



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Avances fitoquímicos de *Buddleja cordata*: dilucidando la importancia del metabolismo secundario en el crecimiento y la protección ante factores de estrés.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A :

ALICIA MONSERRAT VAZQUEZ MARQUEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, junio de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A :

ALICIA MONSERRAT VAZQUEZ MARQUEZ

Comité de tutores

Dra. María Elena Estrada Zúñiga. Tutor Académico

Dr. José Correa Basurto. Tutor Adjunto

Dra. Cristina Burrola Aguilar. Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, 2024.

Resumen

La contaminación ambiental por metales pesados (MPs) ha ido en aumento en los últimos años; convirtiéndose en un problema a nivel mundial. Algunos MPs son esenciales para el crecimiento de las plantas, como Fe, Cu, Zn entre otros, sin embargo, su exceso en el suelo puede ser nocivo. Otros MPs no esenciales como el Cd, Cr, Pb, y Hg, pueden ser absorbidos por las plantas, y su exceso puede ser tóxico. Si las plantas pueden acumular MPs en sus órganos, éstos pueden ser transferidos al ser humano por la entrada a través de la cadena alimenticia, por lo que se han estado buscando soluciones efectivas y económicas de restauración de suelos contaminados, como la fitorremediación: la cual es una tecnología que hace uso de plantas estabilizar y eliminar contaminantes del agua y suelo.

Buddleja cordata (“tepozán”) es una planta utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar lesiones en la piel, diabetes. Sus efectos terapéuticos se han atribuido a los compuestos fenólicos que produce. Esta especie es capaz de crecer en una amplia variedad de hábitats, que incluyen suelos ultramáficos y sitios contaminados por MPs. Se ha reportado que los polifenoles de esta especie movilizaron Pb, Fe, Mn, entre otros. Podría ser que *B. cordata* posee la capacidad de tolerar MPs, pudiendo poseer mecanismos detoxificantes, que le permitan crecer, así como acumular compuestos fenólicos que contribuyan en su capacidad de tolerar y acumular MPs.

Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los MPs, sobre el crecimiento y la acumulación de compuestos fenólicos en plántulas *in vitro* y células en suspensión de *B. cordata*. En las plántulas cultivadas *in vitro* de *B. cordata*, la adición del ATC a 100 μM o 500 μM , Fe o Pb 500 μM , o la combinación de dichos MPs con ATC 500 μM no tuvieron un efecto significativo sobre la cantidad de biomasa producida, ni la longitud de la raíz y parte aérea, en comparación con el control. Sin embargo, la producción de compuestos fenólicos fue afectada por la concentración de ATC, el tipo de MP, el tiempo de incubación, y el tipo de órgano. En términos generales, hubo una mayor acumulación de compuestos fenólicos, observada en el contenido de flavonoides y fenoles totales en presencia Fe o Pb, comparado con el resto de los tratamientos. Mientras en el cultivo de células en suspensión de *B. cordata*, las células fueron capaces de crecer en casi todas las concentraciones de MPs probadas (Cu, Fe, Mn y Zn) sin mostrar cambios en la cantidad de biomasa producida, además, acumularon cantidades significativas de dichos MPs, así como

la acumulación de compuestos fenólicos totales se vio afectada por el tiempo de exposición, con respecto a cada MP y a su concentración. Así, los resultados obtenidos del presente trabajo indican que *B. cordata* es capaz de tolerar altas concentraciones de los MPs Cu, Fe, Mn, Zn y Pb, pudiendo acumular cantidades significativas en sus células sin mostrar efectos adversos en su crecimiento, además de presentar cambios en la acumulación de compuestos fenólicos, los cuales podrían formar parte de los mecanismos detoxificantes de la especie.

Abstract

Environmental pollution by heavy metals (HMs) has increased in recent years and has become a worldwide problem. Some HMs are essential for plant growth, such as Fe, Cu, Zn and others, but their excess in the soil can be harmful. Other non-essential HMs, such as Cd, Cr, Pb, and Hg, can be taken up by plants, and their excess can be toxic. If plants can accumulate HMs in their organs, they can be transferred to humans by entering through the food chain, so effective and economical solutions for the restoration of contaminated soils are being sought, such as phytoremediation, which is a technology that makes use of plants to stabilize and remove pollutants from water and soil.

Buddleja cordata ("tepozan") is a plant used in Traditional Mexican Medicine to treat skin lesions, diabetes. Its therapeutic effects are attributed to the phenolic compounds it produces. This species can grow in a wide variety of habitats, including ultramafic soils and HM contaminated sites. The polyphenols of this species have been reported to mobilize Pb, Fe, Mn, among others. It could be that *B. cordata* can tolerate HMs, and may possess detoxification mechanisms, which allow it to grow, and accumulate phenolic compounds that contribute to its ability to tolerate and accumulate HMs.

Therefore, the aim of the present work was to evaluate the effect of HMs on the growth and accumulation of phenolic compounds in *in vitro* seedlings and suspension cells of *B. cordata*. In *in vitro* grown *B. cordata* seedlings, the addition of ATC at 100 μ M or 500 μ M, Fe or Pb 500 μ M, or the combination of these HMs with ATC 500 μ M had no significant effect on the amount of biomass produced, nor on the length of the root and aerial parts, compared to the control. However, the production of phenolic compounds was affected by ATC

concentration, HMs type, incubation time, and organ type. In general, a higher accumulation of phenolic compounds was observed in the content of flavonoids and total phenolics in the presence of Fe or Pb compared to the other treatments.

While in the suspension cell culture of *B. cordata*, the cells were able to grow in almost all the concentrations of HMs tested (Cu, Fe, Mn and Zn) without showing changes in the amount of biomass produced, in addition, they accumulated significant amounts of these HMs, as well as the accumulation of total phenolic compounds was affected by the exposure time, with respect to each HMs and its concentration. Thus, the results obtained from the present work indicate that *B. cordata* is able to tolerate high concentrations of the HMs Cu, Fe, Mn, Zn and Pb, being able to accumulate significant amounts in its cells without showing adverse effects on its growth, in addition to presenting changes in the accumulation of phenolic compounds, which could be part of the detoxification mechanisms of the species.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para cursar los estudios de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por el parcial financiamiento de los estudios de Doctorado, a través del proyecto 6769/2022CIB: “Establecimiento de cultivos celulares de plantas medicinales en un biorreactor”.

Al Centro de Investigación en Recursos Bióticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México, por los recursos utilizados para la realización de la investigación.

Índice de contenido

Resumen	IV
Abstract.....	V
Agradecimientos	VII
Índice de figuras	X
Índice de tablas	XII
Abreviaturas.....	XIII
1.1 Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	6
2.1 Contaminación ambiental y su riesgo a la salud humana	6
2.1.1 Tecnologías convencionales para la remediación de suelos.....	8
2.1.2 Fitorremediación.....	10
2.1.3 Mecanismos detoxificantes de las plantas acumuladoras de MPs.....	14
2.1.4 Plantas medicinales que crecen en presencia de metales pesados.....	21
2.2 Problemas de contaminación en México	23
2.2.1 Plantas que crecen en suelos contaminados en México	25
2.3 Buddleja cordata	33
2.3.1 Usos de B. cordata	34
2.3.2 Uso medicinal	35
2.3.3 Metabolitos secundarios de B. cordata	35
2.4 Metabolismo secundario	36
2.4.1 Compuestos fenólicos.....	38
2.4.2 Terpenoides	42
2.4.3 Interacción vías de biosíntesis de metabolitos secundarios.....	45
2.5 Cultivo in vitro	46
3 Justificación	47
4 Hipótesis	48
5 Objetivos.....	49
a. Objetivo general modelo biológico 1	49
b. Objetivos específicos modelo biológico 1.....	49
c. Objetivo general modelo biológico 2	50
d. Objetivos específicos modelo biológico 2.....	50
6. Materiales y Método	51
6.1 Establecimiento de cultivo de plántulas de B. cordata	51
6.1.1 Establecimiento de cultivos asépticos.	51

6.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación.	52
6.3 Adición de ácido trans-cinámico como inhibidor de la ruta de los compuestos fenólicos	52
6.4 Análisis del contenido de compuestos fenólicos	53
6.8 Tolerancia de <i>B. cordata</i> ante la presencia de altas concentraciones de Pb y Fe	53
6.9 Análisis estadístico	53
7. Resultados.....	53
7.1 Evaluación del efecto del ácido trans-cinámico sobre el crecimiento y morfología de plántulas in vitro de <i>B. cordata</i>	54
7.2 Producción de flavonoides y fenoles totales en plántulas in vitro de <i>B. cordata</i> expuestas ácido trans-cinámico	59
7.3 Evaluación del efecto de la adición de los metales pesados Fe y Pb sobre el crecimiento y morfología de plántulas in vitro de <i>B. cordata</i> expuestas a ácido trans- cinámico	61
7.4 Producción de compuestos fenólicos: flavonoides y fenoles totales en presencia de Pb y Fe en plántulas in vitro de <i>B. cordata</i> en expuestas ácido trans-cinámico	68
8. Discusión	77
9. Conclusión.....	83
10. Referencias bibliográficas	86
11. Efecto del Cu, Fe, Mn y Zn en el crecimiento y acumulación de metales pesados y de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de <i>B. cordata</i>	97

Índice de figuras

Fig. 1 Principales familias acumuladoras de metales.

Fig. 2 Características de los mecanismos detoxificantes de plantas

Fig. 3 Plantas que crecen en suelos contaminados en México

Fig. 4 Especies de plantas que crecen en México capaces de crecer en sitios contaminados

Fig. 5 *Buddleja cordata* taxonomía y distribución

Fig. 6 Ruta principal de la producción de flavonoides

Fig. 7 Rutas biosintéticas de los terpenoides

Fig. 8 Efecto en la viabilidad y oxidación de los explantes de *B. cordata* durante el proceso de cultivo

Fig. 9 Cinética de crecimiento de la raíz y parte aérea de plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a 100 y 500 μM ATC

Fig. 10 Cinéticas del peso seco de los órganos evaluado de las plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a 100 y 500 μM de ATC

Fig. 11 Efectos en la morfología de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas al ATC a 100 y 500 μM

Fig. 12 Efecto de la adición de ATC a 100 y 500 μM en plántulas *in vitro* de *B. cordata* sobre la producción de fenoles y flavonoides totales

Fig. 13 Cinética de crecimiento longitudinal de la raíz y parte aérea de plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 μM y Fe

Fig. 14 Crecimiento de raíz y parte aérea de las plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 μM y Pb

Fig. 15 Peso seco de los órganos evaluados de las plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 μM y Fe

Fig. 16 Evaluación del peso seco de raíz, tallo y hojas de plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 μM y Fe

Fig. 17 Efecto de la adición de 500 μM de Fe y Pb en la morfología de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas al ATC a 100 y 500 μM ATC

Fig. 18 Efecto de la adición de Fe en la acumulación de fenoles totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a ATC a 100 y 500 μM .

Fig. 19 Efecto de la adición de Fe en la acumulación de flavonoides totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a ATC a 100 y 500 μM .

Fig. 20 Acumulación de fenoles totales de cultivos de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a 500 μM Pb.

Fig. 21 Acumulación de flavonoides totales de cultivos de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a 500 μM Pb.

Índice de tablas

Tabla 1. Enfermedades ocasionadas por el exceso y deficiencia de MPs en seres humanos

Tabla 2. Concentraciones de metales para ser una especie hiperacumuladora de MPs

Tabla 3. Plantas utilizadas y estrategias en procesos de fitorremediación

Tabla 4. Incremento de metabolitos secundarios en plantas medicinales expuestas a MPs

Tabla 5. Concentraciones límite establecido por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para contaminantes en el suelo

Tabla 6. Límites de concentración de MP en productos de consumo humano

Tabla 7. Plantas que son capaces de crecer y tolerar MPs en México

Tabla 8. Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo con su estructura básica

Tabla 9. Concentraciones de NaClO y tiempos, para obtener cultivos asépticos

Tabla 10. Incremento de metabolitos secundarios en plantas medicinales expuestas a MPs

Abreviaturas

MS	Metabolitos secundarios
OMS	Organización Mundial de salud
MPs	Metales Pesado
ADN	ácido desoxirribonucleico
USD	Dólar estadounidense
mM	milimolar
μM	micromolar
BPA	buenas prácticas agrícolas
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
ROS	especies reactivas de oxígeno
RH	respuesta hipersensible
O₂	superóxido
OH-	radical hidroxilo
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
IPP	isopentil difosfato
DMAP	pirofosfato de dimetilalilo
PEP	fosfoenilpiruvato
PAL	fenilalanina amoniaco liasa
CHS	chalcona sintasa
Fegs	glucosidos feniletanoides
DMAPP	isómero alílico pirofosfato de dimetilalilo
MEP	Vía metil-eritritol fosfato
MVA	ruta del ácido mevalónico
MCB	medio de cultivo basal
ATC	ácido trans-cinámico
ANOVA	análisis de varianza

1.1 Introducción

Las plantas producen una serie de compuestos denominados Metabolitos Secundarios (MS) que les permite mejorar la competencia para sobrevivir y afrontar los desafíos que se presentan en su entorno (Nadeem y Ahmad, 2019). Los MS, son compuestos muy importantes para la defensa de la planta, se producen como respuesta ante factores bióticos y abióticos, ya que confiere la capacidad de supervivencia ante depredadores y microorganismos patógenos (virus, bacterias y hongos) y también contribuyen ecológicamente en la atracción de polinizadores, para la dispersión de semillas, así como en el establecimiento de relaciones simbióticas entre microorganismos (Verpoorte *et al.*, 2002; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Además, algunos MS, tienen importancia directa en el crecimiento de la planta, como los compuestos fenólicos, los cuales tienen una mayor distribución en plantas dado que forman parte de la síntesis de la lignina, la cual forma parte de la pared celular (Bourgard *et al.*, 2001). También determinan aspectos físicos de la planta como el color, sabor, aroma en plantas utilizadas en fines ornamentales o alimenticios y en plantas medicinales se atribuye las propiedades curativas, sin embargo, estas moléculas se encuentran en bajas cantidades por lo que se necesita un gran número de material vegetal para obtener suficiente cantidad de MS (Verpoorte *et al.*, 2002; Jamwal *et al.*, 2018). De forma general los MS en plantas representan menos del 1% de peso seco, pero también la concentración puede ser menor por lo que se ha buscado alternativas para como la obtención de MS a partir de las plantas (Georgiev, Weber y Maciuk, 2009).

Los MS se pueden clasificar de acuerdo con su ruta de biosíntesis en: compuestos nitrogenados, compuestos fenólicos y terpenoides. Los terpenos son el grupo más diverso de MS, además su función está relacionada a la defensa contra insectos y mamíferos, actuando como toxinas y limitando su uso como alimentación, mientras que, dentro de la dieta del ser humano actúan de forma preventiva en enfermedades como, por ejemplo, el licopeno y escualeno contra el cáncer (Jamwal *et al.*, 2018). Por otro lado, los compuestos fenólicos tienen diversas funciones en las plantas, tanto en el soporte y estructura y para la defensa de la planta contra el patógenos y herbívoros mientras en la salud humana aportan beneficios en

la salud, por su poder antioxidante, y la regulación de procesos celulares como la inhibición de enzimas, fosforilación de proteínas, etc. (de la Rosa *et al.*, 2019).

El uso de plantas como agentes medicinales es ampliamente utilizado dado que la Organización Mundial de salud (OMS) estima que alrededor del 80% de la población de los países en desarrollo dependen de la medicina herbal, para las necesidades básicas de salud; mientras que en países desarrollados el uso de medicamentos a base de plantas va en aumento (OMS, 2002). Dado que la práctica de la medicina tradicional genera confianza en la población, así como en la eficacia y en los pocos efectos secundarios que se conocen a diferencia de la medicina convencional (Youssef *et al.*, 2018).

Los principales objetivos del uso de plantas medicinales es aislamiento de compuestos bioactivos para ser utilizados como fármacos, así como el uso de la planta entera o partes de esta, para ser utilizada como remedio herbal (Fabricant *et al.*, 2000). Por lo que, el 20% de las plantas han sido utilizadas para conocer su función biológica con potencial farmacéutico como anticancerígeno, antioxidante, analgésico etc., a partir de los metabolitos secundarios (Nadeem y Ahmad, 2019). En consecuencia, es que muchos de los primeros medicamentos son derivados de plantas tales como la aspirina (corteza de sauce), digoxina (dedalera), morfina (amapola real), quinina (chinchona) y pilocarpina (jaborandi) (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

Es preciso tener presente que, las plantas que poseen compuestos valiosos económicamente están sufriendo sobreexplotación debido a la cosecha indiscriminada para usos como el medicinal, alimentario e industrial, además las actividades antropogénicas contribuyen a la posible disminución de las plantas hasta su probable extinción (Ebrahimi y Mokhtari, 2017). Por lo que se ha observado un aumento en la extracción de plantas medicinales del 8 al 15% por año, principalmente en Europa, Norteamérica y Asia debido al alza del consumo de plantas en la medicina tradicional (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018). Por lo que, se estima que aproximadamente dos tercios de las 50,000 especies de plantas medicinales son recolectadas de la naturaleza, además existe la preocupación por la disminución de las poblaciones vegetales, la pérdida de diversidad genética, extinciones y degradación del hábitat (Alagmir, 2017).

Esto como consecuencia al conocer que la mayoría de las drogas químicas tienen efectos secundarios y las personas prefieren el uso de hierbas medicinales, para tratar enfermedades con riesgos mínimos para la salud (Maleki *et al.*, 2017). Por lo que el uso de plantas medicinales y sus productos cada vez es más aceptado, acaparando la confianza de la población haciendo que las plantas sean usadas constantemente (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

Por consiguiente, la conservación de los recursos vegetales debe formar parte de los principales objetivos de la población. La conservación puede llevarse a cabo mediante 2 vertientes, la *in situ* y la *ex situ*. La primera, concierne a la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales, así como al mantenimiento y recuperación de especies cultivadas y domesticadas, en donde se hayan desarrollado. Mientras que la conservación *ex situ*, trata de conservar las especies fuera de su habitar natural (Engelmann y González-Arno, 2013). Una de las principales formas de conservación es a través de los bancos de germoplasma, de los cuales existen 1750 bancos a nivel internacional; otra forma, es por medio de jardines botánicos ya que permiten mantener alrededor de 80,000 especies en 2,500 jardines (Engelmann y González-Arno, 2013). Además, uno de los nuevos enfoques de la conservación, es a través del cultivo *in vitro* ya que permiten la recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma vegetal. Teniendo algunas ventajas, tales como plantas libres de enfermedades, se ocupa menos espacio, se considera de bajo costo, y gracias a las condiciones controladas la manipulación se facilita a corto y largo plazo, y se puede abastecer de semillas a los productores (Bonilla *et al.*, 2015). Por lo que, el utilizar las técnicas del cultivo *in vitro*, se puede obtener plantas para fines comerciales, obtener material vegetal para la establecer cultivos y, asimismo, obtener metabolitos secundarios (Bonilla *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios (MS) son moléculas que la planta sintetiza que no tienen una función directa en procesos del metabolismo primario y que forman parte de la adaptación de la planta con su entorno, además son utilizados como agroquímicos, saborizantes, fragancias, aditivos alimentarios, plaguicidas y productos farmacéuticos (Asgari *et al.*, 2017).

Dado el interés por encontrar nuevas moléculas terapéuticas a partir de plantas, el cultivo *in vitro* es una alternativa que permite realizar estudios sobre la bioquímica y fisiología de las plantas y además obtener mayores cantidades de MS. El cultivo, es un conjunto de técnicas

que permiten crecer células, tejidos y órganos en condiciones asépticas, nutricionales y ambientales controladas (Hussain *et al.*, 2012). Uno de los enfoques para aumentar la producción de MS, es mediante la manipulación de las vías metabólicas, inhibiendo y desviando el flujo de carbono hacia las vías secundarias de competencia con el fin de obtener uno varios compuestos (Brincat *et al.*, 2012). Además, esto permitirá conocer la importancia de los MS durante el crecimiento, ante factores de estrés y la producción de MS.

Una planta de importancia medicinal es *Buddleja cordata*, la cual se distribuye principalmente en México, es conocida comúnmente como “tepozán” o “topozan” (Ocampo-Acosta, 2003 y 2004). Es utilizada para tratar afecciones y padecimientos de salud, también como coadyuvante cuando hay enfermedades respiratorias, del riñón (Acevedo *et al.*, 1999, Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2018). La propiedad medicina es atribuible a los MS que la planta sintetiza, como los compuestos fenólicos y terpenoides. Algunos de los compuestos fenólicos reportados son: los ácidos hidroxicinámicos: p-coumárico, ferúlico, caféico y sinápico, el verbascósido y la linarina (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009), y los del grupo de los terpenos, el iridoide aucubina (antiinflamatorio) (Zeng *et al.*, 2020), el iridoide catalpol (neuroprotector), β -sitosterol (antiinflamatorio) y el estigmasterol (antitumoral) (Khan *et al.*, 2019) y el sesquiterpeno buddledina A (antifúngico contra *Trichophyton rubrum*, *Tricophyto interdigitale* y *Epidermophyton floccosum*) (Mensah *et al.*, 2000).

Por lo que se ha reportado que algunos MS de *B. cordata*, tienen importancia durante el crecimiento ante factores bióticos como el terpeno buddledin A, el cual forma parte de la defensa de la planta actúa como protector contra los hongos *Fusarium culmorum* y *Sordari fimicola* y que, además, presenta actividad antifúngica contra hongos dermatofitos (Houghton *et al.*, 2003); mientras otros MS ayudan a que la planta crezca ante factores abióticos, como las altas concentraciones de metales pesados, por lo que se observó que polifenoles presentes en lixiviados en hojas de *B. cordata* movilizan Fe, manganeso y Pb de los suelos (Quiroz *et al.*, 2002), lo que ha permitido que la planta sea capaz de crecer en condiciones adversas como los suelos ultramaficos los cuales tienen altas concentraciones de magnesio y metales pesados (Navarrete *et al.*, 2018 y Glaría *et al.*, 2006). No hay reportes en *B. cordata* sobre el impacto de la manipulación de las rutas de biosíntesis de los compuestos

fenólicos sobre el crecimiento y la vulnerabilidad de la especie ante factores estresantes como la presencia de metales pesados. Además, se ha observado que *B. cordata* es capaz de crecer en suelos ultramáficos, los cuales contienen altas concentraciones de Mg y otros metales pesados (Navarrete *et al.*, 2018 y Glaría *et al.*, 2006). Por lo que, el estudio de *B. cordata* puede funcionar como un modelo de estudio de la especie para conocer la importancia de los compuestos fenólicos durante el crecimiento y la protección contra metales pesados. Además, dado que *B. cordata* tiene la capacidad de crecer en presencia de metales pesados, es importante conocer si la planta es capaz de acumular metales en su organismo, dado que al ser un recurso curativo; los metales pesados podrían ser consumidos por el ser humano. Por lo que, es necesario investigar a las plantas medicinales que son capaces de crecer en sitios contaminados para evitar que grandes cantidades de metales pesados lleguen al consumidor (Street, 2012, Shah *et al.*, 2013).

En el presente proyecto de tesis se estudió la importancia de los compuestos fenólicos, en el crecimiento y su impacto ante la presencia de metales pesados Fe y Pb, de las plántulas *in vitro* *B. cordata*.

2. Antecedentes

2.1 Contaminación ambiental y su riesgo a la salud humana

La contaminación por Metales Pesados (MPs) en suelos es resultado de las actividades antropogénicas como la industrialización, urbanización, minería y agricultura, en donde se hace uso de plaguicidas, combustibles fósiles, fertilizantes, automóviles, entre otros; así como el desecho de diversas actividades como desechos nucleares, industriales, lodos residuales, combustión de combustibles, entre otras, las cuales tienen como consecuencia la acumulación de MPs en agua, suelo y aire, pero además los procesos naturales contribuyen de manera minoritaria a la acumulación de MPs como las erupciones volcánicas, mineralizaciones naturales, entre otros (Kushwaha *et al.*, 2015; Maleki *et al.*, 2017). Los MPs son compuestos con propiedades metálicas como ductilidad, conductividad, estabilidad con cationes y que, además, tienen una densidad mayor a 5 g/cm³ y número atómico >20, algunos metales como el mercurio (Hg), cadmio (Cd) arsénico (As), cromo (Cr), talio (Ti) y Pb (Pb) son peligrosos hasta en concentraciones muy bajas (Prieto *et al.*, 2009; Mandal *et al.*, 2014).

La contaminación ambiental por MPs, es un problema grave en la mayoría de los países del mundo, ya que representa una problemática para los ecosistemas, pero también se ha convertido en un problema para la salud humana (Asgari *et al.*, 2019). Los MPs presentes en el suelo pueden ser letales para la biota, además de tener consecuencias como pérdida de la fertilidad del suelo, desaparición de la vegetación, bajos rendimientos agrícolas y disminución de la biodiversidad, debido a la acumulación excesiva de MPs se vuelve toxica, ya que son capaces de sustituir metales esenciales alterando el metabolismo y crecimiento de las plantas (Jara-Peña *et al.*, 2014; Kushwaha *et al.*, 2015). Algunos MPs son esenciales para las plantas y animales (Fe, Cu, Zn) así como algunos micronutrientes Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni y Co, los cuales se necesitan en cantidades mínimas, pero el exceso afecta de manera negativa y puede resultar en efectos dañinos en el crecimiento de las plantas, afectar procesos respiratorios y fotosintéticos y afectar la funcionalidad del ADN (Ugulu, 2015; Lajayer *et al.*, 2019; Ranieri *et al.*, 2020). El Zn, en exceso puede limitar el crecimiento de los brotes y

de la raíz, y presentar clorosis en hojas jóvenes, el Cd, puede interferir en la absorción y transporte de otros elementos como el Ca, Mg, P y K, también las plantas pueden presentar clorosis, inhibición del crecimiento y muerte, por otro lado, el Cu, induce estrés e inhibición del crecimiento (Ugulu, 2015). Mientras que los metales pesados no esenciales como el mercurio interfieren en la actividad mitocondrial e induce estrés oxidativo y el Pb inhibe las actividades enzimáticas y provoca morfología anormal del crecimiento, de manera general afectando de forma negativa a los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas (Ugulu, 2015).

Existe un riesgo latente de los MPs a la salud humana, debido principalmente a la potencial entrada de a través de la cadena alimenticia, ya que los MPs son absorbidos por el productor primario y luego al ser consumidos por los niveles tróficos de consumidores (Asati *et al.*, 2016). Se considera que las actividades industriales son el principal problema de la contaminación ambiental por MPs, mientras que las aguas residuales contribuyen a la acumulación en sistemas fluviales urbanos (Liu *et al.*, 2018). El problema de los efluentes urbanos es el potencial riesgo de uso en actividades agrícolas lo que podría considerarse un ingreso a la cadena alimenticia a través de cultivos como las hortalizas (Mandal *et al.*, 2014). El exceso de MPs comienzan a representar riesgos para la salud humana (tabla 1), ya que se han observado enfermedades y trastornos relacionados a la toxicidad de los metales, como pérdida auditiva, discapacidades intelectuales, problemas de comportamiento, disfunción del sistema nervioso y cáncer (Mandal *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2018).

Tabla 1. Enfermedades ocasionadas por el exceso y deficiencia de MPs en seres humanos

Metales	Deficiencia	Exceso
Fe	Anemia	Hemocromatosis primaria
cromo	Hiperglicemia Aumento de grasa corporal	Cancerígeno
Zinc	Alteraciones en el desarrollo físico y cognitivo Hipogonadismo Enfermedades de la piel (alopecia, dermatitis postular, mala cicatrización)	Neurotoxina
Manganeso	Anomalías esqueléticas y reproductivas	Manganismo

Níquel		Pérdida de peso Pérdida de la visión Insuficiencia cardiaca y hepática Cáncer de pulmón, laringe, próstata, etc.
Cobre	Anemia Neutropenia Osteoporosis Arritmia cardiaca	Decoloración de la piel Dermatitis Enfermedades tracto respiratorio Daño hepático

Dobson *et al.*, 2004, Shah *et al.*, 2013, Restrepo *et al.*, 2016; Wessling-Resnick, 2017, Feoktistova *et al.*, 2018

La problemática con los MPs es que pueden generar daños en todos los organismos y además de los efectos bioacumulativos en distintas especies, como las plantas (Alcalá *et al.*, 2013). Otro recurso que se ve afectado por la presencia excesiva de MPs en el medio ambiente, son las plantas medicinales que al crecer en su entorno natural y estar en presencia de distintos metales pueden acumularlos (Maleki *et al.*, 2017). Por lo que es necesario encontrar estrategias efectivas y económicas ante los escenarios de contaminación por MPs, debido a los graves problemas que ocasionan al medio ambiente y a la salud.

2.1.1 Tecnologías convencionales para la remediación de suelos

Las tecnologías utilizadas para remediar el efecto de los contaminantes es por medio de procesos físicos, químicos, biológicos, térmicos y eléctricos utilizan mecanismos de contención, extracción, remoción e inmovilización, y de manera general la remediación de suelos *in situ* se considera uno de los tratamientos más rentables, ya que los contaminantes se tratan en el mismo sitio, la alteración del suelo se minimiza y además se evita que más personas estén en contacto con los contaminantes (Liu *et al.*, 2018). Algunas de las técnicas *in situ* son el lavado de suelos, extracción electrocinética, inmovilización química, y fitorremediación (Liu *et al.*, 2018).

El lavado de suelos es un proceso en el cual se separa los contaminantes por medio de técnicas físicas y químicas, además se puede combinar con otras tecnologías para tratar una mayor variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Una desventaja de este proceso es el costo del surfactante el cual es relativamente caro, pero también presentan el fenómeno de

adsorción, haciendo que se usa más cantidad del surfactante (Rosas *et al.*, 2013). La remediación electrocinética consiste en aplicar una diferencia de potencial con electrodos que se entierran en el suelo, para separar y extraer contaminantes, esta tecnología permite movilizar agua, iones y partículas cargadas (Aragón *et al.*, 2014); además, la eficiencia se reduce en sitios con humedad menor al 10%, y el sitio no debe presentar alta conductividad eléctrica (INE 2007). El costo de este proceso varía en cuanto a la cantidad de suelo y el tipo de contaminante, teniendo un costo aproximado de \$117 USD por m³ (Liu *et al.*, 2018). Por otro lado, la inmovilización química o solidificación, es una técnica de corto tiempo de implementación, pero se considera la última forma de remediación debido a que esta tecnología puede inhibir futuras restauraciones debido a que solidifica el suelo, además de un costo aproximado de \$1500 USD por m³ cubriendo gastos de material, perforación y mezcla (Liu *et al.*, 2018). Esta técnica solamente consiste en la adición de cal, cemento y otros compuestos a suelos con la finalidad de encapsular los contaminantes, sin embargo, no elimina ni extrae los contaminantes del suelo, pero inmoviliza los MPs y evita su transporte hacia organismos vivos (Xia *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018).

En general, la mayoría de las tecnologías de remediación mecánicas y fisicoquímicas, son complicadas de implementar, porque suelen ser costosas y tienen desventajas como la destrucción de consorcios bióticos, conducen a la pérdida de fertilidad y por ende la utilización del suelo para el crecimiento de las plantas (Yan *et al.*, 2020). En ese sentido se debe de encontrar alternativas efectivas y económicas ante los escenarios de contaminación por MPs. Una de las alternativas que está tomando relevancia es la fitorremediación, es una técnica efectiva para absorber o inmovilizar MPs, sirve para mitigar los riesgos ecológicos de los sitios contaminados, además de ser tener un bajo costo en comparación a técnicas convencionales (Noriega- Luna *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

2.1.2 Fitorremediación

La fitorremediación es la tecnología que usa plantas para estabilizar, transformar o eliminar contaminantes orgánicos y metales tóxicos, presentes en el agua, sedimentos y suelo (Ranieri *et al.*, 2020). Además, es considerada un método rentable y respetuoso con el medio ambiente, al ser una técnica sustentable para absorber e inmovilizar MPs, ya que puede ser utilizado para la descontaminación de suelos y agua (Noriega-Luna *et al.*, 2016; Asgari *et al.*, 2019). Las plantas que son capaces de crecer en suelos donde hay concentraciones tóxicas de MPs suelen tener distintas respuestas y esto dependerá de la especie, la concentración total del metal, la biodisponibilidad y las características fisicoquímicas del suelo, por lo que la respuesta se puede dividir en 3 categorías: excluidoras, acumuladoras e indicadoras, las plantas excluidoras, es donde la absorción y transporte de metales está restringido, las plantas indicadoras pueden acumular metales en las partes aéreas en proporción directa al contenido del suelo y las plantas acumuladoras, en donde la concentración de los metales es superior a la cantidad del suelo (Zhu *et al.*, 2018).

Se utilizan plantas con la finalidad de inmovilizar y almacenar MPs, en los tallos, raíces y hojas, se han establecido algunos parámetros para medir la capacidad de las plantas para almacenar MPs, el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de translocación (Santoyo-Martínez *et al.*, 2020)

La fitorremediación comprende diversas estrategias como la fitovolatilización, fitodegradación, fitoextracción, rizofiltración y rizodegradación (Oyuela *et al.*, 2017)

Fitovolatilización

Es la forma de descontaminación, en que la planta absorbe, transloca y volatiliza el compuesto, resultando en la dilución y descomposición fitoquímica en la atmósfera, sin embargo, podría considerarse peligrosa en zonas urbanas debido a la degradación de la calidad del aire y la potencial exposición de las personas al contaminante. Algunos de los MPs que pueden ser volatilizados son selenio, arsénico y mercurio (Limmer y Burken, 2016).

Fitodegradación

La planta absorbe los contaminantes y es capaz de degradarlo mediante el proceso metabólico de la planta o por medio de las enzimas que produce, descomponiendo los metales en formas simples y menos tóxicas (Muthusaravanan *et al.*, 2018). El proceso de fitodegradación es mejor en plantas con sistemas radiculares densos con una gran área superficial, enzimas que son utilizadas en la degradación, así como la producción de exudados (de Farias *et al.*, 2009).

Rizofiltración

También conocida como fitotransformación, esta técnica hace uso de plantas para eliminar los contaminantes del agua ya sea agua subterránea o agua superficial. Se usan plantas acuáticas o también se pueden usar plantas terrestres las cuales están en una plataforma, sin embargo las plantas utilizadas se deben de recolectar y posteriormente eliminarse (Oyuela *et al.*, 2017).

Fitoestabilización

La fitoestabilización hace uso de plantas de tipo excluyente, en donde las especies vegetales son capaces de acumular grandes cantidades de MPs en raíz, restringiendo la acumulación y evitando la transferencia a las partes aéreas de la planta (Covarrubias y Cabrales, 2017). Y también evitando la llegada de los contaminantes a las aguas subterráneas y por ende a la red alimentaria, ya que los metales no están disponibles en las hojas como alimento de los herbívoros; sin embargo, no es una solución permanente dado que los contaminantes siguen en el medio ambiente (Yongpisanphop *et al.*, 2017).

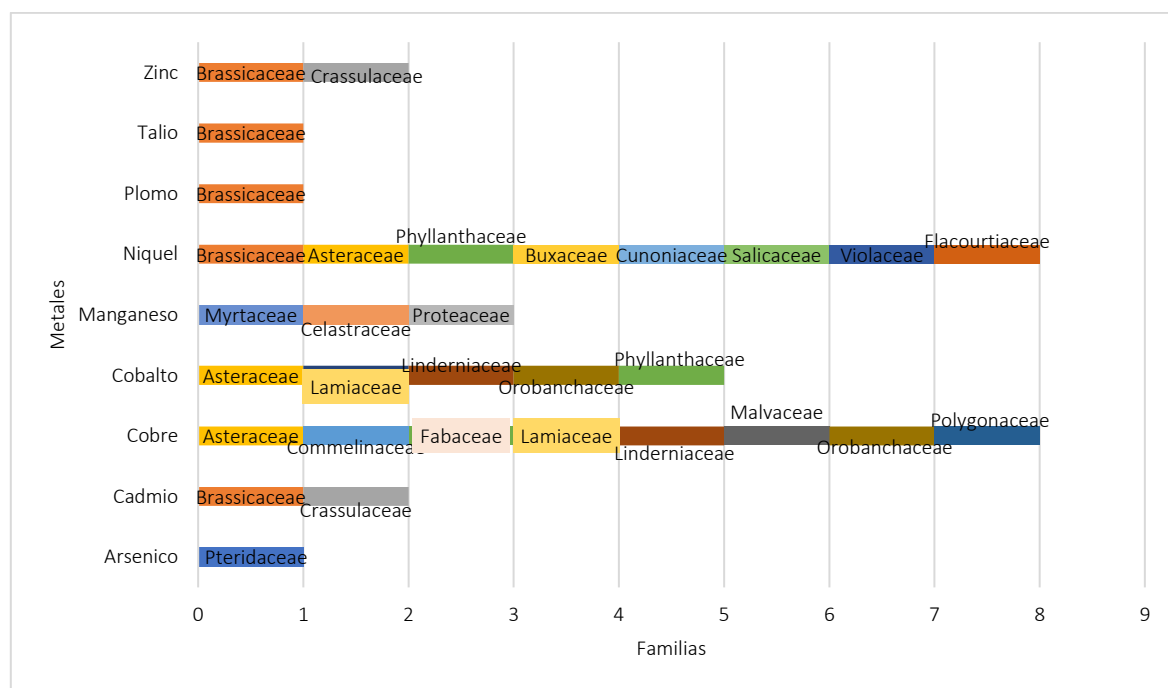
Fitoextracción

La fitoextracción, es la tecnología en donde se usan plantas del tipo acumuladoras, aquí los contaminantes son transportados de la raíz a las partes aéreas de la planta, en donde se puede cosechar y ser desechado o confinado (Covarrubias y Cabrales, 2017). También, ha recibido mayor atención debido a que representa una forma sencilla y rápida, además de ser una técnica en donde al utilizar las plantas para eliminar los MPs se puede cosechar las partes en donde se acumulan los MPs (Asgari *et al.*, 2019). Además, las partes cosechadas pueden ser quemadas, poner bajo otro tratamiento o ser reutilizadas con otros fines, sin embargo, puede

limitarse a sitios menos contaminados debido a que se necesitan varios ciclos de rebrote de las plantas. Por lo que el éxito de esta tecnología requiere de plantas que sean capaces de acumular los metales en la biomasa, resistir al estrés, rápido crecimiento, eficiencia de uso de agua y la resistencia a condiciones climáticas y edáficas (Ranieri *et al.*, 2020).

Dentro de este grupo de plantas algunas son capaces de acumular cantidades enormes de MPs y se les acuño el termino de “hiperacumuladoras”, en donde la cantidad varía según el metal (Tabla 2), como principio general las plantas son capaces de acumular 100 a 1000 veces más que las plantas acumuladoras promedio, además de no mostrar fitotoxicidad, basándose en la hipertolerancia que es una estrategia que les permite vivir en presencia de metales y evitar la intoxicación, se han identificado más de 450 plantas hiperacumuladoras capaces de acumular As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Ti y Zn (Rascio *et al.*, 2011).

Fig 1. Principales familias acumuladoras de metales.



Modificado de Kidd *et al.*, (2007); Reeves *et al.*, (2017). Creado en Microsoft Word

Una de las familias con la mayor cantidad de plantas hiperacumuladoras (aproximadamente 25%), es la Brassicaceae, además de ser la familia con la mayor capacidad de acumulación

de diferentes MPs (Fig. 1), otras familias con especies acumuladoras son Fabaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae y Chenopodiaceae (Verbruggen et al., 2009; Rascio et al., 2011)

Tabla 2. Concentraciones de metales para ser una especie hiperacumuladora de MPs

Metal	Concentración (peso seco)
Cd	100 mg/kg
As, Co, Cr, Ni, Cu, Pb, Sb, Se	1000 mg/kg
Zn, Mn	10000 mg/kg

Ullah et al., 2015; Oyuela et al., 2017

Las plantas son una alternativa frente a los métodos convencionales para remediar, sin embargo, se deben de realizar estudios de la capacidad de estas frente a los contaminantes. En la fitorremediación, los casos de éxito aumentan al usar especies endémicas de los sitios contaminados, debido a que estas plantas están adaptadas a las condiciones climáticas, así como los contaminantes de cada sitio (Covarrubias y Cabrales, 2017), ya que una desventaja de introducir especies no nativas es que podría ocasionar problemas a la diversidad (Noriega-Luna et al., 2016). Por lo que, se han llevado a cabo estudios en países (Tabla 3), que tienen algunos sitios contaminados con MPs, en donde se han investigado algunas plantas que son capaces de remover y eliminar contaminantes de los ecosistemas. Tal es el caso de *Eichhornia crassipes* (Arroyave, 2004), conocida como jacinto de agua; que fueron sembrados en canales de una industria demostrando una eficiencia en remoción de MPs y de solidos suspendidos (Tabla 3).

Tabla 3. Plantas utilizadas y estrategias en procesos de fitorremediación

Proceso de fitorremediación (planta/estrategia)	País	Utilización	Referencia
<i>Eichhornia crassipes</i>	Colombia	Remoción de 97% de los MP y 98% de solidos suspendidos	Arroyave (2004)
<i>Salix viminalis</i> , <i>S. dasyclados</i> y <i>S. schwerinii</i>	Suecia	16,000 hectáreas de plantaciones, remediación de fosforo 22 a 35 kg por hectárea/año.	Dimitriou y Aronsson (2005)
<i>E. crassipes</i> y <i>Pistia stratiotes</i>	Israel	Disminución de solidos suspendidos, disminución de demanda de oxígeno y turbidez.	Martelo y Borrero (2012)

“Beemats y BioHaven” Humedales flotantes	USA	Empresas crean las alfombras flotantes, donde se colocan diversas plantas para el tratamiento de aguas.	Lynch <i>et al.</i> , (2015)
---	-----	---	------------------------------

2.1.3 Mecanismos detoxificantes de las plantas acumuladoras de MPs

Las plantas que son capaces de crecer en presencia de metales se han adaptado desarrollando mecanismos biológicos que les ayuda a resistir y tolerar concentraciones toxicas de metales (Yongpisanphop *et al.*, 2017). Desde una perspectiva biológica, el proceso de hiperacumulación se basa en la absorción de MPs por las raíces, su translocación a las hojas y su compartimentación en células, por ejemplo, en paredes o vacuolas. Para evitar la toxicidad de MPs, estas plantas exhiben una mayor eliminación de ROS, producen exudados radicales, quelación de MPs con ligandos y producen proteínas de choque térmico (Fig. 2) (Hall *et al.*, 2002 y Kushwaha *et al.*, 2015).

Uno de los primeros procesos cuando la planta está expuesta a factores como sequía, inundaciones, MPs, temperatura entre otros factores abióticos es la producción de ROS, superóxido O_2^- , radical hidroxilo OH, el oxígeno O_2 y el peróxido de hidrogeno H_2O_2 . Estas moléculas forman parte del metabolismo de las células vegetales, pero la acumulación de estrés daña a las biomoléculas, debido a su naturaleza reactiva y toxica (Berni *et al.* 2018; Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Sin embargo, las plantas cuentan con un sistema doble de eliminación de ROS a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. El primer mecanismo es a través de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POD), el ascorbato peroxidasa (APX), el guayacol peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). La primera enzima que contrarresta el estrés oxidativo es la SOD, quien convierte el O_2^- en H_2O_2 . El cual se puede convertir en H_2O por medio de CAT, APX y GPX, así como el por ciclo ascorbato-glutación (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). El H_2O_2 , puede difundirse por las membranas dada su permeabilidad. Se considera de toxicidad mínima, pero en presencia de metales de transición; el H_2O_2 , produce OH. El cual se considera muy reactivo, causando daño oxidativo en toda la célula; debido a que desencadena reacciones radicales y es uno de los potenciales responsables de modificaciones irreversibles en las células, por lo que la eliminación del H_2O_2 , es primordial para mitigar el daño oxidativo (Sakihama *et al.*, 2002).

También POD y CAT pueden transformar a nivel intracelular el H₂O₂ y convertirlo en agua (Gong et al., 2020).

Mientras el segundo mecanismo se basa en compuestos como el glutatión (GSH), ácido ascórbico, prolina, y metabolitos secundarios; como flavonoides, carotenoides y fenoles (Berni *et al.*, 2018). Estos compuestos contribuyen a mantener un equilibrio ante la producción de ROS para la adaptación y supervivencia de las plantas ante condiciones de estrés (Yan *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). En especies hiperacumuladoras se ha observado una maquinaria antioxidante mejorada en comparación con especies no hiperacumuladoras, así como el aumento de genes de transporte; transferencia y acumulación en la vacuola (Manara *et al.*, 2020)

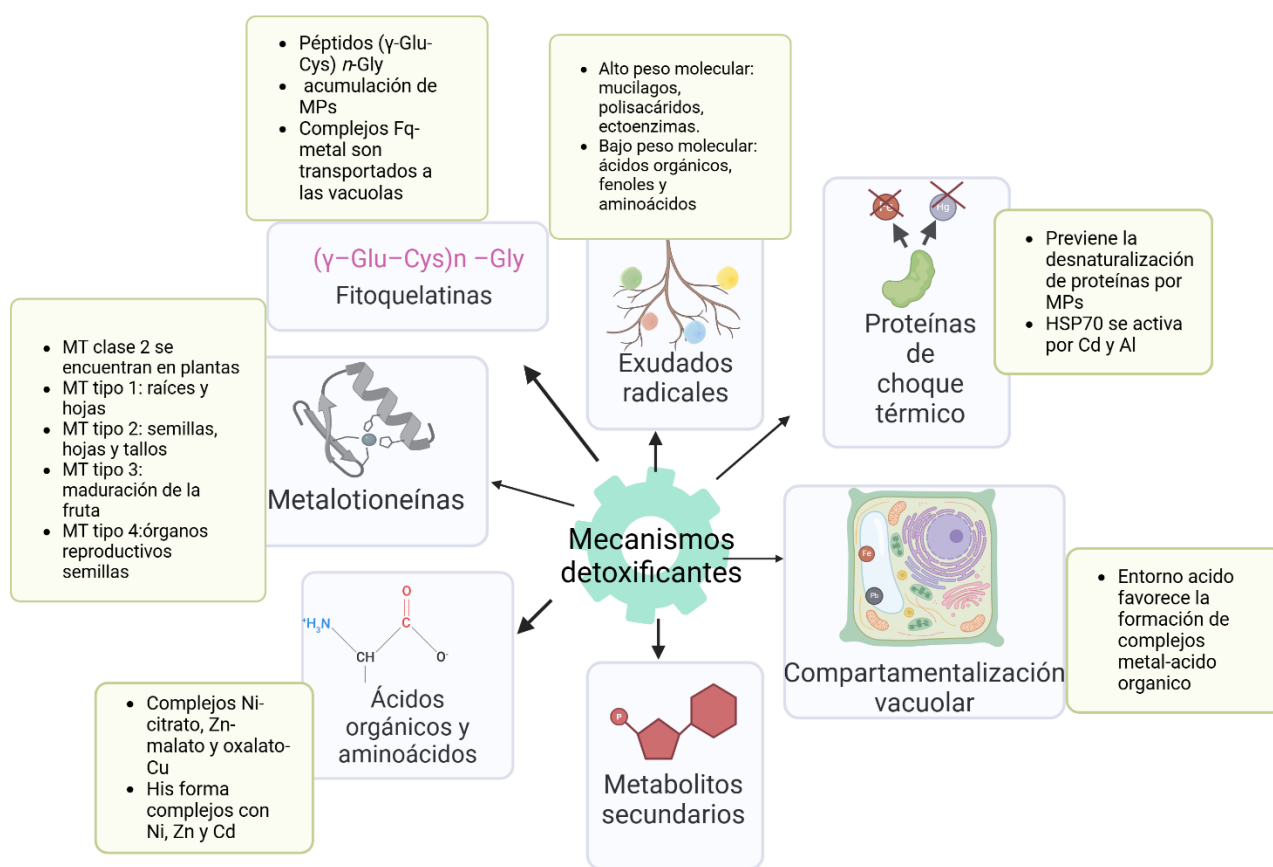


Fig 2. Características de los mecanismos detoxificantes de plantas. Creada con BioRender.com

Producción de exudados por raíces.

En la mayoría de las plantas, los exudados de las raíces pueden aumentar la absorción de algunos metales, principalmente micronutrientes como Fe, manganeso, cobre y zinc, a través de la quelación de MPs (Bais *et al.*, 2006). Las MPs se mantienen en las células de la raíz, donde son desintoxicadas mediante la formación de complejos con moléculas de bajo peso molecular, como aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos (como el oxálico, málico y cítrico) y compuestos fenólicos (Kushwaha *et al.*, 2015); Se ha descrito que muchos compuestos fenólicos pueden formar complejos con micronutrientes metálicos, lo que aumenta la biodisponibilidad de MPs (Bais *et al.*, 2006). De hecho, la composición de los exudados radiculares depende del estrés que se produce, incluido el inducido por MPs (Zhao *et al.*, 2018). En *Erigeron annuus* (Asteraceae), especie hiperacumuladora, un alto estrés por cadmio promueve la secreción de carbohidratos, lípidos, ligninas, proteínas, estructuras aromáticas y compuestos fenólicos tipo taninos; donde los carbohidratos, las estructuras aromáticas y los taninos se sugieren como un mecanismo importante para la tolerancia al cadmio (Zhang *et al.*, 2021), ya que se detectaron como nuevas moléculas producidas bajo el estrés del cadmio a diferencia del tratamiento control donde no se detectaron.

Captación de MPs por raíces y translocación a hojas

Los iones metálicos ingresan atravesando la membrana plasmática de las células de la raíz gracias al gradiente electroquímico por el potencial negativo que presenta la membrana plasmática, después los iones metálicos se mueven hacia el xilema mediante el movimiento simplástico y dentro del xilema, el movimiento se da por proteínas transportadores de membrana (Thakur *et al.*, 2016).

Algunos genes de proteínas de membrana son: familias de genes identificados como los ZIP, (ZRT), NRAMP (natural resistance-associated macrophage protein), YSL (yellow-stripe-like transporter), NAS (nicotinamine synthase), SAMS (S-adenosyl-methionine synthetase), FER (ferritin Fe (III) binding), CDF (cation diffusion facilitator), HMAs (heavy metal ATPases), and IREG (Iron regulated transporter) family (Memon, 2016).

Las familias de genes ZIP, están involucrados en el transporte de cationes como Fe, Mn y Zn. En *Arabidopsis* se encontraron 18 genes que codifica ZIPs, involucrados en la movilización del Zn (Memon, 2016). Mientras los NRAMP, movilizan a iones como Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , y Cd^{2+} , los NRAMP3 y NRAMP4 son localizados en el tonoplasto y controlan la exportación de Fe en vacuolas de semillas en germinación (Pasricha *et al.*, 2021).

Por otro lado, las YSL, tiene un papel importante en la homeóstasis de Fe y en el transporte de metales – NA, se han identificado genes de la familia TcYSL3 y TcYSL5 en raíces y brotes de *Noccaea caerulescens*, participando en la traslocación de nicotina y de complejos NA- metal (Sharma *et al.*, 2021).

Traslocación a hojas

Por otro lado, la eficiente traslocación de metales de raíz a brote de MPs se da por la sobreexpresión de genes de transporte de membrana que codifican ATPasas, del tipo P1B conocidas como HMA (ATPasas transportadoras de metales pesados); como la HMA4 se sobre expresa en hiperacumuladoras de Zn y Cd. Mientras que de la familia MATE (Multidrug and Toxin Efflux), el gen FDR3 se expresa en raíces de *T. caerulescens* y *A. halleri* (Rascio *et al.*, 2011). Los genes Nramp, que codifican a OsNramp1 implicados en el transporte de Cd en arroz, se expresa en raíces y hojas, cuando este se sobre expresa reduce la acumulación de Cd en raíces, pero aumenta la concentración en hojas (Tao y Lu, 2022). El hiperacumulador de Cd/zinc, *N. caerulescens* mostro una mayor traslocación de raíz a brote y un reducido secuestro de en las vacuolas de la raíz en comparación a la especie no acumuladora *N. arvense* (Lateinmaier 2013). Mientras en gen *NcNramp1* forma parte de la traslocación de Cd a través de la membrana plasmática, por lo que tiene un papel importante para la acumulación en la estela y la traslocación de raíz a brote (Tao y Lu, 2022).

Las plantas hiperacumuladoras tienden a secuestrar menos MPs en las vacuolas radiculares, pero existe un alto flujo en el xilema, debido a la composición del tonoplasto de las células radiculares (Pasricha *et al.*, 2021). En los hiperacumuladores *T. caerulescens* y *S. alfredii*, el Zn secuestrado en las raíces de las vacuolas es de 2 a 3 veces menor, mientras la salida de Zn de las vacuolas es dos veces más rápida a los no acumuladores (Rascio *et al.*, 2011). El transporte de los MPs se lleva a cabo en el flujo del xilema desde las raíces hasta los brotes como las hojas fotosintéticas, pasando por una interacción con las paredes celulares y la

eliminación de la savia del xilema, como en el hiperacumulador *Solanum nigrum* el cual transporta Cd, Co y Zn desde las raíces hasta el brote y después en el brote se distribuye a través del floema (Page y Feller *et al.*, 2015).

Compartimentalización de MPS

Uno de los mecanismos de gran importancia en las plantas hiperacumuladoras es la capacidad de acumular MPs en órganos de la superficie de la planta, como la epidermis, tricomas y cutícula (Rascio *et al.*, 2011). Otro de los mecanismos es la quelación de los ligandos con MPs para ser movilizados en paredes celulares y vacuolas (Rascio *et al.*, 2011). Una gran cantidad de MPs se acumulan entre la membrana plasmática y la pared celular. La pared celular inmoviliza y absorbe a los iones de MPs en el citosol, ya que proporciona grupos histidilo, sitios pecticos y carbohidratos extracelulares, como mucilagos y callos (komal *et al.*, 2015). Mientras el ácido poligalacturónico, de las pectinas de la pared celular actúan como un intercambiador de cationes, los MPS al unirse a los grupos carboxílicos de los de ácidos poligalacturónicos restringen la absorción de los metales en la planta (Dalvi *et al.*, 2013). Mientras que esta misma unión del grupo carboxilo de la pectina al Pb es una de las interacciones más importantes para poder tolerar la toxicidad el Pb (Kushwaha *et al.* 2015). El Pb es un metal que puede localizarse en paredes celulares, sitios intercelulares y las vacuolas, como se observó en la raíz de *Symphyotrichum drummondii*, donde el Pb se detectó en la pared celular y las vacuolas, mientras en la planta acumuladora *Sedum alfredii* se determinó poca movilidad de Pb en los haces vasculares, pero se observó mayor cantidad de Pb en las paredes celulares (Gupta *et al.*, 2013)

Cuando la planta se encuentra en presencia de concentraciones tóxicas de MPS, estos pueden ser transportados a la vacuola; este mecanismo disminuye los niveles de MPs tóxicos presentes en el citosol, siendo el sitio final de los iones metálicos y de MPs unidos a moléculas específicas, como las Fqs (Sharma *et al.*, 2016). Las plantas hiperacumuladoras almacenan grandes cantidades de HM, como Al, As, Cd, Ni, Se y Zn principalmente en las células epidérmicas, donde las concentraciones pueden alcanzar cientos de milimoles por litro (Lateinmaier 2013). Algunas de las proteínas involucradas en el transporte vacuolar son las de la familia de proteínas ZIP, transportadores ABC, ATPasas de metal tipo P y transportadores

CDF (Kushwaha *et al.*, 2015). Debido al entorno ácido de las vacuolas favorece la formación de los complejos metal-ácido orgánico, lo que facilita el secuestro de metales en las vacuolas por medio de los ácidos orgánicos (Syta *et al.*, 2021). La vacuola es el principal organelo de las células que almacena compuestos tóxicos y que además compartimentaliza iones metálicos (Mustafa *et al.*, 2016). Aproximadamente el 70% del Zn se almacena en las vacuolas de la epidermis de hojas maduras en *N. caerulea* (Lateinmaier 2013).

Quelación de MPs con ligandos orgánicos.

Uno de los mecanismos desintoxicantes más importantes de las especies hiperacumuladoras. Los ligandos pueden ser metalotioneínas, fitoquelatinas, ácidos orgánicos y aminoácidos (Cobbett 2000; Hall 2002). Las metalotioneínas de clase II son proteínas producidas en plantas sometidas a estrés abiótico, incluida la exposición a MPS a altas concentraciones (Dalvi *et al.*, 2013; Kushwaha *et al.*, 2015).

Las MT de clase II ayudan a contrarrestar el daño causado por las MPs al capturar ROS, activar genes de transcripción y regular las metaloenzimas (Saeed-Ur-Rahman *et al.* 2020). También proporciona protección antioxidante y ayuda a reparar la membrana plasmática (Dalvi *et al.*, 2013) y forma complejos de iones metálicos con los grupos tiol de las cisteínas (Kushwaha *et al.*, 2015). Algunos genes MT son inducidos por la presencia de cobre, estas proteínas están ligadas al cobre cuya relación estaría implicada en la tolerancia de la planta a la presencia de cobre para la expresión del gen MT tipo 2 en *Arabidopsis* (Cobbett y Goldsbrough 2002).

Las *fitoquelatinas* son péptidos sintetizados a partir de glutatión por la enzima glutamil cisteína dipeptidil transpeptidasa (también conocida como fitoquelatina sintasa) (Mishra *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2013). Estos péptidos pueden unirse a los MPs, un destacado mecanismo desintoxicante en las plantas que permite la prevención del estrés oxidativo celular (Gupta *et al.* 2013). La sobreexpresión del gen PCS tiene un papel importante en la acumulación y tolerancia de MPs en plantas, en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que no tienen PCS y no sintetizan Fq y son susceptibles a metales como cadmio y mercurio (Srivastava 2016). Los metales pueden inducir la expresión de diferentes genes de PC, en

algunas especies como *Oriza sativa*, donde el gen OsPCS7 es inducido por Hg y Pb, mientras que OsPCS9 por Cd y Zn y OsPCS5/-15 por Cd y As (Kumar et al., 2016).

Los complejos Fq-metal, son transportados a las vacuolas por medio de antiportadores metal/H⁺ o transportadores ABC (Dalvi et al., 2013). Ante un exceso de MPs, las Fq se acumulan en vacuolas, además son consideradas como indicadores de estrés por MPs (Solanki y Dhankhar 2011). Uno de los mecanismos para la desintoxicación de Pb es la formación de complejos por fitoquelación reduciendo el estrés generado en las plantas como en hierba vetiver (*Vetiveria zizanioides*) y *Ceratophyllum demersum* L., hacen uso de la inducción de fitoquelatinas (Gupta et al., 2013)

El citrato, el malato y el oxalato son ácidos orgánicos que transportan MPs a través del xilema, también secuestran MPs en la vacuola (Solanki y Dhankhar 2011). Entre las especies hiperacumuladoras de Cd/Zn, *Arabidopsis helleri* se encontró una gran cantidad de complejos de malato-zinc, y complejos de citrato-níquel en *Alyssum* y *T. goingingense* (Syta et al. 2021). La histidina es un aminoácido que forma complejos con níquel, zinc y cadmio. Se considera uno de los aminoácidos más importantes para la hiperacumulación (Verbruggen et al. 2009).

La nicotianamina (NA) es un precursor de ligandos en plantas gramíneas conocidos como fitosideróforos; se forma de la condensación de 3 moléculas de S-adenosil-metionina (SAM), catalizadas por la enzima nicotianamina sintasa (NAS). La nicotianamina está relacionada con la homeostasis del Fe (Callahan et al., 2006). La NA también es importante para la eliminación de Fe para evitar el daño oxidativo en las células cuando este se encuentra en exceso (Callahan et al., 2006). En *Alyssum lesbiacum*, una especie hiperacumuladora de níquel, se determinó una sobreexpresión constitutiva del gen TP-PRT1, dando lugar a una mayor producción de histidina que la determinada en *A. montanum* (Rascio et al., 2011).

Proteínas de choque térmico (HSP)

Son una clase de chaperones moleculares, que ayudan en el plegamiento y ensamblaje de proteínas (Hall 2000), actúan en presencia de temperaturas extremas, oxidación, MPs, deshidratación, heridas entre otros (Mishra et al., 2018), entre sus funciones está el proteger

y reparar otras proteínas en plantas estresadas y además previenen la desnaturalización de proteínas debido al estrés oxidativo por MPs (Kumar *et al.*, 2016). Hsp70, se activa al estar en *Arabidopsis* al estar en presencia de cadmio y aluminio, y también en tomate, álamo, y soja (Mishra *et al.*, 2018), mientras multiple stress-responsive gene 3 (OsMSR3), gen de una HSP, se expresó en un transgénico de *A. thaliana*, mostro tolerancia y acumulación al cobre, mostrando mayores tasas de supervivencia y menor formación de malondialdehído (MDA), OsMSR3, ayudo a estabilidad de la membrana plasmática por el daño provocado por el cobre (Cui *et al.* 2019).

2.1.4 Plantas medicinales que crecen en presencia de metales pesados

Las plantas medicinales forman parte importante de la atención sanitaria primaria en todas las culturas del mundo, hasta el 40% de los medicamentos modernos provienen de plantas medicinales por lo que su uso ha ido en aumento; sin embargo, este recurso natural es limitado (Asif *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, en las últimas décadas se ha informado de la acumulación de MPs en plantas medicinales que son vendidas en mercados. La acumulación de los MPs depende del tiempo y la concentración a la que estuvieron expuestos las plantas medicinales por lo que acumulación puede fluctuar entre el 5 y 10% del peso seco (Nasim *et al.*, 2010).

La presencia de los MPs puede afectar de manera negativa el crecimiento y desarrollo de las plantas medicinales y producir alteraciones en la germinación de las semillas, disminución de la biomasa y área foliar, reducción de longitud de raíces y brotes (Nasim *et al.*, 2010). También afectan las actividades metabólicas, como la producción de proteínas, pigmentos fotosintéticos, azúcares y tioles no proteicos, esto puede ser producto de la inhibición de las enzimas implicadas en su biosíntesis (Nasim *et al.*, 2010)

Po lo tanto, las plantas expuestas a MP, presentan respuestas diferenciales a la producción de MS, tanto en síntesis y acumulación (tabla 4), estas respuestas pueden ser negativas como en *Hypericum perforatum* (hierba de san Juan), la cual al estar en presencia de níquel ya no produce hiperforina, mientras que en las respuestas positivas se puede ver el incremento de la concentración de MS como en *Ocimum tenuiflorum* (albahaca morada) induce la

producción de eugenol y *Bacopa monnieri* (hisopo de agua) incrementa los niveles de bacosido-A, a la par del incremento de Fe, entre otras (Fahimarad y Hatami, 2017).

Por ende, los MP podrían estimular la biosíntesis de MS en plantas medicinales, sin embargo, su utilización como potenciador de producción de MS se debe contemplar la seguridad del consumidor (Fahimarad y Hatami, 2017).

Tabla 4. Incremento de metabolitos secundarios en plantas medicinales expuestas a MPs

Plantas medicinales	Experimento	Metal pesado	Incremento de MS	Referencia
<i>Catharanthus roseus</i>	Cultivo de células en suspensión	0.05 a 04 mM Cd	Ajmalicin (alcaloide) 0.4 mM de Cd fue 3 veces superior al control y mayor excreción del metabolito en el medio de cultivo	Zheng <i>et al.</i> , 2004
<i>Matricaria chamomilla</i>	Cultivos en maceta	CuCl ₂ 2%,	Herniarin (compuesto fenólico) Después de 6 h de exposición aumento 3 veces con respecto al control Umbelliferone (compuesto fenólico): Aumento 9 veces con respecto al control	Eliašová <i>et al.</i> , 2004
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Cultivo de raíces peludas	Ag, Cu, Zn, Fe, Mn15–40 µM	30 µM de Ag, Tanshinone 1, Tanshinone IIA y cryptotanshinone (terpeno) Aumento de 2 veces	Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Maceta	Co 20 +Ni 25 mg/Kg en suelo	Flavonoides y antiocianinas Aumento con respecto de control	Eman <i>et al.</i> , 2007
<i>Vitis vinifera</i>	Cultivo de células en suspensión	5 µM Cd y Ag	3-O-glucosyl-resveratrol (compuesto fenólico) Aumento de 1.6 veces	Cai <i>et al.</i> , 2013
<i>Stevia rebaudiana</i>	Cultivo de raíces peludas	Cd 100 µM Cd 200 µM	Stevioside (terpeno) Rebadioside A	Moradpour <i>et al.</i> , 2019
<i>Centella asiatica</i>	Plántulas en invernadero	Cd 200 mg/kg en suelo Pb 200-400 mg/kg en suelo	Asiaticoside (terpeno), Asiatic acid (terpeno), Madecassoside (terpeno), Madecassic acid (terpeno)	Biswas <i>et al.</i> , 2020
<i>Gymnema sylvestre</i>	macetas	Pb 200 mg/kg	Gymnemagenin (terpeno) Aumento de 2.56 veces	Sardana <i>et al.</i> , 2022

Por lo que, una buena opción es implementar las buenas prácticas agrícolas (BPA), para regular la producción y garantizar la calidad del cultivo de plantas medicinales. Las BPA incluyen distintos enfoques desde la ecología medioambiental, la recolección de la planta, verificar la calidad de los plaguicidas, así como la presencia de elementos metálicos. Además, las BPA garantizan que la materia prima de medicamentos a bases de plantas sea de una alta

calidad seguros y libres de contaminación. Debido a esto, algunos países las han implementado como por ejemplo China, que en lugares donde normalmente se cultivan las plantas medicinales se ha impulsado el uso de las BPA (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

2.2 Problemas de contaminación en México

Uno de los principales problemas de contaminación por MPs en México es la minería, debido al mal manejo de los desechos lo que ha ocasionado problemas en Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora, sin embargo, se desconoce la cantidad real de desechos de minas en todo el territorio mexicano, generando problemas ambientales que aún se desconocen (Covarrubias y Cabrales, 2017). Los desechos generados por minas contienen altas concentraciones de cadmio, arsénico, selenio, Pb, entre otros. Debido al mal manejo de los desechos estos son depositados en el medio ambiente sin ningún tratamiento, lo que ha provocado que los MPs afecten a lugares cercanos a las minas, generando contaminación de suelo, de aguas subterráneas, así como la disminución de la diversidad biológica (Noriega-Luna *et al.*, 2016).

Otro problema es el uso de aguas residuales, las cuales pueden ser originadas por los desechos de las minas, aguas residuales de industrias y municipales, y filtraciones de presas, estas aguas son usadas en el riego agrícola, lo que ha ocasionado la acumulación en el suelo debido al tiempo que se ha ocupado esta agua para regar cultivos, los principales metales acumulados son Ni y Pb, la consecuencia de del uso de agua residual es la acumulación en plantas como se ha observado en maíz, trigo y alfalfa, (Prieto *et al.*, 2009)

La contaminación de metales pesados en México abarca ríos, lagos, suelos y cultivos (Covarrubias y Cabrales, 2017). Generando un problema de salud debido a que los cultivos cercanos a fuentes de contaminación, pueden ser acumuladores de MPs; así como el cultivo de alfalfa, el cual es un alimento para el ganado vacuno, una investigación realizada determino que la leche tenía concentraciones de Pb superiores al límite internacional permitido (Castro-González *et al* 2018), también en cultivos de nopales, habas, y maíz se han encontrado concentraciones elevadas de Pb, As, Hg y Cd debido a que son regados con aguas negras, lo que puede generar un riesgo de salud para quien lo consume (Prieto-García *et al.*, 2007), y cultivos de fresa, los cuales tenían concentraciones altas de Zn, Cr y Pb (Dotor-

López et al., 2017). Es por ello que se deben de buscar alternativas para el manejo de residuos de MPs, para que estos no lleguen a los cultivos agrícolas y no generar riesgos para el ser humano. La NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, establece concentraciones límite, hasta los cuales se puede remediar los sitios contaminados, en donde no representen un daño al ser humano ni ecológico (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones límite establecido por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para contaminantes en el suelo

Contaminante	Concentración para uso agrícola /residencial/ comercial (mg kg⁻¹)
Arsénico	22
Bario	5400
Berilio	150
Cadmio	37
Cromo hexavalente	280
Mercurio	23
Níquel	1600
Plata	390
Pb	400
Selenio	390
Talio	5.2
Vanadio	78

La elevada toxicidad de los metales puede generar daños a la salud debido a la exposición prolongada y por bioacumulación, puede generar daños a órganos vitales, así como cáncer. La ingesta y la inhalación de MPs, son de las principales causas de contaminación, y el efecto toxico dependerá del tipo de metal, la concentración, así como la edad de la población. La FAO y la Unión Europea han establecido niveles máximos de concentración de riesgo de MP, en agua de consumo y en alimentos (Tabla 6) (Reyes *et al.*, 2016).

Tabla 6. Límites de concentración de MPs en productos de consumo humano

Metal pesado (mg/kg)	Mercurio	Arsénico	Cadmio	Pb
Producto				
Agua de consumo	0.001	0.05	0.003	0.01
Leche	-	-	-	0.02

Peces	0.5	2	-	-
Arroz	-	0.2	0.4	0.2
Hortalizas			0.5	0.1

Modificado de la FAO 1995 en Reyes et al. (2016)

Uno de los problemas ocasionados por MPs en México, es el envenenamiento de la población infantil en Torreón, Coahuila por Pb, cadmio y arsénico, debido a la mina de la compañía Peñoles la cual se encuentra en el centro de la ciudad, ocasionando que los niños tuvieran altos niveles de Pb en sangre, esto ocasiono problemas nerviosos, estomacales, renales, cerebrales y menor desarrollo de aprendizaje (Perezgasga y Morales, 1999).

Es por ello que la fitorremediación, representa una alternativa económica que podría ayudar a mitigar los escenarios de contaminación por MPs. Por lo que se estudiaron plantas que por su capacidad de crecer frente a la contaminación de metales tóxicos pueden usarse para remediar sitios contaminados. Por lo que, la remediación de MPs es necesaria para evitar la toxicidad en el medio ambiente y tratar de conservarlo para las generaciones futuras (Ullah *et al.*, 2015).

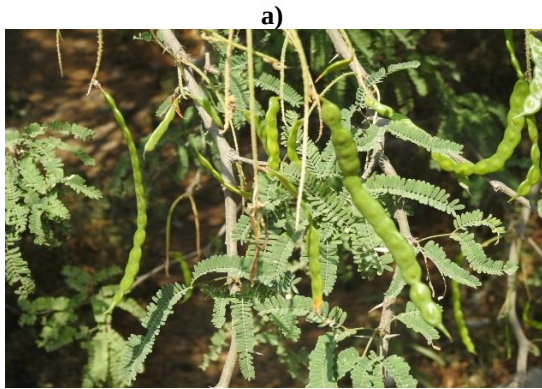
2.2.1 Plantas que crecen en suelos contaminados en México

Las plantas son capaces de crecer en sitios contaminados, hacen uso de dos estrategias para sobrevivir ante MP, como son la acumulación, en donde las plantas acumulan los metales en sus tejidos principalmente en las partes aéreas, y la exclusión donde las plantas restringen la movilidad de los contaminantes a las raíces (Wei *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2018). Se han realizado diversos estudios en plantas que crecen en lugares contaminados como el mezquite (*Prosopis laevigata*) (Fig. 3a) y el huizache (*Acacia farnesiana*) (Fig. 3b) (Armienta et al., 2008), el quintonil verde (*Amaranthus hybridus*) (Fig. 3c), la escobilla (*Buddleja scordioides*) (Fig. 3d) y el cametillo (*Cordia congestiflora*) (Fig. 3e) (Salas-Luevano *et al.*, 2009), ya que debido a su capacidad de crecer frente a la presencia de metales tóxicos pueden ser plantas usadas para remediar sitios contaminados. Diversos autores, exponen que es importante la selección de especies nativas, estas se adaptan mejor al clima regional, por lo que, el estudiar plantas que crecen en suelos contaminados es una forma eficaz de evaluar y

seleccionar plantas fitorremediadoras, mientras que el uso de especies introducidas podría representar un efecto negativo para el ecosistema (Noriega-Luna *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

En la zona semiárida de San Luis Potosí, se ha observado el crecimiento del mezquite (*P. laevigata*), que tiene la facultad de crecer en presencia de metales como As, Co, Cr, Cd, Cu, Pb, Ti, V y Zn (Alcalá *et al.*, 2013); además, de ser una planta endémica de México, capaz de acumular arsénico (87.2 mg kg^{-1} en tallo) (Armienta *et al.* 2008), así como, cromo y cadmio ($21,437 \text{ mg kg}^{-1}$ y 8090 mg kg^{-1} en brotes, respectivamente) considerándose un hiperacumulador de ambos metales, además podría ser utilizada para fitoremediar climas áridos y semiáridos (Buendía-González *et al.*, 2010).

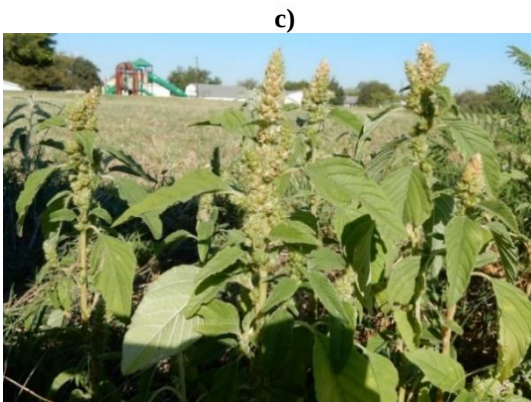
Mientras *B. scordioides*, conocida como escobetilla es capaz de crecer en zonas mineras, en donde fue capaz de tolerar y acumular Pb ($10.435 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$), siendo una planta que podría utilizarse para remediar suelos contaminados con Pb, teniendo la capacidad de crecer en zonas de climas templados y áridos (Salas-Luevano *et al.*, 2016). Por su parte, el tepozán (*Buddleja cordata*) (Fig. 3f) es un arbusto o árbol, de crecimiento rápido, que se encuentra en cuencas y en zonas de transición de pastizales y bosque, los lixiviados de hojas de esta planta contribuyeron a la movilización de metales como el Fe, manganeso y Pb (Quiroz *et al.*, 2002), también es capaz de crecer en presencia de cobalto, zinc, níquel, manganeso y calcio, siendo una planta con la capacidad de crecer en condiciones adversas (Navarrete *et al.*, 2018). Además, de ser plantas que tienen como característica la acumulación de metales, crecimiento rápido y una gran cobertura de suelos (Levresse *et al.*, 2012), la supervivencia de estas plantas ante suelos contaminados depende de los mecanismos de adaptación y tolerancia ante MP (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2016).



<https://www.naturalista.mx/observations/76391900>



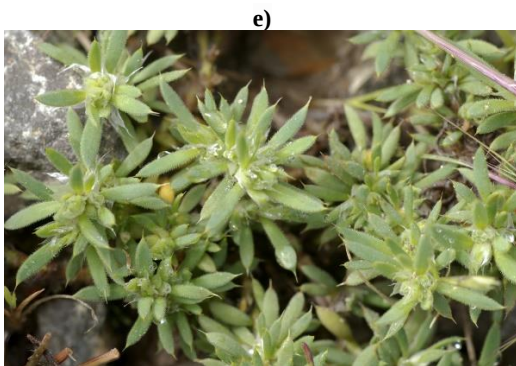
<https://www.flickr.com/photos/45835639@N04/5555619359/>



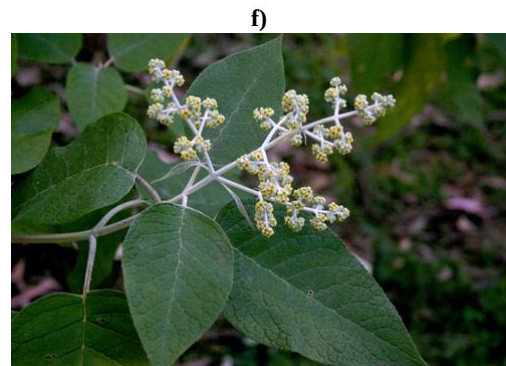
<https://www.naturalista.mx/observations/4271052>



<https://www.naturalista.mx/observations/8556579>



<https://www.naturalista.mx/observations/412182>



http://www.flickr.com/photos/tony_rodd/563982091/

Fig. 3 Plantas que crecen en suelos contaminados en México. a) *P. leavigata*; b) *A. farnesiana*; c) *A. hybridus*; d) *B. scordioides*; e) *C. congestiflora*; f) *B. cordata*. (imágenes tomadas de <https://www.naturalista.mx/taxa/>)

En México, se han estudiado plantas que son capaces de crecer en sitios contaminados (Tabla 7). Por lo que la CONABIO, informo acerca de las plantas que pueden ser utilizadas en zonas mineras, en las que destacan escobillón (*Buddleja scordioides*), la hierba loca (*Lupinus*

campestris), la uña de gato (*Mimosa aculeaticarpa*), huizache (*Acacia schaffneri*), rastrerita (*Cordia congestifolia*) y la gobernadora (*Larrea tridentata*), para fitorremediación mientras el mezquite (*Prosopis laevigata* y *P. glandulosa*), el pirul (*Schinus molle*) y el tepozán blanco (*Buddleja cordata*), además del escobillón (*B. scordioides*), el tepozán (*B. tomentella*), zacate plumoso (*Pennisetum villosum*) y la cola de zorra (*Cortaderia selloana*) para fitoestabilización.

Tabla 7. Plantas que son capaces de crecer y tolerar MPs en México

Especie	Familia	Tipo de planta	Origen	Metal	Estado	Referencia
<i>Prosopis laevigata</i> Mezquite	Fabaceae	leñosa	México	As	Hidalgo	Armienta <i>et al.</i> , 2008
<i>Acacia farnesiana</i> Huizache	Fabaceae	Arbóreo arbustivo, herbáceo	América tropical	As		
<i>Scirpus americanus</i> Totora	Cyperaceae	Herbácea, acuática	América del Sur	Pb, Cd, Cr, Mn	San Luis Potosí	Carranza-Álvarez <i>et al.</i> , 2008
<i>Typha latifolia</i> Tule cola de gato	Typhaceae	herbácea	Norteamérica	Pb, Cd, Cr, Mn		
<i>Polygonum aviculare</i> Sanguinaria	Polygonaceae	herbácea	Eurasia	Zn	Zacatecas	Carrillo-González y González-Chávez 2006
<i>Jatropha dioica</i> Sangre de drago	Euforbiácea	arbustiva	Texas y México	Zn		
<i>Eichhornia crassipes</i> Lirio acuático	Pontederiaceae	Herbáceo	América del Sur	Cr, Mn, Cd	CdMx	Carrión <i>et al.</i> , 2012
<i>Gnaphalium chartaceum</i> Gordolobo	Asterácea	Herbáceo	México	Cu, Mn, Zn, Pb	Guerrero	Cortés-Jiménez <i>et al.</i> , 2013
<i>Wigandia urens</i> tabaquillo	Boraginaceae	Arbustiva o Arborea	México, Colombia y Venezuela	Zn		
<i>Senecio salignus</i> Asomiate amarillo	Asterácea	Arbustiva	América del Norte	Zn		
<i>Ambrosia artemisifolia</i> Altamisa	Asteraceae	Herbácea y arbustiva	América del Norte	Zn	San Luis Potosí	Franco-Hernández <i>et al.</i> , 2010
<i>Flaveria angustifolia</i>	Asteraceae	herbácea	México	As, Cu, Pb, Zn		

contrayerba						
<i>Flaveria trinervia</i>	Asteraceae	herbácea	América del Norte	As, Cu, Pb, Zn		
<i>Centella Simsia amplexicaulis</i>	Asteraceae	herbácea	México y Guatemala	Cu		
<i>Acahual</i>						
<i>Solanum corymbosum</i>	Solanaceae	Herbácea	México y Perú	Cu		
Hierba mora						
<i>Brickellia veronicifolia</i>	Asteraceae	arbustiva	México	Pb, Zn		
Oregano de monte						
<i>Atriplex suberecta</i>						
Chamizo australiano	Amaranthaceae	herbáceo	Australia	Cd	Hidalgo	Hernández-Acosta <i>et al.</i> , 2009
<i>Cynodon dactylon</i>	Poaceae	herbacea	Europa y África	Mn		
pasto bermuda						
<i>Bouteloua curtipendula</i>	Poaceae	herbacea	América	Ni		
banderilla						
<i>Amaranthus hybridus</i>	Amaranthaceae	herbacea	América	Pb		
Quintonil verde						
<i>Buddleja scordioides</i>	Scrophulariaceae	Arbustivo	Sur de EUA y México	Pb	Zacatecas	Salas-Luevano <i>et al.</i> , 2009
Escobilla						
<i>Cordia congestiflora</i>	Caryophyllaceae	herbacea	México	Pb		
camatillo						
<i>Nicotiana glauca</i>	Solanácea	Herbaceo	Argentina y Bolivia	As, Cd, Pb, Zn	Querétaro	Santos-Jallath <i>et al.</i> , 2012
tabaquillo						

Tabla modificada de Covarrubias y Cabrales, 2016.

Mezquite (*Prosopis laevigata*)



Lex García. Todos los derechos reservados
<http://conabio.inaturalist.org/photos/2524157>

Huizache (*Acacia farnesiana*)



<https://www.flickr.com/photos/45835639@N04/5555619359/>

Totora (*Scirpus americanus*)



<https://www.naturalista.mx/observations/10483669>

Tule cola de gato (*Typha latifolia*)



<https://www.naturalista.mx/photos/71660452>

Sanguinaria (*Polygonum aviculare*)



https://www.unavarra.es/herbario/htm/Poly_avic.htm

Sangre de drago (*Jatropha dioica*)



<https://www.naturalista.mx/observations/513020>

Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*)



<https://www.naturalista.mx/photos/11948>

Gordolobo (*Gnaphalium chartaceum*)



<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/gnaphalium-chartaceum/imagenes/gnaphalium-chartaceum-inflor1.jpg>

Tabaquillo (*Wigandia urens*)



<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/hydrophyllaceae/wigandia-urens/imagenes/habito.jpg>

Chilca (*Senecio salignus*)



<https://www.naturalista.mx/photos/248497>

Altamisa (*Ambrosia artemisifolia*)



<https://www.naturalista.mx/photos/9438>

Contrayerba (*Flaveria angustifolia*)



<http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/11061?proyecto=Irekani>

Centella (*Flaveria trinervia*)



<https://www.naturalista.mx/observations/61280209>

Acahual (*Simsia amplexicaulis*)



<https://www.naturalista.mx/observations/35419552>

Hierba mora (*Solanum corymbosum*)



<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/solanum-corymbosum/fichas/ficha.htm>

Orégano de monte (*Brickellia veronicifolia*)



<https://www.naturalista.mx/observations/39958967>

Chamizo australiano (*Atriplex suberecta*)



<https://ecuador.inaturalist.org/observations/45251380>

Zacate bermuda (*Cynodon dactylon*)



<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/cynodon-dactylon/imagenes/habito.jpg>

Banderilla (*Bouteloua curtipendula*)



<https://www.naturalista.mx/observations/31320962>

Quintonil verde (*Amaranthus hybridus*)



<https://www.naturalista.mx/observations/4271052>

Escobilla (*Buddleja scordioides*)



<https://www.naturalista.mx/observations/8556579>

Cerdia congestiflora



<https://enciclopedia.mx/especies/200711-cerdia-virescens>

Tabaquillo (*Nicotiana glauca*)



<http://www.flickr.com/photos/12017190@N06/5474575748>

Fig. 4 Especies de plantas que crecen en México capaces de crecer en sitios contaminados

Sin embargo, muchas de las plantas que han sido estudiados con fines de fitorremediación son comestibles o medicinales; por lo que se necesitan más investigaciones con el fin de evitar la comercialización y consumo de plantas con grandes concentraciones de MP (Street *et al.* 2012, Fahimarad y Hatami, 2017).

1.12.3 *Buddleja cordata*

Buddleja cordata es una planta utilizada ampliamente en la medicina tradicional mexicana, además se ha observado que tiene la capacidad de crecer en sitios con grandes cantidades de MPs como el Fe, manganeso y Pb ((Navarrete *et al.*, 2018), así como en los suelos ultramáficos los cuales tienen Mg y otros metales en grandes concentraciones (Navarrete *et al.*, 2018)

Buddleja cordata kunth es un arbusto o planta que crece en México. Es conocido como palo de zorro prieto, tepozán grande, zomplante y tepozán (BTM, 2009). Esta planta es una especie dioica, puede crecer desde los 2 a 12 mts. Las hojas tienen peciolo de 1-4 cm largo cuentan con un margen entero, serrado o serrulado, haz tomentoso (Fig. 5A), con tricomas glandulares cerca de las nervaduras, inflorescencias terminales paniculadas 9-21 cm de largo, 8-24 cm de ancho, con 5 a 10 flores, corola campanulada, amarillenta con tonos anaranjados (Fig. 5D) la floración la llevan a cabo de septiembre a febrero (Ocampo, 2004). Las semillas que se dispersan pueden permanecer latentes, morir o germinar, si la disponibilidad de agua, nutrientes y luz es la adecuada; si la germinación ocurre dentro de febrero a mayo tendrán una mayor mortalidad. Al menos el 1 % de plantas que crecen son capaces de alcanzar un tamaño considerable (Mendoza, 2003)

La distribución se ubica entre el norte de México hasta Guatemala (Fig. 5C), se puede encontrar en bosque de *Pinus*, bosque de *Pinus-Quercus*, bosque de *Quercus*, en matorral xerófilo y pastizales, pero también es posible encontrarlo en lugares con vegetación secundaria, en parcelas de cultivo y ambientes urbanos en elevaciones de 1800-2700 m (Ocampo, 2003). Además, puede tolerar condiciones de sequía y puede crecer en suelos erosionados (Romero, Aguilar y Roja, 2003).



B Reino: Plantae
 Phylum: Tracheophyta
 Clase: Magnoliopsida
 Orden: Lamiales
 Familia: Scrophulariaceae
 Género: *Buddleja* L.
 Especie *Buddleja cordata* Kunth



Fig. 5 *Buddleja cordata* taxonomía y distribución

2.3.1 Usos de *B. cordata*

Esta planta es utilizada con el fin de reforestar áreas perturbadas, ya que permite modificar el microambiente y esto tiene como consecuencia la incorporación de otras especies, como el encino. También produce una gran cantidad de materia orgánica que aporta nutrientes al suelo y contribuye a la porosidad del suelo y gracias a su raíz profunda puede crecer en sitios rocosos y con pendientes, evitando la erosión ayudando al retener el suelo (Mendoza, 2003). Debido a lo anterior, puede ser una especie utilizada para la recuperación de zonas degradadas (Ramos-Palacios *et al.*, 2012). También, tolera la baja humedad y puede crecer en suelos pocos profundos, la hacen una planta adecuada para ser utilizada como una especie para reforestar la ciudad (Bravo-Bello *et al.*, 2020).

Mientras que la madera se usa como leña para los fogones de las casas y para construir y fabricar herramientas (Camacho-Morfín et al., 1998). Además, forma parte de la alimentación de pequeños rumiantes, debido a que tiene un alto valor nutricional (Navarro, 2001)

2.3.2 Uso medicinal

El uso medicinal se transmite por conocimiento de una persona a otra. *B. cordata*, es utilizada para dar baños posparto, en presencia de reumas, y cuando existen hemorragias nasales, náuseas, calambres y fiebre, la forma de uso se basa en utilizar 3 gr de la planta por un litro de agua, y beber una taza cada 6 horas por 10 días (SEMARNAT, 2010). También se utiliza, en lesiones de piel, tos, diabetes y calambres, la forma de uso es hervir hojas y ramas por 5 min en 2 litros de agua y beber 3 vasos al día por 15 días, mientras que el uso como baño se duplica la dosis (De la Rosa, 2011).

Debido a los diversos usos a esta especie se le atribuyen efectos curativos como analgésico, reparador del colapso uterino, ayuda a sanar úlceras y repara la función biliar, se considera astringente y antiséptico (Ortiz, 1996).

2.3.3 Metabolitos secundarios de *B. cordata*

La propiedad medicinal del tepozán se atribuye a los compuestos que la planta produce. Entre los compuestos se encuentran los del tipo fenólico y terpenoide. De los compuestos fenólicos se encuentran en la planta los ácidos hidroxicinámicos, p-cumárico (antioxidante), caféico (antidrepresivo), ferúlico (hipoglucemiante) y sinápico (antiinflamatorio), el flavonoide linarina (analgésico y antipirético) (Martínez-Vázquez et al., 1996 y 1998) y el glucósido feniletanoide verbascósido (antioxidante, antiinflamatorio) (Estrada-Zúñiga et al., 2009; Díaz Sánchez et al., 2000). Y del grupo de los terpenoides, se encuentran los sesquiterpenos como buddledina A (antifúngico contra *Trichophyton rubrum*, *Tricophyto interdigitale* y *Epidermophyton floccosum*) (Mensah et al., 2000), el iridoide aucubina (antiinflamatorio) (Zeng et al., 2019), el iridoide catalpol (neuroprotector), β -sitosterol (antiinflamatorio) y el estigmasterol (antitumoral) (Khan et al., 2020). Todos los MS, presentes en la planta forman parte de las interacciones con el medio ambiente, y su contacto con otros organismos. Los

compuestos fenólicos ayudan a sobrevivir a la planta cuando hay algún ataque de insectos, organismos patógenos y herbívoros, y otras condiciones de estrés como radiación, ultravioleta, temperaturas elevadas y deshidratación (Castillo *et al.*, 2012). Mientras los terpenos suelen ser los compuestos que le confieren aroma y sabor a las plantas, además de tener funciones principales como pigmentos fotosintéticos (carotenoides), reguladores de crecimiento y desarrollo, elementos principales de la membrana celular (González-López *et al.*, 2016). Algunas de las funciones de los MS dentro de la planta, tiene relación con su actividad biológica como, por ejemplo, la buddledina A y los polifenoles de los lixiviados de hojas de *B. cordata*.

Metabolitos Secundarios	Función ecológica	Actividad biológica
Terpeno: Buddledina A	Protección de raíces y tallo de la planta contra los hongos <i>Fusarium culmorum</i> y <i>Sordari fimicola</i> (Houghton <i>et al.</i> 2003)	Antifúngico contra hongos dermatofitos (Houghton <i>et al.</i> 2003)
Compuestos fenólicos: Polifenoles	Crecimiento ante condiciones adversas, como en los suelos ultramaficos; los cuales tienen altas concentraciones de Mg y metales pesados (Navarrete <i>et al.</i> , 2018)	Los polifenoles presentes en lixiviados de hojas contribuyen en la movilización de metales pesados (Fe, Mn, Pb) de los suelos (Quiroz <i>et al.</i> , 2002)

2.4 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios (MS), también conocidos como productos naturales, son moléculas de bajo peso molecular que la planta sintetiza y que no participa en el crecimiento y desarrollo básicos, pero le confiere la adaptación ante su entorno (Nascimento y Fett-Neto, 2010).

El desarrollo de los MS, data desde el periodo devónico en donde las plantas comenzaron a evolucionar, debido a que tenían que encontrar una forma de sobrevivir al ataque de los herbívoros, así como microorganismos infecciosos; y como medida de defensa tuvieron que producir compuestos bioactivos que repelen, disuaden o envenenan herbívoros o inhiben el crecimiento y desarrollo de organismos infecciosos. Los compuestos desarrollados pueden ser para la defensa de la planta, pero también sirven como mediadores entre las interacciones entre plantas (alelopatía), como atrayentes de polinizadores, para la dispersión de semillas y mediar la interacción de bacterias simbióticas (Wink, 2008).

La defensa de la planta ante condiciones de estrés, ataque de organismos o factores mecánicos, produce una respuesta local (sitio del ataque) o sistémica (sitio lejano al daño). La defensa local esta mediada por una respuesta hipersensible (RH), lo que conlleva la producción de ROS: superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH^\cdot$), y el peróxido (H_2O_2), la apertura de canales iónicos y la fosforilación y desfosforilación de proteínas, así como el aumento de ácido jasmonico, ácido salicílico y etileno, mientras que la respuesta sistémica se da la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis, producción de compuestos con actividad contra los patógenos y (Sepúlveda 2003).

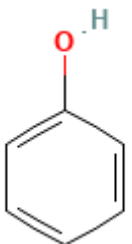
Los MS se pueden dividir de acuerdo con su ruta de biosíntesis en: compuestos nitrogenados, compuestos fenólicos y terpenoides. Los alcaloides son compuestos nitrogenados que cuentan con un átomo de nitrógeno en su estructura química, y que se sintetizan a partir de aminoácidos como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina y arginina, estos compuestos presentan actividad biológica que en los humanos genera respuesta a nivel de los neurotransmisores, a concentraciones alta pueden ser tóxicos, sin embargo, a dosis correctas son utilizados como relajantes musculares, tranquilizantes y analgésicos (Sepúlveda *et al.*, 2003; Avalos y Perez-Urria, 2009). Mientras que los compuestos fenólicos son compuestos con un anillo aromático y un grupo carboxilo se sintetizan a través de la ruta del ácido shikímico y cumplen diversas funciones durante el crecimiento (estructural en la pared celular, estimulación del crecimiento) así como en la supervivencia de la planta contra microorganismos y herbívoros, además de ayudar a la planta ante condiciones adversas como radiación ultravioleta (UV), temperaturas altas y deshidratación (Castillo *et al.*, 2012) y los terpenoides son compuestos que se derivan del isopentil difosfato (IPP) o del pirofosfato de

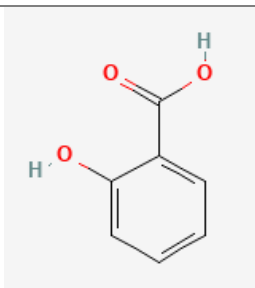
dimetilalilo (DMAP) se sintetizan a través de la ruta del mevalonato o la ruta del metileritritol fosfato. Algunos de estos compuestos como el isopreno, sesquiterpenos y diterpenos están implicados contra el estrés ambiental y permiten la reparación de heridas y lesiones. También los terpenos son componentes de los aromas volátiles que dan fragancia a las plantas, siendo una adaptación para atraer polinizadores o en otros casos sirven para la defensa contra patógenos, y además son compuestos potentes contra la inflamación, así como enfermedades cardiovasculares y cáncer (González López *et al.*, 2016; Battineni *et al.*, 2018).

2.4.1 Compuestos fenólicos

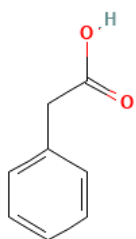
Los compuestos fenólicos son los MS más ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su vía de síntesis es a través de la vía del ácido shikímico y la vía del malonato, conocida como polietido; la producción de compuestos fenólicos representa una respuesta adaptativa y de defensa, cuando hay temperaturas extremas, infecciones por bacterias o virus, ataque de herbívoros y deficiencia de nutrientes, se han identificado compuestos fenólicos monoméricos, diméricos y poliméricos, los cuales se pueden clasificar de acuerdo al número de átomos de carbono y su estructura base (Tabla. 8) (Cheyner *et al.*, 2013). Los precursores de la vía son el fosfoenilpiruvato (PEP) y la D-eritrosa 4-fosfato los cuales se derivan del glucolisis y de la vía pentosas fosfato (Dudareva *et al.*, 2013). El aminoácido esencial de los compuestos fenólicos es la fenilalanina, la cual es catalizada por la fenilalanina amoniaco liasa (PAL) (Dudareva *et al.*, 2013)

Tabla 8. Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo con su estructura básica (Cheyner *et al.*, 2013)

Estructura	Compuesto
	Fenol simple, benzoquinonas
C6	Ácido fenólico

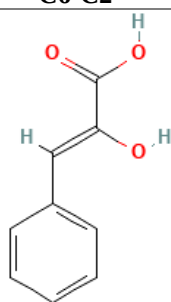


C6-C1



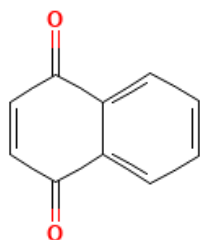
C6-C2

Ácido fenilacético



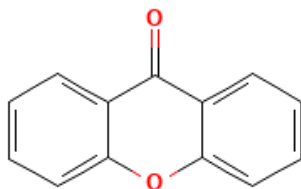
C6-C3

Ácido hidroxicinámico, cumarina fenilpropanos



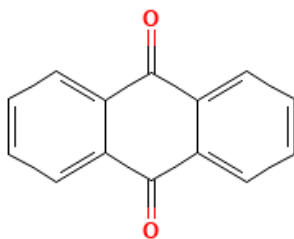
C6-C4

Naftoquinonas



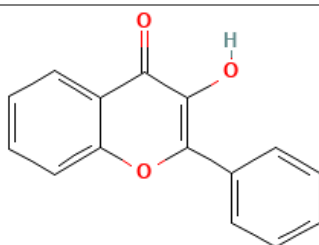
C6-C1-C6

xantonas



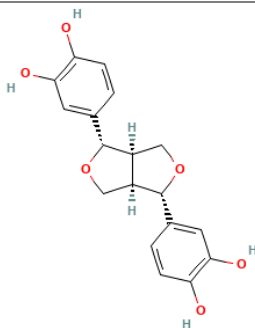
Antraquinonas, estilbenos

C6-C2-C6



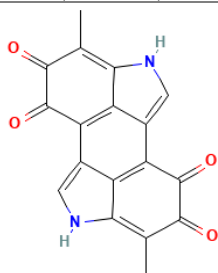
Flavonoides, isoflavonoides

C6-C3-C6



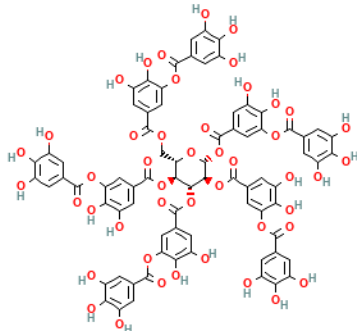
lignanos

(C6—C3)2



Catecol, melaninas

(C6) n



Taninos condensados

(C6-C3-C6) n

Estructuras tomadas de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Los flavonoides, son compuestos que brindan características fenotípicas que hacen atractivas a las plantas para la polinización como el color de las flores, sabor de las frutas, el aroma, así como resistencia hacia enfermedades y plagas. Además, son compuestos de importancia farmacológica que presentan actividades como antioxidante, antialérgica, antitumoral y antimicrobiana (Drago, 2007). Los flavonoides se sintetizan a partir del producto 4-cumaroil-CoA de la ruta de los compuestos fenólicos a través de la CHS (chalcona sintasa) (Fig. 6), la cual sería la enzima principal para la formación de los flavonoides (Drago, 2007).

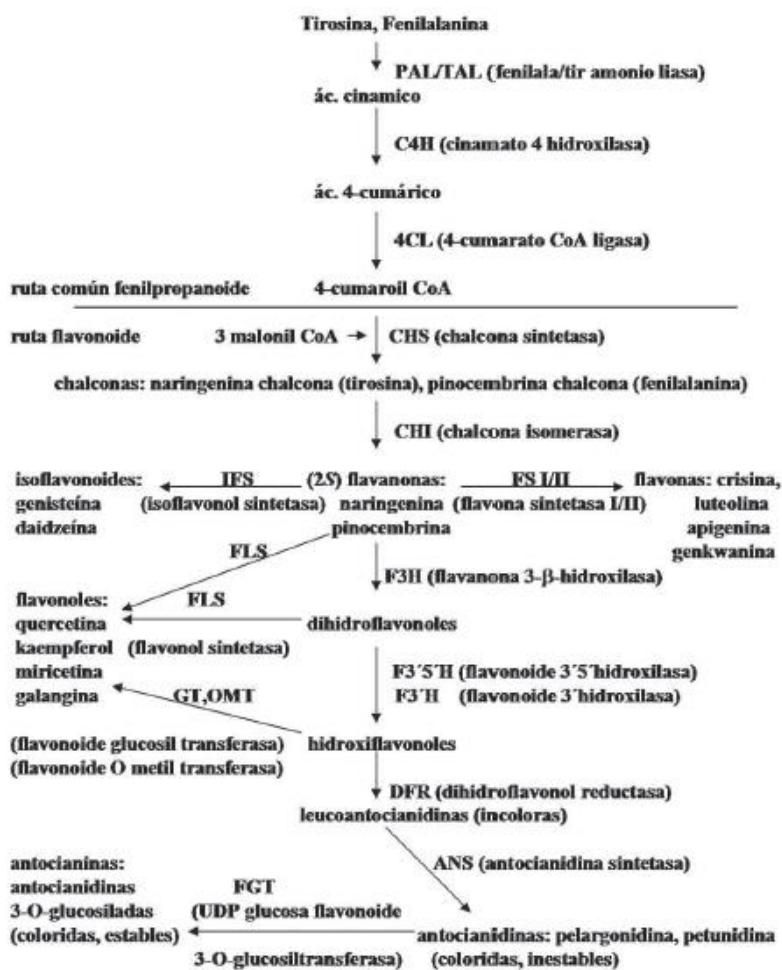


Fig. 6 Ruta principal de la producción de flavonoides

Los flavonoides se pueden dividir en 6 grupos, dependiendo la posición del anillo pirano, en los dos anillos de fenilo (A y B): flavonas, flavonoles, flavonones, flavanes, antiocianinas e isoflavonas. Las flavonas como la apigenina y la luteolina, son las más abundantes en frutas

y verduras; mientras que los flavonoles son compuestos antioxidantes, entre los que destacan kaempferol, quercetina y miricetina, es posible encontrarlas en verduras de hojas y en frutas como uvas, cerezas y manzanas, por otro lado, los flavonones, resaltan naringenina, eriodictyol y hesperetina, estos se encuentran en cítricos, así como en el orégano y la menta; mientras que los principales flavanes, son la catequina, epicatequina, galocatequina, son compuestos abundantes en el té, chocolate, vino tinto y nueces; en cambio las isoflavonas son conocidas como fitoestrógenos debido a la similitud de la estructura química con los estrógenos, estos compuestos son abundantes en la soja, frijol y cacahuete y las antocianinas, que son compuestos que se encuentran en frutas, como las uvas, ciruelas, durazno, nectarinas, entre los principales, se encuentran la pelargonifina, cianidina, delfinidina, poinidina,, petunidina y malvidina (De la Rosa *et al.*, 2019)

Los glucosidos feniletanoides (Fegs), son compuestos solubles en agua, los cuales son absorbibles por las células intestinales humanas y con una gran variedad de actividades biológicas (Cárdenas-Sandoval *et al.*, 2015), algunas de las actividades son: antibacterial, antitumoral, antiviral, neuroprotectora, actividad antioxidante, analgésica, antifatiga, cardioprotector entre otras (Tian *et al.*, 2020). Los Fegs se encuentran distribuidos en varias familias como Acanthaceae, Scrophulariaceae, Lenzaceae, Chicoraceae, Hibiscus, Magnoliaceae, Compositae, Verbenaceae y Plantaginaceae (Tian *et al.*, 2020).

Los Fegs, no son específicos a un tipo de órgano en la planta, es posible encontrarlos en las partes aéreas, corteza, raíces y también en cultivos celulares. La estructura de los Fegs, consta de 3 partes una molécula de hidroxifeniletilo (C6-C2), ácido cinámico (C6-C3) y un azúcar (di o tri sacárido). En los últimos años, han captado la atención de la comunidad científica, principalmente el verbascósido ya que se cuenta con una gran cantidad de literatura para conocer su uso en el tratamiento de distintas enfermedades y afecciones (Khalaf *et al.*, 2021).

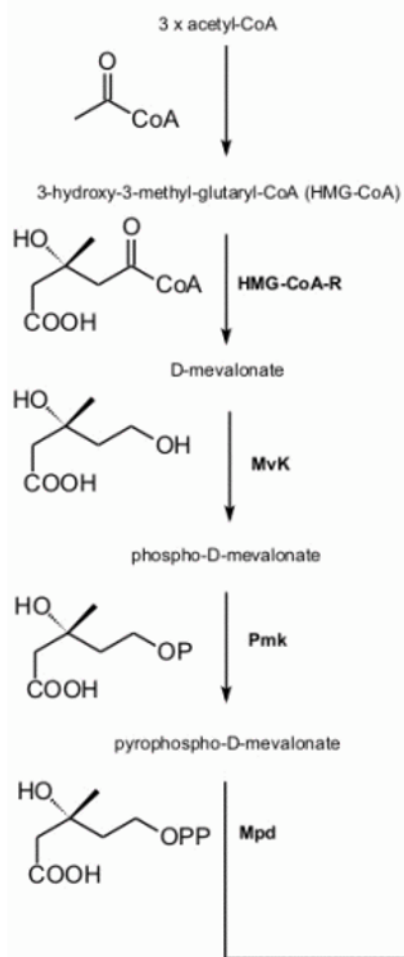
2.4.2 Terpenoides

Los terpenos son un grupo diverso de metabolitos, de los cuales muchos son volátiles, este grupo se origina a partir de las vías que producen las unidades de 5 carbonos (C5) isopentil difosfato (IPP) y el isómero alílico pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) estos se combinan

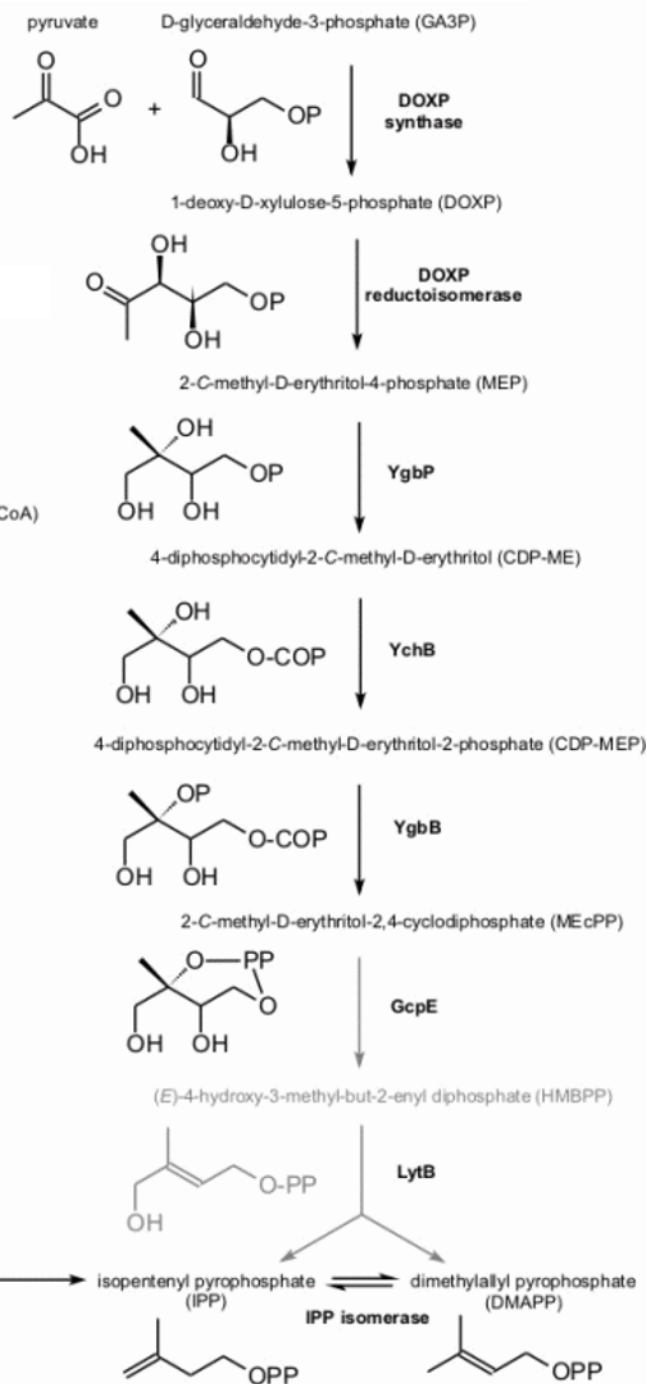
por medio de preniltransferasas a geranil difosfato (GDP), la condensación consecutiva de GDP con IPP, produce farnesilpirofosfato (FDP) y posteriormente el geranilgeranilpirofosfato para producir monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), respectivamente (Bartram *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2014)

Los terpenoides pueden derivarse de los plastidios mediante la vía metil-eritritol fosfato (MEP) y la segunda vía que se produce en el citosol, así como en el retículo endoplasmático y los peroxisomas, se llama ruta del ácido mevalónico (MVA) (Dudareva *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2014). De la vía MVA derivan los sesquiterpenos y esteroides, mientras que, de la MEP, se originan los monoterpenos, diterpenos y carotenoides (Bartram *et al.*, 2006).

Ruta del ácido mevalónico



Ruta del metileritritol 4- fosfato



<https://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/fig/formaisopentenil.gif>

Fig. 7 Rutas biosintéticas de los terpenoides

La vía del MVA (Fig. 7), consta de 6 reacciones enzimáticas, iniciando con la condensación de 3 moléculas de acetil-CoA, mientras la vía MEP, involucra 7 pasos enzimáticos, iniciando con la condensación de D-gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y piruvato para producir 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP); esta vía requiere compuestos del metabolismo primario para el suministro de piruvato y GAP, que son productos del glucolisis y de la vía de las pentosas fosfato (Dudareva *et al.*, 2013).

2.4.3 Interacción vías de biosíntesis de metabolitos secundarios

Las vías de biosíntesis de los MS han sido objeto de gran estudio, dado que se intenta entender su funcionamiento y así como, optimizar la producción de MS útiles. La activación de las vías secundarias se puede dar mediante moléculas como el ácido abscísico, ácido acetilsalicílico, etileno, jasmonato; que son producidas al estar en presencia de factores bióticos (herbívoros o patógenos) y abióticos (Nascimento y Fett-Neto, 2010).

La glucolisis y la vía de las pentosas fosfato, proporcionan los precursores de la vía del shikimato (comp. Fenólicos) y la vía MEP, en donde se da una competencia por el carbono dado que el 30% del carbono fijado durante la fotosíntesis se dirige a la fenilalanina para producir lignina (Dudareva *et al.*, 2013). Las vías de producción de terpenoides y compuestos fenólicos necesitan del carbono del metabolismo primario, por lo que se puede conjeturar después de ocupar los precursores, ambas vías funcionan por separado (Hojati *et al.*, 2016).

La interacción de las vías biosintéticas de los MS da como resultado, compuestos que necesitan de ambas vías para su producción como el paclitaxel, el cual su cadena principal se deriva del MVA, y la cadena lateral se deriva de la fenilalanina, esto se observó al inhibir la fenilalanina amonio liasa de la ruta del ácido shikímico, debido a esto la cantidad de paclitaxel disminuyó (Soliman *et al.*, 2011).

Con el fin de obtener mayores concentraciones de MS, una forma de aumentar la producción de estos es la manipulación de las vías metabólicas para destinar más recursos para la producción de una clase de compuestos, como es el desviar el flujo de carbono de las vías metabólicas secundarias de competencia (Brincat *et al.*, 2002).

Uno de los puntos clave de la producción de compuestos fenólicos, es donde se lleva a cabo la desaminación de la L-fenilalanina por medio de PAL para sintetizar el ácido trans-cinámico. Este compuesto tiene un papel principal dado que controla el flujo de carbono, al controlar la fenilalanina para producir compuestos fenólicos (Brincat *et al.*, 2002).

La adición del ácido cinámico actúa sobre PAL, debido a que reduce la transcripción y traducción de PAL, aceleran su degradación, además de inactivarla dado que el ácido cinámico modifica el residuo de dehidroalanina en el sitio activo de PAL (Brincat *et al.*, 2002)

2.5 Cultivo *in vitro*

La producción de MS a gran escala a través de cultivos de plantas está influida por factores ambientales, situaciones políticas y laborales de países productores, variaciones en la calidad de los cultivos, así como por el almacenamiento y manejo de las plantas. La tecnología del cultivo celular permite el estudio y síntesis de los MS, además uno de los objetivos es aumentar la producción de MS mediante la manipulación de los cultivos de células vegetales (Nadeem *et al.*, 2019). Además, representa una alternativa de uso de las plantas silvestres, y también una opción ecológica y sostenible para la propagación de especies vegetales que están en peligro, ya sea por explotación o en peligro de extinción (Dias *et al.*, 2016).

La producción y acumulación de MS a través del cultivo *in vitro*, puede ser a través de distintos estímulos de estrés que afectan al cultivo celular, modificando aspectos cuantitativos y cualitativos (García-Pérez *et al.*, 2021).

Una de las problemáticas que está afectando de manera global, es la contaminación ambiental la cual representa un grave problema, es por ello por lo que se están realizando estudios en plantas con la finalidad de conocer los mecanismos de transporte en los que están involucradas los MPs para encontrar alguna aplicación biotecnológica y tratar de restaurar ecosistemas contaminados. Por lo que, el cultivo de tejidos vegetales es una técnica que puede ayudar a entender la relación entre las plantas y los contaminantes, así como mejorar las plantas para ser más eficientes para los procesos de descontaminación (Maldonado-Magaña *et al.*, 2013)

3 Justificación

Buddleja cordata es una planta utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana; para tratamientos relacionados a enfermedades gastrointestinales y respiratorios (Martínez-Vázquez 1996 y 1998), la propiedad medicinal se les atribuye a los metabolitos secundarios que produce; además se conoce que la regeneración de la planta, así como la propagación por semilla es complicada (Ramos-Palacios *et al.*, 2012). También es una planta que podría utilizarse para reforestar áreas perturbadas porque produce mucha materia orgánica y podría usarse para reforestar ciudades (Mendoza, 2003).

Sin embargo, también es una planta que es capaz de crecer en sitios contaminados como orillas de lagos y en suelos ultramáficos los cuales tienen gran cantidad de metales pesados. Se reportó que polifenoles presentes en lixiviados de hojas (Quiroz, 2002) contribuían a la movilización de metales como Pb, Fe y Mn. Se desconoce si los compuestos fenólicos sean mecanismos de tolerancia en *B. cordata*.

Dado que es una planta con la capacidad de crecer y tolerar metales pesados es importante promover un manejo de control e implementar estrategias para su uso como planta medicinal y además podría ser utilizada como planta fitorremediadora para regenerar ecosistemas contaminados.

Podría ser que *Buddleja cordata* posee la capacidad de tolerar metales pesados, pudiendo poseer mecanismos detoxificantes, que le permitan crecer, así como acumular compuestos fenólicos que contribuyan en su capacidad de tolerar y acumular metales pesados.

4 Hipótesis

Modelo biológico 1:

Plántulas de *Buddleja cordata* cultivadas *in vitro* en un medio enriquecido con Fe o Pb

Si las plántulas de *Buddleja cordata* poseen mecanismos detoxificantes de los metales pesados Fe y Pb podrán crecer, y presentar cambios en la acumulación de compuestos fenólicos en sus órganos.

Modelo biológico 2:

Cultivo de células en suspensión de *Buddleja cordata* cultivadas en un medio enriquecido con Cu, Fe, Mn y Zn

Si las células del cultivo en suspensión de *Buddleja cordata* poseen mecanismos detoxificantes de los metales pesados Cu, Fe, Mn y Zn podrán crecer, y presentar cambios en la acumulación de compuestos fenólicos.

5 Objetivos

Modelo biológico 1: **Plántulas de *Buddleja cordata* cultivadas *in vitro* en un medio enriquecido con Fe o Pb**

a. Objetivo general modelo biológico 1

Evaluar el efecto de los metales pesados Fe y Pb sobre el crecimiento y la acumulación de compuestos fenólicos en plántulas *in vitro* de *B. cordata*

b. Objetivos específicos modelo biológico 1

1. Evaluar el efecto de la adición de ácido trans-cinámico como inhibidor de la ruta del ácido shikímico productora compuestos fenólicos sobre el crecimiento y la morfología de plántulas *in vitro* de *B. cordata*.
2. Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* cultivadas bajo la adición del ácido trans-cinámico (ATC).
3. Evaluar el efecto de los metales pesados (Fe y Pb), con y sin ATC, sobre el crecimiento y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales acumulados en plántulas de *B. cordata* cultivadas *in vitro*.

Modelo biológico 2: Cultivo de células en suspensión de *Buddleja cordata* cultivadas en un medio enriquecido con Cu, Fe, Mn y Zn

c. Objetivo general modelo biológico 2

Determinar los efectos de los metales pesados Cu, Fe, Mn y Zn sobre el crecimiento y la acumulación de los compuestos fenólicos en un cultivo celular de *B. cordata* para conocer la capacidad de acumulación de metales pesados

d. Objetivos específicos modelo biológico 2

1. Evaluar el efecto de la acumulación de los metales pesados Cu, Fe, Mn y Zn sobre el crecimiento de células en suspensión de *B. cordata*.
2. Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales y verbascósido en el cultivo de células en suspensión de *B. cordata* en presencia de Cu, Fe, Mn y Zn

6. Materiales y Método

Modelo biológico 1

6.1 Establecimiento de cultivo de plántulas de *B. cordata*

Se establecerán cultivos de plántulas de *B. cordata* acorde a metodología descrita por Estrada-Zúñiga, (2016).

6.1.1 Establecimiento de cultivos asépticos.

Explantos nodales fueron cortados de plantas en maceta de *B. cordata* siguiendo la metodología descrita a continuación (n=40):

- a) Lavado en detergente comercial durante 10 min.
- b) Inmersión en antibióticos (1 gr de ampicilina/L y cefatoxime 80 mg/L) durante 45 min.
- c) inmersión en fungicida Bravo 2% por 30 min.
- d) Inmersión en EtOH al 70% (v/v) durante 45 s.
- e) Inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) con 3 gotas de Tween por cada 100ml a distintas concentraciones y tiempos (Tabla 9)

Tabla 9. Concentraciones de NaClO y tiempos, para obtener cultivos asépticos

Tratamiento	NaClO	Tiempo
1	2.5%	15
2	2.5%	20
3	3%	15
4	3%	20

f) Inmersión en solución antioxidante durante 30 min en condiciones asépticas.

Después de obtener los explantes del aséptico estos fueron transferidos a tubos de ensayo con medio de cultivo basal (MBC), los cultivos se incubaron y monitorearon para determinar la presencia de microorganismos y se determinó el porcentaje de explantes viables con respecto al total de explantes sembrados. Posteriormente se eligió el tratamiento con mayor cantidad de explantes viables para los subsecuentes experimentos.

6.1.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación.

El medio de cultivo basal (MCB) que consistió en medio Murashige and Skoog (Murashige y Skoog 1962) al 50% suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 150 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y phytigel al 1.5%. El pH del medio de cultivo será ajustado a 5.8 con NaOH 0.1N / HCl 0.1 N, seguido de su esterilización en autoclave a 121°C durante 18 min.

6.1.3 Adición de ácido trans-cinámico como inhibidor de la ruta de los compuestos fenólicos

Para conocer el efecto de la inhibición de la ruta del ácido shikímico, se adicionará el ácido trans-cinámico (ATC) al MCB. La solución stock se disolvió en etanol mientras el control se preparó sin adicionar el ATC. Después de ser esterilizadas mediante filtración estas fueron añadidas en el MCB, para obtener concentraciones de 100 µM y 500 µM.

Con el fin de determinar el crecimiento y producción de MS, se realizó un seguimiento en el crecimiento de 21 días durante los cuales se tomaron 4 intervalos para efectuar las mediciones. Se tomaron 5 plántulas (n=5), de cada intervalo, para conocer el crecimiento (longitud: planta completa y raíces) y determinar aspectos fenotípicos como número y coloración de hojas, después fueron llevadas a sequedad mediante la estufa a 33° y se determinó el peso seco (PS) de raíces, hojas y tallos, así como el contenido MS (fenoles totales y flavonoides totales).

6.1.4 Análisis del contenido de compuestos fenólicos

El análisis del contenido de compuestos fenólicos consistió en determinar fenoles totales y flavonoides totales acorde a Vazquez-Marquez *et al.*, (2019). por lo que se procesaron extractos en untrasonicador (Vazquez-Marquez *et al.*, 2019).

6.1.8 Tolerancia de plántulas de *B. cordata* ante la presencia de Pb y Fe

Se adicionará al medio de cultivo basal: 500 μM de Fe y Pb. La adición de Fe será mediante la sal FeSO_4 , que está presente en la solución stock del MCB; mientras el metal pesado Pb será añadido de la sal nitrato de Pb. Se adicionará el ATC a 100 o 500 μM y 500 μM Pb o Fe al MCB (así sea el caso), después se transferirán plántulas de 15 días de cultivo para determinar los parámetros descritos previamente.

6.1.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos serán llevados a cabo por triplicado. El software estadístico NCSS v5 será empleado para el análisis estadístico. Todos los datos obtenidos en el presente trabajo serán sujetos de un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias bajo la prueba de Tukey al 5% de nivel de probabilidad para todos los experimentos

Modelo biológico 2

Metodología descrita en el anexo 11

7. Resultados

Modelo biológico 1

Para la obtención de plántulas libres de contaminantes se utilizaron brotes de plantas de *B. cordata*, siguiendo protocolo de Estrada-Zúñiga *et al.* (2009). Sin embargo, con el procedimiento descrito todos los explantes se contaminaban (datos no mostrados). Por lo que, se probaron 2 concentraciones de NaClO en 2 tiempos distintos (Fig. 8), con el fin de eliminar

la contaminación y obtener la mayor cantidad de explantes viables. La solución de 2.5% de NaClO a 15 min fue la concentración con la cual se observó la mayor cantidad de explantes viables y con la mínima cantidad de explantes oxidados. Esta solución fue la elegida para obtener brotes libres de contaminación, dichos brotes fueron transferidos a MCB para la adición del ácido trans-cinámico y posteriormente los metales.

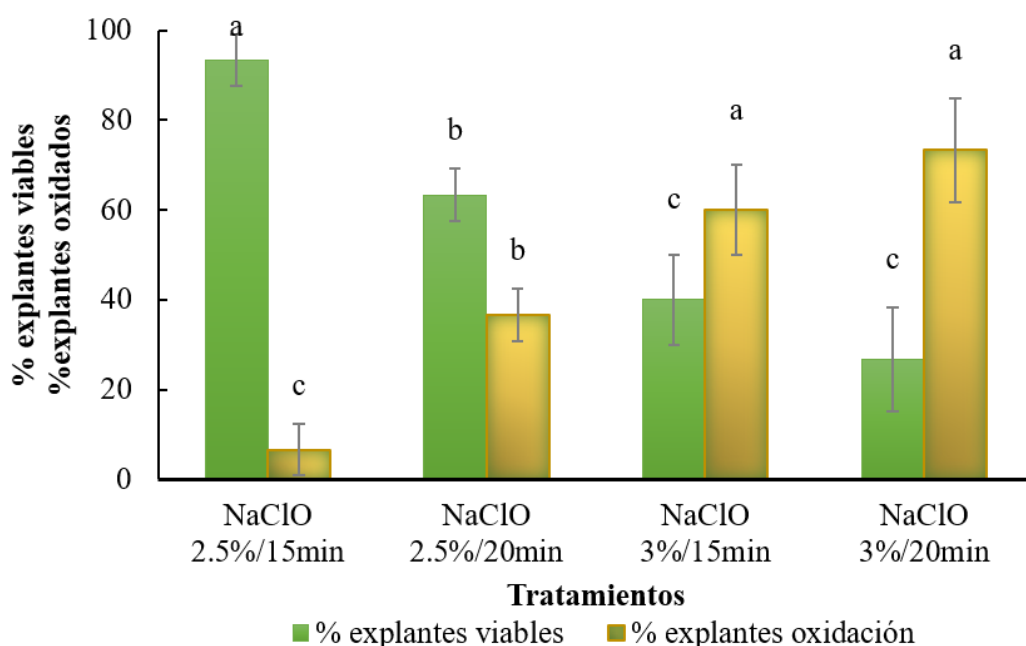


Fig. 8 Efecto en la viabilidad y oxidación de los explantes de *B. cordata* durante el proceso de cultivo. Los valores corresponden al promedio ($\pm$ DS) realizadas por triplicado. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes de acuerdo a la comparación múltiple de Tukey ($p=0.05$).

7.1 Evaluación del efecto del ácido trans-cinámico sobre el crecimiento y morfología de plántulas *in vitro* de *B. cordata*

Las plántulas *in vitro* de *B. cordata* fueron capaces de crecer en presencia de ambas concentraciones de ATC a 100 y 500 μ M, sin mostrar diferencias significativas en cuanto al crecimiento de la raíz y la parte aérea de la plántula (Fig. 9). De la misma manera se evaluó el peso de la biomasa seca de la raíz y la parte aérea de la planta (Fig. 10) sin encontrar diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 100 y 500 μ M de ATC. En

cuanto a la morfología fenotípica de las plántulas *in vitro* de *B. cortada*, al observar las plantas control (Fig. 11 A-D) durante los 21 días del cultivo estas crecieron mostrando un crecimiento exponencial, con hojas verdes fuertes y una raíz de color blanco sin mostrar signos de estrés, mientras que las plántulas de *B. cordata* que fueron cultivadas con 100 μ M de ATC, se puede observar que a 21 días (Fig. 11H) de iniciado el tratamiento estas presentan manchas foliares y en el tratamiento a 500 μ M de ATC las plántulas *in vitro* de *B. cordata* a partir del día 7 (Fig. 11J) muestran algunas manchas foliares y la raíz presenta un tono café en contraste a lo que se observa al día 7 en el cultivo control (Fig. 11B), además las manchas foliares y la raíz café persisten en las plántulas evaluadas a los días 14 y 21 (Fig. 11 K-L) del tratamiento con 500 μ M de ATC.

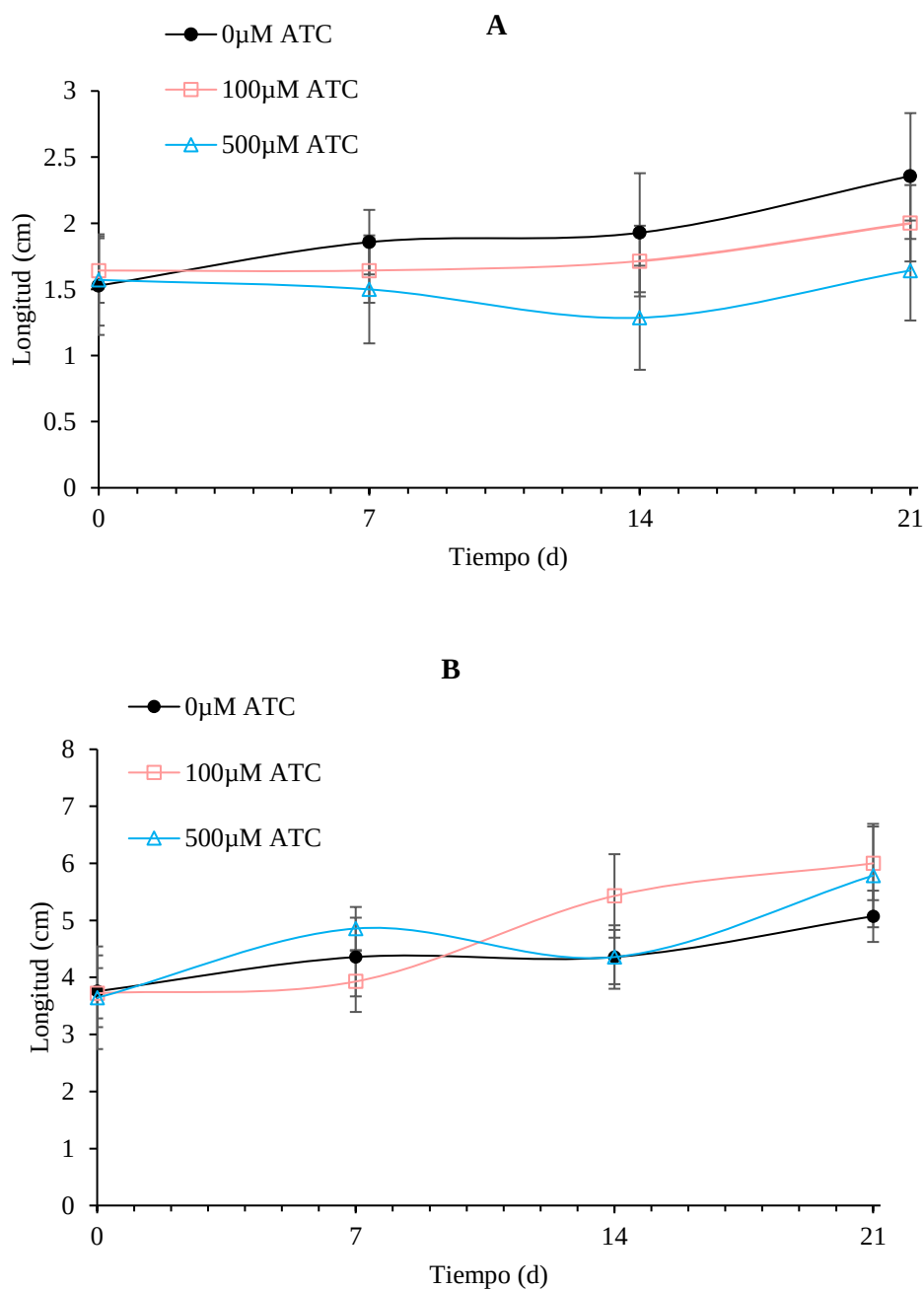


Fig. 9 Cinética de crecimiento de la raíz y parte aérea de plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a 100 y 500 μM ATC. **A** Raíz: control (●), 100 μM ATC (□) y 500 μM ATC (Δ). **B** parte aérea. Los valores corresponden al promedio ($\pm\text{DS}$) realizadas por triplicado. Un asterisco (*) indica diferencia significativa entre el control y los tratamientos según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

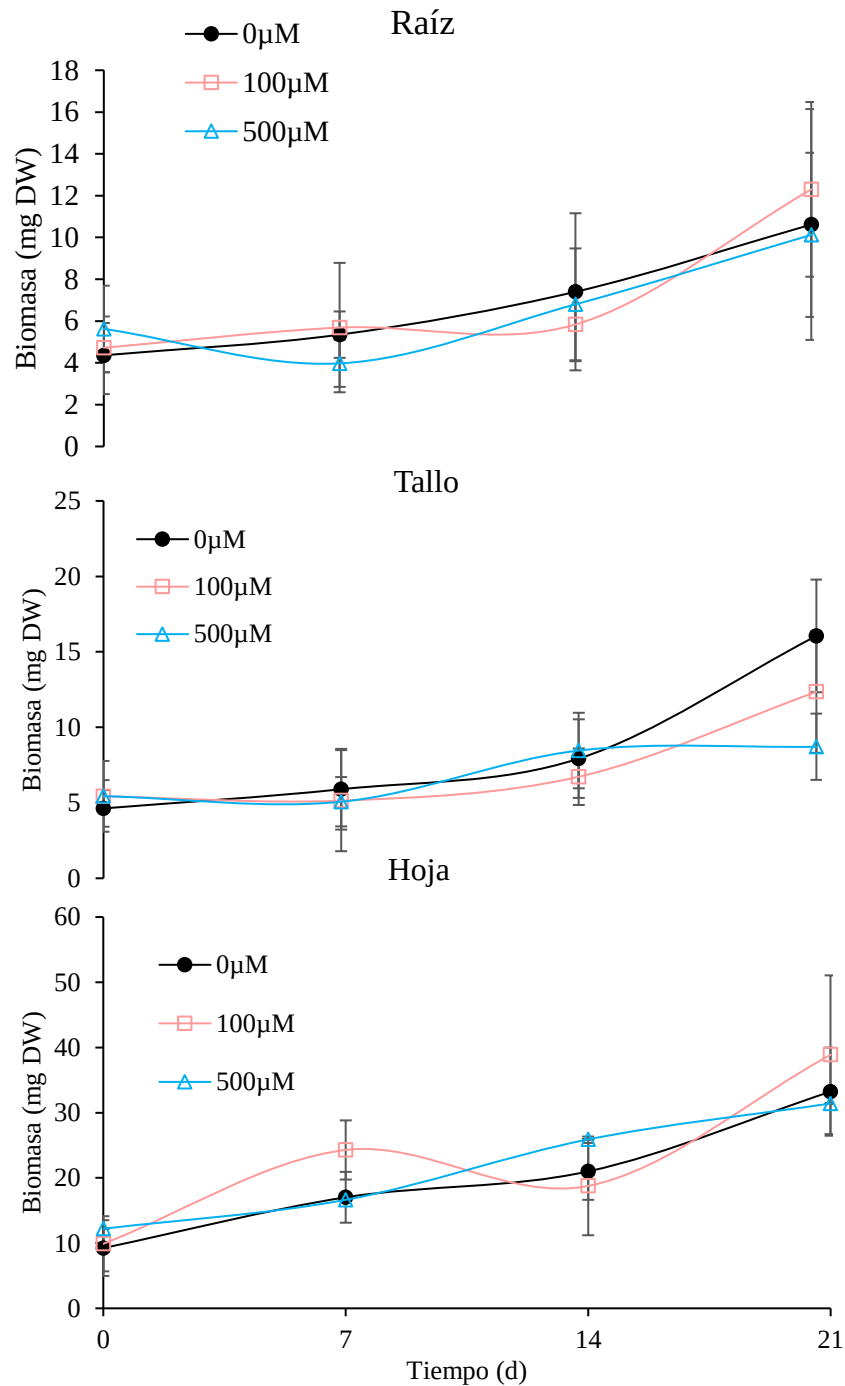


Fig. 10 Cinéticas del peso seco de los órganos evaluado de las plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a 100 y 500 μM de ATC. **A** Raíz: control (●), 100 μM ATC (□) y 500 μM ATC (Δ). Los valores corresponden al promedio ($\pm\text{DS}$) realizadas por triplicado. Un asterisco (*) indica diferencia significativa entre el control y los tratamientos según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

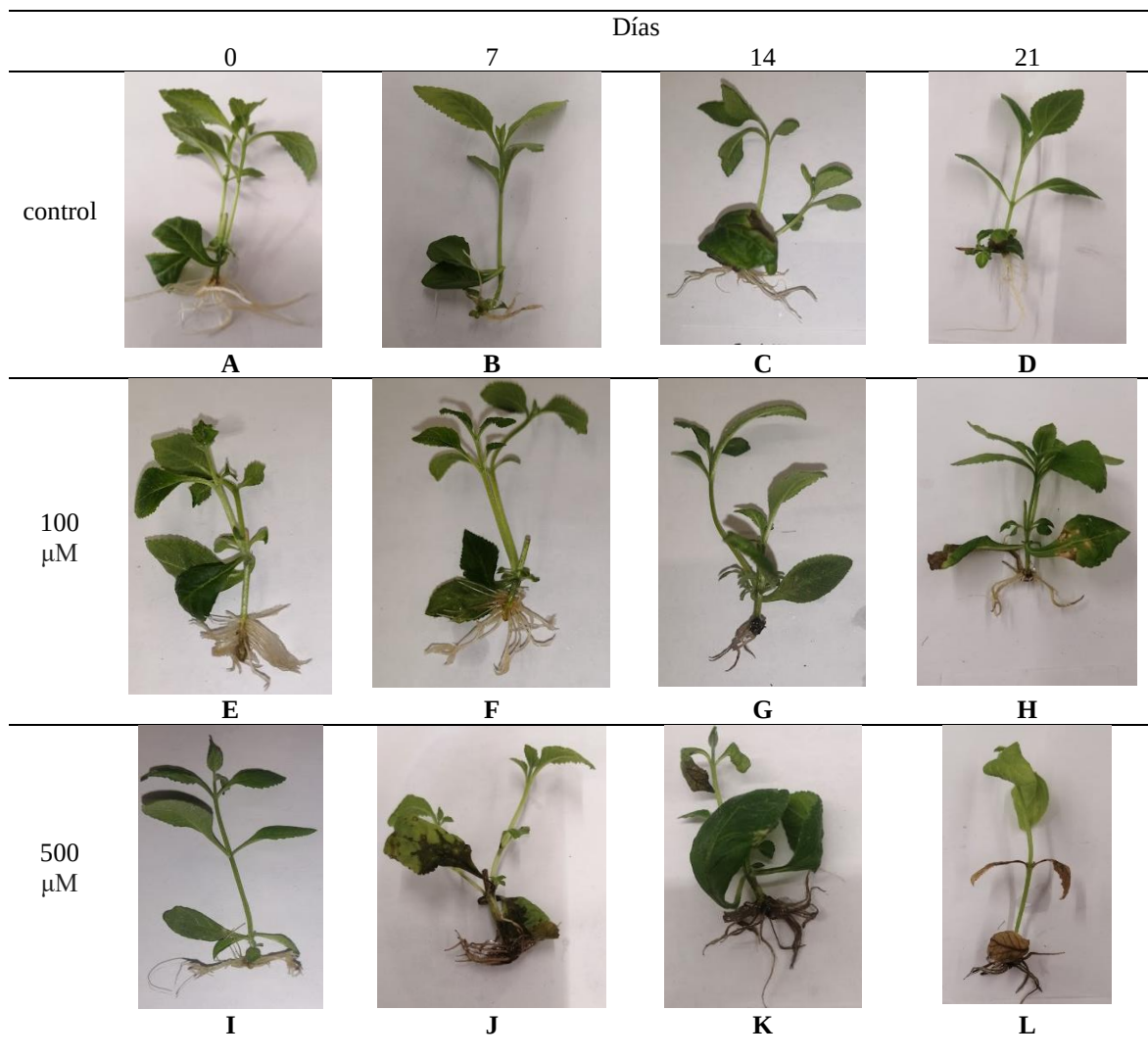


Fig. 11 Efectos en la morfología de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas al ATC a 100 y 500 μ M. **Control:** **A** día 0 del cultivo se puede observar una plántula *in vitro* de 5 cm de altura, con hojas verdes y raíz blanca, **B** se muestra una plántula de *B. cordata* cultivada con MCB a 7 días del cultivo, **C** plántula control a 14 días del cultivo y **D** plántula *in vitro* de *B. cordata* a 21 días, se puede observar hojas verdes y una raíz blanca. **100 μ M ATC:** **E** día 0 del tratamiento a 100 μ M de ATC, **F** día 7 del tratamiento, **G** plántula al día 14 de tratamiento y **H** plántula *in vitro* de *B. cordata* a 21 días del tratamiento a 100 μ M de ATC se puede observar manchas foliares en las hojas. **500 μ M ATC:** **I** plántula *in vitro* de *B.*

cordata en el día que se inició el tratamiento a 500 μM de ATC, **J** día 7 del tratamiento a 500 μM de ATC se pudo observar manchas foliares y la raíz es de color café, **K** día 14 del tratamiento se observa raíz café en la plántula *in vitro* de *B. cordata* y **L** día 21 del tratamiento a 500 μM de ATC se observan hojas cafés y raíz café, así como clorosis en hojas de las plántulas *in vitro* de *B. cordata*.

7.2 Producción de flavonoides y fenoles totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas ácido trans-cinámico

Se evaluó la producción de fenoles y flavonoides totales a través del tiempo del cultivo de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a 100 y 500 μM de ATC, mostrando diferencias significativas en la producción de los compuestos en los órganos evaluados: raíz, tallo y hojas (Fig. 12). Se observaron distintos patrones de producción de los compuestos fenólicos a través del tiempo, así como de los órganos evaluados. La producción de fenoles totales en raíz presenta un proceso de adaptación observándose una disminución en la producción de los fenoles en el control, así como a 100 y 500 μM , para después presentar un crecimiento exponencial de los fenoles totales (Fig. 12A), mientras en el tallo se puede observar el crecimiento exponencial desde el día 0 al día 7, a 100 y 500 μM de ATC, para después observarse que entran a la fase estacionaria, sin embargo en el control la fase exponencial se observa desde el día 0 al día 14 (Fig. 12A), por otro lado los patrones de producción de los fenoles totales en las hojas muestra que en el control y a 100 μM de ATC comienza la fase exponencial a partir del día 7, mientras a 500 μM la fase exponencial inicia en el día 0 al 7 para después observarse la disminución de los fenoles totales (Fig. 12A).

El contenido de fenoles totales en raíz con el tratamiento de 100 μM ATC fue de 57 y 68.78 mg EAG/g al día 7 y 14, respectivamente, mostrando diferencias significativas con respecto al control (Fig. 12 A). En el mismo tratamiento al día 7 en tallo y hoja, se produjeron mayores cantidades de fenoles totales

Con respecto a la producción de los flavonoides totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata*, se observa que en raíz con los tratamientos de 100 y 500 μM de ATC están en una fase de latencia del día 0 al 7, y después el tratamiento de 100 μM de ATC se observa que entra a la fase exponencial (Fig. 12B), mientras que en las hojas el control y el tratamiento a 100 μM de ATC tienen una fase exponencial del día 0 al día 7 sin embargo después se observa una disminución en la producción (Fig. 12B)

A

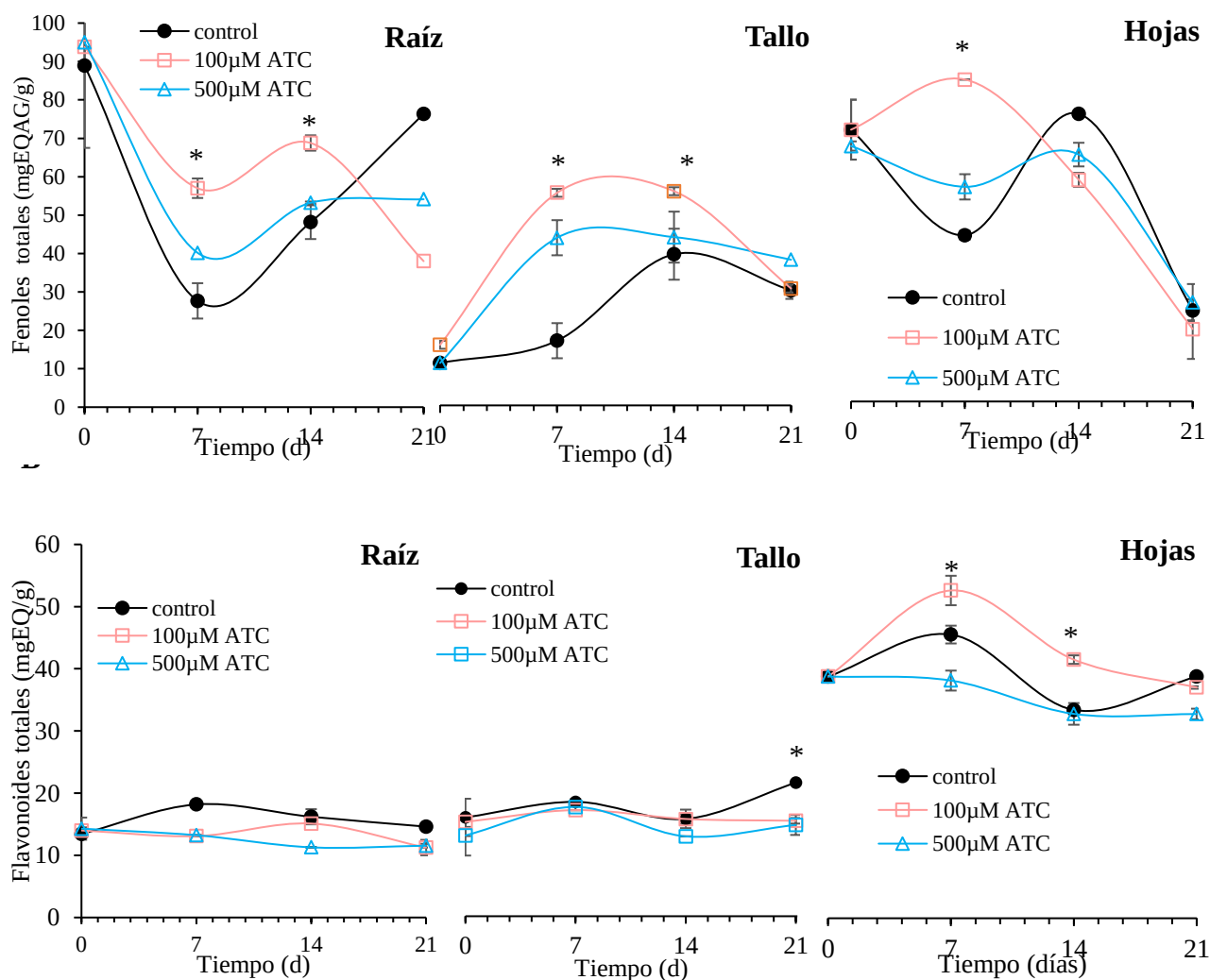


Fig. 12 Efecto de la adición de ATC a 100 y 500 μM en plántulas *in vitro* de *B. cordata* sobre la producción de fenoles y flavonoides totales

A: Contenido de fenoles totales: control (●), 100 μM ATC (□) y 500 ATC μM (Δ)

B Contenido de flavonoides totales: control (●), 100 μM ATC (□) y 500 μM ATC (Δ). Los datos mostrados son el promedio ($\pm$ DS) de las mediciones efectuadas por triplicado. Un

asterisco (*) indica diferencia significativa entre el control y los tratamientos según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

7.3 Evaluación del efecto de la adición de los metales pesados Fe y Pb sobre el crecimiento y morfología de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a ácido trans-cinámico

Las plántulas *in vitro* de *B. cordata* en tratamientos con ATC a 100 y 500 μM , en presencia de los MP: Fe y Pb fueron capaces de crecer sin mostrar diferencias significativas en el crecimiento de las plántulas (parte aérea y raíz) (Fig. 13, 14). También se evaluó el peso seco de la raíz, tallo y hojas (Fig. 15, 16) sin mostrar diferencias significativas en los pesos de la biomasa de las plántulas *in vitro* de *B. cordata*. Sin embargo, las plántulas si mostraron diferencias en la morfología de las plántulas expuestas a los tratamientos de ATC y los MP: Fe y Pb (Fig. 17). Las plantas control (Fig. 17 ABC) durante el tiempo de cultivo no mostraron síntomas de estrés, se puede observar una raíz de color blanco en los 3 puntos, así como hojas de tonalidad verde fuerte a través del tiempo de cultivo evaluados (0, 7 y 14 d). mientras en el tratamiento 100 μM ATC + 500 μM Fe, se puede observar que la plántula *in vitro* de *B. cordata* expuesta al Fe presenta hojas de color verde limón en el día 7 (Fig. 17 E) pero en el día 14 los síntomas de estrés son más evidentes ya que la plántula presenta un tallo débil y se observa clorosis en hojas (Fig. 17 F). Por otro lado, el tratamiento con 500 μM ATC + 500 μM Fe (Fig. 17 G-I), las plántulas mostraron raíz café, así como clorosis en tallo. En los tratamientos de 100 μM ATC + 500 μM Pb, la plántula en el día 7 (Fig. 17 K) se puede observar el estrés ocasionado por el Pb a 500 μM , observándose clorosis en tallo y hojas, al día 14 (Fig. 17 L) las hojas de las plántulas tienen un color verde limón. Mientras el tratamiento 500 μM ATC + 500 μM Pb, las plántulas en el día 7 (Fig. 17 N) presentaban raíz color café fuerte igual al día 14 del tratamiento (Fig. 17 O), aunque también es posible observar hojas de color café. En cambio, el tratamiento que solo contenía 500 μM Fe, al día 7 (Fig. 17 Q) se observó clorosis en tallo y hojas de color verde, morfología que persiste en el día 14 (Fig. 17 R) del tratamiento. En cuanto al tratamiento de 500 μM Pb. Se puede observar que las plántulas al día 7 y 14 del tratamiento presentan hojas color verde fuerte, así como raíz de color café claro, no presentaron estrés por la presencia del MP.

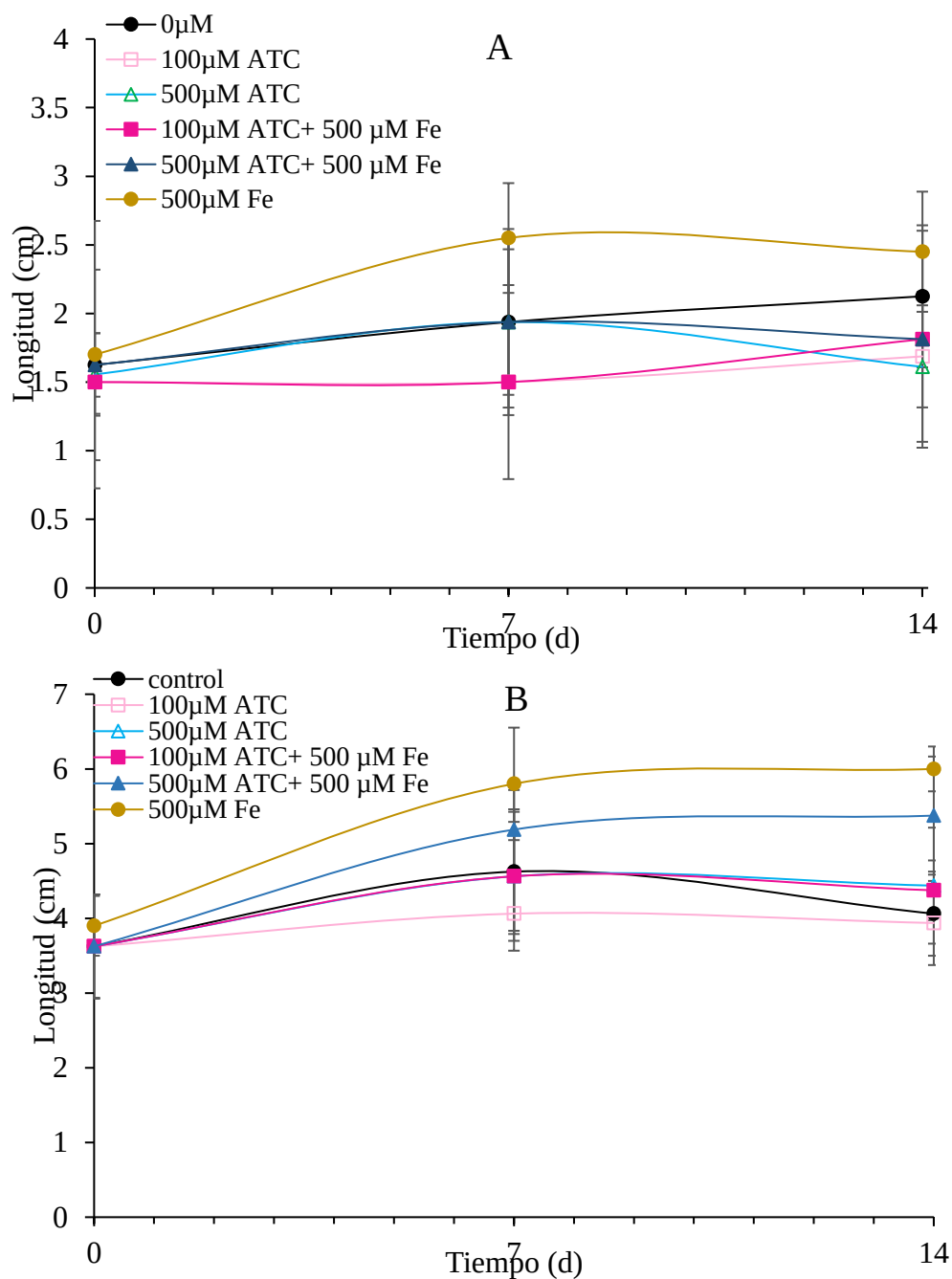


Fig. 13 Cinética de crecimiento longitudinal de la raíz y parte aérea de plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 μ M y Fe. **A** Raíz: control (●), 100 μ M de ATC (□), 500 μ M de ATC (Δ), 100 μ M ATC + 500 μ M Fe (■), 500 μ M ATC + 500 μ M Fe (▲) y 500 μ M Fe (○). **B** parte aérea. Los valores corresponden al promedio ($\pm$ DS) realizadas por triplicado

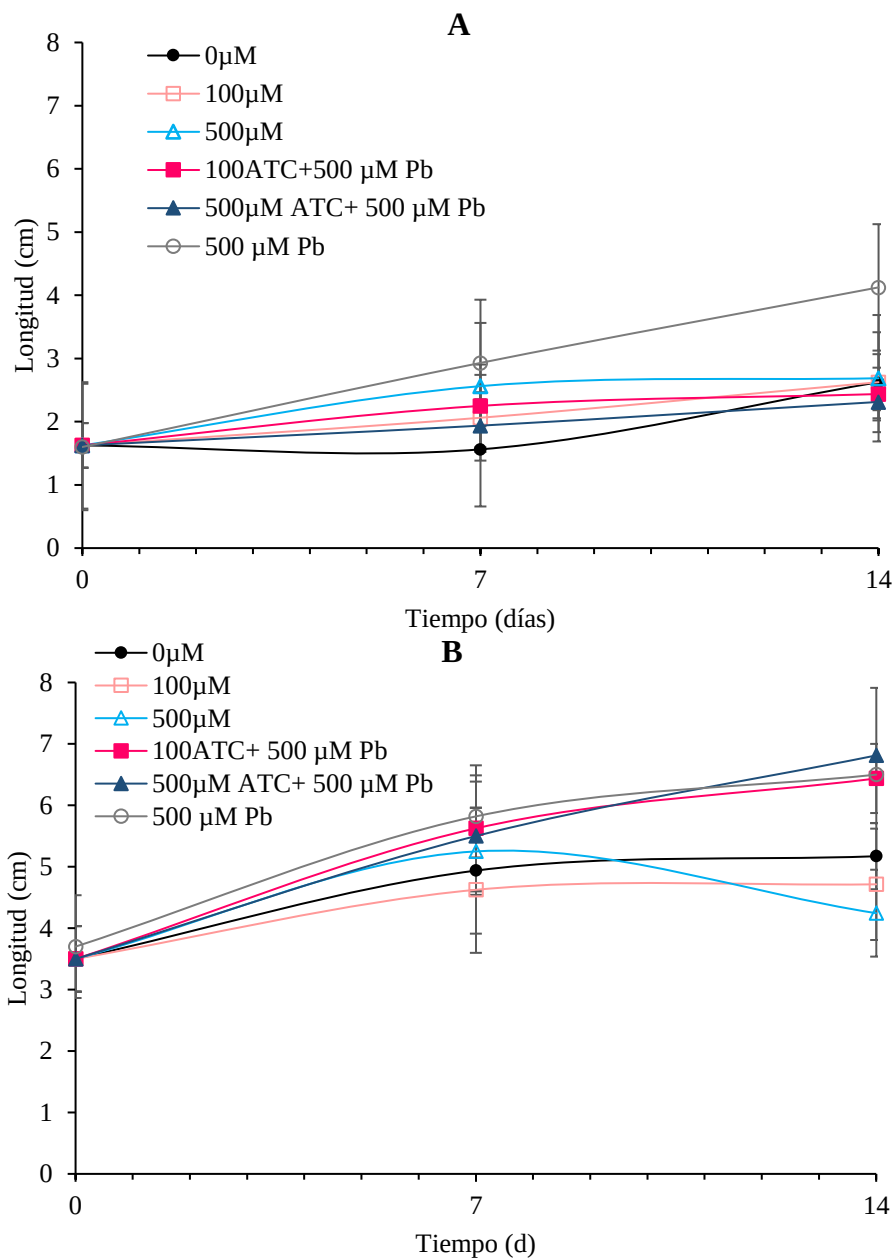


Fig. 14 Crecimiento de raíz y parte aérea de las plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 μ M y Pb. **A** Raíz: control (●), 100 μ M de ATC (□), 500 μ M de ATC (Δ), 100 μ M ATC + 500 μ M Pb (■), 500 μ M ATC + 500 μ M Pb (▲) y 500 μ M Pb (○). **B** parte aérea. Los valores corresponden al promedio ($\pm$ DS) realizadas por triplicado.

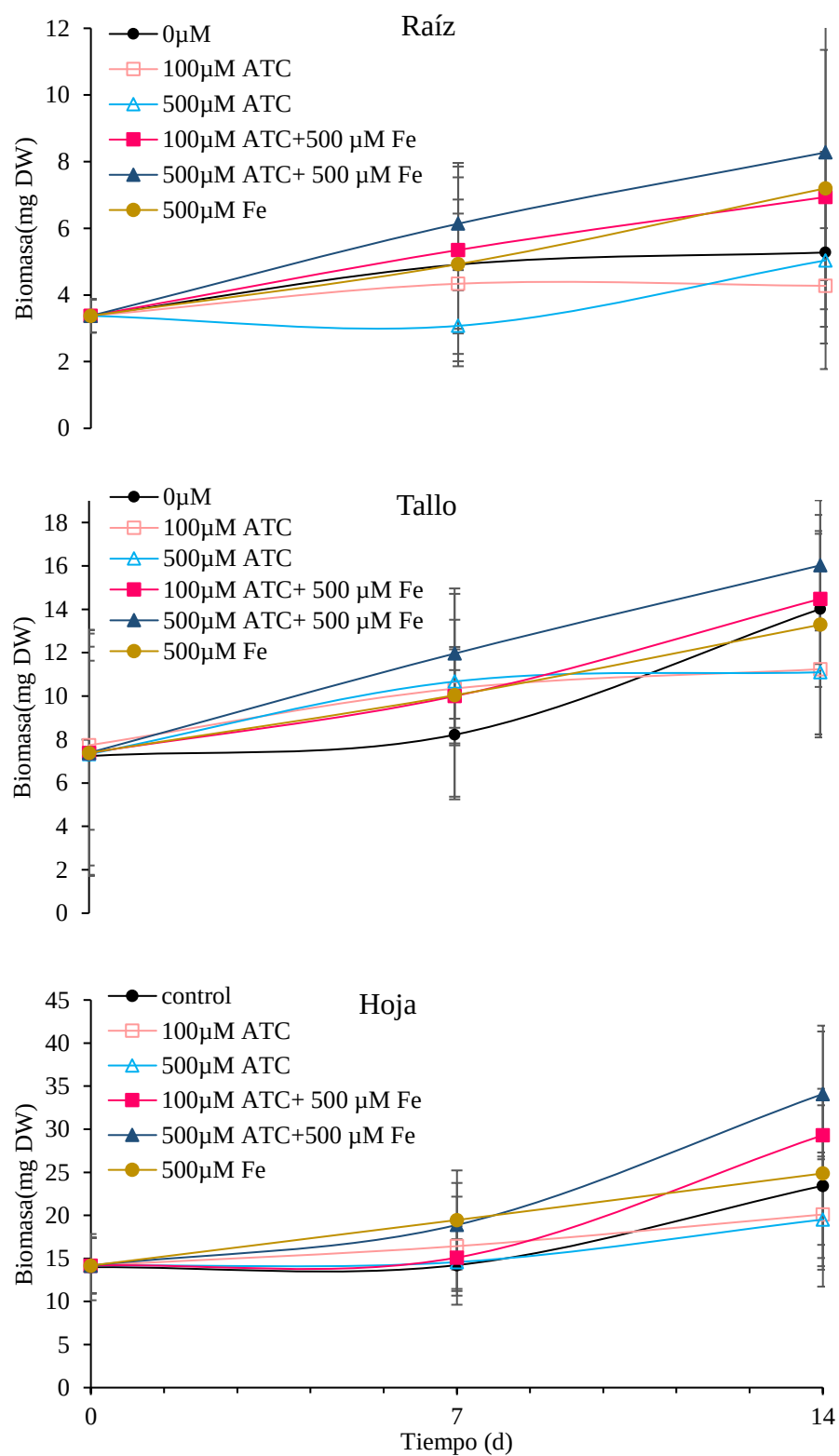


Fig. 15 Peso seco de los órganos evaluados de las plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 µM y Fe. **A** Raíz: control (●), 100 µM de ATC (□), 500 µM de ATC (Δ), 100 µM ATC + 500 µM Fe (■), 500 µM ATC + 500 µM Fe (▲) y 500 µM Fe (○). Los valores corresponden al promedio (±DS) realizadas por triplicado

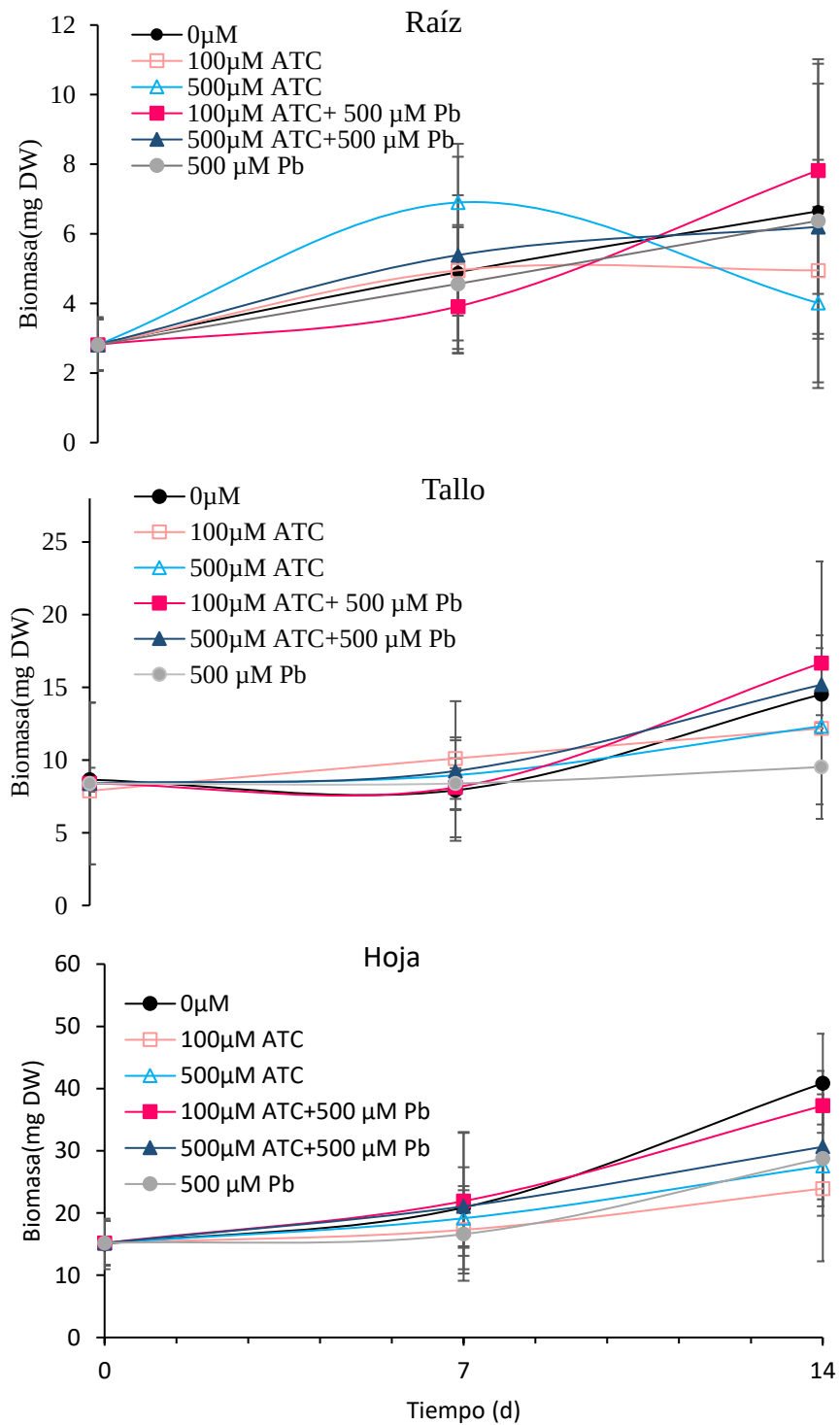


Fig. 16 Evaluación del peso seco de raíz, tallo y hojas de plántulas *in vitro* de *Buddleja cordata* expuestas a los tratamientos de ATC a 100 y 500 µM y Fe. **A** Raíz: control (●), 100 µM de ATC (□), 500 µM de ATC (Δ), 100 µM ATC + 500 µM Pb (■), 500 µM ATC + 500 µM Pb (▲) y 500 µM Pb (○). Los valores corresponden al promedio (±DS) realizadas por triplicado.

Días			
	0	7	14
control			
	A	B	C
100 μ M ATC + 500 μ M Fe			
	D	E	F
500 μ M ATC +500 μ M Fe			
	G	H	I
100 μ M ATC + 500 μ M Pb			
	J	K	L
500 μ M ATC +500 μ M Pb			
	M	N	O

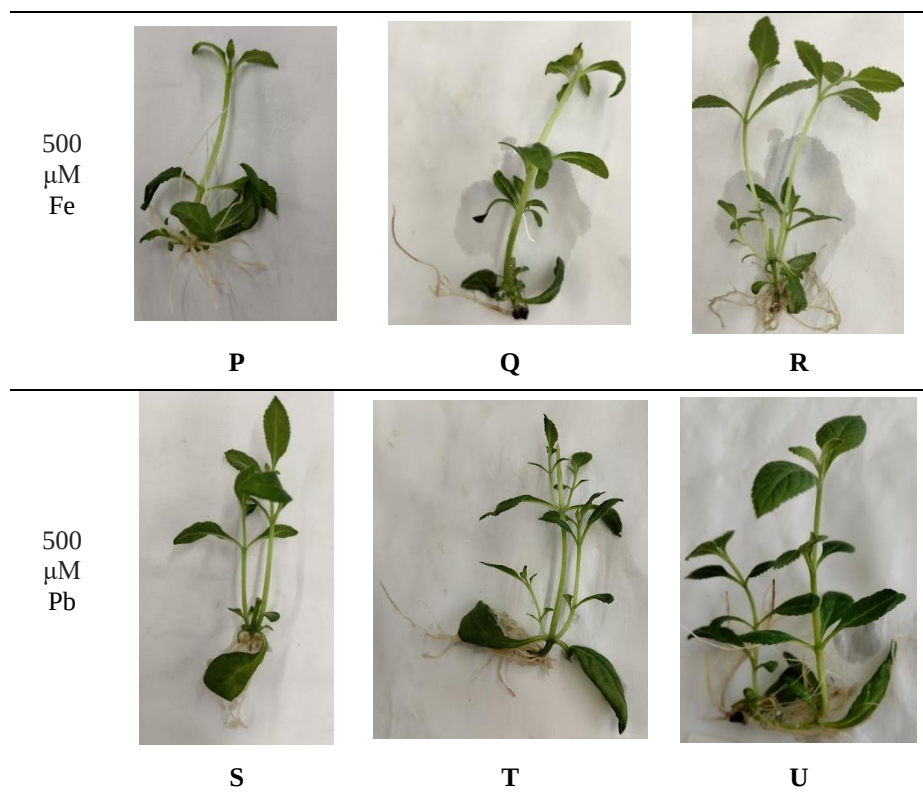


Fig. 17 Efecto de la adición de 500 μM de Fe y Pb en la morfología de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas al ATC a 100 y 500 μM ATC. **Control:** **A, B y C**, se puede observar plántulas en los días 0, 7 y 14 del tratamiento control, se muestran plántulas con raíz blanca y de hojas color verde fuerte. **100 μM ATC + 500 μM Fe:** **D** corresponde a la plántula en el día 0 del tratamiento, **E** se observa la plántula en el día 7, la plántula presenta hojas color verde limón, clorosis en tallos y **F** se observa la plántula al día 14 del cultivo se puede observar, clorosis en hojas y tallo, así como un tallo débil. **500 μM ATC + 500 μM Fe:** **G** plántula en el inicio del tratamiento, **H** plántula al día 7, presenta clorosis en hojas y hojas cafés e **I** plántula a los 14 días de cultivo del tratamiento se observa, manchas foliares, clorosis en tallo y raíz café. **100 μM ATC + 500 μM Pb:** **J** corresponde a la plántula en el día 0 del tratamiento, **K** se observa la plántula en el día 7 y presenta clorosis en tallo y hojas con bordes doblados y **L** se observan hojas color verde limón. **500 μM ATC + 500 μM Pb:** **M** día 0 del tratamiento, **N** se puede observar que la plántula tiene una raíz café y manchas foliares y **O** corresponde al día 14 del tratamiento se observa la tonalidad café de la raíz y hojas color café en la yerma terminal de la plántula. **500 μM Fe:** **P** plántula en el inicio del tratamiento, **Q** se observa que la plántula tiene clorosis en tallo y hojas color verde limón al

día 14 del tratamiento y **R** se observa clorosis en tallo y presenta raíz de color café claro. **500 μ M Pb:** **S** día 0 del tratamiento, **T** día 7 de iniciado el tratamiento se observa que la plántula presenta hojas color verde fuerte y raíz café claro y **U** se observa la plántula *in vitro* de *B. cordata* a 14 días de iniciado el tratamiento, presenta hojas verdes.

7.4 Producción de compuestos fenólicos: flavonoides y fenoles totales en presencia de Pb y Fe en plántulas *in vitro* de *B. cordata* en expuestas ácido trans-cinámico

El contenido de fenoles y flavonoides totales dependió del tiempo de exposición al metal, así como del tiempo de órgano evaluado. Los resultados de los tratamientos en las plántulas *in vitro* de *B. cordata* muestran patrones fluctuantes que varían entre la cantidad de ATC (100 y 500 μ M ATC) y el metal evaluado (Pb y Fe a 500 μ M) (Fig. 18, 19, 20 y 21).

Debido a que, el ATC y los MP se encuentran dentro del medio de cultivo, las raíces de las plántulas son las primeras que tienen contacto con los compuestos, por lo que estas presentan un proceso de adaptación el cual se puede observar en el patrón de la producción de los fenoles en raíz (Fig. 18, 19, 20 y 21).

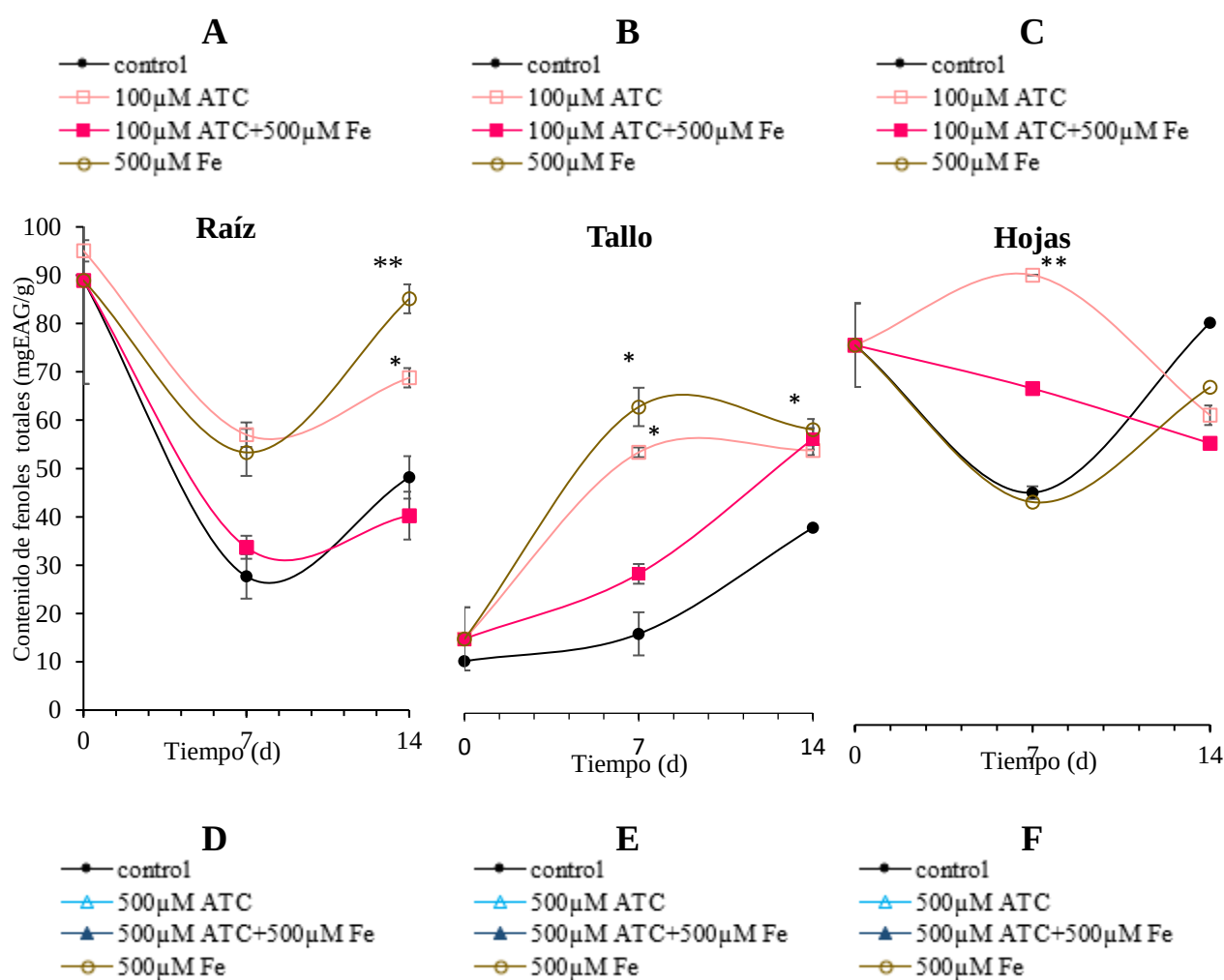
El contenido de fenoles totales en raíz (Fig. 18A) de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* mostro cambios con respecto al tiempo, la adición de 500 μ M Fe produjo 85.5 mgEAG/g, 1.76 veces más que el control (48.16 mgEAG/g) al día 14. Mientras el tratamiento de 500 μ M ATC+ 500 500 μ M Fe no mostro diferencias significativas con el control ni en el día 7 y 14. Algo similar ocurrió en el tallo (Fig. 18B), donde la mayor producción de los tratamientos con ATC a ambas concentraciones y la presencia de 500 μ M ATC fue mayores que el control. Por otro lado, la mayor concentración de fenoles totales en hojas (Fi. 18C) se observó en el día 7 a 100 μ M ATC. 81.71 mgEAG/g, donde fue superior 1.96 veces en comparación al control (42.19 mgEAG/g). También, se puede observar que en las hojas a 500 μ M de Fe no mostro diferencias significativas con el control al día 7, mientras que los tratamientos con 100 μ M ATC y 100 μ M ATC+500 μ M Fe y 500 μ M de Fe tuvieron una disminución de con respecto al control.

Por otro lado, la acumulación de fenoles totales con los tratamientos de 500 μM ATC, 500 μM ATC+500 μM Fe y 500 μM Fe, de igual forma la acumulación dependió del tiempo de incubación, así como del órgano evaluado. En raíces (Fig.18D) de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* se observa un aumento de la acumulación de fenoles totales en todos los tratamientos de fenoles totales en comparación al control al día 7. De igual forma en tallo (Fig. 18D) al día 7 se observa que los tratamientos aumentaron la acumulación de fenoles totales en comparación al control. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones al día 7 de 500 μM Fe y 500 μM ATC+500 μM Fe, y 500 μM ATC y 500 μM Fe al día 14. Mientras en hojas, la adición de 500 μM ATC+500 μM Fe y 500 μM ATC (88.70 y 54.47 mgEAG/g, respectivamente) se encontraron mayores concentraciones que el control (42.19 mgEAG/g) al día 7. En general, los cambios más notorios se observan al día 7 donde se observan mayores concentraciones con respecto al control.

En la acumulación de flavonoides totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata*, se observan diferentes patrones de acumulación que varía a través del tiempo y del tipo de órgano en la raíz (Fig. 19 A), se observa una disminución significativa de la acumulación de los flavonoides totales en 100 μM ATC, 100 μM ATC+500 μM Fe y 500 μM Fe (12.86, 7.76 y 9.97 mgEQ/g, respectivamente) al día 7 con respecto al control (18.18 mgEQ/g, respectivamente). Algo similar se observa en tallo (Fig. 19B), aunque los tratamientos de 100 μM ATC y 100 μM ATC+500 μM Fe no mostraron diferencias significativas con el control al día 7, pero si se observa una marcada disminución con 500 μM Fe (12.71 mgEQ/g) con respecto al control (18.18 mgEQ/g). Mientras en hojas (Fig.19C) se observan cambios más significativos al día 7 con respecto al control, la acumulación de flavonoides totales al día 7 mostro mayores concentraciones con 100 μM ATC (51.98 mgEQ/g) con respecto al control (45 mgEQ/g) mientras los tratamientos de 100 μM ATC+500 μM Fe y 500 μM Fe se observa que la cantidad de flavonoides totales disminuyo por la presencia de 500 μM Fe.

La acumulación de los flavonoides totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata* con los tratamientos 500 μM ATC y 500 μM ATC+500 μM , mostraron diferentes patrones de producción que dependió del tipo de órgano y del tiempo de incubación. En raíz se puede observar la disminución de los flavonoides totales en al día 7 con 500 μM ATC, 500 μM ATC+500 μM Fe y 500 μM Fe (13.23, 9.66 y 9.67mgEQ/g, respectivamente) con respecto

al control (18.18 mgEQ/g). Mientras en el tallo (Fig. 19E), se observa que el tratamiento a 500 μ M ATC no muestra diferencias significativas al día 7 y 14 con respecto al control, sin embargo, los tratamientos de 500 μ M Fe y 500 μ M ATC+500 μ M Fe si son estadísticamente distintos en el día 7 y 14 con respecto al control. Por otro lado, la acumulación de flavonoides totales en hojas de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* no se encontraron diferencias significativas con el tratamiento 500 μ M ATC+500 μ M Fe, pero si hubo diferencias con el día 7 mostrando la disminución de los flavonoides con 500 μ M Fe (37.69 mgEQ/g) con respecto al control (45 mgEQ/g).



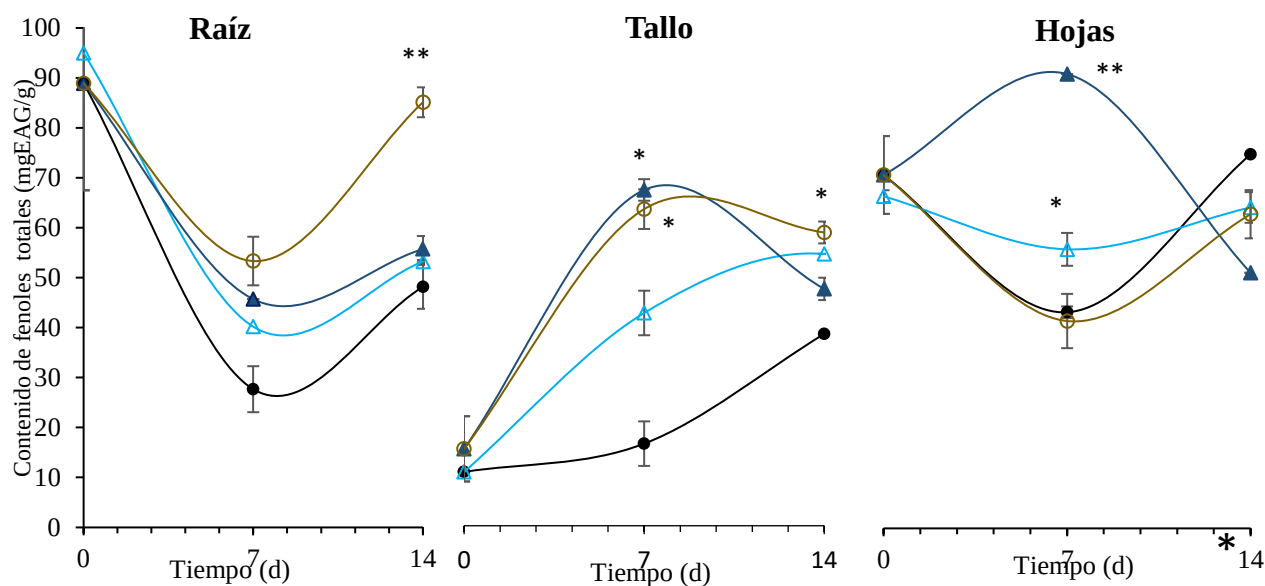
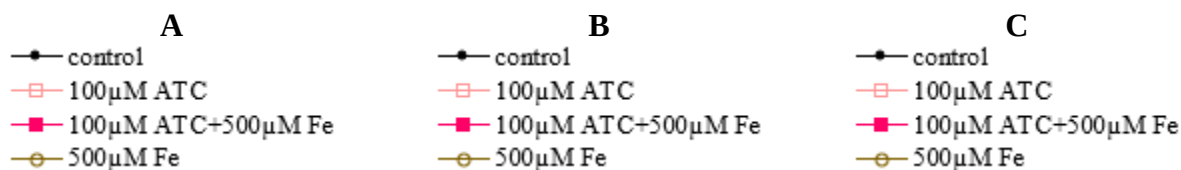


Fig. 18 Efecto de la adición de Fe en la acumulación de fenoles totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a ATC a 100 y 500 μM .

Fenoles totales: control (●), 100 μM de ATC (□), 500 μM de ATC (Δ), 100 μM ATC + 500 μM Fe (■), 500 μM ATC + 500 μM Fe (▲) y 500 μM Fe (○). Los valores corresponden al promedio ($\pm\text{DS}$) realizadas por triplicado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparado al control en el mismo tiempo de evaluación.



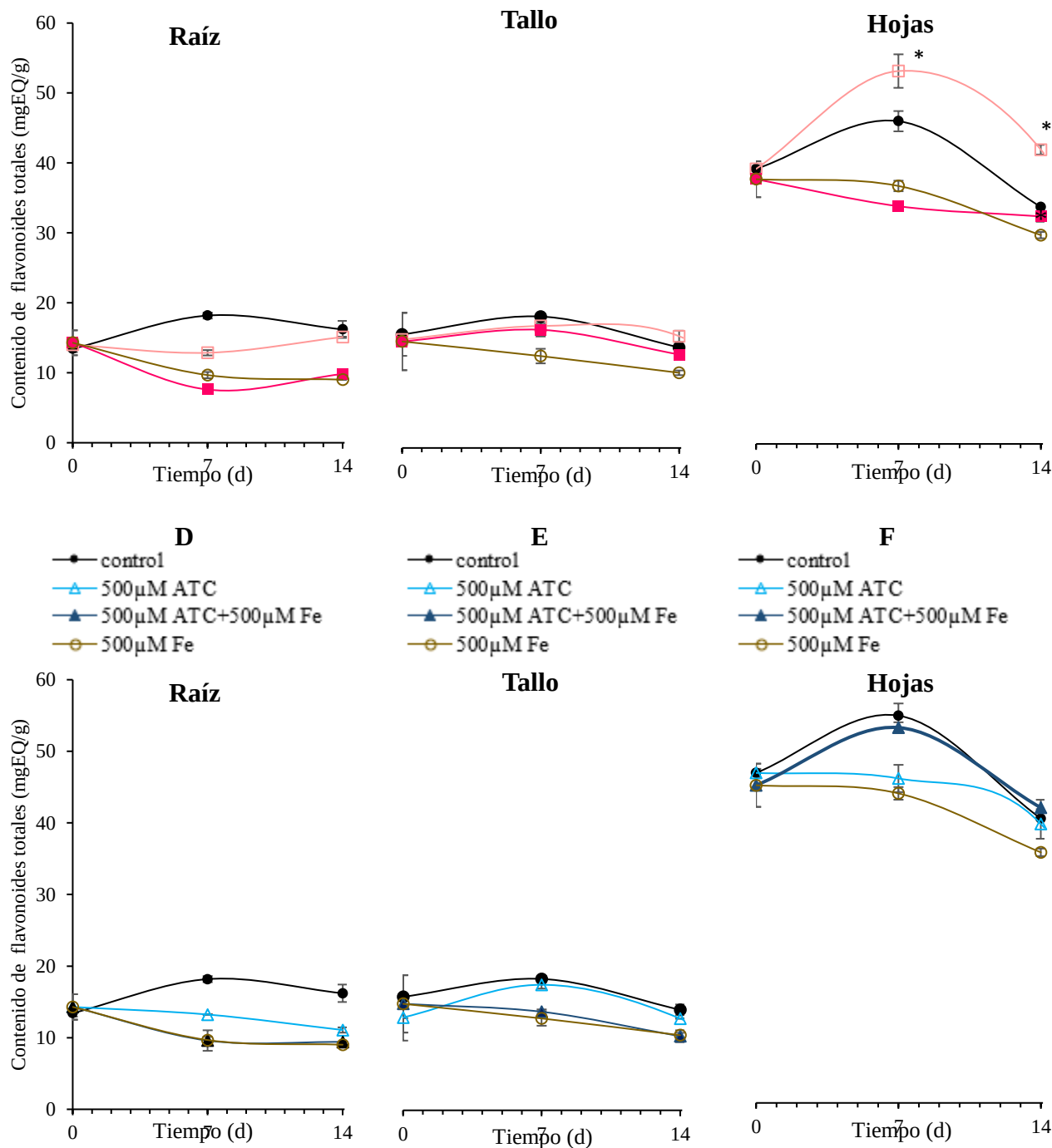
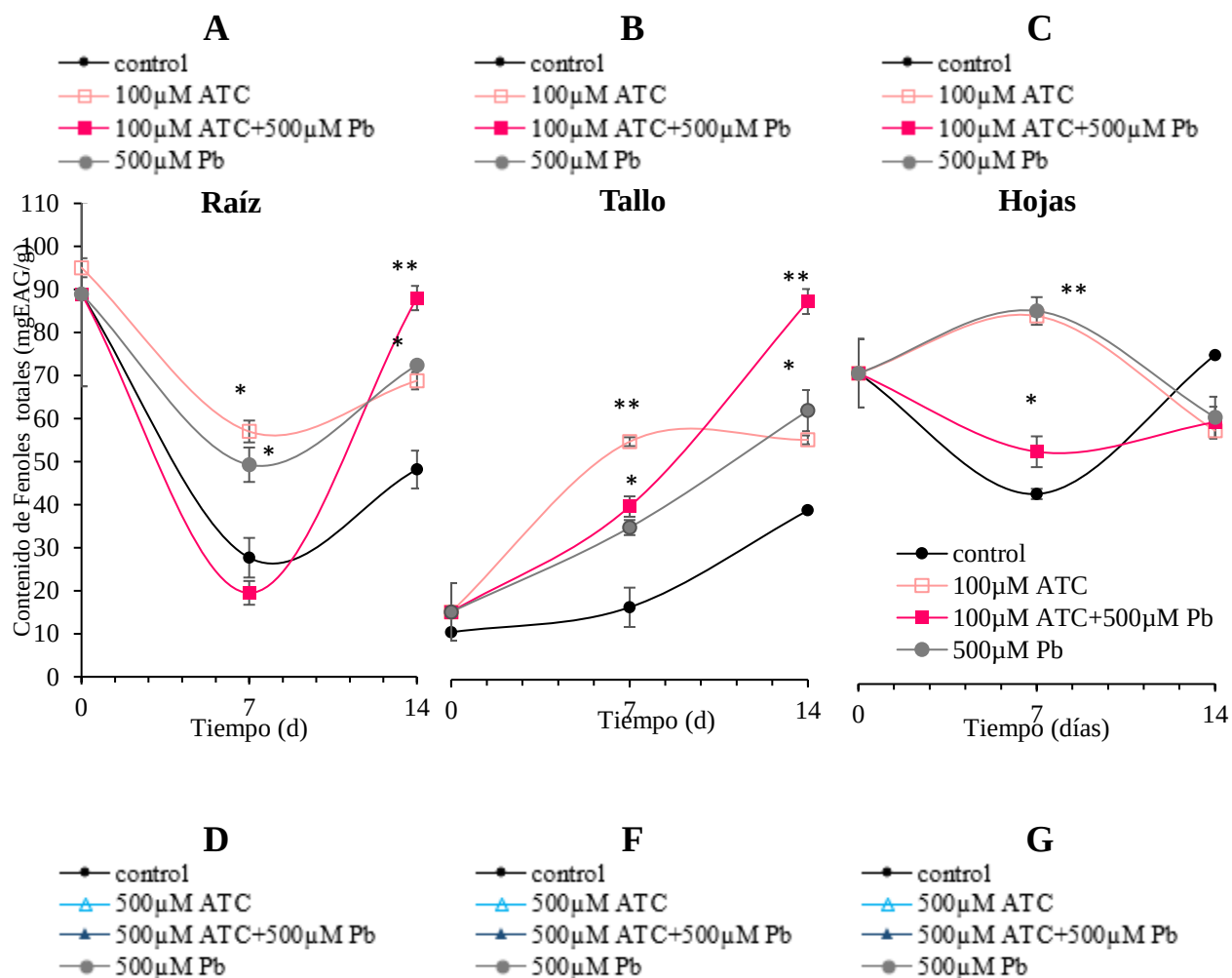


Fig. 19 Efecto de la adición de Fe en la acumulación de flavonoides totales en plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a ATC a 100 y 500 μ M. Flavonoides totales: control (●), 100 μ M de ATC (□), 500 μ M de ATC (Δ), 100 μ M ATC + 500 μ M Fe (■), 500 μ M ATC + 500 μ M Fe (▲) y 500 μ M Fe (○). Los valores corresponden al promedio ($\pm$ DS) realizadas por triplicado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparado al control en el mismo tiempo de evaluación.

De igual forma la acumulación de fenoles totales expuestas al 500 μM Pb y el ATC (100 y 500 μM) se observaron cambios a través del tiempo y dependió del tipo de órgano. En raíz (Fig. 20A), se observa un aumento significativo en la acumulación de los fenoles totales al día 7 a 100 μM de ATC (57 mgEAG/g) en comparación al control (27.67 mgEAG/g), mientras al día 14 la mayor acumulación se observó con 100 μM ATC + 500 μM Pb (88 mgEAG/g) en comparación al control (48.16 mgEAG/g). Por otro lado, la mayor acumulación de fenoles totales en tallo se observó en 100 μM ATC, 100 μM ATC + 500 μM Pb y 500 μM Pb en el día 7 y 14 en comparación al control observándose las mayores concentraciones al día 7 en 100 μM ATC (53.48 mgEAG/g) y en 100 μM ATC + 500 μM Pb (84.94 mgEAG/g). Mientras en las hojas (Fig. 20C) se puede observar que los fenoles totales aumentaron con todos los tratamientos al día 7, 100 μM ATC, 100 μM ATC + 500 μM Pb y 500 μM Pb (81.71, 51.55 y 82.82 mgEAG/g) en comparación al control (42.19 mgEAG/g). Por otro lado, la acumulación de fenoles totales en los tratamientos de 500 μM ATC, 500 μM ATC + 500 μM Pb y 500 μM Pb, se observó que la acumulación dependió del tiempo de incubación y del tipo de órgano. En raíz (Fig. 20 A), se observa al día 7 mayor acumulación de compuestos fenólicos totales a 500 μM ATC + 500 μM Pb (63.68 mgEAG/g) en comparación al control (27.67 mgEAG/g), mientras en tallo (Fig. 20B), la mayor acumulación de fenoles totales fue en 500 μM ATC + 500 μM Pb (83.31 mgEAG/g) en comparación al control (16.27 mgEAG/g), 5.13 veces mayor, de forma similar en hoja (Fig.20C) en donde el mismo tratamiento se acumuló fenoles totales (101.12 mgEAG/g), 6.3 veces mayor que el control (16.27 mgEAG/g).

Mientras la acumulación de flavonoides totales en plántulas *in vitro* d *B. cordata* expuesta a 500 μM Pb y 100 μM ATC, fue similar a la producción observada con 100 μM ATC. En raíz se observó diferencias significativas en la producción de 500 μM Pb (20.27 mgEQ/g), en donde aumento la producción con respecto al control al día 7 (18.18 mgEQ/g), mientras en hojas se puede observar que la mayor acumulación de flavonoides totales fue en 100 μM ATC (51.98 mgEQ/g) en comparación al control (45 mgEQ/g) al día 7. Por otro lado, se observó la disminución de los flavonoides totales en 100 μM ATC+500 μM Pb y 500 μM Pb, al día 7 y 14 con respecto al control.

Se observó que los tratamientos de 500 μ M ATC y 500 μ M ATC+500 μ M Pb, fueron estadísticamente diferentes al control observándose una disminución de los flavonoides totales al día 7. Por otro lado, la mayor concentración de flavonoides totales se observó en 500 μ M ATC+500 μ M Pb (54.92 mgEQ/g) en comparación al control (45 mgEQ/g), 1.22 veces mayor.



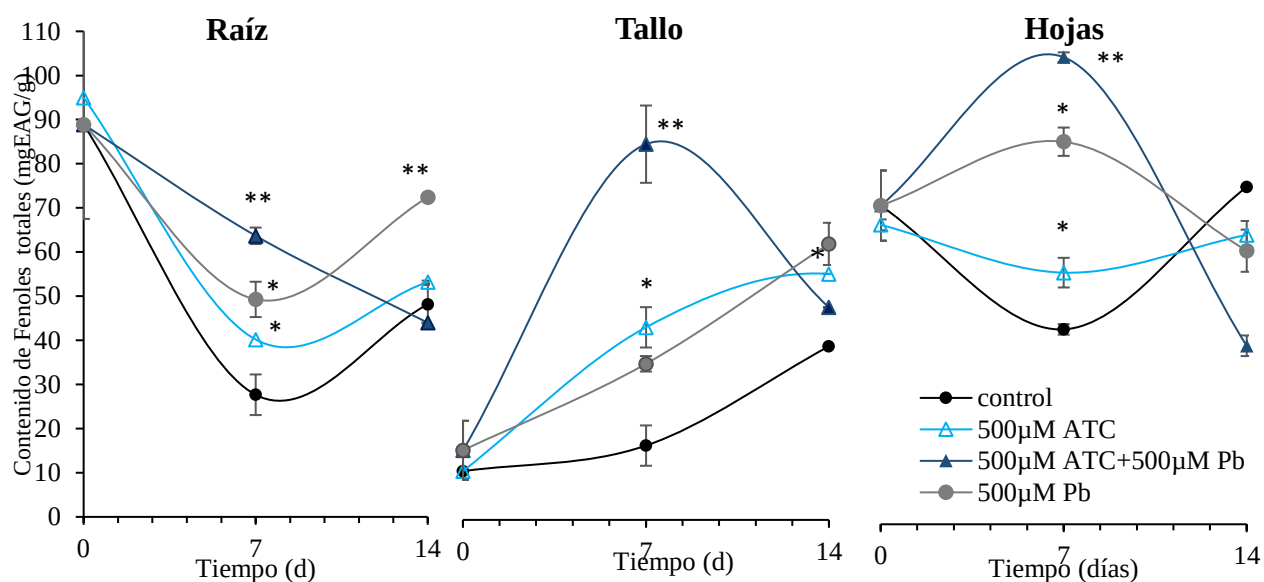
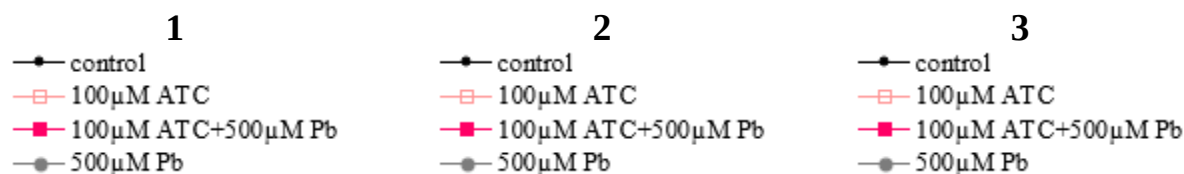


Fig. 20 Acumulación de fenoles totales de cultivos de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a 500 μ M Pb.

Fenoles totales: control (●), 100 μ M de ATC (□), 500 μ M de ATC (△), 100 μ M ATC + 500 μ M Pb (■), 500 μ M ATC + 500 μ M Pb (▲) y 500 μ M Pb (○).

Los valores corresponden al promedio ($\pm$ DS) realizadas por triplicado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparado al control en el mismo tiempo de evaluación.



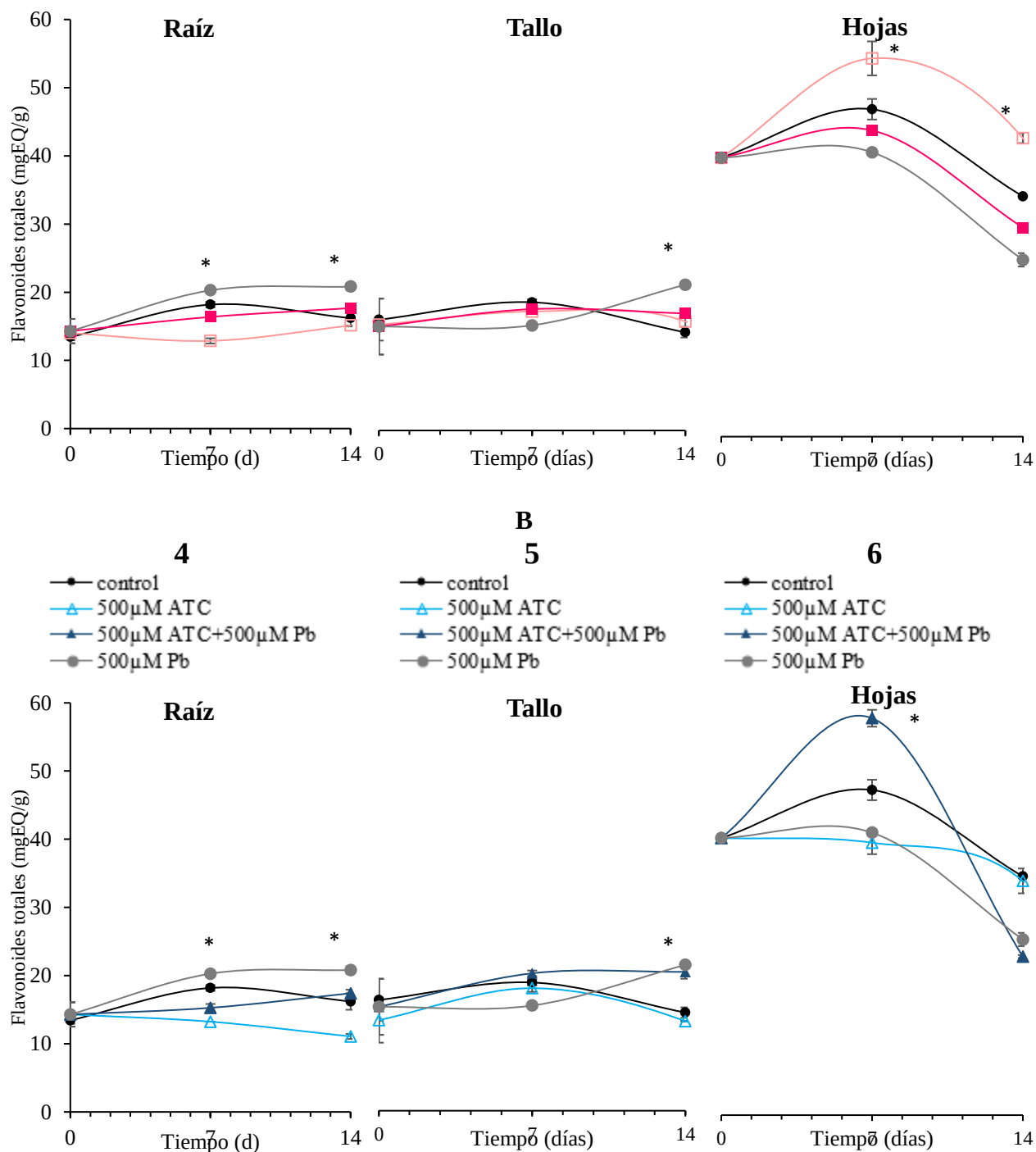


Fig. 21 Acumulación de flavonoides totales de cultivos de plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestas a 500 μ M Pb.

Flavonoides totales: control (●), 100 μ M de ATC (□), 500 μ M de ATC (△), 100 μ M ATC + 500 μ M Pb (■), 500 μ M ATC + 500 μ M Pb (▲) y 500 μ M Pb (○). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparado al control en el mismo tiempo de evaluación.

Los valores corresponden al promedio ($\pm$ DS) realizadas por triplicado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ comparado al control en el mismo tiempo de evaluación

8. Discusión

Modelo biológico 1

En la actualidad hay un incremento de la contaminación por MPs en el mundo, asociado principalmente a las actividades antropogénicas como los son las actividades industriales, domesticas, afectando a los suelos. Esto puede ocasionar la acumulación de MPs en plantas ya que son trasladados hacia las partes aéreas de las plantas y por consecuencia introducirse a la cadena trófica y afectar la salud humana (Hernández y Hernández *et al.*, 2022). Por lo que, en la actualidad se ha buscado de tecnologías eficientes que ayuden a eliminar los MPs del suelo, una de estas estrategias es la fitorremediación la cual se considera un método efectivo para inmovilizar y eliminar los MPs, además de ser considerado sustentable y considerases de bajo costo en comparación a otros métodos como los físicos y químicos (Noriega-Luna *et al.*, 2016).

En la actualidad algunas plantas son ocupadas en la fitorremediación, como por ejemplo el *Eicchornia crassipes* (jacinto de agua) la cual se ha demostrado que es una planta con efectividad en la remoción de contaminantes de aguas residuales por lo que se han diseñado diferentes esquemas para su uso en sistemas de tratamiento (Martelo y Lara 2012). Otras plantas fitorremediadoras son *Salix* spp y *Populus* spp, que son utilizadas para la extracción de Cd y Zn, en el caso de árboles utilizados en la fitorremediación es necesario que presentan un sistema radicular extenso, crecimiento rápido y una gran cantidad de biomasa foliar (Koptsik 2014)

Las plantas que crecen en sitios contaminados con MPs pueden ser plantas con la capacidad de acumular, por lo que la evaluación de estas especies podría conllevar a encontrar plantas potencialmente fitorremediadoras (Liu *et al.*, 2018). Se ha observado que *B. cordata* es una planta con la capacidad de crecer en sitios con condiciones extremas como los suelos ultramáficos que contienen una gran cantidad de Mg y otros MPs (Navarrete *et al.*, 2018) además es una planta utilizada ampliamente en la medicina tradicional, en la cual la población mexicana tiene acceso a la planta fácilmente.

Se ha estudiado el potencial biosintético de producción de compuestos fenólicos en *B. cordata*, Estrada-Zúñiga *et al.* (2009), reporto el establecimiento de un cultivo de células en suspensión en donde se produjeron principalmente compuestos fenólicos como: los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, p- cumárico, sinápico y ferúlico), el flavonoides linarina y el verbascósido, también se ha llevado a cabo la transferencia del cultivo de células en suspensión de *B. cordata* a un sistema biorreactor en donde se mantuvo el potencial metabólico para la producción de metabolitos fenólicos (contenido de glucósidos feniletanoides, flavonoides y fenoles totales) (Vazquez-Marquez *et al.*, 2019), también se estudió los rendimientos de producción de verbascósido después de agregar los elicitores fenilalanina y metil jasmonato en el cultivo de células en suspensión, obteniendo la mayor producción de verbascósido (1.96 g/L) agregando 600 μ M de L-Phe (Arano-Varela *et al.*, 2020). Todas estas investigaciones se han centrado en conocer la capacidad que tienen *B. cordata* para producir compuestos fenólicos, pero no se han hecho investigaciones de la importancia que tienen en el crecimiento y ante condiciones adversas como los MPs.

Un análisis que permite conocer y entender la producción de los metabolitos secundarios en las plantas o en cultivos de células, es la manipulación de las vías metabólicas mediante algunos compuestos con el fin de desviar el flujo de carbono a las otras vías secundarias de competencia para obtener mayores concentraciones de los compuestos deseados (Brincat *et al.*, 2002). Por lo que, se ha hecho uso de inhibidores enzimáticos específicos como el ácido cinámico con el fin de bloquear a la primera enzima de la ruta de los compuestos fenólicos (la fenilalanina amoniaca liasa- PAL) (Brincat *et al.*, 2002).

En los experimentos realizados se utilizó ATC a 100 μ M y 500 μ M en plántulas *in vitro* de *B. cordata*, con el fin de conocer la importancia de los compuestos fenólicos durante el crecimiento. Con respecto a los resultados se observó que el uso de ATC a ambas concentraciones no afectó el crecimiento longitudinal de la raíz y de la planta completa (Fig. 6) tampoco se encontraron diferencias significativas en el peso seco de la raíz, tallo y hojas (Fig.7). Se ha informado que el uso de ácido cinámico aumenta los compuestos fenólicos unidos a la pared celular lo que induce a un aumento de ligninas (Brincat *et al.*, 2002). El 30% del carbono obtenido de la fotosíntesis se dirige a la vía del ácido shikímico para la producción de lignina, sin embargo, también hay una competencia entre el carbono dirigido

para la producción de compuestos fenólicos y la vía MEP (Dudareva *et al.*, 2013). Dado que el ATC no afectó el crecimiento de las plántulas *in vitro* de *B. cordata*, podría deberse a un aumento del metabolismo primario o a la eliminación de compuestos fenólicos inhibidores del crecimiento debido al bloqueo de la vía del ácido shikímico (Brincat *et al.*, 2002).

También, se ha reportado que a concentraciones menores de 50 μM de ATC aumenta la cantidad de biomasa, debido a procesos metabólicos como la fotosíntesis y la disminución de los daños oxidativos (Hojati *et al.*, 2016). En otro estudio, se añadió ATC a 1mM en cultivos de callo de *Camellia sinensis*, en donde se observó la disminución de crecimiento del callo y cambio de coloración con respecto a su control (Aksenova *et al.*, 2023). Por otro lado, Lupini *et al.* (2016), comprobó que 103 μM de ATC correspondía a la cantidad fitotóxica sobre plántulas de maíz, además mostrar una coloración verde brillante en comparación al control y tener cambios morfológicos en sus raíces.

El ácido cinámico (AC) se encuentra en las plantas como isómeros *trans* y *cis*, el ácido *trans*-cinámico se sintetiza a través de la desaminación de la PAL, mientras el *cis*-cinámico es producto de la foto-isomerización del ácido *trans*-cinámico (ATC), actúa como inhibidor de las auxinas promoviendo la formación de raíces laterales (Steenackers *et al.*, 2017). El AC inhibió el crecimiento primario de las raíces e indujo la formación de raíces adventicias en *Selaginella moellendorffii* (Steenackers *et al.*, 2017). Mientras la aplicación de ATC en plantas de *Zea mays* inhibió la actividad de la H-ATPasa y causó la disminución del crecimiento de las raíces, mientras que en *Glycine max*, el ATC aumentó la actividad de las enzimas indol-3-acética oxidasa (IAA) y de la cinamato 4-hidroxilasa (C4H), por lo que se vio inhibido el crecimiento de las raíces (López-González *et al.*, 2023). En los resultados obtenidos de López-González *et al.* (2023), muestran las alteraciones que provoca el ATC en la morfología radicular, disminuyendo los haces vasculares y modificando el metabolismo, cuando el maíz trata de desintoxicarse del ATC, *Z. mays* lo convierte en lignina mediante la activación del metabolismo de la fenilalanina.

Por otro lado, la mayor producción de fenoles totales se observó en el tratamiento de 100 μM de ATC, en raíz, tallo y hoja en el día 7 con respecto al control (Fig.9 A), de igual forma se observó que la mayor producción de flavonoides totales en hojas también fue con ATC 100 μM (Fig.9B). El ATC desvía el flujo de carbono a la producción de compuestos fenólicos,

sin embargo, se ha informado que inhibe la producción de compuestos al bloquear la ruta en concentraciones de 10 μ M a 1 mM (Brincat *et al.*, 2002). Los valores obtenidos en la producción de los compuestos fenólicos por la adición de ATC, pueden variar debido a las varias isoformas de la PAL por lo que puede haber diferencias en la inhibición y producción de los distintos compuestos (Hojati *et al.*, 2016). En *Medicago truncatula* (carretón) se reportaron 6 isoformas, en *Oryza sativa* (arroz) hay 9 y en *Arabidopsis thaliana* 4, en donde PAL1, PAL2 y PAL4 se expresan en el tallo en las primeras etapas de desarrollo, mientras PAL 2 y PAL4 se encuentra en las semillas y PAL1 y PAL2 participan en la producción de flavonoides y PAL3 y PAL4 en la formación de lignina (Biała y Jasiński, 2018).

El ATC disminuyó la producción de compuestos fenólicos: Apigenina, rutina, naringenina y fenólicos totales en *Tanacetum parthenium* (Hojati *et al.*, 2016). Mientras en cultivos de callo de *Camellia sinensis*, se observó un 50% de mayor acumulación de compuestos fenólicos totales, así como de flavanos al día 3 con respecto al control, sin embargo, al durante el tiempo restante de cultivo los compuestos van disminuyendo (Aksenova *et al.*, 2023)

Las plántulas *in vitro* de *B. cordata* expuestos a 500 μ M de Pb y Fe, fueron capaces de crecer en el medio de cultivo que contenía ATC a 100 y 500 μ M respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de raíz y de la parte aérea de las plántulas de los tratamientos utilizados 100 μ M ATC + 500 μ M Fe, 500 μ M ATC + 500 μ M Fe, 100 μ M ATC + 500 μ M Pb, 500 μ M ATC + 500 μ M Pb, 500 μ M Fe y 500 μ M Pb. De la misma forma tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto al peso seco de la raíz, tallo y hojas de las plántulas expuestas a los tratamientos probados.

La aplicación de ATC en *Tanacetum parthenium* mejoró los efectos tóxicos provocados por los MPs (Cd y Cu) sobre la fotosíntesis debido al aumento de los pigmentos, así como la disminución de malondialdehído y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Hojati *et al.*, 2016). Mientras *Basilicum polystachyon* fue capaz de acumular y translocar Pb (II) y mercurio (II), en raíces y brotes, en donde principalmente se observó la acumulación de Pb en raíces esto debido a la unión a los iones de la pared celular que evita que se mueva a otras células de otros órganos (Das *et al.*, 2024).

Con respecto a los resultados obtenidos de la producción de compuestos fenólicos las mayores concentraciones de fenoles totales se dan en el día 7 en los hojas y tallos de las plántulas *in vitro* de *B. cordata*, en donde el tratamiento consistió en 500 μM de ATC con 500 μM de Fe. Con respecto a los experimentos realizados con Pb de la misma forma se encontraron las mayores concentraciones de compuestos fenólicos en raíz, tallo y hojas en el día 7 del tratamiento con 500 μM de Pb y 500 μM de ATC.

La presencia de altas concentraciones de MPs puede generar estrés oxidativo que se puede observar mediante la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Solanki). Por lo que las plantas pueden implementar 2 sistemas para minimizar el estrés oxidativo mediante las enzimas antioxidantes y la síntesis de compuestos no enzimáticos. El sistema enzimático engloba a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), y guayacol peroxidasa (GPX), mientras en el no enzimático, algunos compuestos son el ascorbato, el glutatión, metabolitos secundarios como, los carotenoides, el α -tocoferol y los compuestos fenólicos (Marques *et al.*, 2019).

En presencia de Fe^{2+} o Cu^+ , se pueden generar ROS, mediante de la descomposición de H_2O_2 resultando en la formación del radical $\text{HO}\cdot$ mediante la reacción de Fenton (Covarrubias y Cabrales, 2017). Aunque el Fe es un metal esencial para las plantas, también puede ser reactivo y toxico debido a la reacción de Fenton, por lo que las plantas controlan el equilibrio entre la deficiencia o el exceso de Fe (Kumar *et al.*, 2019). El Fe es muy importante para algunos procesos celulares como la síntesis de clorofila, desarrollo del cloroplasto, además actúa como cofactor de enzimas, se trasfiere en forma de citrato férrico o quelato de Fe (III) hacia los brotes en crecimiento (Kumar *et al.*, 2019). Por otro lado, la presencia de Pb también induce la generación de ROS y aumenta la peroxidación lipídica (Gupta *et al.*, 2013).

El Pb es uno de los metales más persistentes y tóxicos en el medio ambiente, además se encuentra ampliamente distribuido en los suelos debido a las actividades industriales, como el uso de pinturas de Pb, perdigones de escopeta, eliminación de lodos residuales, gasolina entre otros (Gupta *et al.*, 2013). En las plantas puede ocasionar cambios en el cloroplasto, dañar las membranas e inhibir el crecimiento de las raíces y hojas (Gupta *et al.*, 2013). Las plantas capaces de crecer en presencia de Pb, son capaces de acumularlo en raíces debido a

que es capaz de absorberlo por medio de la vía apoplástica o mediante los canales permeables de Ca^{2+} , además el Pb se queda atrapado en la pared celular de las raíces (Kumar *et al.*, 2019).

Además, plantas del género *Buddleja* son capaces de acumular Pb y no mostrar signos de fitotoxicidad. Como *B. asiatica* la cual es capaz de acumular grandes concentraciones de Pb en brotes considerándose un hiperacumulador y ser una planta que podría ser utilizada para la revegetación de zonas contaminadas (Rotkittikhun *et al.*, 2006 y Waranusantigul *et al.*, 2008); *B. paniculata* es considerada un acumulador de Pb (Waranusantigul *et al.*, 2008) y *B. scordioides* puede tolerar el Pb, además es una planta que crece en México (Salas-Luévano *et al.*, 2009). Por lo que, *B. cordata* podría tener la capacidad de acumular Pb debido a que fue capaz de crecer en presencia de 500 μM , y además mostró una mayor producción de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos funcionan como quelantes de metales ayudando a la eliminación de ROS cuando el organismo presenta toxicidad de MPs (Hojati *et al.*, 2016). El aumento de compuestos fenólicos en plantas en presencia de MPs ayuda a proteger a la planta del estrés oxidativo. Los flavonoides neutralizan a los radicales libres que dañan a las células, desempeñando una función de protección (Jańczak-Pieniążek *et al.*, 2022)

Se observó que en *kandelia obovata* en presencia de altas concentraciones de Cd y Zn, sintetiza ácidos fenólicos como el ácido pirogálico, el ácido clorogénico el ácido cafeico y el ácido ferúlico que son capaces de eliminar los radicales hidroxilos (Chen *et al.*, 2020). En *T. parthenium* se dio un aumento de los fenilpropanoides en plantas tratadas con Cd y Cu (Hojati *et al.*, 2016). En otros estudios el exceso de zinc redujo a los terpenos, pero hubo un aumento de los compuestos fenólicos en la manzanilla (Grejtovský *et al.*, 2006).

Mientras en *B. polystachyon* se observó un aumento de compuestos fenólicos en hojas, como los ácidos rosmarínico, cafeico, gálico y elágico en presencia de Pb (II), por otra parte, cuando la planta estuvo en presencia de mercurio (II) se observó un aumento de los ácidos vanílico, elágico, rosmarínico, trans-cinámico, gálico, cafeico y p-cumárico (Das *et al.*, 2024). La presencia de Cu y Pb, aumento la concentración de fenoles y flavonoides totales en variedades de trigo, mostrando diferencias en la acumulación con respecto a la concentración del metal probado (Jańczak-Pieniążek *et al.*, 2022).

En la actualidad hay una gran cantidad de investigaciones (Tabla 10) sobre la interacción de los MPs y el incremento de los MS. La presencia de MPs en los cultivos funciona como elicitación, por lo que la modificación del metabolismo secundario por moléculas que causan estrés funciona como una estrategia para la supervivencia, y al estar dentro de su organismo activan genes implicados en la síntesis de los MS, y las moléculas como $-O_2^-$, H_2O_2 , $-OH$ generadas por la presencia de metales también inducirían la formación de compuestos (Nasim et al. 2010)

Tabla. 10 Incremento de metabolitos secundarios en plantas medicinales expuestas a MPs

Plantas medicinales	Experimento	Metal pesado	Incremento de MS	Referencia
<i>Catharanthus roseus</i>	Cultivo de células en suspensión	0.05 a 0.4 mM Cd	Ajmalicin (alcaloide) 0.4 mM de Cd fue 3 veces superior al control y mayor excreción del metabolito en el medio de cultivo	Zheng et al. 2004
<i>Matricaria chamomilla</i>	Cultivos en maceta	Cu 12%, Zn 2%	Herniarin (compuesto fenólico) Después de 6 h de exposición aumento 3 veces con respecto al control Umbelliferone (compuesto fenólico): Aumento 9 veces con respecto al control	Eliašová et al. 2004
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Cultivo de raíces peludas	Ag, Cu, Zn, Fe, Mn 15–40 μ M	30 μ M de Ag, Tanshinone 1, Tanshinone IIA y cryptotanshinone (terpeno) Aumento de 2 veces	Zhang et al. 2004
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Maceta	Co 20 +Ni 25 mg/Kg en suelo	Flavonoides y antiocianinas Aumento con respecto de control	Eman et al. 2007
<i>Vitis vinifera</i>	Cultivo de células en suspensión	5 μ M Cd y Ag	3-O-glucosyl-resveratrol (compuesto fenólico) Aumento de 1.6 veces	Cai et al. 2013
<i>Stevia rebaudiana</i>	Cultivo de raíces peludas	Cd 100 μ M Cd 200 μ M	Stevioside (terpeno) Rebadioside A	Moradpour et al. 2019
<i>Centella asiatica</i>	Plántulas en invernadero	Cd 200 mg/kg en suelo Pb 200-400 mg/kg en suelo	Asiaticoside (terpeno), Asiatic acid (terpeno), Madecassoside (terpeno), Madecassic acid (terpeno)	Biswas et al. 2020
<i>Gymnema sylvestre</i>	macetas	Pb 200 mg/kg	Gymnemagenin (terpeno) Aumento de 2.56 veces	Sardana et al. 2022

9. Conclusión

Modelo biológico 1

La adición de ATC 100 μM o 500 μM , Fe o Pb 500 μM no tuvieron un efecto sobre la cantidad de biomasa producida de los órganos evaluados: raíz, tallo y hojas, ni afectaron la longitud de la raíz y parte aérea de las plántulas *in vitro* de *B. cordata*, en comparación al control.

El contenido de fenoles y flavonoides totales en las plántulas *in vitro* de *B. cordata* se vio afectado por la adición del ATC (100 y 500 μM), Fe o Pb 500 μM , del tiempo de incubación, así como del tipo de órgano evaluado: raíz, tallo y hojas, en comparación al control.

Bajo el efecto del ATC, tiempo de incubación y tipo de órgano analizado en las plántulas *in vitro* de *B. cordata*, se encontró el mayor contenido de fenoles totales bajo 100 μM de ATC en raíz al día 14 de incubación (68.78 mgEQAG/g) y en hojas al día 7 (81.72 mgEQAG/g), con respecto al control (27.67 y 42.19 mgEQAG/g, respectivamente). Mientras en el tallo la mayor producción de fenoles totales fue con 100 μM de ATC al día 7 y 14 (53.48 y 53.89 mgEQAG/g, respectivamente) con respecto al control (16.27 y 38.04 mgEQAG/g, respectivamente). Respecto al mayor contenido de flavonoides totales, únicamente se observó un efecto del ATC y el tiempo de incubación en las hojas, bajo 100 μM de ATC al día 7 y 14 (51.98 y 41.02 mgEQ/g, respectivamente), con respecto al control (45 y 33.04 mgEQ/g, respectivamente).

Las plántulas *in vitro* de *B. cordata* fueron capaces de producir fenoles y flavonoides totales con la adición de ATC 100 y 500 μM + 500 μM Fe y Pb, mostrando diferentes concentraciones a través del tiempo y dependiendo del tipo de órgano con respecto al control.

Se puede observar que en los tratamientos que contienen 500 μM Fe+ ATC 100 y 500 μM , hay mayor producción de fenoles totales en raíz, tallo y hojas en las plántulas *in vitro* de *B. cordata*. Además, en los tratamientos que solo contienen Fe, se observa un aumento de fenoles totales en raíz y tallo con respecto al control. Mientras la producción de flavonoides totales no aumento en presencia de ATC a 100 μM y 500 μM y Fe o Pb 500 μM , en raíz y tallo.

Las concentraciones más altas de fenoles totales al día 7 se observaron a 500 μM ATC + 500 μM Pb, en raíz, tallo y hojas con respecto al control. Mientras el tratamiento de 100 μM ATC + 500 μM Pb, se observó las mayores concentraciones de fenoles totales al día 14 con

respecto al control. Mientras la producción de flavonoides totales no vio afectada con los tratamientos ATC a 100 μM y 500 μM y Pb 500 μM en hojas y tallos de las plántulas *in vitro* de *B. cordata* con respecto al control, pero se observó un aumento significativo de la producción de flavonoides totales al día 7 con ATC 500 μM y Pb 500 μM .

Los compuestos fenólicos se ven afectados por la adición de los MPs Fe y Pb, en los tratamientos con el ATC a 100 μM y 500 μM , por lo que al verse potenciado la producción de los fenoles y flavonoides totales, estos podrían formar parte de los mecanismos detoxificantes de *B. cordata*.

Con respecto, al cultivo de células en suspensión de *B. cordata*, las células fueron capaces de crecer en todas las concentraciones de los MPs (0.03, 0.06, 0.1, y 0.25 mM Cu; 0.25, 0.50, 1.0 y 1.5 mM Fe; 0.5, 1.0, 2.0, y 3.0 mM Mn; y 0.5, 1.0, 1.25, 1.5 y 2.0 mM Zn.), y estas acumularon cantidades significativas de estos metales. Los niveles más altos de acumulación fueron los siguientes: 1160 mg Cu kg^{-1} , 6845 mg Fe kg^{-1} , 3770 mg Mn kg^{-1} y 6581 mg de Zn kg^{-1} . Mientras que la producción de compuestos fenólicos totales se vio afectado por el tiempo de exposición a los MPs y fue diferente para cada MPs y su concentración.

Por lo que, se requieren más investigaciones sobre que metabolitos secundarios son los responsables en el mecanismo detoxificante de *B. cordata* en presencia de MPs. Esto podría ser a través de la metabolómica no dirigida que permitiría conocer todos los compuestos que se ven potenciados en presencia de MPs.

10. Referencias bibliográficas

- 1 Acevedo, L., Martínez, E., Castañeda, P., Franzblau, S., Timmermann, B. N., Linares, E., ... & Mata, R. (2000). New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp. *cordata*. *Planta medica*, 66(03), 257-261.
- 2 Aksenova, M.A.; Nechaeva, T.L.; Zubova, M.Y.; Goncharuk, E.A.; Kazantseva, V.V.; Katanskaya, V.M.; Lapshin, P.V.; Zagoskina, N.V. Influence of Different Precursors on Content of Polyphenols in *Camellia sinensis* In Vitro Callus Culture. *Plants* **2023**, 12, 796. <https://doi.org/10.3390/plants12040796>
- 3 Alamgir, A. N. M. (2017). Cultivation of herbal drugs, biotechnology, and *In Vitro* production of secondary metabolites, high-value medicinal plants, herbal wealth, and herbal trade. In *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1* (pp. 379-452). Springer, Cham.
- 4 Alcalá Jáuregui, J.; Rodríguez Ortiz, J. C.; Villaseñor Zuñiga, M. E.; Hernández Montoya, A.; García Arreola, M. E.; Beltrán Morales, F. A.; Rodríguez Fuentes, H. 2013. Vegetación bioindicadora de metales pesados en un sistema semiárido. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 45(1): 27-42
- 5 Alcalá Jáuregui, Jorge, Rodríguez Ortiz, Juan C., Villaseñor Zuñiga, María Elena, Hernández Montoya, Alejandra, García Arreola, María Elena, Beltrán Morales, F. Alfredo, Rodríguez Fuentes, Humberto Vegetación bioindicadora de metales pesados en un sistema semiárido. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias [en línea]. 2013, 45(1), 27-42.
- 6 Aragón C.T, De la Torre Chauvin, E., & Caiquetan, A. G. (2014). Diseño a escalas laboratorio y piloto de un sistema de remediación electrocinética de suelos contaminados con metales pesados. *Revista Politécnica*, 34(1), 9-9.
- 7 Arano-Varela, H., Cruz-Sosa, F., Estrada-Zúñiga, M. E., & Fernández, F. J. (2020). Effects of phenylalanine and methyl jasmonate on verbascoside production in *Buddleja cordata* Kunth cell suspension cultures. *South African journal of botany*, 135, 41-49. 10.1016/j.sajb.2020.08.005
- 8 Armienta, M. A., Ongley, L. K., Rodríguez, R., Cruz, O., Mango, H., & Villaseñor, G. (2008). Arsenic distribution in mesquite (*Prosopis laevigata*) and huizache (*Acacia farnesiana*) in the Zimapán mining area, México. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, 8(2), 191-197.
- 9 Arroyave, M. D. P. (2004). La lenteja de agua (*Lemna minor* L.): una planta acuática promisorio. *Revista eia*, (1), 33-38.
- 10 Asati, A., Pichhode, M., & Nikhil, K. (2016). Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 5(3), 56-66.
- 11 Asgari Lajayer B, Khadem Moghadam N, Maghsoodi MR, Ghorbanpour M, Kariman K. Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil, water and atmosphere using ornamental plants: mechanisms and efficiency improvement strategies. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 Mar;26(9):8468-8484. doi: 10.1007/s11356-019-04241-y
- 12 Asgari Lajayer, B., Ghorbanpour, M., & Nikabadi, S. (2017). Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 377-390. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.035>
- 13 Asif M (2015) Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *Chem Int* 1:35-52.
- 14 Avalos GA y Pérez-Urria EC (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).

- 15 Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., & Boland, W. (2006). Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, 67(15), 1661-1672.
- 16 Battineni JK, Koneti PK, Bakshi V, Boggula N (2018) Triterpenoids: A review. *Int J Res Pharm Sci* 3: 91-96
- 17 Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J. F., ... & Guerriero, G. (2019). Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 98-106.
- 18 Biała, W., & Jasiński, M. (2018). The phenylpropanoid case—it is transport that matters. *Frontiers in Plant Science*, 9, 414799.
- 19 Biswas T, Parveen O, Pandey VP, Mathur A, Dwivedi UN (2020) Heavy metal accumulation efficiency, growth and centelloside production in the medicinal herb *Centella asiatica* (L.) urban under different soil concentrations of cadmium and lead. *Ind Crops Prod* 157: 112948. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112948>
- 20 Bonilla MMM; Mancipe MC; y Aguirre MAC (2015). Conservación in vitro: una perspectiva para el manejo de los Recursos Fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67-82.
- 21 Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- 22 Bravo-Bello, J. C., Martínez-Trinidad, T., Romero-Sanchez, M. E., Valdez-Lazalde, J. R., & Benavides-Meza, H. (2020). The analytic hierarchy process for selection of suitable trees for Mexico City. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 13(6), 541.
- 23 Brincat, M. C., Gibson, D. M., & Shuler, M. L. (2002). Alterations in taxol production in plant cell culture via manipulation of the phenylalanine ammonia lyase pathway. *Biotechnology progress*, 18(6), 1149-1156.
- 24 Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C. E., & Vernon-Carter, E. J. (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, 101(15), 5862-5867.
- 25 Cai Z, Kastell A, Speiser C, Smetanska I (2013) Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability. *Appl Biochem Biotechnol* 171:330–340
- 26 Callahan, D. L., Baker, A. J., Kolev, S. D., & Wedd, A. G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11, 2-12.
- 27 Camacho-Morfin, D., Nahed-Toral, J., Soto-Pinto, L., Jiménez-Ferrer, G., Ochoa-Gaona, S., & Grande-Cano, D. (1998). Conocimiento local y valor nutritivo del género *Buddleia* en los Altos de Chiapas. *Agrociencia*, 32(4), 403-412.
- 28 Cárdenas-Sandoval, B. A., Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K., Trejo-Espino, J. L., Zamilpa, A., & Trejo-Tapia, G. (2015). Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Castilleja tenuiflora* Benth: Shoot cultures with cell wall oligosaccharides from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(3), 631-639.
- 29 Carranza-Álvarez, C., Alonso Castro, Á. J., Maldonado-Miranda, J. J., & Hernández Morales, A. (2016). Quantitation of Cd, Pb and Fe in three medicinal plants (*Justicia spicigera*, *Arnica montana* and *Hamelia pantens*) from environmentally diverse locations of Huasteca Potosina, Mexico. *Acta universitaria*, 26(5), 24-30.

- 30 Castillo, F., Aguilar, C. N., Hernández, D., Gallegos, G., & Rodríguez, R. (2012). *Antifungal properties of bioactive compounds from plants*. INTECH Open Access Publisher.
- 31 Castro-González, N. P., Moreno-Rojas, R., Calderón-Sánchez, F., Moreno-Ortega, A., & Tamariz-Flores, J. V. (2018). Metales pesados en leche de vacas alimentadas con alfalfa producida en suelos irrigados con aguas residuales en Puebla y Tlaxcala, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(3), 466-485.
- 32 Chen, S., Lin, R., Lu, H., Wang, Q., Yang, J., Liu, J., & Yan, C. (2020). Effects of phenolic acids on free radical scavenging and heavy metal bioavailability in *kandelia obovata* under cadmium and zinc stress. *Chemosphere*, 249, 126341.
- 33 Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology*, 123(3), 825-832.
- 34 Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology*, 53(1), 159-182.
- 35 Covarrubias, S. A., & Cabriaes, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.
- 36 Cui, Y., Wang, M., Yin, X., Xu, G., Song, S., Li, M., ... & Xia, X. (2019). OsMSR3, a small heat shock protein, confers enhanced tolerance to copper stress in *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6096.
- 37 Dalvi, A. A., & Bhalarao, S. A. (2013). Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Ann Plant Sci*, 2(9), 362-368.
- 38 Das, S., Sultana, K. W., Mondal, M., Chandra, I., & Ndhlala, A. R. (2024). Unveiling the Dual Nature of Heavy Metals: Stressors and Promoters of Phenolic Compound Biosynthesis in *Basilicum polystachyon* (L.) Moench In Vitro. *Plants*, 13(1), 98.
- 39 de Farias, V., Maranhão, L. T., de Vasconcelos, E. C., da Silva Carvalho Filho, M. A., Lacerda, L. G., Azevedo, J. A. M., ... & Soccol, C. R. (2009). Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(1), 10-22.
- 40 De la Rosa L., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing.
- 41 De La Rosa Lara, Itzel Susana. (2011). "Evaluacion de la actividad antihipertensiva de los extractos crudos de "tepozán" *buddleja cordata* h.b.k.". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/208443>
- 42 De la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & Shahidi, F. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 152-162.
- 43 Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial crops and products*, 82, 9-22.
- 44 Díaz Sánchez, B R; Jiménez Estrada, M; Auró de Ocampo, A; (2000). Evaluación del efecto parasitocida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleja cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp). *Veterinaria México*, 31() 189-194. Recuperado de <http://4www.redalyc.org/articulo.oa?id=42331303>

- 45 Dimitriou, I., & Aronsson, P. (2005). Sauces para energía y fitorremediación en Suecia.
- 46 Dobson, A. W., Erikson, K. M., & Aschner, M. (2004). Manganese neurotoxicity. *ANNALS-NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 115-128
- 47 Dotor-López, G.I., et al. "CUANTIFICACION DE METALES PESADOS EN EL CULTIVO DE LA FRESA (*Fragaria x ananassa* Duch. var. festival) EN TENANCINGO Y VILLA GUERRERO ESTADO DE MEXICO." *AGROProductividad*, vol. 10, no. 10, 2017, p. 29+. *Gale OneFile: Informe Académico*
- 48 Drago SME (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4), 42-47.
- 49 Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16-32.
- 50 Ebrahimi, M., & Mokhtari, A. (2017). Engineering of Secondary Metabolites in Tissue and Cell Culture of Medicinal Plants: An Alternative to Produce Beneficial Compounds Using Bioreactor Technologies. In *Crop Improvement* (pp. 137-167). Springer, Cham.
- 51 Eliašová A, Repčák M, Pastírová A (2004) Quantitative changes of secondary metabolites of *Matricaria chamomilla* by abiotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59: <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-817> 543-548
- 52 Eman A, Gad N, Badran NM (2007) Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of *Hibiscus sabdariffa* L. *Aus J Basic Appl Sci* 1:73–78
- 53 Engelmann, F., & González-Arno, M. T. (2013). Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. *en América Latina y el Caribe*, 25.
- 54 Estrada-Zúñiga M.E., Cruz-Sosa F., Verde-Calvo R., Rodríguez-Monroy M., Vernon-Carter E.J. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (2009) 97: 39-47.
- 55 Estrada-Zúñiga, M. E., Aarland, R. C., Rivera-Cabrera, F., Bernabé-Antonio, A. N. T. O. N. I. O., Buendía-González, L., & Cruz-Sosa, F. R. A. N. C. I. S. C. O. (2016). Micropropagation of *Buddleja cordata* and the content of verbascoside and total phenols with antioxidant activity of the regenerated plantlets. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 333-346.
- 56 Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 69-75.
- 57 Fahimirad S, Hatami M (2017) Heavy Metal-Mediated changes in growth and phytochemicals of edible and medicinal plants. In: Ghorbanpour M, Varma A (eds) *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. Springer, Cham. pp 189-214. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_11
- 58 Feoktistova V, Liudmila C, Feoktistova Y (2018). El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *MediSur*, 16(4), 579-587
- 59 Georgiev, M. I., Weber, J., & Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(5), 809-823.
- 60 Glaría, A. V., González-Torres, L. R., Iturralde, R. B., & Granados, E. B. (2006). Flora de la región ultramáfica (serpentinícola) de Guamuhaya. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 75-84.

- 61 Gong W, Dunn BL, Chen Y, y Shen Y (2020) Acclimatization of photosynthetic apparatus and antioxidant metabolism to excess soil cadmium in *Buddleja* spp. *Sci Rep* 10(1), 1-10.
- 62 González-López, Á. M., Quiñones-Aguilar, E. E., & Rincón-Enríquez, G. (2016). Actividad Biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. *Editores: H. Espinosa Andrews. E. García Marquez heavy metals, spotlight on wetlands d A review*, Chemosphere (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.075>
- 63 Grejtovský, A., Markušová, K., & Nováková, L. (2008). Lead uptake by *Matricaria chamomilla* L. *Plant Soil Environ*, 54(2), 47-54.
- 64 Gupta, D. K., Huang, H. G., & Corpas, F. J. (2013). Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2150-2161.
- 65 Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1-11. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>
- 66 Hasanuzzaman M, Bhuyan MHM, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fotopoulos V (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9:681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- 67 Hernández, M. E. L., & Hernández, O. E. M. (2022). Fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados: una revisión. *Revista Ciencia y Tecnología El Higo*, 12(2), 15-28.
- 68 Hojati, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Enferadi, S. T., Majdi, M., Ghanati, F., & Farzadfar, S. (2016). Differential deployment of parthenolide and phenylpropanoids in feverfew plants subjected to divalent heavy metals and trans-cinnamic acid. *Plant and soil*, 399(1-2), 41-59.
- 69 Houghton, P., Mensah, A., Iessa, N., & Yong Hong, L. (2003). Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry*, 64(2), 385-393. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00264-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00264-4)
- 70 Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1).
- 71 Jamwal, K., Bhattacharya, S., & Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 9, 26-38
- 72 Jańczak-Pieniążek, M., Cichoński, J., Michalik, P., & Chrzanowski, G. (2022). Efecto del estrés por metales pesados sobre la acumulación de compuestos fenólicos en plantas de trigo de invierno. *Moléculas*, 28(1), 241.
- 73 Jara-Peña, E., Gómez, J., Montoya, H., Chanco, M., Mariano, M., & Cano, N. (2014). Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista peruana de biología*, 21(2), 145-154.
- 74 Kang, J. H., McRoberts, J., Shi, F., Moreno, J. E., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2014). The flavonoid biosynthetic enzyme chalcone isomerase modulates terpenoid production in glandular trichomes of tomato. *Plant physiology*, 164(3), 1161-1174.
- 75 Khalaf, H., Jasim, R. e Ibrahim, I. (2021) Verbascoside: una revisión de sus actividades antitumorales. *Farmacología y Farmacia* , 12 , 109-126. doi: [10.4236/pp.2021.126011](https://doi.org/10.4236/pp.2021.126011)

- 76 Khan, H., Pervaiz, A., Intagliata, S., Das, N., Venkata, K. C. N., Atanasov, A. G., ... & Bishayee, A. (2020). The analgesic potential of glycosides derived from medicinal plants. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-15.
- 77 Kidd PS, Castro CB, Lestón MG, Monterroso C (2007) Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas*, 16(2).
- 78 Komal, T., Mustafa, M., Ali, Z., & Kazi, A. G. (2015). Heavy metal uptake and transport in plants. *Heavy metal contamination of soils: Monitoring and remediation*, 181-194.
- 79 Koptsik, G.N. Problems and prospects concerning the phytoremediation of heavy metal polluted soils: A review. *Eurasian Soil Sc.* **47**, 923–939 (2014). <https://doi.org/10.1134/S1064229314090075>
- 80 Kumar, V., Singh, J., & Kumar, P. (2019). Heavy metals accumulation in crop plants: Sources, response mechanisms, stress tolerance and their effects. *Contaminants in agriculture and environment: health risks and remediation*, 1, 38.
- 81 Kushwaha, A., Rani, R., Kumar, S., & Gautam, A. (2015). Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: Implications for phytoremediation. *Environmental Reviews*, 24(1), 39-51.
- 82 Lattanzio V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction 50. *Nat. Prod*, 1543-1580.
- 83 Leitenmaier, B., & Küpper, H. (2013). Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in plant science*, 4, 55114.
- 84 Levresse, G., Lopez, G., Tritlla, J., López, E. C., Chavez, A. C., Salvador, E. M., ... & Corona-Esquivel, R. (2012). Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: the case of the Wadley Sb district (San Luis, Potosí, Mexico). *Science of the total environment*, 427, 115-125.
- 85 Limmer, M., & Burken, J. (2016). Phytovolatilization of organic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 50(13), 6632-6643.
- 86 Liu, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of the Total Environment*, 633, 206-219.
- 87 López-González, D., Bruno, L., Díaz-Tielas, C., Lupini, A., Aci, M. M., Talarico, E., ... & Araniti, F. (2023). Short-Term Effects of Trans-Cinnamic Acid on the Metabolism of *Zea mays* L. Roots. *Plants*, 12(1), 189.
- 88 Lupini, A., Sorgona, A., Princi, M. P., Sunseri, F., & Abenavoli, M. R. (2016). Morphological and physiological effects of trans-cinnamic acid and its hydroxylated derivatives on maize root types. *Plant Growth Regulation*, 78, 263-273.
- 89 Lynch, J., Fox, L. J., Owen Jr, J. S., & Sample, D. J. (2015). Evaluation of commercial floating treatment wetland technologies for nutrient remediation of stormwater. *Ecological Engineering*, 75, 61-69.
- 90 Maldonado-Magaña, A. M. A. L. I. A., Orozco-Villafuerte, J. U. A. N., Buendía-González, L., Estrada-Zúñiga, M. E., Bernabé-Antonio, A. N. T. O. N. I. O., & Cruz-Sosa, F. R. A. N. C. I. S. C. O. (2013). Establishment of cell suspension cultures of *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) MC Johnst to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead. *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(3), 489-498.
- 91 Maleki, M., Ghorbanpour, M., & Kariman, K. (2017). Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene*, 11, 247-254.

- 92 Manara, A. (2012). Plant responses to heavy metal toxicity. *Plants and heavy metals*, 27-53.
- 93 Mandal, A., Purakayastha, T. J., Ramana, S., Neenu, S., Bhaduri, D., Chakraborty, K., ... & Rao, A. S. (2014). Status on phytoremediation of heavy metals in India-a review. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 5(Dec, 4), 553-560.
- 94 Marques, D. N., Carvalho, M. E. A., Piotto, F. A., Batagin-Piotto, K. D., Nogueira, M. L., Gaziola, S. A., & Azevedo, R. A. (2019). Antioxidant defense response in plants to cadmium stress. In *Cadmium Tolerance in Plants* (pp. 423-461). Academic Press.
- 95 Martelo, J., & Lara Borrero, J. A. (2012). Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales: una revisión del estado del arte. *Ingeniería y ciencia*, 8(15), 221-243.
- 96 Martínez-Vázquez, M., Apan, T., Lastra, A., & Bye, R. (1998). A Comparative Study of the Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Pectolinarin Isolated from *Cirsium subcoriaceum* and Linarin Isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica*, 64(02), 134-137. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957390>
- 97 Martínez-Vázquez, M., Ramírez Apan, T., M., H., & Bye, R. (1996). Analgesic and Antipyretic Activities of an Aqueous Extract and of the Flavone Linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Medica*, 62(02), 137-140. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957836>
- 98 Memon, A. R. (2016). Metal hyperaccumulators: mechanisms of hyperaccumulation and metal tolerance. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 3*, 239-268.
- 99 Mendoza PE (2003). El tepozán del herbario. *Ciencias* 70: 32-33
- 100 Mensah, A. Y., Houghton, P. J., Bloomfield, S., Vlietinck, A., & Vanden Berghe, D. (2000). Known and novel terpenes from *Buddleja globosa* displaying selective antifungal activity against dermatophytes. *Journal of natural products*, 63(9), 1210-1213.
- 101 Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., & Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant physiology and biochemistry*, 44(1), 25-37.
- 102 Moadpour N, Garoosi G, Haddad R (2019) Study the effect of heavy metals and Nano TiO₂ on stevioside and Rebadioside A production in *Stevia rebaudiana* Bertoni hairy roots. *IJGPB* 8: 36-44
- 103 Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- 104 Mustafa, G., & Komatsu, S. (2016). Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(8), 932-944.
- 105 Muthusaravanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, M., Prakashmaran, J., ... & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environmental chemistry letters*, 16(4), 1339-1359.
- 106 Nadeem, H., & Ahmad, F. (2019). Prospects for the Use of Plant Cell Culture as Alternatives to Produce Secondary Metabolites. In *Natural Bio-active Compounds* (pp. 153-182). Springer, Singapore.
- 107 Nascimento N.C., Fett-Neto A.G. (2010) Plant Secondary Metabolism and Challenges in Modifying Its Operation: An Overview. In: Fett-Neto A. (eds) *Plant Secondary Metabolism Engineering. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 643. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-723-5_1

- 108 Nasim, S. A., & Dhir, B. (2010). Heavy metals alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 139-149.
- 109 Navarrete Gutiérrez, D.M., Pons, MN., Cuevas Sánchez, J.A. *et al.* Is metal hyperaccumulation occurring in ultramafic vegetation of central and southern Mexico?. *Ecol Res* **33**, 641–649 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11284-018-1574-4>
- 110 Navarro Ascencio, Gabriel, 2001 “Determinación de la calidad nutritiva de cuatro plantas forrajeras (*Amelanchier denticulata*, *Buddleia cordata*, *Cotoneaster pannosa*, *Dodonaea viscosa*) como alternativa para la alimentacion de caprinos y ovinos.” Mexico, 36 p.
- 111 Noriega-Luna, B., Morales-Rodríguez, A. A., Luna-Quintanilla, R., Ulloa-Vázquez, T., Cruz-Jiménez, G., Serafín-Muñoz, A. H., & Gutiérrez-Ortega, N. L. (2016). Identificación de especies vegetales asociadas a jales del distrito minero de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 26(2), 71-77
- 112 Ocampo- Acosta G. (2003) Buddlegaceae, Flora del bajío y regiones adyacentes. 115:1-35
- 113 Ocampo- Acosta G. (2004) Flora del valle de Tehuacán- Cuicatlán. 39:1-12
- 114 Ortiz Zepeda, Elsa Haide. (1996). "Actividad antibacteriana de la raiz de *Buddleia cordata*". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/264751>
- 115 Oyuela Leguizamo, M.A., et al., Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of
- 116 Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy metals in crop plants: transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*, 5(3), 447-463.
- 117 Pasricha, S., Mathur, V., Garg, A., Lenka, S., Verma, K., & Agarwal, S. (2021). Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators-an analysis: Heavy metal tolerance in hyperaccumulators. *Environmental Challenges*, 4, 100197.
- 118 Perezgasga, F. V., & Morales, V. M. C. (1999). *La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México*. Texas Center for Policy Studies
- 119 Prieto Méndez, Judith, & González Ramírez, César A., & Román Gutiérrez, Alma D., & Prieto García, Francisco (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Agroecosistemas tropicales y subtropicales*, 10 (1), 29-44. [Fecha de Consulta 10 de Noviembre de 2021]. ISSN:
- 120 Quiroz, A., Espinosa-Garcia, F., & Ilangovan, K. (2002). Effects of natural hydrosoluble chelates of three plant species on the mobilization of heavy metals. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(6), 862-869.
- 121 Ramakrishna A. y Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- 122 Ramos-Palacios, R., Orozco-Segovia, A., Sánchez-Coronado, M. E., & Barradas, V. L. (2012). Vegetative propagation of native species potentially useful in the restoration of Mexico City's vegetation. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(3), 809-816.
- 123 Ranieri, E., Moustakas, K., Barbaferi, M., Ranieri, A. C., Herrera-Melián, J. A., Petrella, A., & Tommasi, F. (2020). Phytoextraction technologies for mercury-and chromium-contaminated soil: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(2), 317-327.

- 124 Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant science*, 180(2), 169-181.
- 125 Reeves RD, Baker AJ, Jaffré T, Erskine PD, Echevarria G, van der Ent A (2018) A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytologist*, 218(2), 407-411.
- 126 Restrepo Caro, C., Coronell, M. D. C., Arrollo, J., Martínez, G., Sánchez Majana, L., & Sarmiento-Rubiano, L. A. (2016). La deficiencia de zinc: un problema global que afecta la salud y el desarrollo cognitivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 165-175.
- 127 Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., & Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+ D*, 16(2), 66-77.
- 128 Rodríguez-Vázquez, R., Sánchez, S., Mena-Espino, X., & Amezcua-Allieri, M. A. (2016). Identification of the medicinal plant species with the potential for remediation of hydrocarbons contaminated soils. *Acta physiologiae plantarum*, 38(1), 1-11.
- 129 Romero, SR., Aguilar RS y Rojas CZ (2003). *Buddleja cordata* hbk ssp. *cordata* (buddlejaceae): Propagación y anatomía de la madera. *Polibotánica*, (16), 63-77.
- 130 Rosas, J. M., Vicente, F., Santos, A., & Romero, A. (2013). Soil remediation using soil washing followed by Fenton oxidation. *Chemical engineering journal*, 220, 125-132.
- 131 Rotkittikhun, P., Kruatrachue, M., Chaiyarat, R., Ngernsarsaruay, C., Pokethitiyook, P., Pajitprapaporn, A., & Baker, A. J. M. (2006). Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *Environmental pollution*, 144(2), 681-688
- 132 Saeed-Ur-Rahman K, Hui M, Kayani N, Tang S-I (2020) Diversity and versatile functions of metallothioneins produced by plants: a review. *Pedosphere* 30:577–588. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60022-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60022-4)
- 133 Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1), 67-80.
- 134 Salas Hernández, J. E. (2023). Sabores y colores del semidesierto zacatecano: cabuches y flores de palma. Dos alimentos ancestrales en Mazapil, Zacatecas. <https://sillares.uanl.mx/index.php/s/issue/view/4>. <https://doi.org/10.29105/sillares2.4-73>
- 135 Salas-Luévano, M. A., Manzanares-Acuña, E., Letechipía-de León, C., & Vega-Carrillo, H. R. (2009). Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23(1), 27-32.
- 136 Santoyo-Martínez, M., Mussali-Galante, P., Hernández-Plata, I., Valencia-Cuevas, L., Flores-Morales, A., Ortiz-Hernández, L., ... & Tovar-Sánchez, E. (2020). Heavy metal bioaccumulation and morphological changes in *Vachellia campechiana* (Fabaceae) reveal its potential for phytoextraction of Cr, Cu, and Pb in mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 11260-11276.
- 137 Sardana TB, Dwivedi UN (2022) Differential morphological, biochemical, and secondary Metabolism–related tolerance to increasing soil lead levels in *Gymnema sylvestre* R.Br. *J Soil Sci Plant Nutr* 22:4404–4414. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-01040-2>

- 138 SEMARNAT. (2010). Plantas medicinales de la Farmacia Viviente de CEFOROR: usos terapéuticos tradicionales y dosificación. Disponible en: https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas_medicinales_de_la_farmacia_viviente-conafor.pdf
- 139 Sepúlveda Jiménez, Gabriela, Porta Ducoing, Helena, Rocha Sosa, Mario La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* [en línea]. 2003, 21 (3), 355-363 [fecha de Consulta 19 de Mayo de 2021]. ISSN:. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>
- 140 Shah, A., Niaz, A., Ullah, N., Rehman, A., Akhlaq, M., Zakir, M., & Suleman Khan, M. (2013). Comparative study of heavy metals in soil and selected medicinal plants. *Journal of Chemistry*, 2013
- 141 Sharma, S. S., Dietz, K. J., & Mimura, T. (2016). Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 1112-1126.
- 142 Solanki, R., & Dhankhar, R. (2011). Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia*, 66(2), 195-204.
- 143 Soliman, S. S., Tsao, R., & Raizada, M. N. (2011). Chemical inhibitors suggest endophytic fungal paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways. *Journal of natural products*, 74(12), 2497-2504.
- 144 Srivastava, N. (2016). Role of phytochelatins in phytoremediation of heavy metals contaminated soils. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 3*, 393-419.
- 145 Steenackers, W., Klíma, P., Quareshy, M., Cesarino, I., Kumpf, R. P., Corneillie, S., ... & Vanholme, B. (2017). cis-Cinnamic acid is a novel, natural auxin efflux inhibitor that promotes lateral root formation. *Plant Physiology*, 173(1), 552-565.
- 146 Street, R. A. (2012). Heavy metals in medicinal plant products—An African perspective. *South African Journal of Botany*, 82, 67-74.
- 147 Sytar, O., Ghosh, S., Malinska, H., Zivcak, M., & Brestic, M. (2021). Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants. *Physiologia plantarum*, 173(1), 148-166.
- 148 Tao, J., & Lu, L. (2022). Advances in genes-encoding transporters for cadmium uptake, translocation, and accumulation in plants. *Toxics*, 10(8), 411.
- 149 Thakur, S., Singh, L., Wahid, Z. A., Siddiqui, M. F., At Naw, S. M., & Din, M. F. M. (2016). Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-11.
- 150 Tian, X. Y., Li, M. X., Lin, T., Qiu, Y., Zhu, Y. T., Li, X. L., ... & Chen, L. P. (2021). A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112563.
- 151 Ugulu, I. (2015). Determination of heavy metal accumulation in plant samples by spectrometric techniques in Turkey. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 113-151.
- 152 Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., Fahad, S., & Yang, X. (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28-40.
- 153 Vazquez-Marquez, A. M., Zepeda-Gómez, C., Burrola-Aguilar, C., Bernabé-Antonio, A., Nieto-Trujillo, A., Cruz-Sosa, F., ... & Estrada-Zúñiga, M. E. (2019). Effect of stirring speed on the production of phenolic

- secondary metabolites and growth of *Buddleja cordata* cells cultured in mechanically agitated bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(1), 155-166.
- 154 Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New phytologist*, 181(4), 759-776.
- 155 Verpoorte R., Contin A., Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1: 1, 13-25.
- 156 Waranusantigul, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., & Auesukaree, C. (2008). Evaluation of Pb phytoremediation potential in *Buddleja asiatica* and *B. paniculata*. *Water, air, and soil pollution*, 193, 79-90
- 157 Wei C, Deng Q, Wu F, Fu Z, Xu L (2011) Arsenic, antimony, and bismuth uptake and accumulation by plants in an old antimony mine, China. *Biol. Trace Elem. Res.* 144(1), 1150-1158.
- 158 Wessling-Resnick, M. (2017). Excess iron: considerations related to development and early growth. *The American journal of clinical nutrition*, 106(suppl_6), 1600S-1605S
- 159 Wink, M. (2008). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications*, 3(8), 1934578X0800300801
- 160 Xia, W.-Y., Feng, Y.-S., Jin, F., Zhang, L.-M. and Du, Y.-J. (2017) Stabilization and solidification of a heavy metal contaminated site soil using a hydroxyapatite based binder. *Construction and Building Materials*, 156, pp. 199-207. (doi:10.1016/j.conbuildmat.2017.08.149)
- 161 Yan, X., Wang, J., Song, H., Peng, Y., Zuo, S., Gao, T., ... & Dong, J. (2020). Evaluation of the phytoremediation potential of dominant plant species growing in a chromium salt-producing factory wasteland, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 7657-7671.
- 162 Yongpisanphop, J., Babel, S., Kruatrachue, M., & Pokethitiyook, P. (2017). Phytoremediation potential of plants growing on the Pb-contaminated soil at the Song Tho Pb Mine, Thailand. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 26(4), 426-437.
- 163 Youssef, F. S., Ashour, M. L., & El-Ahmady, S. H. (2018). Insights into the traditional uses of certain medicinally important genera belonging to family Scrophulariaceae. *Current Traditional Medicine*, 4(3), khan
- 164 Zeng, X., Guo, F., & Ouyang, D. (2020). A review of the pharmacology and toxicology of aucubin. *Fitoterapia*, 140, 104443
- 165 Zhang, X., Zhang, Z. Q., Zhang, L. C., Wang, K. X., Zhang, L. T., & Li, D. Q. (2021). The development and validation of a sensitive HPLC-MS/MS method for the quantitative and pharmacokinetic study of the seven components of *Buddleja lindleyana* Fort. *RSC advances*, 11(42), 26016-26028.
- 166 Zheng, Z., & Wu, M. (2004). Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant science*, 166(2), 507-514.
- 167 Zhu G, Xiao H, Guo Q, Song B, Zheng G, Zhang Z y Okoli CP (2018) Heavy metal contents and enrichment characteristics of dominant plants in wasteland of the downstream of a lead-zinc mining area in Guangxi, Southwest China. *Ecotoxicology and Environmental safety* 151, 266-271.

11. Efecto del Cu, Fe, Mn y Zn en el crecimiento y acumulación de metales pesados y de compuestos fenólicos en cultivos de células en suspensión de B. cordata

Article

Changes in Growth and Heavy Metal and Phenolic Compound Accumulation in *Buddleja cordata* Cell Suspension Culture under Cu, Fe, Mn, and Zn Enrichment

Alicia Monserrat Vazquez-Marquez ¹, Antonio Bernabé-Antonio ² , José Correa-Basurto ³ ,
Cristina Burrola-Aguilar ⁴ , Carmen Zepeda-Gómez ¹ , Francisco Cruz-Sosa ^{5,*} , Aurelio Nieto-Trujillo ^{4,*} 
and María Elena Estrada-Zúñiga ^{4,*} 

- ¹ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 15.5, Toluca CP 50200, México
 - ² Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Km. 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Col. Las Agujas, Zapopan CP 45200, México
 - ³ Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón S/N, Casco de Santo Tomas, Miguel Hidalgo, Ciudad de México CP 11340, México
 - ⁴ Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 14.5, San Cayetano, Toluca CP 50295, México
 - ⁵ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco No. 186, Col. Leyes de Reforma 1a. Sección, Alcaldía Iztapalapa, Ciudad de México CP 09310, México
- * Correspondence: cuhp@xanum.uam.mx (F.C.-S.); anietot_ext@uaemex.mx (A.N.-T.); meestrada@uaemex.mx (M.E.E.-Z.)



Citation: Vazquez-Marquez, A.M.; Bernabé-Antonio, A.; Correa-Basurto, J.; Burrola-Aguilar, C.; Zepeda-Gómez, C.; Cruz-Sosa, F.; Nieto-Trujillo, A.; Estrada-Zúñiga, M.E. Changes in Growth and Heavy Metal and Phenolic Compound Accumulation in *Buddleja cordata* Cell Suspension Culture under Cu, Fe, Mn, and Zn Enrichment. *Plants* **2024**, *13*, 1147. <https://doi.org/10.3390/plants13081147>

Academic Editors: Marzena Sujkowska-Rybkowska and Marilena Ronzan

Received: 13 March 2024

Revised: 13 April 2024

Accepted: 16 April 2024

Published: 19 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Buddleja cordata* cell suspension cultures could be used as a tool for investigating the capabilities of this species to tolerate heavy metals (HMs) and for assessing the effects of HMs on the accumulation of phenolic compounds in this species. It grows in a wide range of habitats in Mexico, including ultramafic soils, and mobilizes some HMs in the soil. The mobilization of these HMs has been associated with phenolic substances. In addition, this species is used in Mexican traditional medicine. In the present study, a *B. cordata* cell suspension culture was grown for 18 days in a culture medium enriched with Cu (0.03–0.25 mM), Fe (0.25–1.5 mM), Mn (0.5–3.0 mM), or Zn (0.5–2.0 mM) to determine the effects of these HMs on growth and HM accumulation. We also assessed the effects of the HMs on phenolic compound accumulation after 1 and 18 days of HM exposure. Cells were able to grow at almost all tested HM concentrations and accumulated significant amounts of each HM. The highest accumulation levels were as follows: 1160 mg Cu kg^{−1}, 6845 mg Fe kg^{−1}, 3770 mg Mn kg^{−1}, and 6581 mg Zn kg^{−1}. Phenolic compound accumulation was affected by the HM exposure time and corresponded to each HM and its concentration. Future research should analyze whole plants to determine the capabilities of *Buddleja cordata* to accumulate abnormally high amounts of HM and to evaluate the physiological impact of changes in the accumulation of phenolic compounds.

Keywords: heavy metal tolerance; elicitation; secondary metabolite; verbascoside

1. Introduction

Plants are evolutionarily adapted to environmental changes, allowing them to absorb heavy metals (HMs) present at high levels in soils via well-coordinated molecular mechanisms through morphological, physiological, and metabolic adaptations [1–3]. All plant species presumably have a basal heavy metal (HM) tolerance provided by a complex system of uptake/efflux, transport/sequestration, and chelation processes. However, the characteristics of these processes vary among species, and plant species can be categorized as hyperaccumulators or non-accumulators [4]. Most plants are non-accumulators and tend to avoid metal uptake, which is the simplest strategy for tolerating high HM exposure.

However, HMs can induce phytotoxicity, which presents as altered metabolic activity, growth reduction, and low biomass production [3,4]. The capability of plants to accumulate abnormally high amounts of metals (at levels 100- to 1000-fold greater than those typically measured in non-accumulator plants) in their aboveground organs is represented by the term “hyperaccumulation” [5,6]. Hyperaccumulator species are characterized by their tolerance of HMs and detoxification mechanisms. For example, the overexpression of the transport protein systems required to enhance sequestration, the chelation of metals, and the fast and effective repair of damage caused by HMs may include changes in antioxidant defenses, the expression of heat shock proteins, and the induction of secondary metabolites (e.g., phenolic compounds). Chelation with ligands may also occur, enabling HM ions to be transported and sequestered in different plant tissues [4,5,7]. Phenolic compounds can act as ligands that form complexes with metals. This complexation may have indirect effects such as facilitating cell penetration; changing the redox state of the metal, consequently altering its bioavailability; and producing reduction activity in redox-active metals. Phenolic compounds can also act as antioxidants during the oxidation process due to their radical-scavenging activities based on hydrogen or electron donation, which results in stable phenoxyl radicals [8].

Hyperaccumulator species have been found in at least 52 families, including Brassicaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, and Scrophulariaceae [2,5,6]. In addition, several hyperaccumulator species grow in soils rich with metals, such as ultramafic soils. These soils are generally infertile and edaphically stressful for the growth and survival of most plant species. However, ultramafic species have evolved adaptations to tolerate these stressful conditions [9], such as some species belonging to the *Buddlejaceae* genus (Scrophulariaceae). *Buddleja asiatica* was reported to be a lead hyperaccumulator [10,11], while *B. paniculata* and *B. scordioides* were reported to be lead accumulators [11,12]. Although *Buddleja cordata* Humb. Bonpl. and Kunth is distributed in a wide range of habitats in Mexico, including habitats with infertile soils [13,14], the most recent study to determine its hyperaccumulation potential was published by Navarrete et al. [14]. In that work, the ultramafic vegetation of central and southern Mexico was assessed to identify Ni hyperaccumulator species. Although *B. cordata* presented low Ni accumulation (10 mg kg^{-1}), Ca, Co, Fe, Mg, Mn, and Zn were accumulated at concentrations of 6889, 1.2, 1788, 4481, 22, and 13.6 mg kg^{-1} , respectively, in the plant's leaves when grown in an ultramafic soil characterized by high Mg, Fe, Cr, Co, and Ni concentrations and Ca macronutrient deficiencies [14]. Leaf litter samples of *B. cordata* grown near Mexico City, which is highly polluted, indicated an increased mobilization of some HMs in the soil (essential metal nutrients Cu, Fe, Mn, and Zn and nonessential metal nutrients Al, Cd, and Pb) based on hydrosoluble phenolic substances [15]; the authors argued that these compounds might act as chelators.

Research on hyperaccumulators has increased worldwide because such species represent an environmentally friendly and inexpensive way to restore HM-polluted soils through phytoremediation [2,16,17]. Moreover, plant cell cultures are a useful tool used to investigate plant responses to metal pollution. These cultures allow one to control environmental and nutritional conditions, enabling researchers to estimate the intrinsic phytoremediation potential of plants. In addition, the use of plant cultures reduces the time required for experiments because they rely on continuously propagated vegetal material rather than whole plants [18].

In previous work with *B. cordata*, we established a cell culture producer of phenolic compounds such as phenolic acids (hydroxycinnamic acids), linarin (flavonoid), and verbascoside (phenylpropanoid glycoside) [19]. This culture was characterized by its growth and phenolic compound concentration since these phenolic compounds are related to the use of this species in Mexican traditional medicine; its medicinal uses are related to wounds or skin ailments, rheumatism, liver disorders, headaches, gastrointestinal infections, muscle cramps, nasal hemorrhages, and diuretic and kidney treatments, of which their therapeutic effects have been mainly attributed to phenolic compounds [19]. Thus, this type of cell

culture can be used to investigate the ability of *B. cordata* to tolerate HMs. The present study aimed to determine the effects of different concentrations of Cu, Fe, Mn, and Zn on growth, HM accumulation, and phenolic compound accumulation to study the HM tolerance of the *B. cordata* cell suspension culture.

2. Results

2.1. Tolerance and Accumulation of HMs in a *B. cordata* Cell Suspension Culture Grown in a Culture Medium Enriched with Cu, Fe, Mn, and Zn

After HM exposure, the *B. cordata* cell suspension culture showed significant changes in its growth parameters (cell viability and growth index), and its environment (pH, and total sugar content of the culture medium) caused by the type of HM and its concentration. The highest concentration tested for each HM (0.25 mM Cu, 1.5 mM Fe, 3.0 mM Mn, and 2.0 mM Zn) had the strongest effect on the growth parameters and yielded the most significant growth inhibition (with growth indexes of 0.21, 0.44, 0.34, and 0.24, respectively); the lowest cell viability percentages (20.5, 12.86, 10.34, and 12.2, respectively); the lowest pH values (4.22, 4.43, 4.11, and 4.34, respectively); and the highest total sugar contents (28.13, 27.56, 27.88, and 28.31 g L⁻¹, respectively) in the culture medium (Table 1). In the remaining HM treatments, the cells were able to grow, presenting growth index values > 3.29. Notably, the growth index values in several HM treatments (0.03–0.10 mM Cu, 0.25–0.5 mM Fe, 0.5–2.0 mM Mn, and 0.5–1.25 mM Zn) were not significantly different from those in the control (growth index of 6.46). In addition, the cell viability, total sugar content, and pH values in these treatments were slightly or not different from those in the control (81.33%, 5.57 g L⁻¹, and 6.38, respectively; Table 1).

All these results show that the *B. cordata* cell suspension culture was unable to tolerate the highest HM concentrations tested, inhibiting growth and leading to death, acidification, and the nonconsumption of sucrose in the culture medium. Indeed, growth tolerance index values lower than 0.1 were observed (0.03, 0.07, 0.05, and 0.04 for 0.25 mM Cu, 1.5 mM Fe, 3.0 mM Mn, and 2.0 mM Zn, respectively; Figure 1a–d). Therefore, HM accumulation in the *B. cordata* cell suspension culture was not determined at the highest HM concentrations tested. However, the *B. cordata* cell suspension culture tolerated the remaining HM concentrations tested and grew despite the presence of HMs at considerably higher concentrations (600- to 2000-fold greater for Cu, 5- to 20-fold greater for Fe, 10- to 40-fold greater for Mn, and 33.3- to 100-fold greater for Zn) than those in the control treatment (0.00005 mM Cu, 0.05 mM Fe, 0.05 mM Mn, and 0.015 mM Zn). For all other tested HM concentrations, the growth tolerance index values were higher than 0.51 (Figure 1a–d).

Exposing the *B. cordata* cell suspension culture to the four HMs provoked a significant increase in HM accumulation (Figure 2a–d). For Cu, Fe, and Zn, HM accumulation was directly influenced by the HM concentration (Figure 2a,b,d). The highest accumulation values for each HM were 1160 mg Cu kg⁻¹, 6845 mg Fe kg⁻¹, 3770 mg Mn kg⁻¹, and 6581 mg Zn kg⁻¹ at 0.1 mM Cu, 1 mM Fe, 2 mM Mn, and 1.5 mM Zn, respectively (Figure 2a–d). In addition, the ability of the *B. cordata* cell suspension culture to take up HMs from the culture medium, expressed as the bioaccumulation factor, significantly decreased under Cu, Mn, and Zn exposure and was inversely influenced by the HM concentration. However, we observed opposite effects under Fe exposure (Figure 2a–d).

2.2. Total Phenolic and Verbascoside Content Changes in the *B. cordata* Cell Suspension Culture Grown in a Culture Medium Enriched with Cu, Fe, Mn, and Zn

The exposure time of the *B. cordata* cell suspension culture to the four HMs yielded significant changes in phenolic compound accumulation. In general terms, HM exposure over 18 days of culture decreased the total phenolic and verbascoside contents, which were inversely affected by the HM level, compared with the control; however, the opposite occurred at 1.0 mM Mn (Figure 3a–d). Total phenolic and verbascoside content values were found to be the lowest under the highest tested metal concentrations, with values as low as zero (Figure 3a,b). In contrast, treating the *B. cordata* cell suspension culture with 1.0 mM Mn yielded the highest accumulation of phenolic compounds, with higher values observed

for the total phenolic (248 mg gallic acid equivalent g^{-1} [mg GAE g^{-1}]) and verbascoside (224 mg g^{-1}) contents compared to the control treatment (152 mg GAE g^{-1} and 137 mg g^{-1} , respectively) (Figure 3a,b). After 1 day of HM exposure, the values of the total phenolic and verbascoside were higher than those of the control, which was an effect that depended on each HM and its concentration (Figure 3e–h).

Table 1. Effects of Cu, Fe, Mn, and Zn enrichment on the growth and culture medium of the *B. cordata* cell suspension grown for 18 days.

Heavy Metal Treatment (mM)	Growth		pH	Culture Medium
	Cell Viability (%)	Growth Index		Total Sugar Content (g L ⁻¹)
Copper				
Control (0.00005)	81.33 ± 1.58 ^a	6.46 ± 0.88 ^a	6.38 ± 0.05 ^b	5.57 ± 0.40 ^b
0.03	77.00 ± 3.54 ^a	6.43 ± 0.27 ^a	6.44 ± 0.05 ^b	5.21 ± 0.72 ^b
0.06	73.25 ± 0.65 ^b	6.11 ± 0.58 ^a	6.66 ± 0.02 ^a	4.34 ± 0.61 ^b
0.10	72.40 ± 1.15 ^b	6.23 ± 0.15 ^a	6.63 ± 0.10 ^a	4.44 ± 0.54 ^b
0.25	20.50 ± 0.78 ^c	0.21 ± 0.01 ^b	4.22 ± 0.03 ^c	28.13 ± 1.11 ^a
Iron				
Control (0.05)	81.33 ± 1.58 ^a	6.46 ± 0.88 ^a	6.38 ± 0.05 ^{a,b}	5.57 ± 0.40 ^c
0.25	75.97 ± 2.10 ^b	5.97 ± 0.24 ^a	6.64 ± 0.05 ^a	3.91 ± 0.15 ^c
0.50	71.94 ± 1.82 ^b	5.77 ± 0.18 ^a	6.55 ± 0.10 ^a	5.94 ± 0.02 ^c
1.00	66.99 ± 0.84 ^c	3.29 ± 0.14 ^b	5.69 ± 0.01 ^c	16.22 ± 2.01 ^b
1.50	12.86 ± 1.26 ^c	0.44 ± 0.02 ^c	4.43 ± 0.01 ^d	27.56 ± 0.40 ^a
Manganese				
Control (0.05)	81.33 ± 1.58 ^a	6.46 ± 0.88 ^a	6.38 ± 0.05 ^a	5.57 ± 0.40 ^b
0.50	78.41 ± 1.85 ^a	6.48 ± 0.19 ^a	6.49 ± 0.04 ^a	1.71 ± 0.22 ^c
1.00	67.71 ± 2.53 ^b	6.38 ± 0.09 ^a	6.42 ± 0.09 ^a	1.58 ± 0.29 ^c
2.00	66.75 ± 2.25 ^b	6.17 ± 0.01 ^a	6.26 ± 0.04 ^b	1.38 ± 0.33 ^c
3.00	10.34 ± 0.25 ^c	0.34 ± 0.04 ^b	4.11 ± 0.04 ^b	27.88 ± 1.26 ^a
Zinc				
Control (0.015)	81.33 ± 1.58 ^a	6.46 ± 0.88 ^a	6.38 ± 0.05 ^a	5.57 ± 0.40 ^d
0.50	72.32 ± 2.44 ^b	6.22 ± 0.35 ^a	6.37 ± 0.06 ^a	4.34 ± 0.46 ^d
1.00	70.77 ± 1.83 ^b	5.99 ± 0.13 ^{a,b}	5.84 ± 0.06 ^b	13.04 ± 1.79 ^c
1.25	54.56 ± 0.41 ^c	5.46 ± 0.41 ^{a,b}	5.22 ± 0.03 ^c	17.70 ± 0.80 ^b
1.50	26.06 ± 1.40 ^d	4.36 ± 0.24 ^b	4.98 ± 0.04 ^d	24.35 ± 1.66 ^a
2.00	12.20 ± 2.54 ^e	0.24 ± 0.02 ^c	4.34 ± 0.02 ^e	28.31 ± 2.48 ^a

Data show the mean $\pm$ standard deviation (SD). For each heavy metal, the same lowercase letter after the mean $\pm$ SD value within a column indicates no significant difference at the 5% significance level. For each heavy metal, all the results are highlighted with a specific color: orange color was used for copper, green color was used for iron, pink color was used for manganese, and blue color was used for zinc.

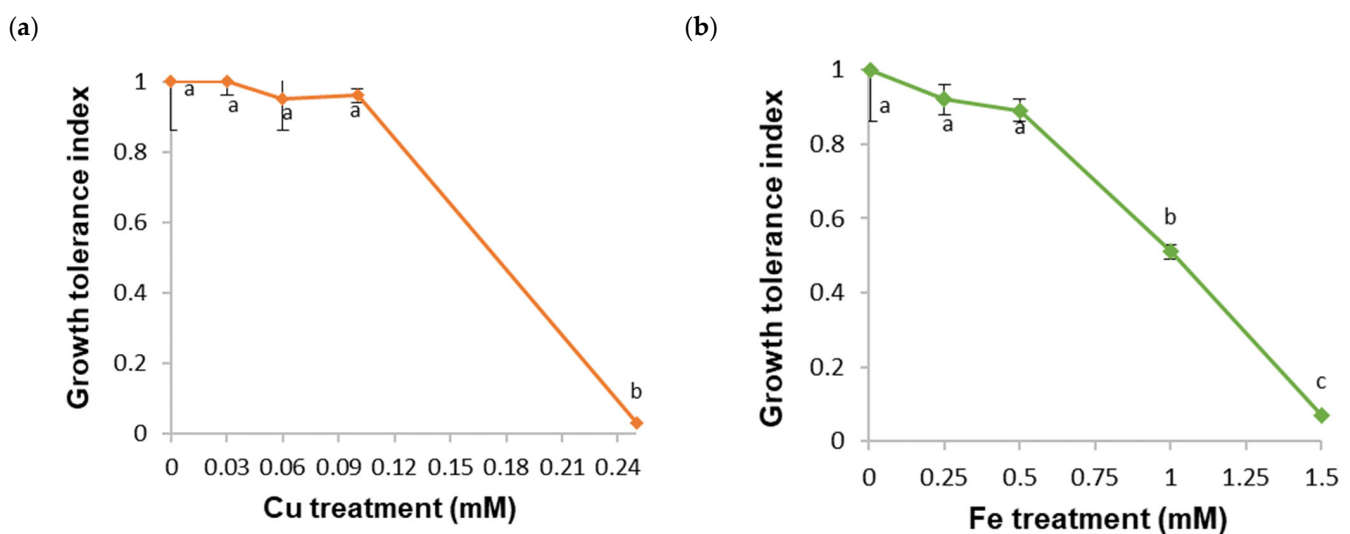


Figure 1. Cont.

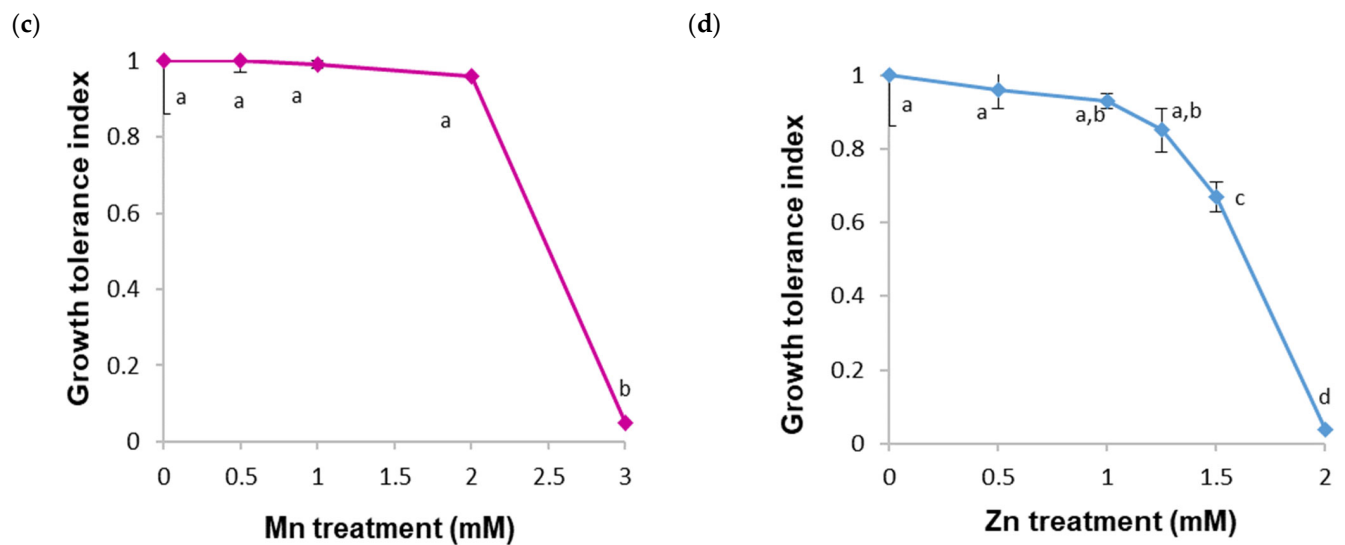


Figure 1. Effects of (a) Cu, (b) Fe, (c) Mn, and (d) Zn at different concentrations on the growth tolerance index of the *B. cordata* cell suspension culture grown for 18 days in the culture medium enriched with heavy metals. All results are shown as the mean $\pm$ SD. The same lowercase letter indicates no significant difference at a 5% significance level.

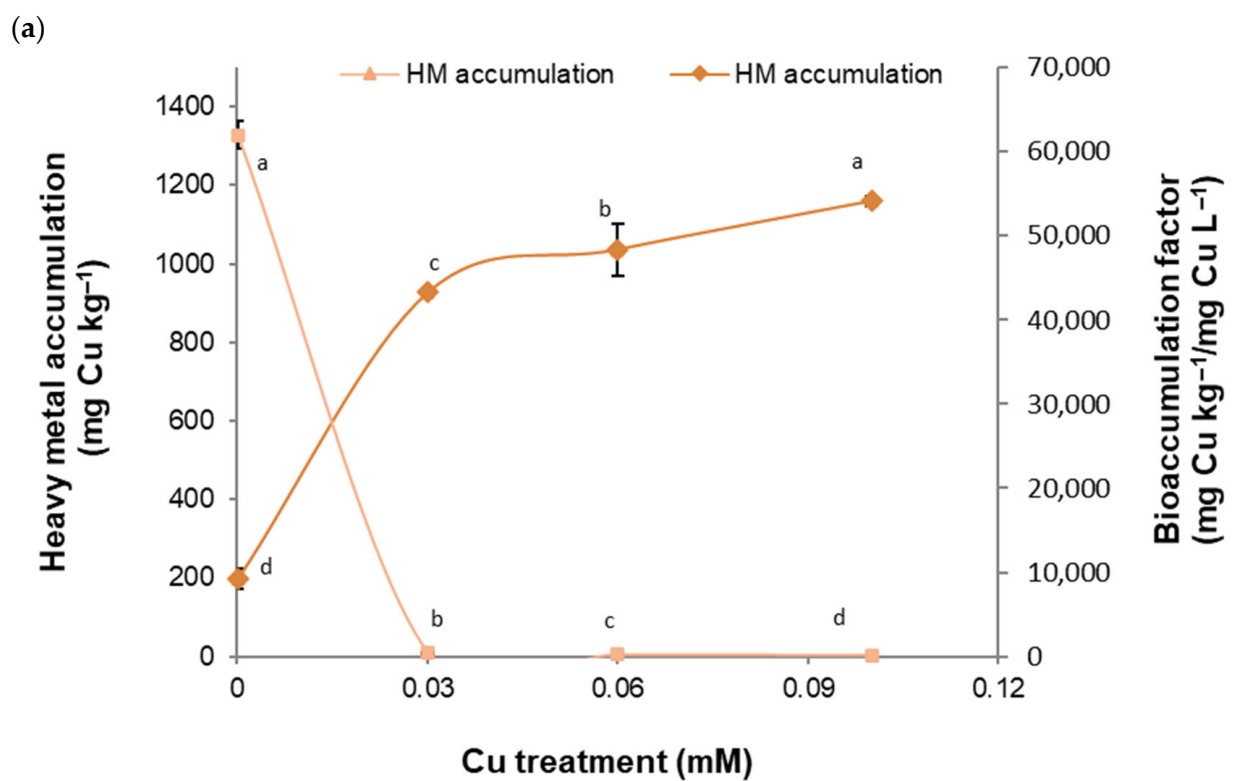


Figure 2. Cont.

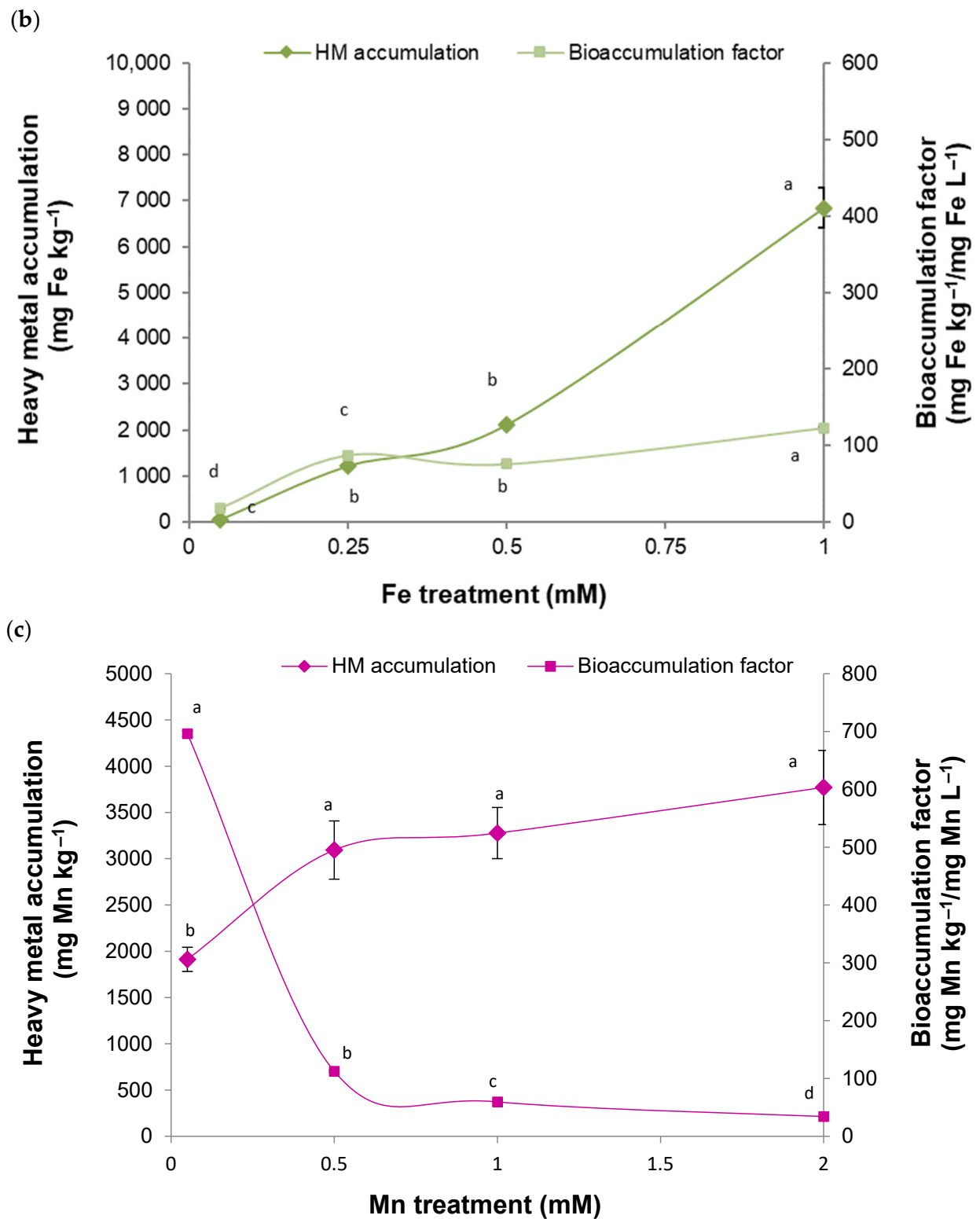


Figure 2. Cont.

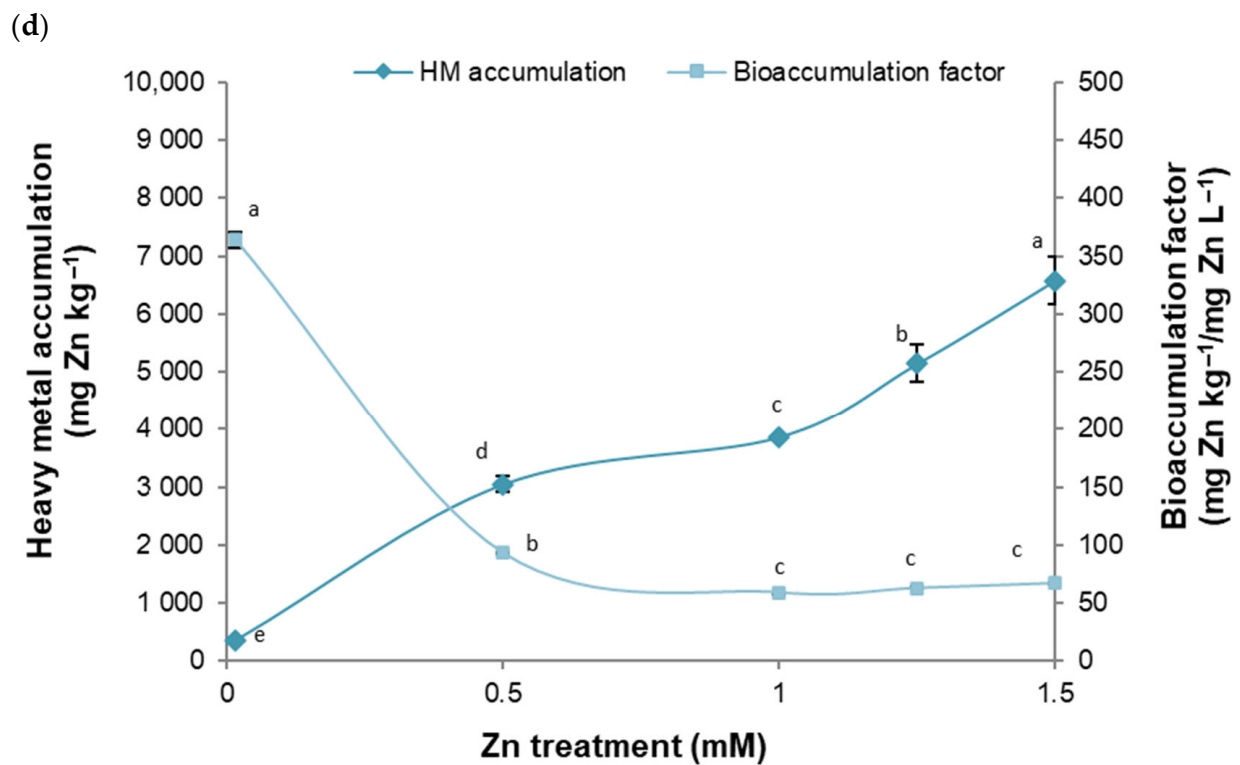


Figure 2. Heavy metal accumulation and bioaccumulation factors of Cu, Fe, Mn, and Zn in the *B. cordata* cell suspension grown for 18 days in a culture medium enriched with the heavy metals at different concentrations: (a) 0.03 to 0.25 mM Cu; (b) 0.25 to 1.5 mM Fe; (c) 0.5 to 3.0 mM Mn; and (d) 0.5 to 2.0 mM Zn. The concentrations of the heavy metals in the control treatment were 0.00005 mM Cu, 0.05 mM Fe, 0.05 mM Mn, and 0.015 mM Zn. All the results are shown as the mean $\pm$ SD. The same lowercase letter indicates no significant difference at a 5% significance level for a particular response variable.

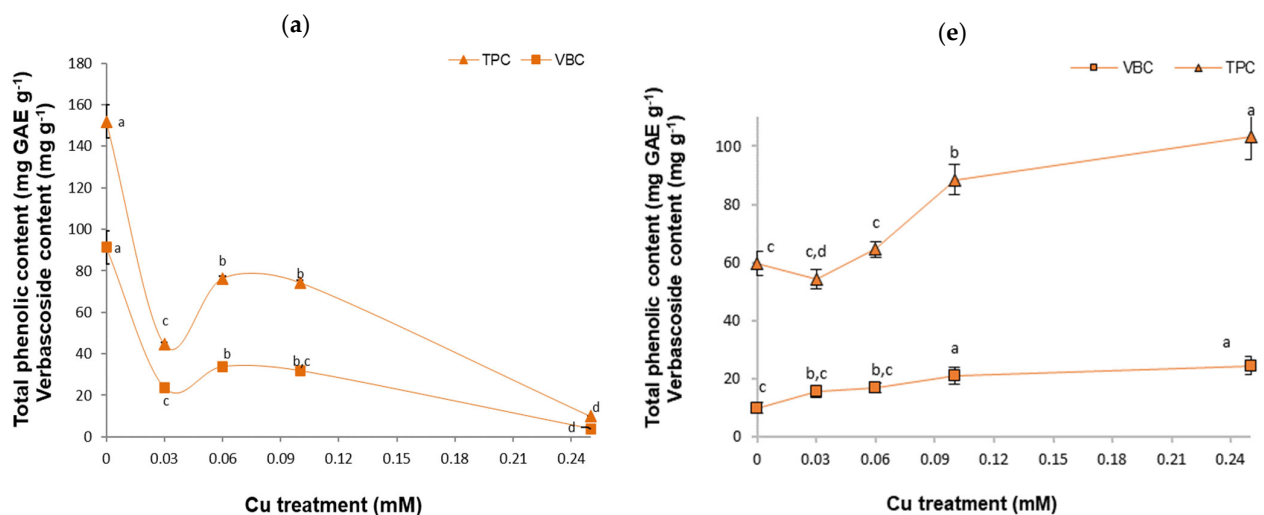


Figure 3. Cont.

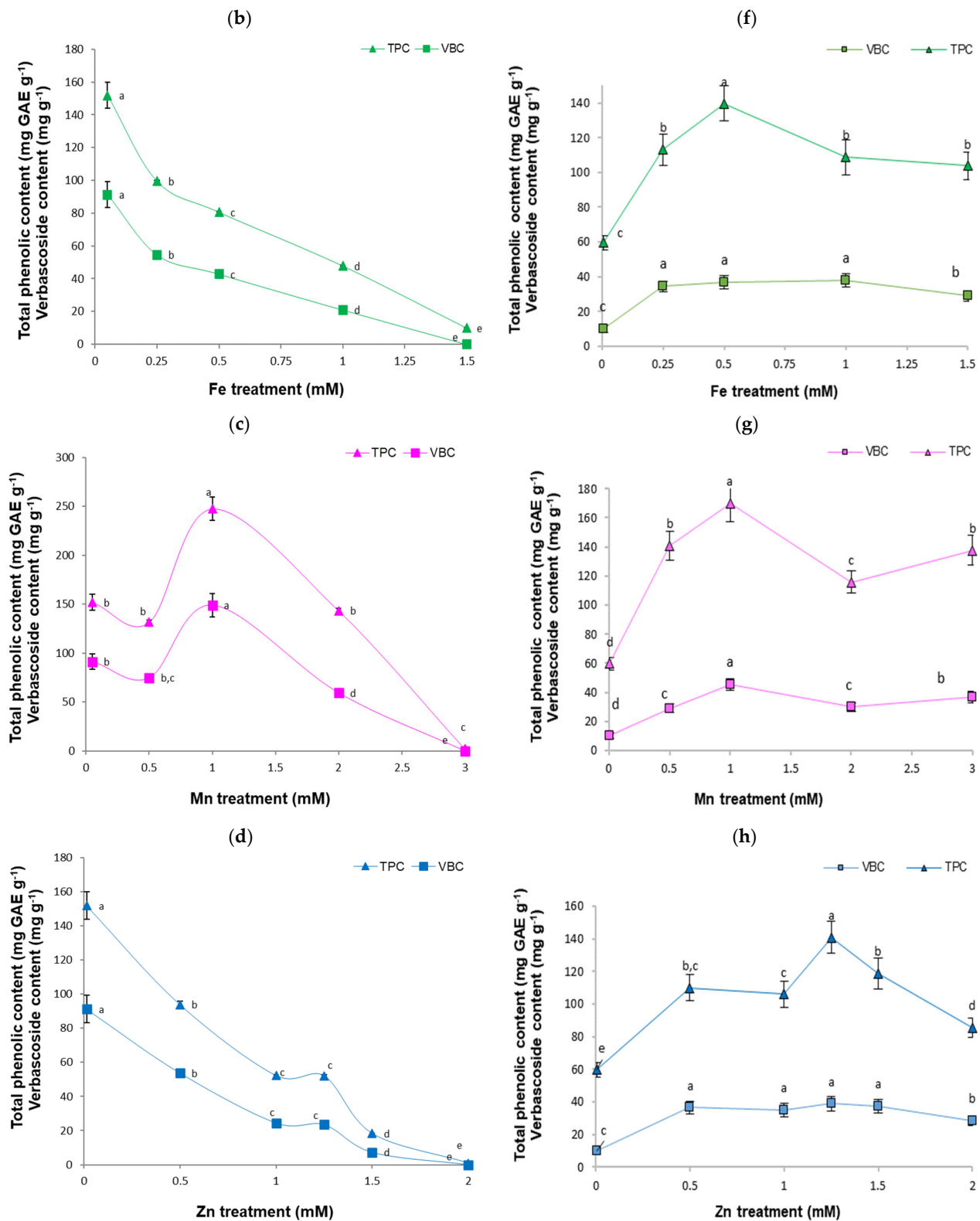


Figure 3. Phenolic compound accumulation (total phenolic and verbascoside contents) in the *B. cordata* cell suspension culture grown for 18 and 1 day(s) in a culture medium enriched with heavy metals at different concentrations. At 18 and 1 day(s): (a,e) 0.03 to 0.25 mM Cu; (b,f) 0.25 to 1.5 mM Fe; (c,g) 0.5 to 3.0 mM Mn; and (d,h) 0.5 to 2.0 mM Zn. The concentrations of heavy metals in the control treatment were 0.00005 mM Cu, 0.05 mM Fe, 0.05 mM Mn, and 0.015 mM Zn. All results are shown as the mean $\pm$ SD. The same lowercase letter indicates no significant difference at a 5% significance level for a particular response variable.

3. Discussion

Some HMs such as Cu, Fe, Mn, and Zn are essential nutrients for plants. These metals play vital functions in plant metabolism, e.g., serving as integral components in several enzymes that participate in redox reactions and nucleic acid metabolism [3]. These metals are normally found in plants at low concentrations (6, 100, 50, and 20 mg kg⁻¹ for Cu, Fe, Mn, and Zn, respectively) [20]. Consequently, HMs are required in low amounts, and exposure to high concentrations can result in toxicity [3]. However, Cu and Fe hyperaccumulator species can harbor at least 1000 mg kg⁻¹ of these metals, while Mn and Zn hyperaccumulators can contain 10,000 mg kg⁻¹ [6], without showing toxicity.

The results of this work suggest that *B. cordata* cells have tolerance traits that allow them to accumulate Cu, Fe, Mn, and Zn and thus resist toxicity and grow despite the HM concentrations being higher than those in the control. This tolerance was indicated by the high growth index, growth tolerance index, and cell viability values, as well as the low total sugar content values in the residual medium. Together, these results indicate a high consumption of the sugar substrate required for growth. At the cellular level, plants can feature a range of detoxification mechanisms that activate to prevent the accumulation of toxic HM concentrations within the cell, such as the involvement of the plasma membrane in reducing the uptake of HM; chelation in the cytosol by ligands, resulting in complex formation; or the transport of HM/HM complexes to vacuoles [21]. In this study, the plasma membranes of the *B. cordata* cells, as a detoxification mechanism, may have reduced the uptake of Cu and Mn since HM accumulation greatly increased under the first concentration tested, followed by a slight increase that plateaued as the concentration increased. However, for Fe and Zn, the HM accumulation increased as the HM concentration increased. In this case, the plasma membranes of the *B. cordata* cells likely did not reduce uptake, and HM chelation may have occurred. HM conjugates can be formed with amino acids, vitamins, organic acids, glutathione, phytochelatins (PCs), and metallothioneins [4,5,7,22,23]. Indeed, Cu and Zn have shown to induce the formation of PC complexes [24,25]. The enzyme responsible for PC synthesis is a constitutive cytoplasmic enzyme activated through exposure to several HMs, such as Zn. This enzyme has been reported to be essential in detoxifying large amounts of Zn by promoting its accumulation [26]. *B. cordata* cells may also form HM complexes that allow the cells to accumulate HMs.

Furthermore, the antioxidant mechanisms of *B. cordata* cells may allow the cells to accumulate HMs and grow. A common consequence of HM poisoning is the enhanced production of reactive oxygen species (ROS) that expose cells to oxidative stress, leading to RNA and DNA synthesis errors, enzyme activity inhibition, lipid peroxidation, and the blocking and displacement of essential functional groups in biomolecules [5,27]. The tolerance of hyperaccumulator species involves enhanced antioxidant (enzymatic and nonenzymatic) defense mechanisms to counteract this oxidative stress [5,28]. Notably, the antioxidant enzymatic mechanisms of plants are considered an important defense against the oxidative stress induced by HMs [3]. The primary enzymes implicated in ROS scavenging are superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. Superoxide dismutase is the first line of defense against reactive oxygen species, followed by catalase and peroxidase [29]. However, after a prolonged period of HM exposure, under the highest tested concentrations of each HM, the antioxidant mechanism of the *B. cordata* cells was likely unable to counteract the oxidative stress provoked by each HM, thereby damaging the integrity of the cells and leading to a low growth index, growth tolerance index, and cell viability values, as well as high total sugar contents. The integrity of the cells may have been affected by the peroxidation of lipids from the plasma membrane [27], which provoked the release of organic acids including phenolic acids. These conditions resulted in the lowest pH values in the culture medium. Moreover, phenolic compounds, including verbascoside, likely contributed to the nonenzymatic antioxidant mechanisms in *B. cordata* cells, which counteracted the adverse effects of high HM concentrations, as phenolic compound accumulation significantly increased after 1 day of HM exposure. An antioxidant (nonenzymatic) system consisting of metabolites with low molecular weights, such as

flavonoids, phenolic acids, and phenylpropanoids, has been recognized to be effective in directly scavenging the reactive oxygen species produced by the presence of HMs [30]. Likewise, the phenolic compounds produced by *B. cordata* cells likely contributed to the transport of Fe since the HM accumulation and bioaccumulation factors both increased as the Fe concentration increased. Some plants have been reported to release organic anions, such as phenolic compounds, to increase HM solubility by forming chelates [31,32]. This phenomenon has been shown to improve Fe transport [31,32] and confer an additional ability to tolerate and grow under highly toxic metal concentrations in hyperaccumulator species [4,33]. Different experimental models have demonstrated that verbascoside exerts antioxidant activity by scavenging free radicals or chelating the HMs (Cu^{2+} , Fe^{2+} , and Fe^{3+}) that mediate oxidation [34,35]. This compound contributes to protecting plants from the DNA damage from hydroxyl radicals induced by Fe^{2+} and Fe^{3+} since it can form complexes with HMs (formation constants of 1021.03 and 1031.94 M^{-2} for Fe^{2+} and Fe^{3+} , respectively) [34].

The results of this work could serve as a useful approach for continuing research on *B. cordata* as a species with tolerance traits that could be useful for phytoremediation purposes. Indeed, in vitro cultures of several plant species were demonstrated to be useful tools for researching topics in phytoremediation. A tolerant callus of *Brassica* spp., taxonomically similar to *Brassica juncea* and a hyperaccumulator crop used for phytoremediation in polluted soil, has shown a high HM content in cells, with 3.83 mg Zn kg^{-1} and 2.91 mg Mn kg^{-1} under 0.24 mM Zn and 0.8 mM Mn, respectively [36]. The callus presented reductions of 33 and 30%, respectively, in fresh weight compared with that in the control [36]. The growth of *Sesbania drummondii* cell cultures (a species used in phytoremediation) was negligible at 500 mg Cu L^{-1} (~7.87 mM). However, under 100 mg Cu L^{-1} (~1.58 mM), the cells were able to grow and accumulate 3000 mg Cu kg^{-1} [31]. In both studies, the activity of antioxidant enzymes was a feature associated with metal tolerance [36,37]. Treating callus cultures of *Acer pseudoplatanus* (a tree that grows in soils polluted with metals) obtained from several populations with 0.08 mM Cu or 1.91 mM Zn yielded different levels of HM accumulation (100–400 mg Cu kg^{-1} and 6000–10,000 mg Zn kg^{-1}) [38]. A cell suspension culture of *Thlaspi caerulescens* (a Zn/Cd hyperaccumulator species) exhibited no changes in growth after 10 days of treatment with Zn concentrations from 30 to 1500 μM , while the HM accumulation increased from 30 to 200 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (equivalent to 1962 to 13,080 mg Zn kg^{-1}) [39]. Treating in vitro root cultures of *Scirpus americanus* with 1.8 mg Mn L^{-1} (~0.033 mM) did not affect growth and yielded 5000 mg Mn kg^{-1} . This organism was found to be a Mn accumulator [40]. Tolerant somaclones developed from the calli of some indica rice varieties grew at 50–400 ppm Fe (~0.89–7.15 mM). Callus growth decreased under higher Fe concentrations until complete necrosis occurred at 400 ppm [41]. Studies have also been performed on HMs that are not essential nutrients for plants. For example, Bernabé-Antonio et al. [42] demonstrated high accumulations of Cr and Pb contents in a cell culture of *Jatropha curcas*. This species was shown to have significant potential for HM phytoremediation [42]. Thus, according to the results for the *B. cordata* cells in the present study and in the context of previous publications, *B. cordata* may possess outstanding tolerance mechanisms that could be useful for phytoremediation. This ability might be related to the membership of *B. cordata* in the *Buddlejaceae* genus [10–12]. In addition, several hyperaccumulator species grow in soils rich with metals, such as ultramafic soils [9], in which *B. cordata* also grows [14].

Plant metal tolerance is typically specific to particular metals [38], and the results found in this work show that *B. cordata* may be tolerant to several metals. *Bacopa monnieri* showed high tolerance to Mn > Cr > Cu > Cd > Pb, as no visible phytotoxic symptoms were observed after two months of HM exposure (0.003–0.160 mM for each HM) [43]. In vitro seedlings of *Prosopis laevigata* showed a strong ability to tolerate and accumulate Cr, Cd, Pb, and Ni [44,45]. The tolerance capabilities of the *B. cordata* cell culture against must be tested different HM ions from those tested in this work, including those of nonessential HMs, since the transport of metal ions occurs regardless of whether or not they are essential [23].

Several plant species can grow in metalliferous soils, and these rare species have valuable potential for phytoextraction [1]. Thus, this work contributes to exploring the potential of *B. cordata* for further research on phytoremediation. Moreover, the results of this work highlight the care that must be taken when *B. cordata* is used for medicinal purposes because the plant may have accumulated high amounts of HMs (essential or nonessential metal nutrients) and may thus represent a serious risk to human health. Higher amounts of some HMs than those required to maintain good health can be toxic or dangerous [46]. Therefore, avoiding exposure to high HM concentrations is a protective measure necessary to support human wellbeing [46]. In addition, the high amounts of the four HMs accumulated by the *B. cordata* cells and their impacts on phenolic compound accumulation after 1 day or 18 days of HM exposure could have both ecological and biotechnological implications. Ecological studies should be undertaken to determine the evolutionary value of high HM accumulation as an advantage over pathogens or herbivores. It was previously hypothesized that hyperaccumulation provides a defense against pathogens or herbivores [47]. Cell suspension cultures of plants represent a biotechnological tool for producing bioactive secondary metabolites, and elicitation can be used to increase the production of secondary metabolites [19]. Elicitation is a strategy used to promote the increased biosynthesis and accumulation of secondary metabolites, through activating the defense system against biotic or abiotic stress [24]. In this work, we demonstrated that phenolic compound accumulation was significantly increased after 1 day of HM exposure compared with that in the control, so future research should be carried out to identify the specific secondary metabolites, in addition to verbascoside, with increased accumulation. Metals act as signal molecules or abiotic elicitors that stimulate the production of secondary metabolites such as alkaloids, terpenoids, and phenolic compounds as a defense response to stressful stimuli [20,24,48,49]. Treating *Panax ginseng* root cultures with 5–50 μM Cu affected the ginsenoside metabolite content; ginsenoside content was stimulated from 5–25 μM Cu, but under 50 μM Cu, it was decreased [50]. The maximum increase in flavonoid production in *Trifolium pratense* suspension cultures occurred after 7 days of copper application (0.1 mM) [51]. Producing high yields of bioactive secondary metabolites through in vitro plant cultures is highly desirable, with several potential strategies including elicitation and optimizing the culture medium [52].

4. Materials and Methods

4.1. Cell Suspension Culture

In a previous study using a *B. cordata* cell suspension culture, the outstanding growth parameters were a maximum biomass of 12.9 g L⁻¹ and growth index of 8.14 after 14 days of culturing, cell viability > 80% during the exponential phase of growth, and total substrate consumption at 30 days of culturing (measured through total sugar content). The verbascoside content was associated with growth and reached its maximum level (116.36 mg g⁻¹ dry weight (DW), equivalent to 1.44 g L⁻¹ for verbascoside) during the stationary phase at 16–22 days of culturing [19]. Based on the growth profile of the culture, this work was carried out over 18 days of HM exposure to estimate the effects on growth and phenolic accumulation.

An in vitro cell culture of *B. cordata* was donated to the Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa Campus (UAM-I), México D.F., México, as a suspension culture and proliferated according to Estrada-Zúñiga et al. [19]. Briefly, the basal culture medium (BCM) consisted of half-strength Murashige and Skoog medium [53] with 3% weight/volume (*w/v*) sucrose, 0.45 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2.32 μM kinetin, 100 mg L⁻¹ citric acid, and 150 mg L⁻¹ ascorbic acid. Cell suspension cultures were subcultured ten times to proliferate their biomass [19], which was required for the HM bioassays. The cell suspension cultures under proliferation were incubated in a gyratory shaker at 110 rpm with a photoperiod of 16 h light (30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 26 $\pm$ 2 °C.

4.2. HM Bioassays

The HM bioassays involved growing *B. cordata* cells in BCM enriched with Cu, Fe, Mn, and Zn. The biomass from the last subculture was used to inoculate 125 mL Erlenmeyer flasks (1.5 g of fresh weight per flask) containing 25 mL of the culture medium. This process involved the addition of the HMs for the enrichment of culture medium until achieving the following concentrations: 0.03, 0.06, 0.1, and 0.25 mM Cu; 0.25, 0.50, 1.0, and 1.5 mM Fe; 0.5, 1.0, 2.0, and 3.0 mM Mn; and 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, and 2.0 mM Zn. The BCM contained these HMs at micromolar concentrations (0.05 μ M Cu, 50 μ M Fe, 50 μ M Mn, and 15 μ M Zn). Additionally, we carried out a preliminary experiment to establish the maximum concentration tested for each HM based on the concentration that caused growth inhibition. Stock solutions (20 mg mL⁻¹) of CuSO₄·5H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, and MnSO₄·H₂O (Baker Analyzed, Phillipsburg, NJ, USA) were used as sources of the HMs. Corresponding aliquots of each stock solution were added to the BCM. The control treatments were as follows: (i) BCM and (ii) BCM with SO₄²⁻ at the same concentrations used in the HM treatments (BCM-SO₄), with a (NH₄)₂SO₄ stock solution (20 mg mL⁻¹) used as the source of SO₄²⁻. This control was used because sulfur is an essential nutrient for plants, and its enrichment in the culture medium was hypothesized to have effects on *B. cordata* cells. However, when the response variables were determined for the *B. cordata* cells in both control treatments (BCM and BCM with SO₄²⁻), the results were not significantly different. Thus, these treatments are both referred to as the control treatment in the present study, and data from these treatments were pooled. Deionized water was used to prepare stock solutions of HM salts and the medium. When all components of the medium were added, the pH was adjusted to 5.8 with NaOH 0.1 M, and the samples were autoclaved at 121 °C for 18 min. Each treatment consisted of two Erlenmeyer flasks with three replicates (n = 6).

Once biomass was inoculated in the 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of sterile medium enriched with the HM, the resulting cultures were incubated in the same conditions described above for proliferation purposes. After 18 days of culturing, several response variables were measured to estimate the tolerance of cells exposed to HMs. For this purpose, biomass from the HM bioassays was harvested via vacuum filtration while washing with 100 mM EDTA, dried in an oven at 60 °C, and weighed. The residual medium was used to determine the pH value and total sugar content of the biomass. Cell viability, total sugar content, and growth index measurements were carried out as described by Estrada-Zúñiga et al. [19]. Different system responses in plant cell suspension cultures (e.g., growth) can be used to study whether the plant cells are subjected to factors that cause stress [54]. Additionally, the tolerance of the cells was calculated based on the growth tolerance index using Equation (1) according to Rout et al. [36], with some modifications:

$$\text{Growth tolerance index} = \frac{\text{Growth index of cells grown in culture medium with HM}}{\text{Growth index of cells grown in culture medium without HM}} \quad (1)$$

The growth index was estimated based on the DW as follows:

$$\text{Growth index} = \frac{\text{Final biomass (mg DW)} - \text{initial biomass (mg DW)}}{\text{initial biomass (mg DW)}} \quad (2)$$

4.3. Determination of the HM Content in Cells

After 18 days of culturing, cells (100 mg DW) harvested from the HM-exposure treatments were powdered and digested with 5 mL of concentrated HNO₃ in a microwave oven (CEM Mars5, CEM Corporation, Charlotte, NC, USA). Then, the volume of each digested sample was adjusted to 10 mL with deionized water, and the samples were retained in high-density polyethylene flasks. An atomic absorption spectrometer (Varian Spectra AA-220 FS, Varian, Belrose, Australia) was used to analyze the HM content in the cells from the digested samples. Calibration curves (0.5 to 1.5 mg mL⁻¹ for Cu; 0.5 to 2.5 mg mL⁻¹ for Fe; 0.5 to 3.5 mg mL⁻¹ for Mn or Zn) were generated using HM

standards corresponding to the analyzed HM (Baker Analyzed, Phillipsburg, NJ, USA). The results were expressed as mg of HM per kg of DW biomass (mg HM kg^{-1}). A solution of 0.1 N HNO_3 was used to wash the glassware and equipment before use. Additionally, the bioaccumulation factor (determined only for treatments showing a growth index > 1) was estimated according to Bernabé-Antonio et al. [55], as follows:

$$\text{Bioaccumulation factor} = \frac{\text{HM content in cells grown in culture medium enriched with HM (mg HM/kg)}}{\text{HM content in culture medium (mg/L)}} \quad (3)$$

4.4. Effect of HM on the Accumulation of Phenolic Compounds

The dry biomass from the HM exposure treatments of 18 days (60 mg DW) was extracted for 60 min with boiling MeOH (30 mL). All results were expressed on a per g basis of DW biomass. The total phenolic content was determined according to Vazquez-Marquez et al. [56]. The corresponding results were expressed as mg GAE g^{-1} . All reagents were acquired from Sigma–Aldrich Co., Ltd., St. Louis and Burlington, MA, USA. The verbascoside content was determined with an Agilent Technologies 1100 series high-performance liquid chromatography system using a G1311A Quatpump (Alltech Co., Ltd., Nicholasville, KY, USA) equipped with an Econosil C18 column ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, 5μ ; Alltech Co., Ltd., Nicholasville, KY, USA) and a G1315B diode array detector (Alltech Co., Ltd., Nicholasville, KY, USA). The operating conditions of this system included a mobile phase of 2.0% (v/v) acetic acid solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B), an injection volume of 20 μL , a flow rate of 1.0 mL min^{-1} , and a detection wavelength of 330 nm. The system was run with a gradient program as follows: 10 min, 90% to 75% A, and 15 min, 75% to 60% A. Agilent 1100 Chemstation chromatography software (Rev. A.08.03; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to acquire data from the detector. A calibration curve ($80\text{--}240 \mu\text{g mL}^{-1}$) was created using the verbascoside standard (Extrasynthese, Genay, L, France). The results were expressed as mg of verbascoside per g of DW biomass (mg g^{-1}). Peak areas at the corresponding standard retention times were used for detecting, identifying, and quantifying verbascoside in the samples. Each sample was injected twice ($n = 2$). In addition, cells were also grown for 1 day in a medium enriched with Cu, Fe, Mn, and Zn treatments to determine the effect of the HMs on phenolic compound accumulation. Thus, the same procedure described in this section was carried out.

4.5. Statistical Analysis

The results for the response variables (growth index, growth tolerance index, cell viability, total sugar content, pH, HM accumulation, bioaccumulation factor, total phenolic content, and verbascoside content) were analyzed using one-way ANOVA, followed by the Tukey–Kramer post hoc test for multiple comparisons. NCSS version 12 software (East Kaysville, UT, USA) was used for all statistical analyses. A p value of less than 0.05 was uniformly considered to indicate significant differences.

5. Conclusions

The *B. cordata* cell suspension culture presented strong HM tolerance traits that allowed the cells to grow and accumulate high amounts of Cu, Fe, Mn, and Zn ($1160 \text{ mg Cu kg}^{-1}$, $6845 \text{ mg Fe kg}^{-1}$, $3770 \text{ mg Mn kg}^{-1}$, and $6581 \text{ mg Zn kg}^{-1}$). This species may have hyperaccumulator potential for HMs as follows, from least to most significant: $\text{Mn} < \text{Zn} < \text{Cu} < \text{Fe}$. This potential should be evaluated in future research with whole *B. cordata* plants. In addition, future research should determine the ecological impact of a possible decrease in the accumulation of phenolic compounds in whole plants growing in heavy-metal-polluted soils. *B. cordata* cell suspension cultures exposed to HMs for 1 day may represent a useful biotechnological tool for enhancing the accumulation of bioactive phenolic compounds in this species.

Author Contributions: Conceptualization, A.N.-T., F.C.-S. and M.E.E.-Z.; formal analysis, A.N.-T. and M.E.E.-Z.; investigation, A.M.V.-M.; methodology, A.B.-A., C.B.-A., J.C.-B., A.N.-T., M.E.E.-Z. and C.Z.-G.; project administration, F.C.-S., A.N.-T. and M.E.E.-Z.; resources, J.C.-B., F.C.-S. and M.E.E.-Z.; supervision, A.N.-T.; writing—original draft preparation, A.M.V.-M.; writing—review and editing, F.C.-S., A.N.-T. and M.E.E.-Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) for providing funding through grant number 792860 for the PhD studies of A.M.V.-M. at the Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales at the Graduate Doctoral Program at Universidad Autónoma del Estado de México, as well as this University for partially supporting the experimental procedures through Project No. 6769/2022CIB: “Establecimiento de cultivos celulares de plantas medicinales en un biorreactor”.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Kosakivska, I.V.; Babenko, L.M.; Romanenko, K.O.; Korotka, I.Y.; Potters, G. Molecular mechanisms of plant adaptive responses to heavy metals stress. *Cell Biol. Int.* **2021**, *45*, 258–272. [\[CrossRef\]](#)
2. Goyal, D.; Yadav, A.; Prasad, M.; Singh, T.B.; Shrivastav, P.; Ali, A.; Dantu, P.K.; Mishra, S. Effect of heavy metals on plant growth: An overview. In *Contaminants in Agriculture Sources, Impacts and Management*, 1st ed.; Naeem, M., Ansari, A.A., Gill, S.S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp. 79–101. [\[CrossRef\]](#)
3. Ejaz, U.; Khan, S.M.; Ahmad, Z.; Jehangir, S.; Fatima, R.Z.; Lho, L.H.; Han, H.; Raposo, A. Detoxifying the heavy metals: A multipronged study of tolerance strategies against heavy metals toxicity in plants. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1154571. [\[CrossRef\]](#)
4. Viehweger, K. How plants cope with heavy metals. *Bot. Stud.* **2014**, *55*, 35. [\[CrossRef\]](#)
5. Pasricha, S.; Mathur, V.; Garg, A.; Lenka, S.; Verma, K.; Agarwal, S. Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators—an analysis Heavy metal tolerance in hyperaccumulators. *Environ. Chall.* **2021**, *4*, 100197. [\[CrossRef\]](#)
6. Wuana, R.A.; Okieimen, F.E. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* **2011**, *2011*, 402647. [\[CrossRef\]](#)
7. Jutsz, A.M.; Gnida, A. Mechanisms of stress avoidance and tolerance by plants used in phytoremediation of heavy metals. *Arch. Environ. Prot.* **2015**, *41*, 104–114. [\[CrossRef\]](#)
8. Goncharuk, E.A.; Zagorskina, N.V. Heavy metals, their phytotoxicity, and the role of phenolic antioxidants in plant stress responses with focus on cadmium: Review. *Molecules* **2023**, *28*, 3921. [\[CrossRef\]](#)
9. Garnica-Díaz, C.; Berazain, I.R.; Cabrera, B.; Calderón-Morales, E.; Felipe, F.L.; García, R.; Gómez, H.J.L.; Franklin, G.A.; Medina, E.; Paul, A.L.D.; et al. Global plant ecology of tropical ultramafic ecosystems. *Bot. Rev.* **2023**, *89*, 115–157. [\[CrossRef\]](#)
10. Rotkittikhun, P.; Kruatrachue, M.; Chaiyarat, R.; Ngernsarsarua, C.; Pokethitiyook, P.; Pajitpraporn, A.; Baker, A.J.M. Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *Environ. Pollut.* **2006**, *144*, 681–688. [\[CrossRef\]](#)
11. Waranusantigul, P.; Kruatrachue, M.; Pokethitiyook, P. Evaluation of Pb phytoremediation potential in *Buddleja asiatica* and *B. paniculata*. *Water Air Soil Pollut.* **2008**, *193*, 79–90. [\[CrossRef\]](#)
12. Salas-Luévano, M.A.; Manzanares-Acuña, E.; Letechipía-de León, C.; Vega-Carrillo, H.R. Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian J. Exp. Sci.* **2009**, *23*, 27–32.
13. Alvarado-López, S.; Gómez-Maqueo, X.; Soriano, D.; Orozco-Segovia, A.; Gamboa-Debuen, A. Mobilization and synthesis of seed storage and LEA proteins during natural priming of *Buddleja cordata* and *Opuntia tomentosa*. *Bot. Sci.* **2018**, *96*, 76–83. [\[CrossRef\]](#)
14. Navarrete, G.D.M.; Pons, M.N.; Cuevas, S.J.A.; Echeverría, G. Is metal hyperaccumulation occurring in ultramafic vegetation of central and southern Mexico? *Ecol. Res.* **2018**, *33*, 641–649. [\[CrossRef\]](#)
15. Quiroz, A.; Espinosa-García, F.; Ilangovan, K. Effects of natural hydrosoluble chelates of three plant species on the mobilization of heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *68*, 862–869. [\[CrossRef\]](#)
16. Awa, S.H.; Hadibarata, T. Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: A review. *Water Air Soil Pollut.* **2020**, *231*, 47. [\[CrossRef\]](#)
17. Jaskulak, M.; Grobelak, A.; Vandenbulcke, F. Modelling assisted phytoremediation of soils contaminated with heavy metals: Main opportunities, limitations, decision making and future prospects. *Chemosphere* **2020**, *249*, 126196. [\[CrossRef\]](#)
18. Majumder, A. Plant in vitro cultures for phytoremediation of heavy metals. In *Back to Basics: A Multidisciplinary Approach to Organic Living and Waste Management*, 1st ed.; Ghosh, K.K., Mandal, P., Neogi, S., Eds.; Jogamaya Devi College Interdisciplinary: Calcutta, India, 2022; pp. 24–44.
19. Estrada-Zúñiga, M.E.; Cruz-Sosa, F.; Rodríguez-Monroy, M.; Verde-Calvo, J.R.; Vernon-Carter, E.J. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2009**, *97*, 39–47. [\[CrossRef\]](#)

20. Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed.; Wiley Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–1280.
21. Tang, Z.; Wan, H.Q.; Chen, J.D.; Zhao, F.J. Molecular mechanisms underlying the toxicity and detoxification of trace metals and metalloids in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2023**, *65*, 570–593. [\[CrossRef\]](#)
22. Rajput, V.; Minkina, T.; Semenov, I.; Klink, G.; Tarigholizadeh, S.; Sushkova, S. Phylogenetic analysis of hyperaccumulator plant species for heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Geochem. Health* **2021**, *43*, 1629–1654. [\[CrossRef\]](#)
23. Pilon-Smits, E. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 15–39. [\[CrossRef\]](#)
24. Anjitha, K.S.; Sameena, P.P.; Puthur, S.T. Functional aspects of plant secondary metabolites in metal stress tolerance and their importance in pharmacology. *Plant Stress* **2021**, *2*, 100038. [\[CrossRef\]](#)
25. Thangavel, P.; Long, S. Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2007**, *88*, 201–216. [\[CrossRef\]](#)
26. Tennstedt, P.; Peisker, D.; Böttcher, C.; Trampczynska, A.; Clemens, S. Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 938–948. [\[CrossRef\]](#)
27. Siwek, M. Plants in postindustrial sites, contaminated with heavy metals. Part I. Uptake, transport and toxicity of heavy (trace) metals. *Wiad. Bot.* **2008**, *1*, 7–22.
28. Ahmad, P.; Jaleel, C.A.; Salem, M.A.; Nabi, G.; Sharma, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30*, 161–175. [\[CrossRef\]](#)
29. Valadez-Villareal, A.; Maldonado-Magaña, A.; Bernabé-Antonio, A.; Estrada-Zúñiga, M.E.; Román-Guerrero, A.; Cruz-Sosa, F. Effect of Cr and Pb on the activity of antioxidant enzymes in a cell suspension culture of *Jatropha curcas*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2015**, *14*, 681–689.
30. Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 523–530.
31. Curie, C.; Briat, J.F. Iron transport and signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 183–206. [\[CrossRef\]](#)
32. Jin, C.W.; You, G.Y.; He, Y.F.; Tang, C.; Wu, P.; Zhen, S.J. Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 278–285. [\[CrossRef\]](#)
33. Masarovičová, E.; Kráľová, K.; Kummerová, M. Principles of classification of medicinal plants as hyperaccumulators or excluders. *Acta Physiol. Plant* **2010**, *32*, 823–829. [\[CrossRef\]](#)
34. Alipieva, K.; Korkina, L.; Orhan, I.E.; Georgiev, M.I. Verbascoside—A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1065–1076. [\[CrossRef\]](#)
35. Zhao, C.; Dodin, G.; Yuan, C.; Chen, H.; Zhen, R.; Jia, Z.; Fan, B.T. “In vitro” protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *BBA-Gen. Subj.* **2005**, *1723*, 114–123. [\[CrossRef\]](#)
36. Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P. In vitro selection and biochemical characterization of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. *Plant Sci.* **1999**, *137*, 89–100. [\[CrossRef\]](#)
37. Sharma, N.C.; Sahi, S.V.; Jain, J.C. *Sesbania drummondii* cell cultures: ICP-MS determination of the accumulation of Pb and Cu. *Microchem. J.* **2005**, *81*, 163–169. [\[CrossRef\]](#)
38. Watmough, S.A.; Dickinson, N.M. Multiple metal resistance and co-resistance in *Acer pseudoplatanus* L. (Sycamore) callus culture. *Annu. Bot.* **1995**, *76*, 465–472. [\[CrossRef\]](#)
39. Klein, M.A.; Sekimoto, H.; Milner, M.J.; Kochian, L.V. Investigation of heavy metal hyperaccumulation at the cellular level: Development and characterization of *Thlaspi caerulescens* suspension cell lines. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 2006–2016. [\[CrossRef\]](#)
40. Santos-Díaz, M.S.; Barrón-Cruz, M.C.; Alfaro-De la Torre, M.C. Induction of in vitro roots cultures of *Thypha latifolia* and *Scirpus americanus* and study of their capacity to remove heavy metals. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 417–424. [\[CrossRef\]](#)
41. Mandal, A.B.; Roy, B. In vitro selection of mature seed derived calli for increased tolerance towards Fe-toxicity in rice and their isozyme profiling. *J. Genet. Breed* **2003**, *57*, 325–340.
42. Bernabé-Antonio, A.; Álvarez, L.; Buendía-González, L.; Maldonado-Magaña, A.; Cruz-Sosa, F. Accumulation and tolerance of Cr and Pb using a cell suspension culture system of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2015**, *120*, 221–228. [\[CrossRef\]](#)
43. Sinha, S. Accumulation of Cu, Cd, Cr, Mn and Pb from artificially contaminated soil by *Bacopa monnieri*. *Environ. Monit. Assess.* **1999**, *57*, 253–264. [\[CrossRef\]](#)
44. Buendía-González, L.; Orozco-Villafuerte, J.; Cruz-Sosa, F.; Barrera-Díaz, C.E.; Vernon-Carter, E.J. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresour. Technol.* **2010**, *10*, 5862–5867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Buendía-González, L.; Orozco-Villafuerte, J.; Estrada-Zúñiga, M.E.; Barrera-Díaz, C.E.; Vernon-Carter, E.J.; Cruz-Sosa, F. In vitro lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2010**, *9*, 1–9.
46. Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B.B.; Beeregowda, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* **2014**, *7*, 60–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Fones, H.N.; Preston, G.M. Trade-offs between metal hyperaccumulation and induced disease resistance in metal hyperaccumulator plants. *Plant Pathol.* **2013**, *62*, 63–71. [\[CrossRef\]](#)
48. Nasim, S.A.; Dhir, B. Heavy metals alter the potency of medicinal plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, *203*, 139–149. [\[CrossRef\]](#)
49. De, B. Cell signaling and elicitation of secondary plant metabolite production. *J. Med. Arom. Plant Sci.* **2021**, *23*, 413–428.

50. Ali, M.B.; Hahn, E.J.; Paek, K.Y. Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Rep.* **2006**, *25*, 1122–1132. [[CrossRef](#)]
51. Kasparova, M.; Siatka, T.; Dusek, J. Abiotic elicitation of *Trifolium pratense* L. suspension culture. *Ceska Slov. Farm.* **2007**, *56*, 225–229.
52. Arano-Varela, H.; Fernández, F.J.; Estrada-Zúñiga, M.E.; Cruz-Sosa, F. Verbascoside production in long-term *Buddleja cordata* Kunth cell suspension cultures. *3 Biotech* **2020**, *10*, 245. [[CrossRef](#)]
53. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497. [[CrossRef](#)]
54. Zhong, J.J. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In *Plant Cells, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; Scheper, T., Zhong, J.J., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2001; Volume 72, pp. 1–26. [[CrossRef](#)]
55. Bernabé-Antonio, A.; Maldonado-Magaña, A.; Estrada-Zúñiga, M.E.; Buendía-González, L.; Cruz-Sosa, F. Procedure for estimating the tolerance and accumulation of heavy metals using plant cell cultures. In *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*; Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N., Eds.; Humana Press: New York, NY, USA, 2018; Volume 1815, pp. 333–337. [[CrossRef](#)]
56. Vazquez-Marquez, A.M.; Zepeda-Gómez, C.; Burrola-Aguilar, C.; Bernabé-Antonio, A.; Nieto-Trujillo, A.; Cruz-Sosa, F.; Rodríguez-Monroy, M.; Estrada-Zúñiga, M.E. Effect of stirring speed on the production of phenolic secondary metabolites and growth of *Buddleja cordata* cells cultured in mechanically agitated bioreactor. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2019**, *139*, 155–166. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.