



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *in vitro* DE *Randia* sp.  
COMO FUENTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**PAULINA BERNAL ARRIAGA**

ASESOR

**DRA. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ**

CO-ASESOR

**DRA. CARLA GARCÍA MORALES**



TOLUCA, MÉXICO JULIO 2020

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
1 INTRODUCCIÓN .....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Estrés oxidativo.....	13
2.2 Medicina tradicional y fitoterapia.....	14
2.3 Metabolitos secundarios .....	15
2.3.1 Compuestos fenólicos.....	19
2.3.2 Flavonoides.....	21
2.3.3 Mecanismos antioxidantes de los fenoles y flavonoides.....	23
2.4 Biotecnología .....	24
2.4.1 Biotecnología vegetal.....	25
2.4.2 Cultivo de tejidos vegetales .....	26
2.4.3 Cultivo de tejidos vegetales y producción de fenoles y flavonoides .....	26
2.5 Género <i>Randia</i> .....	28
2.5.1 Usos tradicionales.....	28
2.5.2 Estudios fitoquímicos .....	29
2.5.3 Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Randia</i> .....	30
3. JUSTIFICACIÓN .....	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	33
6. METODOLOGÍA.....	34
6.1 Material vegetal.....	35

6.2 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Randia</i> sp. ....	35
6.2 Evaluación de soluciones antioxidantes para controlar la oxidación de los explantes.....	36
6.3 Inducción de callo en explantes foliares y cotiledonares de <i>Randia</i> sp.....	37
6.4 Obtención de extractos a partir de diferentes tejidos de <i>Randia</i> sp. ....	38
6.5 Determinación de fenoles totales de los extractos de diferentes tejidos de <i>Randia</i> sp. ....	39
6.6 Determinación de flavonoides en los extractos de diferentes tejidos de <i>Randia</i> sp. ....	39
6.7 Análisis estadístico.....	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
7.1 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Randia</i> sp. ....	41
7.1.1 Cultivo aséptico de semillas de <i>Randia</i> sp.....	41
7.1.2 Efecto del lavado/inmersión de las semillas de <i>Randia</i> sp. en la germinación .....	42
7.1.3 Problemas de oxidación de los cultivos de <i>Randia</i> sp. ....	44
7.1.4 Inducción de callo en explantes de <i>Randia</i> sp. ....	47
7.2 Extracción de compuestos fenólicos de frutos y cultivos de callo de <i>Randia</i> sp .....	51
7.2.1 Obtención de los extractos.....	51
7.3 Cuantificación de fenoles totales en frutos de <i>Randia</i> sp.....	53
7.4 Cuantificación de flavonoides de frutos de <i>Randia</i> sp.....	54
7.5 Cuantificación de fenoles totales en los cultivos <i>in vitro</i> de <i>Randia</i> sp.....	56
7.6 Cuantificación de flavonoides en los cultivos <i>in vitro</i> de <i>Randia</i> sp.....	58
8. CONCLUSIONES .....	61
12. PERSPECTIVAS.....	62

10. REFERENCIAS.....	63
11. ANEXOS .....	69
Anexo 1 Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).....	69
Anexo 2 Curva de calibración con ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales .....	71
Anexo 3 Curva de calibración para la determinación de flavonoides .....	73
Anexo 4 Presentación de cartel en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. ...	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de fármacos y compuestos aislados o desarrollados a partir de productos naturales.....	17
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de oxidación de los explantes de cotiledón sometidos dos tratamientos antioxidantes, solución antioxidante con L-cisteína (CIS) o carbón activado (CA), incubados en oscuridad continua (O) o en fotoperiodo de 16 h (L), a los 8 d de cultivo.....	44
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento de extracción (%) de diferentes extractos de <i>Randia</i> sp.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa simplificado de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y su derivación del metabolismo primario.....	16
<b>Figura 2.</b> Fenol (también llamado ácido carbólico, ácido fénico, alcohol fenílico, ácido fenílico, fenilhidróxido, hidrato de fenilo, oxibenceno o hidroxibenceno) .....	19
<b>Figura 3.</b> Formas principales de compuestos fenólicos.....	20
<b>Figura 4.</b> Estructura básica de los flavonoides.....	21
<b>Figura 5.</b> Diagrama general de la metodología empleada para el establecimiento de los cultivos de <i>Randia</i> sp. <i>in vitro</i> , obtención de extractos de diferentes tejidos de la planta y caracterización fitoquímica..	34
<b>Figura 6.</b> Tejidos de <i>Randia</i> sp. A-C) Fruto; completo, semilla con pulpa y pericarpio; D) Plántulas crecidas <i>in vitro</i> ; E) Callos obtenidos <i>in vitro</i> liofilizados.....	35
<b>Figura 7.</b> Proceso de desinfección superficial de las semillas.....	36
<b>Figura 8.</b> Diagrama general del proceso de obtención de los extractos de <i>Randia</i> sp.....	38
<b>Figura 9.</b> Esquemas que ilustran los tipos de complejos que el $AlCl_3$ puede formar con ciertas flavonas y flavonoles en presencia o ausencia de HCl.....	40
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de contaminación (15 d) y germinación (60 d) de cultivos de semillas de <i>Randia</i> sp. para cada concentración de NaOCl evaluada.....	42

<b>Figura 11.</b> Cultivos de cotiledones de <i>Randia</i> sp. inoculados en medio ½ MS (1.5 mg L <sup>-1</sup> KIN + 2.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D) y bajo cuatro tratamientos antioxidantes, transcurridos 8 días de cultivo.....	45
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de inducción de callo en explantes foliares y cotiledonares de <i>Randia</i> sp. a los 30 días de cultivo, creciendo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de TDZ (T), BAP (B) ó KIN (K) en combinación con 2,4-D (D).....	47
<b>Figura 13.</b> Tejido callogénico inducido en explantes de hoja y cotiledón creciendo en medio MS a los 21 días de cultivo.....	48
<b>Figura 14.</b> Cultivos de callos provenientes de cotiledón creciendo en medio MS tras 60 días de cultivo.....	49
<b>Figura 15:</b> Cultivo de callo de <i>Randia</i> sp. creciendo en medio MS en el tratamiento K <sub>10</sub> D <sub>20</sub> a los 120 días de incubación.....	50
<b>Figura 16.</b> Extracto acuoso secado por liofilización del fruto completo de <i>Randia</i> sp.....	52
<b>Figura 17.</b> Contenido de fenoles totales en diferentes extractos de <i>Randia</i> sp.....	54
<b>Figura 18.</b> Contenido de flavonoides en diferentes extractos de <i>Randia</i> sp.....	55
<b>Figura 19.</b> Contenido de fenoles en extractos acuosos en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Randia</i> sp .....	57
<b>Figura 20.</b> Contenido de flavonoides en extractos acuosos en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Randia</i> sp .....	59

## RESUMEN

El ritmo de vida acelerado de los seres humanos en la actualidad nos expone a numerosos factores que pueden ocasionar estrés oxidativo a nuestro organismo como la contaminación, radiación UV, ingredientes de los alimentos procesados, entre otros. Estos factores pueden desencadenar mutaciones en el material genético teniendo consecuencias como la presencia de rasgos de envejecimiento prematuro, el desarrollo de enfermedades como el cáncer, cardiovasculares, inflamatorias y neurodegenerativas. Numerosos estudios sugieren que el consumo frecuente y a largo plazo de una dieta rica en polifenoles puede ofrecer protección para el organismo y prevenir el desarrollo de este y otro tipo de enfermedades. Las especies del género *Randia* son ampliamente utilizadas por sus cualidades antioxidantes y antiinflamatorias; los estudios fitoquímicos de varios órganos de estas plantas explican sus actividades en la medicina tradicional, a través de su alto contenido en polifenoles, flavonoides, taninos, saponinas y otros metabolitos secundarios. Sin embargo, la obtención de compuestos antioxidantes a través del uso de ejemplares completos tiene como consecuencia la disminución de las poblaciones silvestres, y también se ve limitado por algunos factores como la variabilidad en el contenido de metabolitos secundarios presentes en la planta dependiendo de su estado fisiológico y los factores de estrés a los que se encuentre expuesta, además, se requieren condiciones específicas para su cultivo fuera de su zona geográfica de origen. Como alternativa al cultivo de plantas completas, se puede utilizar una herramienta de la biotecnología vegetal conocida como cultivo de tejidos vegetales (CTV), utilizando sólo fragmentos de la planta y obteniendo grandes volúmenes de biomasa a partir de estos, la cual es capaz de producir un perfil fitoquímico uniforme de los metabolitos secundarios de interés identificados en la especie vegetal. Existen pocos estudios con referencia al cultivo *in vitro* de especies del género *Randia*, por lo que plantas de este género son excelentes candidatas para el establecimiento de un cultivo *in vitro* con potencial para la producción de fenoles y flavonoides.

A partir de plántulas germinadas *in vitro*, se obtuvieron explantes de hoja y cotiledón de *Randia* y fueron expuestos a diferentes tratamientos para la inducción de callo, utilizando las citocininas cinetina (KIN), bencilaminopurina (BAP) y tidiazurón (TDZ) en diferentes concentraciones (0-1.5 mg L<sup>-1</sup>) y en combinación con la auxina 2,4-D (0-2.0 mg L<sup>-1</sup>), obteniéndose altos porcentajes de inducción de callo en cada uno de los tratamientos evaluados, de los cuales se seleccionó el que contenía KIN (1.0 mg L<sup>-1</sup>) y 2,4-D (2.0 mg L<sup>-1</sup>) para la proliferación de los cultivos de callo al presentar un porcentaje de inducción del 80%, y alta friabilidad, lo que favoreció a la obtención de biomasa y la realización de estudios posteriores. De distintos tejidos de *Randia* se obtuvieron extractos utilizando diferentes solventes (agua, etanol, metanol y la combinación de estos). El significativamente mayor contenido de fenoles totales se determinó en los extractos hidroalcohólicos del fruto completo y plántulas *in vitro* (24 y 25 mg EAG g<sup>-1</sup>, respectivamente), y un contenido dos veces menor en los cultivos de callo (11 mg EAG g<sup>-1</sup>). En cuanto a los flavonoides presentes, se observó el mayor contenido en los extractos acuosos del fruto completo y cultivos de callo (5.2 y 3.3 mg EQ g<sup>-1</sup>, respectivamente). Los resultados del presente trabajo sugieren que los cultivos de callo *in vitro* de *Randia* sp. establecidos son una buena fuente de obtención de polifenoles, con alto contenido de compuestos de tipo flavonoide.

## 1 INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo, es un concepto adoptado en la actualidad y se refiere a un desequilibrio entre la producción y eliminación de los radicales libres debido a la incapacidad de la célula para brindar una competente respuesta antioxidante (Hussain *et al.*, 2016). Los radicales libres son moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo. Esto les confiere una capacidad de reacción muy elevada y se pueden formar a partir de diferentes moléculas, pero los derivados del oxígeno y del nitrógeno son los que tienen mayor importancia en el desarrollo de patologías humanas (Paredes & Fernández, 2002). El estrés oxidativo ocasiona principalmente el daño a macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos, por lo que se le ha relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas como aterosclerosis, diabetes, cáncer, neurodegeneración y envejecimiento (Ray *et al.*, 2013). Ante la incapacidad del organismo para regular el estrés oxidativo, la medicina sugiere el consumo de compuestos antioxidantes, estos pueden ser de origen sintético o natural. Algunos antioxidantes artificiales son butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) los cuales son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, aunque estudios recientes sugieren que podrían ser responsables de causar daño hepático e inducir carcinogénesis (Gandhimathi & Bai, 2013).

Por otro lado, en la búsqueda de alternativas para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, la población acude a la medicina tradicional, esto debido principalmente a la carencia de servicios de salud y a la pobreza. La medicina tradicional es asociada fuertemente a las plantas, éstas son el recurso más abundante, accesible y conocido. Por lo que, derivado de una demanda creciente en el consumo de productos naturales, en los últimos años se ha intensificado el estudio de las actividades biológicas aliadas a las plantas. Actualmente, se conoce que los efectos farmacológicos de las plantas medicinales se deben a sus constituyentes fitoquímicos. Estos compuestos, son conocidos como metabolitos secundarios, ya que son producidos por rutas de biosíntesis derivadas del metabolismo primario. Los metabolitos secundarios son clasificados, con base en

su estructura química, en alcaloides, saponinas, terpenos, lípidos, carbohidratos y compuestos fenólicos (Hussein & El-Anssary, 2018).

En particular, los compuestos fenólicos son utilizados por las plantas para su protección contra la radiación UV, en el control de los procesos de oxidación y ante el ataque de patógenos. Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que los fenoles poseen distintas bioactividades, tales como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, anticancerígeno, antidiarreico, entre otros, por lo que en la actualidad existe un creciente interés en la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de estos compuestos naturales (de Mello & Fasolo, 2014). Hasta la fecha, se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos en las plantas (Hussain *et al.*, 2016). De acuerdo con su estructura, los fenoles pueden ser clasificados en ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, cromonas y xantonas, estilbenos, lignanos y flavonoides. Estos últimos destacan por su elevado poder antioxidante (Hussein & El-Anssary, 2018). Los flavonoides, son el grupo más amplio de compuestos fenólicos, y son reconocidos por sus efectos antiinflamatorios, antialérgicos, antitrombóticos y propiedades vasoprotectoras, además de estar implicados en la inhibición de la formación de tumores y en la protección de la mucosa gástrica (Hussein & El-Anssary, 2018).

Se conoce que la presencia de metabolitos secundarios en las plantas depende de múltiples factores como el estado fisiológico de la planta, estacionalidad, fluctuaciones en las condiciones de clima y suelo, estrés por patógenos, radiación, exposición a metales pesados, humedad, etc. Pero en términos generales, la concentración de los compuestos es muy baja. Adicionalmente, la disponibilidad del material vegetal se ve limitada por inestabilidad política y laboral de los países productores, lo cual dificulta la obtención de compuestos de interés a escala comercial. Por otro lado, la mayoría de los compuestos que se encuentran en la naturaleza son difíciles de obtener vía síntesis química, debido a su gran complejidad y características estereoquímicas específicas (de Mello & Fasolo, 2014; Smetanska, 2018).

Afortunadamente, se puede emplear el cultivo de tejidos vegetales (CTV), herramienta de la Biotecnología que consiste en cultivar *in vitro*, cualquier fragmento de la planta en un medio estéril y bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. Se ha utilizado ampliamente para fines como micropropagación, cultivo de protoplastos, obtención de plantas libres de virus, selección de variedades, producción de metabolitos secundarios y cultivo de anteras o polen para la obtención de haploides (Kumar & Loh, 2012). Adicionalmente, la síntesis de fitoquímicos mediante el CTV no depende de factores medioambientales, ya que se pueden estandarizar las condiciones del cultivo *in vitro* del mismo modo que se cultivan bacterias u hongos para la obtención de antibióticos o aminoácidos, por lo que es posible controlar la concentración y el perfil fitoquímico individual, para obtener un producto uniforme (Smetanska, 2018).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo, es un concepto adoptado en la actualidad y se refiere a un desequilibrio entre la producción y eliminación de los radicales libres debido a la incapacidad de la célula para brindar una competente respuesta antioxidante (Hussain *et al.*, 2016). Los radicales libres son moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo. Esto les confiere una capacidad de reacción muy elevada y se pueden formar a partir de diferentes moléculas, pero los derivados del oxígeno y del nitrógeno son los que tienen mayor importancia en el desarrollo de patologías humanas (Paredes & Fernández, 2002). El estrés oxidativo ocasiona principalmente el daño a macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos, por lo que se le ha relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas como aterosclerosis, diabetes, cáncer, neurodegeneración y envejecimiento (Ray *et al.*, 2013). Adicionalmente, episodios de inflamación prolongada resultan en enfermedades crónicas severas como las mencionadas previamente (Hussain *et al.*, 2016). También, el estrés oxidativo es considerado un estímulo importante en el proceso de inflamación, ya que resulta en la síntesis y secreción de moléculas proinflamatorias como las citoquinas, el factor nuclear kappa B y la proteína activadora 1 (NF- $\kappa$ B/AP-1), además del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno (ERO) son compuestos importantes para los organismos aerobios, ya que participan en la regulación de la homeostasis celular, transducción de señales, expresión de genes y activación de receptores de membrana. Se generan naturalmente a partir de la respiración celular, así como en respuesta a la exposición de agentes xenobióticos, citoquinas o en consecuencia a una infección bacteriana (Turrens, 2003). Ante la incapacidad del organismo para regular el estrés oxidativo, la medicina sugiere el consumo de compuestos antioxidantes, estos pueden ser de origen sintético o natural. Algunos antioxidantes artificiales son butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) los cuales son ampliamente utilizados en la industria

alimenticia, aunque estudios recientes sugieren que podrían ser responsables de causar daño hepático e inducir carcinogénesis (Gandhimathi & Bai, 2013).

## **2.2 Medicina tradicional y fitoterapia**

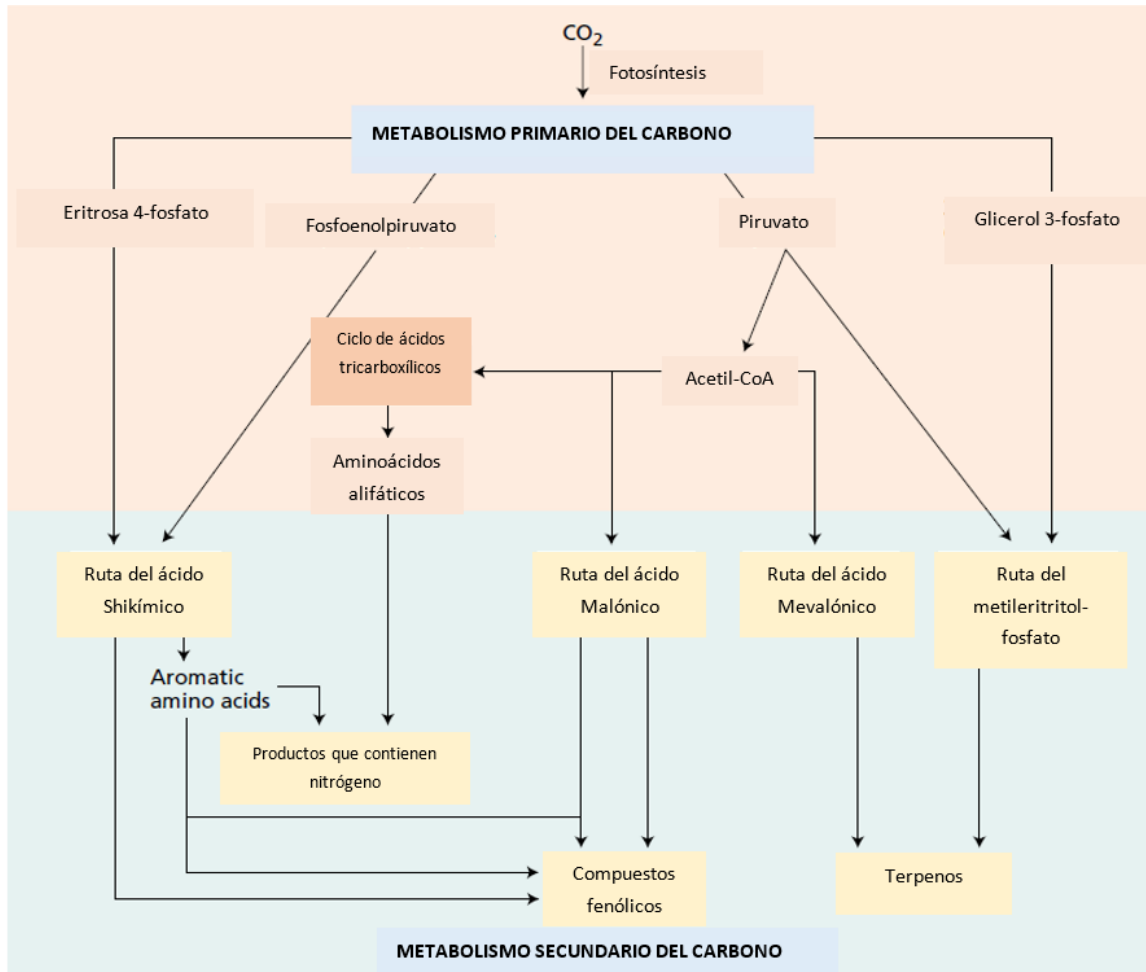
La historia de la humanidad también es la historia de las medicinas para el tratamiento y prevención de las enfermedades. La medicina tradicional es la forma más antigua del cuidado de la salud, basada en el conjunto de prácticas relacionadas con creencias y experiencias de diferentes culturas y provenientes de distintas épocas utilizadas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, sin brindar necesariamente explicaciones sobre su funcionamiento (Firenzuoli & Gori, 2007). La medicina tradicional, también conocida como medicina alternativa continúa siendo aplicada para tratar enfermedades físicas y mentales en muchos países (Yuan *et al.*, 2016). Debido a ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la necesidad de establecer los modelos para la investigación clínica y metodológica de los tratamientos de medicina tradicional que evalúen su efectividad y seguridad (Firenzuoli & Gori, 2007). La fitoterapia es el uso de plantas medicinales para preservar la salud; incluye prácticas de medicina tradicional y también el uso de extractos herbales estandarizados (Firenzuoli & Gori, 2007). En algunas zonas de escasos recursos, la medicina tradicional y herbaria no son una opción si no que constituyen las únicas formas de acceso a la salud (Bodeker & Bertrand, 2013). Varios tipos de medicina herbolaria son admitidos como auténticos sistemas de salud en países como India (Ayurveda y Unani), China (Medicina Tradicional China), Japón (Kampo), Rusia, y por supuesto México (herbolaria mexicana). De manera general, se ha observado que son usados como complementos de la medicina convencional debido a que el desarrollo de fármacos no ha presentado el éxito que se esperaba, y la población los percibe como tratamientos costosos y que representan un riesgo por sus efectos secundarios (Cragg & Newman, 2013; Yuan *et al.*, 2016).

Los compuestos de origen natural presentan una diversidad química única que resulta en una gran variedad en actividades biológicas, con ventajas significativas como su especificidad a ciertos blancos moleculares en el organismo (Cragg & Newman, 2013). Sin embargo, el uso generalizado de fitoterapias ha ocasionado que se asuman como tratamientos seguros mientras que existe escasez de información completa sobre la composición de los extractos que conforman los remedios a base de plantas, también se desconoce su posible interacción con la medicina de farmacia, por lo que se debe continuar con la profunda evaluación de las cualidades farmacológicas y de la seguridad de los extractos a base de plantas para minimizar el riesgo de uso y posibles efectos tóxicos (Yuan *et al.*, 2016).

Analizar el perfil fitoquímico de las plantas no es una tarea sencilla, sin embargo, actualmente se cuenta con métodos de identificación novedosos y herramientas avanzadas de extracción, cuantificación y purificación como la espectrofotometría, espectrometría de masas, cromatografía de alta eficiencia, resonancia magnética nuclear, etc. (Tsao & Deng, 2004).

### **2.3 Metabolitos secundarios**

Los principales compuestos aislados de origen vegetal son los metabolitos secundarios, llamados así debido a que no cumplen con un papel esencial en el crecimiento de las plantas, no obstante, les ayudan a interactuar con su entorno asegurando su sobrevivencia, ya que la mayoría de los metabolitos secundarios actúan como moléculas señal o de defensa (Sarker *et al.*, 2006). Los metabolitos secundarios se encuentran clasificados según su origen biosintético (Fig. 1) en alcaloides (a partir de aminoácidos), fenoles (ruta del ácido shikímico) y terpenos (ruta del ácido mevalónico), aunque su distribución puede estar restringida a una sola especie, género o familia (Taiz & Zeiger, 2003) .



**Figura 2** Mapa simplificado de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y su derivación del metabolismo primario. Tomado de Taiz & Zeiger (2003)

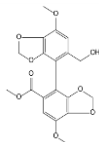
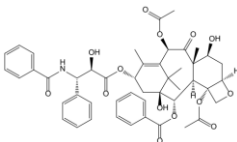
Se han fabricado gran variedad de fármacos a partir del aislamiento y purificación de compuestos naturales como artemisina, extraída de la planta *Artemisia annua*, la cual se usa como tratamiento contra la malaria y difiere de los antipalúdicos antes utilizados, como cloroquina, debido a su estructura de lactona sesquiterpénica que le confiere alta eficiencia, efecto rápido y baja toxicidad (Li, 2012). También los vinca-alcaloides originalmente identificados y extraídos de *Catharanthus roseus* son ampliamente utilizados en el tratamiento contra el cáncer por su capacidad anti-mitótica y anti-microtubular (Yuan *et al.*, 2016). En la Tabla 1 se observan otros ejemplos de metabolitos secundarios que han sido utilizados

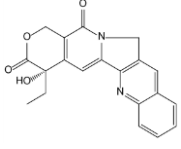
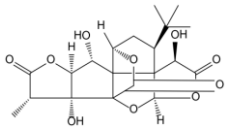
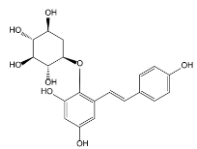
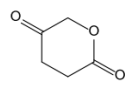
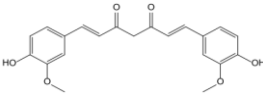
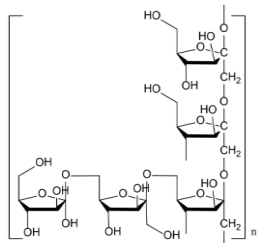
en la fabricación de medicamentos y que actualmente se comercializan resolviendo numerosos problemas de salud (Yuan *et al.*, 2016).

Los compuestos fitoquímicos con bioactividades pueden ser utilizados inmediatamente después de su aislamiento, o pueden ser mejorados una vez que su estructura química y mecanismo de acción son elucidados utilizando química combinatoria para obtener moléculas más eficientes, estables, o con mejores características farmacocinéticas (Cragg & Newman, 2013; Li, 2012). De esta manera, los derivados de artemisina (artesanato y dihidroartemisina) han sido utilizados para atender la malaria pero también se ha reportado su actividad citotóxica en 55 líneas celulares tumorales (Li, 2012).

Hoy en día, continúa la búsqueda de nuevas y mejores fuentes de obtención de compuestos naturales con bioactividades. De los fármacos anti-cáncer aprobados, entre 1940 y 2002, el 54% fueron derivados de compuestos naturales o fueron inspirados en el conocimiento relacionado con ellos, además, en las últimas dos décadas, el 64% de los nuevos fármacos antihipertensivos, fueron originados a partir de la estructura de productos naturales (Cragg & Newman, 2013).

**Tabla 2.** Ejemplos de fármacos y compuestos aislados o desarrollados a partir de productos naturales. Tomado de Yuan y col., (2016)

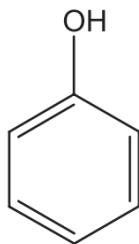
Origen (Planta)	Fármaco o compuesto	Estructura química	Efecto
<i>Schisandra chinensis</i>	Schisandrina C, biciclol, bifendato	 biciclol	Hepatoprotector, antiviral hepatitis B
<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol, docetaxel	 taxol	Antitumoral

<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina, irinotecán y topotecán	 camptotecina	Antitumoral
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgólido B		Infarto cerebral
<i>Polygonum multiflorum</i>	Glucósido de estilbeno		Demencia vascular
<i>Ranunculus ternatus</i>	Ternatólido		Antituberculosis
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina		Hipolipemiente
<i>Ophiopogon japonicus</i>	Polisacárido MDG-1		Protección de las células miocárdicas

La obtención de fitofármacos a partir de los metabolitos secundarios de plantas completas representa un reto debido a que la composición fitoquímica de las plantas es variable, dependiendo de numerosos factores como la especie, el ejemplar, la parte anatómica utilizada en el remedio, además de las condiciones de cosecha y postcosecha como la estacionalidad y factores de estrés a los que la planta esté expuesta (patógenos, radiación UV, sequía, inundación, contaminantes, etc). Esta alta variabilidad puede tener efectos secundarios no deseados en los usuarios como reacciones alérgicas y presentando resultados clínicos contradictorios (de Mello & Fasolo, 2014; Smetanska, 2018).

### 2.3.1 Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático benceno. El fenol (Fig. 2) es la estructura en la que se basa toda esta familia de compuestos (Vermerris & Nicholson, 2013).

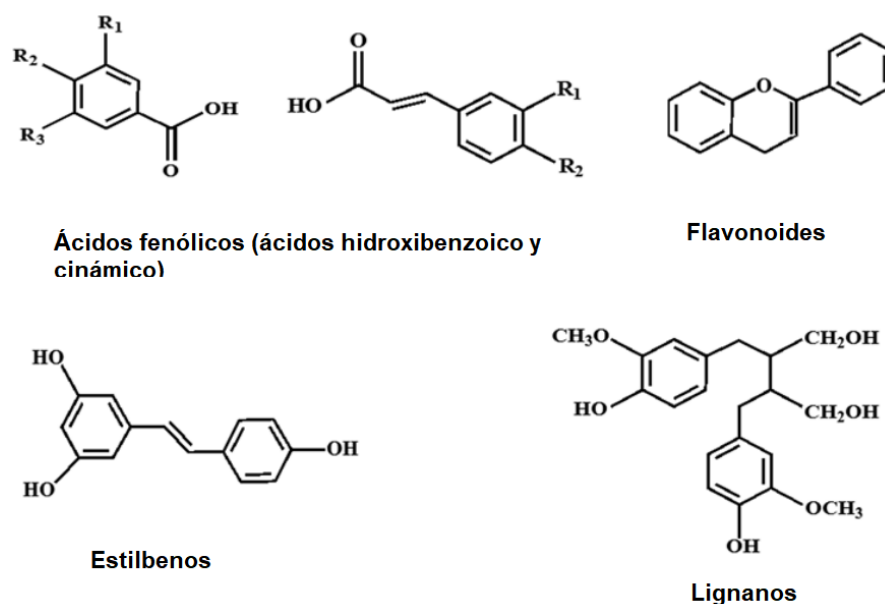


**Figura 2.** Fenol (también llamado ácido carbólico, ácido fénico, alcohol fenílico, ácido fenílico, fenilhidróxido, hidrato de fenilo, oxibenceno o hidroxibenceno). Tomado de Vermerris & Nicholson (2013).

Debido a la presencia del anillo aromático el hidrógeno del hidroxilo fenólico es lábil, ocasionando que los fenoles se comporten como ácidos débiles y confiriéndoles cualidades antioxidantes (Vermerris & Nicholson, 2013). Por otro lado, los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos de benceno (Vermerris & Nicholson, 2013).

De acuerdo con su estructura, los fenoles pueden ser clasificados (Fig. 3) en ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, cromonas, xantonas, estilbenos, lignanos y

flavonoides (Hussein & El-Anssary, 2018). Los compuestos de tipo flavonoide destacan por su elevado poder antioxidante (Hussein & El-Anssary, 2018).



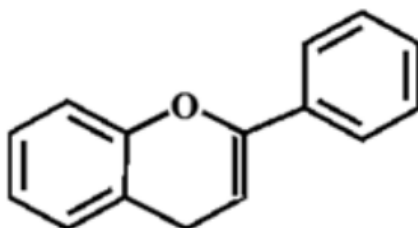
**Figura 3.** Formas principales de compuestos fenólicos: Los ácidos fenólicos comprenden un tercio del total de compuestos que se conocen, se encuentran en todas las especies vegetales, pero principalmente en frutos ácidos. Los flavonoides son los más abundantes en nuestra dieta y su estructura clásica son dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos formando un heterociclo oxigenado. Los estilbenos pueden actuar como fitoalexinas anti-fúngicas y son sintetizados ante infecciones o heridas de la planta. Los lignanos son compuestos difenólicos que contienen una estructura de 2,3-dibencilbutano que se forma por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico, se sintetizan y se depositan donde ocurre una lesión. Tomado de Pandey & Rizvi, (2009).

En la naturaleza, los compuestos fenólicos son utilizados por las plantas para su protección contra la radiación UV, en el control de los procesos de oxidación y ante el ataque de patógenos, mientras que otorgan características organolépticas a los alimentos como el amargor, astringencia, aroma, color, etc. Estas propiedades se modifican a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento del alimento y su madurez (Pandey & Rizvi, 2009). Hasta la fecha, se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos en las plantas (Hussain *et al.*, 2016).

Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que los fenoles poseen distintas bioactividades, tales como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, anticancerígeno, antidiarreico, entre otros, por lo que en la actualidad existe un creciente interés en la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de estos compuestos naturales (de Mello & Fasolo, 2014). Una dieta rica en compuestos fenólicos se ha correlacionado con la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, desarrollo de cáncer, entre otras (Pandey & Rizvi, 2009).

### 2.3.2 Flavonoides

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en los alimentos de origen vegetal que consume el ser humano y comparten una estructura básica común (Fig. 4) que consiste en dos anillos aromáticos, unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (Pandey & Rizvi, 2009; Vermerris & Nicholson, 2013).



**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides. Tomado de Pandey & Rizvi (2009)

Los flavonoides se pueden dividir en varias clases según el nivel de oxidación del anillo central (anillo c), siendo las especies más comunes las antocianinas, flavonas y flavonoles (Hussein & El-Anssary, 2018). Los flavonoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, sin embargo, tienen mayor presencia en las plantas superiores y en los tejidos jóvenes (Hussein & El-Anssary, 2018). Con más de 4000 variedades identificadas, los flavonoides, son el grupo más

estudiado de los compuestos fenólicos, y su función en las plantas es proveer de atractivos colores a flores, frutos y hojas (Pandey & Rizvi, 2009), mientras que los estudios de su actividad en organismos vivos han demostrado que poseen importantes efectos antiinflamatorios, antialérgicos, antitrombóticos y propiedades vasoprotectoras, además de estar implicados en la inhibición de la formación de tumores y en la protección de la mucosa gástrica (Hussein & El-Anssary, 2018). La búsqueda de alternativas terapéuticas para pacientes con cáncer continúa siendo una prioridad para la medicina debido a que la quimioterapia convencional produce efectos secundarios dolorosos debido a su carácter inespecífico e invasivo. Hoy por hoy, tras numerosos estudios, se reconoce la actividad antitumoral de los flavonoides; las flavonas wogonina, baicalina y baicaleína extraídas de plantas del género *Scutellaria* han mostrado actividad citotóxica y antitumoral específica contra líneas celulares de mieloma humano y sarcomas creciendo en modelos murinos (Li-Weber, 2009). Por otro lado, flavopiridol es un medicamento que se comercializa actualmente, derivado de los flavonoides de *Dysoxylum bineariferum* (Syn. *Dysoxylum gotadhora*) y se receta a pacientes que sufren de linfomas y leucemia (Tungmunnithum *et al.*, 2018).

Anteriormente, las mujeres menopáusicas recibían terapia hormonal basada en estrógenos de origen sintético, hasta que se descubrieron sus peligrosos efectos secundarios, entre ellos, el aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de útero, seno y ovario. Se encontró como alternativa utilizar isoflavonas como la genisteína, la cual puede ser consumida como un suplemento alimenticio y es recomendada principalmente a las mujeres que padecen menopausia ligada a trastornos metabólicos (Tungmunnithum *et al.*, 2018).

Muchas de las actividades protectoras de los flavonoides se atribuyen a su capacidad para transferir electrones, frenar cadenas de oxidación causadas por radicales libres y fungir como excelentes quelantes (Smetanska, 2018).

### 2.3.3 Mecanismos antioxidantes de los fenoles y flavonoides

Los mecanismos antioxidantes de los compuestos fenólicos son diversos, *e. g.*, los fenoles participan en la eliminación directa de radicales libres y en la quelación de metales como  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (catalizadores en la formación de radicales  $\bullet\text{OH}$ ), así como en la inhibición de enzimas involucradas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), dando protección a la defensa antioxidante existente, y han mostrado capacidad para frenar las reacciones en cadena de la lipoperoxidación (de Mello & Fasolo, 2014). Por otro lado, los compuestos fenólicos, promueven la síntesis de enzimas antioxidantes o detoxificantes mediante la activación de factores de transcripción como NRF2 (de Mello & Fasolo, 2014; Fainstein, 2007). Respecto al carácter antiinflamatorio de los compuestos fenólicos, los estudios muestran que algunos polifenoles modulan la actividad de las enzimas metabolizadoras del ácido araquidónico como la ciclooxigenasa, lipoxigenasas y óxido nítrico sintetasa. La inhibición de estas enzimas tiene como consecuencia, una reducción en la síntesis de ácido araquidónico, del que derivan prostaglandinas, leucotrienos y óxido nítrico, los cuales son mediadores clave de la inflamación, contribuyendo así a la prevención del desarrollo de enfermedades (Hussain *et al.*, 2016).

Sin embargo, la presencia de metabolitos secundarios en las plantas depende de múltiples factores y aunado a ello la concentración de los compuestos es muy baja. Adicionalmente, la disponibilidad del material vegetal se ve limitada por inestabilidad política o laboral de los países productores. Por otro lado, la mayoría de los compuestos que se encuentran en la naturaleza son difíciles de obtener vía síntesis química, debido a su gran complejidad (de Mello & Fasolo, 2014; Smetanska, 2018). Todo esto dificulta la obtención de compuestos de interés a escala comercial. Afortunadamente, se pueden emplear herramientas de la biotecnología para su obtención.

## 2.4 Biotecnología

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) define a la biotecnología como “*La aplicación de la ciencia y la tecnología a los organismos vivos, así como a sus partes, productos y modelos, para alterar materiales vivos o no vivos para la producción de conocimiento, bienes y servicios*” (OECD, 2013). Es decir, es conocida como la disciplina que hace uso de organismos vivos para la fabricación de productos o conocimientos para el beneficio del ser humano.

El término biotecnología se refiere a una colección creciente de técnicas, basadas en la biología molecular y celular, para analizar y manipular componentes moleculares de la vida que finalmente sirvan para producir nuevos fármacos, alimentos funcionales, nuevas fuentes de energía, etc. (Hilgartner, 2001). La biotecnología ha acompañado a la humanidad desde sus primeros esfuerzos por domesticar a las plantas mediante siembra de los mejores granos y a los animales a través de las cruces entre los ejemplares más grandes y sanos. También se considera como biotecnología a la obtención accidental de los primeros productos fermentados como el vino, el yogurt y el queso, aunque el proceso de fermentación no fue descrito sino hasta 1800 con el trabajo de Louis Pasteur (Smith, 2012). De manera similar, se conocen antecedentes de la biotecnología médica; en 1928, Alexander Flemming fue capaz de extraer penicilina del mohó (*Penicillium notatum*) surgiendo así el primer antibiótico, el cual poseía mejor efectividad que los tratamientos utilizados hasta ese momento (Tan & Tatsumura, 2015).

Después de la segunda guerra mundial, se contaba con un amplio entendimiento de la biología molecular, no sólo como una ciencia para entender la naturaleza, sino como una herramienta que permite al ser humano modificarla y aprovecharla. Hacia finales de los años 70 el gremio científico había elucidado como los genes contienen la información necesaria para crear proteínas con estructuras específicas, habían descubierto también enzimas capaces de cortar, unir y extender fragmentos de ácido ribonucleico (ADN); este fue el escenario para el

nacimiento de la tecnología de ADN recombinante con lo que se definió el comienzo de la biotecnología moderna (Hilgartner, 2001).

Debido a su carácter multidisciplinario, en el presente y el futuro, se espera que la biotecnología resuelva en gran medida los problemas que aquejan a la humanidad, ya que actualmente, la biotecnología cuenta con gran potencial para producir cantidades prácticamente ilimitadas de sustancias de las que nunca se había dispuesto con anterioridad, con un costo de producción mucho menor comparado con los métodos convencionales. Esto es posible debido al uso de nuevas y mejores materias primas que se encuentran abundantemente en la naturaleza y son económicas. A través de la biotecnología, se pretenden resolver hoy en día numerosos problemas de contaminación, enfermedades crónicas y hereditarias, insuficiencia de recursos alimentarios y de energía, etc (Bolívar, 2017).

### **2.4.1 Biotecnología vegetal**

La biotecnología vegetal (BV) es una herramienta para el desarrollo de nuevas variedades de plantas o estrategias de cultivo. La BV es el conjunto de técnicas utilizadas para mejorar las características de las plantas en función de las necesidades agrícolas y de ornamentación, o de algunas problemáticas sociales que pueden ser abordadas aprovechando las cualidades de las plantas. Esta disciplina comprende conocimientos de diversas áreas de la ciencia como bioquímica, agronomía, biología celular y genética. Con ayuda de la BV se pueden obtener nuevos productos y modificar las características de otros, con el objetivo de aumentar su productividad, volumen y resistencia a condiciones adversas como las generadas por bacterias, virus, hongos, sequía, salinidad, frío y calor (Renneberg *et al.*, 2017). La BV es un conjunto de técnicas utilizadas para adaptar las plantas a necesidades u oportunidades específicas. Las situaciones que combinan múltiples necesidades y oportunidades son comunes. Por ejemplo, se puede requerir un solo cultivo para proporcionar alimentos sostenibles y una nutrición saludable, protección del medio ambiente y oportunidades de empleo e

ingresos. Sin embargo, encontrar o desarrollar plantas adecuadas suele ser un desafío muy complejo (Bhatia & Sharma, 2015; Renneberg *et al.*, 2017). De entre las herramientas de la BV se encuentra el cultivo de tejidos que permite resolver varios de los problemas previamente abordados.

### **2.4.2 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se basa en una estrategia alternativa de propagación vegetativa en la que las células vegetales de un explante (hojas, tallos, anteras, polen, meristemas, etc.) cultivado en un medio aséptico de composición definida, son capaces de originar una planta completa bajo ciertos estímulos. Esta característica se conoce como totipotencialidad celular (Govil & Gupta, 1997). Dentro de las numerosas aplicaciones del CTV se encuentran la producción de metabolitos secundarios, mejoras de cultivares de interés agronómico, conservación de germoplasma, producción de nuevas variedades libres de enfermedades, fabricación de semillas artificiales, biofármacos, síntesis de proteínas recombinantes y de vacunas o anticuerpos utilizando la maquinaria de la célula vegetal (Bhatia & Sharma, 2015). Además, las técnicas de cultivo *in vitro* son una plataforma para realizar estudios de biología molecular o la modificación genética de plantas (Bhatia & Sharma, 2015). Para el 2018, se reportó que la industria del CTV tenía un valor estimado de 280 mil millones de dólares, representando más de la mitad del valor total de la industria agrícola mientras que la demanda de productos derivados de CTV continúa en aumento año con año (Smetanska, 2018), su gran popularidad se atribuye a su potencial para automatizar casi por completo los procesos de producción reduciendo el tiempo y costos de manufactura (Bhatia & Sharma, 2015).

### **2.4.3 Cultivo de tejidos vegetales y producción de fenoles y flavonoides**

Numerosos estudios a partir de cultivos *in vitro* de especies vegetales han reportado rendimientos mayores a la planta completa en la obtención de

compuestos fenólicos, en la mayoría de los casos, es necesario el uso de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) para el establecimiento del cultivo y la síntesis de los metabolitos de interés. Algunos ejemplos del potencial del CTV para la obtención de metabolitos con altos rendimientos y en menor tiempo de producción, respecto a la planta de origen son los siguientes: Bandekar & Lele (2014) establecieron cultivos de células en suspensión de *Ficus benghalensis* empleando 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 1-naftalenacético (ANA), con una producción de quercetina, de 0.31 mg/g peso seco (PS), siendo 20 veces mayor el contenido con respecto al encontrado en hojas de la planta madre. La quercetina pertenece a los flavonoides y se distingue por su elevada capacidad antioxidante además de presentar un tiempo de permanencia en circulación (10 horas) muy superior al mostrado por otros flavonoides (Sánchez-Gallego, 2009). En un estudio reportado por Thanonkeo & Panichajakul (2006), obtuvieron un contenido de daidzeína y genisteína 34 veces mayor en cultivos de callo (masa celular indiferenciada), creciendo con 0.46 μM (~0.1 mg L<sup>-1</sup>) de kinetina (KIN) y 4.5 μM (~1.0 mg L<sup>-1</sup>) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), respecto a lo encontrado en raíces de la planta madre de *Pueraria candollei*. Los cultivos de 24 días de edad produjeron 5.12 y 2.77 mg g<sup>-1</sup> de biomasa en peso seco (PS) de daidzeína y genisteína, respectivamente. Daidzeína y genisteína pertenecen a una subclase de flavonoides conocida como isoflavonas, que asemejan la estructura del estrógeno en humanos.

En un trabajo realizado por Yang y col, (2009) con *Glycyrrhiza inflata* demostraron que cultivos de células en suspensión creciendo en medio suplementado con 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 120 mM de nitrógeno (amoníaco y nitrato de amonio, 1:1.8), además de los RCV: 2,4-D, ANA, y BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup>), son capaces de producir flavonoides con un máximo de 95.7 mg equivalentes de rutina L<sup>-1</sup> (mgER L<sup>-1</sup>), a los 21 días de cultivo, representando 6 mg g<sup>-1</sup> PS (~0.6%), mientras que en la planta el contenido de flavonoides es cerca del 3%. Sin embargo, las plantas de *G. inflata* requieren tener una edad de por lo menos tres años, para que puedan ser cosechadas con fines terapéuticos (Yang *et al.*, 2009), por lo que la tasa de producción de flavonoides a través del cultivo *in vitro* podría considerarse una

opción viable. Rutina es una forma glicosidada de quercetina, ambas constituyen agentes quelantes muy potentes de los metales de transición lo cual les confiere una elevada actividad antioxidante.

El establecimiento de cultivos *in vitro* de callo representa una alternativa para la producción de metabolitos secundarios, la micropropagación, el estudio de los mecanismos moleculares y la transformación genética de plantas leñosas (Knyazev *et al.*, 2018). A diferencia de las herbáceas, las plantas leñosas han sido escasamente estudiadas, pero existe un elevado interés en el establecimiento de cultivos *in vitro* de especies arbóreas, ya que su propagación por los métodos convencionales es difícil y prolongada, lo que limita su uso como fuente de metabolitos secundarios.

## **2.5 Género *Randia***

El género *Randia* (Rubiaceae) está conformado por 90 especies aproximadamente, cuya distribución en el continente americano va desde Estados Unidos hasta Argentina (Gustafsson & Persson, 2002). Son árboles, arbustos o bejucos frecuentemente armados con espinas pareadas, son dioicos de hojas opuestas y frutos en bayas subglobosas a elipsoidales, generalmente amarillentas, anaranjadas a pardas de pericarpo coriáceo a leñoso cuya pulpa es carnosa y frecuentemente de color pardo oscuro a negro. Las semillas son elipsoidales a subcirculares, comprimidas y lisas (Ulloa *et al.*, 2012). En México se pueden encontrar 40 especies de *Randia* creciendo a lo largo de todo el país de las cuales, 23 son endémicas (Borhidi & Diego-Pérez, 2004).

### **2.5.1 Usos tradicionales**

El uso etnobotánico de las especies de *Randia*, reporta que las plantas se utilizan para atender diversas afecciones respiratorias, gastrointestinales, renales, parasitarias, cardiovasculares (Bye *et al.*, 1991; Hossain *et al.*, 2016; Ritesh *et al.*,

2011; Satpute *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010), además de su uso como analgésico (Pérez-Espinosa *et al.*, 2003; Tilloo *et al.*, 2012), cicatrizante, antibiótico, (Gallardo-Casas *et al.*, 2012; Ritesh *et al.*, 2011), anti inflamatorio (Mahabaleshwara *et al.*, 2016) y como antídoto en casos de mordeduras de serpiente y picaduras de animales ponzoñosos (Gallardo-Casas *et al.*, 2012; Méndez *et al.*, 2012). Las bioactividades están asociadas a diversos compuestos fitoquímicos.

## 2.5.2 Estudios fitoquímicos

Los estudios fitoquímicos de las especies de *Randia* revelan un contenido mayoritario de alcaloides, saponinas, fenoles, flavonoides, taninos y glucósidos, los cuales podrían ser responsables de las diversas actividades biológicas de estas plantas (Bye *et al.*, 1991; Gulnaz *et al.*, 2014; Hossain *et al.*, 2016; Juárez-Trujillo *et al.*, 2018; Mahabaleshwara *et al.*, 2016; Ritesh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2010). Algunas bioactividades conferidas a las especies del género *Randia* han sido comprobadas a través de diferentes estudios. Satpute y col, (2009) demuestran que la fracción clorofórmica (100 mg kg<sup>-1</sup> PS) de un extracto del fruto de *Randia dumentorum* posee actividad inmunomoduladora en roedores. Por otro lado, Tilloo y col., (2012), reportan que un extracto de éter de petróleo del endocarpo de *Randia spinosa* es capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Mientras que se ha comprobado la actividad antioxidante de los fenoles y flavonoides presentes en el extracto etanólico de hojas de *Randia uliginosa*, así como la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. mutans*, *A. niger* y *C. albicans* (Gulnaz *et al.*, 2014). Otro estudio, reporta el efecto citoprotector del extracto etanólico del fruto de *Randia aculeata*, al suministrar veneno de *Bothrops asper* y *Crotalus simus* en el músculo esquelético y de miocardio en un modelo murino (Gallardo-Casas *et al.*, 2012). Una evaluación de la actividad antihelmíntica y antidiarreica de la fracción clorofórmica del extracto de la planta completa de *R. uliginosa* evidenció una respuesta similar a la de piperazina y loperamida,

medicamentos usados convencionalmente para el tratamiento de estas afecciones (Hossain *et al.*, 2016).

### **2.5.3 Cultivo *in vitro* del género *Randia***

Respecto al cultivo *in vitro* del género *Randia* se ha reportado la micropropagación de *R. dumetorum* a partir del cultivo de meristemos apicales creciendo en medio Murashige & Skoog (1962; MS) suplementado con BAP ( $1\text{ mg L}^{-1}$ ) y ANA ( $1\text{ mg L}^{-1}$ ) obteniendo un máximo de 12.7 brotes, los cuales fueron posteriormente enraizados con  $1\text{ mg L}^{-1}$  de ácido indolbutírico (AIB). Las plantas presentaron una sobrevivencia del 70%, luego de ocho semanas de aclimatación (Begum *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha reportado la inducción de callo a partir de explantes de hipocótilo y cotiledón de *R. echinocarpa*, en medio MS conteniendo  $1\text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $1\text{ mg L}^{-1}$  de ANA, obteniendo un callo con elevada producción de biomasa y textura friable (Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020). De los callos, se obtuvieron extractos metanólicos determinando la actividad antioxidante (DPPH) ( $0.49\text{-}56\mu\text{M}$  equivalentes de trolox  $\text{g}^{-1}$ ). Sin embargo, de nuestro conocimiento, no existen reportes sobre la producción de metabolitos secundarios a través del cultivo *in vitro*, en todo el género *Randia*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidativo es una de las causas que contribuyen en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades crónicas como hipertensión, cáncer, diabetes, etc, así como del envejecimiento prematuro, por lo que existe una necesidad de encontrar nuevas y mejores fuentes de obtención de compuestos antioxidantes, ya que los de origen sintético pueden desencadenar consecuencias en la salud por su uso prolongado, y no son tan eficaces y diversos como los de origen vegetal. Éstos últimos, actúan empleando numerosas estrategias antioxidantes y poseen otras cualidades protectoras para el organismo que ayudan a prevenir o tratar múltiples padecimientos. Los estudios fitoquímicos de las especies del género *Randia* son numerosos y mencionan la presencia de fenoles con actividad antioxidante, por lo que el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Randia* sp., permitirá obtener una producción controlada de los compuestos fenólicos y flavonoides de esta planta.

## 4. HIPÓTESIS

*Randia* sp. produce compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides, por lo que cultivos *in vitro* de la especie vegetal mantendrán la capacidad de síntesis de este tipo de compuestos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

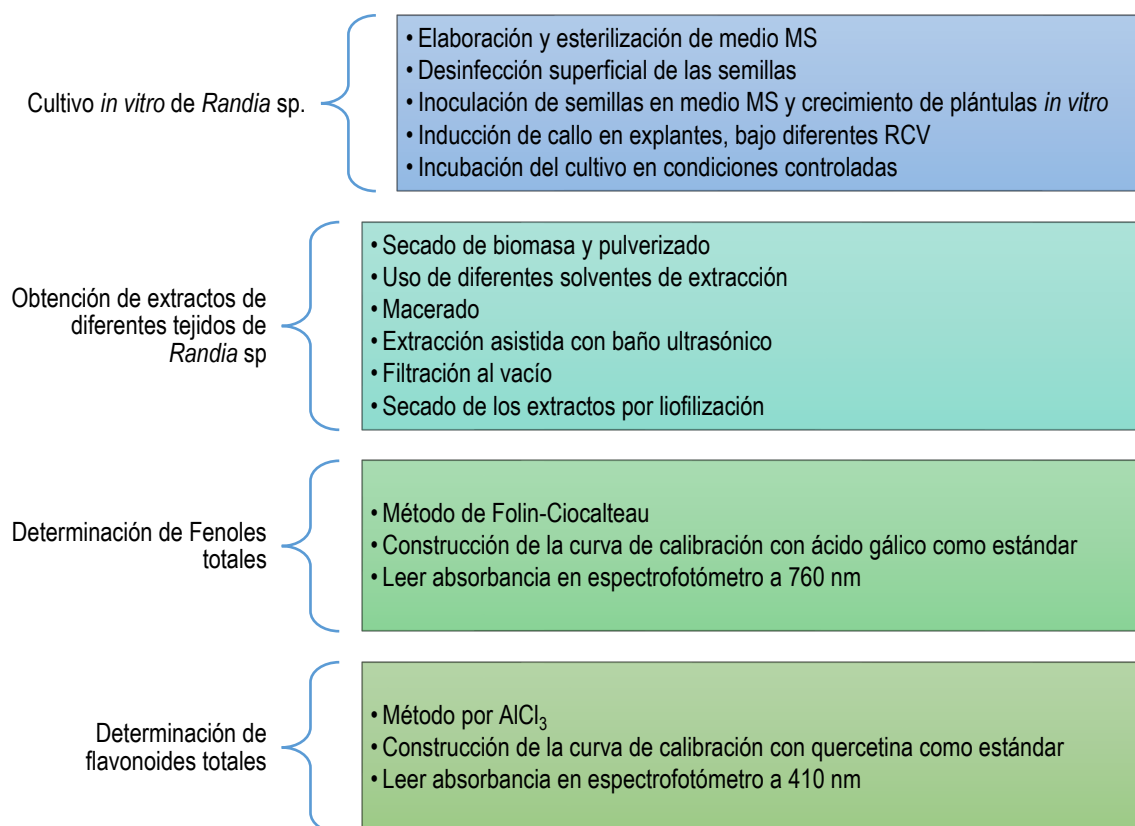
Establecer las condiciones para la obtención de cultivos *in vitro* de *Randia* sp. con potencial de síntesis de compuestos fenólicos

### 5.2 Particulares

1. Establecer las condiciones de germinación de semillas de *Randia* sp. bajo condiciones asépticas
2. Evaluar diferentes explantes en la inducción de callo (hojas y cotiledones) en *Randia* sp.
3. Evaluar distintos reguladores de crecimiento vegetal (KIN, BAP, tidiazurón y 2,4-D) en la inducción de callo en explantes de *Randia* sp.
4. Evaluar diferentes solventes (agua, etanol-agua y metanol-agua) en la obtención de extractos de diferentes tejidos (fruto y cultivos *in vitro*) de *Randia* sp., conteniendo fenoles y flavonoides.

## 6. METODOLOGÍA

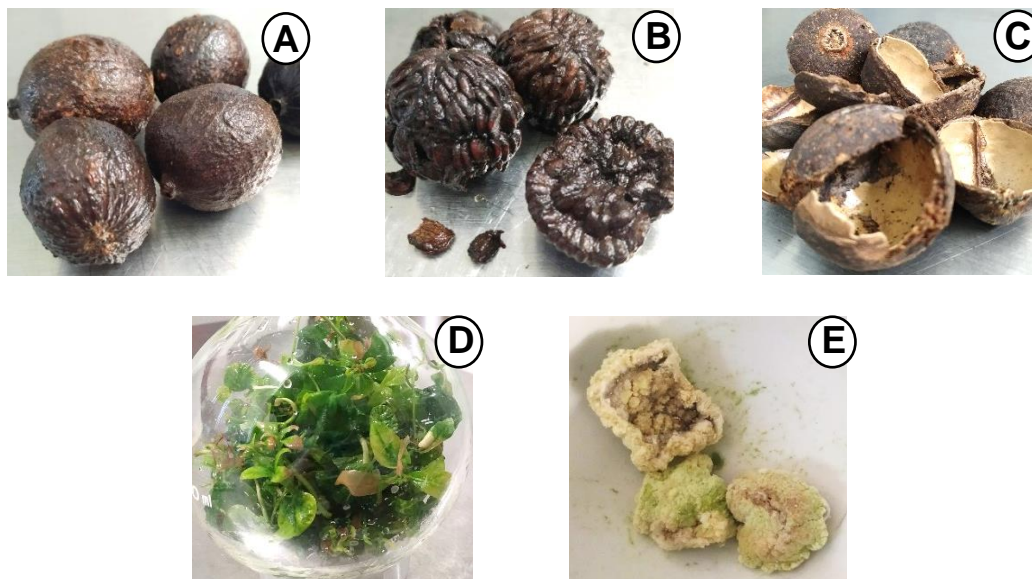
La metodología del presente estudio se puede dividir en cuatro etapas (Fig. 5), iniciando con el establecimiento de cultivos asépticos de semillas de *Randia* sp., evaluando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Posteriormente, las plántulas germinadas *in vitro* en medio Murashige & Skoog (MS; 1962) fueron fuente de explantes de hojas y cotiledones para la inducción de callo, utilizando diferentes concentraciones de las citocininas TDZ, BAP y KIN en combinación con la auxina 2,4-D. Por otro lado, se elaboraron extractos de los tejidos de fruto completo, plántulas *in vitro* y cultivos de callo generados *in vitro* de *Randia* sp. (Fig. 6), empleando solventes polares (agua, etanol y metanol). Posteriormente, los extractos fueron caracterizados, determinando su contenido de fenoles totales y flavonoides mediante espectrofotometría.



**Figura 5.** Diagrama general de la metodología empleada para el establecimiento de los cultivos de *Randia* sp. *in vitro*, la obtención de extractos de diferentes tejidos de la planta y la caracterización fitoquímica de estos.

## 6.1 Material vegetal

Frutos maduros de *Randia* sp. fueron colectados en el Estado de Veracruz, México. Los frutos fueron lavados y almacenados en un ambiente seco y fresco para los diferentes estudios del cultivo *in vitro* y la caracterización fitoquímica.



**Figura 6.** Tejidos de *Randia* sp. A-C) Fruto; completo, semilla con pulpa y pericarpio; D) Plántulas crecidas *in vitro*; E) Callos obtenidos *in vitro* liofilizados.

## 6.2 Establecimiento del cultivo *in vitro* de semillas de *Randia*

**sp.**

Las semillas fueron extraídas del fruto y desinfectadas superficialmente empleando una solución de detergente al 2% (p/v) durante 15 min, seguido de su inmersión en solución de etanol al 70% (v/v) por 30 s, y finalmente en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6, 1.2 ó 1.8% (v/v) por 20 min, retirando el exceso de cloro con lavados de agua destilada estéril (Fig. 7).

Una vez desinfectadas, las semillas fueron pre-tratadas para la germinación con su lavado/inmersión en agua destilada estéril durante 30 min, posteriormente

fueron inoculadas bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar en frascos conteniendo medio de cultivo MS a la mitad de su concentración, suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2 g L<sup>-1</sup> de fitagel, y solución antioxidante (150 mg L<sup>-1</sup>, ácido ascórbico, 100 mg L<sup>-1</sup>, ácido cítrico y 500 mg L<sup>-1</sup> PVP), el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.75±0.5 y posteriormente fue esterilizado a 121°C durante 15 min (Anexo 1). Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz a 25±2 °C. En los cultivos, se registró el porcentaje de contaminación y el número de semillas germinadas. Las plántulas germinadas *in vitro*, fueron fuente de explantes de hoja y cotiledón para el ensayo de inducción de callo.

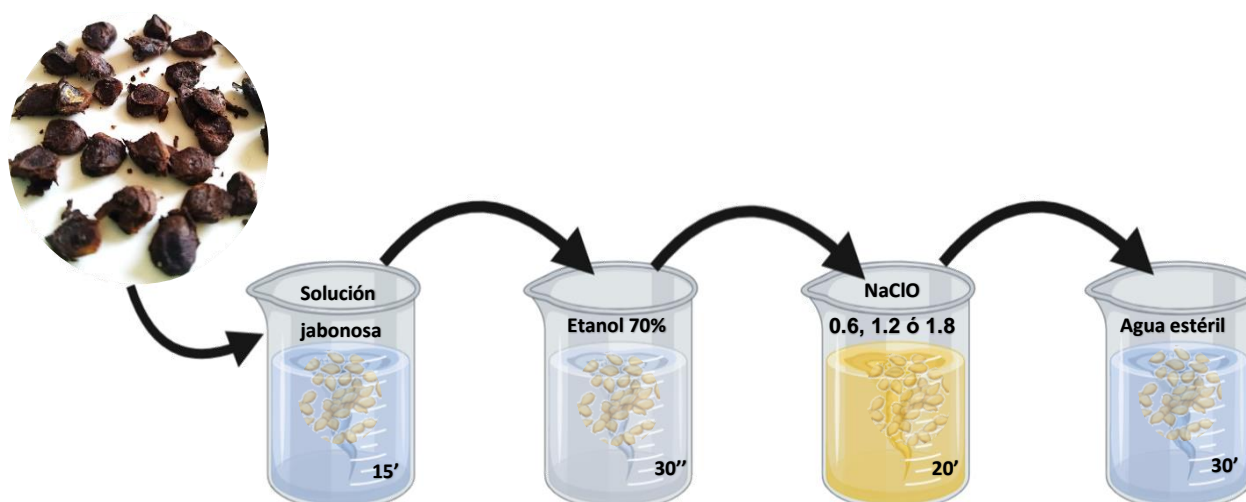


Figura 7. Proceso de desinfección superficial de las semillas

## 6.2 Evaluación de soluciones antioxidantes para controlar la oxidación de los explantes

Los explantes de hoja y cotiledón presentaron oxidación desde el primer día de cultivo, por lo que se evaluaron dos tratamientos, 1) baño de los explantes con solución antioxidante + carbón activado durante 8 días (CA), y 2) inmersión en solución antioxidante + L-cisteína con agitación continua durante 3 h (CIS) (Ahmad *et al*, 2013). Todos los explantes fueron colocados en medio  $1/2$  MS suplementado

con KIN ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y 2,4-D ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido cítrico ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), polivinilpirrolidona (PVP;  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) y fitagel ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ). Los tratamientos fueron incubados en dos condiciones: 1) fotoperiodo de 16 h luz y 2) completa oscuridad durante 8 días, ambos a  $25^{\circ}\text{C}$

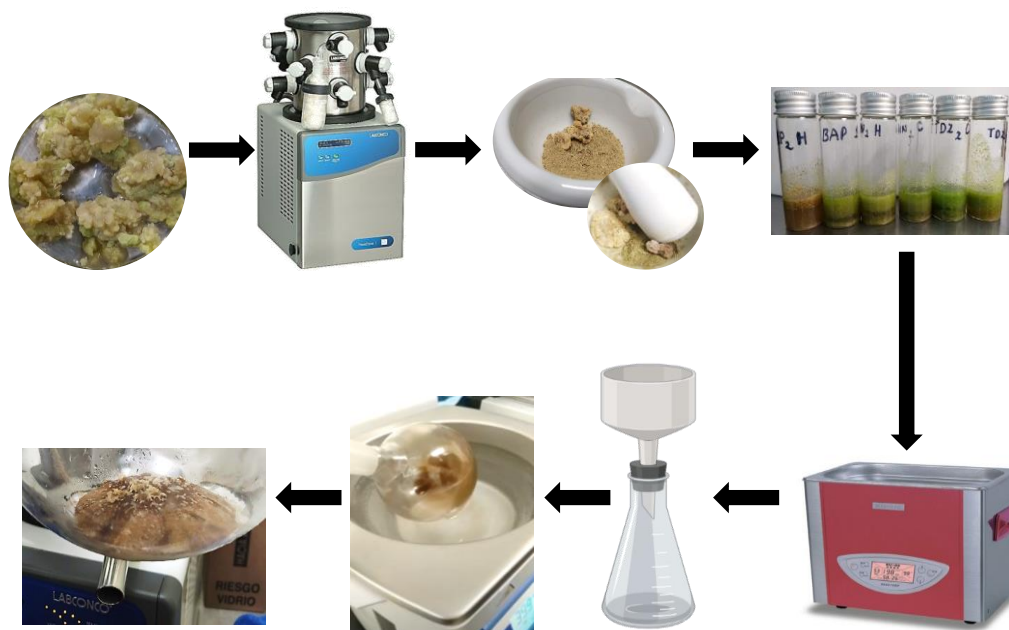
Los porcentajes de oxidación fueron registrados a los 15 días en cultivo, seleccionando el tratamiento con menor grado de oxidación para el establecimiento de los cultivos *in vitro* de hojas y cotiledones de *Randia* sp.

### **6.3 Inducción de callo en explantes foliares y cotiledonares de *Randia* sp.**

Plántulas de aproximadamente dos meses de edad, fueron fuente de explante, y bajo condiciones asépticas y en presencia de solución antioxidante, fueron escindidos los explantes de hoja ó cotiledón, los cuales fueron inoculados en tubos de cultivo conteniendo medio MS adicionado con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de PVP,  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido cítrico y  $2 \text{ g L}^{-1}$  fitagel y suplementado con diferentes concentraciones de la auxina 2,4-D (0.0, 1.0 y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) en combinación con las citocininas KIN, BAP ó TDZ (0.0, 0.5, 1.0 y  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). A los explantes se les añadió 1 mL de solución antioxidante como se describe en la subsección 5.2 y con carbón activado ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ). Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad durante 8 días, y posteriormente incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz. Los porcentajes de oxidación e inducción de callo fueron registrados a los 8, 15, 21 y 30 días de cultivo. Los cultivos de callo friable fueron seleccionados para su proliferación, a fin de obtener la biomasa necesaria para la elaboración de los extractos.

## 6.4 Obtención de extractos a partir de diferentes tejidos de *Randia* sp.

Los tejidos de *Randia* (frutos o cultivos *in vitro*) fueron pesados (PF) y posteriormente fueron secados por liofilización y pesados para la determinación del peso seco (PS). Posteriormente, la biomasa seca fue pulverizada hasta un tamaño de partícula menor a 1mm, luego fue macerada empleando una relación de biomasa solvente 1:30 (p/v) en los solventes: agua, etanol, metanol, etanol-agua (1:1) y metanol-agua (1:1) durante 24 horas en agitación a 110 rpm. Al término del periodo, la extracción fue asistida por ultrasonido a 53 kHz, a 40°C durante 40 minutos. El extracto resultante se filtró al vacío y los solventes alcohólicos se eliminaron mediante presión reducida (IKA, RV10CS099, EUA) y se llevó a sequedad el extracto por liofilización (Labconco, 7670521, EUA). Para determinar los rendimientos de extracción, los extractos secos fueron pesados y se almacenaron en frascos ámbar a 4°C hasta su uso (Fig 8).



**Figura 8.** Diagrama general del proceso de obtención de los extractos de *Randia* sp.

## **6.5 Determinación de fenoles totales de los extractos de diferentes tejidos de *Randia sp.***

Se determinó el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) de acuerdo con lo descrito por Singleton *et al.*, (1999) para lo cual, se construyó una curva de concentraciones conocidas usando como estándar ácido gálico (Anexo 2), los resultados fueron expresados como mg EAG g<sup>-1</sup> de biomasa seca.

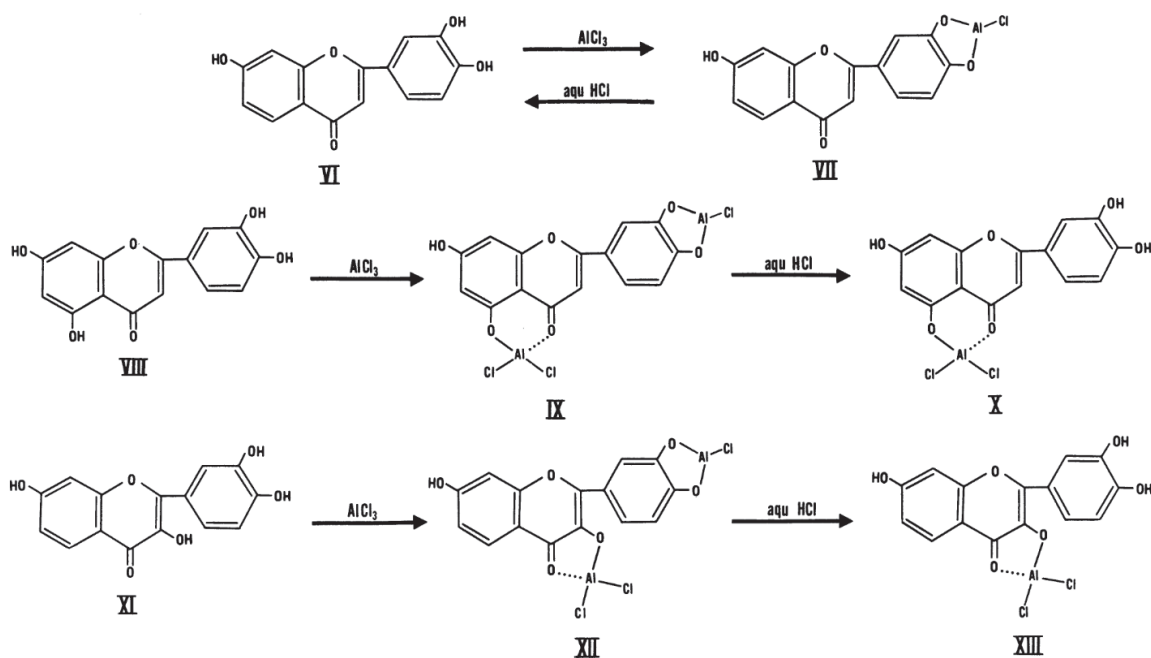
El reactivo FC es una mezcla de ácido fosfotungástico (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) y ácido fosfomolibdico (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) que reacciona con los compuestos fenólicos y otras sustancias reductoras no fenólicas para formar cromógenos, los cuales pueden detectarse espectrofotométricamente a 760 nm, ya que en condiciones alcalinas el oxo-tungstato y el oxo-molibdato formados en esta reacción redox muestran una coloración azul proporcional a la capacidad reductora de la muestra, que normalmente se expresa en términos de contenido de fenoles (Lamuela-Raventós, 2017).

## **6.6 Determinación de flavonoides en los extractos de diferentes tejidos de *Randia sp.***

Al comienzo, se construyó una curva de concentraciones conocidas de quercetina (Anexo 3) posteriormente se realizó el ensayo con AlCl<sub>3</sub> según Pękal & Pyrzyńska (2014) y los resultados fueron expresados como mg EQ g<sup>-1</sup> de biomasa (PS).

El principio de este método colorimétrico es la formación de complejos ácidos estables en medios ácidos entre el tricloruro de aluminio y los grupos ceto C-4 e hidroxilo C-3 o C-5 de las flavonas y flavonoles (Chang *et al.*, 2002; Mabry *et al.*, 1970). Además, el AlCl<sub>3</sub> también forma complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides. Estos complejos son de color amarillo y se pueden detectar espectrofotométricamente a 410 nm. En la figura 9 se muestra una representación esquemática de las posibles estructuras VII - XIII

para los complejos formados entre el  $\text{AlCl}_3$  y los flavonoides según el trabajo realizado por Mabry y col, (1970).



**Figura. 9** Esquemas que ilustran los tipos de complejos que el  $\text{AlCl}_3$  puede formar con ciertas flavonas y flavonoles en presencia o ausencia de HCl.

## 6.7 Análisis estadístico

Todos los ensayos y determinaciones se realizaron por duplicado. Los datos registrados fueron sujetos a un análisis de varianza usando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI, realizando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación de medias en cada ensayo.

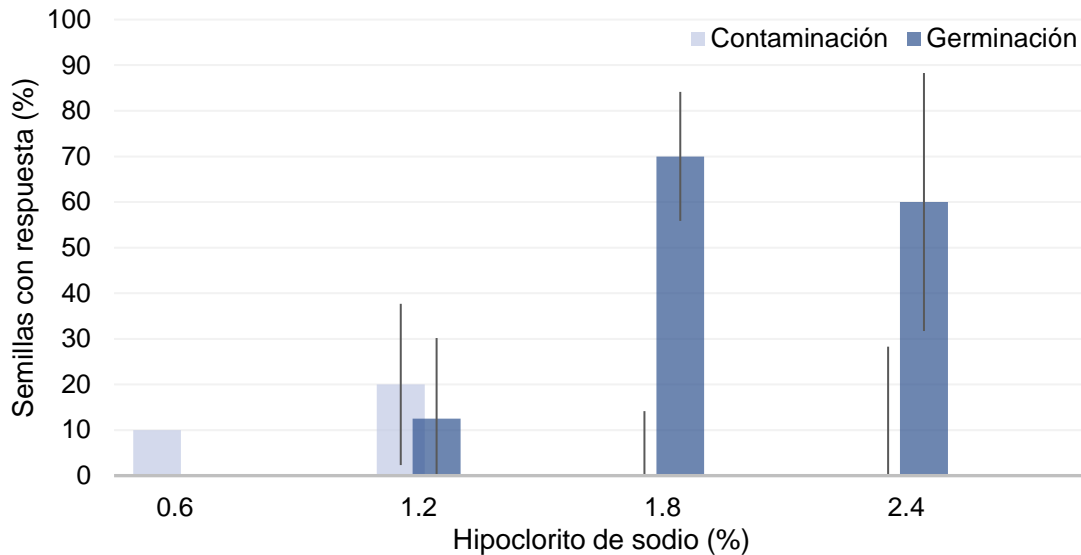
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Establecimiento del cultivo *in vitro* de semillas de *Randia* sp.

#### 7.1.1 Cultivo aséptico de semillas de *Randia* sp.

Se evaluaron diferentes tratamientos para el establecimiento de los cultivos asépticos de semillas de *Randia* sp., variando las concentraciones del hipoclorito de sodio (0.6, 1.2, 1.8 y 2.4%; v/v) con exposición de 20 min. El tratamiento más efectivo para la obtención de cultivos libres de contaminación fúngica o bacteriana (0%) y con tejido viable, fue la concentración de hipoclorito de sodio al 1.8% (Fig. 10). El proceso de germinación *in vitro* comenzó a los 60 días, en el tratamiento con 1.8% de NaOCl se presentó el mayor porcentaje de germinación (70%) y se desarrolló de manera asincrónica, registrándose un máximo de la germinación (93%) a los 90 días de incubación. En la Fig. 10 se observa que a medida que aumenta la concentración de NaOCl disminuye el porcentaje de contaminación, obteniendo un 0% en los tratamientos de mayor concentración (1.8 y 2.4%). Se consideró como el inicio de la germinación el momento en que se observó el rompimiento de la testa con surgimiento de la radícula.

El hipoclorito de sodio es el compuesto más utilizado para la esterilización superficial de semillas y otros tejidos vegetales (Abdul-Baki, 1974), ya que es altamente efectivo contra bacterias, hongos y virus, debido a su elevada propiedad oxidante y reactiva contra aminoácidos, ácidos nucleicos, entre otros componentes esenciales de microorganismos que pueden crecer fácilmente en condiciones *in vitro* (Yildiz *et al.*, 2013). El uso de NaOCl se ha reportado con éxito en la desinfección de semillas de otras especies leñosas como *Ficus religiosa* (Hesami *et al.*, 2017), *Ziziphus spina* (Ahmadi *et al.*, 2012), *Jatropha curcas* (Silva *et al.*, 2012), *Parkia biglobosa* (Abbas *et al.*, 2018) y *Randia echinocarpa* (Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020).



**Figura 10.** Porcentaje de contaminación (15 d) y germinación (60 d) de cultivos de semillas de *Randia* sp. para cada concentración de NaOCl evaluada. Los datos representan el promedio de dos repeticiones  $\pm$  DS.

El método de desinfección seleccionado debe garantizar la completa eliminación de los microorganismos, pero también la viabilidad del tejido, la efectividad del procedimiento depende del tiempo de exposición, y la concentración del NaOCl por lo que se debe establecer una estrategia específica para cada caso (Yildiz *et al.*, 2013).

### 7.1.2 Efecto del lavado/inmersión de las semillas de *Randia* sp. en la germinación

Para disminuir el periodo del inicio de la germinación, se realizó un tratamiento pre-germinativo posterior a la realización de la desinfección superficial de las semillas de *Randia* sp., el cual consistió en la escarificación mediante la inmersión/lavado de las semillas en agua destilada estéril en agitación continua, durante 30 minutos. Con ello se remueve el mucilago y se reblandece el tegumento que cubre las semillas de *Randia* sp. disminuyendo a la mitad el inicio de la germinación (30 d vs. 60 d). Al transcurrir 40 días a partir del inicio de la germinación, se obtuvieron plántulas completas, las cuales fueron fuente de explantes de hojas y cotiledones para la inducción de callo. El tiempo en la emergencia de las semillas de *Randia* sp. utilizando el tratamiento pre-germinativo,

es similar a lo reportado en las semillas de *Randia echinocarpa*, (98% germinación, a las 6 semanas de cultivo), aunque estas no fueron escarificadas (Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020).

Probablemente, el tiempo de inmersión/lavado de las semillas en agua destilada redujo el tiempo de germinación debido a que con el tratamiento se interrumpió la dormancia física, esta condición se caracteriza por un tejido tegumentario de la semilla demasiado rígido o presenta alguna capa de mucílago o algún otro compuesto inhibitorio. *e. g.* en semillas de manzana se encuentran compuestos fenólicos como floridzina y ácido clorogénico, lo cual previene la entrada de oxígeno y agua al interior de la semilla, imposibilitando la activación del metabolismo del embrión y la germinación (Bewley *et al.*, 2013).

La inmersión/lavado de las semillas en agua como pre-tratamiento germinativo, se ha utilizado en otras especies vegetales como *Angelica sinensis* con variantes como el tiempo (2 min) y la temperatura (60°C) además de evaluar otros sistemas, como el uso de AIA (50 mg L<sup>-1</sup> por 3 h), con estos pre-tratamientos se obtuvieron mayores porcentajes (80% y 78%) de germinación comparado con el control (Xiao *et al.*, 2017). En otro estudio realizado por Yisau y col, (2015), se registró un máximo de germinación (53.3%) de semillas de *Albizia zygia* utilizando un tratamiento con inmersión/lavado en agua a 60°C por 5 min, este resultado fue mejor comparado con un tratamiento de escarificación mecánica (36.6%) y de inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50% durante 15 min (50%).

En cuanto a la composición del medio de cultivo para la germinación (½ MS + 1% sacarosa), los resultados obtenidos son consistentes con lo observado por Valenzuela-Atondo y col, (2020), quienes estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (15 y 30 g L<sup>-1</sup>) y sales en el medio MS (0.5 y 1.0 X) en el proceso de germinación de semillas de *R. echinocarpa*, encontrando que los nutrientes en el medio de cultivo son requeridos para el crecimiento de las plántulas, pero no para la germinación de las semillas de esta especie. Debido a su elevado contenido en sales de amonio, el medio MS no es el medio óptimo para todas las especies vegetales, en especial para las leñosas, en su lugar se puede

utilizar medio para especies leñosas (WP, por sus siglas en inglés) o medio MS modificado con la mitad de las sales de los macronutrientes (George *et al.*, 2007).

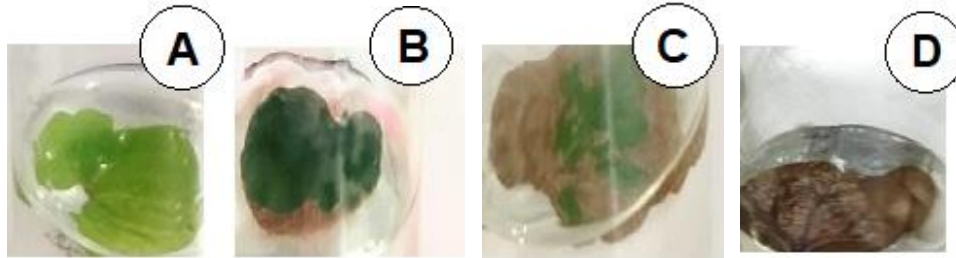
### 7.1.3 Problemas de oxidación de los cultivos de *Randia sp.*

Se registró el porcentaje de oxidación de los explantes sometidos a los dos tratamientos antioxidantes CIS y CA (tabla 2) transcurridos 15 días en cultivo observando que el tratamiento con baño en solución antioxidante y CA mantenido en oscuridad continua, presentó el menor grado de oxidación de los explantes (Fig. 11 A), mientras que la respuesta de inducción de callo se presentó después de 31 días en cultivo.

**Tabla 2.** Porcentaje de oxidación de los explantes de cotiledón sometidos dos tratamientos antioxidantes, solución antioxidante con L-cisteína (CIS) o carbón activado (CA), incubados en oscuridad continua (O) o en fotoperiodo de 16 h (L), a los 8 d de cultivo.

Solución antioxidante	Condición de incubación	Oxidación (%)
CA	L	25 ± 0 <sup>a</sup>
	O	33 ± 0.35 <sup>a</sup>
CIS	L	75 ± 35 <sup>b</sup>
	O	75 ± 35 <sup>b</sup>

En la figura 11 (A y B) se observa que los explantes tratados por 8 días con la solución antioxidante con carbón activado (CA), independientemente de la condición de incubación (fotoperiodo o en oscuridad), muestran un mejor control del proceso de oxidación, mientras que los tratamientos de la solución antioxidante con cisteína no son adecuados para evitar la necrosis parcial o total del tejido (Fig. 11 C y D).



**Figura 11.** Cultivos de cotiledones de *Randia* sp. inoculados en medio  $\frac{1}{2}$ MS ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D) y bajo cuatro tratamientos antioxidantes, transcurridos 8 días de cultivo. A) solución CA y en oscuridad; B) solución CA y fotoperiodo de 16 h; C) Solución CIS y en oscuridad; y D) Solución CIS y fotoperiodo de 16 h.

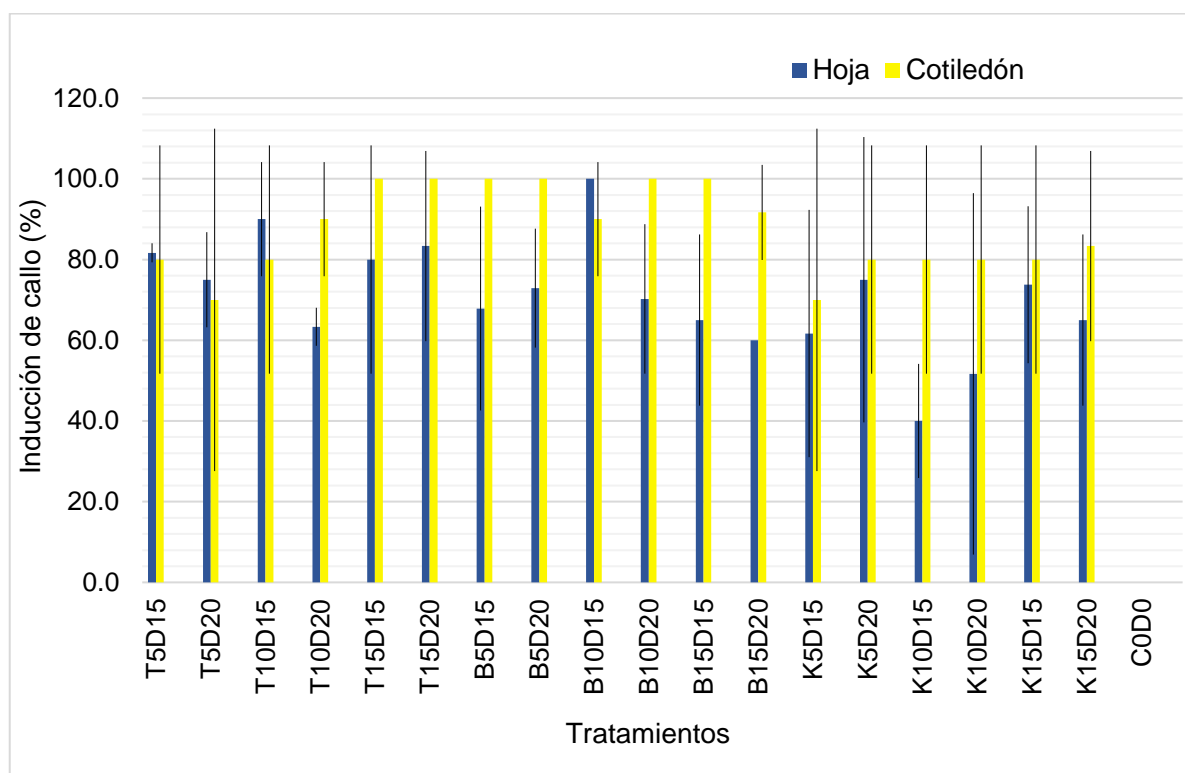
Los procesos de oxidación de los tejidos vegetales se deben al estrés oxidativo y nitrosativo causado por factores bióticos y abióticos como la radiación UV, lesiones, herbicidas, senescencia, patógenos o metales pesados (Buchanan *et al.*, 2015). En el CTV, los procesos de oxidación son causados principalmente por la escisión del explante, el uso de abrasivos como agentes desinfectantes y la composición del medio de cultivo (Azofeifa-Delgado, 2008). Luego de ser cortados, los explantes comienzan a oscurecerse liberando exudados al medio de cultivo, los cuales usualmente son una mezcla compleja de sustancias fenólicas. El efecto de los exudados es más severo en la etapa de establecimiento del cultivo *in vitro*, y aunque no todos los exudados liberados al medio de cultivo son tóxicos, en la mayoría de los casos inhiben el crecimiento y la capacidad de respuesta del explante. Los tejidos que se oscurecen, pierden la capacidad para crecer o generar una respuesta *in vitro*, lo cual constituye uno de los mayores problemas del establecimiento de cultivos *in vitro* de especies leñosas (Ahmad *et al.*, 2013). Algunas especies, principalmente las tropicales y leñosas, contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos los cuales son oxidados por enzimas como la polifenol oxidasa que es activada cuando las células sufren heridas o se encuentran en senescencia (Ahmad *et al.*, 2013; George *et al.*, 2007). Existen varias estrategias para la prevención y disminución del estrés oxidativo de los explantes en el establecimiento del cultivo *in vitro*, entre ellos la elección del

método de desinfección adecuado, crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad, o bien, a bajas temperaturas, realización de subcultivos frecuentes, así como el uso de agentes adsorbentes y / o antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o incorporados en el medio de cultivo (Azofeifa-Delgado, 2008). Los antioxidantes más usados en el CTV son el ácido ascórbico y ácido cítrico, también se utiliza cisteína, aunque con menor frecuencia, y se adicionan solos o en combinación a una solución o directamente al medio de cultivo (Azofeifa-Delgado, 2008). La cisteína, ácido ascórbico y ácido cítrico actúan disminuyendo el potencial redox de la solución ( $E_h$ ), es decir, aumentan su potencial reductor (George *et al.*, 2007). Por otro lado, el carbón activado y PVP son compuestos utilizados en el CTV como adsorbentes de compuestos aromáticos como los fenoles y sus oxidados ya sea en soluciones como enjuague para preparar el explante o directamente en el medio de cultivo (Gannoun *et al.*, 1995; Pan & Van Staden, 1998; Thomas, 2008). También presentan capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado del medio o liberadas por el explante (Azofeifa-Delgado, 2008). También se ha reportado que el carbón activado presenta gran afinidad por los RCV, iones metálicos  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , así como otros suplementos orgánicos, alterando considerablemente la relación de los componentes del medio de cultivo, influenciando la respuesta de inducción de callo (Thomas, 2008). Por otro lado, el PVP es una poliamida que fue inicialmente utilizada como adsorbente en la separación de sustancias ácidas y aromáticas, aldehídos y fenoles mediante cromatografía de columna (Lerner, 1970).

El control de la oxidación mediante el reposo en soluciones con agentes adsorbentes y / o antioxidantes de los explantes para el establecimiento de cultivos *in vitro* ha sido reportado en otras especies leñosas como *Rollinia mucosa* (Figueiredo *et al.*, 2001), *Anacardium occidentale* (D'souza *et al.*, 1996), *Musa acuminta* (Gupta, 1986), *Pistacia terebinthus* y *Pistacia vera* (Gannoun *et al.*, 1995).

### 7.1.4 Inducción de callo en explantes de *Randia sp.*

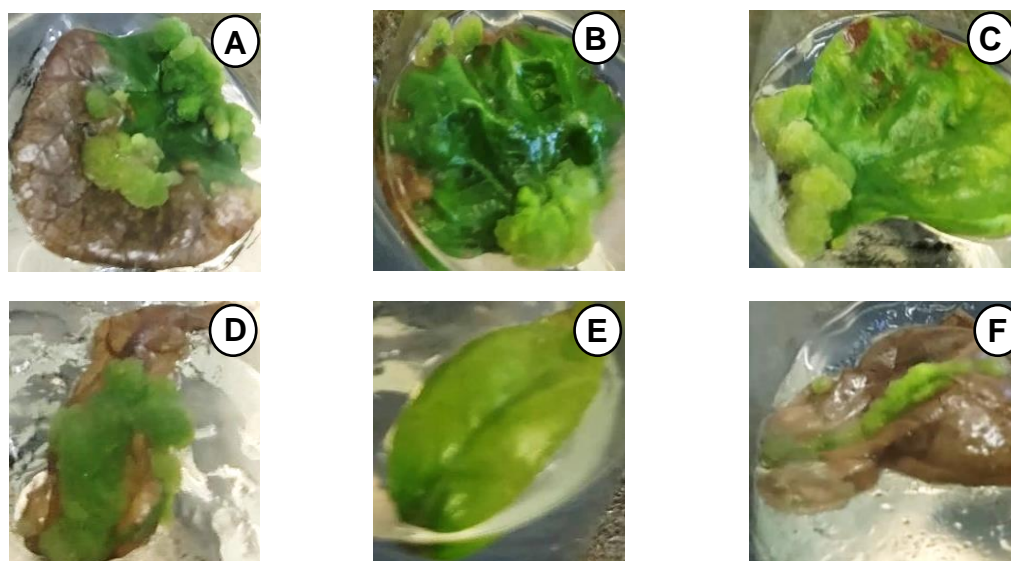
Los explantes de hoja y cotiledón presentaron problemas de oxidación en diferentes grados, en todos los tratamientos evaluados a partir del quinto día de incubación. Mientras que los explantes del tratamiento control (sin RCV), se oxidaron en su totalidad a los 8 días de cultivo. No obstante, los tejidos que no mostraron necrosis respondieron a la presencia de los RCV. En términos generales, todos los tratamientos indujeron la formación de callo en ambos explantes, con excepción del tratamiento control (Fig. 12).



**Figura 12.** Porcentaje de inducción de callo en explantes foliares y cotiledonares de *Randia sp.* a los 30 días de cultivo, creciendo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de TDZ (T), BAP (B) ó KIN (K) en combinación con 2,4-D (D). Los datos representan el promedio de dos repeticiones  $\pm$  DS.

Por otro lado, se presentaron diferencias en cuanto a los porcentajes de inducción, cantidad y morfología del callo formado (friabilidad y color). En las combinaciones

hormonales con TDZ y BAP + 2,4-D se observó la formación de callo en ambos explantes a partir de los 21 días (Fig. 13), mientras que en los explantes de hoja bajo los tratamientos con KIN + 2,4-D se indujo el callo a los 30 días en cultivo (Fig. 13 E). En cuanto al tejido evaluado, el cotiledón, presentó significativamente mayores porcentajes de inducción de callo respecto al explante de hoja ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el callo derivado del explante foliar exhibió una textura más friable, la cual es una característica deseada para el establecimiento de cultivos en suspensión. Este es el primer trabajo, en todo el género *Randia*, que explora el uso de explantes foliares derivados de plántulas germinadas *in vitro* para la obtención de callo. El uso de explantes generados *in vitro* es conveniente ya que favorece las condiciones de esterilidad, y tienen una mejor respuesta que los explantes provenientes de plantas creciendo *in vivo* (S. & A., 2017; Thangavel *et al.*, 2014; Walia *et al.*, 2007). La selección del explante apropiado en la inducción de callo es un paso primordial en cualquier estudio de CTV.



**Figura 13.** Tejido callogénico inducido en explantes de hoja y cotiledón creciendo en medio MS a los 21 días de cultivo: A-C) formación de callo en cotiledones (B<sub>15</sub>D<sub>15</sub>, K<sub>15</sub>D<sub>15</sub> y T<sub>15</sub>D<sub>15</sub>; respectivamente); D-F) formación de callo en hojas (B<sub>15</sub>D<sub>15</sub>, K<sub>15</sub>D<sub>15</sub> y T<sub>15</sub>D<sub>15</sub>; respectivamente).

En referencia a la auxina 2,4-D, se reporta en diferentes especies de la familia Rubiaceae que tiene una mayor influencia que otras auxinas en la inducción de callo, a la vez que promueve la producción de metabolitos secundarios en los cultivos (Anjusha & Gangaprasad, 2017). Los cultivos *in vitro* de *Gynochthodes umbellata* (Anjusha & Gangaprasad, 2017), *Anthocephalus indicus* (Indu *et al.*, 2013) y *Rudjea jasminoides* (Stella & Braga, 2002) han demostrado que sólo la presencia de una auxina en la concentración apropiada, es necesaria para la proliferación de callo friable.

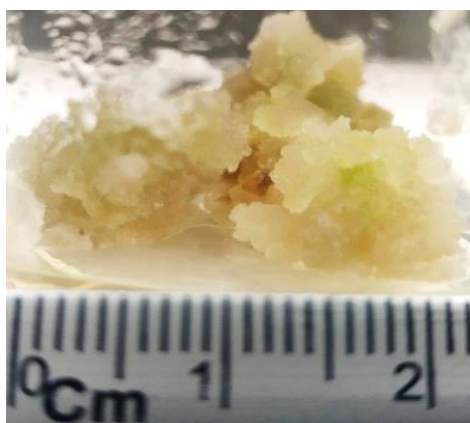
Respecto a la influencia de la citocinina empleada, se registró un significativamente mayor porcentaje de inducción en los tratamientos conteniendo BAP (100%), independientemente de su concentración (0.5, 1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup>), y usando como explante el cotiledón ( $p < 0.05$ ), sin embargo, el callo formado mostró poca friabilidad y un crecimiento lento. Adicionalmente, en estos cultivos se observó un exudado en la superficie del tejido callogénico, el cual podría ser una goma, como se ha reportado su producción en cultivos de callo de *Prosopis laevigata* (Trejo-Espino *et al.*, 2011), y en callos de *Canthium parviflorum* (Rubiaceae) (Kala *et al.*, 2012). Las gomas obtenidas mediante CTV pueden ser utilizadas en la industria alimenticia y farmacéutica como emulsificantes, agentes gelificantes o espesantes (Mahmoudifar *et al.*, 2000).



**Figura 14.** Cultivos de callos provenientes de cotiledón creciendo en medio MS tras 60 días de cultivo: A) T<sub>10</sub>D<sub>20</sub> B) B<sub>10</sub>D<sub>20</sub> C) K<sub>10</sub>D<sub>20</sub>

A pesar de que los tratamientos de inducción utilizando KIN presentaron menores porcentajes de inducción respecto a lo observado con BAP, los callos formados en ambos explantes presentan una textura friable, coloración amarillo o verde a blanco y apariencia hidratada (Fig. 14 C). Por lo cual se seleccionó el tratamiento con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D para su proliferación y estudios posteriores, el cual mostró un alto porcentaje de inducción en cotiledones (80%) y 51.7% en hojas, además de presentar crecimiento acelerado (Fig. 15). Mientras que los porcentajes de inducción de callo en ambos explantes, con TDZ + 2,4-D no presentaron diferencias significativas con respecto de los tratamientos en KIN + 2,4-D, sin embargo, la apariencia del tejido callogénico era compacto (Fig. 14 A). La diferencia en la inducción y la morfología del callo por los diferentes RCV puede atribuirse a la diferencia en su actividad fisiológica y el grado en que se mueven dentro de los tejidos o se metabolizan (George *et al.*, 2007).

Después de dos subcultivos, utilizando el tratamiento con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D, el tejido callogénico mostró una mayor friabilidad (aproximadamente el 80% de los callos) y un color amarillo o verde a blanco, con mayor tasa de crecimiento, obteniendo a los 31 días de cultivo el triple de biomasa (Fig. 15). Se ha reportado que la combinación de KIN y 2,4-D ( $1.0$  y  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente) también promovió la inducción y crecimiento acelerado de callos derivados de hojas de *Cephaelis ipecacuanha* (Rout *et al.*, 2000).



**Figura 15:** Cultivo de callo de *Randia* sp. creciendo en medio MS en el tratamiento  $K_{10}D_{20}$  a los 120 días de incubación.

Entre los estudios relacionados con el cultivo *in vitro* de especies del género *Randia*, se ha reportado que una relación igual de BAP y AIA ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) en explantes de hipocótilo y cotiledón de *Randia echinocarpa* es capaz de inducir la formación de callo friable con alta producción de biomasa (Valenzuela-Atondo *et al.*, 2020), mientras que la misma relación, pero sustituyendo la auxina por ácido naftalenacético ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y ANA), da como resultado la máxima formación de brotes (12.7) en cultivos de meristemas apicales de *Randia dumentorum* (Begum *et al.*, 2003). Esto se debe a que la presencia de auxinas y citocininas en el medio de cultivo es necesaria para la inducción de callo, sin embargo, la concentración utilizada puede desencadenar diferentes respuestas dependiendo del tipo de RCV y la especie vegetal. También en *Randia dumentorum*, se observó que en ausencia de auxinas se inhibe la respuesta callogénica de los explantes, mientras que todas las combinaciones de ANA y BAP ( $0.5\text{-}2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) lograron inducir una formación de tejido callogénico, además de la producción de brotes, (Begum *et al.*, 2003).

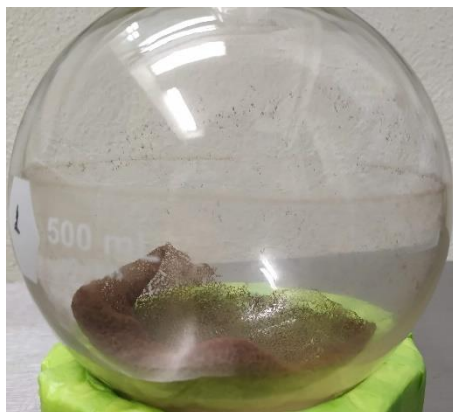
En contraste con lo observado en este trabajo, ha sido reportado que el TDZ es eficiente en la inducción de callo de otras especies de la familia Rubiaceae (Al-Juboory *et al.*, 1998).

## **7.2 Extracción de compuestos fenólicos de frutos y cultivos de callo de *Randia* sp**

### **7.2.1 Obtención de los extractos**

En términos generales, se observó que el extracto acuoso del fruto completo (Fig. 16) con un rendimiento del  $34.77\% \pm 0.01$ , resulta ser el más eficiente en el proceso de extracción, seguido por el extracto hidroetanólico del fruto completo con  $34.11\% \pm 0.03$ , por otro lado, el extracto etanólico de pericarpo fue del que se obtuvo el menor rendimiento de extracción con  $12.62\% \pm 0.00$  (Tabla 3). Se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tipo de tejido utilizado, siendo el fruto completo y la semilla con pulpa, los tejidos que presentan

mejores rendimientos de extracción. De manera similar, se observaron diferencias entre la capacidad de extracción de cada solvente, siendo el solvente hidro-etanólico el más eficiente.



**Figura 16.** Extracto acuoso secado por liofilización del fruto completo de *Randia* sp.

Resulta favorable obtener mejores índices de extracción empleando como solventes agua y mezclas con etanol y agua, puesto que son solventes estables, inocuos, fáciles de remover, y de bajo costo, a diferencia del metanol, el cuál es un solvente orgánico tóxico. La eficiencia de extracción está relacionada con las interacciones entre la matriz y el soluto y / o la ruta de difusión del soluto a través de la matriz de la muestra, por lo que es necesario determinar los parámetros de extracción ideales para cada muestra modificando el tipo de solvente, duración y temperatura de la extracción, así como las relaciones de muestra con el solvente (Galili & Hovav, 2014).

El agua como solvente de extracción, ocasiona que el material vegetal se hinche, con lo que permite que el solvente penetre más fácilmente en la matriz sólida y aumenta la capacidad de extracción de polifenoles. Cuando se usan combinaciones de solventes orgánicos con agua, la función del solvente orgánico es disolver las membranas celulares y los polifenoles no polares, mientras que el agua participa disolviendo los compuestos fenólicos polares (Galili & Hovav, 2014).

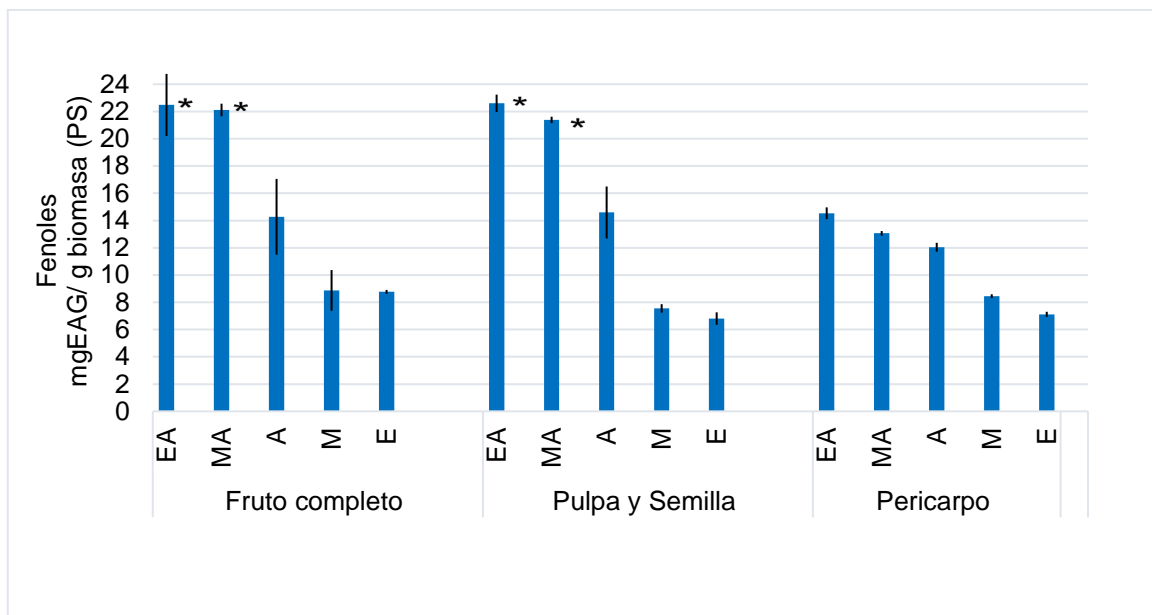
**Tabla 3.** Rendimiento de extracción (%) de diferentes extractos de *Randia* sp.

Solvente	Tejido		
	Fruto completo	Semilla	Pericarpio
Agua	34.77 ± 0.01 <sup>a</sup>	27.38 ± 0.01 <sup>abcdef</sup>	24.72 ± 0.00 <sup>defg</sup>
Etanol-agua	34.11 ± 0.03 <sup>ab</sup>	33.51 ± 0.00 <sup>abc</sup>	25.25 ± 0.02 <sup>bcdefg</sup>
Metanol-agua	31.51 ± 0.01 <sup>abcd</sup>	30.70 ± 0.03 <sup>abcde</sup>	23.11 ± 0.01 <sup>efg</sup>
Etanol	28.86 ± 0.03 <sup>abcdef</sup>	21.14 ± 0.02 <sup>fgh</sup>	12.62 ± 0.00 <sup>i</sup>
Metanol	24.69 ± 0.05 <sup>cdefg</sup>	23.04 ± 0.01 <sup>efg</sup>	17.04 ± 0.00 <sup>hi</sup>

Los datos representan el promedio de dos replicas ± DS. Las letras en superíndice representan diferencias significativas, en columnas, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.3 Cuantificación de fenoles totales en frutos de *Randia* sp.

En cuanto al contenido de fenoles totales, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre los extractos del fruto completo y de semilla empleando como solvente agua en combinación con etanol o metanol. El mayor contenido de compuestos fenólicos se obtuvo en los extractos hidroalcohólicos provenientes de semilla y el fruto completo, obteniendo 21-24 mg EAG g<sup>-1</sup> biomasa (~91-100 mg EAG g<sup>-1</sup> extracto; Fig. 17). estos resultados coinciden con la caracterización de extractos metanólicos de hojas y corteza de *Randia dumetorum* de los cuales se obtuvieron 112 y 138 mg EAG g<sup>-1</sup> extracto (Kandimalla *et al.*, 2016) y también con el contenido presente en los extractos etanólicos de hojas de *Randia uliginosa* de 85.5 mg EAG g<sup>-1</sup> extracto (Gulnaz *et al.*, 2014).



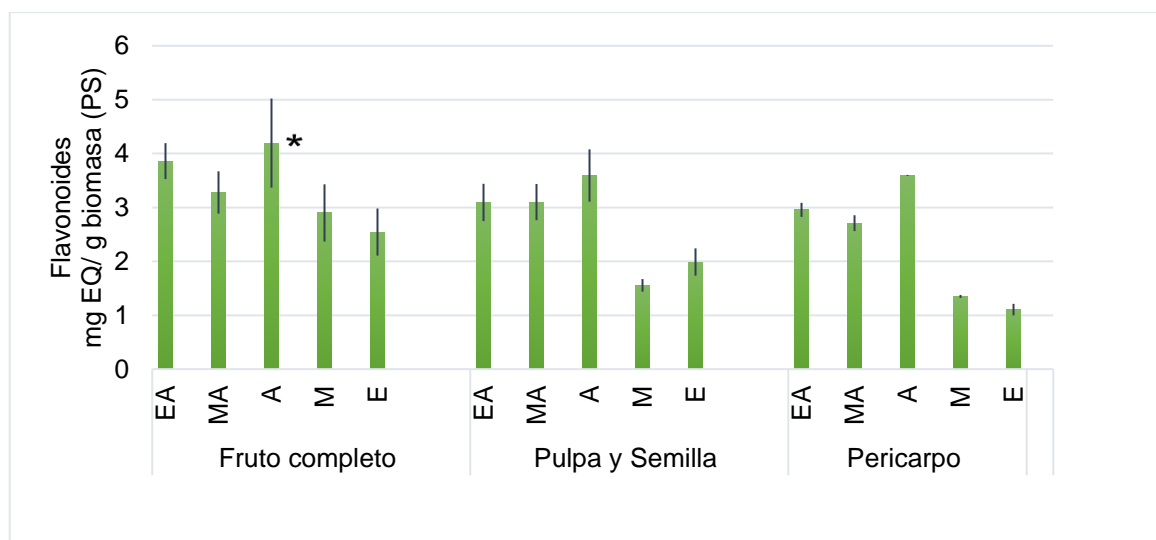
**Figura 17.** Contenido de fenoles totales en diferentes extractos de *Randia* sp: EA: etanol-agua; MA: metanol-agua; A: agua; M: metanol; E: etanol. Mejores tratamientos señalados con \* ( $p < 0.05$ )

Estudios previos realizados en la pulpa y semilla de *Randia monantha* señalan que la especie puede llegar a presentar más de 400 mg EAG g<sup>-1</sup> extracto seco (Juárez-Trujillo *et al.*, 2018). El contenido de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales puede variar dependiendo del grado de madurez, tiempo de cosecha, método de cosecha y almacenamiento, además de factores medioambientales como humedad, temperatura, etc (Pandey & Rizvi, 2009). Por lo que se refiere al tipo de tejido, no existen diferencias significativas respecto al contenido de fenoles totales de *Randia* sp, mientras que el tipo de solvente si tiene influencia en el contenido de compuestos fenólicos, siendo las mezclas de agua con etanol o metanol, los de mayor eficiencia. La polaridad de los compuestos fenólicos es diversa (polar-no polar), por lo que diferentes trabajos han evaluado diferentes solventes en su extracción, entre ellos el agua, acetona, metanol, etanol y mezclas con agua (Tsao & Deng, 2004).

#### 7.4 Cuantificación de flavonoides de frutos de *Randia* sp.

Acerca del contenido de flavonoides presentes en los diferentes extractos obtenidos, el extracto acuoso del fruto completo presenta significativamente un

mayor contenido de flavonoides totales ( $p < 0.05$ ). En términos generales, el fruto completo es el tejido con mayor contenido de flavonoides totales. Mientras que el tipo de solvente más favorable para su extracción puede ser agua, o la combinación de agua con etanol o metanol (Fig. 18).



**Figura 18.** Contenido de flavonoides en diferentes extractos de *Randia* sp. EA: etanol-agua; MA: metanol-agua; A: agua; M: metanol; E: etanol. Mejores tratamientos señalados con \* ( $p < 0.05$ )

Comparado con lo reportado para otras especies, el contenido de flavonoides encontrado en los extractos acuosos del fruto de *Randia* sp. (15.29 mg EQ g<sup>-1</sup> extracto), es 5 a 6 veces más que en los extractos de hojas y corteza de *Randia dumentorum* en la que se encontraron 2.6 y 3.34 mg ER g<sup>-1</sup> extracto respectivamente (Kandimalla *et al.*, 2016). En contraste con lo reportado en este trabajo, un extracto etanólico de hojas de la especie *Randia uliginosa*, posee un contenido casi 3 veces mayor con 45 mg ER g<sup>-1</sup> extracto (Gulnaz *et al.*, 2014), mientras que Prabakaran y col, (2018) encontraron en los extractos acuosos de hojas de *Morinda oleífera* tienen un contenido 4.5 veces mayor de flavonoides (69 mg EQ g<sup>-1</sup> extracto).

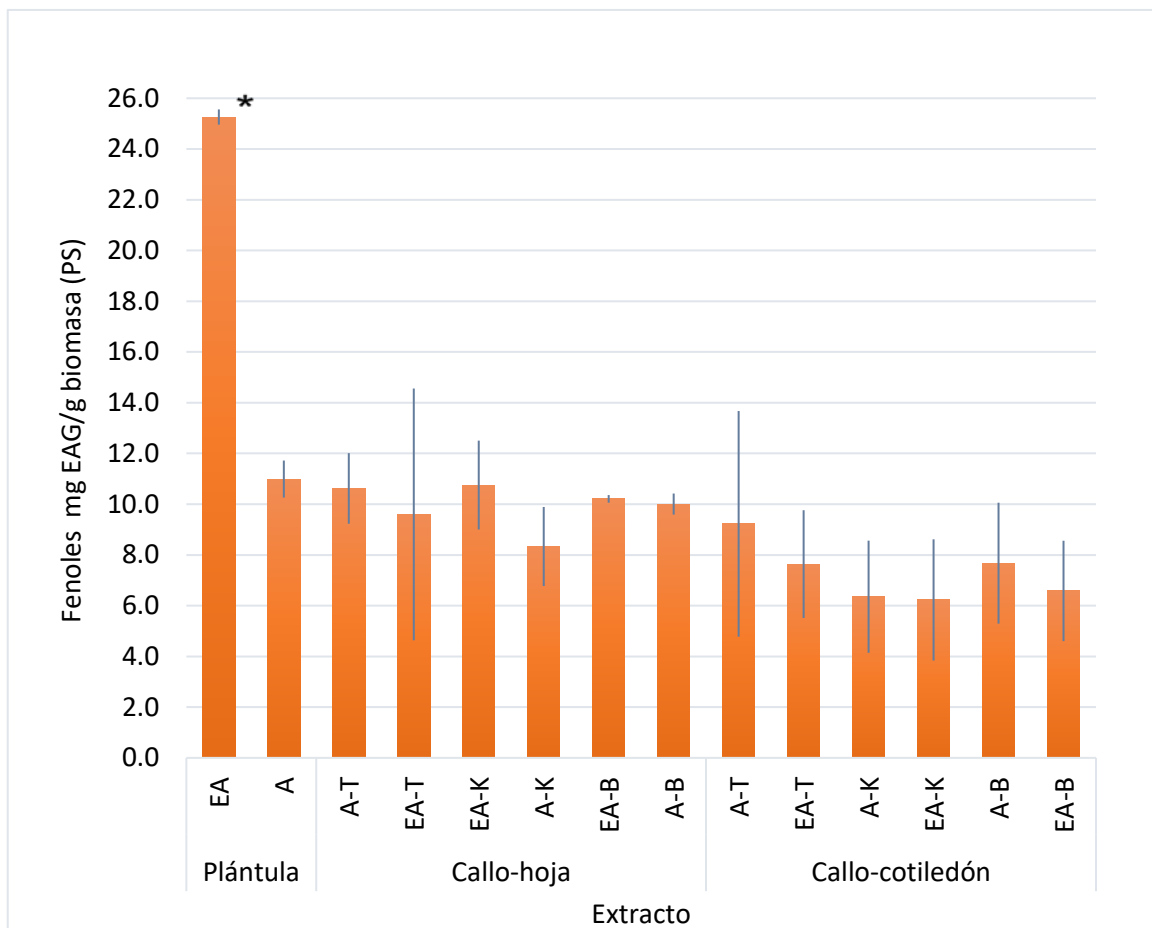
Generalmente, los metabolitos secundarios se acumulan en partes específicas de las plantas, para conocer que parte contiene los niveles más altos de los compuestos de interés, se deben evaluar múltiples partes o la planta completa,

para garantizar que los extractos preparados sean representativos del rango de metabolitos secundarios producidos por la planta (Sarker *et al.*, 2006). Los metabolitos secundarios también varían tanto cuantitativa como cualitativamente entre especies del mismo género, dentro de una sola especie y entre miembros de una población (Sarker *et al.*, 2006).

### **7.5 Cuantificación de fenoles totales en los cultivos *in vitro* de *Randia* sp.**

Debido a la poca disponibilidad de biomasa derivada de los cultivos *in vitro*, únicamente se realizó la caracterización fitoquímica de los extractos con mayor eficiencia de extracción determinados en los frutos, los cuales fueron utilizando agua, y mezcla de etanol-agua, como solventes (1:1).

El significativamente mayor contenido de fenoles totales se encontró en los extractos hidroetanólicos de cultivos de plántulas (Fig. 19), con un contenido similar 25.3 mg EAG g<sup>-1</sup> al presente en el fruto completo utilizando el mismo solvente ( $p < 0.05$ ). Mientras que los cultivos de callo presentaron un contenido 2 veces menor de fenoles totales comparado con el contenido presente en los extractos hidroetanólicos de los frutos completos de *Randia* (Fig. 19). Respecto del solvente utilizado, no existen diferencias significativas en la presencia de fenoles totales de los extractos de cultivos *in vitro*. En cuanto al explante usado en la inducción, los extractos a partir del callo proveniente de cotiledones presentaron un significativamente mayor contenido de fenoles comparado con el callo proveniente de hoja ( $p < 0.05$ ). De manera general, se observó que el contenido de fenoles presente en los cultivos *in vitro*, no se encuentra influenciado por el tratamiento de RCV (KIN, BAP o TDZ + 2,4-D) del cual provienen las diferentes líneas de los cultivos *in vitro* de *Randia*.



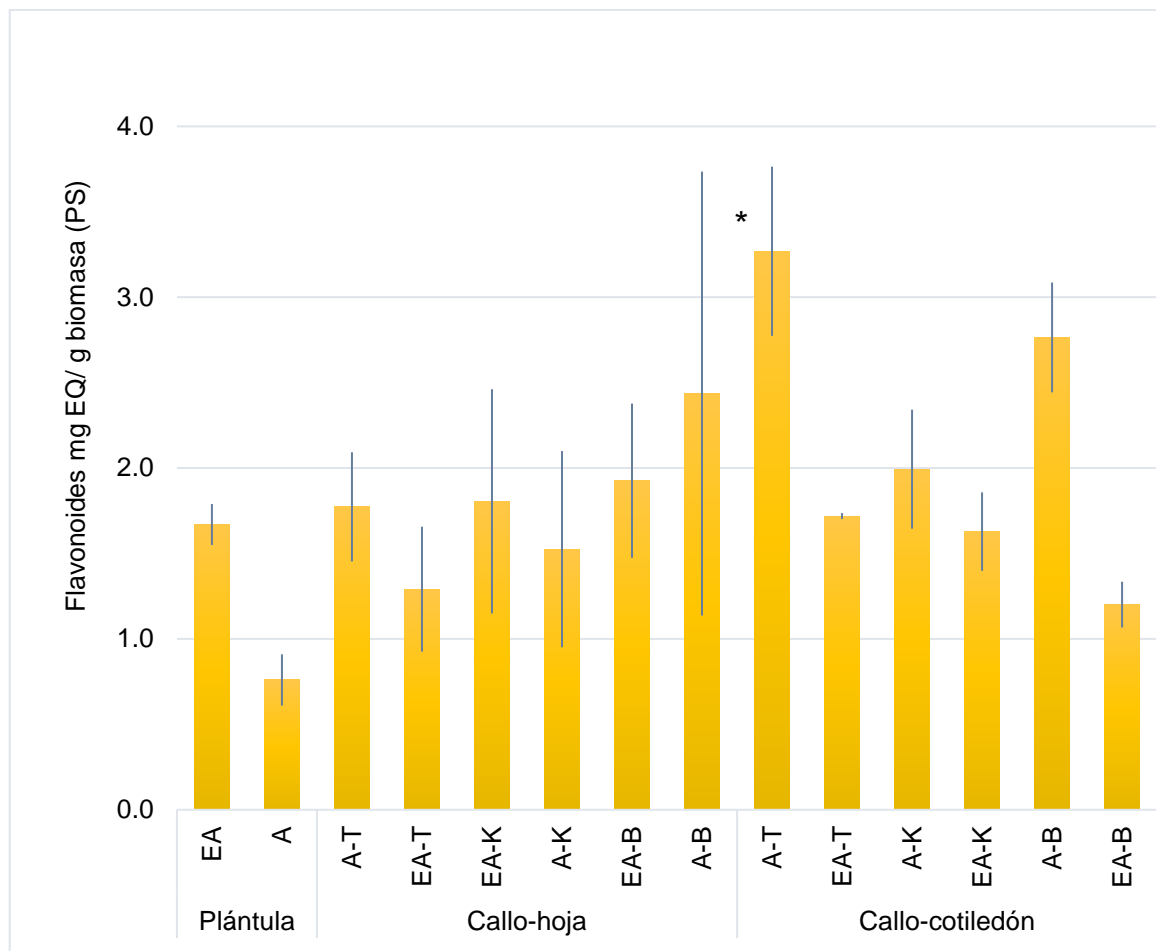
**Figura 19.** Contenido de fenoles totales en cultivos *in vitro* de *Randia* sp. A: extracto acuoso, EA: extracto hidroetanólico; K: cinetina, B: bencilaminopurina, y T: tidiazurón. Mejores tratamientos señalados con \* ( $p < 0.05$ )

Dentro de la familia Rubiaceae se han estudiado otras especies con el fin de producir fenoles a partir de cultivos *in vitro*. En un trabajo realizado por Anjusha y Gangaprasad (2016) se determinó el contenido de antraquinonas presentes en las raíces de plántulas *in vitro* de *Gynochthodes umbellata*, encontrando 8.33 mg g<sup>-1</sup> biomasa (PS) siendo su presencia 2 veces mayor a lo encontrado en las raíces de plantas completas. Las antraquinonas son compuestos fenólicos tipo quinona, que se presentan en la naturaleza como colorantes con bioactividades como antimicrobiano, anticancerígeno, antiviral, antioxidante, etc. De manera similar Anjusha & Gangaprasad (2017) reportan el establecimiento del cultivo de callo de *G. umbellata* productor de antraquinonas obteniendo 18.19 mg g<sup>-1</sup> de biomasa

(PS) a partir de explantes foliares *in vitro* de la planta utilizando el medio MS suplementado con la auxina 2,4-D ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), lo que sugiere que este cultivo puede representar una fuente importante para la obtención industrial de estos colorantes bioactivos.

### **7.6 Cuantificación de flavonoides en los cultivos *in vitro* de *Randia sp.***

El significativamente mayor contenido de flavonoides se encontró en el extracto acuoso de la línea de callo derivado de cotiledón en los tratamientos de inducción con tidiazurón ( $p < 0.05$ ) empleando como explante cotiledón con una presencia 1.8 veces menor de flavonoides con respecto al contenido presente en los extractos acuosos de los frutos completos, mientras que las plántulas *in vitro* presentaron 4 veces menos flavonoides comparado con el fruto completo (Fig. 20). En cuanto al tipo de solvente empleado, se observó un significativamente mayor contenido de flavonoides empleando agua ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, respecto a las diferentes líneas de cultivo de callo, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de explante y tampoco entre las citocininas correspondientes a los tratamientos de inducción.



**Figura 20.** Contenido de flavonoides en extractos acuosos en cultivos *in vitro* de *Randia* sp. A: extracto acuoso, EA: extracto hidroetanólico; K: cinetina, B: bencilaminopurina, y T: tidiazurón. Mejores tratamientos señalados con \* ( $p < 0.05$ )

El trabajo de Khooon-Huat y Nagaratnam-P., (1989) es un ejemplo de la producción de flavonoides empleando CTV, de una especie de la familia Rubiaceae. Cultivos de callo de *Uncaria elliptica* sometidos a un fotoperiodo continuo en presencia de 4% de sacarosa, mostraron un aumento en la síntesis de (-) epicatequina, obteniendo un máximo de 5.2 mg g<sup>-1</sup> biomasa (PS). La epicatequina es un flavonoide que se comercializa como fármaco con el nombre de catergen o cianidanol-3 y cuales son recetados a pacientes que sufren de daño hepático.

El contenido de flavonoides en los cultivos *in vitro* de *Randia* sp. que se reporta en este trabajo, no es muy lejana a la producción de metabolitos en el fruto completo, además, existen estudios que señalan que la manipulación del medio de cultivo,

por adición de compuestos que desencadenan respuestas de estrés o de defensa en las células vegetales, son una estrategia efectiva para incrementar la producción de metabolitos secundarios y son conocidas como técnicas de elicitación. En un trabajo realizado por Indu y col, (2013) se obtuvo un máximo de 203 mg g<sup>-1</sup> biomasa (PS) de flavonoides en un cultivo de callo de *Anthocephalus indicus* (Rubiaceae), tras la adición de BAP (3 mg L<sup>-1</sup>), fenilalanina (100 mg L<sup>-1</sup>) y NaCl (100 mg L<sup>-1</sup>), incrementando 10 veces la producción comparado con la síntesis inicial sin elicitores de los metabolitos de interés. De manera similar, en un estudio posterior se puede proponer la elicitación de los cultivos de callo *in vitro* de *Randia* establecidos en este trabajo.

## 8. CONCLUSIONES

1. La exposición de las semillas de *Randia* sp. al 1.8% de NaClO por 20 min es un tratamiento que permite establecer cultivos asépticos de semillas, con un 70% de germinación.
2. El pretratamiento de las semillas por inmersión durante 30 min en agua destilada, previo a su inoculación en el medio de cultivo, incrementa 1.5 veces la germinación y reduce 1.5 veces el tiempo de emergencia de la radícula.
3. La inmersión de los explantes en solución antioxidante con carbón activado ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 8 días en oscuridad, previene la oxidación de los explantes permitiendo observar la respuesta a los tratamientos de inducción de callo.
4. Altos porcentajes de inducción de callo en explantes foliares y cotiledonares de *Randia* sp. se pueden lograr utilizando  $0.5\text{-}1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, TDZ ó KIN en combinación con  $0.5\text{-}2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D.
5. La obtención de callo friable se logra utilizando la combinación hormonal de  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D.
6. El mayor rendimiento de extracción en los extractos del fruto completo se obtiene utilizando agua como solvente.
7. En el fruto completo de *Randia* sp., el mayor contenido de fenoles totales se obtuvo en el extracto hidroetanólico ( $21\text{-}24 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ), mientras que el mayor contenido de flavonoides se obtuvo en el extracto acuoso ( $5.15 \text{ mg EQ g}^{-1}$ ).
8. En las plántulas *in vitro*, el mayor contenido de fenoles ( $25 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ) y de flavonoides ( $1.7 \text{ mg EQ g}^{-1}$ ), se obtuvo en el extracto hidroetanólico.
9. En los cultivos de callo, el mayor contenido de fenoles totales se determinó en los extractos hidroetanólicos de cultivos de callo proveniente de hoja y bajo tratamiento con KIN ( $10.8 \text{ mg EAG g}^{-1}$ ), mientras que los flavonoides fueron predominantes en el extracto acuoso de cultivos de callo derivado del cotiledón y en tratamiento con TDZ ( $3.3 \text{ mg EQ g}^{-1}$ ).
10. Los cultivos de callo *in vitro* de *Randia* sp. son una fuente potencial de compuestos fenólicos

## 12. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten sugerir los siguientes estudios a futuro:

1. Realizar la identificación de *Randia* sp.
2. Establecer y caracterizar cultivos de células en suspensión para evaluar su tasa de crecimiento y producción de fitoquímicos.
3. Evaluar diferentes elicitores para mejorar la producción de fenoles y flavonoides de los cultivos *in vitro* de *Randia* sp.
4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos de *Randia* sp.
5. Realizar la identificación de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes del callo de *Randia* sp. por cromatografía líquida de alta eficiencia.
6. Establecer bioensayos para la validación de las bioactividades reportadas en la medicina tradicional.

## 10. REFERENCIAS

- Abbas, M. S., El-Shabrawi, H. M., Soliman, A. S., & Selim, M. A. (2018). Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.012>
- Abdul-Baki, A. A. (1974). Hypochlorite and tissue sterilization. *Planta*, 115(4), 373–376. <https://doi.org/10.1007/BF00388620>
- Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Rafay, M., & Iqbal, M. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 13(4), 539–547. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2013.13.04.1975>
- Ahmadi, E., Nasr, S. M. H., Jalilvand, H., & Savadkoobi, S. K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christii] seed in vitro culture. *Trees - Structure and Function*, 26(4), 1299–1304. <https://doi.org/10.1007/s00468-012-0705-8>
- Al-Juboory, K. ., Skirvin, R. ., & Williams, D. . (1998). Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Horticulturae*, 72(3–4), 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00060-5)
- Anjusha, S., & Gangaprasad, A. (2016). In vitro propagation and anthraquinone quantification in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae)—A dye yielding plant. *Industrial Crops and Products*, 81, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.043>
- Anjusha, S., & Gangaprasad, A. (2017). Callus culture and in vitro production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae). *Industrial Crops and Products*, 95, 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.021>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bandekar, H., & Lele, S. S. (2014). Production of flavonol Quercetin from cultured plant cells of Banyan ( *Ficus benghalensis* L .). *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(5), 12150–12157.
- Begum, F., Mohammed, K., & Islam, D. (2003). In vitro propagation of emetic nut *Randia dumetorum* (Lamb.). *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(12), 1479–1481.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Bhatia, S., & Sharma, K. (2015). *Plant Tissue Culture-Based Industries. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00014-5>
- Bodeker, G., & Bertrand, G. (2013). Traditional medicine Report. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease* (Tenth Edit, pp. 194–199). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00025-9>
- Bolívar Zapata, F. G. (2017). *Transgénicos: grandes beneficios, ausencia de daños y mitos*. (A. M. de Ciencias, Ed.).
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.
- Bye, R., Liinares, E., Mata, R., Albor, C., Castañeda, C. P., & Delgado, G. (1991). Ethnobotanical and phytochemical

- investigation of *Randia echinocarpa* (Rubiaceae). *Anales Del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*, 62(1), 87–106.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- D'souza, L., D'silva, I., Mallya, S., Augustine, A. C., Rajendra, K., Kulkarni, K. R., & Cardoza, V. (1996). *Anacardium occidentale* L. (Cashewnut) L. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Trees IV* (Vol. 35, pp. 31–49). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-10617-4>
- De C. Silva, R., Camillo, J., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2012). A method for seedling recovery in *Jatropha curcas* after cryogenic exposure of the seeds. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 473–482. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i1.2782>
- de Mello A., J. M., & Fasolo, D. (2014). *Polyphenol antioxidants from natural sources and contribution to health promotion. Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00020-7>
- Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(1), 18–25.
- Figueiredo, S. F. L., Albarello, N., & Campos Viana, V. R. (2001). Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) baill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(4), 471–475. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0083-1>
- Firenzuoli, F., & Gori, L. (2007). Herbal medicine today: Clinical and research issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(SUPPL. 1), 37–40. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem096>
- Galili, S., & Hovav, R. (2014). Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in dry seeds. In *Polyphenols in Plants* (pp. 305–323). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397934-6.00016-4>
- Gallardo-Casas, C. A., Guevara-Balcázar, G., Morales-Ramos, E., Tadeo-Jiménez, Y., Gutiérrez-Flores, O., Jiménez-Sánchez, N., ... Castillo-Hernández, M. C. (2012). Ethnobotanic study of *Randia aculeata* (Rubiaceae) in Jamapa, Veracruz, Mexico, and its anti-snake venom effects on mouse tissue. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18(3), 287–294. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000300006>
- Gandhimathi, S., & Stella Bai, G. V. (2013). In vitro antioxidant activity of *Randia dumetorum* lam leaf extract. *International Journal of Herbal Medicine*, 1(4), 107–111. Retrieved from <http://www.florajournal.com/archives/2013/vol1issue4/PartA/17.1.pdf>
- Gannoun, S., Lionakis, S. M., & Gerasopoulos, D. (1995). Aspects of in vitro culture of *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera*. *Acta Horticulturae*, 419(32), 201–206. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.419.32>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2007). *Plant Propagation by Tissue Culture*. (E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. De Klerk, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Govil, S., & Gupta, S. C. (1997). Commercialization of plant tissue culture in India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1), 65–73. <https://doi.org/10.1023/A:1005873221559>
- Gulnaz, A. R., Moutawe-Abdelrhim, M. A. El., & Chauhan, J. B. (2014). Antimicrobial, antioxidant activities and phytochemical analysis of ethanolic extract of *Randia uliginosa* leaves. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 1–12.

- Gupta, P. P. (1986). Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/BF00037756>
- Hesami, M., Daneshvar, M. H., & Lotfi-Jalalabadi, A. (2017). Effect of sodium hypochlorite on control of in vitro contamination and seed germination of ficus religiosa. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 7(4), 2157–2162. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2017.537980>
- Hilgartner, S. (2001). Biotechnology. In *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (pp. 1235–1240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043076-7/03147-8>
- Hossain S, M., Al- Amin, M., Hossain-A, M., & Rana-S, M. (2016). Phytochemical, antimicrobial, anthelmintic and antidiarrhoeal activity of traditional plant *Randia uliginosa* Retz. *Natural Products Chemistry & Research*, 4(6), 0–4. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000245>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation : what polyphenols can do for us ? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2018). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. In *Herbal Medicine* (pp. 11–30). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Indu, S., Vijaya, L., Meeta, B., Jossy, V., & Naresh, C. (2013). Production of flavonoids in callus culture of *Anthocephalus indicus* A. Rich. *Asian Journal of Plant Sciences*, 12(1), 40–45. <https://doi.org/10.3923/ajps.2013.40.45>
- Juárez-Trujillo, N., Monribo-Villanueva, J. L., Alvarado-Olivarez, M., Luna-Solano, G., Guerrero-Analco, J. A., & Jiménez-Fernández, M. (2018). Phenolic profile and antioxidative properties of pulp and seeds of *Randia monantha* Benth. *Industrial Crops and Products*, 124(2018), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.052>
- Kala, S. C., Mallikarjuna, K., & Aruna, P. (2012). Qualitative phyto chemical analysis of seed and leaf callus extracts of *Canthium parviflorum* Lam. Guntur District, Andhra, Pradesh. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4), 177–182. Retrieved from <https://ijpbs.net/abstract.php?article=MTc4MA==>
- Kandimalla, R., Kalita, S., Saikia, B., Choudhury, B., Singh, Y. P., Kalita, K., ... Kotoky, J. (2016). Antioxidant and hepatoprotective potentiality of *randia dumetorum* Lam. leaf and bark via inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Frontiers in Pharmacology*, 7(JUL), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00205>
- Kasim, K., Syed, S. H., & Gulnaz, A. R. (2013). Antimicrobial efficacy of bark extracts of “*Randia uliginosa*” on oral pathogens: research study. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 2(24), 4260–4263. <https://doi.org/10.14260/jemds/829>
- Khoon-Huat, L., & Nagaratnam-P., D. (1989). Production of (–)-epicatechin by *Uncaria elliptica* callus cultures. *Phytochemistry*, 28(4), 1099–1100. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80191-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80191-8)
- Knyazev, A., Kuluev, B., Vershinina, Z., & Chemeris, A. (2018). Callus induction and plant regeneration from leaf segments of unique tropical woody plant *Parasponia andersonii* Planch. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 28(1), 45–55. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v28i1.37197>
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. In *Plant Biotechnology and Agriculture* (First Edit, pp. 131–138). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>
- Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (pp. 107–115). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

- Lerner, J. (1970). A simple laboratory experiment on PVP column chromatography. *Journal of Chemical Education*, 47(1), 32. <https://doi.org/10.1021/ed047p32>
- Li-Weber, M. (2009). New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.09.005>
- Li, Y. (2012). Qinghaosu (artemisinin): Chemistry and pharmacology. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9), 1141–1146. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.104>
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>
- Mahabaleshwara, K., Chandrasekhar, N., & Govindappa, M. (2016). Phytochemical investigations of methanol leaf extracts of *Randia spinosa* using column chromatography, HPTLC and GC-MS. *Natural Products Chemistry & Research*, 4(2), 1–15. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000202>
- Mahmoudifar, N., Chai, E., Dunstan, D., & Lane, A. (2000). Production and applications of novel plant cell culture polysaccharides. In *Hydrocolloids* (pp. 135–138). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044450178-3/50015-9>
- Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. D., & Aguilar, C. N. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.017>
- Muschietti, L., Vila, R., Filho, V. C., & Setzer, W. (2013). Tropical Protozoan Diseases: Natural Product Drug Discovery and Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2013/404250>
- OECD. (2013). *OECD factbook 2013: economic, environmental and social statistics*. OECD. <https://doi.org/10.1787/factbook-2013-en>
- Pan, M. J., & Van Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture - A review. *Plant Growth Regulation*, 26(3), 155–163. <https://doi.org/10.1023/A:1006119015972>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Paredes, F., José, J., & Fernández, R. (2002). Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Bioquímica*, 21(7), 96–100.
- Pełkal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Pérez-Espinosa, T. P., Castillo-Hernández, M. del C., Valadez-Omaña, M. T., & Gallardo-Casas, C. A. (2003). Evaluación toxicológica y efecto antinociceptivo en un modelo de dolor visceral del extracto etanólico de *Randia aculeata* (Crucetillo). *Revista de Toxicología En Línea*, 1(1), 50–57.
- Prabakaran, M., Kim, S. H., Sasireka, A., Chandrasekaran, M., & Chung, I. M. (2018). Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*. *Food Bioscience*, 26, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.003>
- Ray, P. D., Bo-Wen, H., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>. Reactive

- Renneberg, R., Berkling, V., & Lorocho, V. (2017). Green Biotechnology. In *Biotechnology for Beginners* (pp. 233–279). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801224-6.00007-2>
- Ritesh G., P., Nimish L., P., Jaimik D., R., L. D., P., & Nayna, M. B. (2011). Phytopharmacological properties of *Randia dumetorum* as a potential medicinal tree: An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(10), 24–26.
- Rout, G. ., Samantaray, S., & Das, P. (2000). In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*, 86(1), 71–79. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00130-8)
- Sánchez-Gallego, J. I. (2009). *Efecto de la quercetina y la rutina frente al daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol*. Universidad de Salamanca.
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). Natural Products Isolation: an overview. *Natural Products Isolation*, 864, 1–25. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>
- Satpute, K., Jadhav, M. M., Karodi, R., Rub, R. A., & Bafna, A. (2009). Immunomodulatory activity of fruits of *Randia dumetorum* Lamk. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(3), 036–040.
- Singh, N. K., Mishra, A. K., Gupta, J. K., & Jayalakshmi, S. (2010). *Randia spinosa* (Poir.): Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology -A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(1), 127–131.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Smetanska, I. (2018). Sustainable production of polyphenols and antioxidants by plant in vitro cultures. In *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems* (pp. 1–45). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5\\_2-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5_2-1)
- Smith, K. A. (2012). Louis Pasteur, the father of immunology? *Frontiers in Immunology*, 3(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00068>
- Stella, A., & Braga, M. R. (2002). Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(3), 271–276. <https://doi.org/10.1023/A:1013901909797>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). Plant physiology. In Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.), *Annals of Botany* (3rd edn., Vol. 91, pp. 283–308). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Tan, S. Y., & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin. *Singapore Medical Journal*, 56(7), 366–367. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015105>
- Thangavel, P., Prabhu, S., & Britto, S. J. (2014). High frequency shoots regeneration from nodal explants of *Plectranthus barbatus* Andrews belong to the Lamiaceae. *Journal of the Andaman Science Association*, 19(2), 126–135.
- Thanonkeo, S., & Panichajakul, S. (2006). Production of isoflavones, daidzein and genistein in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 28(1), 45–53.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Tilloo, S. K., Bodhankar, M. M., Waikar, S. B., & Pande, V. B. (2012). Antimicrobial activity of formulation containing bioactive extract of endocarp of *Randia spinosa*. *International Journal of Advances in Pharmacy Biology and Chemistry*, 1(2), 172–175.
- Trejo-Espino, J. L., Rodríguez-Monroy, M., Vernon-Carter, E. J., & Cruz-Sosa, F. (2011). Establishment and

- characterization of *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M.C. Johnst. cell suspension culture: a biotechnology approach for mesquite gum production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1687–1695. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0705-5>
- Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812(1–2), 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.028>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 2, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Valenzuela-Atondo, D. A., Delgado-Vargas, F., López-Angulo, G., Calderón-Vázquez, C. L., Orozco-Cárdenas, M. L., & Cruz-Mendivil, A. (2020). Antioxidant activity of in vitro plantlets and callus cultures of *Randia echinocarpa*, a medicinal plant from northwestern Mexico. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11627-020-10062-3>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2013). *Phenolic compound biochemistry*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Walia, N., Kaur, A., & Babbar, S. B. (2007). An efficient, in vitro cyclic production of shoots from adult trees of *Crataeva nurvala* Buch. Ham. *Plant Cell Reports*, 26(3), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0239-x>
- Xiao, S., Fang, X., Jiang, Z., Cheng, Y., & Ma, Y. (2017). Effects of warm water soaking and IAA soaking on germination of *Angelica sinensis* seeds. *Chinese Journal of Ecology*, 36(5), 1265–1270. <https://doi.org/10.13292/j.1000-4890.201705.006>
- Yang, Y., He, F., Yu, L., Ji, J., & Wang, Y. (2009). Flavonoid accumulation in cell suspension cultures of *Glycyrrhiza inflata* batal under optimizing conditions. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, 64(1–2), 68–72. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-1-212>
- Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T. Kahramanogullari, C., & Tuna, E. (2013). The Effect of Sodium Hypochlorite Solutions on the Viability and In Vitro Regeneration Capacity of the Tissue. *The Natural Products Journale*, 2(4), 328–331. <https://doi.org/10.2174/2210315511202040328>
- Yisau, J., Aduradola, A., Agboola, D., & Jayeola, O. (2015). Influence of pre-germination treatments on germination potentials and seedling vigour of *Albizia zygia* (D.C. Macbr.). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 19(3), 397. <https://doi.org/10.4314/jasem.v19i3.8>
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21(5), 559. <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>

## 11. ANEXOS

### Anexo 1 Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Medio MS suplementado con antioxidantes

Componentes	Solución stock (mg)	Concentración en el medio de cultivo (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>	<b>10 X</b>	<b>100 mL /L</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,500	1650
KNO <sub>3</sub>	19,000	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,400	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,700	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,700	170
<b>Micronutrientes</b>	<b>100 X</b>	<b>1 mL /L</b>
KI	83	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	6.20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2230	22.30
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860	8.60
NaMoO <sub>5</sub> .2H <sub>2</sub> O	25	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2.50	0.03
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.50	0.03
<b>Fe-EDTA</b>	<b>20 X</b>	<b>5 mL /L</b>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	745	37.30
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	557	27.80

---

<b>Vitaminas</b>	<b>100 X</b>	<b>1 mL /L</b>
Ácido nicotínico	50	0.50
Piridoxina-HCl	50	0.50
Tiamina-HCl	10	0.10
Glicina	200	2.00
Mioinositol	10000	100

---

<b>Antioxidantes</b>	<b>mg/L</b>
Ácido cítrico	100
Ácido ascórbico	150
Polivinilpirrolidona	500

---

## Anexo 2 Curva de calibración con ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales

Se realizó por el método de Folin-Ciocalteu reportado por Singleton *et al.*, (1999).

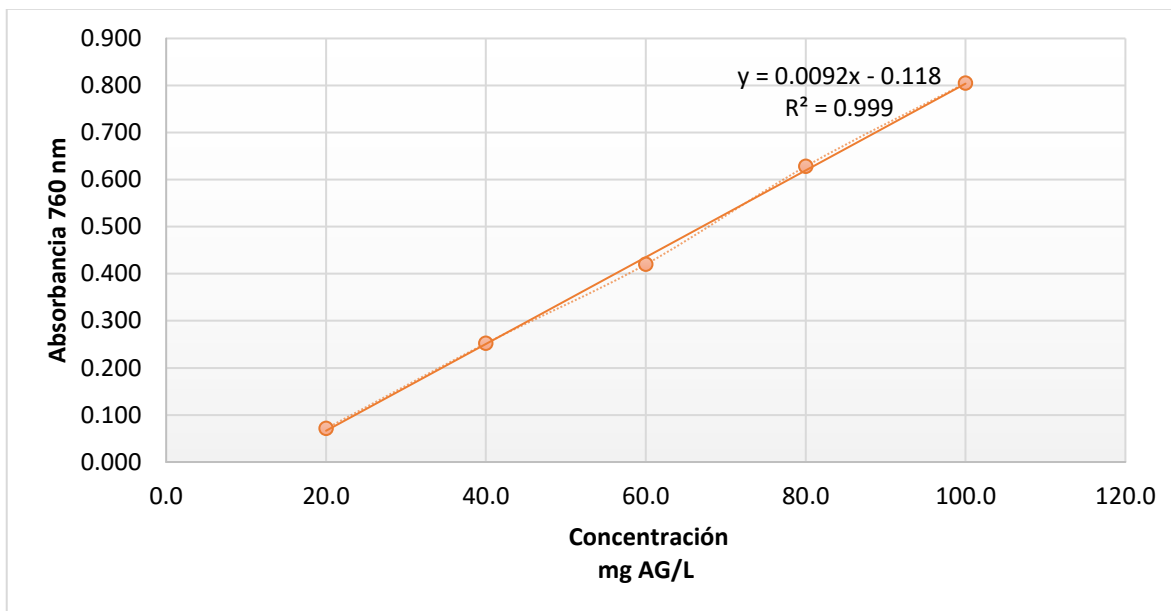
Concentraciones de ácido gálico (AG) para la curva patrón

No. de tubo	mg AG/L	$\mu$ L AG	$\mu$ L Agua
Control	0	0	200
1	20	40	160
2	40	80	120
3	60	120	80
4	80	160	40
5	100	200	0

Para la obtención de la curva de calibración:

1. Agregar el volumen ( $\mu$ L) de la concentración correspondiente de ácido gálico y agua en un tubo de vidrio
2. Añadir 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (1:10 en agua)
3. Homogeneizar con ayuda de vórtex y reposar por 5 min en oscuridad
4. Colocar 800  $\mu$ L de carbonato de sodio anhidro al 7.5% (p/v)
5. Homogeneizar con vórtex
6. Reposar en oscuridad a temperatura ambiente por dos horas
7. Leer la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro UV-VIS

Para la cuantificación de fenoles totales en las muestras de *Randia* sp, se tomaron 200 µL del extracto de la planta y se realizó el mismo procedimiento que para la obtención de la curva de calibración.



La ecuación resultante del modelo lineal fue utilizada para el cálculo de la concentración de fenoles totales.

$$\text{Ácido gálico (mg/L)} = ((D.O. + b) / m) * FD$$

Donde:

$b$ := ordenada al origen

$m$ := pendiente

$FD$ := factor de dilución

### Anexo 3 Curva de calibración para la determinación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó por el método de  $AlCl_3$  descrito por Pękal & Pyrzynska (2014).

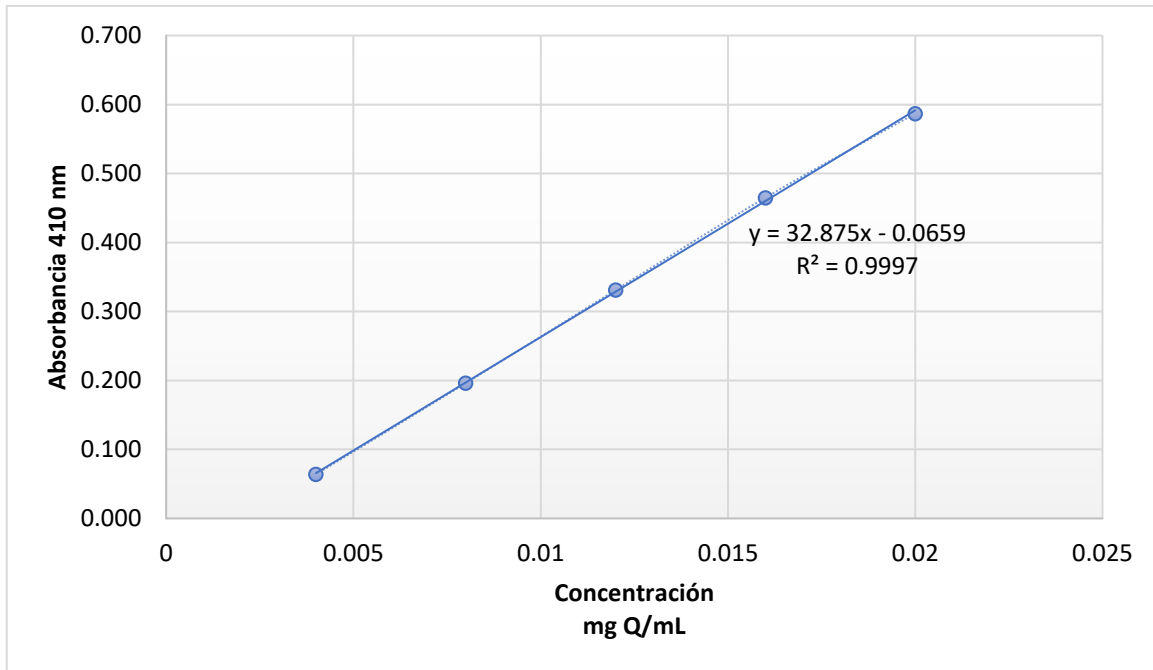
Concentraciones de quercetina (Q) para la curva patrón

No. de tubo	mg Q/mL	$\mu$ L Q	$\mu$ L Agua
Control	0.000	0	1000
1	0.004	200	800
2	0.008	400	600
3	0.012	600	400
4	0.016	800	200
5	0.020	1000	0

Para la obtención de la curva de calibración:

1. Agregar el volumen ( $\mu$ L) de la concentración correspondiente de quercetina y agua en un tubo de vidrio
2. Añadir 500  $\mu$ L de solución de cloruro de aluminio al 2% (etanol: agua) p/v
3. Mezclar con 500  $\mu$ L de agua destilada
4. Homogeneizar con vórtex
5. Reposar por 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad

Para la cuantificación de flavonoides en las muestras de *Randia* sp, se tomaron 1000  $\mu$ L del extracto de la planta y se realizó el mismo procedimiento que para la obtención de la curva de calibración.



La ecuación resultante del modelo lineal fue utilizada para el cálculo del contenido de flavonoides

$$\text{Quercetina (mg/mL)} = ((D.O. + b) / m) * FD$$

Donde:

*b*:= ordenada al origen

*m*:= pendiente

*FD*:= factor de dilución

**Anexo 4** Presentación de cartel en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

**XXVIII Congreso Nacional DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería  
León, Guanajuato  
23 al 28 de junio 2019

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A:

**Paulina Bernal-Arriaga, Juan Orozco-Villafuerte, Carla García-Morales, Leticia Buendía-González**

Por su participación con la contribución en cartel:

## CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN EXTRACTOS DE FRUTOS DE Randia sp. CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,  
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

*Jose Adelfo Escalante*  
Dr. Adelfo Escalante Lozada  
Presidente Comité Organizador

*Jaime Ortega López*  
Dr. Jaime Ortega López  
Presidente del Comité Organizador

*Sylvie LeBorgne*  
Dr. Sylvie LeBorgne  
Presidente del Comité Científico

**Leon**  
GTO  
leon-mexico.com