



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS DE *Pereskia* spp., SU
ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

PRESENTA

I.B.Q. Dalia Delfina Macías Martínez

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTORA

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

COMITÉ TUTORAL

M. en C. Laura Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo

Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch

Aguascalientes, Ags., 17 de junio de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DALIA DELFINA MACIAS MARTINEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS DE *Pereskia* spp., SU ANALISIS FITOQUIMICO Y EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 23 de junio de 2017

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como tutor designado de la estudiante **DALIA DELFINA MACÍAS MARTÍNEZ** con ID 111045, quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS DE *Pereskia* spp., SU ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 22 de junio de 2017

Yenny Adriana Gómez A.
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Tutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesora designada de la estudiante **DALIA DELFINA MACÍAS MARTÍNEZ** con ID **111045**, quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS DE *Pereskia* spp., SU ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 22 de junio de 2017

Laura Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo
M. en C. Laura Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo
Asesora de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesor designado de la estudiante **DALIA DELFINA MACÍAS MARTÍNEZ** con ID **111045**, quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS DE *Pereskia* spp., SU ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 22 de junio de 2017

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por abrir sus puertas y laboratorios para el desarrollo de este trabajo además del financiamiento otorgado al proyecto PIBT16-6 del Programa de Investigación en Biotecnología de la Dirección General de Investigación y Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante el periodo agosto 2014 – junio 2016 y al proyecto No. 1030 de Cátedras CONACyT.

Al Jardín Etnobotánico de Oaxaca por la donación de las semillas de *Pereskia lychnidiflora*, material necesario para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre, por su excelente guía y apoyo, así como los consejos y el conocimiento transmitido durante estos dos años.

A la M. en C. Laura Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo y al Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch por formar parte de mi comité tutorial por sus consejos, sus correcciones y su guía.

Al Dr. Alejandro Zamilpa, excelente ser humano, por recibirme en su laboratorio en el CIBIS-IMSS y participar activamente al compartirme su experiencia y conocimientos.

A mis papás Joel Macías y Delfina Martínez, por su ejemplo de responsabilidad y trabajo, por su apoyo y aliento para superarme, por su gran amor y entrega, son mi motor y mi modelo a seguir.

A mis hermanos Joel, Araceli y Sandra, por su paciencia en mis ratos de mal humor, porque siempre cuento con ustedes y me hace sentir bien tenerlos cerca en los mejores y más importantes momentos de mi vida.

A ti, porque sin tu ayuda, empuje, paciencia, ternura y amor, no habría podido concluir este trabajo.

A mis amigos, que los cuento con los dedos de una mano, y a mi familia; primos, tíos y abuelos, por enseñarme que no existe poder más grande que el amor y por siempre estar para mí, en las buenas y en las malas.



Índice General

1.Introducción 11

2.Antecedentes..... 12

2.1 Descripción del género *Pereskia*..... 12

2.1.1 Género *Pereskia*..... 13

2.1.2 Usos del género *Pereskia*..... 14

2.2 Técnicas de cultivos de células vegetales 15

2.2.1 Tejido calloso..... 15

2.3 Estudios biotecnológicos en *Pereskia* spp 17

2.4 Compuestos fenólicos 17

2.4.1 Flavonoides..... 18

2.5 Actividad antioxidante 19

2.6 Actividad antioxidante y contenido fenólico en *Pereskia* spp 19

2.7 Técnicas de cromatografía 20

2.8 Metabolitos identificados en el género *Pereskia* 21

3.Justificación..... 22

4.Hipótesis..... 23

5.Objetivos..... 23

6.Metodología..... 24

6.1 Material Vegetal..... 24

6.2 Germinación de semillas de *Pereskia lychnidiflora* 24

6.3 Propagación *in vitro* de *Pereskia sacharosa* 24

6.4 Inducción y establecimiento del cultivo de callo 25

6.5 Preparación de extractos 25

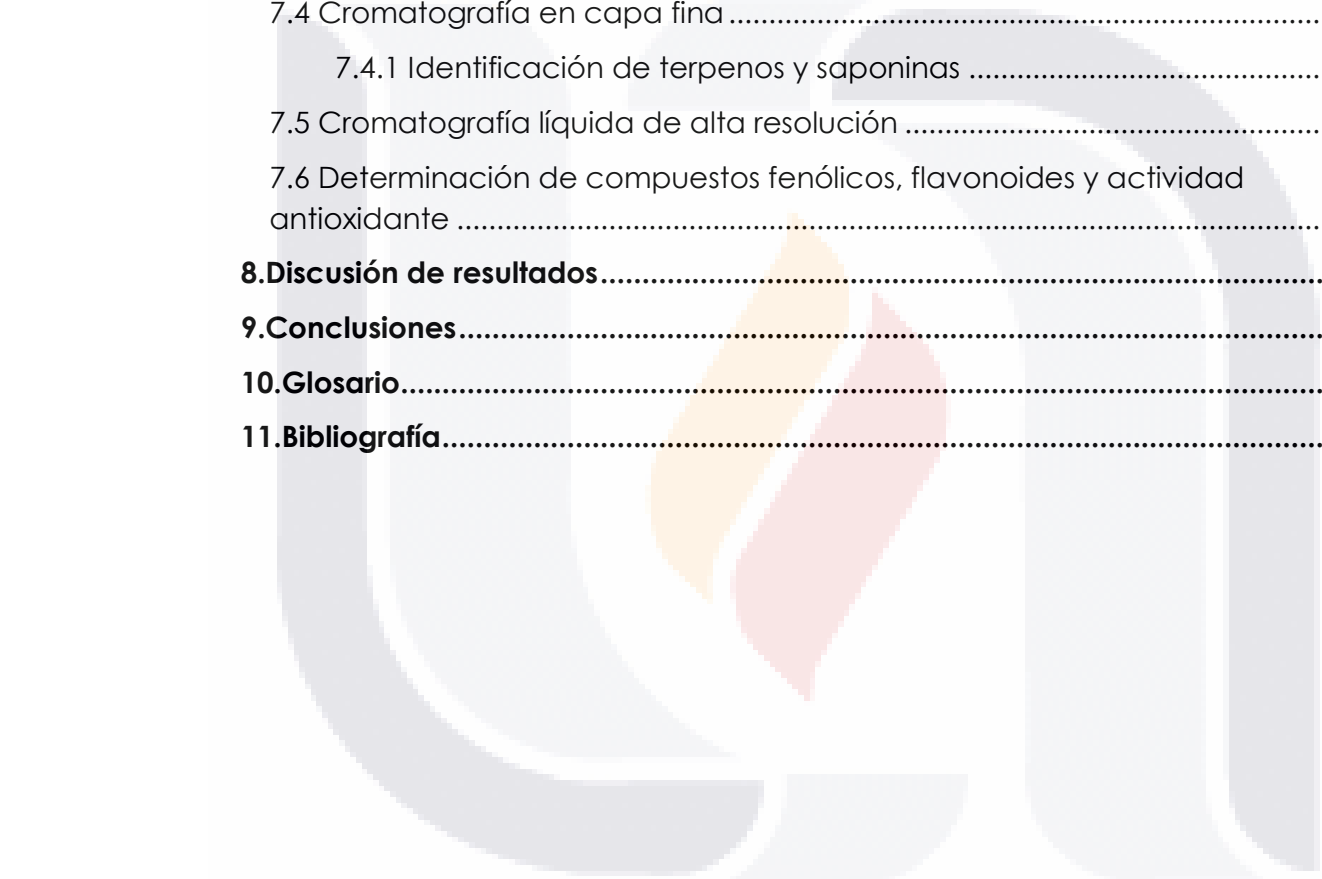
6.6 Cromatografía en capa fina 26

6.7 Cromatografía líquida de alta resolución 26

6.8 Determinación de compuestos fenólicos..... 27

6.9 Determinación de flavonoides..... 28

6.10 Actividad antioxidante (DPPH)..... 28



7.Resultados 29

7.1 Germinación de semillas de *Pereskia lychnidiflora* 29

7.2 Propagación de brotes *in vitro* de *Pereskia sacharosa*32

7.3 Inducción y establecimiento del cultivo de callo33

7.3.1 Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de *P. sacharosa*34

7.3.2 Cinética de crecimiento del tejido calloso de la hoja de *P. sacharosa*36

7.3.3 Cultivo de callo de *P. lychnidiflora*37

7.4 Cromatografía en capa fina39

7.4.1 Identificación de terpenos y saponinas41

7.5 Cromatografía líquida de alta resolución43

7.6 Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante48

8.Discusión de resultados..... 49

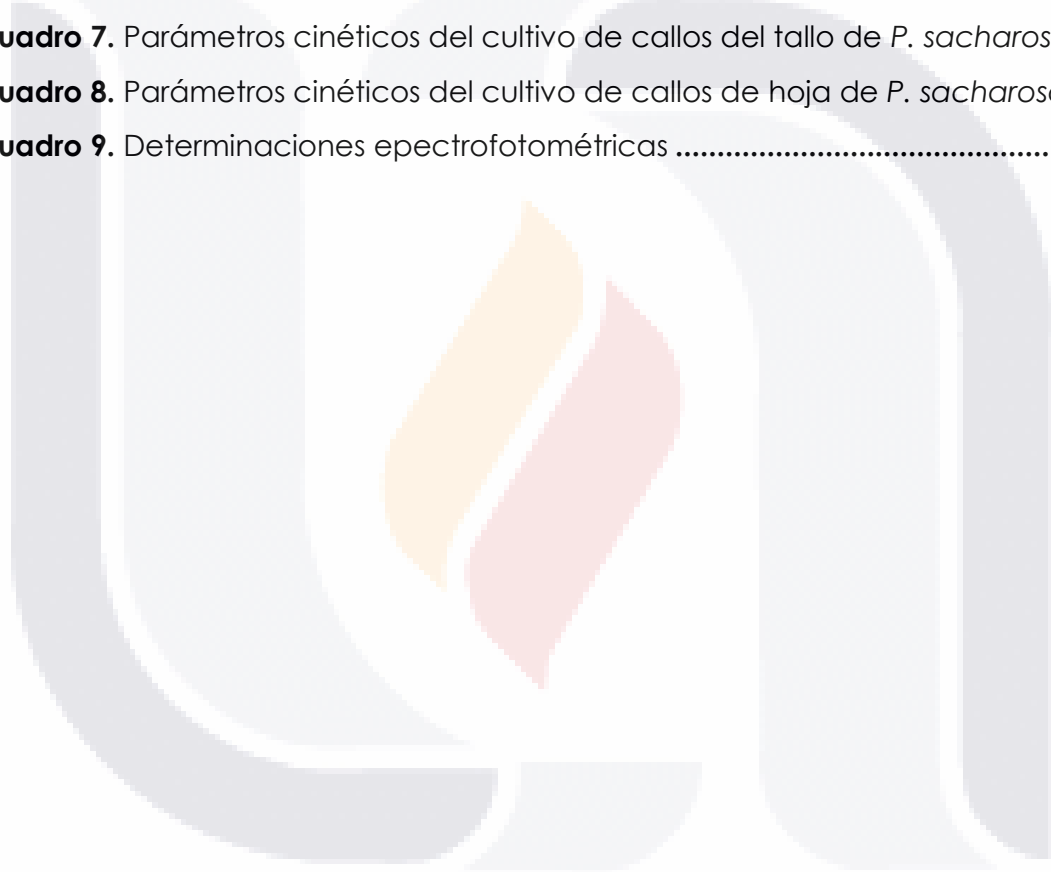
9.Conclusiones..... 58

10.Glosario..... 59

11.Bibliografía..... 64

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Pereskia</i> spp.	12
Cuadro 2. Distribución natural de <i>Pereskia</i> spp.	14
Cuadro 3. Metabolitos identificados en el género <i>Pereskia</i>	21
Cuadro 4. Sistema de gradientes metodología (1)	26
Cuadro 5. Sistema de gradientes para la metodología (2).....	27
Cuadro 6. Sistema de gradientes para la metodología (3).....	27
Cuadro 7. Parámetros cinéticos del cultivo de callos del tallo de <i>P. sacharosa</i>	34
Cuadro 8. Parámetros cinéticos del cultivo de callos de hoja de <i>P. sacharosa</i>	36
Cuadro 9. Determinaciones epectrofotométricas	48



Índice de figuras

Figura 1. Germinación de semillas de <i>P. lychnidiflora</i> a los 10(A), 12(B) y 14(C) días después de cultivadas en medio MS	29
Figura 2. Plántulas de <i>P. lychnidiflora</i> en medio de cultivo MS + CA	30
Figura 3. Plántulas de <i>P. lychnidiflora</i> en medio MS	30
Figura 4. Plántulas de <i>P. sacharosa</i> del banco de germoplasma de la UAA a partir de los cuales se comenzó la propagación <i>in vitro</i>	31
Figura 5. Izquierda tratamiento con carbón activado, derecha tratamiento sin carbón activado (n=9)	31
Figura 6. Explantes de <i>P. sacharosa</i> subcultivados después de 1 y 2 meses	32
Figura 7. Explantes de <i>P. sacharosa</i> después de 6 meses de subcultivo	32
Figura 8. <i>P. sacharosa</i> , explante tallo, en medio MS con TDZ y ANA, un mes después de inoculado el explante	33
Figura 9. <i>P. sacharosa</i> , explante hoja, medio MS con TDZ y ANA, un mes después de inoculado el explante	35
Figura 10. <i>P. lychnidiflora</i> , explante cotiledón, medio MS con TDZ y ANA, un mes después del tratamiento	37
Figura 11. <i>P. lychnidiflora</i> , explante hipocotilo, medio MS con TDZ y ANA, un mes después del tratamiento	37
Figura 12. <i>P. lychnidiflora</i> , explante hipocotilo, medio MS con Picloram, un mes después del tratamiento	38
Figura 13. <i>P. lychnidiflora</i> , explante cotiledón, medio MS con Picloram, dos meses después de iniciado el tratamiento	38
Figura 14. Cromatografía preliminar.	39
Figura 15. Cromatografía con fase móvil: Diclorometano:metanol (95:5)	40
Figura 16. Cromatografía revelada para flavonoides	40
Figura 17. Cromatografía revelada para flavonoides	41
Figura 18. Cromatografía en fase móvil diclorometano: metanol (85:15)	41
Figura 19. Cromatografía en fase reversa de agua: acetonitrilo (7:3)	42
Figura 20. Cromatogramas con la metodología (1) desarrollada para la detección de flavonoides a 340nm	43
Figura 21. Comparación del espectro del pico del min. 11 con espectro de bibliografía	44

Figura 22. Cromatogramas con la metodología (2) a 220nm45

Figura 23. Cromatogramas con la metodología (3) a 220nm46

Figura 24. Comparación del espectro del pico del min. 17-18 con espectro de bibliografía47

Figura 25. Comparación de cromatogramas de las diferentes metodologías probadas.....47



Índice de gráficos

Gráfico 1. Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de <i>P. sacharosa</i>	34
Gráfico 2. Cinética de crecimiento del tejido calloso de la hora de <i>P. sacharosa</i>	36



Abreviaturas

μL– microlitro

μM – micromolar

2,4 D– 2,4 diclorifenoxiacético

2iP– 2-isopentil adenina

ADN– Ácido desoxirribonucleico

AG– Ácido gálico

AIA– Ácido Indolacético

ANA– Ácido Naftalenacético

ARN– Ácido Ribonucleico

BA– Benziladenina

CA– Carbón activado

CCF– Cromatografía en capa fina

CH₃CN– Acetonitrilo

CLAR– Cromatografía líquida de alta resolución

DPPH– 2,2-difenil-1-picrihidracil

FAL– Fenilalanina Amonio Liasa

FAP– Furfurilaminopurina

FRAP– Ferric ion Reducing Antioxidant Power. Poder antioxidante reductor del hierro

g– gramo

HCl– Ácido clorhídrico

KIN– Cinetina

L– litro

mg– miligramo

min– minutos

mL– mililitro

MS– Medio de cultivo Murashige & Skoog

NaClO– Hipoclorito de sodio

NP– Difenilboriloxietilamina

PEG– Polietilenglicol etanólico

Picloram– Ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-metílico

Rf– Factor de retención

TDZ– Tidiazurón

TFA– Ácido trifluoroacético

v/v– Relación volumen-volumen

Resumen

El género *Pereskia* es ampliamente utilizado en América del Sur, como alimento y en la medicina tradicional. Se han realizado estudios sobre algunos extractos de especies del género mostrando actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos bioactivos dentro de los que destacan los compuestos fenólicos como el β -sitosterol, quercetina y catequina. En el presente trabajo se estableció un protocolo para el cultivo de callos de *P. sacharosa* y un sistema de cultivo para la propagación *in vitro* de *P. lychnidiflora*. De cada sistema se realizaron análisis fitoquímicos (determinación de flavonoides, y compuestos fenólicos) así como la evaluación de la actividad antioxidante, usando una planta de *P. sacharosa* cultivada en invernadero como testigo. Con respecto a los medios de cultivo para propagación de material vegetal, se determinó que el uso de carbón activado para estas especies es benéfico pues se obtienen hojas y tallos más grandes. Por otro lado, se estableció que para *P. sacharosa* la mezcla de fitohormonas de TDZ y ANA fue la apropiada para la inducción de tejido calloso. La separación por cromatografía en capa fina reveló la presencia de terpenos y flavonoides del tipo flavona en los extractos de hoja de *P. sacharosa*, lo que se confirmó mediante cromatografía líquida de alta resolución, para el cuál se desarrolló una metodología para que pudieran ser observados en el mismo espectro tanto flavonoides como terpenos. El contenido de compuestos fenólicos reveló que no existe diferencia significativa entre los extractos de hoja de *P. sacharosa* cultivada en el invernadero y la cultivada *in vitro*, de igual forma estos extractos fueron los que presentaron una mayor actividad antioxidante. Dichos resultados dan la pauta hacia próximos estudios en el género con la finalidad de identificar compuestos de interés farmacológico.

Abstract

The genus *Pereskia* is widely used in South America, as food and in traditional medicine. Studies have been carried out on some extracts of species of the genus showing antioxidant activity due to the presence of bioactive compounds, such as phenolic compounds such as β -sitosterol, quercetin and catechin. In the present work a protocol was established for the cultivation of *P. sacharosa* calli and a culture system for the *in vitro* propagation of *P. lychnidiflora*. From each system, phytochemical analysis (determination of flavonoides, and phenolic compounds) and the evaluation of antioxidant activity were carried out using a plant of *P. sacharosa* cultivated in a greenhouse as a control. With respect to the culture media for the propagation of plant material, it was determined that the use of activated carbon for these species is beneficial since larger leaves and stems were obtained. On the other hand, it was established that the mixture of phytohormones of TDZ and ANA was appropriate for the induction of callous tissue in *P. sacharosa*. The thin layer chromatography revealed the presence of flavone-type terpenes and flavonoids in leaf extracts of *P. sacharosa*, which was confirmed by high performance liquid chromatography; a methodology was developed for their development same spectrum both flavonoids and terpenes. The content of phenolic compounds revealed that there is no significant difference between leaf extracts of *P. sacharosa* cultivated in the greenhouse and cultivated *in vitro*, similarly these extracts were those that presented greater antioxidant activity. These results will guide future studies in the genus with the purpose of identifying compounds of pharmacological interest.

1. Introducción

Se puede afirmar que el uso de las plantas medicinales nació casi con el hombre. Desde los tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX, por ensayo y error, éste utilizó los elementos que la naturaleza le brindaba para curar sus enfermedades y las de sus animales, y así mismo para mejorar su estado de ánimo. Esta práctica médica pasaba y se perfeccionaba de generación en generación, por lo cual se denominó medicina tradicional (Fonnegra & Jiménez, 2007). Una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional es *P. sacharosa* (Quiroga *et al*, 2012).

Por otro lado, *Pereskia lychnidiflora* tiene una distribución geográfica nacional en Guerrero y Oaxaca (Guzmán *et al*, 2003), se conoce en la región con el nombre de guichitache, derivado del zapoteco: guiche=espino, na-yasi=negro. Son árboles de hasta más de 10 metros, con fruto aromático globoso y con escleridas aciculares por lo que no es comestible (Bravo-Hollis, 1937). Se encuentra en bosques tropicales caducifolios. De acuerdo a la información de los pobladores de las regiones donde crece, esta especie tenía una mayor presencia en su hábitat, por lo que se deduce que sus poblaciones han tendido a reducirse siendo el cambio de uso de suelo es el principal factor que amenaza a esta especie (CITES, 2017).

La biotecnología vegetal ofrece una alternativa para conservar estas especies que se encuentran bajo amenaza, además de otras metodologías con diferentes finalidades como la producción en masa de metabolitos secundarios de interés farmacológico y comercial. Dentro de estos metabolitos de interés encontramos el grupo de los compuestos fenólicos integrado en parte importante por los flavonoides, cuya actividad depende de su estructura, el grado de hidroxilación, otras sustituciones y conjugaciones, y del grado de polimerización (Heim *et al*, 2002). El reciente interés por estas sustancias ha sido estimulado por los posibles beneficios a la salud derivados de la actividad antioxidante de estos compuestos polifenólicos (Kumar & Pandey, 2013).

2. Antecedentes

2.1 Descripción del género *Pereskia*

El nombre de *Pereskia* fue dado en honor de Nicolaus Claudius Peireskius (1580-1637), nativo de Provenza, aficionado a la botánica. El nombre del género se ha escrito también *Peireskia*, *Peirescia* o *Perescia*. Las especies de este género son nativas de América tropical y se encuentran distribuidas en las Antillas, América del centro, norte de América del Sur (*P. sacharosa*), sureste de Brasil, Paraguay y norte de Argentina. En el cuadro 1 se muestra la clasificación taxonómica del género *Pereskia*. Las especies citadas en México, nativas o cultivadas son *Pereskia aculeata*, *P. zinniaeflora* y *P. lychnidiflora* (Bravo-Hollis, 1937).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Pereskia* spp. (Bravo-Hollis, 1937)

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Caryophyllales</i>
Familia:	<i>Cactaceae</i>
Subfamilia:	<i>Pereskioideae</i>
Género:	<i>Pereskia</i>

Este género es de gran importancia taxonómica por ser considerado como el más primitivo de las cactáceas. Entre los caracteres primitivos se encuentran: hábito arbóreo o arbustivo, semejante al de las otras dicotiledóneas leñosas; hojas laminares grandes, bien desarrolladas, con nervadura penninervada, palmeada hasta pseudopalmeada; receptáculo de la flor con brácteas o escamas provistas de aréolas axilares prolíferas; ovario integrado por un número variable de carpelos que se unen más o menos abajo, quedando libres los estilos, o bien éstos, al unirse, forman un solo estilo con lóbulos estigmas libres; el ovario es súpero o queda más o menos incluido en el hipanto, por lo que se le considera ínfero, estambres muy numerosos; semillas con embrión grande y cotiledones foliáceos. A nivel anatómico, en el floema secundario de los órganos vegetativos presentan varias formas de esclereidas y en las capas corticales existen drusas distribuidas de

manera difusa, dichas estructuras indican que las cactáceas tuvieron un alto nivel de especialización aún antes de adquirir la succulencia (Bravo-Hollis, 1937).

Pereskia zinniaeflora y *P. lynchnidiflora* fueron dibujadas y descritas como nativas de México dándoles los nombres de *Cactus zinniaeflorus* y *Cactus fimbriatus*. Después se realizaron descripciones más amplias y fueron situadas en el género *Pereskia*. Tales descripciones incompletas y sin localidad no habían permitido identificarlas con las pereskias que se encuentran en México (Anderson, 2001).

2.1.1 Género *Pereskia*

Arbustos o plantas trepadoras. Hojas bien desarrolladas con vascularización penninervada. Flores en inflorescencias, ovario súpero, carpelos parcialmente separados en la región del estilo; óvulos en los ángulos de los carpelos o en la base. Este género comprende las dos especies más primitivas de las cactáceas: *Pereskia aculeata*, cultivada en México, y *P. sacharosa*, de Paraguay y Argentina (Bravo-Hollis, 1937).

El género incluye 17 especies que crecen en los trópicos y florecen durante la temporada de lluvia. En el cuadro 2 se muestra la distribución natural de las especies de *Pereskia* (Anderson, 2001).

Cuadro 2. Distribución natural de *Pereskia* spp. (Anderson, 2001)

Especie	Distribución natural
<i>P. aculeata</i>	Caribe y norte, este y sureste de Sudamérica
<i>P. aureiflora</i>	Noreste de Minas Generales y sur de Bahía, Brasil
<i>P. bahiensis</i>	Vegetación caatinga de Bahía, Brasil
<i>P. bleo</i>	Panamá y Colombia a lo largo de los ríos y en bosques secundarios
<i>P. diaz-romeroana</i>	Valles secos del centro de Bolivia
<i>P. grandifolia</i>	Brasil
<i>P. guamacho</i>	Regiones secas de Colombia y Venezuela, posiblemente también en las Antillas Holandesas
<i>P. horrida</i>	Perú
<i>P. lychnidiflora</i>	Sur de México hasta Costa Rica
<i>P. marcanoi</i>	Bosques semidecíduos de La Española
<i>P. nemerosa</i>	Bosques secos en el sur de Brasil, Paraguay, norte de Argentina y noroeste de Uruguay
<i>P. portulacifolia</i>	Haití/República Dominicana
<i>P. quisqueyana</i>	A nivel del mar en el sureste de República Dominicana
<i>P. sacharosa</i>	Tierras bajas de los Andes, en la región del Gran Chaco de Brasil, Bolivia, Paraguay y noroeste de Argentina
<i>P. stenantha</i>	Vegetación caatinga del centro sur de Bahía, Brasil
<i>P. weberiana</i>	Bosques secos en los valles andinos de Río Beni, Bolivia
<i>P. zinniiflora</i>	Tierras bajas del sur y suroeste de Cuba

2.1.2 Usos del género *Pereskia*

En Brasil, *P. aculeata* y *P. grandifolia* son popularmente conocidos como ora-pro-nobis. Los frutos de ambas especies se utilizan en medicina popular como antisifilítico y expectorante, y las hojas de *P. aculeata* se utilizan como un emoliente, debido a su alto contenido de mucílago, y para tratar la inflamación y enfermedades de la piel. Las hojas de las plantas se utilizan como alimento por los indígenas en algunas regiones de Brasil, y *P. grandifolia* se cultiva principalmente como planta ornamental y para formar setos, mientras que *P. aculeata* se utiliza

tradicionalmente en la cocina regional donde el pequeño y amarillo fruto se usa en jaleas y conservas, el fruto es jugoso y ligeramente ácido (Shetty *et al*, 2011).

En Malasia, *P.bleo* y *P. grandifolia* se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el cáncer, dolor de cabeza, dolor de estómago, úlceras gástricas, hemorroides, dermatitis, diabetes, hipertensión, reumatismo, inflamación y como tónico para revitalizar el cuerpo. En un estudio realizado por Yen *et al*. (2013) destinado a evaluar los usos medicinales y la eficacia de *P. bleo* fueron entrevistados los usuarios en tres aldeas en Malasia, algunos de ellos informaron que se habían recuperado de cáncer usando las hojas o puntas de *P. bleo*, sin el uso de cualquier otro medicamento. Muchos indígenas informaron también que las hojas, yemas y flores de *P. bleo* fueron eficaces para el tratamiento de muchas otras enfermedades y también como un suplemento de la salud general. Por su parte, *P. bleo* del mismo modo se utiliza en la medicina tradicional en Panamá para el tratamiento de trastornos gastrointestinales y para la nutrición humana. En el caso de *P. sacharosa* las hojas y frutos se emplean en Bolivia para tratar trastornos de la piel y dolor de oído y las espinas se utilizan contra el dolor muscular. Las hojas se utilizan en la medicina tradicional malaya para tratar enfermedades gástricas (De Castro & Scio, 2014). *Pereskia sacharosa* ha sido usada para tratar ciertas enfermedades como Urifa, una deshidratación en niños, y este tratamiento es a menudo asociado con un ritual en particular (Quiroga *et al*, 2012).

2.2 Técnicas de cultivos de células vegetales

2.2.1 Tejido Calloso

Algunos de los cultivos de células vegetales se inician a través de la formación de una masa de células indiferenciadas llamada "callo". Un cultivo de tejido calloso se obtiene mediante la escisión de un pedazo de tejido de la planta madre, el explante, que es colocado en una base de nutrientes solidificado con agar. Esta base de nutrientes contiene macronutrientes (nitrógeno, potasio, fósforo, etc.), micronutrientes (cobalto, cobre, hierro, etc.), una fuente de carbono (generalmente sacarosa) y varios reguladores de crecimiento vegetal. Existen

diversos medios de cultivo y uno de los más usados es el de Murashige y Skoog (MS). La correcta evaluación de los efectos de la composición de los diferentes medios o reguladores de crecimiento en su tasa de crecimiento es un parámetro importante para definir los medios óptimos para su uso. Los parámetros de crecimiento más comunes utilizados para cultivos de callos incluyen peso fresco, peso seco y el índice de crecimiento (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006).

Como material vegetal inicial (explante), una gran diversidad de partes de la planta puede ser usada. La selección dependerá de la especie que sea empleada en particular y del tipo de respuesta que se deseé. De entre los tipos de explantes que comúnmente son usados están partes de hojas, meristemas aislados, hipocotilos y segmentos de raíces, entre otros. Para la iniciación del cultivo, se deben tomar en cuenta tres importantes consideraciones: 1) la selección del explante, 2) la selección de un medio de cultivo adecuado y 3) las condiciones ambientales apropiadas para su desarrollo (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

La inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de auxinas es superior a la de las citocininas. Se ha observado que las primeras son las responsables de la aparición de este tipo de tejido, regulan la elongación celular, la división celular, formación de raíces adventicias, inhibición de brotes axilares o adventicios y la inducción de la embriogénesis, mientras que las citocininas sólo favorecen la proliferación del tejido calloso, así como estimular los brotes adventicios y axilares, regula la diferenciación, activa la síntesis de ARN y estimula la actividad enzimática y protéica (Pérez-Molphe-Balch *et al* 2015). Las auxinas sintéticas han mostrado ser las más adecuadas para la inducción de tejido calloso. Las más utilizadas son el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-metílico (Picloram), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA), mientras que las citocininas que más se utilizan son la cinetina (KIN) y la benziladenina (BA) (Biswas *et al*, 2013). Llamoca-Zárate *et al* (1999) desarrollaron un método para el establecimiento de cultivo de callo y células en suspensión de *O. ficus-indica*. El cultivo de callo friable fue iniciado a partir de cotiledones e hipocotilos usados como explantes; los cotiledones como

explante producen significativamente más callo que los de hipocotilo. El crecimiento óptimo de callo se observó en medio MS suplementado con furfurilaminopurina (FAP), 2,4-D, picloram o caseína hidrolizada, y 3% de sacarosa.

2.3 Estudios biotecnológicos en *Pereskia* spp.

Estudios recientes han demostrado que a partir de segmentos de hipocotilo de plántulas cultivadas *in vitro* de *Pereskia aculeata* Mill en medio basal MS y suplementado con 10µM de Picloram induce la formación de callos friables con pigmentación de color rojizo-rosa, el cual se caracterizó como betalaína. Los cultivos de células en suspensión de *Pereskia aculeata* Mill en MS modificado acumulan mayor contenido de biomasa y betalainas que los cultivos de callos de esta misma especie (De Aguiar *et al*, 2015).

2.4 Compuestos fenólicos

Son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático, este grupo se basa en la estructura del fenol. La ruta general de los fenilpropanoides, genera a partir de un sustrato común a un número de compuestos fenilpropanoides incluidos los flavonoides, monolignoles, ácidos hidroxycinámicos, cumarinas y estilbenos, ésta comienza con la fenilalanina generada a través de la vía del shikimato (Haslam & Cai, 1994). La desaminación de la fenilalanina es catalizada por la enzima fenilalanina amonía liasa (FAL) y resulta en el ácido cinámico. El ácido cinámico es subsecuentemente hidrolizado por la ácido cinámico 4-hidroxilasa para dar ácido p-cumárico. Esta ruta termina con la p-cumaroil coenzima A, como otras reacciones conduce a la biosíntesis de clases específicas de compuestos. Esta ruta es considerada como esencial en la biosíntesis de compuestos fenólicos además de otros compuestos importantes. Los compuestos fenólicos solubles se pueden aislar fácilmente a partir del tejido de las plantas por extracción en metanol o metanol acidificado con HCl 0.1% (v/v). Como la mayoría de los fenoles están presentes como glucósidos se debe tener precaución en su aislamiento para evitar la hidrólisis. Algunas técnicas pueden ser el aislamiento en oscuridad o condiciones de frío. Hay muchas maneras de

estimar la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en los tejidos de las plantas, pero es importante tener en cuenta que ninguno de estos métodos detecta todos los compuestos fenólicos. Como consecuencia, es en ocasiones necesario llevar a cabo varios análisis (Vermeris & Nicholson, 2008).

2.4.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de moléculas orgánicas ubicuamente distribuidos en las plantas vasculares. Se han descrito aproximadamente 2,000 miembros individuales del grupo de compuestos flavonoides. Como es típico para los compuestos fenólicos, pueden actuar como potentes antioxidantes y quelantes de metales. Ellos también parecen ser eficaces a influir en el riesgo de cáncer. En general, varios de estos flavonoides parecen ser eficaces contra el cáncer y agentes quimiopreventivos del cáncer. Los flavonoides, ubicuos en las plantas, son la clase más grande de polifenoles con una estructura común de propano de difenilo (C₆-C₃-C₆), que consta de dos anillos aromáticos unidos a través de tres carbonos. Las seis grandes subclases de flavonoides incluyen las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas e isoflavonas. Los efectos protectores de los flavonoides en los sistemas biológicos se atribuyen a su capacidad de transferir electrones de radicales libres, quelar metales, activar enzimas antioxidantes, reducir los radicales alfa-tocoferol y la inhibición de las oxidasas (Grotewold, 2006), los principales ingredientes nutraceuticos activos en plantas son los flavonoides.

"Nutraceuticos" es un término acuñado en 1979 por Stephen DeFelice. Se define como un "alimento o partes de los alimentos que proporcionan beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades". Posteriormente, se utilizaron otros términos (comida médica, alimentos funcionales y suplementos nutricionales). Un nutraceutico es cualquier suplemento de extracto de alimentos no tóxico que científicamente se ha demostrado beneficios para la salud, tanto para el tratamiento como la prevención de enfermedades (Dillard & German, 2000).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nutracéuticos pueden variar desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y dietas a ingeniería genética de alimentos, los productos a base de hierbas y productos procesados, como los cereales, sopas y bebidas. El creciente interés en nutraceuticos refleja el hecho de que los consumidores escuchan sobre estudios epidemiológicos que indican que una dieta específica o componente de la dieta se asocia con un menor riesgo de una determinada enfermedad (Dillard & German, 2000).

2.5 Actividad antioxidante

Los radicales son moléculas con un electrón libre (desapareado) que es altamente reactivo. Los radicales se forman en todos los organismos vivos durante las reacciones de oxidación que ocurren como parte normal del metabolismo. Bajo ciertas circunstancias como estrés medioambiental, heridas y ataques de patógenos las concentraciones de radicales libres se incrementan más allá de los niveles normales. Los radicales pueden ocasionar un daño considerable en los organismos vivos cuando no se controla. Esto resulta en parte por su reactividad, en particular hacia el ADN y las membranas (lípidos y proteínas), y en parte por las reacciones en cadena que inician. Las reacciones en cadena ocurren cuando un radical reacciona con otra molécula, extrae un electrón y por lo tanto crea un nuevo radical que puede reaccionar con otras moléculas (Vermerris & Nicholson, 2008).

2.6 Actividad antioxidante y contenido fenólico en *Pereskia* spp.

Se han realizado estudios sobre la actividad antioxidante del extracto metanólico y las fracciones de hojas de *P. grandifolia*, mediante el uso del modelo *in vitro* de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) (captura de radicales libres), β -caroteno y el poder reductor. Los resultados mostraron una actividad significativa para la fracción de acetato de etilo y también fuerte poder reductor para la fracción de hexano (Sim *et al*, 2010). Para el extracto de hexano obtenido de *P. bleo* se informó también actividad antioxidante (Wahab *et al*, 2009).

Un estudio realizado por Hassanbaglou *et al.* (2012) mostró mayor actividad antioxidante de extracto de acetato de etilo en comparación con los extractos de hexano y metanol por DPPH, FRAP y de β -caroteno. En contraste, aunque Sim *et al.* (2010) informó de efectos antioxidantes fuertes para el extracto de acetato de etilo usando el ensayo de β -caroteno, el extracto de hexano mostró la actividad más alta en el DPPH y la reducción de los ensayos de potencia. Además, Hong *et al.* (2009) describe la actividad antioxidante de diferentes extractos de tallos de *P. bleo*, especialmente para el extracto de t-butanol. Recientemente, Pinto *et al.* (2012) reportó la actividad antioxidante de diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto de metanol de hojas de *P. aculeata* por DPPH. Una actividad interesante se observó en la fracción de hexano debido a la presencia de compuestos fenólicos (Sim *et al.*, 2010). Todos estos resultados sugieren que en otras especies dentro del mismo género se puede presentar dicha actividad antioxidante.

2.7 Técnicas de cromatografía

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil). La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (Rubinson & Rubinson, 2004).

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y gran variedad de sustancias inorgánicas. La fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es una columna que puede ser de acero inoxidable (Voet *et al.*, 2007).

La cromatografía de fase reversa (Reversed Phase Chromatography, RPC) describe un tipo de cromatografía en la cual la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La RPC es una técnica de purificación capaz de separar componentes con características muy similares (Mayolo-Deloisa K. *et al*, 2012).

2.8 Metabolitos identificados en el género *Pereskia*

De los diversos estudios realizados en *Pereskia* spp. se ha logrado la identificación de algunos compuestos químicos de diferentes grupos como son carotenoides, fitosteroles y flavonoles (Tabla 3), los cuales poseen diferentes actividades tanto benéficas como de protección para la planta y a los que se les ha atribuido una capacidad farmacológica para el ser humano al momento de que la planta es ingerida por él.

Cuadro 3. Metabolitos identificados en el género *Pereskia*

Especies de <i>Pereskia</i>	Metabolitos identificados	Referencias
<i>P. aculeata</i>	α -caroteno, β -caroteno, luteína, α -criptoxantina, β -criptoxantina	Agostini-Costa <i>et al</i> , 2012
	Estigmasterol, sitosterol, 24- ζ -metilcolesterol	Salt <i>et al</i> , 1987
	Betalaínas	De Aguiar <i>et al</i> , 2015
<i>P. bleo</i>	2,4-di-tert-butilfenol	Malek <i>et al</i> , 2008, 2009
	β -sitoesterol glucósido, vitexina	Abdul-Wahab <i>et al</i> , 2012
	Epicatequina, quercetina, catequina, miricetina	Hassanbaglou <i>et al</i> , 2012
	Dihydroactinidiolide, campesterol, estigmasterol, fitol	Malek <i>et al</i> , 2009
<i>P. grandifolia</i>	β -sitosterol	Malek <i>et al</i> , 2008, 2009
	β -sitosterol, fitona, 2,4-di-terc-butilfenol	Nurestri <i>et al</i> , 2009

3. Justificación

El presente estudio aportará metodologías para el uso racional de especies del género *Pereskia*, esto mediante el establecimiento de cultivos de callos *in vitro* para la obtención de compuestos de interés farmacológico. Así también, contribuirá al estudio del perfil fitoquímico de compuestos presentes en el tejido calloso por medio de técnicas de cromatografía. Además, se determinará la actividad antioxidante que dichos metabolitos llegaran a tener.

Una de las aplicaciones de la biotecnología vegetal en la actualidad es la producción de metabolitos secundarios, los cuales son encargados de regular las relaciones de la planta con el medio que la rodea, estos metabolitos son de gran interés comercial ya que algunos se usan como medicamentos, en su mayoría por las capacidades antioxidantes que tienen estos compuestos. Por lo que es importante el aprovechamiento de la biotecnología para lograr el establecimiento de un cultivo que permita la producción de dichos metabolitos, así como la identificación de los mismos, para determinar cuál o cuáles son los que podrían ser extraídos y utilizados en la industria farmacéutica. Son pocos los estudios que se han realizado en este género por lo que la información que sea obtenida de esta investigación sirve de referencia para futuros análisis dentro de esta área.

La realización de una comparación del perfil químico entre el tejido calloso y la planta en su estado natural, recae en la importancia que tiene identificar las diferencias que se pueden presentar entre un estado y otro, para la obtención de los metabolitos de interés, es decir, averiguar si en un cultivo de callo se producen compuestos diferentes a los que la planta producía de manera natural y si estos tienen algún tipo de actividad antioxidante, que pueda llegar a usarse como fármaco por la industria.

4. Hipótesis

Es posible establecer cultivos de callos *in vitro* de *Pereskia sacharosa* y *Pereskia lychnidiflora* que acumulen metabolitos secundarios que presenten actividad antioxidante.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Establecer cultivos de callos de *P. sacharosa* y *P. lychnidiflora* para hacer un análisis fitoquímico preliminar de los mismos y evaluar su actividad antioxidante.

5.2 Objetivos particulares

- Establecer el cultivo *in vitro* de *Pereskia lychnidiflora* y multiplicar brotes *in vitro* de *Pereskia sacharosa*.
- Evaluar el efecto de las concentraciones de dos reguladores de crecimiento vegetal y tipo de explante en la inducción de callos en plántulas *in vitro* de *P. sacharosa* y *P. lychnidiflora*.
- Analizar el perfil fitoquímico de plántulas de las especies seleccionadas y compararlo con los cultivos de callos que produjeron mayor biomasa.
- Evaluar la actividad antioxidante y el contenido fenólico de los cultivos seleccionados de callos seleccionados y de las plantas *in vitro* de *P. sacharosa* y *P. lychnidiflora*.

6. Metodología

6.1 Material Vegetal

P. sacharosa cultivada in vitro, se obtuvo del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. *P. sacharosa* de invernadero, fue tomada del Invernadero de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Semillas de *P. lychnidiflora*, fueron una donación realizada por el Jardín Ethnobotánico de Oaxaca. *P. aculeata*, fue adquirida en el Invernadero Herba Orgánica ubicado en Yautepec, Morelos.

6.2 Germinación de semillas de *Pereskia lychnidiflora*

Se realizó una desinfestación de las semillas, se dieron tres lavados de 5min cada uno con agua corriente y jabón líquido Dermoclean (10mL L⁻¹), luego de estos lavados se desinfectaron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.75% (v/v) por 20min, tapando el vaso con papel aluminio y así se mantuvo hasta estar en campana. Una vez ahí, se decantó la solución de hipoclorito de sodio y se enjuagaron las semillas tres veces con agua destilada estéril. Se colocó una semilla en cada tubo con medio MS complementado con 30g L⁻¹ de sacarosa y como agente gelificante 8g L⁻¹ de agar. Una vez germinadas las semillas, las plántulas obtenidas fueron pasadas a medio MS líquido y conservadas en el cuarto de incubación a 25±2°C bajo un fotoperiodo de 16h luz, 8h oscuridad.

6.3 Propagación in vitro de *Pereskia sacharosa*

Partiendo de plántulas de *Pereskia sacharosa* se realizó un experimento colocando los explantes en dos diferentes medios; uno con medio MS + BA y el otro con medio MS + BA + carbón activado (n=9), para determinar en cuál de los dos medios la plántula producía más hojas. Del resultado de este experimento se siguió subcultivando en el que dio un mejor efecto, crecimiento de una mayor cantidad de hojas por explante, a cada explante se le cortó la raíz en caso de que se haya obtenido y se quitan también las hojas adventicias, dejando solamente las hojas de la parte superior. Los subcultivos se realizaron cada 21 días.

6.4 Inducción y establecimiento del cultivo de callo

Segmentos de hoja (1cm²) y tallo (1cm) de *P. sacharosa* y *P. lychnidiflora* se inocularon en frascos con 10mL de medio MS adicionado con 30g L⁻¹ de sacarosa y suplementado con ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (2.41mg L⁻¹) o tiazurón (TDZ) (0.5mg L⁻¹) más ácido naftalenacético (ANA) (2mg L⁻¹). El pH del medio fue ajustado a 5.7 antes de la adición del agar (8g L⁻¹), colocando cinco frascos con cuatro explantes (hoja y peciolo) cada uno, por tratamiento, manteniéndolos en cuarto de incubación a 25±2°C bajo un fotoperiodo de 16h proporcionada por tubos fluorescentes blancos (45 μmol m⁻² s⁻¹). Los callos se subcultivaron en medio fresco con la misma composición cada 21 días. La cinética de crecimiento se llevó a cabo durante 40 días con un inóculo inicial de 0.2g (tallo de *P. sacharosa*) y 0.1g (hoja de *P. sacharosa*), haciendo mediciones de peso de la biomasa en fresco y seco cada 4 a 5 días (n = 3). La masa seca se obtuvo por liofilización.

Se determinaron los siguientes parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ, d⁻¹) calculada a través de los datos logarítmicos en base seca de la curva de crecimiento exponencial, el tiempo de duplicación (td) que se el tiempo requerido para duplicar la biomasa, se obtuvo de la siguiente ecuación: $td = \ln 2 / \mu$; el índice de crecimiento es la concentración de biomasa final entre la concentración de biomasa inicial.

6.5 Preparación de extractos

Hojas (3g) y tallos (5g) de *P. sacharosa*, *P. aculeata* (control positivo) y *P. lychnidiflora* fueron secados a temperatura ambiente, mientras que los callos fueron liofilizados, todas las muestras se pulverizaron y se colocaron en maceración con metanol durante 30 minutos en baño maría a 60°C, el sobrenadante fue filtrado y concentrado en rotavapor a 70°C. Los extractos se mantuvieron en refrigeración y lejos de la luz hasta su análisis cromatográfico y espectrofotométrico.

6.6 Cromatografía en capa fina

Para el análisis por cromatografía en capa fina se utilizaron placas de gel de sílice de fase normal y fase reversa, en cámara con atmósfera saturada; utilizando diferentes fases móviles. Hexano:acetato de etilo (7:3), diclorometano:metanol (95:5), agua:acetonitrilo (7:3), diclorometano:metanol (85:15), los reveladores usados; reactivo de Dragendorff (alcaloides), 4-hidroxibenzaldehído (terpenos), sulfato cérico (universal), NP/PEG (flavonoides). Los extractos se llevaron a una concentración de 25mg mL⁻¹ y fueron aplicadas con capilar.

6.7 Cromatografía líquida de alta resolución

El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna analítica de fase reversa de 25cm, RP-18-5µm, Supersphare, Merck. Las condiciones del análisis cromatográfico fueron las siguientes: se usaron dos fases móviles, la primera fue una mezcla de 0.5% ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo (CH₃CN) y la segunda una mezcla de agua (H₂O) y CH₃CN (Cuadros 4, y 5); velocidad de flujo 1mL min⁻¹. La detección por fluorescencia se realizó a 340nm, y el tiempo total de análisis fue de 30 minutos. Los extractos se llevaron a una concentración de 5mg mL⁻¹ y el volumen de inyección fue de 10µL.

Cuadro 4. Sistema de gradientes, para la metodología (1) de fase móvil: TFA 5%, CH₃CN

Tiempo (min)	%TFA	%CH ₃ CN
	100	0
1	100	0
2	95	5
3	95	5
4	70	30
20	70	30
21	50	50
23	50	50
24	20	80
25	20	80
26	0	100
27	0	100
28	100	0

30	100	0
----	-----	---

Cuadro 5. Sistema de gradientes, para la metodología (2) de fase móvil:

agua : CH₃CN

Tiempo (min)	%Agua	%CH ₃ CN
	100	0
1	100	0
2	95	5
3	95	5
4	70	30
20	70	30
21	50	50
23	50	50
24	20	80
25	20	80
26	0	100
27	0	100
28	100	0
30	100	0

Cuadro 6. Sistema de gradientes, para la metodología (3).

Fase móvil: agua : CH₃CN

Tiempo (min)	%H ₂ O	%CH ₃ CN
	100	0
3	100	0
4	90	5
6	90	5
7	70	30
14	70	30
15	15	50
21	15	50
22	0	80
26	0	80
27	100	100
30	100	100

6.8 Determinación de compuestos fenólicos

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Sim *et al* (2010). Para ello, se preparó una curva

estándar con ácido gálico ($n=3$) a concentraciones de 0 a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un volumen final de 1 mL. A cada tubo le fueron añadidos 2.5 mL de agua desionizada y 0.1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) 1N. Después de 6 minutos, a cada tubo se le agregaron 0.25 mL de una solución de carbonato de sodio (marca del reactivo) al 10% y se agitaron en un vortex. La absorbancia de las muestras se monitoreó a 760 nm en un espectrofotómetro (Jenway, Genova) y se obtuvo la ecuación de la recta ($y=0.023x+0.012$) y el coeficiente de correlación ($R^2=0.988$).

6.9 Determinación de flavonoides

La determinación del contenido de flavonoides se realizó por el método descrito por Jun *et al* (2013) con algunas modificaciones. Se preparó una curva estándar con quercetina ($n=3$) a concentraciones de 10 a $140 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un volumen final de 1 mL. A cada tubo le fueron añadidos 1.25 mL de agua desionizada y 0.075 mL de nitrito de sodio (marca del reactivo) al 5% y se agitaron en vortex. Después de 5 min a cada tubo se le agregaron 0.15 mL de cloruro de aluminio (marca del reactivo) al 10% agitando en vortex. A los 5 min se añadieron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1M y 2.5 mL de agua desionizada. Se midió la absorbancia después de 30 min a 510 nm usando un espectrofotómetro (Jenway, Genova) y se obtuvo la ecuación de la recta ($y=0.001x+0.013$) y el coeficiente de correlación ($R^2=0.972$). El contenido total de flavonoides se expresó en equivalentes de quercetina.

6.10 Actividad antioxidante (DPPH)

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos en los radicales de DPPH se midió de acuerdo al método de Cheung *et al* (2003), con algunas modificaciones. Se preparó una curva estándar con ácido ascórbico ($n=3$) a concentraciones de 2.5 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un volumen final de 100 μL . A cada tubo le fueron añadidos 600 μL de una solución de DPPH 100 μM . Los tubos fueron guardados en oscuridad total durante 20 minutos, transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia de todos los tubos a 515 nm en espectrofotómetro (Jenway, Genova), calibrando a cero con metanol absoluto. Se obtuvo la ecuación de la

recta ($y=-0.012x+0.634$) y el coeficiente de correlación ($R^2=0.995$). La actividad antioxidante se expresó en mg equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto



7. Resultados

7.1 Germinación de semillas de *Pereskia lychnidiflora*

El método de desinfección se determinó como efectivo para semillas de *P. lychnidiflora*, dando un porcentaje de contaminación de 0% (n=35). El porcentaje de germinación fue de 91.4% (n=35), la germinación comenzó a los 10 días de iniciado el tratamiento (Figura 1).

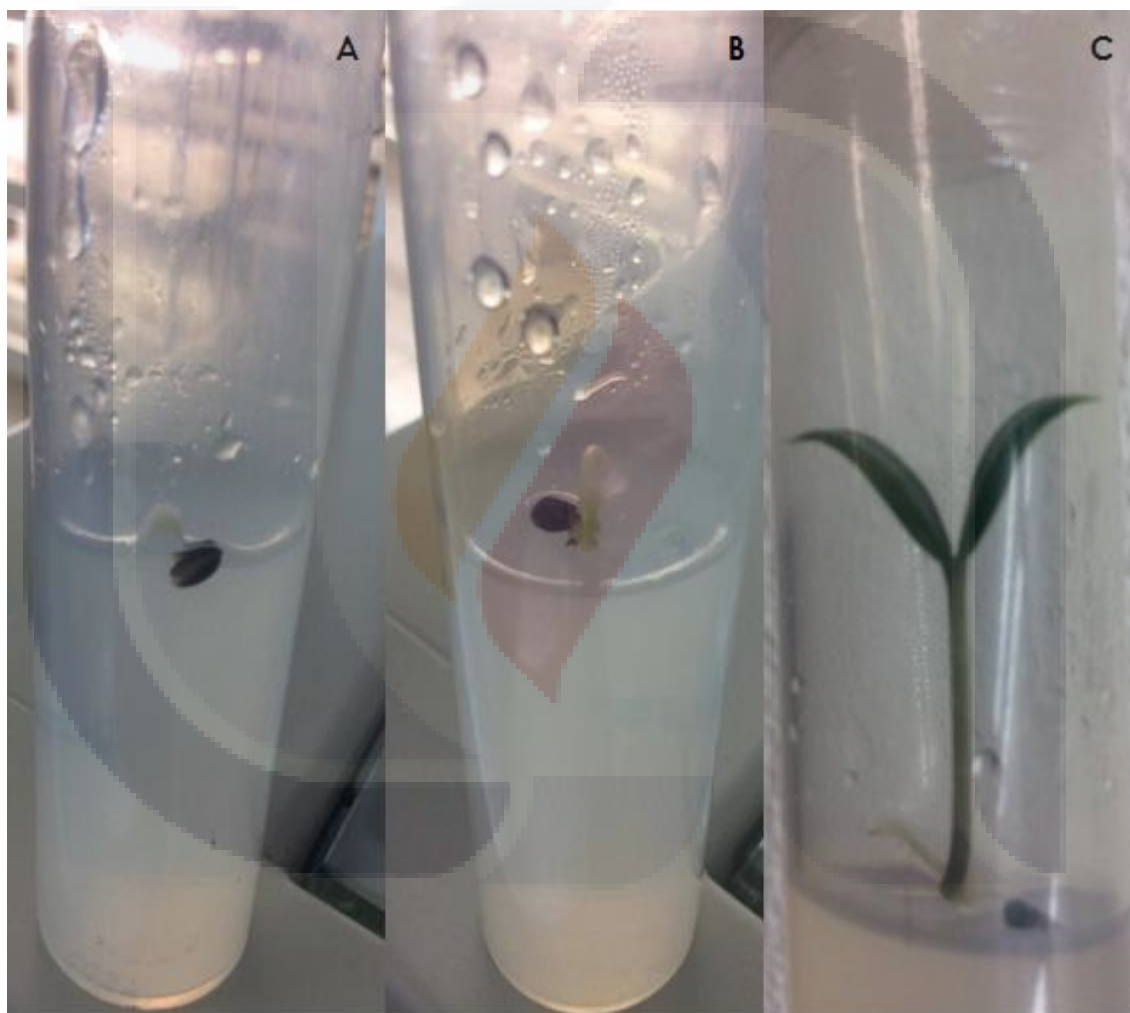


Figura 1. Germinación de semillas de *P. lychnidiflora* a los 10 (A), 12(B) y 14(C) días después de cultivadas en medio MS

En la siguiente parte del experimento, se evalúan dos tratamientos, uno con medio de cultivo MS y el otro MS + carbón activado.

En las figuras 2 y 3 se observan las diferencias entre los medios de cultivo sobre las plántulas de *P. lychnidiflora*, los que se encuentran en medio MS sin el carbón activado presentan oxidación en las hojas, mientras los que tienen carbón activado se observan con mayor vigor.

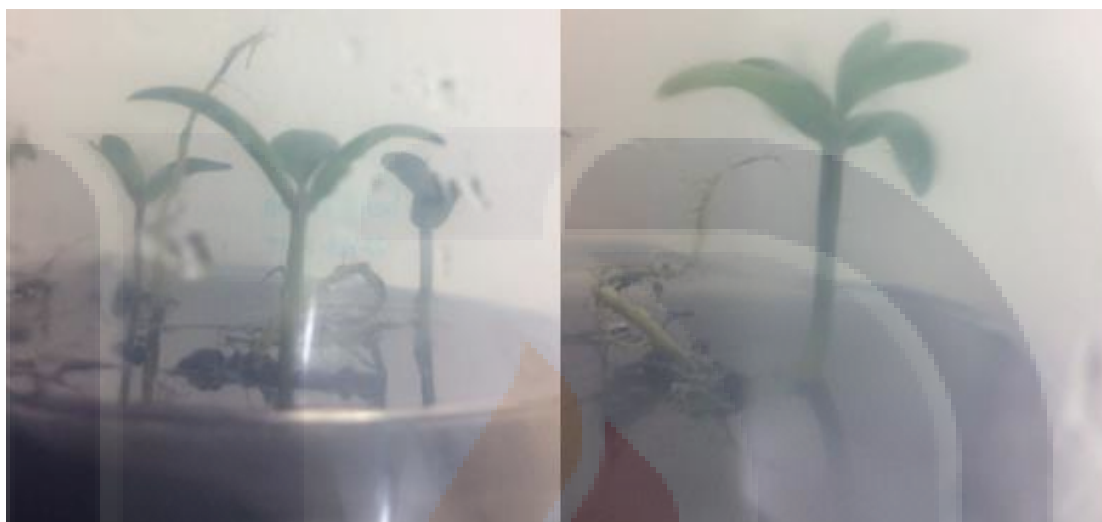


Figura 2. Plántulas de *P. lychnidiflora* en medio de cultivo MS + CA

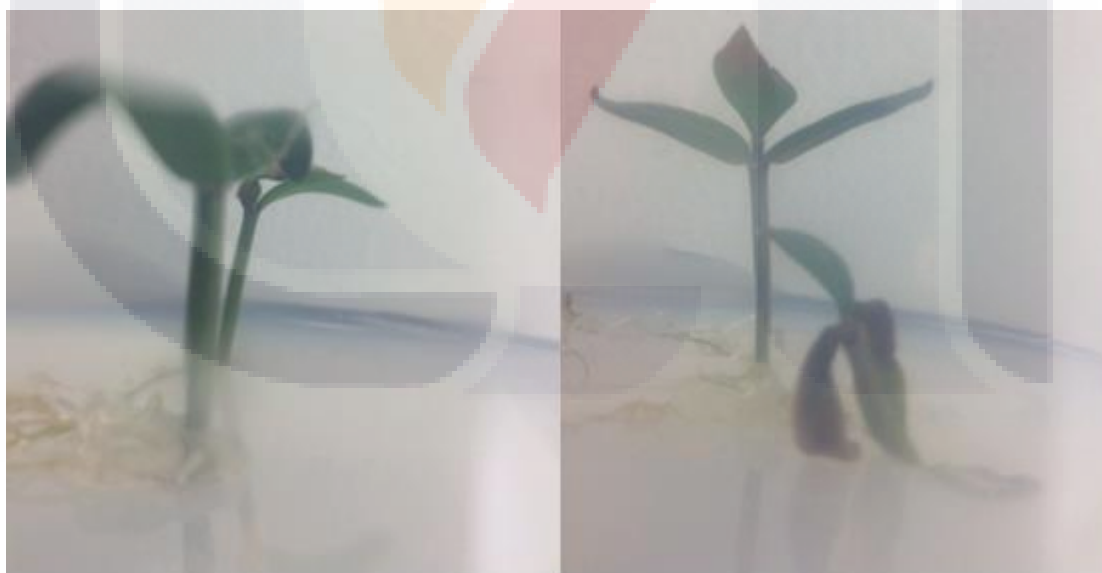


Figura 3. Plántulas de *P. lychnidiflora* en medio MS

7.2 Propagación de brotes *in vitro* de *Pereskia sacharosa*

En la figura 5 se muestran los resultados de los tratamientos para la propagación de *P. sacharosa*, para el tratamiento que usó carbón activado se obtuvo una media de 6 hojas por explante, mientras que para el tratamiento sin carbón activado la media fue de 3 hojas por explante. Teniendo así que el mejor tratamiento para propagación es el que usa el carbón activado, a partir de este experimento se continuó subcultivando en este medio con carbón activado.



Figura 4. Plántulas de *P. sacharosa* del banco de germoplasma de la UAA a partir de los cuales se comenzó la propagación *in vitro*



Figura 5. Izquierda tratamiento con carbón activado, derecha tratamiento sin carbón activado (n=9)

En la figura 6 se observa el crecimiento de las plántulas, así como después de 6 meses de subcultivar, en la figura 7 se muestra el crecimiento que han tenido las hojas de éstos explantes.



Figura 6. Explantes de *P. sacharosa* subcultivados después de 1 y 2 meses



Figura 7. Explantes de *P. sacharosa* después de 6 meses de subcultivo

7.3 Inducción y establecimiento del cultivo de callo

La inducción de callo se llevó a cabo con dos diferentes tratamientos con hormonas, dando como resultado el crecimiento de tejido calloso friable y en mayor cantidad en los tratamientos que llevaban las hormonas TDZ y ANA como inductores de crecimiento. En la figura 8 se muestra el color del callo obtenido del tallo de *P. sacharosa*, que va desde tonalidades blancas y amarillas hasta verdes.



Figura 8. *P. sacharosa*, explante tallo, en medio MS con TDZ y ANA, un mes después de inoculado el explante

7.3.1 Cinética de crecimiento del tejido calloso del tallo de *P. sacharosa*

En el gráfico 1 se observan las etapas de crecimiento del tejido calloso, la fase de adaptación al medio (0 a 10 días), seguida de la fase exponencial (10 a 38 días), fase que fue utilizada para el cálculo de los parámetros cinéticos presentados en el Cuadro 7.

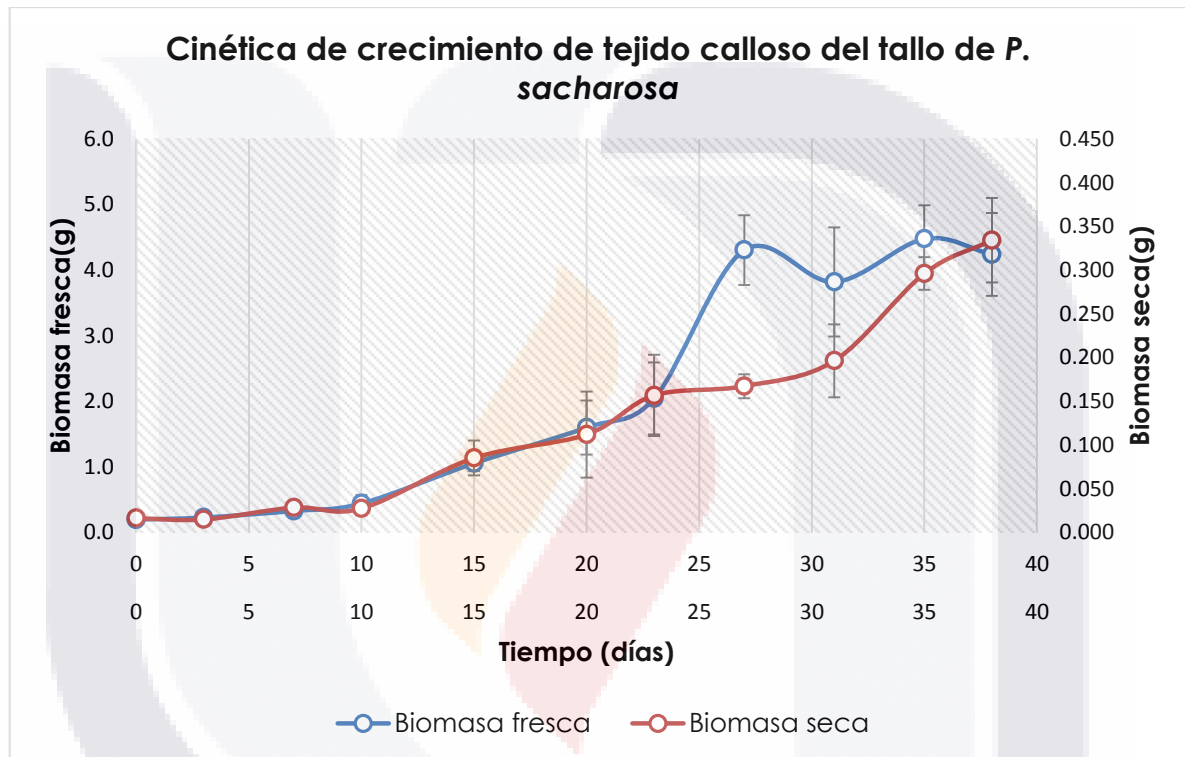


Gráfico 1. Cinética de crecimiento del tejido calloso obtenido a partir del tallo de *P. sacharosa*. Las barras de error representan la desviación estándar, cada punto es promedio de 3 repeticiones.

Cuadro 7. Parámetros cinéticos del cultivo de callos del tallo de *P. sacharosa* determinados con base a la biomasa seca.

Biomasa inicial (g)	Biomasa final (g)	Tiempo* (días)	Índice de crecimiento	Tiempo de duplicación (días)	Velocidad específica de crecimiento (μ , d ⁻¹)
0.2	0.334	38	12.1409	8.9	0.0776

*Tiempo al cual se alcanza la biomasa máxima

En la figura 9 se observa el callo obtenido de la hoja de *P. sacharosa*, se observan coloraciones verdes y amarillas.

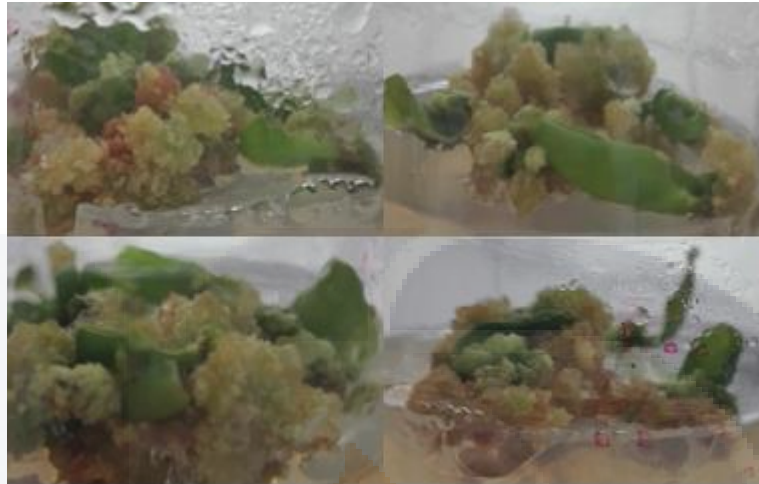


Figura 9. *P. sacharosa*, explante hoja, medio MS con TDZ y ANA, un mes después de inoculado el explante

7.3.2 Cinética de crecimiento del tejido calloso de la hoja de *P. sacharosa*

En el gráfico 2 se observan las etapas de crecimiento del tejido calloso, la fase de adaptación al medio (0 a 10 días), seguida de la fase exponencial (10 a 31 días), de la cual se obtuvieron los datos para determinar los parámetros cinéticos (Cuadro 8).

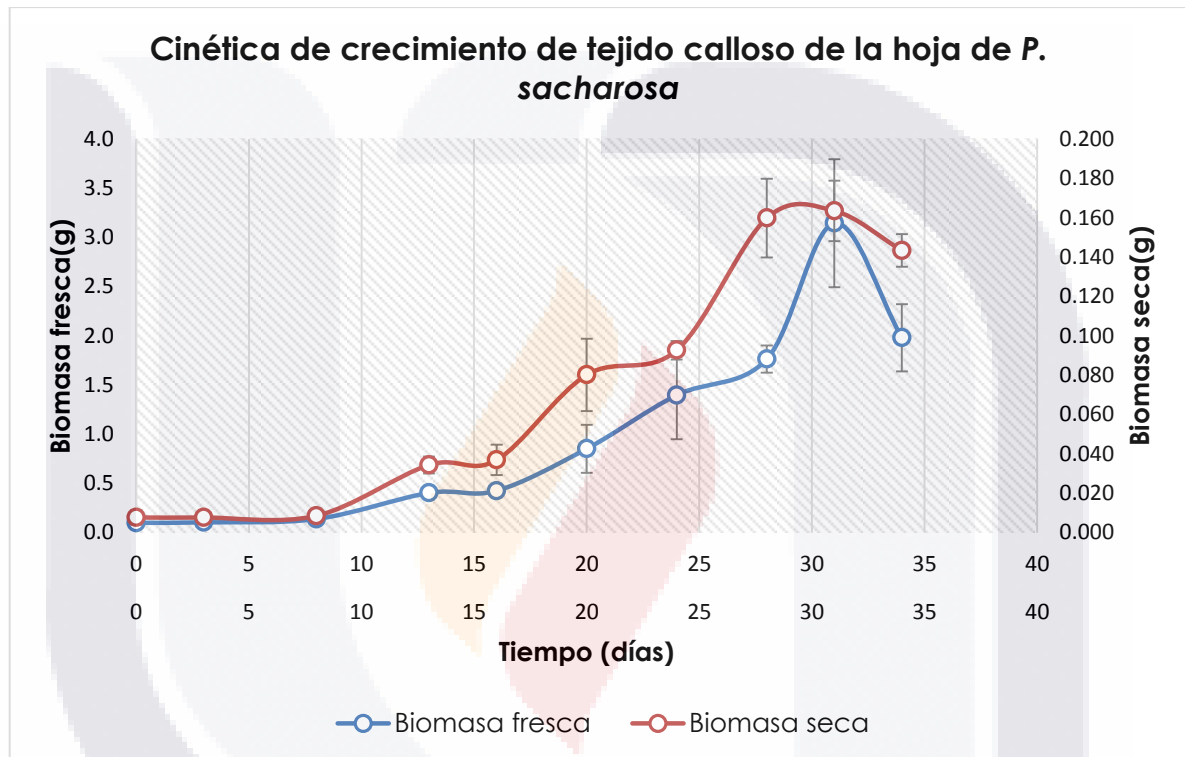


Gráfico 2. Cinética de crecimiento del tejido calloso obtenido a partir de la hoja de *P. sacharosa*. Las barras de error representan la desviación estándar, cada punto es promedio de 3 repeticiones.

Cuadro 8. Parámetros cinéticos del cultivo de callos de la hoja de *P. sacharosa*, determinados con base a la biomasa seca.

Biomasa inicial (g)	Biomasa final (g)	Tiempo* (días)	Índice de crecimiento	Tiempo de duplicación (días)	Velocidad específica de crecimiento (μ , d ⁻¹)
0.1	0.164	31	16.71	8.9	0.0776

*Tiempo al cual se alcanza la biomasa máxima

7.3.3 Cultivo de callo de *P. lychnidiflora*

En las siguientes figuras (10, 11, 12 y 13), se observó la formación de tejido calloso en *P. lychnidiflora*, pero de consistencia muy firme, y que además tardó más tiempo en desarrollarse, 1 mes. por lo que de este material no se obtuvo suficiente cantidad para realizar las pruebas posteriores, ni para hacer una cinética de crecimiento que pudiera arrojar datos importantes.

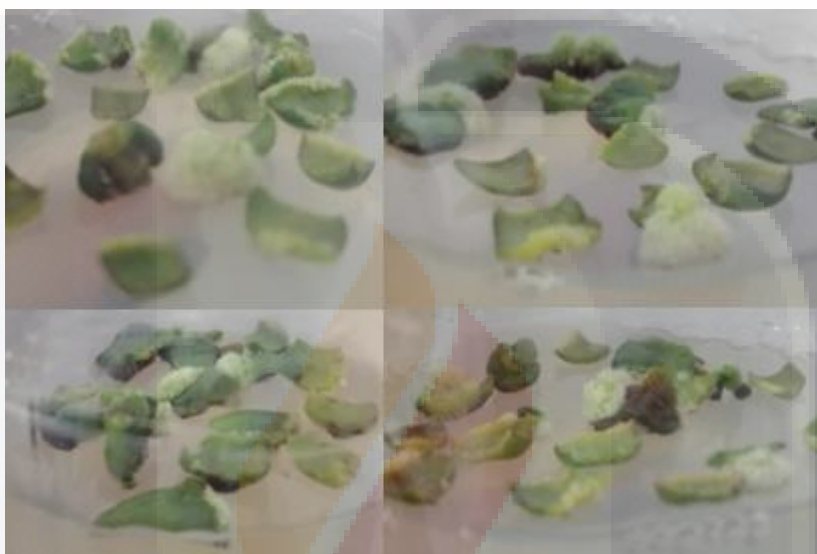


Figura 10. *P. lychnidiflora*, explante cotiledón, medio MS con TDZ y ANA, un mes después del tratamiento

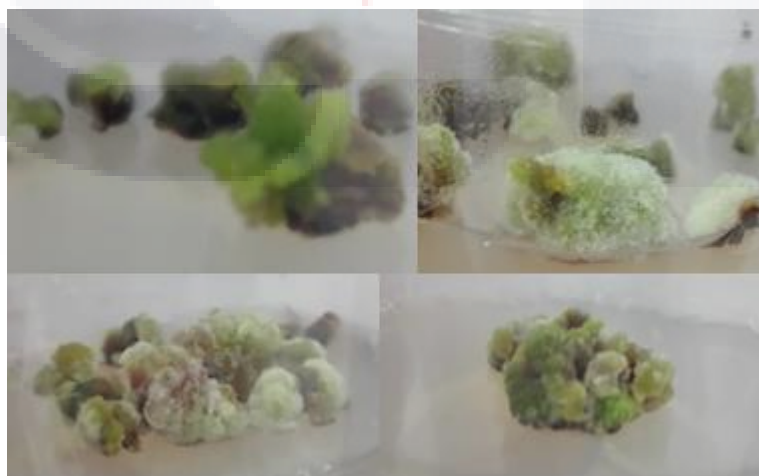


Figura 11. *P. lychnidiflora*, explante hipocotilo, medio MS con TDZ y ANA, un mes después del tratamiento

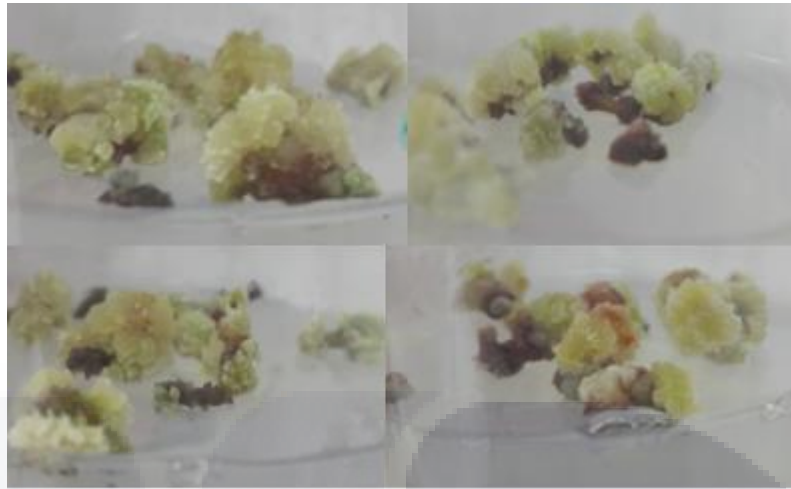


Figura 12. *P. lychnidiflora*, explante hipocotilo, medio MS con Picloram, un mes después del tratamiento



Figura 13. *P. lychnidiflora*, explante cotiledón, medio MS con Picloram, dos meses después de iniciado el tratamiento

7.4 Cromatografía en capa fina

Se realizó un análisis preliminar por cromatografía en capa fina para los extractos metanólicos de hoja y tallo de *P. sacharosa* y *P. aculeata*. Como un primer sistema de elusión se utilizó una mezcla 7:3 de n-hexano: acetato de etilo, revelando con reactivo de Dragendorff (alcaloides), 4-hidroxibenzaldehído (terpenos) y sulfato cérico (universal). En la figura 14-A, no se observa la presencia de alcaloides, en la figura 14-B el 4-hidroxibenzaldehído revela bandas a la altura del β -sitosterol ($R_f = 0.5$). Con el sulfato cérico se puede observar la presencia de otros compuestos que se quedaron en el punto de aplicación (figura 14-C), por lo que se procedió a modificar la fase móvil (Figura 15).



Figura 14. Cromatografía preliminar. A. Revelada con Dragerndorff, B. Revelada con 4-hidroxi y C. Revelado con sulfato cérico. Carriles: 1. Extracto metanólico del tallo de *P. aculeata*, 2. Extracto metanólico del tallo de *P. sacharosa*, 3. Extracto metanólico de la hoja de *P. aculeata*, 4. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa*, R. β -sitosterol. Fase estacionaria normal. Fase móvil: hexano: acetato de etilo (7:3)

En la figura 15 se observan bandas a la altura del ácido ursólico ($R_f = 0.4$) lo que podría indicar la presencia de compuestos similares a éste.



Figura 15. Cromatografía con fase móvil: Diclorometano:metanol (95:5). Carriles: 1. Extracto metanólico del tallo de *P. aculeata*, 2. Extracto metanólico del tallo de *P. sacharosa*, 3. Extracto metanólico de la hoja de *P. aculeata*, 4. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa*, R. ácido ursólico. Fase estacionaria normal. Revelado: 4-hidroxibelzaldehído

Para el revelado con flavonoides, se alcanzan a distinguir en los extractos de hoja de *P. sacharosa* y *P. aculeata*, principalmente en el punto de aplicación (figura 16), por lo que se modificó la fase para una mejor observación de los mismos, usando una fase reversa descrita a continuación.

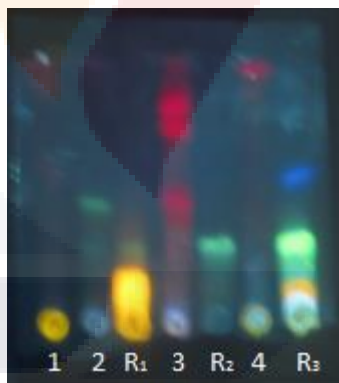


Figura 16. Cromatografía revelada para flavonoides. Carriles: 1. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa*, 2. Extracto metanólico del tallo de *P. sacharosa*, 3. Extracto metanólico del tallo de *P. aculeata*, 4. Extracto metanólico de la hoja de *P. aculeata*, R₁. quercetina (flavonol), R₂. apigenina (flavona), R₃. Mezcla de flavonas. Fase estacionaria normal. Fase móvil: Diclorometano:metanol (95:5). Revelado: NP/PEG

En la figura 17 se observa la separación por CCF de los extractos metanólicos de hoja y tallo de *P. sacharosa* y *P. aculeata*, la fluorescencia amarilla y naranja, indica la presencia de flavonas en los extractos de hoja de las dos especies.

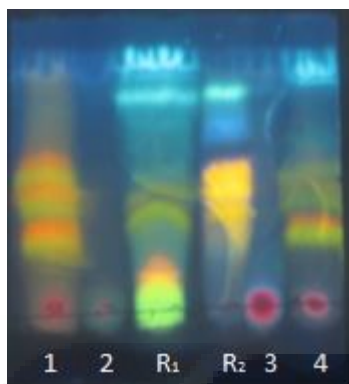


Figura 17. Cromatografía en fase reversa y revelada para flavonoides. Carriles: 1. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa*, 2. Extracto metanólico del tallo de *P. sacharosa*, 3. Extracto metanólico del tallo de *P. aculeata*, 4. Extracto metanólico de la hoja de *P. aculeata*, R₁. Mezcla de flavonas, R₂. apigenina (flavona). Fase estacionaria reversa. Fase móvil: agua: acetonitrilo (7:3). Revelado: NP/PEG

7.4.1 Identificación de terpenos y saponinas

Se probó una fase móvil de diclorometano y metanol (85:15) revelada con sulfato cérico dando como resultado dos bandas en cada extracto ($R_f = 0.78$ y 0.87), se observa también manchas en el punto de aplicación por lo que se procedió a separar en una fase reversa con la fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3) (figura 19).

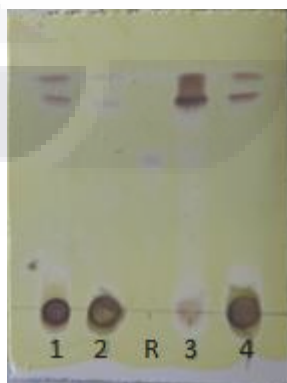


Figura 18. Cromatografía en fase móvil diclorometano: metanol (85:15). Carriles: 1. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa*, 2. Extracto metanólico del tallo de *P. sacharosa*, 3. Extracto metanólico de la hoja de *P. aculeata*, 4. Extracto metanólico del tallo de *P. aculeata*, R. Glucósido

de sitosterol. Fase estacionaria normal. Fase móvil: Diclorometano: metanol (85:15). Revelado: Sulfato cérico



Figura 19. Cromatografía en fase reversa de agua: acetonitrilo (7:3). Carriles: 1. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa*, 2. Extracto metanólico del tallo de *P. sacharosa*, 3. Extracto metanólico de la hoja de *P. sacharosa* cultivada *in vitro*, 4. Extracto metanólico del tallo de *P. aculeata*, 5. Extracto metanólico de la hoja de *P. aculeata*, R. Glucósido de sitosterol. Fase estacionaria reversa. Fase móvil: agua: acetonitrilo (7:3). Revelado: Sulfato cérico

En las hojas de *P. sacharosa* y *P. aculeata* se observan manchas amarillas características de flavonoides y manchas moradas de triterpenos glicosilados (saponinas). Las manchas verdes que presentaron estas muestras en un $R_f=1$ corresponden a los compuestos más polares que pueden ser mono, di o polisacáridos.

En el caso del tallo de *P. sacharosa*, se observó una mayor concentración de manchas moradas indicando un elevado contenido de saponinas triterpénicas y una mínima concentración de flavonoides. Esta muestra también presentó un alto contenido de azúcares.

7.5 Cromatografía líquida de alta resolución

En primera instancia se utilizó una metodología (1) desarrollada por el equipo de trabajo del CIBIS-IMSS para la separación e identificación de flavonoides. Usando como fase móvil una mezcla de 0.5% TFA y acetonitrilo. Bajo estas condiciones de separación las hojas presentaron más compuestos con picos de mayor altura que se observan en la figura 20 A y D.

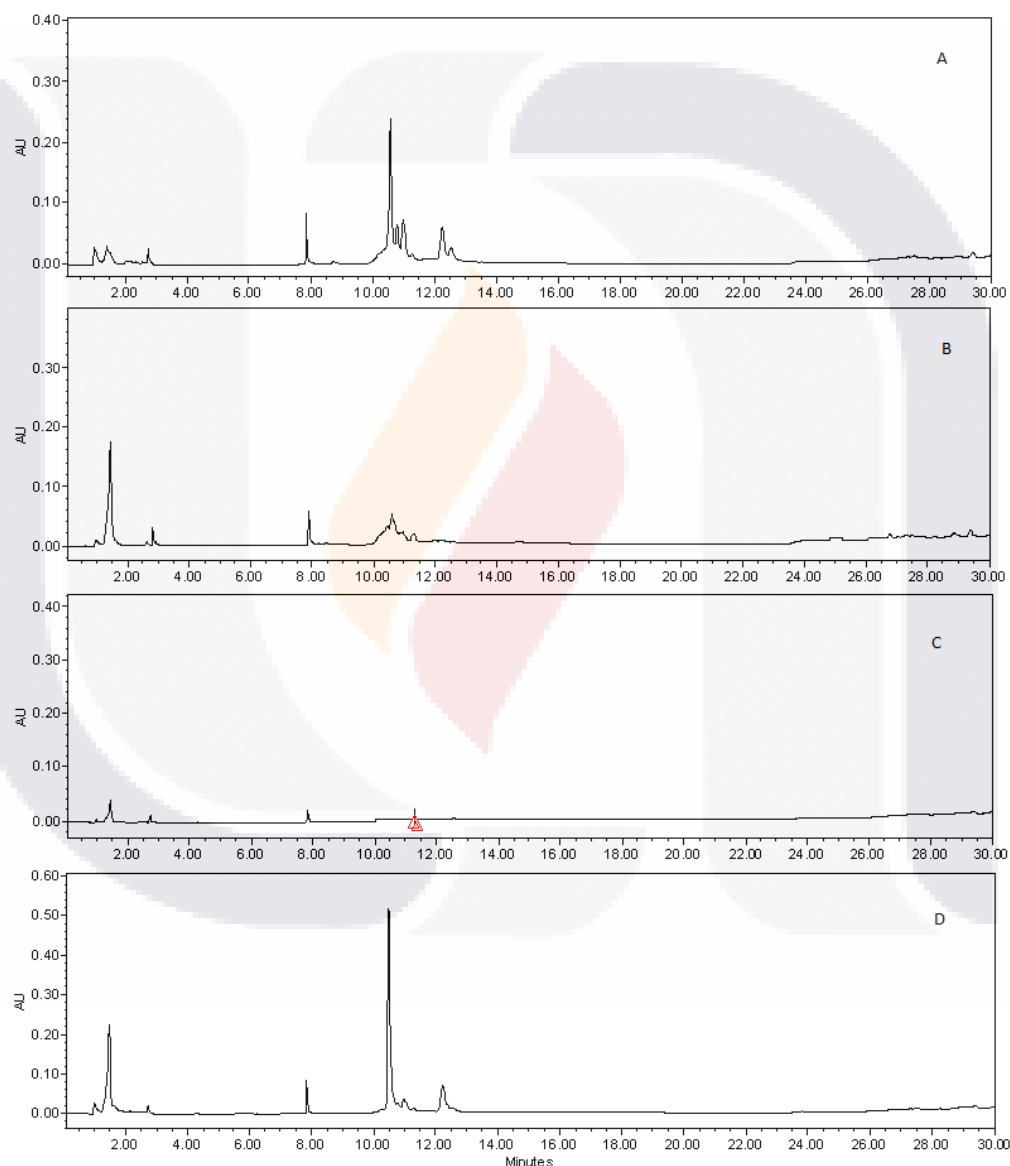


Figura 20. Cromatogramas con la metodología (1) a 340nm. **A.** *P. sacharosa* hoja, **B.** *P. sacharosa* tallo, **C.** *P. aculeata* tallo, **D.** *P. aculeata* hoja

Los picos más altos son los que presentaban un espectro muy similar a los referenciados como flavonas o flavonoles:

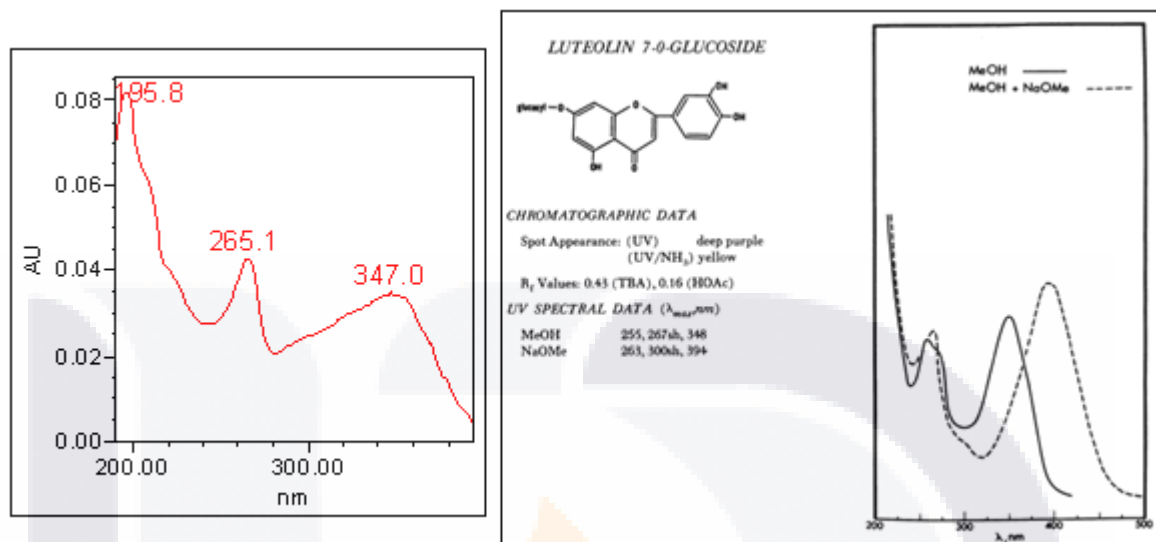


Figura 21. Comparación del espectro del pico del min 11 con espectro de bibliografía. Izquierda: espectro de uno de los picos más altos de *P. sacharosa* hoja. Derecha: Referencia de espectro tomada de Mabry et al, 1970

Se desarrolló un método en el CLAR para separar compuestos más polares presentes en la hoja de *Pereskia sacharosa*. Con esta metodología (2) se observaron los espectros a 220nm en los cuales se observaban picos en los últimos minutos de la corrida, dichos picos pertenecen a los espectros principalmente de terpenos. Para esta metodología se usó como fase móvil una mezcla de agua y acetonitrilo, en el gradiente que se describió en la metodología y que nos permitió observar los flavonoides y terpenos presentes en los extractos.

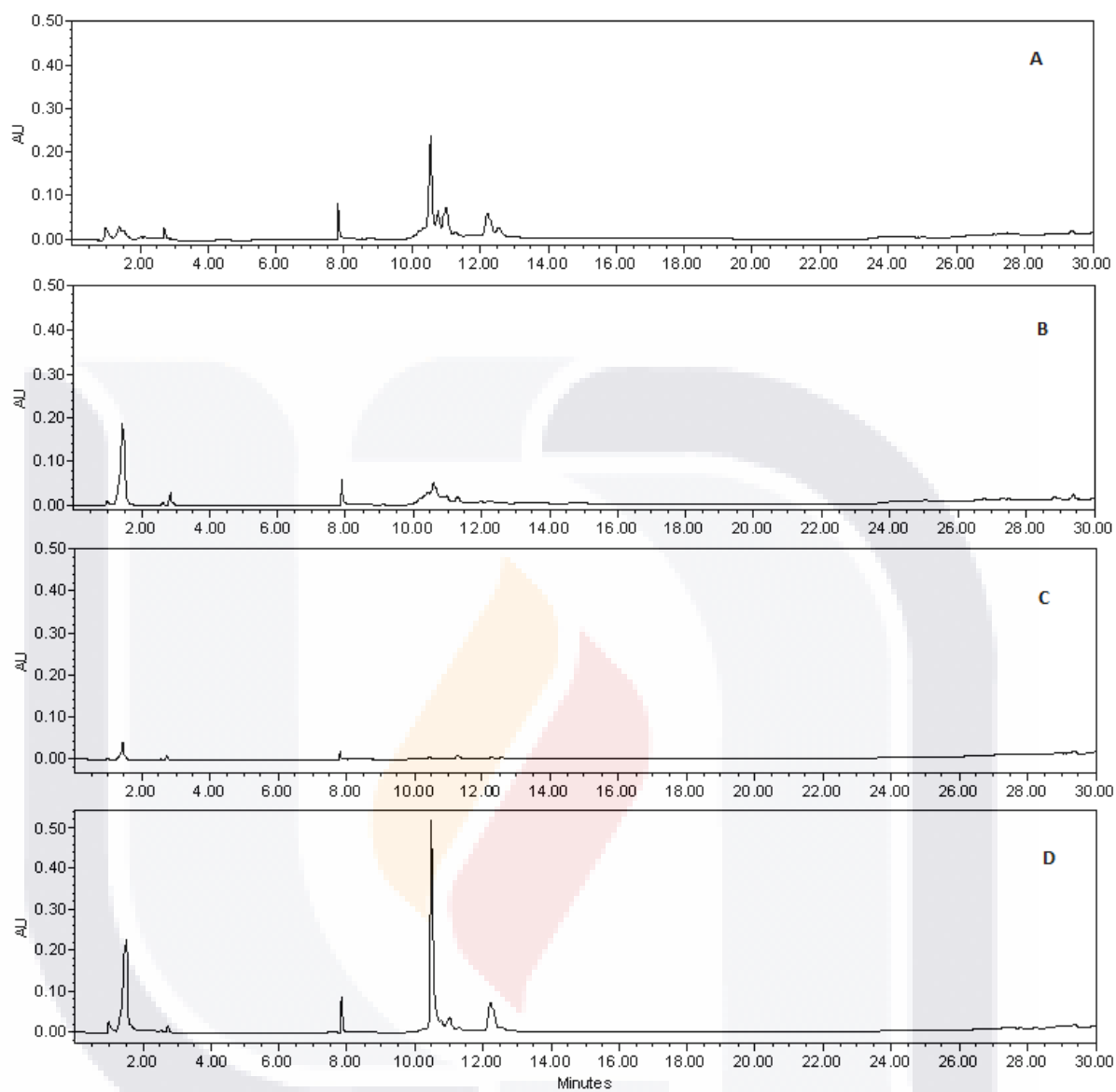


Figura 22. Cromatogramas con la metodología (2) a 220nm. **A.** *P. sacharosa* hoja, **B.** *P. sacharosa* tallo, **C.** *P. aculeata* tallo, **D.** *P. aculeata* hoja

A partir de la metodología 2, se desarrolló una nueva que pudiera retener por menos tiempo los terpenos presentes en los extractos y que también se pudieran observar dentro de la misma los compuestos identificados como flavonas. Obteniendo como resultado la presencia de picos entre los minutos 17 y 21 (figura 23), que por los espectros de absorción corresponden a terpenos (figura 24).

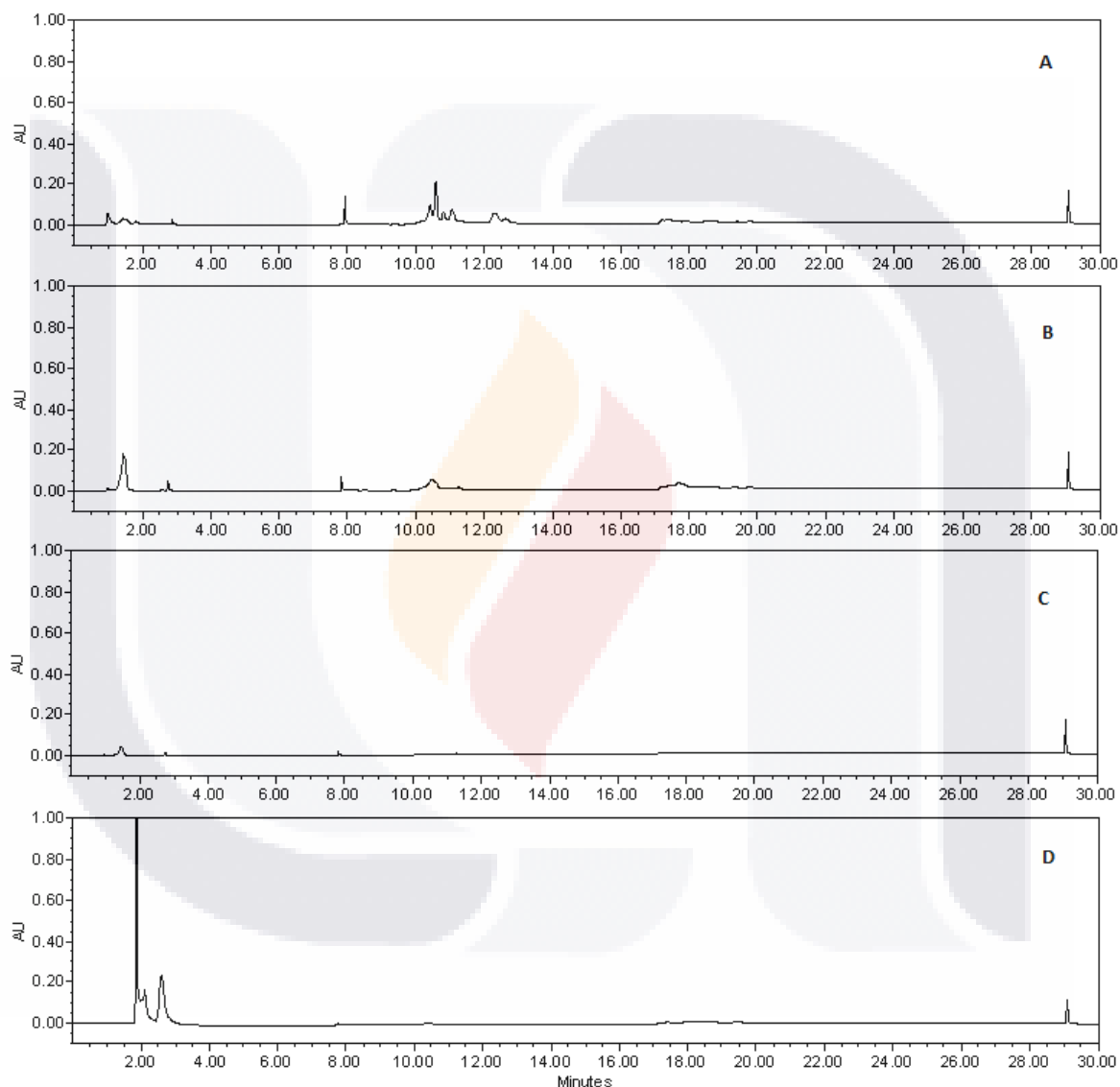


Figura 23. Cromatogramas con la metodología (3) a 220nm. **A.** *P. sacharosa* hoja, **B.** *P. sacharosa* tallo, **C.** *P. aculeata* tallo, **D.** *P. aculeata* hoja

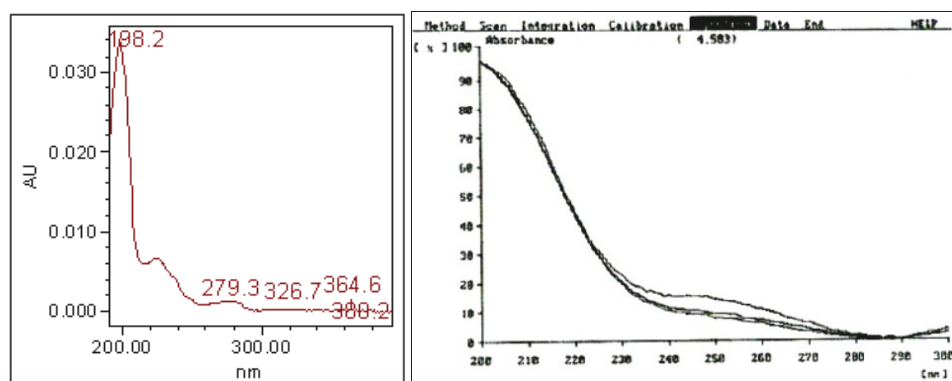


Figura 24. Comparación del espectro del pico del min. 17-18 con espectro de bibliografía. Izquierda. Espectro de absorción del pico más alto del tallo de *P. sacharosa* que aparece entre los 17 y 18 minutos. Derecha. Espectro de absorción del ácido corosólico (triterpeno). (Vijaykumar K. et al, 2012)

Por último, se muestra una comparación de los cromatogramas usando las diferentes metodologías (Figura 25), solamente para hoja de *P. sacharosa* y a 340nm en A y 220nm para B y C.

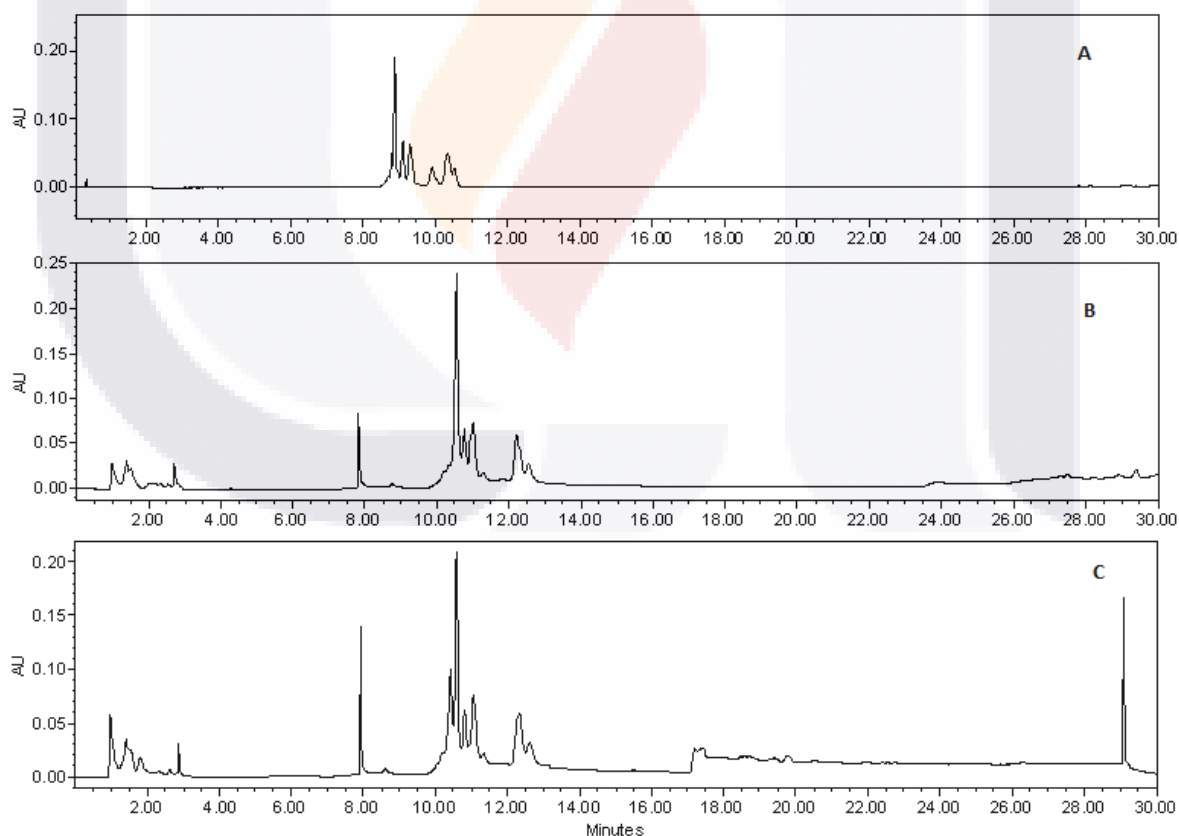


Figura 25. Comparación de cromatogramas de las diferentes metodologías probadas. **A.** Metodología (1) 340nm, **B.** Metodología (2) 220nm, **C.** Metodología (3) 220nm.

7.6 Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante (DPPH)

En el cuadro 8, se indica el contenido fenólico, expresado en μg equivalentes de ácido gálico por mL de extracto. Las hojas de *P. sacharosa* tanto *in vitro* como de invernadero mostraron una mayor cantidad de compuestos fenólicos, dando una correlación directa con la actividad antioxidante de los extractos. Por otro lado, el contenido de flavonoides equivalentes a quercetina, se presenta en una mayor cantidad en la hoja de *P. aculeata* seguido de la hoja de *P. sacharosa* de invernadero y la cultivada *in vitro*.

Cuadro 9. Determinaciones espectrofotométricas. Contenido fenólico, flavonoides y actividad antioxidante de los extractos de: 1. Hoja de *P. sacharosa*. 2. Tallo de *P. sacharosa*. 3. Hoja de *P. aculeata*. 4. Hoja de *P. sacharosa in vitro*. 5. Callo a partir del tallo de *P. sacharosa* (T_1). 6. Callo a partir de hoja de *P. sacharosa* (T_3).

Muestra	Contenido fenólico (mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto)	Flavonoides (mg equivalentes de quercetina/g de extracto)	Actividad antioxidante por DPPH (mg equivalentes de ácido ascórbico/g de extracto)
1	26.41 $\pm$ 0.18 a	235.33 $\pm$ 7.77 b	92.06 $\pm$ 1.55 a
2	7.62 $\pm$ 0.31 c	39.67 $\pm$ 18.50 c	0 $\pm$ 2.4 d
3	16.44 $\pm$ 1.65 b	566.67 $\pm$ 88 a	3.06 $\pm$ 4.06 c
4	25.99 $\pm$ 0.27 a	222.33 $\pm$ 40.67 b	52.94 $\pm$ 5.55 b
5	2.72 $\pm$ 0.12 e	4 $\pm$ 3.61 d	0 $\pm$ 0.84 d
6	5.86 $\pm$ 0.09 d	24.33 $\pm$ 16.5 c	0 $\pm$ 2.4 d

Los resultados representan la media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes en la misma columna representan diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, prueba de Tukey, $p \leq 0.05$)

8. Discusión de resultados

Germinación de semillas

De acuerdo con Barrueto y Zimmermann (2006) el hipoclorito de sodio (NaClO) es el producto más eficiente en la desinfestación de explantes, ya que este presenta una correlación inversamente proporcional, donde a mayor concentración de NaClO , menor porcentaje de contaminación, lo cual se demuestra en esta investigación ya que al desinfestar las semillas con una concentración de NaClO al 0.75%, se obtuvo un 0% de contaminación, mostrando que el método de desinfestación utilizado fue el adecuado. Con respecto a la germinación de *P. lychnidiflora* se obtuvo un porcentaje del 91.4%, coincidiendo con Pereira *et al* (2011) donde demostraron que la concentración de NaClO utilizado para la desinfestación de semillas no afecta de manera significativa al porcentaje de germinación de las mismas.

Propagación *in vitro* de *P. sacharosa*

Pedroza-Manrique (2009) observó que el carbón activado adicionado a los medios es un agente químico que ejerce un control positivo en la oxidación tanto del medio de cultivo como en el tejido vegetal, esto se observa en los resultados pues comparando la cantidad de hojas desarrolladas en los dos medios de cultivo, se concluye que en el medio que tiene carbón activado las plantas tienen mayor número de hojas, ya que al detener de manera significativa la oxidación del material vegetal, permite que no se pierda por necrosis y así terminar con la supresión de toda respuesta de crecimiento y desarrollo del tejido. El efecto benéfico del carbón activado se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado o que son liberadas por el explante, las concentraciones empleadas que se manejan en bibliografía varían, siendo las más usadas 2 y 3 g L⁻¹ (Azofeifa, 2009). De la Rosa-Carrillo *et al*, (2012) observaron un efecto positivo en el enraizamiento de cactáceas con la adición de carbón activado, en el mismo estudio por otra parte se presentó generación de brotes adventicios gracias a la

adición de la citocinina BA en el medio de cultivo, gracias a estos resultados y comparando con lo obtenido en este estudio se puede decir que existe una sinergia de estos dos compuestos dentro del medio de cultivo para *P. sacharosa*, pues aunque se probó usar solamente la citocinina, al mezclarla con el carbón activado se observa un efecto positivo en cuanto al crecimiento de las plántulas así como en la cantidad de hojas y raíces y el tamaño de las mismas.

Inducción y establecimiento del cultivo de callo

Pérez-Molphe-Balch *et al* (2015), mencionan que los reguladores de crecimiento son usados para inducir directa o indirectamente organogénesis o embriogénesis, dentro de estos los más comúnmente utilizados para inducir organogénesis directa, con un paso intermedio de formación de callo, en especies de cactus son las citocininas, específicamente 6-benciladenina (BA), cinetina (Kin), 2-isopentil adenina (2ip) y seatina, pueden eventualmente inducir formación de callo en algunas especies de cactáceas, dependiendo de la concentración y combinación con auxinas, ocasionalmente se puede utilizar el tidiazuron (TDZ), además de que la auxina incorporada más frecuentemente en los medios de cultivo para inducir organogénesis es el ácido 1-naphtalenacetico (ANA) 2.7 μ M. Con respecto a los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede observar en el gráfico 1 y 2, que se logró el establecimiento de tejido calloso en la tallo y hoja de *P. sacharosa*; en la cinética de crecimiento de tallo, la máxima biomasa fresca se obtuvo del día 27 y 35 (4.307 y 4.478 g respectivamente), teniendo una ligera disminución el día 31; para el caso de hoja también se logró el establecimiento de dicho cultivo, la cinética de crecimiento marca que la máxima biomasa se obtuvo el día 30 (3.145 g), por lo tanto se puede decir que se obtuvo mejor rendimiento en caso del tallo. Otro aspecto importante de mencionar es que los resultados antes descritos fueron desarrollados en medio MS con TDZ y ANA, por lo que se puede decir que para estos explantes dicho medio resultó ser efectivo, para el caso del establecimiento de callo en *P. lychnidiflora* bajo las mismas condiciones del medio de cultivo antes mencionado, se obtuvieron resultados desfavorables ya que el crecimiento de callo era muy lento,

en algunos casos se obtuvo muy poco y este era muy duro, no se presentaba friable, que es una condición deseable en este tipo de cultivos, cabe mencionar que en este caso, se utilizó como explante el cotiledón y el hipocotilo, lo cual fue un factor para el establecimiento de callo, ya que como comenta Perez-Molphe-Balch *et al* (2015), la concentración y combinación de hormonas va a ser trascendental para el establecimiento de cultivos, así como la fase de crecimiento en la que se encuentra la planta, en este caso la combinación de hormonas o la edad de la planta no fueron adecuados para producir callo. Por último, también se utilizó un medio adicionado con Picloram para ambas especies, como en el estudio realizado por De Aguiar *et al* (2015) donde combinaron el uso de Picloram con BA para la formación de callo en *P. acuelata*, dado una respuesta favorable, por el contrario en el presente estudio los resultados al usar Picloram fueron desfavorables ya que en ningún caso se logró desarrollar callo, por lo que se puede decir que este compuesto no es efectivo para el establecimiento de tejido callos en hojas y tallos de *P. sacharosa*, ni en cotiledones e hipocotilos de *P. lychnidiflora*. El análisis de crecimiento ha sido usado ampliamente para el estudio de los factores que influyen el desarrollo de la planta y el rendimiento, a través del seguimiento de la acumulación de materia seca durante el tiempo (Santos *et al*, 2010) en el presente estudio se obtuvieron 3 factores para hacer este análisis (Cuadros 7 y 8). Se observa que la velocidad de crecimiento para la hoja fue mayor siendo de 0.1214 g d^{-1} , mientras que para el tallo fue de solo 0.0776 g d^{-1} una posible explicación a este fenómeno es que las hojas son tejido más joven que el tallo por lo que es más fácil la obtención de callo, así como su duplicación, que en el caso del explante de hoja fue de 5.7 días, mientras que el del tallo fue de 8.93 días, retardando el crecimiento durante casi 3 días, corroborando la efectividad del tratamiento por el índice de crecimiento (hoja 16.71, tallo 12.14) donde solamente el cambio fue el del explante, como se había mencionado antes, la hoja por la edad y exposición de heridas al medio resultó ser el mejor explante para la producción de callo en *P. sacharosa*. Dejando así estos resultados la base para próximos

estudios donde se puedan realizar los subcultivos en los días de duplicación para así optimizar el cultivo de callo.

Cromatografía en capa fina

Debido al lento crecimiento tanto de las plántulas como del callo de *P. lychnidiflora*, no se realizaron extractos y no se pudieron analizar, por lo que se procedió a tomar la especie de *P. aculeata* que es una de las especies más estudiadas y que ha demostrado tener actividad antioxidante (Pinto *et al*, 2012) que en parte se atribuye a los compuestos fenólicos que podría poseer y así presentarla como testigo y para hacer comparaciones. Se realizó una separación por cromatografía en capa fina de los extractos de la hoja y tallo de *P. aculeata* y en la hoja de *P. sacharosa* donde se observó la presencia de una mancha con el Rf similar al de la referencia β -sitosterol (0.5). En un estudio realizado por Sutar *et al* (2014) donde identificaron β -sitosterol en *Holoptelea integrifolia*, el factor de retención del compuesto fue de 0.38 con una fase móvil de tolueno: acetato de etilo: ácido acético glacial en 8:2:0.2 (v/v). El β -sitosterol es el principal fitosterol encontrado en plantas que puede tener el potencial para prevenir y tratar el cáncer. El mecanismo de acción exacto del β -sitosterol es desconocido, pero puede estar relacionado con el metabolismo del colesterol o con efectos anti inflamatorios (vía interferencia del metabolismo de la prostaglandina). Una dieta basada en alimentos vegetales modifica la concentración sérica de β -sitosterol en mujeres posmenopáusicas hiperandrogénicas, este descubrimiento indica que puede ser usado como biomarcador en estudios observacionales sobre la prevención del cáncer. Induce la apoptosis y activa la vía de las caspasas en células de cáncer de mama (PubChem, 2017). Todos estos descubrimientos y posibles aplicaciones hacen que sea de gran importancia el estudio de la presencia de este compuesto en estas plantas con potencial terapéutico.

El revelado para alcaloides dio negativo para estos extractos. Abrego y Sorto (2007) realizaron pruebas fitoquímicas preliminares en el extracto de acetato de etilo de las hojas de *P. autumnalis*, dando negativo también para la presencia de

alcaloides, lo que puede sugerir que en este género no se han encontrado estos metabolitos.

El ácido ursólico se utilizó como referencia ($R_f=0.4$), del cual se reporta actividad antioxidante y antitumoral además de haber sido aislado de muchos tipos de plantas medicinales (PubChem b, 2017). Por lo que son importantes las manchas observadas con el R_f muy cercano al del ácido ursólico, en los extractos metanólicos de hoja de *P. aculeata* y *P. sacharosa*, por ejemplo también es posible observar dentro de los mismos carriles manchas con R_f s mayores, pero con la coloración que corresponde al revelado, lo que indica presencia de otro tipo de terpenos además de los que se parecerían al ácido ursólico, por las diversas actividades que se le adjudican a los terpenos es el interés en identificar algunos de estos compuestos, entre las que están, amebicida, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, hipocolesterolmiante, antioxidante, de prevención de degeneración macular y de enfermedades cardiovasculares (Lanhers *et al*, 1992. Brett *et al*, 2012. Cheng-Yu *et al*, 2010. Quesada *et al*, 2011).

Con la misma fase móvil, se procedió a hacer el revelado para flavonoides, dando como resultado las fluorescencias de color amarillo y naranja en los puntos de aplicación o cerca de ellos (figura 16), principalmente en los extractos de hoja de *P. sacharosa* y *P. aculeata*, por lo que se decidió hacer una CCF de fase reversa, para tratar de separar estos compuestos. Dando como resultado la figura 17, donde se observan bandas con el mismo R_f de las referencias mezcla de flavonas y apigenina. Abdul-Wahab *et al* (2012) aislaron vitexina y el glucósido de β -sitosterol de los extractos de acetato de etilo y diclorometano respectivamente de hojas de *P. bleo*, por lo que la presencia de estas manchas en las placas nos da un indicio de la posible presencia de compuestos similares a la vitexina o que correspondan a flavonas en forma general.

Se realizó un revelado con sulfato cérico para la fase móvil de diclorometano:metanol (85:15), donde se observaron en el punto de aplicación manchas muy pronunciadas y dos bandas al final para cada extracto (figura 18). Se prosiguió a realizar una fase reversa para una separación más pronunciada

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(figura 19), dando como resultado la aparición de varias manchas que indican la presencia de triterpenos glicosilados por la coloración morada, unas manchas de coloración amarilla que corresponderían a flavonoides y además en el final de la placa con un $R_f=1$ compuestos más polares y en color verde para mono, di o polisacáridos, ha sido reportada la presencia del ácido oleanólico, un triterpeno en *P. grandifolia* por Sahu *et al* (1974), lo que se puede comparar con los resultados obtenidos en estas placas, mostrando la posible presencia de compuestos de este tipo dentro de los extractos analizados.

Cromatografía líquida de alta resolución

Como se puede observar en la figura 20, los cromatogramas muestran la presencia de compuestos del tipo de flavonoides, siendo más evidente la presencia de estos en las hojas de *P. sacharosa* y *P. aculeata*, en el tiempo de retención 10.5 min se observó la presencia de un pico, que al comparar el espectro de absorción con lo reportado en la literatura se propone que es luteolina 7-O-glucosido, como se puede observar en la figura 21 (Mabry *et al*, 1970), este compuesto en particular dentro de algunas propiedades que se le han encontrado, podemos destacar un efecto hipoglucémico en ratas (Azevedo *et al*, 2010). Otro aspecto importante de mencionar es que la presencia de flavonoides es favorable, ya que estos compuestos son capaces de suprimir la formación de radicales libres por enlace con iones de metales pesados, los cuales catalizan muchos procesos conllevando a la aparición de radicales libres, dentro de sus acciones farmacológicas podemos destacar, dependiendo de ciertas características de su molécula, su actividad sobre el sistema circulatorio, que conduce a una disminución de la fragilidad capilar y previene la formación de varicosidades mejorando la circulación periférica, lo cual es la primera manifestación en los procesos inflamatorios, además de que presentan actividad hepatoprotectora, anticancerígena, antiviral etc. (Kumar & Pandey, 2013).

En la figura 21, se encontraron en los cromatogramas (17-21 min), compuestos que presumiblemente se trate de terpenos, como se observa en la figura 24 el pico más alto de *P. sacharosa*, que aparece entre los minutos 17 y 18, pudiera

corresponder a un compuesto similar al ácido corosólico (triterpeno) (Vijaykumar K. et al, 2012), ya que sus espectros son muy parecidos. De ser así esto sería favorable, ya que en muchas investigaciones se ha comprobado que este compuesto presenta propiedades benéficas para la salud, que van desde agente hepatoprotector, además de potenciar el efecto en tratamientos de cáncer, ya que es un agente pro-apoptótico (Guo et al, 2016; Xu et al, 2017). Como se mencionó anteriormente, no se puede asegurar que se esté tratando de los compuestos antes mencionados, pero en este caso el HPLC nos da una idea de la naturaleza química de los compuestos que componen *P. sacharosa*, lo cual es un parteaguas importante, ya que de esta planta se tienen escasos estudios, marcando la base para posteriores investigaciones, donde se realice una caracterización exhaustiva, que nos permita dilucidar posibles compuestos biológicos con potencial terapéutico, que nos indiquen alcances reales de esta planta y dirigirla como una posible opción para prevención de enfermedades o en su defecto para tratamientos de las mismas.

Fenoles totales y actividad antioxidante

Debido al lento crecimiento que presentó *P. lychnidiflora* se procedió a trabajar con un control positivo (*P. aculeata*), que es una especie que ha sido estudiada y presenta actividad antioxidante (Pinto et al, 2012), es por esta razón que aparecen resultados de *P. aculeata*. En un estudio realizado por Hassanbaglou et al (2012) analizaron la actividad antioxidante de extractos de hojas de *Pesreskia bleo* (Cacataceae), encontrando que dependiendo del solvente con el cual se realizaba el extracto, la actividad antioxidante variaba, en el caso de la prueba ante el radical DPPH encontraron que el extracto etanólico fue el que mayor actividad de este tipo dio, para el caso del ensayo de FRAP, que es una prueba que mide la habilidad de las muestras de reducir el ion férrico a la forma ferrosa, encontraron que el extracto de etil acetato fue el que mayor actividad antioxidante dio, para el caso de extractos etanólicos y metanólicos fueron los que menor actividad dieron, comparado con los resultados antes mencionados, de estos últimos para la prueba del DPPH el extracto etanólico fue el que mayor

actividad presentó con respecto al metanólico. Como se menciona en la metodología, se determinó la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides, y la actividad antioxidante por el método DPPH, de extractos metanólicos de hoja y tallo de *Pereskia sacharosa*, *P. aculeata*, encontrando con respecto a los compuestos fenólicos, que no existe diferencia significativa en los extractos metanólicos de la hoja de *P. sacharosa* de invernadero y la propagada *in vitro*, siendo un resultado importante, ya que al realizar este paso (micropropagación *in vitro*) la concentración de compuestos fenólicos permanece igual, es decir no se presenta diferencia estadísticamente significativa, con respecto a la especie de invernadero (25.99 y 26.41 mg eq de AG/ g de extracto respectivamente) , ya que uno de los problemas que se presenta al momento de propagar especies vegetales, es que las plantas en cuestión, pierden sus características originales y con esto compuestos bioactivos con potencial terapéutico (de la Rosa-Carrillo *et al*, 2012). En el caso de extractos metanólicos de tallos de *P. sacharosa* fueron los que menor concentración de fenoles dieron (7.62 mg eq de AG/ g de extracto), finalmente para *P. aculeata*, para esta misma prueba presentó 16.44 mg eq de ácido ascórbico/g de extracto, teniendo mayor concentración que los extractos de tallo, pero menor concentración que los extractos de hojas de *P. sacharosa*, por lo cual se puede decir que los extractos metanólicos de hoja de esta última especie contienen mayor concentración de compuestos fenólicos.

En el caso flavonoides, Sandhar *et al* (2011), mencionan que son polifenoles ampliamente distribuidos en las plantas, con gran poder antioxidante contra radicales libres, dicha actividad es atribuida a la habilidad que estos tienen de donar átomos de hidrogeno. Los resultados con respecto a flavonoides muestran (Cuadro 9) que el extracto metanólico de *P. aculeata*, fue el que mayor concentración de este tipo de metabolitos presentó, seguido del extracto de hoja de *P. sacharosa* (de invernadero e *in vitro*), 235.33 y 222.33 mg eq de quercetina/g de extracto respectivamente, y por último y al igual que en los compuestos fenólicos el extracto metanólico de tallo de *P. sacharosa* (39.67 mg eq de quercetina/g de extracto), un aspecto importante de resaltar, en el caso

de los extractos metanólicos de *P. sacharosa*, es que a pesar de no ser los extractos con mayor concentración de flavonoides, entre estos no se presentó diferencia estadísticamente significativa, por lo que al igual que los compuestos fenólicos la propagación *in vitro* no altera la concentración de compuestos bioactivos, como es el caso de los flavonoides. En el caso del callo T₁ y T₃ (4 y 24.33 mg eq de quercetina/g de extracto), fueron los que presentaron menor concentración de flavonoides, por lo cual se puede decir que, bajo el método utilizado en la presente investigación, esta no favorece la concentración de flavonoides ni de compuestos fenólicos en callo.

Finalmente para las pruebas de capacidad antioxidante con el radical DPPH, se puede observar en el cuadro 9 que la hoja de *P. sacharosa* (92.06 mg eq de ácido ascórbico/g de extracto) fue la que mayor actividad presentó, seguida de la hoja de *P. sacharosa in vitro* (52.945 mg eq de ácido ascórbico/g de extracto) y finalmente la hoja de *P. aculeata* (3.06 mg eq de ácido ascórbico/g de extracto), en el caso de callo con los tratamientos 1 y 3, no presentó actividad de este tipo, en términos generales se puede decir que existe una relación en donde a mayor concentración de compuestos fenólicos, mayor actividad antioxidante ante el radical DPPH, todo esto bajo las condiciones en las que se desarrolló esta investigación. Más no se puede decir lo mismo para flavonoides ya que como se puede observar en el cuadro 9, *P. aculeata* (566.67 mg eq de quercetina/g de extracto) fue la que presentó mayor concentración, sin embargo, esto no se vio reflejado en la capacidad antioxidante por este método (DPPH), ya que como se mencionó anteriormente las hojas de *P. sacharosa* presentaron menor concentración de flavonoides, pero mayor actividad antiradical.

9. Conclusiones

- Se obtuvo un porcentaje de germinación del 91% para las semillas de *P. lychnidiflora*.
- El mejor medio de cultivo para la propagación *in vitro* de *P. sacharosa* fue el adicionado con CA (1g L^{-1}) y BA (2mg L^{-1}). Para *P. lychnidiflora* el mejor medio de cultivo fue el adicionado con CA (1g L^{-1}).
- Se logró la inducción de tejido calloso friable y de colores entre verde y amarillo para *P. sacharosa*, en ambos explantes, hoja y tallo, en un medio adicionado con TDZ (0.5mg L^{-1}) y ANA (2mg L^{-1}).
- El uso de Picloram (2.41mg L^{-1}) dio resultado negativo para la formación de callo tanto en *P. sacharosa* como en *P. lychnidiflora*.
- La hoja de *P. sacharosa* como explante para la producción de tejido calloso presenta la mayor velocidad de crecimiento, así como mayor índice de crecimiento y menor tiempo de duplicación.
- El análisis para extractos de *P. lychnidiflora* no pudo ser realizado debido al lento crecimiento y como consecuencia el escaso material vegetal con que se contaba.
- Por la CCF se lograron identificar grupos de compuestos dentro de los terpenos (saponinas) y los flavonoides (flavonas) en los extractos de hoja de *P. sacharosa* y *P. aculeata*.
- Se desarrolló una metodología en CLAR para separar flavonoides tipo flavonas y terpenos en los extractos de hoja de *P. sacharosa* y *P. aculeata*.
- Los extractos de hoja de *P. sacharosa* de invernadero e *in vitro*, fueron los que presentaron una mayor cantidad de compuestos fenólicos (26.41 ± 0.18 y 25.99 ± 0.27 mg eq. de ácido gálico/g de extracto respectivamente) sin que hubiese diferencia estadísticamente significativa.
- En cuanto a la actividad antioxidante, *P. sacharosa* de invernadero e *in vitro* fueron los extractos con una respuesta mayor frente al radical DPPH (92.06 ± 1.55 y 52.94 ± 5.55 mg eq. de ácido ascórbico/g de extracto respectivamente).

10. Glosario

A

Actividad antioxidante. Capacidad de algunas moléculas para atrapar radicales libres que causan oxidación en un sistema.

Adsorbente. Es un sólido que tiene la capacidad de retener sobre su superficie un componente presente en corrientes líquidas o gaseosas.

Adventicio. Que se desarrolla fuera de su lugar habitual.

Auxina. Grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal. Esencialmente provocan la elongación de las células.

Axilar. De la axila o relacionado con esta parte de las plantas, yema axilar, raíz axilar, flor axilar, etc.

B

Biomasa. Materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los residuos y desechos orgánicos, susceptible de ser aprovechada energéticamente. Las plantas transforman la energía radiante del sol en energía química a través de la fotosíntesis, y parte de esta energía queda almacenada en forma de materia orgánica.

Biotecnología vegetal. Aplicación de la ciencia y la tecnología a las plantas, sus partes, productos y modelos, con el fin de alterar materiales vivos o inertes para el desarrollo de conocimiento, bienes y servicios.

C

Cactáceas. Familia de plantas suculentas y, en gran mayoría, espinosas, conocidas en conjunto como cactus o cactus. Esta familia es originaria de América.

Citocinina. Grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular.

Cotiledón. Hoja primera que, sola o junto a otra u otras, se forma en el embrión de una planta fanerógama, modificada especialmente y que en algunos casos acumula sustancias de reserva.

Cromatografía. Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente; está basado en la diferente velocidad con la que se mueve cada fluido a través de una sustancia porosa.

D

Diferenciación celular. Proceso por el cual las células de un linaje celular concreto sufren modificaciones en su expresión génica, para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de tipos celulares del organismo.

E

Elongación celular. La expansión celular es un proceso polarizado, es decir, las células se expanden siguiendo una dirección predeterminada.

Embriogénesis. La embriogénesis en plantas es el conjunto de procesos fisiológicos que conducen a la transformación de una sola célula, el cigoto, en un individuo multicelular más complejo, contenido en la semilla madura.

Explanete. Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento.

Extracto. Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.

E

Farmacológico. Tratamiento con cualquier sustancia, diferente de los alimentos, que se usa para prevenir, diagnosticar, tratar o aliviar los síntomas de una enfermedad o un estado anormal.

Fitoquímicos. Sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida (por lo menos a corto plazo), pero tienen efectos positivos en la salud. Se encuentran naturalmente en las plantas.

Friable. Propiedad de un material que lo hace fácilmente rompible, desmenuzable.

G

Género. Categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie; así, un género es un grupo de organismos que a su vez puede dividirse en varias especies.

H

Hipocotilo. Tras la salida de la radícula, el hipocotilo emerge elevando el ápice de la plántula (y normalmente también la envoltura de la semilla) sobre el nivel del suelo, llevando las hojas embrionarias (llamadas "cotiledones") y la "plúmula", que da origen a las primeras hojas verdaderas.

I

***in vitro*.** Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

M

Macronutrientes. Se caracterizan por sus concentraciones superiores al 0.1% de la materia seca. Los tres elementos que se encuentran en mayor concentración son el carbono, el hidrógeno y oxígeno; los cuales se toman del agua y de la atmósfera. El nitrógeno, fósforo y potasio son llamados macronutrientes primarios y es muy frecuente fertilizar con esos nutrientes. Los macronutrientes secundarios son calcio, magnesio y azufre.

Medio de cultivo. Técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

Metabolismo. Conjunto de los cambios químicos y biológicos que se producen continuamente en las células vivas de un organismo.

Metabolito secundario. Compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo.

Micronutrientes. No sobrepasan el 0.01% de la materia seca. Son el cloro, hierro, boro, manganeso, zinc, cobre y níquel. Todos los mencionados cumplen en todas las especies vegetales con criterios de esencialidad. Existen otros elementos benéficos que pueden ser esenciales para algunos cultivos; tales como el sodio, silicio o cobalto.

Mucílago. Tipo de fibra soluble de naturaleza viscosa. Lo producen las semillas de ciertas plantas y cumplen diferentes funciones.

O

Oxidación. Reacción química a partir de la cual un átomo, ión o molécula cede electrones.

P

Polifenoles. Grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula.

Polimerización. Proceso mediante el cual las moléculas simples, iguales o diferentes, reaccionan entre sí por adición o condensación y forman otras moléculas de peso doble, triple, etc.

R

Radical libre. Especie química (orgánica o inorgánica), caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados.

Regulador de crecimiento vegetal. Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas. Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta y aquellas de origen sintético.

S

Sistema biológico. Sistema natural que posee vida o que forma parte de un ser viviente.

I

Taxonomía. Es la ciencia en la que se clasifican los organismos y se establecen parámetros de diferencia, creando familias, ramas y conjuntos de razas.

Tejido calloso. Es una masa de células no diferenciadas. En las plantas las células del callo son aquellas que cubren una herida.

11. Bibliografía

- Abdul-Wahab I.R., Guilhon C.C., Fernandes P.D. & Boylan F. (2012). Antinociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth (Cactaceae) leaves extracts. *J Ethnopharmacol.* 144:741–746
- Abrego A. L. & Sorto E. (2007). Comprobación de la actividad antifúngica del extracto de la especie *Pereskia autumnalis* (Matial) en el hongo *Aspergillus niger* (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Agostini-Costa T.S., Wondracek D.C., Rocha W.S. & Silva D.B. (2012). Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Rev Bras Frutic* 34(1):234–238
- Anderson E. F. (2001). *The Cactus Family*. EE. UU.: Timber Press, Inc.
- Azevedo M., Camsari C., Sá C., Lima C. Fernandes M. & Pereira C. (2010). Ursolic Acid and Luteolin-7-Glucoside Improve Lipid Profiles and Increase Liver Glycogen Content through Glycogen Synthase Kinase-3. *Phytother. Res.* 24: 220–224. DOI: 10.1002/ptr.3118
- Azofeifa A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175
- Barrueto I. & Zimmermann M. (2006). A contaminação *in vitro* de plantas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. ISSN 1676 – 1340. 1-18
- Bhojwani S.S. & Dantu P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer
- Biswas M., Das S. S. & Dey S. (2013). Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant. *Food Sci. Biotechnol.* 22(S):1-8. DOI 10.1007/s10068-013-0041-9
- Bravo-Hollis H. (1937). *Las cactáceas de México Vol. I*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Brett J. W., Palmer S. K., Deng S. & Palu A. K. (2012). Antimicrobial Activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. *Current Research J Biol Sc.* 4: 52-54
- Cheng-Yu T., Yue-Hwa C., Yi-Wen C., Wen-Hsuan H. & Shyh-Hsiang L. (2010) Effect of soy saponin on the growth of human colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* 16: 3371–3376

- 📖 Cheung L. M., Cheung P. C. K. & Ooi V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 81: 249-255
- 📖 Cites.org. (2017). CITES. [online] Available at: <https://cites.org/> [Accessed 13 Jun. 2017]
- 📖 De Aguiar D., Da Silva M., Ribeiro S., Costa de Carvalho K. & Albarello N. (2015). Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) J of Plant Biotech*, 1, 1-10.
- 📖 De Castro N. & Scio E. (2014). The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)—A Review. *Plant Foods Hum Nutr*, 69, 189-195.
- 📖 De la Rosa-Carrillo M. L., Domínguez-Rosales M. S., Pérez-Reyes M. E. & Pérez-Molphe-Balch E. (2012). Cultivo y propagación in vitro de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia*. 47:114-120
- 📖 Dillard C. J. & German J. B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric*. 80: 1744-1756.
- 📖 Fonnegra R. & Jiménez S. L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- 📖 George E.F., Hall M.A. & Jan De Klerk G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- 📖 Godoy-Hernández G. & Vázquez-Flota F. A. (2006). Growth Measurements. En *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 51-58). EE. UU.: Humana Press Inc.
- 📖 Grotewold E. (2006). *The Science of Flavonoids*. USA: Springer.
- 📖 Guo X., Cui R., Zhao J., Peng., y Yan M. (2016). Corosolic acid protects hepatocytes against ethanol-induced damage by modulating mitogen-activated protein kinases and activating autophagy. *European Journal of Pharmacology*. 791;578–588. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.031>
- 📖 Guzmán U., Arias S. & Dávila P. (2007). Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM/CONABIO. 203
- 📖 Haslam E. & Cai Y. (1994). Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep*. 11:41-65

- 📖 Hassanbaglou B., Hamid A. A., Royeeyati A. M., Saleh N. M., Abdulamir A. S., Khatib A. & Sabu M. C. (2012). Antioxidant activity of different extracts from leaves of *Pereskia bleo* (Cactaceae). *J Med Plants Res* 6(15):2932–2937. doi:10.5897/JMPR11.760
- 📖 Heim K. E., Tagliaferro A. R. & Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10):572-584. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- 📖 Jun H., Cha M., Yang E., Choi D. G. & Kim Y. (2013). Physicochemical properties and Antioxidant Activity of Korean Cactus (*Opuntia humifusa*) cladodes. *Hort Environ Biotechnol*. 54(3):288-295.
- 📖 Kumar S. & Pandey A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 1-16. Pages. doi.org/10.1155/2013/162750.
- 📖 Lanhers M. C., Fleurentin J., Mortier F., Vinche A. & Younos C. (1992). Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Plant Med*. 58: 117–123.
- 📖 Llamoca-Zárate R. M., Studart-Guimarães C., Landsmann J. & Campos F. A. P. (1999) Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 58:155–157
- 📖 Loyola-Vargas V. M. & Vázquez-Flota F. (2006). Callus and Suspension Culture Induction, Maintenance and Characterization. En *Plant Cell Culture Protocols* (p. 60). EE. UU.: Humana Press Inc.
- 📖 Mabry T. J., Markham K. R. & Thomas M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York, EE. UU. Springer-Verlag
- 📖 Malek S. N. A., Shin S. K., Wahab N. A. & Yaacob H. (2009). Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. *Molecules* 14:1713–1724
- 📖 Malek S. N. A., Wahab N. A., Yaacob H., Shin S. K., Lai H. S., Serm L. G. & Rahman S. N. S. A. (2008). Cytotoxic activity of *Pereskia bleo* (cactaceae) against selected human cell lines. *Int J Canc Res*. 4(1):20–27

- Mayolo-Deloisa D., Martínez L. M. & Rito-Palomares M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(3):415-429
- Neumann K. H., Imani J. & Kumar A. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology*. Giessen, Germany: Springer-Verlag
- Nurestri A. M. S., Sim K. S. & Norhanom A. W. (2009). Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw (Cactaceae) leaves. *J Biol Sci*. 9(5):488–493
- Pedroza-Manrique J. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones *in vitro*. *Rev.Colomb.Biotecnol*. 11, (1): 17-32
- Pereira J., Rodrigues E., Monteiro M. & Ramalho E. (2011). *In vitro* germination and disinfestation of sweet cactus (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). *Maringá*, 33, 3: 509-512
- Pérez-Molphe-Balch E., Santos-Díaz M. S., Ramírez-Malagón R. & Ochoa-Alejo N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*. 72: 540-561. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012>
- Pinto N.C.C., Santos R.C., Machado D.C., Florêncio J.R., Fagundes E.M.Z., Antinarelli L.M.R., Coimbra E.S., Ribeiro A. & Scio E. (2012) Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. *Pharmacologyonline* 3:63–69, ISSN:1827–8620
- PubChem b. (2017). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ursolic_acid#section=Top
- PubChem. (2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-sitosterol#section=Top>
- Quesada S., Azofeifa G., Jatunov S., Jimenez G., Navarro L. & Gomez G. (2011). Carotenoids composition, antioxidant activity and glycemic index of two varieties of *Bactris gasipaes*. *Emir J Food Agric*. 23: 482-489

- Quiroga R., Meneses L. & Bussmann R.W. (2012). Medicinal ethnobotany in Huacareta (Chuquisaca, Bolivia). *J Ethno and Ethnomed*, 8, 29. doi:10.1186/1746-4269-8-29
- Rubinson K. A. & Robinson J. F. (2004) Análisis Instrumental. Prentice Hall. España.
- Sahu N. P., Banerji N & Chakravarti R. N. (1974). A new saponin of oleanolic acid from *Pereskia Grandifolia*. *Phytochemicals Reports*. 13:529-230
- Salt T. A., Tocker J. E. & Adler J. H. (1987). Dominance of Δ^5 -sterols in eight species of the Cactaceae. *Phytochem*. 26:731–733
- Sandhar H., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M. & Sharma P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1 (1): 25-41
- Santos M., Segura M. & Núñez C. E. (2010). Análisis de crecimiento y relación fuente-demanda de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Rev. Fac. Nal. Arg. Medellín*. 63(1):5253-5266
- Shedbalkar U., Adki V., Jadhav J. & Bapat V. (2010). *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biol*. 3: 136-150.
- Shetty A. A., Rana M. K. & Preetham S. P. (2011). Cactus: a medicinal food. *J Food Sci Technol*. 49(5):530-536. DOI 10.1007/s13197-011-0462-5
- Sim K. S., Nurestri A. M. S. & Norhanom A. W. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. *Pharmacogn Mag*. 6(23):248–254
- Sutar R. C., Kasture S. B. & Kalaichelvan V. K. (2014). Identification, quantification and validation of β -sitosterol from *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) planch using High Performance Thin Layer Chromatography Method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(5): 249-252
- Vermerris W. & Nicholson R. (2008). Phenolic Compound Biochemistry. USA: Springer.
- Vijaykumar K., Murthy P. B., Kannababu S., Syamasundar B. & Subbaraju G. V. (2012). Quantitative Determination of Corosolic acid in *Lagerstroemia Speciosa*

Leaves, Extracts and Dosage Forms. Mayo 16, 2016 de Staherb Natural Ingredients. Sitio web: <http://www.staherb.com/en/shownews.asp?newid=164>

- 📖 Voet D., Voet J. G. & Pratt C. W. (2007). *Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular*. Buenos Aires: Panamericana.
- 📖 Wahab S. I. A., Abdul A. B., Mohan S. M., Al-Zubairi A. S., Elhassan M. M. & Ibrahim M. Y. (2009). Biological activities of *Pereskia bleo* extracts. *Int Pharm.* 5(1):71–75
- 📖 Xu Y., Zhao Y., Guan Y., Zhang X., Chen Y., Wu Q., Zhu G., Chen Y., Sun F., Wang J., y Yu Y. (2017). Blocking inhibition to YAP by Actinomycin D enhances anti-tumor efficacy of Corosolic acid in treating liver cancer. *Cellular Signalling* 29; 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.11.001>
- 📖 Yen K. P., Abdullah M. S. B., Syafri S., Raju S. K. & Yahya C. A. H. C. (2013). A preliminary survey on the medicinal uses and effectiveness of *Pereskia bleo* used by people of three villages in the State of Kelantan, Malaysia. *Int J Herb Med.* 1(3):1–4, ISSN:2321–2187