



### CULTIVO DE BROTES DE *Castilleja tenuiflora* BENTH. EN UN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL: ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Raúl Valdez Tapia, 2010

#### RESUMEN

*Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae antes Scrophulariaceae), “hierba del cáncer” es una planta silvestre que produce iridoideas, compuestos fenólicos y flavonoides, con actividad citotóxica, inmunoestimulante y antioxidante. Se han implementado sistemas de cultivo para la multiplicación *in vitro* de los brotes de esta especie en medio de cultivo semisólido (convencional) y en inmersión permanente (CIP) obteniendo índices de multiplicación (IMB) de 2-4 y de 7-9 brotes/explante, respectivamente. Sin embargo, en CIP se presentó vitrificación. El objetivo de este trabajo fue implementar el cultivo de brotes de *C. tenuiflora* en un biorreactor de inmersión temporal y evaluar la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante. Se definió un medio de cultivo (MCmod) para la multiplicación de los brotes de *C. tenuiflora* a partir de un diseño ortogonal L9 Taguchi considerando las siguientes factores: A) relación nitrato:amonio; B) concentración de sacarosa; C) tiazurón y D) espermina, observándose que la mejor combinación fue nitrato:amonio 24:1, 45 g/L de sacarosa y 5  $\mu$ M de espermina. Posteriormente, se evaluó la influencia de la duración (5 y 30 min) y la frecuencia de inmersión (3 y 24 h) en el IMB y las características de los brotes utilizando medio B5 sin fitorreguladores. Tanto la duración como la frecuencia de inmersión tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en el IMB. En la condición RII (5 min de inmersión cada 24 h) se obtuvo un IMB de 6 brotes/explante, no se presentó vitrificación y todos los brotes formaron raíz. En estas condiciones de operación se probó el medio MCmod, lográndose un IMB de 10 brotes/explante. Los brotes obtenidos por cultivo en inmersión temporal presentaron una supervivencia del 100% al transferirlos a sustrato sólido. Por otro lado, brotes desarrollados en RIV (30 min de inmersión cada 24 h) presentaron el mayor contenido de fenoles totales ( $86.10 \pm 4.19$  mg Equivalentes de Ácido Gálico/g extracto) y flavonoides ( $120.86 \pm 11.74$  mg Equivalentes de Catequina/g de extracto) lo cual coincidió con la mayor actividad antioxidante contra ABTS ( $476.99 \pm 15.11$   $\mu$ moles Trolox/g extracto). Sin embargo, la mayor actividad contra DPPH ( $288.99 \pm 43.99$   $\mu$ moles Trolox/g extracto) se obtuvo en RII y el mayor poder reductor en RI (5 min de inmersión cada 3 h) presentaron el mayor poder reductor ( $1042.24 \pm 33.81$   $\mu$ moles Trolox/g extracto). Con la implementación del sistema de inmersión temporal se estableció una metodología eficiente para la micropropagación *in vitro* de *C. tenuiflora*.



### CULTIVO DE BROTES DE *Castilleja tenuiflora* BENTH. EN UN BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL: ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDEOS Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Raúl Valdez Tapia, 2010

#### ABSTRACT

*Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae before Scrophulariaceae), “hierba del cáncer” is a wild plant that produces iridoids, phenolic compounds and flavonoids, with cytotoxic, immunostimulant, and antioxidant activities. *In vitro* shoot multiplication of this species has been achieved by culture in semisolid medium (conventional) and in permanent immersion in liquid medium (PIC); shoot multiplication rates (SMR) are 2-4 and 7-9 shoots/explant, respectively. However, in PIC vitrification has been observed. The objective of this work was to establish shoots culture of *C. tenuiflora* in a temporary immersion bioreactor and to evaluate the concentration of phenolic compounds, flavonoids and its antioxidant activity. Culture medium (MCmod) for *C. tenuiflora* shoot multiplication was defined using a Taguchi orthogonal design L9 considering the following factors: A) nitrate:ammonium ratio; B) concentration of sucrose; C) thidiazuron and D) spermine. The best combination was nitrate:ammonium 24:1, 45 g/L sucrose and 5  $\mu$ M of spermine. Subsequently, the influence of immersion time (5 and 30 min) and frequency (3 and 24 h) on SMR and shoots characteristics was evaluated. Both, immersion time and frequency had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on SMR. In condition RII (5 min of immersion every 24 h) a SMR of 6 shoots/explant was obtained; vitrification was not observed and all the shoots formed roots. In these operating conditions, MCmod was tested achieving a SMR of 10 shoots/explant. The shoots obtained by temporary immersion culture showed a 100% survival when transferred to solid substrate. Shoots developed in RIV (30 min immersion every 24 h) presented the highest total phenolics content, which coincided with the highest antioxidant activity against ABTS ( $476.99 \pm 15.11$   $\mu$ moles Trolox/g extract). However, the highest activity against DPPH ( $288.99 \pm 43.99$   $\mu$ moles Trolox/g extract) was obtained in shoots from RII and the highest reducing power in RI (5 min immersion every 3 h,  $1042.24 \pm 33.81$   $\mu$ mol Trolox/g extract). Culture in temporary immersion represents a reliable and efficient methodology for *in vitro* micropropagation of *C. tenuiflora*.