día 9 de cultivo bajo reducción de N, se observó en algunos de los tallos una pigmentación morada que se fue acentuando hacia el final del experimento (Figura 8c). De acuerdo a la literatura revisada, cuando las plantas son expuestas a concentraciones bajas de N suelen acumular antocianinas (Kovacik *et al.*, 2007) por lo que se realizó un análisis químico de este material el cual se presenta en la sección 7.3.2 (Cuadro 6).

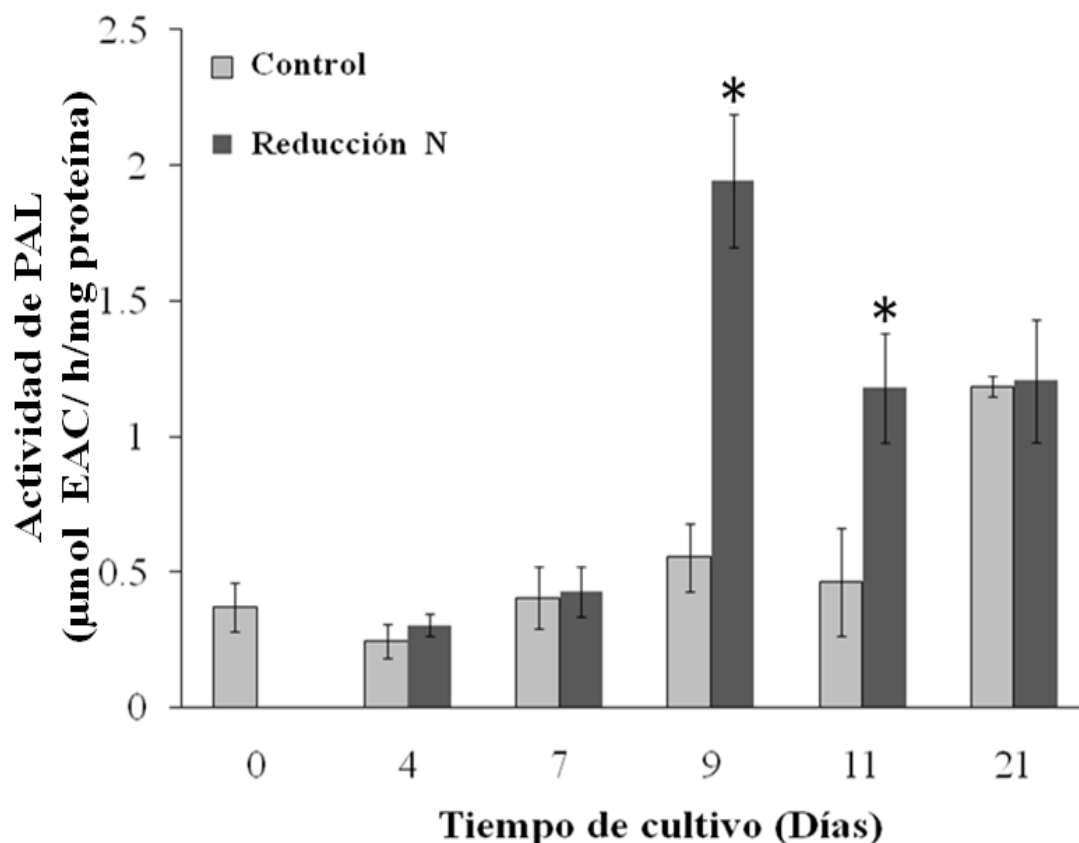




**Figura 8.** Brotes de *C. tenuiflora* desarrollados en cultivo en inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de nitrógeno. (a) Vista superior de los biorreactores con brotes de 11 días de cultivo; (b) Vista lateral de los brotes de 11 días de cultivo y (c) Brotes de 21 días de cultivo.

## 7.2. Actividad de la enzima PAL

En la figura 9 se observa que entre los días 0 y 11, la actividad de la enzima PAL de los brotes cultivados en el control varió entre 0.37 y 0.46  $\mu\text{mol EAC/h/mg}$  proteína, presentando la máxima actividad en el día 21. Bajo reducción de N, la actividad de PAL fue similar al control hasta el día 7 ( $P>0.05$ ), pero en el día 9 la diferencia fue de 3.5 veces con respecto al control ( $P<0.05$ ), para luego disminuir a partir del día 11 y hasta el final del cultivo. Al final del experimento, no hubo diferencia entre las dos concentraciones de N ( $P>0.05$ ).

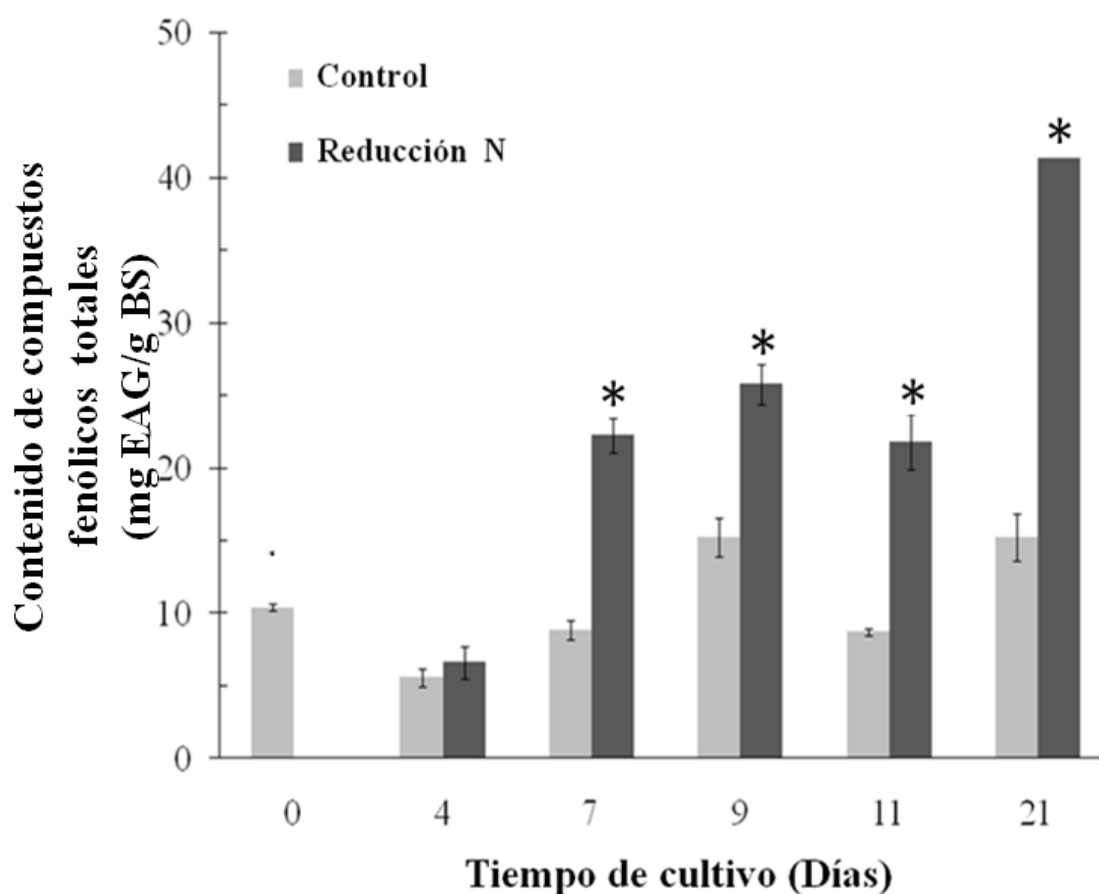


**Figura 9.** Actividad de la enzima PAL de brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error std.  $n=3$ . En el día 9 y 11, el asterisco (\*) indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento de reducción de N según la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P<0.05$ ).

### 7.3. Análisis fitoquímico

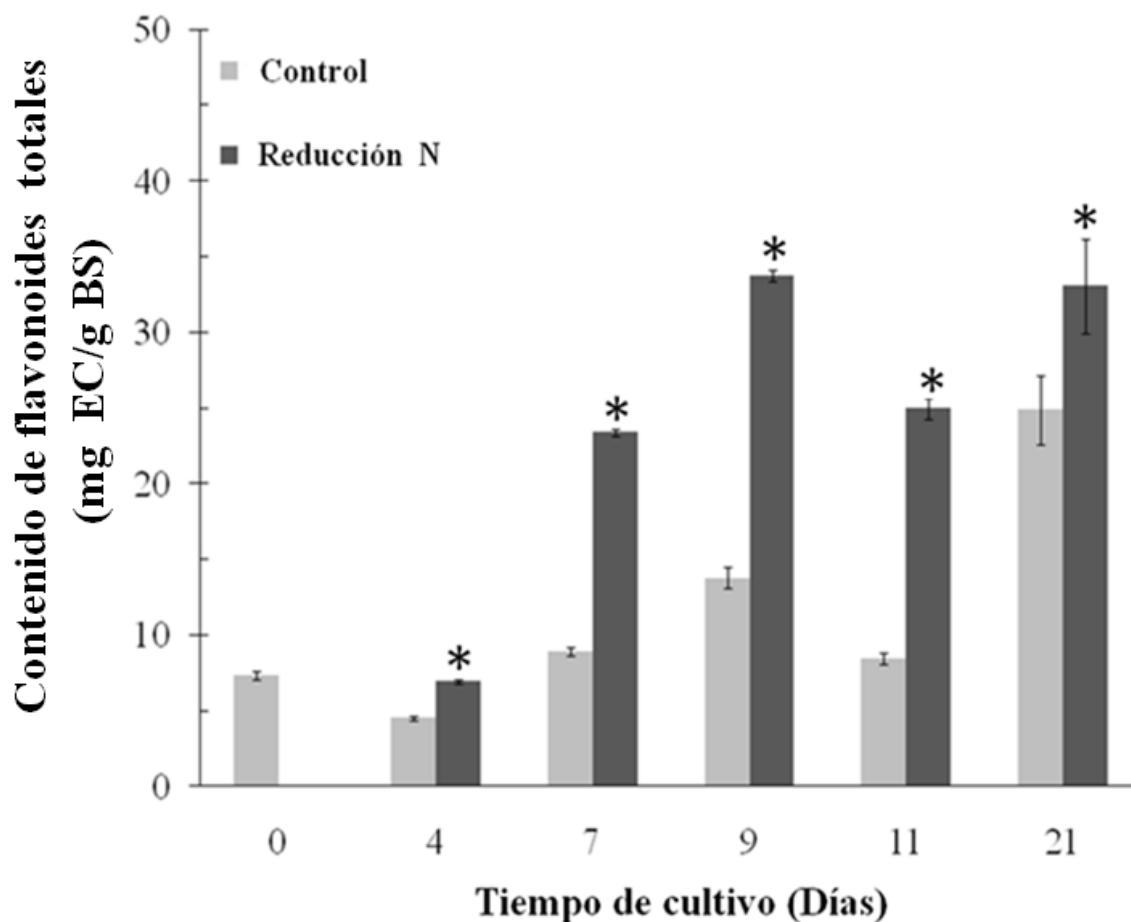
#### 7.3.1. Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales

La concentración de compuestos fenólicos totales de los brotes del control varió de 5.58 mg EAG/g BS en el día 4 hasta 15.27 mg EAG/g BS en el día 21 de cultivo (Figura 10). Mientras que bajo reducción de N, la concentración aumentó a partir del día 7 de cultivo (22.26 mg EAG/g BS,  $P < 0.05$ ), observándose el máximo en el día 21 (41.34 mg EAG/g BS,  $P < 0.05$ ).



**Figura 10.** Contenido de compuestos fenólicos totales de brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos diferentes concentraciones iniciales de N. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error std.  $n=3$ . Para cada día de cultivo, el asterisco (\*) indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento de reducción de N según la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

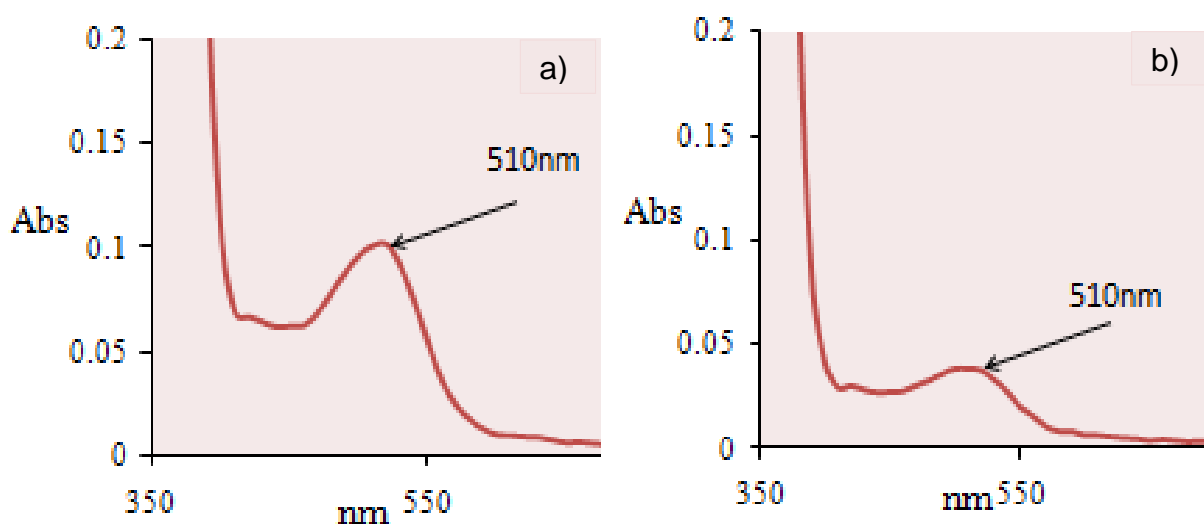
El contenido de flavonoides totales de los brotes control, en los días 4 a 11, varió entre 4.51 y 8.44 mg EC/g BS, observándose la concentración más alta en el día 21 (Figura 11). Bajo la reducción de N, la concentración de flavonoides totales aumentó de manera significativa ( $P < 0.05$ ) en el día 7, 2.8 veces más que el control; entre los días 9 y 21 varió entre 33.73 y 33.08 mg EC/g BS.



**Figura 11.** Contenido de flavonoides totales de brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error std.  $n=3$ . Para cada día de cultivo, el asterisco (\*) indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento de reducción de N según la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

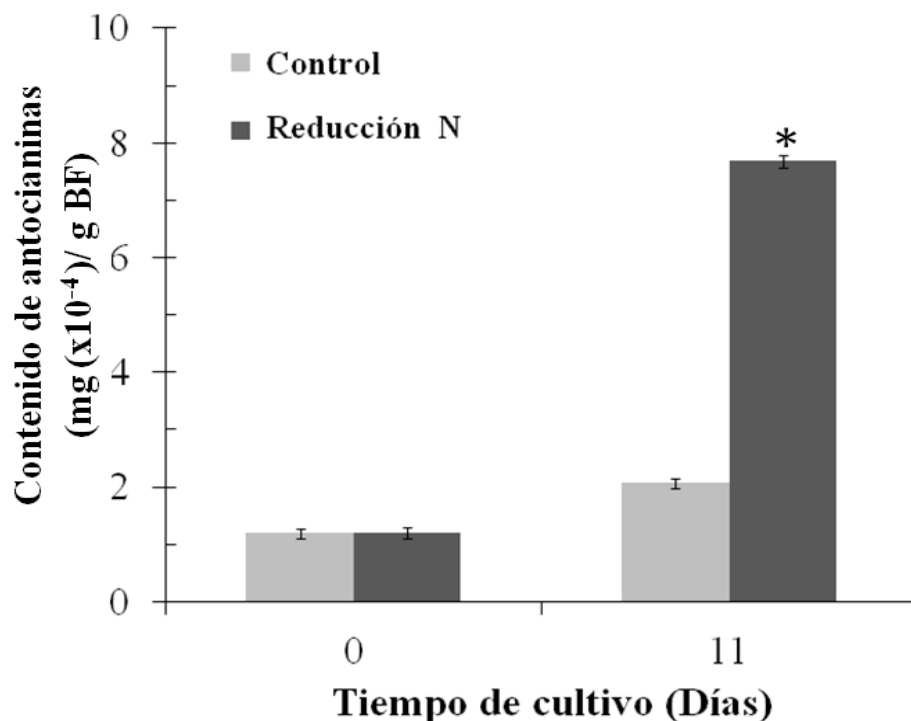
### 7.3.2. Identificación y cuantificación de antocianinas

La figura 12 muestra los espectros de absorción VIS de extractos de brotes de *C. tenuiflora* de 11 días cultivados con las dos concentraciones iniciales de N. En ambos casos, se observa un pico con un máximo de absorción a 510 nm que corresponde a antocianinas (Rapisarda *et al.*, 2000).



**Figura 12.** Espectro de absorción VIS de brotes de *C. tenuiflora* cultivados durante 11 días en biorreactor de inmersión temporal, a) con reducción de N, b) control.

En la figura 13, se muestra que el contenido de antocianinas de los brotes del control en los días 0 a 11 fue entre  $1.23$  y  $2.08 \times 10^{-4}$  mg/g BF. Bajo reducción de N, el contenido de antocianinas aumentó en el día 11 a  $7.68 \times 10^{-4}$  mg /g BF ( $P < 0.05$ ) en 2.7 veces más que el control.

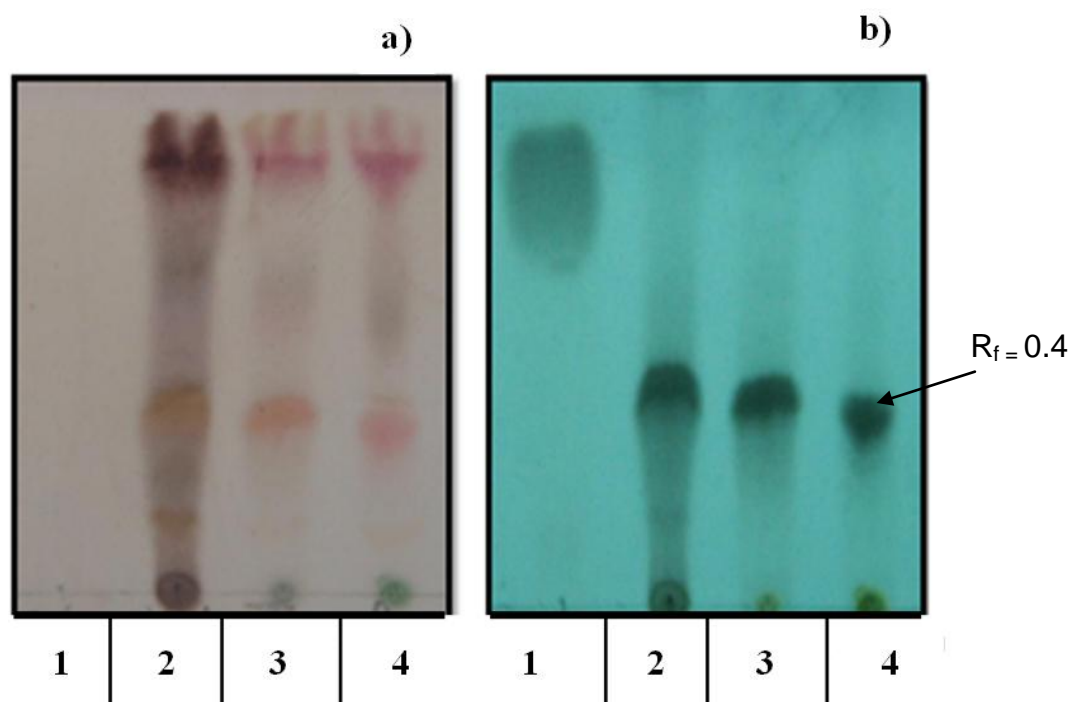


**Figura 13.** Contenido de antocianinas de brotes de *C. tenuiflora* cultivados durante 11 días en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. Los valores corresponden al promedio  $\pm$ error std. n= 3. En el día 11, el asterisco (\*) indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento de reducción de N según la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

### 7.3.3. Análisis y cuantificación de feniletanoides

Para identificar los grupos de compuestos mayoritarios en los brotes de *C. tenuiflora* se realizó un análisis por cromatografía en capa fina (CCF), como estándares de referencia se utilizaron ácido cafeico (ácido fenólico y precursor de los feniletanoides) y una fracción rica en el feniletanoide verbascósido (Figura 14). Los extractos de los brotes cultivados en ambas concentraciones de N revelaron bandas de color rosa, naranja y café (Figura 14a) lo cual

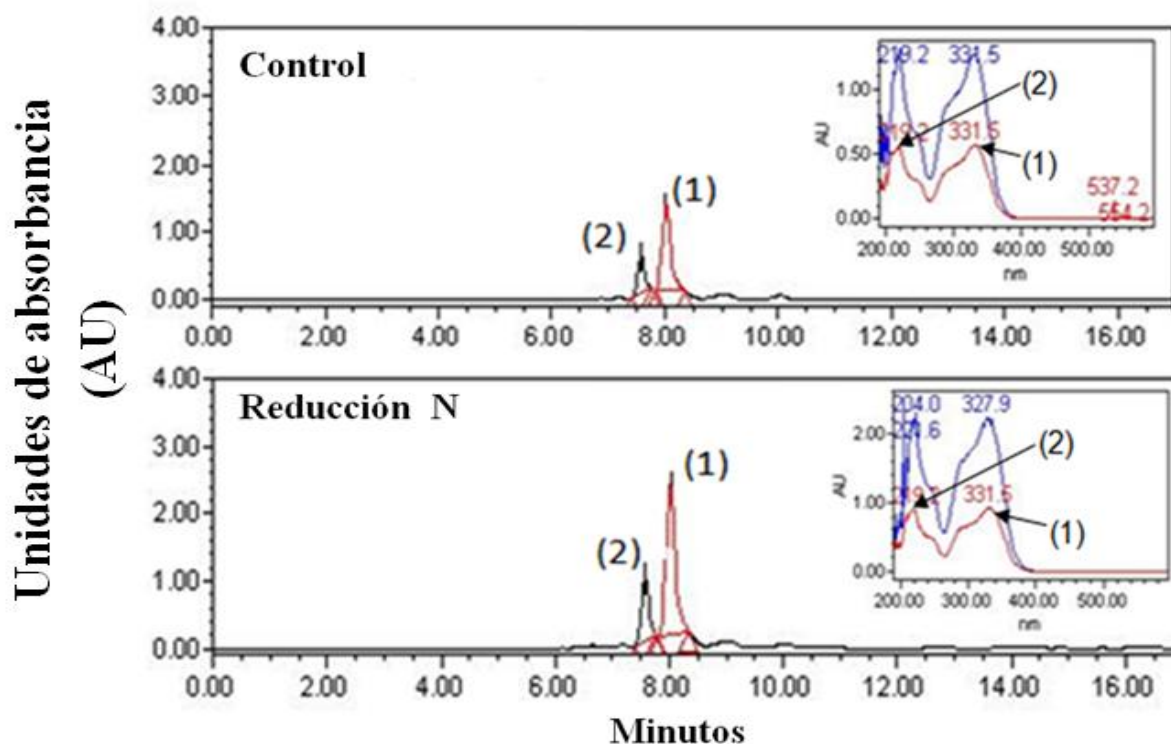
sugiere la presencia de flavonoides y feniletanoides, respectivamente (Martínez, 2005). La banda con  $R_f = 0.4$  y que fluoresció bajo luz UV a 366 nm corresponde al verbascósido (Figura 14b). De acuerdo con este análisis, los brotes de *C. tenuiflora* no acumulan ácido cafeico.



**Figura 14.** Cromatografía en capa fina (CCF) de extractos metanólicos de brotes de *C. tenuiflora* cultivados durante 21 días en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. Placas de sílica gel 60F<sub>254</sub> y fase móvil agua:metanol (7:3). (a) Placa revelada con 4-hidroxibenzaldheído; (b) Luz UV de 366 nm. (1) ácido cafeico; (2) verbascósido; (3) extracto de brotes cultivados bajo reducción de N; (4) extracto de brotes control.

El perfil por HPLC de los feniletanoides presentes en los extractos es mostrado en la figura 15. En ambas concentraciones de N, los brotes acumularon dos compuestos con  $t_R$  de 7.6 (2) y 8.0 min (1), respectivamente. Para ambos compuestos, el espectro de absorción es el característico de los feniletanoides con dos picos de máxima absorción alrededor de 220 y 330 nm (Figura 15 inserto) (Esposito *et al.*, 2009). De acuerdo con estas dos propiedades, el compuesto (1) corresponde al verbascósido y el compuesto (2) al isoverbascósido (Gómez *et al.*, 2012). En

estos mismos extractos los espectros de absorción demostraron que los compuestos con tiempos de retención de 9.3 min corresponden al grupo de los flavonoides.



**Figura 15.** Perfil Cromatográfico por HPLC de extractos metanólicos de brotes de *C. tenuiflora* cultivados durante 21 días en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. (1) verbascósido  $t_R=8.0$  min, (2) isoverbascósido  $t_R=7.6$  min. Insertos: espectros de absorción UV/VIS (1) verbascósido,  $\lambda=292$  y 331 nm, (2) isoverbascósido,  $\lambda=218$  y 247 nm.

El contenido de feniletanoides de los brotes de *C. tenuiflora* se muestra en el Cuadro 7. Con ambas concentraciones de N, el verbascósido fue más abundante que el isoverbascósido y la cantidad más alta de ambos feniletanoides se observó en el día 21 de cultivo. Los brotes cultivados con reducción de N acumularon 111.59 y 113.88 mg verbascósido/g BS a los 11 y 21 días de cultivo, respectivamente. Estos valores son 2.3 y 2 veces mayores al control, respectivamente ( $P<0.05$ ). Por su parte, la concentración de isoverbascósido con reducción de N fue 19.92 y 36.41 mg/g BS a los 11 y 21 días, respectivamente. ( $P<0.05$ ). Estos valores son 2.5 y 1.7 veces mayores al control ( $P<0.05$ ).



**Cuadro 7.** Concentración de verbascósido e isoverbascósido en brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N.

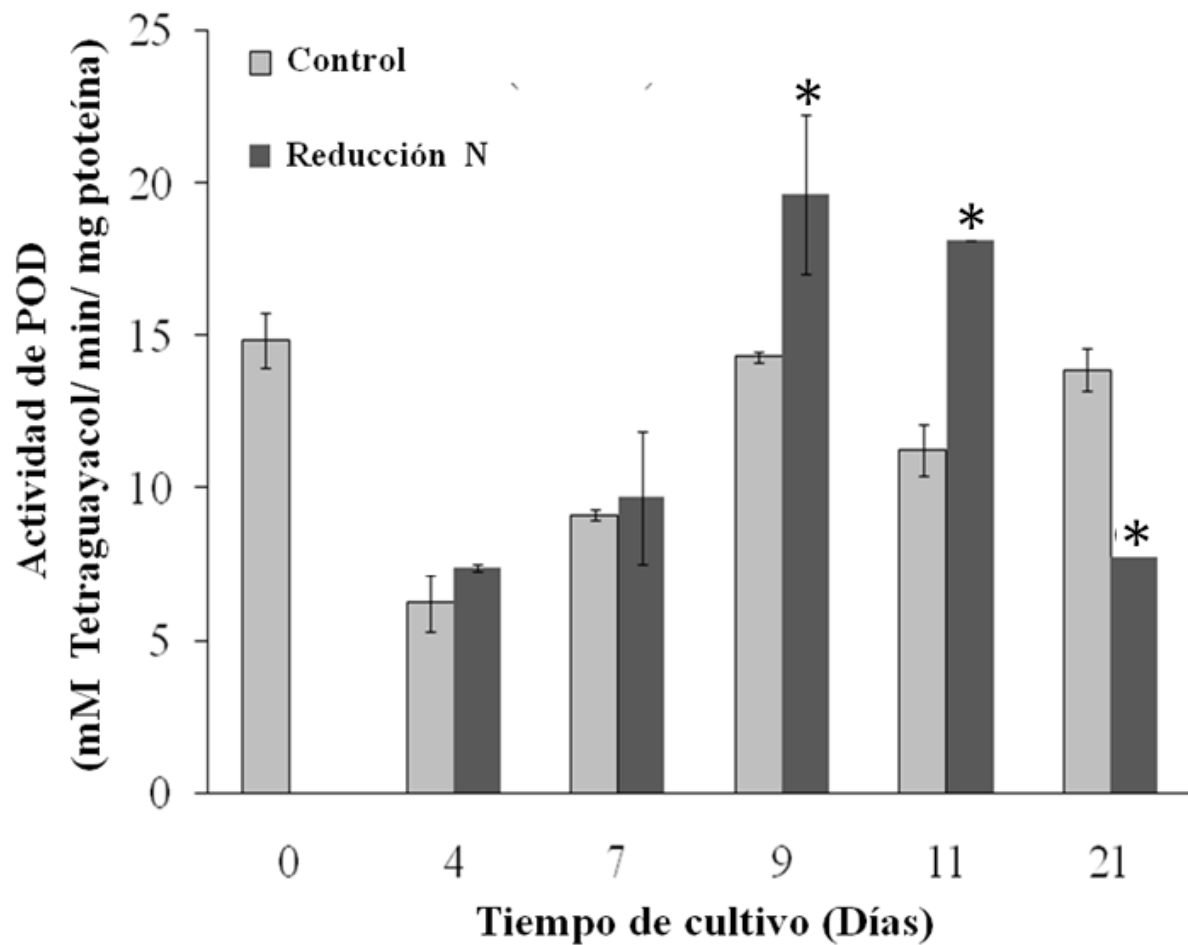
Tratamiento (mM N)	Verbascósido (mg/g BS)		Isoverbascósido (mg/g BS)	
	11	21 días	11	21 días
Control (25.74)	46.80±0.3 <sup>B</sup>	57.64±1.4 <sup>B</sup>	7.94±0.1 <sup>B</sup>	21.25±0.5 <sup>B</sup>
Reducción N (1.32)	111.59±5.6 <sup>A</sup>	113.88±8.6 <sup>A</sup>	19.92±0.7 <sup>A</sup>	36.41± 2.3 <sup>A</sup>

Los valores corresponden al promedio ± error std. n=3.

En cada columna, letras diferentes indican que hay diferencias significativas según la prueba de comparación de medias de Tukey (P<0.05).

#### 7.3.4. Actividad de la enzima POD

La actividad de la enzima POD de los brotes cultivados en el control aumentó entre los días 4 y 9 de 6.23 a 14.30 mM tetraguaiacol/min/mg proteína para luego disminuir al día 11 e incrementarse al final del cultivo. Bajo reducción de N, la actividad de POD fue similar al control hasta el día 7, alcanzó su máxima actividad en el día 9, para luego disminuir al final del cultivo. En los días 9 y 11, la actividad de POD bajo reducción de N fue de 1.3 y 1.6 veces mayor al control (P<0.05), respectivamente; mientras que al final del experimento, bajo reducción de N fue 1.8 menor a la del control (P<0.05) (Figura 16).



**Figura 16.** Actividad de la enzima POD de brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal con dos concentraciones iniciales de N. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error std. n=3. En el día 9, 11 y 21 el asterisco (\*) indica diferencia significativa entre el control y el tratamiento de reducción de N según la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la reducción de N sobre el metabolismo de compuestos fenólicos en brotes de *C. tenuiflora* cultivados en biorreactor de inmersión temporal. La reducción de N se realizó tomando como referencia la concentración de N total en el medio de cultivo B5 (Gamborg *et al.*, 1968) que es de 25.74 mM (control) y se redujo a 1.32 mM (20 veces) (reducción N). Esta concentración es superior a la calificada como deficiente para especies como *Achillea collina* (Asteraceae) (Giorgi *et al.*, 2009), *Arabidopsis thaliana* (Stewart *et al.*, 2001) y *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) (Stewart *et al.*, 2001). El efecto de la reducción de N en *C. tenuiflora* no había sido evaluado hasta ahora y no existen antecedentes en especies de las familias Scrophulariaceae u Orobanchaceae. Por lo que la discusión que se presenta se realiza con especies de otras familias.

El crecimiento y desarrollo de los brotes de *C. tenuiflora* se vio afectado de manera negativa por la reducción de N. La biomasa y la altura de los brotes fueron significativamente menores con reducción de N que en el control; se presentó clorosis en las hojas, se inhibió la formación de raíz y la multiplicación de la parte aérea (Cuadro 6, Figura 8). Estos resultados coinciden con lo reportado en *Morus alba* (Moraceae) y *Achillea collina* (Asteraceae). Las plantas de *M. alba* expuestas a la eliminación de la fuente de nitrógeno por 30 días presentaron menos crecimiento tanto de la parte aérea como de la raíz y, la biomasa de la parte aérea y raíz disminuyó seis veces con respecto al control (Tewari *et al.*, 2007). De manera similar, las plantas de *Achillea collina* (Asteraceae) expuestas a una deficiencia de N a largo plazo (cuatro meses), en donde se disminuyó la concentración de N del medio de 1.0 a 0.1 mM (10 veces), presentaron una disminución severa en la cantidad de biomasa a partir de los 40 días de iniciado el tratamiento. También disminuyó la concentración de proteínas, clorofila y carotenos (Giorgi *et al.*, 2009). Estos resultados pueden deberse a que la deficiencia de N acelera la senescencia foliar y estimula la producción de especies reactivas de oxígeno lo que conduce a la degradación de las macromoléculas como proteínas y la clorofila en las plantas (Crafts-Brandner, 1992; Khavari-Nejad *et al.*, 2009). De manera complementaria, Reddy (2006) menciona que la disminución gradual de los pigmentos fotosintéticos y la clorosis, podría deberse a procesos degenerativos del metabolismo de los cloroplastos, reduciendo así la

disponibilidad de clorofila. Este proceso se inicia en las hojas más viejas debido a la alta movilidad del nitrógeno a través del floema. En su conjunto, los resultados evidencian que la baja disponibilidad de nitrógeno afectó severamente el metabolismo primario de *C. tenuiflora*.

Los brotes de *C. tenuiflora* expuestos a la disminución de N presentaron pigmentación morada en tallos y hojas a partir del día 9 de cultivo (Figura 8c). De acuerdo con el análisis químico, estos pigmentos corresponden a antocianinas (Figura 12), cuya concentración fue 3.7 veces mayor a la del material cultivado en condiciones control (Figura 13). Esta respuesta coincide con estudios realizados en *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) y en *Oryza sativa* (Poaceae). En las hojas de plántulas de *L. esculentum* cultivadas en medio hidropónico con bajas concentraciones de N (3.75 y 3.25 mM) con respecto al control (5.0 mM) durante 23 días, la concentración de antocianinas aumentó 1.3 y 1.6 veces respectivamente (Khavari-Nejad *et al.*, 2009). De manera similar, las plantas de *Oryza sativa* (Poaceae) expuestas a disminución total de N durante una semana acumularon 2.4 veces más antocianinas que el control (Yuan *et al.*, 2009). La disminución de N está asociada con la baja actividad de las enzimas necesarias para el metabolismo energético como la fotosíntesis y la respiración (Shin *et al.*, 2005) lo cual lleva a la producción de pigmentos fotoprotectores tales como las antocianinas y flavonoides (Stewart *et al.*, 2001).

Las hojas de brotes de *C. tenuiflora* desarrollados bajo reducción de N presentaron 3.5 veces mayor actividad enzimática de la PAL que el control, presentando su máxima actividad en el día 9. Esto coincide con un estudio realizado con las hojas de plantas de *Matricaria chamomilla* (Asteraceae) cultivadas sin nitrógeno por 12 días; el máximo de actividad enzimática se presentó al día 4 y 8 con 61 y 23 % respectivamente y al final del experimento no presenta variación estadística con respecto al control (Kovacik *et al.*, 2007).

La PAL es un punto de regulación importante entre el metabolismo primario y secundario. Por lo tanto la lignina, ésteres, ácidos fenólicos y flavonoides dependen de su actividad enzimática. En un estudio realizado en plantas de *Arabidopsis thaliana* que fueron cultivadas sin N por 7 días, la concentración de kamferol, quercetina y antocianinas se incrementó 2, 5 y 6 veces más que el control, respectivamente. Además, la actividad de la PAL se incrementó un

83%, y esta actividad enzimática estuvo relacionada con los niveles de transcripción de los genes *PAL* (Olsen *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos aumentaron en los brotes de *C. tenuiflora* cultivados con la menor concentración de N. Entre el día 9 y el 21 de cultivo, se dio la máxima acumulación y de igual manera la actividad de la PAL aumentó en este tiempo. Esto es consistente con lo reportado por Kovacik *et al.* (2007), donde en hojas de *Matricaria chamomilla* los fenólicos aumentaron entre los días 8 y 12 y, cuando terminó el experimento continuaron acumulándose. Los iones de amonio liberados por PAL en la des-aminación de la fenilalanina pueden ser eficientemente asimilados, por ejemplo, a través del sistema de la GS/GOGAT, (glutamina sintetasa (GS) E.C. 6.3.1.2) y la glutamato sintasa (GOGAT E.C. 1.4.1.13) para producir arogenato, fenilalanina y tirosina y esqueletos de carbono libres de nitrógeno de *t*-cinamato que se puede desviar en las diferentes vías de fenilpropanoides, como los flavonoles, antocianinas, e indirectamente la biosíntesis de lignina (Kovacik *et al.*, 2007). En ese trabajo, los cambios en los ácidos fenólicos se asociaron con la modificación de la actividad PAL, enzima clave para la biosíntesis de compuestos fenólicos (Giorgi *et al.*, 2009).

Así mismo, los brotes de *C. tenuiflora* expuestos a menor cantidad de N acumularon mayor cantidad de flavonoides con respecto al control y tuvieron su máxima acumulación en los días 9 y 21 de cultivo. Los resultados sobre flavonoides totales presentados en este trabajo son similares a los reportados para otras especies como: *Arabidopsis thaliana*; las plántulas fueron expuestas a la disminución de N y se incrementó 3.6 veces la concentración de flavonoles en el tejido, con respecto al control, principalmente de quercetina, kamferol e isoramnetina. Los investigadores redujeron la concentración de N de 60 mM a 0, 0.1, 0.6 y 6.0 mM por 11 días en medio hidropónico MS, obteniendo la mayor concentración de flavonoles en ausencia de nitrógeno. Los mismos autores estudiaron plántulas de *Lycopersicon esculentum* y obtuvieron mayor acumulación de flavonoles a concentración de 0 mM de N (Stewart *et al.*, 2001).

En este trabajo, se observó que en los brotes de *C. tenuiflora* los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido son los compuestos fenólicos mayoritarios, cuya acumulación fue aproximadamente de 2.5 y 1.7 veces mayor bajo reducción de N en comparación al control

respectivamente. Giorgi *et al.* (2009) obtuvieron los perfiles de HPLC de extractos metanólicos de hoja, flor y raíz de plantas de *Achillea collina* (Asteraceae) cultivadas en medio hidropónico con disminución de N (1.0 mM (control) a 0.1 mM de N) y observaron que se presentaban los mismos compuestos en todos los extractos; sin embargo se acumulaban en mayor cantidad en los extractos obtenidos de medios de cultivos con menor cantidad de N. Kovacik *et al.* (2007) observaron un comportamiento similar en hojas de *Matricaria chamomilla*, las cuales acumularon 11 ácidos fenólicos, 6 derivados del ácido benzoico y 5 derivados del ácido cinámico. Después de 12 días de exposición a una disminución total de N en el medio de cultivo, la concentración de los ácidos fenólicos fue de 110% mayor en comparación al control. Debido a que el N es un nutriente importante por ser constituyente de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos su disminución hace que se re programe el metabolismo primario y secundario de las plantas (Giorgi *et al.*, 2009).

La actividad enzimática de la POD en las hojas de *C. tenuiflora* cultivadas con reducción de N fue en aumento a medida que transcurría el tiempo teniendo su máximo en el día 9 para después disminuir hasta el final del experimento. Este comportamiento fue muy similar al observado en hojas de *O. sativa* las cuales fueron expuestas a una solución nutritiva libre de N por 20 días; presentándose inicialmente poca actividad, pero al día 15 tuvo un máximo y disminuyó para el final del tratamiento (20 días) (Huang *et al.*, 2004). Esto pudo deberse a la sobreproducción de ROS como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocado por la disminución del nutriente. Ésta sobreproducción de peróxido provoca la activación de las enzimas antioxidantes como la peroxidasa como defensa ante el estrés. El daño provocado puede observarse porque decrece la masa fresca debido a la peroxidación en las membranas y esto provoca una degradación en las biomoléculas de gran tamaño como las clorofilas y proteínas solubles como RuBiSCO (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa). Estas reacciones producen hojas senescentes en las plantas y la asimilación del carbono se sustituye por el catabolismo de la clorofila y macromoléculas como proteínas, lípidos de membranas y el ARN (Huang *et al.*, 2004).

La reducción de N en el medio de cultivo de 25.74 mM a 1.32 mM afectó de forma significativa el crecimiento y desarrollo de los brotes de *C. tenuiflora*. Los brotes presentaron clorosis, no formaron raíz, disminuyó su capacidad de multiplicación y su tamaño. Estas

características coinciden con las descritas para otras especies como resultado de una deficiencia de N. Estos resultados en conjunto con los cambios en la actividad de la enzima POD indican que los brotes de *C. tenuiflora* cultivados con disminución de N fueron expuestos a un estrés por deficiencia de este elemento lo que influyó en el metabolismo de los compuestos fenólicos. Este es el primer trabajo en que se aborda el efecto de la deficiencia de nitrógeno en el metabolismo de los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido.

## 9. CONCLUSIONES

La reducción de N de 25.74 mM a 1.32 mM representa una condición de estrés por deficiencia para los brotes de *C. tenuiflora* evidenciada por el efecto negativo en crecimiento y desarrollo y, los cambios en la actividad de la enzima POD.

En respuesta al estrés por deficiencia de N, los brotes de *C. tenuiflora* acumulan mayor concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides. En específico, aumenta la concentración de los feniletanoides verbascósido e isoverbascósido y de las antocianinas. Estos cambios en la concentración de compuestos químicos están asociados con el incremento en la actividad de la enzima PAL.



## **10. PERSPECTIVAS**

En este trabajo se observó que al disminuir la concentración de N hasta un 5%, la actividad enzimática de la PAL y POD aumentaron, al igual que la concentración de fenoles, flavonoides, feniletanoides como el verbascósido e isoverbascósido. Sin embargo, también se observaron daños en la fisiología de los brotes. Estudios posteriores serían encaminados a probar otras concentraciones de N en donde los brotes de *C. tenuiflora* no presenten daños excesivos en los tejidos y puedan ser recuperados para subcultivarlos, tratando de acumular los compuestos de interés.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Ah Koo, K., Sung, S.H., Park, J.H., Kim, S.H., Lee, Y.K., Kim, Y.C. 2005. *In vitro* neuroprotective activities of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa dichotoma*. *Planta Medica* 71:778-780.
- Alonso-Castro, A., Villarreal, M., Salazar-Olivo, L., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133:945-972.
- Bartholomaeus, A., Ahokas, J. 1995. Inhibition of P450 by aucubin: is the biological activity of aucubin due to its glutaraldehyde-like aglycone. *Toxicology Letters* 80:75-83.
- Bejar, E., Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M. 2000. Bioactive compounds from selected plants used in the XVI Century Mexican traditional medicine. In: Atta-ur-Rahman (ed) *Studies in natural products chemistry*. Elsevier Sci BV. 24:799-844.
- Bongue-Bartelsman, M., Phillips, D. A. 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:539-546.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Crafts-Brandner, S.J. 1992. Phosphorous nutrition influence on leaf senescence in soybean. *Plant Physiology* 98:1128-1132.
- Díaz, A.M., Abad, M.J., Fernandez, L., Silvan, A.M., De Santos J., Bermejo P. 2004. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: *In vitro* anti-inflammatory activity. *Life Science* 74: 2515-2526.
- Díaz-Sánchez, B.R., Jiménez-Estrada, M., Ocampo, A.A. 2000. Evaluación del efecto parasitocida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleja cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp). *Veterinaria México* 31:189-194.
- Dixon, A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.

- Dixon, R.A., Achnine, L., Richard A., Dixon, P., Kota, C., Liu, M., Reddy, S., Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3:371-390.
- Esposito, E., Toso, R., Pressi G., Bramanti P., Meli R., Cuzzocrea S. 2009. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 381:93-105.
- Frick, F. 1976. Oxidative enzymes. *Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology*. E. Heitefuss, R. and Williams, P.H. (eds). New series 4:617-627.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Giorgi, A., Mingozi, M., Madeo, M., Speranza, G. Cocucci, M. 2009. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chemistry* 114:204–211.
- Gómez-Aguirre, Y., Zamilpa, A., González, M., Trejo-Tapia, G. 2012. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Industrial Crops and Products* 36:188-195.
- Gómez, G.A. 2011. Identificación estructural de compuestos mayoritarios en plantas silvestres de *Castilleja tenuiflora* Benth y su acumulación en cultivos de raíces *in vitro*. Tesis de doctorado. Ceprobi-IPN. Yautepec, Morelos, México.
- Gyurkovska, V., Alipieva, K., Maciuk, A., Dimitrova, P., Ivanovska, N., Haas, C., Bley T., Georgiev, M. 2011. Anti-inflammatory activity of Devil's claw *in vitro* systems and their active constituents. *Food Chemistry* 125:171-178.
- Harbone, J.B. y Simmonds, N.W. 1964. *Biochemistry of phenolic compounds*. Academic Press. London 101p
- Hee-Lee, J., Lee, J.Y., Kang, H.S., Jeong, C.H., Moon, H., Whang, W.K., Kim, C.J., Sim S. 2006. The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Archives of Pharmacal Research* 29:508-513.
- Herrera, A. M. 2010. Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en plantas de *Castilleja tenuiflora* Benth crecidas a diferente altitud. Tesis de Nivel Superior. Universidad Tecnológica de Tecámac. Tecámac, Estado de México. México 60p.

- Huang, Z.A., Jiang, D.A., Yang, Y., Sun, J.W., Jin, S.H. 2004. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* 42:357-364.
- Jeong, H., Koo, H., Na, H., Kim, M., Hong, S., Eom, J., Kim, K., Shin, T., Kim, H. 2002. Inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 production by aucubin through block ade of NF- $\kappa$ B activation in RBL-2H3 mast cells. *Cytokine* 18:252-259.
- Jez, J., Noel, J. 2002. Reaction mechanism of chalcone isomerase. *Journal of Biological Chemistry* 10:277:1361.
- Jiménez, E., Padilla, M., Reyes C., Espinoza L., Melendez E., Lira, Rocha, A. 1995. Iridoid glycoside constituents of *Castilleja tenuiflora*. *Biochemical Systematics and Ecology* 23:455-456.
- Kang, J., Wang, H., Liu, T., Chen, Y., Ueng, T. 1997. Modulation of cytochrome P-450 dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Food and Chemical Toxicology* 35:945-965.
- Kovacik, J., Klejdus, B., Backor, M., Repcaka, M. 2007. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science* 172:393-399.
- Khavari-Nejad, R.A., Najafi, F., Tofighi, C. 2009. Diverse responses of tomato to N and P deficiency. *International Journal Agriculture Biology* 11:209-213.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. 1987. Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. *Biology Society Transaction* 11:591-592.
- Lister, C.E., Lancaster, J.E., Walker, J.L. 1996. Developmental changes in enzymes biosynthesis in the skins of red and of flavonoid green apple cultivars. *Journal of Science Food and Agriculture* 71:313-330.
- Liu, W., Duan-Wei, Z., Da-Hui, L., Ming-Jian, G., Wen-Bing, Z., Wei-Jie, M., Te-Wu, Y., David, H. 2010. Influence of nitrogen on the primary and secondary metabolism and synthesis of flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* ramat. *Journal of Plant Nutrition* 33:240-254.
- López-Laredo, A.R., Medina, P.V., Sepúlveda-Jiménez, G., Salcedo-Morales, G., Trejo- Tapia, G. 2009. Comparative study of phenolics, flavonoids content and antioxidant activity in

wild and cultivated plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. II Congreso de radicales libres y estrés oxidativo. Taxco, Guerrero.

- Martínez, M.A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Medellín. 21-22.
- Martínez-Valverde I., Periago, M., Ros G. 2000. Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos de la Dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 50:1-11.
- Medina, P.V. 2008. Actividad antioxidante por DPPH, contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de plantas crecidas en invernadero de *Castilleja tenuiflora* Benth “hierba del cáncer”. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Culiacán. 62p.
- Mendes, A.E.M., Ferreira, L.P.C., Oliveira, R.G.S., Souza, A.E., Fernandes, Q.R. 2010. Características químicas de frutos da Quixabeira (*Bumelia sertorium* Mart.). Revista Verde (Mossoró-RN-Brasil). 5:05-08.
- Moreno-Escobar, J., Montiel, H., Villareal, O., Rodríguez, L. 2009. Actividad citotóxica y antioxidante de algunas especies pertenecientes a la familia Scrophulariaceae. XXXII Congreso Nacional de Farmacología. UAEM.
- Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, S., Satoh, S., Chiba, A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N., Sasaki, Y. 1997. Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves). The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. Mutation Research 388:7-20.
- Ohno, T., Inoue, M., Ogihara, Y., Saracoglu, I. 2002. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. Biology Pharmaceutical Bulletin 25:666-668.
- Olsen, K.M., Lea, U.S., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C. 2008. Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-trigger flavonoid synthesis. Journal of Plant Physiology 165:1491-1499.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y., Rothstein, S. J. 2008. Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. Journal of Experimental Botany 59: 2933-2944.
- Queiroz, M.B., Marcelino, N.B., Ribeiro, M.V., Espindola, L.S., Cunha, F.R., Silva, M.V. 2009. Development of gel with *Matricaria recutita* L. extract for topic application an evaluation of physical-chemical stability and toxicity. Latin American Journal of Pharmacy 28:574-579.

- Rapisarda, P., Fanella, F., Maccarone, E. 2000. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal Agriculture Food Chemistry* 48:2249-2252.
- Reddy, KJ. 2006. Nutrient Stress. En: K.V. Madhava R., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K. (eds.). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants* 6:187-217.
- Reuber, S., Jende-Strid, B., Wray, V., Weissenbôck, G., 1996. Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase. *Physiological Plant* 101:827-832.
- Rosas, R.G. 2007. Establecimiento del cultivo in vitro de *Castilleja tenuiflora* Benth. Tesis de maestría. Ceprobi-IPN. Dpto. de Biotecnología. Yautepec, Morelos, México. 85.
- Rzedowski, G.C. de J. Rzedowski (2001). *Flora fanerogámica del valle de México*. 2ª Ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de Biodiversidad, Michoacán.
- Saimaru, H., Orihara, Y. 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europea*. *Journal of Natural Medicine* 64:139-145.
- Shin, R., Howard, B. R., Schachtman, D. P. 2005. Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant and Cell Physiology* 46:1350-1357.
- Shohael, A.M., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., Lee, H.L., Paek, K., Y. 2006. Enhancement of Chutherosides production in embryogenic cultures of *Eletretrucoccus sessiflorus* in response sucrose-induced osmotic stress. *Procces Biochemistry* 41:512-518.
- Shoyama, Y., Matsumoto, M., Nishioka, I. 1986. Phenolic glucosides from diseased roots of *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*. *Phytochemistry* 25:1633-1636.
- Smejkal, K., Holubova, P., Zima, A., Muselik, J., Dvorska, M. 2007. Antiradical activity of *Paulownia tomentosa* (Scrophulariaceae) extracts. *Molecules* 12:1210-1219.
- Stewart, A.J., Chapman, W., Jenkins, G.I., Graham, I., Martin, T., Crozier A. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell and Environment* 24:1189-1197.

- Strissel, T., Halbwirth, H., Hoyer, U., Zistler, C., Stich, K., Treutter, D. 2005. Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biology* 7:677-685.
- Tank, C.D., Olmstead, G.R. 2008. From annuals to perennials: phylogeny of subtribe *Castillejinae* (Orobanchaceae). *American Journal of Botany* 95:608-625.
- Taiz, L., Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Universidad Jaume I., 3<sup>rd</sup>. ed. (Vol. 1). 580p.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P. N. 2007. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:313-322.
- Trejo-Tapia, G., Rosas-Romero, G., López-Laredo, A.R., Bermúdez-Torres, K., Zamilpa, Z. 2010. *In vitro* organ cultures of the cancer herb *Castilleja tenuiflora* Benth. as potential sources of iridoids and antioxidant compounds. In: *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*. Bentham Science Publishers, The Netherlands (En prensa).
- Valdez, R. 2011. Cultivo de brotes de *Castilleja tenuiflora* Benth. en un biorreactor de inmersión temporal: acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. 68p.
- Vermerris, W. y Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Ed. Ilustrada. Springer. 276p.
- Wagner, H., Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd ed. Springer Verlag . Berlin. 384p.
- Wang, C., Wang, S., Lin, J. 1991. Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Cancer Letters* 60:95-102.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., Wu, J.Y. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science* 170:853-858.
- Yuan Y., Chiu Li, W., Li, L. 2009. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage. *Planta* 230:1141-1153