



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**“ Estudio de la acumulación de  
compuestos fenólicos y otros  
eventos bioquímicos relacionados  
con la respuesta al suministro de luz  
y nitrato en plantas de  
*Cecropia peltata* ”**

T E S I S

para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

**M. en C. Alejandro Mora Izquierdo**

D I R E C T O R

**Dr. Francisco Cruz Sosa**

C O - D I R E C T O R A

**Dra. María del Pilar Nicasio Torres**

Departamento de Biotecnología



Mayo 2011

México D.F. a 02 de Mayo del 2011

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Estudio de la acumulación de compuestos fenólicos  
y otros eventos bioquímicos relacionados con la respuesta  
al suministro de luz y nitrato en plantas de *Cecropia peltata*”**

que presentó

M. en C. Alejandro Mora Izquierdo

**Comité Tutorial:**

**Director:** Dr. Francisco Cruz Sosa

**Co-Directora:** Dra. María del Pilar Nicasio Torres

**Asesora:** Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

**Jurado:**

**Presidente: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila** \_\_\_\_\_

**Secretario: Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez** \_\_\_\_\_

**Vocal: Dr. Juan Orozco Villafuerte** \_\_\_\_\_

**Vocal: Dr. Manasés González Cortazar** \_\_\_\_\_

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana  
está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT  
y además cuenta con apoyo del mismo Consejo”**

**El M. en C. Alejandro Mora Izquierdo recibió la beca de CONACYT  
con número de registro 42514 y del IMSS con matrícula 99183755**

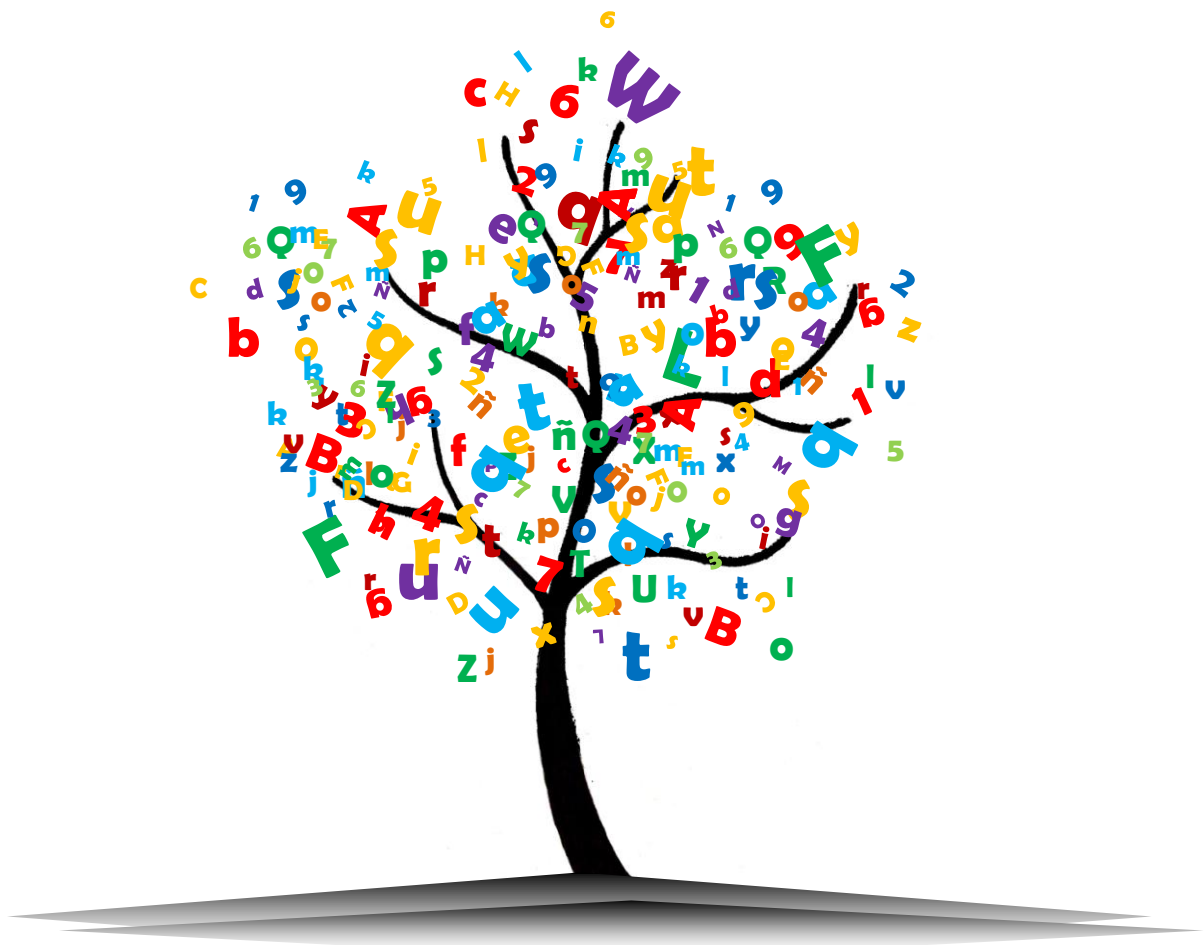
A mis padres que han sido el mayor ejemplo de dedicación, honestidad y amor.

A mis profesores por las enseñanzas y su paciencia para mi formación personal y profesional.

A mis compañeros de siempre, por los buenos momentos.

A mis familiares y amigos, gracias por su apoyo y su cariño.

Con todos ustedes comparto los logros de este trabajo.



# CONTENIDO

	Pag.
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCIÓN	4
II ANTECEDENTES	5
2.1 PLANTAS MEDICINALES	5
2.1.1 La herbolaria Mexicana en el tratamiento de diabetes mellitus	7
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Cecropia peltata</i>	8
2.3 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL GÉNERO <i>Cecropia</i>	9
2.3.1 Estudios en animales de experimentación	9
2.3.2 Estudios clínicos	12
2.3.3 Estudios toxicológicos	13
2.3.4 La propagación de guarumbo	13
2.4 PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS PLANTAS	14
2.4.1 Significado de estrés en plantas	15
2.4.2 La participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en la biosíntesis de metabolitos secundarios	15
2.4.3 Hipótesis del balance carbono-nutrientes (CNB) y la síntesis de metabolitos secundarios	18
2.4.4 La ruta metabólica de compuestos fenólicos	18
2.4.5 La disponibilidad de luz y nitrógeno como inductores de la biosíntesis de compuestos fenólicos	20

III	JUSTIFICACIÓN	22
IV	OBJETIVOS	23
	4.1 OBJETIVO GENERAL	23
	4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
V	MATERIALES Y MÉTODOS	24
	5.1 PLANTEAMIENTO GENERAL, TRES ETAPAS DE EXPERIMENTACIÓN	24
	<b>ETAPA A</b>	
	5.2 MATERIAL VEGETAL	24
	5.3 OBTENCIÓN DEL CULTIVO HIDROPÓNICO	25
	<b>ETAPA B</b>	
	5.4 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO	25
	5.5 COSECHA Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	26
	5.6 ANÁLISIS QUÍMICOS	27
	5.6.1 Obtención de extractos	27
	5.6.2 Cuantificación de fenólicos solubles totales (FT)	27
	5.6.3 Evaluación de la actividad antioxidante (AA)	27
	5.6.4 Cuantificación de ácido clorogénico (ACG) e isoorientina (ISO)	28
	5.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO-LIASA (PAL)	28
	5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	29
	<b>ETAPA C</b>	
	5.9 CINÉTICA EN PARTES AÉREAS: CRECIMIENTO Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS	29
	5.10 COSECHA Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	30
	5.11 ANÁLISIS QUÍMICOS	30
	5.11.1 Contenido de lignina total	30
	5.12 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	31
	5.12.1 Actividad de PAL	31
	5.12.2 Cuantificación de peróxido de hidrógeno	31
	5.12.3 Análisis de peroxidación de lípidos	31
	5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31

VI	RESULTADOS	32
	<b>ETAPA A</b>	
	6.1 OBTENCIÓN DEL CULTIVO HIDROPÓNICO DE <i>C. peltata</i>	32
	<b>ETAPA B</b>	
	6.2 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS	33
	6.3 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD DE PAL	36
	<b>ETAPA C</b>	
	6.4 CINÉTICA DE BIOMASA ACUMULADA EN PARTES AÉREAS	43
	6.5 CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS	44
	6.6 CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE FENÓLICOS Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAL	46
VII	DISCUSIÓN	49
	7.1 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO	49
	7.2 CINÉTICA DE PARÁMETROS DE RESPUESTA EN PARTES AÉREAS: CRECIMIENTO Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS	53
VIII	CONCLUSIONES	57
IX	PERSPECTIVAS	59
X	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
XI	PUBLICACION EN REVISTA INTERNACIONAL	69

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño experimental de dos factores: irradiancia y suministro de nitrato, a tres niveles cada uno. Los valores iniciales fueron muestreados como parámetros de referencia de las plantas en el día inicial (d0) y en el resto de los tratamientos al día 28 (d28).	26
Cuadro 2. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en el contenido de fenólicos solubles totales (FT), actividad antioxidante (AA), ácido clorogénico (ACG), y actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL), en partes aéreas de plantas de <i>Cecropia peltata</i> .	36
Cuadro 3. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en el contenido de fenólicos solubles totales (FT), actividad antioxidante (AA), ácido clorogénico (ACG), y actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL), en raíces de plantas de <i>Cecropia peltata</i> .	37
Cuadro 4. Resumen de los resultados de ANOVA para los parámetros evaluados de partes aéreas (Pa) y raíces (Ra) en plantas de <i>Cecropia peltata</i> debido al efecto combinado de dos factores: irradiancia y concentración de nitrato (I*N= interacción irradiancia-nitrato).	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de una planta de <i>C. peltata</i> en estado adulto aclimatada en el Estado de Morelos y su clasificación taxonómica.	8
Figura 2. Compuestos fenólicos con actividad hipoglucemiante más abundantes en plantas del género <i>Cecropia</i> .	11
Figura 3. Función de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el reconocimiento de diferentes señales ambientales (e.g. estrés) y activación de las respuestas en las células vegetales (Adaptado de Mittler et al. 2004).	16
Figura 4. Ruta biosintética condensada de los compuestos fenólicos.	19
Figura 5. Diagrama de obtención de los lotes experimentales de plantas de <i>C. peltata</i> en sistema hidropónico y condiciones controladas.	32
Figura 6. Características físicas de hojas y raíces de plantas de <i>Cecropia peltata</i> desarrolladas bajo dos condiciones de irradiancia y niveles de nitrato después de 28 días de cultivo.	33



Figura 7. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de masa seca en partes aéreas y raíces de plantas de <i>Cecropia peltata</i> cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).	34
Figura 8. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la relación-raíz-brote (RRB) en plantas de <i>Cecropia peltata</i> cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).	35
Figura 9. Relación entre la actividad antioxidante y los fenólicos solubles totales de extractos de partes aéreas (a) y raíces (b) de plantas de <i>Cecropia peltata</i> desarrolladas con diferentes irradiancias y concentraciones de nitrato.	39
Figura 10. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de fenólicos totales (FT) en partes aéreas y raíces de plantas de <i>Cecropia peltata</i> cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).	40
Figura 11. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de ácido clorogénico (ACG) en partes aéreas y raíces de plantas de <i>Cecropia peltata</i> cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).	41
Figura 12. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de extractos metanólicos de partes aéreas de plantas de <i>Cecropia peltata</i> desarrolladas en $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia y tres diferentes niveles de nitrato (13, 2 y 0.2 mM).	42
Figura 13. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de masa seca (MS) en partes aéreas de plantas de <i>C. peltata</i> , cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).	43
Figura 14. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (a) y malondialdehído (MDA) (b) en partes aéreas de plantas de <i>C. peltata</i> , cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).	45
Figura 15. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de fenólicos totales (a) y ácido clorogénico (b) en partes aéreas de plantas de <i>C. peltata</i> , cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).	47
Figura 16. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de lignina total (a) y actividad de la enzima PAL (b) en partes aéreas de plantas de <i>C. peltata</i> , cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).	48
Figura 17. Secuencia de eventos de respuesta a condiciones de estrés por alta irradiancia y/o deficiencia de nitrato en el modelo de cultivo hidropónico de <i>C. peltata</i> .	55

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	Actividad antioxidante
ACG	Ácido clorogénico
CNB	Carbon nutrient balance
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
d0	Día 0
d28	Día 28
eq	Equivalente
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FT	Fenólicos solubles totales
ISO	Isoorientina
MDA	Malondialdehído
MF	Masa fresca
MS	Masa seca
MeS	Metabolitos Secundarios
Pa	Parte aérea
PAL	Fenilalanina amonio-liasa
PCD	Programmed cell death
Ra	Raíz
RRB	Relación raíz-brote

## RESUMEN



*Cecropia peltata* es una especie vegetal conocida en México como “guarumbo” y es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus. En este trabajo, se desarrollaron plantas de *C. peltata* de 5 meses de edad, en un sistema de cultivo hidropónico bajo condiciones controladas. Diferentes intensidades de luz 20, 30 y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia y concentraciones de nitrato 13, 2 y 0.2 mM fueron aplicados durante 28 días para observar su efecto sobre la acumulación de biomasa y de compuestos fenólicos (ácido clorogénico e isoorientina).

Los resultados son acordes con las predicciones de la hipótesis del balance de carbono y nutrientes (CNB). La acumulación de biomasa en partes aéreas fue estimulada por la mayor irradiancia (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); de manera similar, en la mayor irradiancia en combinación con menor concentración de nitrato (0.2 mM), el crecimiento de la raíz fue estimulado (la relación raíz-brote aumentó 2-veces con respecto al control). Los contenidos de fenólicos totales (FT) y de ácido clorogénico (ACG) fueron superiores en partes aéreas que en raíces. Los mayores incrementos se obtuvieron en el follaje por la mayor irradiancia y menor concentración de nitrato, de 3.8-veces en FT y 7.7-veces en ACG con respecto a las plantas del control. Isoorientina (ISO) se acumuló en niveles muy bajos. La actividad antioxidante (AA) y el contenido FT mostraron una fuerte correlación positiva. En partes aéreas, la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) mostró incrementos significativos (2-veces) por la mayor irradiancia; sin embargo, su actividad no varió en las raíces por los diferentes tratamientos.

En una siguiente etapa, la evaluación de la intensidad de la luz en combinación con niveles de nitrato sobre el crecimiento y de algunos cambios bioquímicos con respecto al tiempo (cinéticas), se enfocó al análisis de partes aéreas empleando el modelo hidropónico de plantas de *C. peltata*. En condiciones de alta irradiancia y deficiencia de nitrato, se pudo caracterizar parcialmente la secuencia de los mecanismos de respuesta sobre los cuales impactan estos factores, así como su relación con el metabolismo de los compuestos fenólicos. El incremento de los niveles de ERO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) causó la oxidación de lípidos que se detectaron por incrementos de los niveles de malondialdehído (MDA). Por

otro lado, la enzima PAL es activada para la producción de FT, particularmente el ACG como mayoritario de la especie; el incremento de FT es parte de la respuesta de las células para evitar la progresión del daño oxidativo causado por el incremento de las ERO. Asimismo, la lignificación de la pared celular se relaciona con los cambios metabólicos de los fenólicos en condiciones de estrés.

El cultivo de guarumbo bajo condiciones controladas, es una alternativa viable para la obtención de material vegetal confiable, seguro y eficaz; además es un sistema útil para aumentar los rendimientos de biomasa y compuestos bioactivos que favorecerían la comercialización de esta especie medicinal. En el presente trabajo, por medio de la manipulación del suministro de luz y nitrato en plantas de *C. peltata* cultivadas en hidroponía, se favoreció el crecimiento y la acumulación de compuestos fenólicos sobre todo en condiciones de alta irradiancia y deficiencia de nitrato.

## ABSTRACT



*Cecropia peltata* is popularly known as “guarumbo” in Mexico and is used in traditional medicine for treatment of diabetes mellitus. In this work, *C. peltata* plants were cultivated in a hydroponic system under controlled conditions. Gradients of light 20, 30, and 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (irradiance) and nitrate concentrations 13, 2, and 0.2 mM, were applied over a 28-day period to estimate their effect on biomass allocation and accumulation of bioactive (chlorogenic acid and isoorientin) phenolic compounds.

According to Carbon Nutrient Balance (CNB) hypothesis predictions, biomass accumulation in foliage was stimulated by the highest irradiance (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); similarly, at highest irradiance in combination with lowest nitrate concentration (0.2 mM), root growth was stimulated (root-to-shoot ratio increased 2-fold with respect to the control). Total phenolics (TP) and chlorogenic acid (CGA) contents were higher in aerial

parts than in roots; highest contents were also obtained under high irradiance and nitrate deficiency, with a 3.8-fold increase in TP and a 7.7-fold increase in CGA in foliage with respect to the control plants. Isoorientin was accumulated at very low levels. Antioxidant activity and TP content showed a strong positive correlation. Phenylalanine ammonia-lyase activity (PAL) in aerial parts exhibited significant changes (>2-fold) by highest irradiance; however, PAL activity did not change in roots under the different treatments.

In the next step, the assessment of the irradiance in combination with levels of nitrate on the growth and biochemical changes with time (kinetics), focused on the analysis of aerial parts using the hydroponic model of *C. peltata* plants. Under conditions of highest irradiance and nitrate deficiency, it could partially characterize the sequence of response mechanisms which have an impact on these factors, as well as its relationship with the metabolism of the phenolic compounds. The increase in the levels of ERO ( $H_2O_2$ ) caused the oxidation of lipids that were detected by increases in the levels of malondialdehyde (MDA). On the other hand, the PAL enzyme is activated for the production of FT, particularly the ACG as the most abundant on the specie; the increase of FT is part of the response of cells to prevent the progression of the oxidative damage caused by the increase of the ERO. Also, the cell wall lignification is related to the metabolic changes of the phenolics under stress.

The cultivation of guarumbo under controlled conditions, is a viable alternative to obtain reliable, safe and effective plant material; It also is a useful system to increase the yields of biomass and bioactive compounds that would favour the marketing of this medicinal species. In this paper, through the manipulation of the supply of light and nitrate in plants of *C. peltata* grown in hydroponics, are favored growth and accumulation of phenolic compounds especially in conditions of high irradiance and nitrate deficiency.

# I INTRODUCCIÓN



La diabetes mellitus (DM) tipo 2 es una enfermedad crónica degenerativa que aparece cuando la insulina elaborada por el cuerpo no actúa de manera efectiva. Las complicaciones resultantes de la DM incluyen daño a los riñones y al corazón, ceguera, deficiencias en la circulación sanguínea e infecciones que pueden derivar en amputaciones de los miembros inferiores (Hiriart 2002). En México, la DM afecta al 11 % de la población y ocupa el primer lugar de mortalidad general en el país, donde cada hora mueren 6 personas por esta causa y sus complicaciones. Actualmente los fármacos utilizados regulan el nivel de la hiperglucemia, sin embargo, no se ha logrado tener un control adecuado de la enfermedad debido a las complicaciones macrovasculares (Herrera et al. 2004).

Las especies vegetales *Cecropia obtusifolia* y *Cecropia peltata* conocidas popularmente como guarumbo, han sido usadas ampliamente por la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la DM (Argueta et al. 1994; Aguilar et al. 1994; Aguilar y Xolapa 2002). Este uso tradicional ha sido validado científicamente mediante estudios farmacológicos en modelos animales, así como estudios clínicos; en los que se observó la disminución de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre por el efecto de extractos provenientes de hojas. Tal propiedad terapéutica es atribuida a dos compuestos fenólicos que son los principales constituyentes de los extractos estudiados: ácido clorogénico (ACG) e isoorientina (ISO) (Andrade-Cetto y Wiedenfeld 2001; Herrera 2004; Nicasio et al. 2005, 2009). Los resultados obtenidos en la clínica han motivado el desarrollo de proyectos de investigación en aspectos básicos de química, farmacología y toxicología.

Sin embargo, diferentes factores pueden afectar la composición química de las plantas de guarumbo por lo que es importante estudiar la producción de los compuestos fenólicos en condiciones particulares de cultivo. Dentro de este contexto, el establecimiento de cultivos controlados de *C. peltata* es una estrategia de tipo biotecnológico que se plantea para proveer un suministro auténtico de materia prima, con

características morfológicas y componentes químicos homogéneos, para continuar con la investigación clínica y el potencial desarrollo en un fito-medicamento.

Actualmente, el diseño y la producción de un fitofármaco requieren del abastecimiento continuo de material vegetal controlado en sus constituyentes bioactivos; este hecho propicia también la investigación aplicada de tipo biotecnológico y agronómico, como se aborda en éste trabajo.

## II ANTECEDENTES



### 2.1 PLANTAS MEDICINALES

A lo largo de la historia, las plantas se han utilizado para prevenir y curar enfermedades en los seres humanos (Raskin et al. 2002; Cai et al. 2004). Sin embargo, el consumo generalizado de algunas especies medicinales (colectadas de áreas naturales o cultivadas) ha generado importantes cuestionamientos relacionados con su control de calidad, seguridad, eficacia y conservación del ambiente (Mosaleeyanon et al. 2005; Street et al. 2008). La necesidad de conservar plantas medicinales para los usos tradicionales, modernos y futuros, requiere de muchos esfuerzos tanto en el hábitat natural, como en el conocimiento de las condiciones de cultivo, lo que servirá también para la conservación de las poblaciones silvestres (Pelt 1992; Bye et al. 1995).

México es reconocido como uno de los países con mayor riqueza de especies vegetales en el mundo, se estima que existen más de 30 mil especies de plantas en su territorio. Esta diversidad vegetal se originó gracias a su ubicación geográfica que posee una amplia gama de climas y suelos. Otra característica importante de nuestro país es su gran diversidad cultural, que combinada con la riqueza biológica, favorecieron el valioso conocimiento etnobotánico; por lo que México es clasificado en el segundo lugar a nivel

mundial en cuanto a riqueza de plantas medicinales con alrededor de 4 mil especies registradas (Conabio 1998).

La medicina tradicional en México es una importante manifestación cultural; se estima que el 80% de la población utiliza plantas medicinales, de los cuales 20 millones recurren exclusivamente a la medicina tradicional y el resto combinan su uso con la medicina institucional (Estrada y Morales 2002). A pesar de la amplia trayectoria de la investigación sobre el uso de plantas medicinales, el rescate y validación de dichos conocimientos son recientes; conjuntamente, el desarrollo de fitomedicamentos en nuestro país está en auge (Rivera 1999; Estrada y Morales 2002).

El interés actual en el uso de terapias alternas derivadas de plantas se ha incrementado debido a diferentes factores (Conabio 1998; Rates 2001):

- △ La ineficacia de la medicina alópata en muchos casos.
- △ El escaso acceso de las personas de bajos recursos a los tratamientos farmacológicos convencionales.
- △ El abuso y/o uso incorrecto de los medicamentos que conlleva a diversos efectos colaterales.
- △ La tendencia a creer que todos los productos naturales son inocuos.
- △ La herbolaria se puede utilizar para la atención primaria de la salud con costos accesibles a la mayor parte de la población.

Desafortunadamente, la sobreexplotación de las plantas medicinales conduce a la desaparición de las especies de su hábitat natural, ya que más del 90 % de las plantas medicinales que se usan en México son de origen silvestre (Craker 1999). Por otro lado, también es importante considerar el papel que tienen algunas de estas especies dentro de los ecosistemas que forman parte. En este sentido, es importante buscar el aprovechamiento de la biodiversidad a través de proyectos de bioprospección y al mismo tiempo buscar los mecanismos para no sobreexplotar los recursos biológicos en los diferentes ecosistemas (Massieu y Chapela 2002). La necesidad de conservar las poblaciones silvestres de plantas medicinales para los usos tradicionales, modernos y futuros, requiere de muchos esfuerzos tanto en el hábitat donde las plantas crecen naturalmente, como en el conocimiento de las condiciones de cultivo (Pelt 1992; Bye et al. 1995).



### 2.1.1 La herbolaria mexicana en el tratamiento de diabetes mellitus (DM)

Con base en los reportes existentes sobre las plantas que son utilizadas por la población mexicana para el control de la hiperglicemia, se estima un número entre 269 y 306 especies vegetales que pertenecen a 235 géneros de diversas familias botánicas; entre las que destacan Asteraceae, Leguminosae (Fabaceae), Cactaceae, Euphorbiaceae, Labiatae, Solanaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae, Lamiaceae y Rosaceae; siendo las familias Asteraceae y Leguminosae las que comprenden el mayor número de las especies utilizadas. Por otro lado, *Tecoma stans* (Bignoniaceae) es la planta más frecuentemente utilizada para tratar los cuadros hiperglucémicos, seguido de *Aloe barbadensis*, *Cecropia obtusifolia*, *Opuntia streptacantha*, *Psacalium peltatum*, *Bidens pilosa*, *Marrubium vulgare* y *Parmentiera edulis*. Asimismo, se reporta que las hojas son las estructuras vegetales más utilizadas, le siguen los tallos y las raíces (Aguilar y Xolapa 2002; Hernández Galicia et al. 2002; Andrade-Cetto y Heinrich 2005).

Los efectos hipoglucemiantes de *Opuntia spp*, *C. obtusifolia*, *M. vulgare*, *Equisetum myriochaetum*, *Enicostemma litorale*, *Trigonella foenum-graecum*, *Ipomoea batatas* fueron demostrados en estudios clínicos (Fratti-Munari et al. 1992; Revilla et al 2002; Upadhyay y Goyal 2004; Herrera-Arellano et al. 2004; Ludvik et al. 2004; Gupta et al. 2001; Revilla-Monsalve et al. 2007). En Alemania, dos productos comerciales elaborados a partir de especies de la herbolaria medicinal mexicana son utilizados para tratar la DM2, uno de estos productos es distribuido por Hando-Austria, es un preparado a base de *Opuntia sp.* (nopal); el segundo es Sucontral de Harras Pharma (Munich) a base de *Hintonia sp.*(copalchi) (Andrade-Cetto y Heinrich 2005).

Las especies vegetales *Cecropia obtusifolia* y *Cecropia peltata* indistintamente se conocen como “guarumbo”, ya que comparten características físicas tan similares que a simple vista no se distinguen una de otra. Del centro hasta el sureste de México, el uso medicinal más frecuente de “guarumbo”, es como remedio antidiabético, para lo cual se emplea la infusión de las hojas, ramas, corteza o raíz como “agua de uso”. Cuando se utilizan las hojas de la planta, se recomienda hervir 3 ó 4 hojas tiernas en 2 l de agua (Martínez 1969; Argueta et al. 1994; Aguilar et al. 1994; Gupta 1995; Aguilar et al. 1998; Conabio 2008; SEMARNAT 2008). Actualmente, las hojas de *C. obtusifolia* son empleadas por algunas industrias mexicanas para la elaboración de productos herbolarios (Químicos y Vegetales Rowi, S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco; Ciencia y Salud:

Fórmulas Herbolarias, México, D.F) y también son exportadas a Europa con el mismo propósito (Gutiérrez-D y Betancourt-A 2008). Estos antecedentes fueron la base para el desarrollo de diversos proyectos de investigación que abordan aspectos básicos de química, farmacología y toxicología; asimismo, los resultados obtenidos motivaron a los ensayos clínicos.

## 2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Cecropia peltata*

En su estado adulto *C. peltata* es un árbol de 5 a 12 m de altura, de tronco liso y anillado, hojas orbiculares de 30 a 50 cm de diámetro promedio y con 7–9 lóbulos que llegan hasta la mitad de la hoja con ápices de obtusos a redondeados (Figura 1).

Figura 1. Fotografía de una planta de *C. peltata* en estado adulto aclimatada en el Estado de Morelos y su clasificación taxonómica.



Reino: Plantae  
Subreino: Tracheobionta  
Superdivisión: Spermatophyta  
División: Magnoliopsida  
Subclase: Hamamelidae  
Orden: Urticales  
Familia: Cecropiaceae  
Género: *Cecropia*  
Especie: *peltata*

Es una especie dioica con inflorescencias masculinas que presentan espigas de 12 a 30 cm de largo y de 2 a 5 cm de ancho, con un pedicelo corto; en tanto que las inflorescencias femeninas son amarillentas, sésiles, dispuestas en grupos de 2 a 6 y de unos 4 a 5 cm de largo. El fruto mide aproximadamente 10 a 12 cm de largo y presenta un punteado negruzco (Martínez 1969). Su lámina es algo escábrida en el haz y densamente blanco tomentoso en el envés, con pecíolo grueso de hasta 30 a 40 cm de largo ([http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia\\_obtusifolia.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia_obtusifolia.htm)).

La viabilidad inicial de las semillas es del 90 % y la van perdiendo al pasar el tiempo, la latencia del tipo fotoblástica es impuesta. En un estudio se observó que de todas las semillas producidas en 5 hectáreas en un año, solamente el 40 % de ellas llegan al suelo y la mitad son viables; después de un año, sólo el 2.87 % permanecen viables y 4.4 % germinan en los claros. Para germinar las semillas se requiere de humedad y temperatura favorable (16 a 36 °C) que puede ser constante o fluctuante, así como también de varias exposiciones consecutivas y prolongadas de luz infrarroja para alcanzar la máxima germinación. La primera reproducción ocurre alrededor de los 3 años después de la germinación (Conabio 2008).

En México, el árbol de *Cecropia peltata* se distribuye en los Estados de Oaxaca, Veracruz, San Luís Potosí, Tabasco, Yucatán y Chiapas y se le conoce popularmente como guarumbo, árbol trompeta, yagrumo, congo, ambaí, ambaú, caseta, imbaúba, umbáuba (Martínez 1969; <http://plantamed.com.br/index.html>). Los sinónimos botánicos reportados son *Cecropia amphiclora*, *Cecropia peltata* var. *Candida* (Velázquez 1971) y *Cecropia surinamensis* (Mig).

## **2.3 ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL GÉNERO *Cecropia***

### **2.3.1 Estudios en animales de experimentación**

Aunque el uso etnobotánico para *C. obtusifolia* y *C. peltata* es el mismo, los estudios químicos y farmacológicos se han enfocado principalmente a la primera. La actividad hipoglucemiante atribuida a estas especies fue evaluada utilizando diferentes modelos biológicos. La infusión de hojas secas (1g/10ml), administrada por vía

intravenosa en una dosis de 150  $\mu$ l/Kg en perros mongrel con pancreatectomía parcial y total, produjo una disminución de los niveles de glucosa en sangre desde la segunda hora después de su administración; la hipoglucemia no se acompañó por el incremento en los niveles plasmáticos de insulina, pero se produjo una elevación significativa en las cifras plasmáticas de triglicéridos. Los resultados permitieron asumir que el efecto hipoglucemiante no está asociado con una estimulación sobre las células  $\beta$ -pancreáticas (Mellado y Lozoya-Meckes 1984).

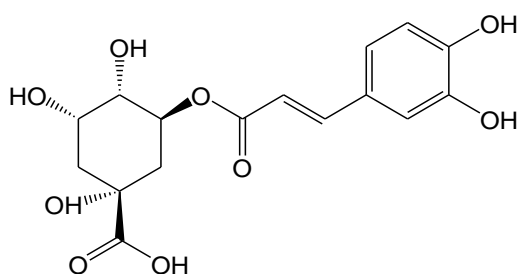
En otros estudios, se reportó el efecto antihiperoglucemiante del extracto acuoso de las hojas de *C. obtusifolia* en ratones con hiperoglucemia inducida con aloxana (Pérez et al. 1984) y en conejos con hiperoglucemia inducida por cargas dobles de glucosa (Román et al. 1991). Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001) reportan en ratas tratadas con estreptozotocina también el efecto antihiperoglucemiante producido por los extractos acuoso y butanólico, así como por el ácido clorogénico (ACG) y la isoorientina (ISO) aislados de la planta (Figura 2).

El extracto butanólico de las hojas de esta especie disminuye la hiperoglucemia postprandial en las ratas estreptozotomizadas; este efecto fue asociado con la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas del intestino, impidiendo con ello el desdoblamiento de carbohidratos complejos y retardando la absorción de la glucosa (Andrade-Cetto et al. 2008). Observaciones realizadas en ratones normoglucémicos reproducen el efecto hipoglucemiante de los extractos metanólicos de *C. obtusifolia* y *C. peltata* administrado vía oral en dosis de 1g/Kg (Nicasio et al. 2005). Además se ha reportado que el extracto acuoso de *C. obtusifolia* y ACG estimulan la obtención de glucosa en adipositos sensibles y resistentes a insulina (Alonso-Castro et al. 2008).

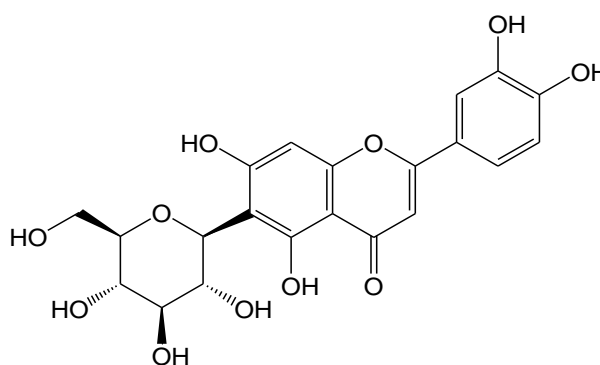
Los estudios metabólicos para establecer la correlación entre el consumo de café y la diabetes, demuestran que los polifenoles y principalmente el ACG se encuentra en concentraciones elevadas en esta bebida y tiene gran capacidad antioxidante. Asimismo, el ACG actúa protegiendo a las células beta del páncreas y disminuye la absorción intestinal de la glucosa aumentando los niveles del péptido tipo glucagon-1 (GLP-1) y disminuyendo los del polipéptido insulino-trópico glucosa-dependiente (GIP); fenómenos que se traducen en disminución de la glucosa plasmática (Johnston et al. 2003; McCarty 2005). En ratas Zucker (*fa/fa*) obesas, hiperlipidémicas y resistentes a insulina se evaluó el efecto del ACG administrado por vía intravenosa, y se demostró que este compuesto

disminuye el pico postprandial de la glucosa sin producir una hipoglucemia sostenida. Además de disminuir significativamente los niveles séricos de colesterol y de triglicéridos, así como los de triglicéridos hepáticos (Rodríguez de Sotillo y Hadley 2002).

Figura 2. Compuestos fenólicos con actividad hipoglucemiante más abundantes en plantas del género *Cecropia*.



Ácido Clorogénico (ACG)



Isoorientina (ISO)

Estructuralmente el éster formado entre el ácido caféico y el ácido quínico es el ácido clorogénico. La isomerización del ácido clorogénico resulta en tres estructuras diferentes por la posición del ácido quínico 3 (3-ACG), 4 (4-ACG) y 5 (5-ACG). Además de su actividad antioxidante, existen reportes de su función como antiviral (Jassim y Najj 2003), antibacterial (De Sotillo et al. 1998) y antifúngica (Bowels et al. 1994). En su función en plantas se reporta como un intermediario en la biosíntesis de lignina (Mondolot et al. 2006), antibacteriano, antiherbívoros (Izaguirre et al. 2007; Leiss et al. 2009) y antifúngico (Maher et al. 1994).

De la misma forma, se demostró el efecto antihyperglucemiante e hipolipemiante, de la ISO por la administración vía oral por 2 semanas a ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Los resultados confirman que la ISO disminuye los niveles de glucosa, de colesterol y de triglicéridos a partir del 5º día de tratamiento. El efecto se mantuvo

hasta 10 días después de suspender la administración del compuesto (Sezik et al. 2005). Por otro lado Ko et al. (1998) demostró que ISO posee actividad antioxidante demostrada *in vitro*.

Además, se reportó que ACG e ISO son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I al vasoconstrictor más potente angiotensina II (ECA), lo que les confiere también propiedades antihipertensivas a *C. obtusifolia* y *C. peltata* (Lacaille-Dubois et al. 2001).

### **2.3.2 Estudios clínicos**

En un diseño al azar y doble ciego con diabéticos de ambos sexos de entre 30 y 60 años de edad, se evaluó la infusión preparada de “guarumbo” con un contenido de ACG en cada dosis de  $2.99 \pm 0.14$  mg/g de hojas secas; los pacientes tomaron la infusión antes de cada alimento durante 21 días. Se mostró una disminución de los niveles de glucosa (15.25), colesterol (14.62 %) y triglicéridos en sangre (42 %) respecto al grupo control (Herrera et al. 2004). Actualmente se realiza un estudio clínico fase 2 en pacientes diabéticos tipo 2, a los cuales se les administran las cápsulas desarrolladas como fitofármaco (estandarizado su contenido en ACG e ISO), a partir del extracto acuoso de hojas de *C. obtusifolia* (Herrera A, comunicación personal).

En un siguiente estudio con un grupo de pacientes recientemente diagnosticados como diabéticos y sin tratamiento con hipoglucemiantes orales que recibieron diariamente como agua de uso una infusión preparada con 13.5 g/l de hojas de *C. obtusifolia* (ACG=2.91 mg; ISO=2.4 mg); se encontró que el extracto tiene un efecto antihiperoglucemiante y la hemoglobina glicosilada también se redujo de una manera significativa y sostenida. Por el contrario, el colesterol, triglicérido e insulina no se modificaron. Al suspender el tratamiento, se observó que el proceso se revierte. La evaluación de las enzimas hepáticas indicaron que el producto no es tóxico (Revilla-Monsalve et al. 2007).

### 2.3.3 Estudios toxicológicos

La dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del extracto acuoso de hojas de *C. obtusifolia* administrado vía intraperitoneal en la rata fue de 1.45±0.07 g/Kg (equivalente a 11.21±0.52 g/Kg peso corporal de la hoja seca). En los animales tratados se observó un estado de relajación general, somnolencia y piloerección (Pérez-Guerrero et al. 2001). En los ratones, la DL<sub>50</sub> para el extracto metanólico de las hojas fue >5 g/Kg. En el estudio subagudo por 30 días, la dosis diaria de 3 g/Kg del extracto metanólico no mostró alteraciones en las pruebas conductuales ni en los cortes histológicos de diferentes órganos (Aguilar 2004).

### 2.3.4 La propagación de guarumbo

El material vegetal que se ha utilizado hasta ahora para valorar las propiedades químicas y farmacológicas de *C. obtusifolia* y *C. peltata*, proviene de plantas silvestres. El conocimiento generado por la investigación de la especie como potencial agente hipoglucemiante no tóxico y su propuesta para el desarrollo de un fitomedicamento, obliga a considerar otras alternativas.

Hay antecedentes respecto a la propagación vegetativa de *C. obtusifolia* por medio de esquejes y de acodos aéreos. Con los esquejes se reporta la formación de raíces utilizando una mezcla de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA); en cambio, con los acodos aéreos, se logró un enraizamiento superior y sin necesidad de aplicar hormonas (LaPierre 2001). Asimismo, se reportó un protocolo de propagación *in vitro*, induciendo la formación de brotes en yemas apicales por medio de fitorreguladores. La mejor respuesta morfogénica se obtuvo con cinetina 26.64 µM en combinación con ANA o ácido indolacético 0.57 µM. Las plántulas generadas conservaron la capacidad de producir los compuestos fenólicos ACG e ISO, así como sus propiedades hipoglucemiantes (Nicasio-Torres et al. 2009).

## 2.4 PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS PLANTAS

El metabolismo es el proceso de utilización y transferencia de masa y energía que permite la vida de los organismos. Participan en este proceso: a) los metabolitos primarios que son los compuestos esenciales y universales en todas las especies (sacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos y bases nitrogenadas, los que a su vez, dan lugar a moléculas poliméricas: proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos); y b) los metabolitos secundarios (MeS), que son particulares de cada especie y que independientemente de que no son esenciales, cumplen un papel importante en la interacción de la planta con su ambiente (Bourgaud et al. 2001; Nugroho y Verporte 2002).

Los MeS tienen una estructura única y compleja, y su producción está frecuentemente asociada a condiciones de estrés biótico y abiótico. En general, se acepta que los MeS son necesarios para la sobrevivencia de la planta en su ecosistema; ya que algunos (fitoalexinas) poseen propiedades antimicrobianas y por lo tanto protegen a la planta de los agentes patógenos. Asimismo, ejercen acciones antigerminativas o tóxicas para otras plantas (alelopatía); actúan sobre los insectos (propiedades antialimentarias o insecticidas); son útiles para repeler predadores y atraer polinizadores o simbiosis; finalmente, absorben el exceso de energía luminosa evitando el daño por fotooxidación (Bourgaud et al. 2001; Nugroho y Verporte 2002; Marja et al. 2004).

La síntesis de los MeS se deriva del metabolismo primario a través de una ruta compleja en la que intervienen diversas enzimas, es característica para cada especie o género, y se activa en estadios particulares del crecimiento y desarrollo de la planta. La biosíntesis de MeS y las reacciones enzimáticas pueden activarse o inhibirse genéticamente de acuerdo con las condiciones existentes: disponibilidad de los nutrientes, lesiones, ataques microbianos, sequía, depredación, agentes químicos (herbicidas), cambios de temperatura, humedad, etc. (Nugroho y Verporte 2002).

Las plantas pueden ser la fuente renovable más abundante y de menor costo para la obtención de MeS complejos con propiedades farmacológicas; sin embargo, como se mencionó anteriormente, diferentes factores pueden afectar su composición química. Para asegurar esa composición y por lo tanto la eficacia de las plantas medicinales, se requiere de cultivos uniformes en condiciones estandarizadas (Raskin et al. 2002). Para



la mayoría de las especies medicinales, la relación entre los factores ambientales y la producción de compuestos bioactivos es poco estudiada o se desconoce; sin embargo, de manera general su contenido varía dependiendo del genotipo, estado de desarrollo, tejidos y órganos de estudio, estado de salud y diferencias en el ambiente. Para conocer la respuesta de la planta, es preciso estudiar los factores por separado y determinar la variación en el contenido de los MeS bajo el manejo agrícola aplicado (Wink 1999).

#### **2.4.1 Significado de estrés en plantas**

El término estrés en el marco de la fisiología vegetal refleja la magnitud de presión ambiental que es desfavorable y que fuerza al cambio en la fisiología de una planta. A menudo es difícil distinguir entre aquellas respuestas que repercuten negativamente en la planta y aquellas que poseen un efecto benéfico; algunos factores pueden tener ambos efectos simultáneamente. Por ejemplo, la marchitez producida por déficit hídrico, si bien tiene un efecto negativo en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, también puede ser positiva para la planta, ya que colabora en la menor absorción de energía lumínica al cambiar el ángulo de exposición, evitando con ello el daño permanente en la hoja por alta irradiancia y temperatura (Nielsen y Orcutt 1996).

Las plantas están expuestas a diferentes condiciones ambientales, que adversamente afectan su metabolismo, crecimiento y desarrollo. Por ello, se adaptan a estas condiciones de estrés modulando su metabolismo y fisiología. Estos factores de estrés pueden ser de tipo abiótico (sequía, salinidad, luz, CO<sub>2</sub>, nutrientes y temperatura) y bióticos (bacterias, hongos, virus, insectos y herbívoros). Entre los factores abióticos más dañinos están la alta incidencia de luz y la deficiencia de nutrientes (Grechi et al. 2007).

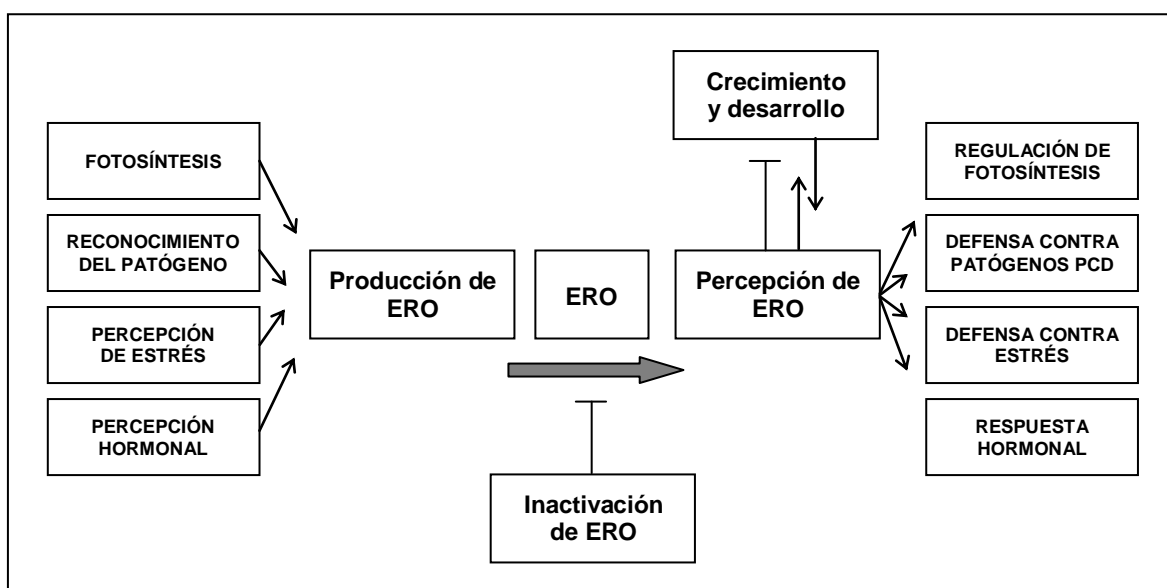
#### **2.4.2 La participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en la síntesis de metabolitos secundarios**

En las plantas, la síntesis y acumulación de los MeS se induce por efecto de condiciones tanto de estrés biótico, como abiótico. Entre los primeros eventos que ocurren en respuesta a las condiciones de estrés está la producción masiva de las

especies reactivas de oxígeno (ERO) (Figura 3), tales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) el radical hidróxilo ( $HO\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Sudha y Ravishankar 2002; Sepúlveda et al. 2003; Gechev et al. 2006).

Esta sobreproducción de especies oxidantes se acopla a una cascada de reacciones en las células vegetales, que conducen a la biosíntesis y acumulación de los MeS que ayudan a la planta a tolerar las condiciones de estrés. Las ERO pueden tener dos funciones principalmente: en la primera pueden actuar como una señal para la activación de las respuestas de defensa; mientras que en la segunda, debido a su toxicidad, pueden aumentar el daño producido por el estrés al provocar un desbalance en el estado óxido-reducción de la célula. Las ERO son percibidas por diferentes ERO-sensores y activan respuestas celulares (e.g. defensa contra estrés) (Figura 3); la intensidad, duración y localización de las señales de ERO son determinadas por la interacción entre las vías de producción-ERO y de inactivación-ERO (Sudha y Ravishankar 2002; Sepúlveda et al. 2003; Gechev et al. 2006).

Figura 3. Función de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el reconocimiento de diferentes señales ambientales (e.g. estrés) y activación de las respuestas en las células vegetales (Adaptado de Mittler et al. 2004).



El daño oxidativo se puede medir mediante métodos directos e indirectos; la medición directa de la concentración de las ERO es difícil por su corta vida media y lo costoso que resultan los equipos, lo que hace imprescindible medirlos indirectamente. Uno de los métodos de medición indirecta es mediante la determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas, como es la peroxidación lipídica, que es uno de los métodos más utilizados cuando se trata de probar daño celular inducido por los oxidantes (Pérez y Pérez 2000).

Por otro lado, la disminución de la fijación de CO<sub>2</sub> en los cloroplastos debido a la deficiencia de macronutrientes, provoca sobre-saturación en el sistema de transporte de electrones fotosintéticos incluso en condiciones de baja irradiancia. Bajo esta condición altamente reducida, los electrones de alto potencial y la clorofila excitada, pueden interactuar con el oxígeno molecular y formar ERO. Tewari et al. (2006) reportaron que las hojas de maíz en condiciones de deficiencia de nitrato presentaron importante disminución en el contenido de clorofila, concluyendo que esta condición causa severa clorosis y fotooxidación de los constituyentes de las hojas por la generación de las ERO.

Con el objeto de controlar la toxicidad de las ERO hacia sus propios componentes celulares, las plantas cuentan con mecanismos de detoxificación para eliminarlas. Dichos mecanismos se han clasificado en dos grupos principales: los enzimáticos y los no enzimáticos. En los enzimáticos se induce la expresión de genes para la biosíntesis de enzimas antioxidantes como son superóxido dismutasas, catalasa y peroxidasas; en tanto que en los no enzimáticos, se induce la expresión de genes para la biosíntesis de compuestos con actividad antioxidante como el ácido ascórbico, el  $\alpha$ -tocoferol, los carotenoides y los fenólicos (García et al. 2004). En particular, un gran número de compuestos fenólicos son poderosos antioxidantes capaces de consumir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y contribuir con el ajuste del estado de óxido-reducción celular desencadenado durante el estrés. Además de la activación o inactivación de las diferentes respuestas celulares, la percepción-ERO puede afectar el crecimiento y el desarrollo. (Sepúlveda et al. 2003; Fritz et al. 2006)

### **2.4.3 Hipótesis del balance carbono-nutrientes (CNB) y la síntesis de metabolitos secundarios**

Las plantas están continuamente enfrentando un dilema acerca de cómo distribuir sus recursos eficientemente. La interacción entre el metabolismo del carbono (C) y nitrógeno (N) regula muchos aspectos del metabolismo, fisiología y desarrollo de las plantas. La hipótesis de CNB (Bryant et al. 1983) postula que las plantas dirigen el C y N hacia el metabolismo secundario sólo cuando los requerimientos del crecimiento se han cubierto y el crecimiento se reduce en mayor medida por las limitaciones de nutrientes que por la fotosíntesis. La hipótesis del CNB es útil para explicar los efectos de la disponibilidad de nutrientes en la concentración de MeS como alcaloides, terpenos y fenólicos (Fritz et al. 2006, Palumbo et al. 2007). De acuerdo con esta teoría, el exceso de carbohidratos que acumulan las plantas en condiciones limitadas de nutrientes cuando la fotosíntesis sobrepasa al crecimiento, son dirigidos a la producción de metabolitos secundarios basados en carbón (e.g., fenólicos). Cuando se incrementa el suministro de nutrientes por fertilización, se permite el crecimiento y se equilibra con la actividad fotosintética. Considerando esto, se postula que cuando hay una limitación de N, el metabolismo secundario se dirige hacia metabolitos ricos en C como los fenólicos y terpenos; y por otro lado, cuando hay una limitación de C, se incrementan los metabolitos ricos en N como los alcaloides (Palumbo et al. 2007). En estudios con plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y tabaco (*Nicotiana tabaccum*), se mencionó que la deficiencia de nitrato resulta en la disminución de varios aminoácidos (incluyendo fenilalanina y tirosina que son los precursores de compuestos fenólicos) y ácidos orgánicos, incrementos en el nivel de varios carbohidratos y fosfoésteres, así como de algunos MeS (Fritz et al. 2006; Urbanczyk-Wochniak y Fernie 2005).

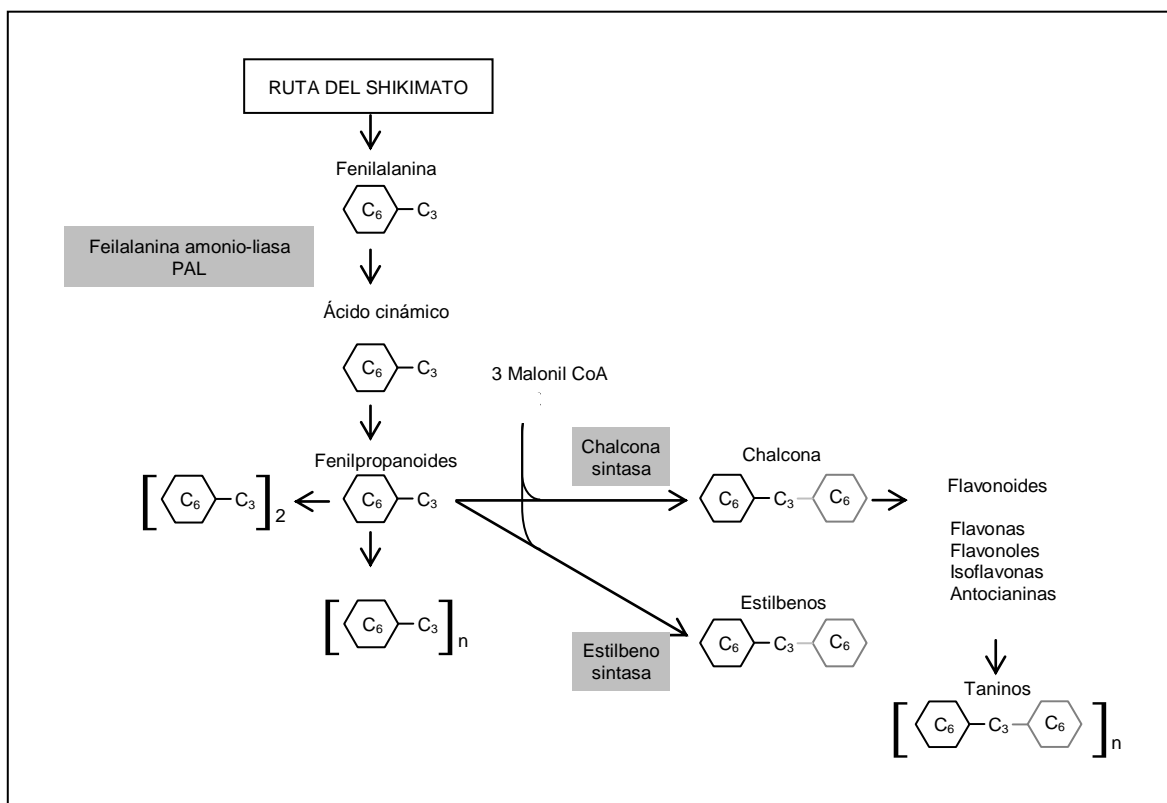
### **2.4.4 La ruta metabólica de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un grupo muy amplio de metabolitos con más de 8000 estructuras químicas diferentes reconocidas hasta ahora; poseen un anillo aromático básico de benceno con un grupo hidroxilo como mínimo unido a él. Estos compuestos son sintetizados en las plantas, a partir del ácido shikimico principalmente; esta vía se inicia a partir de carbohidratos como la eritrosa 4-P y el fosfoenolpiruvato, lo

cual conduce a la síntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina (Camacho-Cristobal et al. 2002; Fritz et al. 2006).

A partir de fenilalanina se forma el ácido transcinámico por la acción de la enzima fenilalanina-amonoliasa (PAL), enzima clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos (Figura 4). La PAL y otras enzimas involucradas en la biosíntesis de los fenólicos, son inducidas a través de síntesis *de novo*, principalmente en respuesta a varias condiciones de estrés como el ataque de patógenos, heridas, UV, etileno y deficiencia de nitratos; lo que conduce a la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos: fenoles simples (p.ej. ácido clorogénico), flavonoides (p.ej. isoorientina), taninos y lignina (Camacho et al. 2002). Hemm et al. (2004) demostraron que los genes que conducen a la biosíntesis de la PAL son altamente expresados en raíces de *Arabidopsis* crecidas en luz; por su parte, Fritz et al. (2006) reportaron que la expresión de genes de PAL y otras enzimas requeridas en el metabolismo de compuestos fenólicos: C4H (Cinamato-4hidroxilasa), 4CL (Hidroxicinamato-CoAligasa) y HQT (Hidroxicinamoil-CoA), fueron inducidas por la deficiencia de nitrato en plantas de *Nicotiana tabacum*.

Figura 4. Ruta biosintética condensada de los compuestos fenólicos.



#### 2.4.5 La disponibilidad de luz y nitrógeno como inductores de la biosíntesis de compuestos fenólicos

Los factores ambientales tales como la presencia de metales pesados, deficiencia de nutrientes, salinidad, heladas, sequía, luz UV, etc., pueden alterar significativamente las concentraciones de metabolitos en las plantas (Sepúlveda et al. 2003). Briskin et al. (2001) reportaron que en el cultivo de *Hypericum perforatum* con el incremento de irradiancia (de 100 a 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), se incrementó significativamente la concentración de un compuesto bioactivo del grupo de los fenólicos, la hipericina. En el mismo trabajo, al disminuir la concentración de nitrato de 4.42 a 0.2 mM, se obtuvo un incremento de casi el doble de la hipericina. Los autores mencionan que mientras el incremento en la intensidad luminosa y la disminución del suministro de nitrato favorecieron la producción de hipericina, la naturaleza de estas respuestas fue diferente; el incremento en la irradiancia tuvo un efecto continuo en el incremento de la concentración del compuesto, en tanto que, la disminución de nitrato resultó en un patrón discontinuo en la elevación del contenido de hipericina. Con estos resultados se concluyó que las respuestas a la irradiancia y nitrato, son independientes y aditivas en la producción del compuesto.

En plantas cultivadas con la combinación de baja irradiancia (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con deficiencia de nitrato (0.4 mM) y que posteriormente fueron cambiadas a condiciones de mayor irradiancia (900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con deficiencia de nitrato, se observó un incremento hasta de 3-veces en el nivel de ACG (Urbanczyk-Wochniak and Fernie 2005). Por otro lado, Fritz et al. (2006) observaron incremento en la producción de ACG y otros fenólicos como el ácido cumárico y caféico en plantas de *Nicotiana tabaccum* sometidas a deficiencia de nitrato (12 mM control y 0.2 mM deficiencia).

En particular, en una parcela de árboles de guarumbo, se observó un incremento del contenido de ACG e ISO en las hojas relacionado con la disminución del contenido de nitrógeno total en el suelo. Cabe mencionar que en dicho estudio se tuvieron condiciones semi-controladas de las condiciones de cultivo en campo (González 2005). En otro estudio con la misma especie, pero en un cultivo de células en suspensión, se reportó un incremento (2-veces) en la producción de ACG por deficiencia de nitrato (Ríos 2007).

De acuerdo con estos trabajos, la producción de fenólicos puede ser estimulada por bajos niveles de nitrato (Armstrong et al. 1970; Fritz et al. 2006; Palumbo et al. 2007; Le

Bot et al. 2009); por la alta intensidad de luz (Hemm et al. 2004; Jaakola et al. 2004; Mosaleeyanon et al. 2005) y otros factores de estrés biótico y/o abiótico (Bernards y Ellis 1991; Kováčik y Bačkor 2007; Clé et al. 2008; Jansen et al. 2008). Estos antecedentes se tomaron en consideración en el presente estudio, para diseñar el protocolo encaminado a estimular la biosíntesis los compuestos bioactivos ACG e ISO, en plantas de *C. peltata*.

### III JUSTIFICACIÓN



Las especies *Cecropia peltata* y *C. obtusifolia*, popularmente conocidas como “guarumbo”, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional mexicana por los pacientes diabéticos como coadyuvantes en su control. Los preparados a base de la infusión de sus hojas poseen efecto hipoglucemiante e hipolipemiante, demostrado tanto en modelos experimentales en el animal vivo como en estudios clínicos. Sin embargo, para el desarrollo de un fitomedicamento es imprescindible contar con el material vegetal que asegure su calidad y sea factible de ser manipulado en su composición química, especialmente para inducir la producción de ácido clorogénico (ACG) e isoorientina (ISO), compuestos a los cuales se les atribuye el efecto terapéutico. Esto a su vez, permitirá obtener extractos homogéneos con contenidos conocidos de los compuestos fenólicos asegurando con ello su efectividad terapéutica.

Entre los sistemas de producción para la obtención de material vegetal de *C. obtusifolia* y *C. peltata* con características químicas constantes, se reporta la obtención de plantas por micropropagación. A través de este sistema se determinó que bajo condiciones controladas no se requiere el desarrollo de la planta a la edad adulta, debido a que los metabolitos de interés están presentes desde los estados tempranos de su desarrollo.

A la fecha se conoce poco acerca de como modifican los factores ambientales el metabolismo secundario de plantas de *C. peltata*; particularmente en un reporte previo, se menciona que la deficiencia de nitrógeno en suelo favorece la acumulación de ACG e ISO. Por lo cual, es importante conocer el metabolismo de la planta en condiciones de estrés por deficiencia de nitrato en combinación con alta irradiancia, para estimular la producción de compuestos fenólicos (CGA e ISO). Asimismo, el estudio de diferentes eventos bioquímicos involucrados en la respuesta de la planta en esas condiciones, proporcionará información para caracterizar los mecanismos de respuesta sobre el metabolismo de los compuestos fenólicos. Los avances logrados servirán para contribuir con las bases para el establecimiento de un sistema de cultivo controlado de *C. peltata* como fuente de material vegetal para la investigación y el posible desarrollo de un fitomedicamento para el tratamiento de diabetes mellitus.



## IV OBJETIVOS



### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la disponibilidad de la luz (irradiancia) y de nitrato sobre la acumulación de compuestos fenólicos (ACG e ISO), así como otros cambios bioquímicos, relacionados con la distribución de la biomasa y el desarrollo de la planta, empleando un sistema de cultivo hidropónico controlado de la especie *C. peltata*.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- △ Establecer un sistema de propagación y aclimatización de plantas de *C. peltata* en condiciones ambientales controladas mediante un sistema hidropónico, para el suministro continuo y homogéneo de material vegetal.
- △ Evaluar el efecto del incremento de la irradiancia en combinación con la disminución de la concentración de nitrato sobre la distribución de la biomasa, la producción de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante y actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL), en el desarrollo de las plantas de *C. peltata* a 28 días de cultivo.
- △ Caracterizar la biomasa seca, contenido de fenólicos solubles totales, actividad antioxidante, fenólicos individuales, contenido de ligninas, actividad de PAL, producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidación de lípidos, relacionados con el desarrollo en diferentes tiempos de cultivo (cinética), como respuesta de las plantas de *C. peltata* ante el incremento de la irradiancia en combinación con el contenido de nitrato

## V MATERIALES Y MÉTODOS



### 5.1 PLANTEAMIENTO GENERAL, TRES ETAPAS DE EXPERIMENTACIÓN

Etapa A. Establecimiento del sistema de propagación de plantas de *C. peltata*, que incluye su aclimatización en un sistema hidropónico, lo que servirá como suministro continuo y homogéneo de material vegetal.

Etapa B. Diseño experimental factorial de concentración de nitrato (13, 2 y 0.2 mM) e irradiancia (20, 30, y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 4 semanas de cultivo, sobre los parámetros: biomasa seca, contenido de fenólicos solubles totales, fenólicos individuales, actividad antioxidante y actividad de la enzima PAL en partes aéreas y raíces.

Etapa C. Del diseño experimental de la etapa B, se eligieron cuatro tratamientos para la evaluación con respecto al tiempo de cultivo (cinéticas a 28 días), de los siguientes parámetros en partes aéreas: biomasa seca, contenido de fenólicos solubles totales, actividad antioxidante, fenólicos individuales, contenido de ligninas, actividad de PAL, producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peroxidación de lípidos.

### ETAPA A

### 5.2 MATERIAL VEGETAL

Los frutos maduros de *Cecropia peltata* “guarumbo”, se tomaron de un árbol colectado en Cunduacán, Tabasco y aclimatado en Xochitepec, Morelos. Este espécimen fue identificado en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social de México (IMSSM) con el código número 14123 (Nicasio-Torres et al. 2009).

### 5.3 OBTENCIÓN DEL CULTIVO HIDROPÓNICO

Las semillas se esterilizaron superficialmente por inmersiones sucesivas en etanol al 70% durante 5 min, seguida en una solución de cloro comercial (Cloralex®: agua, 1:5 v/v) por 10 min y enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se transfirieron a frascos tarro con el medio nutritivo sólido de Murashige y Skoog (1962) al 50%, complementado con 1.5% (p/v) de sacarosa, ajustado a pH 5.7 y 0.3% (p/v) de fitagel. Las plántulas de ocho semanas de edad (5 cm de altura) se aclimatizaron a condiciones *ex vitro* como lo describe Osuna et al. (2008), para lo cual se utilizaron sistemas hidropónicos que consistían en recipientes de plástico (cubiertos con bolsas de plástico transparentes para prevenir la desecación) con 60 ml de solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada a la siguiente composición: 13 mM  $\text{NO}_3^-$ , 6 mM  $\text{K}^+$ , 4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 1 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 46.2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 17.9  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{K}_2\text{EDTA}$ , 9.1  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$ , 0.76  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ , 0.31  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  y 0.10  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  a pH 5.8. La solución nutritiva se renovó cada 7 días y la humedad relativa se redujo gradualmente hasta que las bolsas de plástico se retiraron de las plantas. Después de 4 semanas, las plantas se transplantaron en vasos de plástico de 300 ml repletos con perlita mineral, y regadas con solución nutritiva (50 ml) cada tercer día durante 4 semanas más. Las condiciones en el cuarto de incubación fueron 25 °C y fotoperíodo de luz/oscuridad (16/8 h) con irradiancia de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrados con lámparas de luz fluorescente. Treinta plantas de dieciséis semanas de edad fueron empleadas como unidades experimentales.

## ETAPA B

### 5.4 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO

Para evaluar el efecto de la intensidad de la luz y la concentración de nitrato sobre el desarrollo, y los cambios fisiológicos y bioquímicos en plantas *C. peltata*, se evaluaron nueve tratamientos (Cuadro 1) por la combinación de dos factores: irradiancia (20, 30 y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la concentración de nitrato en la solución nutritiva (13, 2 y 0.2 mM) en 3 niveles. Las condiciones control fueron 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia y 13 mM de

concentración de nitrato. Para garantizar un suministro adecuado de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , las sales eliminadas de la solución nutritiva se reemplazaron con moles equivalentes de  $K_2SO_4$  y  $CaCl_2$ . Las plantas se regaron con 50 ml de la solución nutritiva diariamente por un período de 28 días. Todos los experimentos se llevaron a cabo dentro del cuarto de incubación. Lámparas fluorescentes de luz blanca, se utilizaron para modificar la cantidad de irradiancia. Al comienzo del experimento, tres plantas se recolectaron como referencia de los valores iniciales; el resto de las muestras se colectaron el día 28.

Cuadro 1. Diseño experimental de dos factores: irradiancia y suministro de nitrato, a tres niveles cada uno. Los valores iniciales fueron muestreados como parámetros de referencia de las plantas en el día inicial (d0) y en el resto de los tratamientos al día 28 (d28).

Tratamiento	Irradiancia $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Nitrato mM
d0		
A (inicial)	30	13
d28		
B	20	13
C	20	2
D	20	0.2
E (control)	30	13
F	30	2
G	30	0.2
H	100	13
I	100	2
J	100	0.2

## 5.5 COSECHA Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Las plantas se separaron cuidadosamente en partes aéreas y raíces, y secadas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La masa fresca (MF) y la masa seca (MS) de cada muestra se obtuvieron mediante el uso de la balanza analítica, y de los valores de MS se obtuvo la relación de raíz-brote (RRB) en  $\text{g g}^{-1}$ .

## **5.6 ANÁLISIS QUÍMICOS**

### **5.6.1 Obtención de extractos**

Las muestras secas (partes aéreas y raíces) y finamente molidas (0.2 g), se extrajeron en forma separada vía maceración con metanol (1:100, p/v) durante 24 h a temperatura ambiente, repitiendo el proceso tres veces. Los extractos se filtraron con papel filtro (Whatman No. 1), se reunieron y concentraron a sequedad con presión reducida y almacenados en frascos de vidrio (Nicasio et al. 2005; Nicasio-Torres et al. 2009).

### **5.6.2 Cuantificación de fenólicos solubles totales (FT)**

El contenido de FT en los extractos metanólicos se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Cai et al. 2004; Silva et al. 2007). Los extractos se re-disolvieron en metanol ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y oxidados con el reactivo de Folin-Ciocalteu (10% v/v); después de 10 minutos, la reacción se alcalinizó con la solución de carbonato de sodio (8%, w/v), se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente ( $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se midió la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro Jenway 6305. La cuantificación se realizó sobre la base de la curva estándar de ACG y los resultados se expresaron como mg de FT equivalentes (eq) de ACG por g MS, así como mg (eq) de ACG por planta.

### **5.6.3 Evaluación de la actividad antioxidante (AA)**

La evaluación de la AA de los extractos se llevó a cabo por el método ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2-azinobis 3-etilbencetiazolina-6-sulfónico) descrito por Re et al. (1999). El catión radical ABTS<sup>+</sup> se generó por reacción de 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato de potasio, después de incubar a temperatura ambiente ( $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y oscuridad durante 16 h. La solución ABTS<sup>+</sup> se diluyó con agua a una absorbancia de  $0.700 \pm 0.050$  a 734 nm (espectrofotómetro Jenway 6305). Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de los extractos re-disueltos en

metanol ( $1.58 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y se mezclaron con 1 ml de solución ABTS<sup>+</sup>. La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos e inmediatamente se leyó la absorbancia a 734 nm. Las soluciones estándar de ACG en metanol ( $0\text{--}200 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) se prepararon y analizaron en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron en términos de actividad antioxidante equivalente (eq) de ACG por g MS.

#### **5.6.4 Cuantificación de ácido clorogénico (ACG) e isoorientina (ISO)**

El análisis del contenido de ACG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) e ISO (Indofine Chemical Co., Inc., Estados Unidos) se realizó por HPLC empleando un equipo Waters (módulo de separación 2695) y un controlador de sistema (software de administrador del sistema del Milenio) en las condiciones establecidas previamente por Nicasio-Torres et al. (2009). Muestras de 60  $\mu\text{l}$  se eluyeron en una columna Spherisorb ODS-2 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) a una velocidad de flujo de 1 ml  $\text{min}^{-1}$  con un gradiente binario de fases móviles: (A)  $\text{H}_2\text{O}$ -( $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.5%) y (B)  $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1) con duración de 32 min. La identificación de los picos en las muestras analizadas se determinó mediante la comparación de los tiempos de retención y sus espectros de absorción al UV con el de los estándares. Las curvas de calibración se construyeron con soluciones estándar de 20, 40, 80 y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de ACG e ISO en metanol y se monitoreo a 300 nm empleando un detector de arreglos de fotodiodos Waters 2996. El análisis por regresión lineal basados en el área de los picos de los estándares utilizados mostraron un  $R^2 = 0.999$ .

### **5.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO-LIASA (PAL)**

La extracción de PAL y la evaluación de su actividad se determinó por el método descrito por Kováčik y Bačkor (2007), con algunas modificaciones. Las muestras frescas (0.2 g) se trituraron en el homogenizador de tejidos durante 50 s con 3 ml de buffer de boratos 0.1 M (pH 8.8) en frío, conteniendo también 20 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. La mezcla se mantuvo durante 30 min en un baño de hielo (4 °C); se centrifugó a 12.500 rpm a 4 °C durante 20 min, y el extracto final se utilizó para el ensayo enzimático. El

extracto (0.5 ml) se mezcló con 2.1 ml de búfer de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) y pre-incubado a 40 °C durante 5 min; posteriormente, se inició la reacción por la adición de 0.3 ml de L-fenilalanina 100 mM. Después de 1 h de incubación a 40 °C, la reacción se detuvo por la adición de 0.1 ml de HCl 6 N. Simultáneamente, el blanco para cada muestra se llevó a cabo con 2.4 ml de borato de sodio 0.1 M (pH 8.8), 0.5 ml del extracto y 0.1 ml de HCl 6 N. Después de 1 h, se midió el cambio de absorbancia a 277 nm. La actividad enzimática fue reportada como  $U\ g^{-1}$  de masa fresca (MF), donde  $U$  = diferencia de absorbancia después de 1 h a 277 nm  $h^{-1}$ .

## 5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se consideraron significativos los valores de  $p \leq 0.05$ . Las diferencias significativas entre tratamientos fueron calculadas mediante la prueba de Tukey. Después de la regresión lineal de los datos de FT vs AA, se obtuvo el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) junto con su valor de  $p$ ; correlaciones con valores de  $p \leq 0.01$  fueron consideradas significativas (SAS, 9.1; SAS Institute, Inc.).

## Etapa C

### 5.9 CINÉTICA EN PARTES AÉREAS: CRECIMIENTO Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS

De los nueve tratamientos aplicados en la etapa anterior (Cuadro 1), se eligieron cuatro tratamientos: 30/13, 30/0.2, 100/13 y 100/0.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mM}$  (irradiancia/nitrato, respectivamente) para evaluar con respecto al tiempo (cinéticas), el cambio en el crecimiento y otros parámetros bioquímicos en las partes aéreas de *C. peltata*. Al comienzo del experimento, tres plantas se tomaron como referencia de los valores iniciales, el resto de las muestras (3 por cada tratamiento) se colectaron a tiempos de: 7, 14, 21 y 28 días de cultivo.

## 5.10 COSECHA Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Para la evaluación de los parámetros vegetativos (biomasa fresca y biomasa seca), las partes aéreas de las plantas se separaron cuidadosamente y enseguida se procesaron como se describió en la etapa B.

## 5.11 ANÁLISIS QUÍMICOS

De los extractos metanólicos del material vegetal seco (partes aéreas) se realizó el análisis del contenido de compuestos fenólicos solubles totales, actividad antioxidante y fenólicos individuales como se describió en la etapa B.

### 5.11.1 Contenido de lignina total

El contenido de lignina se midió mediante el método Klason, como lo describe Ma (2007) con algunas modificaciones. El residuo sólido resultante de la maceración se secó y se pesó; se tomaron 200 mg del residuo seco y se hidrolizó en 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72 % (v/v) a 25 °C, durante 3 h con agitación ocasional. El hidrolizado se diluyó con 190 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se puso en autoclave a 120 °C durante 1 h. Después de enfriar, se filtró con papel filtro (Whatman No. 1), y se enjuagó el filtrado con 50 ml de agua fría. El residuo sólido correspondiente a la lignina insoluble, se secó a temperatura ambiente y se pesó. La solución filtrada se diluyó hasta 500 ml y se midió la absorbancia a 205 nm; se calculó la lignina soluble en ácido por la siguiente fórmula: lignina soluble (g l<sup>-1</sup>) = Abs<sub>205</sub>/110. La lignina total se obtuvo por la suma de la lignina insoluble en ácido y la lignina soluble. La lignina total se reportó como g de lignina Klason por g de MS



## **5.12 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS**

### **5.12.1 Actividad de PAL**

Del material fresco se evaluó la actividad de la enzima PAL como se describió en la etapa B.

### **5.12.2 Cuantificación de peróxido de hidrógeno**

El contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se determinó por el complejo  $H_2O_2$ -titanio como resultado de la reacción del tejido- $H_2O_2$  con tetracloruro de titanio por el método de Brennan y Frenkel (1977).

### **5.12.3 Análisis de peroxidación de lípidos**

La peroxidación lipídica en hojas se determinó por el contenido de malondialdehído (MDA) mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) como lo describe Heath y Packer (1968). El equivalente de MDA se calculó a partir de la diferencia de absorbancia a 532 y 600 nm utilizando el coeficiente de extinción de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## **5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

De cada parámetro, en el punto de muestreo que presentó mayor diferencia entre los promedios de los tratamientos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA); los valores de  $p \leq 0,05$  se consideraron significativos. Diferencias significativas entre tratamientos con respecto al control se calcularon mediante la prueba de Tukey (SAS, 9.1; SAS Institute, Inc.).

## VI RESULTADOS

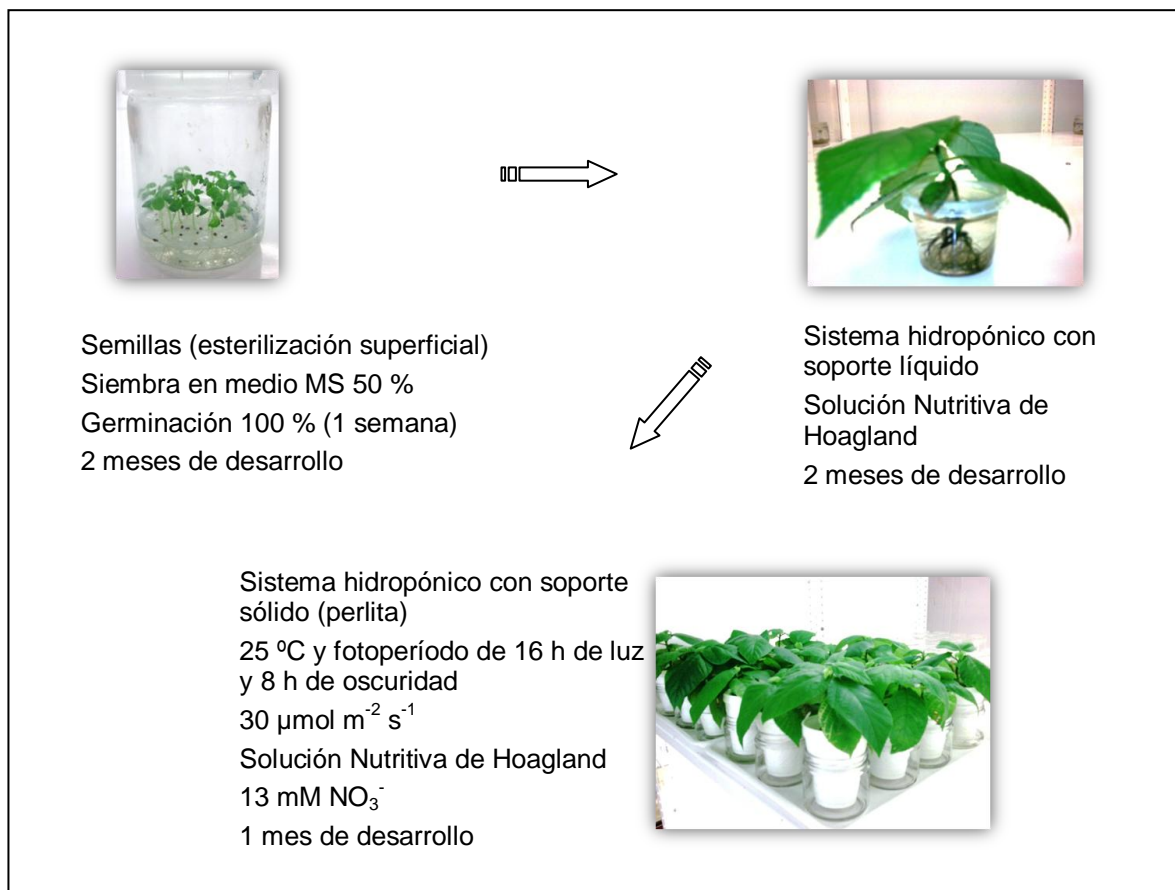


### ETAPA A

#### 6.1 OBTENCIÓN DEL CULTIVO HIDROPÓNICO DE *C. peltata*

Para el establecimiento del cultivo hidropónico de plantas de *C. peltata* se siguió la metodología que se ilustra en la Figura 5. Se inició con la germinación *in vitro* a 25 °C y fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, con una irradiancia de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; las plántulas generadas se conservaron en las condiciones *in vitro* durante un periodo de 2 meses.

Figura 5. Diagrama de obtención de los lotes experimentales de plantas de *C. peltata* en sistema hidropónico y condiciones controladas.



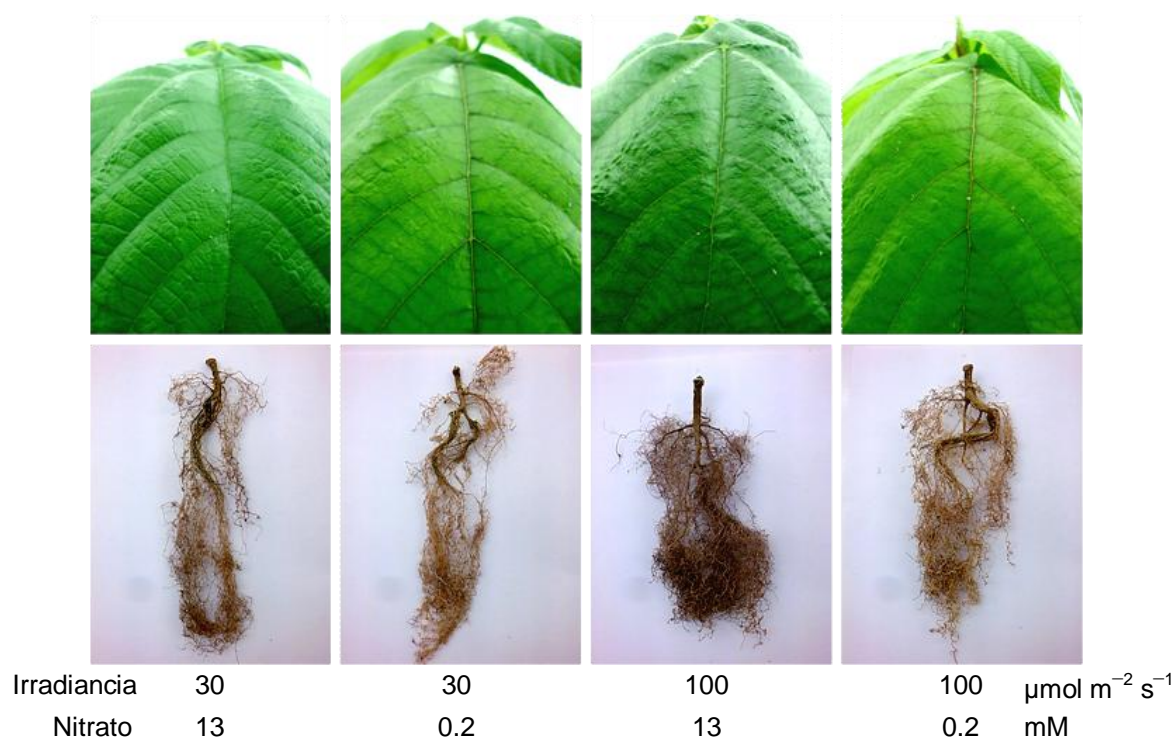
Posteriormente, se procedió a la aclimatización de las plántulas a condiciones *ex vitro* mediante un sistema hidropónico (2 meses) en las mismas condiciones de cultivo. Las plantas obtenidas al término de este proceso (5 meses) fueron manejadas como unidad experimental. Se obtuvieron lotes de plantas en cultivo hidropónico con soporte sólido, para cada grupo de parámetros a evaluar se utilizaron 3 ejemplares como repeticiones en cada tratamiento, en las diferentes fases experimentales.

## Etapa B

### 6.2 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

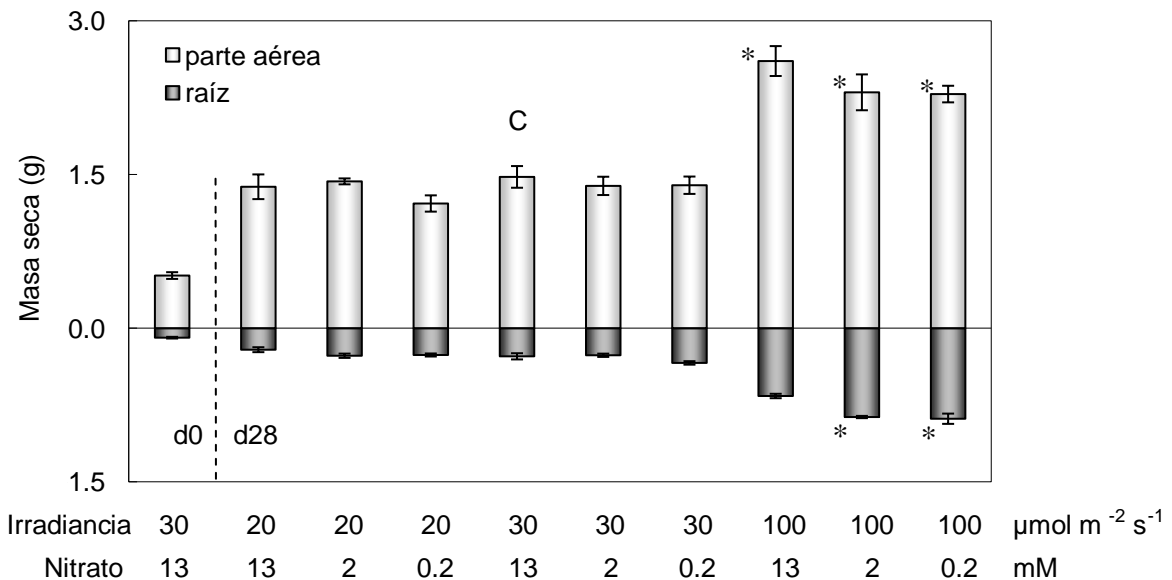
Las plantas a 30 y 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia en condiciones de deficiencia de nitrato, presentaron hojas con clorosis (amarillamiento) y una tonalidad rojiza en el área del tejido vascular (Figura 6). Del mismo modo, se observó que las plantas desarrolladas en los tratamientos de mayor irradiancia, presentaron raíces secundarias más abundantes después de 28 días de cultivo.

Figura 6. Características físicas de hojas y raíces de plantas de *Cecropia peltata*, desarrolladas bajo dos condiciones de irradiancia y niveles de nitrato después de 28 días de cultivo.



Con respecto al crecimiento, bajo las condiciones control (irradiancia  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y nitrato  $13 \text{ mM}$ ), la biomasa seca de partes aéreas y raíces (Figura 7) aumentó casi 3-veces al final del experimento con respecto a la biomasa inicial (d0). En las partes aéreas, después de 28 días, no se encontraron diferencias significativas de masa seca (MS) entre los tratamientos de baja irradiancia ( $20$  y  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); sin embargo, en los tratamientos con mayor irradiancia ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), la MS aumentó significativamente ( $F = 87.68$ ;  $p < 0.0001$ ;  $Tukey_{0.05} = 0.22$ ), hasta 1.7 veces más que el control. Bajo esta condición de mayor irradiancia, se observó una reducción no significativa en la acumulación de MS por la disminución de la concentración de nitrato ( $2$  y  $0.2 \text{ mM}$ ). En las raíces, el análisis estadístico mostró que la acumulación de biomasa resultó de la interacción entre la mayor irradiancia y la menor concentración de nitrato ( $F_{3 \times 3} = 5.92$ ;  $p = 0.0032$ ). En el tratamiento con irradiancia más alta, en un efecto contrario a la tendencia observada en las partes aéreas, la MS aumentó por efecto de la disminución de la concentración de nitrato.

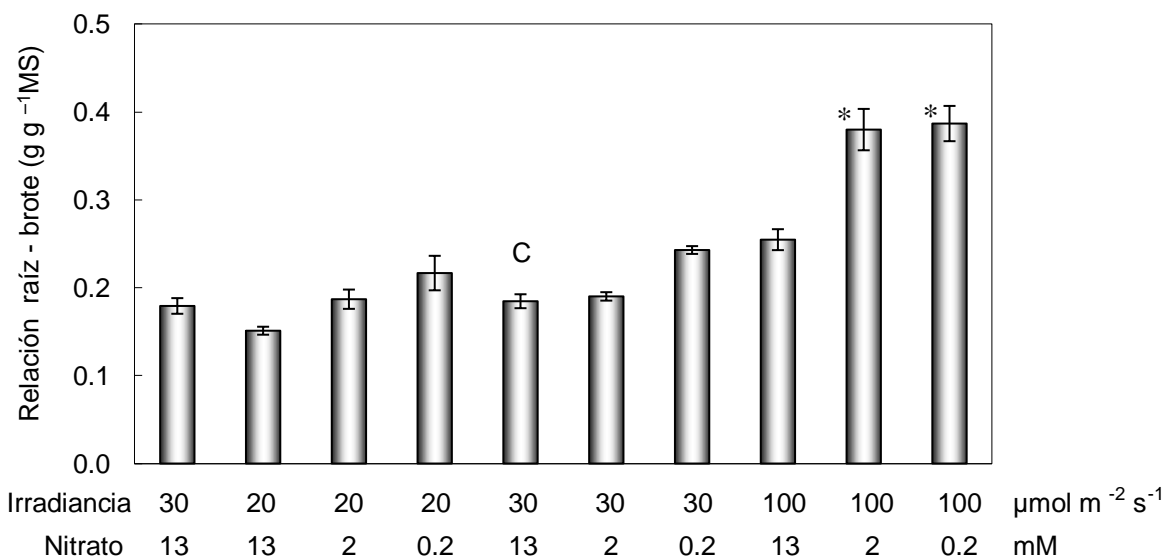
Figura 7. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de masa seca en partes aéreas y raíces de plantas de *Cecropia peltata* cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Por medio del parámetro relación-raíz-brote (RRB) (Figura 8), se analizó la diferencia de crecimiento entre partes aéreas y raíces. En el control, a los 28 días de cultivo, se obtuvo una relación similar a la del inicio (d0). Del mismo modo, en los tratamientos de baja-irradiancia (20 y 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se encontraron diferencias significativas en RRBs a los 28 días con respecto al control; por el contrario, en los tratamientos de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la relación entre la RRB aumentó de manera significativa ( $F = 111.76$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\text{Tukey}_{0.05} = 0.02$ ) hasta casi 2-veces, y fue favorecido por la disminución de la concentración de nitrato ( $F = 29.37$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\text{Tukey}_{0.05} = 0.02$ ).

Figura 8. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la relación-raíz-brote (RRB) en plantas de *Cecropia peltata* cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

### 6.3 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD DE PAL

La acumulación de compuestos fenólicos solubles totales (FT) se determinó en partes aéreas y en raíces (Cuadro 2 y 3). Al inicio (d0) del experimento, la concentración de FT en partes aéreas fue 1.8-veces mayor que el de las raíces, la cual aumentó a 2.3-veces al final del estudio (d28) bajo las condiciones control (irradiancia  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y nitrato 13 Mm). La abundancia de ACG en partes aéreas es notable; al principio (d0), un contenido 2-veces mayor que el de las raíces; sin embargo, a los 28 días, esta relación aumento de 6- a 8-veces en los diferentes tratamientos. Por otro lado, como una tendencia general, la actividad de PAL fue mayor en las raíces que en partes aéreas.

Cuadro 2. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en el contenido de fenólicos solubles totales (FT), actividad antioxidante (AA), ácido clorogénico (ACG), y actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL), en partes aéreas de plantas de *Cecropia peltata*.

Tratamiento		FT (mg eqACG $\text{g}^{-1}$ MS)	AA (mg eqACG $\text{g}^{-1}$ MS)	ACG (mg $\text{g}^{-1}$ MS)	PAL (U $\text{g}^{-1}$ MF)
Irradiancia ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Nitrato (Mm)				
d0					
30	13	$5.66 \pm 0.85$	$7.38 \pm 1.07$	$0.16 \pm 0.04$	$2.79 \pm 0.04$
d28					
20	13	$7.04 \pm 1.84$	$6.13 \pm 0.95$	$0.12 \pm 0.05$	$1.86 \pm 0.52$
20	2	$3.40 \pm 0.24$	$4.21 \pm 0.48$	$0.07 \pm 0.01$	$1.98 \pm 0.36$
20	0.2	$6.33 \pm 0.81$	$5.72 \pm 0.81$	$0.17 \pm 0.03$	$1.89 \pm 0.56$
30 control	13	$5.21 \pm 1.59$	$4.94 \pm 0.94$	$0.14 \pm 0.09$	$1.86 \pm 1.01$
30	2	$5.95 \pm 0.96$	$5.29 \pm 0.48$	$0.07 \pm 0.02$	$1.56 \pm 0.80$
30	0.2	$8.64 \pm 1.36$	$9.25 \pm 1.09$	$0.25 \pm 0.06$	$1.80 \pm 0.28$
100	13	$6.68 \pm 1.84$	$7.74 \pm 1.62$	$0.20 \pm 0.10$	$3.06 \pm 0.41$
100	2	$8.45 \pm 0.77$	$7.99 \pm 0.54$	$0.23 \pm 0.07$	$3.35 \pm 1.49$
100	0.2	$13.29 \pm 1.51$	$13.78 \pm 2.18$	$0.70 \pm 0.15$	$4.38 \pm 0.48$

Las plantas fueron cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28). Los valores representan la media (n=3)  $\pm$  error estándar (EE).

Como una importante tendencia en partes aéreas, se observó que FT, AA y contenido ACG aumentó conforme aumentó la irradiancia y la concentración de nitrato disminuye (Cuadro 2), un efecto contrario a la acumulación de biomasa (Figura 7). Incrementos significativos en los parámetros FT, AA y ACG de las partes aéreas (Cuadro 4) fueron obtenidos bajo la condición de mayor irradiancia ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la menor concentración de nitrato (0.2 Mm); mientras que la actividad de PAL aumentó significativamente sólo con la mayor irradiancia.

Con respecto a las raíces, ninguno de los factores evaluados afectó la actividad de PAL (Cuadros 3 y 4). Incrementos significativos en los parámetros de FT y AA se obtuvieron bajo la condición de mayor irradiancia ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y menor concentración de nitrato (0.2 Mm). El contenido de ACG en raíces sólo aumentó por el efecto de la mayor irradiancia (Cuadro 4).

Cuadro 3 Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en el contenido de fenólicos solubles totales (FT), actividad antioxidante (AA), ácido clorogénico (ACG), y actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL), en raíces de plantas de *Cecropia peltata*.

Tratamiento		FT (mg eqACG $\text{g}^{-1}$ MS)	AA (mg eqACG $\text{g}^{-1}$ MS)	ACG (mg $\text{g}^{-1}$ MS)	PAL (U $\text{g}^{-1}$ MF)
Irradiancia ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Nitrato (Mm)				
d0					
30	13	$3.18 \pm 0.50$	$5.89 \pm 1.36$	$0.08 \pm 0.00$	$3.23 \pm 0.19$
d28					
20	13	$1.82 \pm 0.14$	$3.21 \pm 0.60$	$0.02 \pm 0.01$	$3.06 \pm 0.34$
20	2	$2.45 \pm 0.21$	$3.15 \pm 0.21$	$0.02 \pm 0.00$	$3.02 \pm 0.12$
20	0.2	$2.91 \pm 0.44$	$4.21 \pm 0.39$	$0.04 \pm 0.01$	$3.25 \pm 0.03$
30 control	13	$2.19 \pm 0.05$	$2.89 \pm 0.48$	$0.02 \pm 0.00$	$3.01 \pm 0.06$
30	2	$2.23 \pm 0.25$	$3.79 \pm 0.78$	$0.02 \pm 0.00$	$2.95 \pm 0.50$
30	0.2	$2.53 \pm 0.17$	$3.99 \pm 0.50$	$0.04 \pm 0.01$	$2.50 \pm 0.20$
100	13	$2.34 \pm 0.26$	$4.39 \pm 0.34$	$0.01 \pm 0.00$	$3.84 \pm 0.79$
100	2	$2.92 \pm 0.28$	$4.36 \pm 0.80$	$0.01 \pm 0.00$	$3.14 \pm 0.22$
100	0.2	$5.34 \pm 0.94$	$7.37 \pm 1.19$	$0.09 \pm 0.03$	$3.02 \pm 0.18$

Las plantas fueron cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28). Los valores representan la media ( $n=3$ )  $\pm$  error estándar (EE).

Cuadro 4 Resumen de los resultados de ANOVA para los parámetros evaluados de partes aéreas (Pa) y raíces (Ra) en plantas de *Cecropia peltata* debido al efecto combinado de dos factores: irradiancia y concentración de nitrato (I\*N= interacción irradiancia-nitrato).

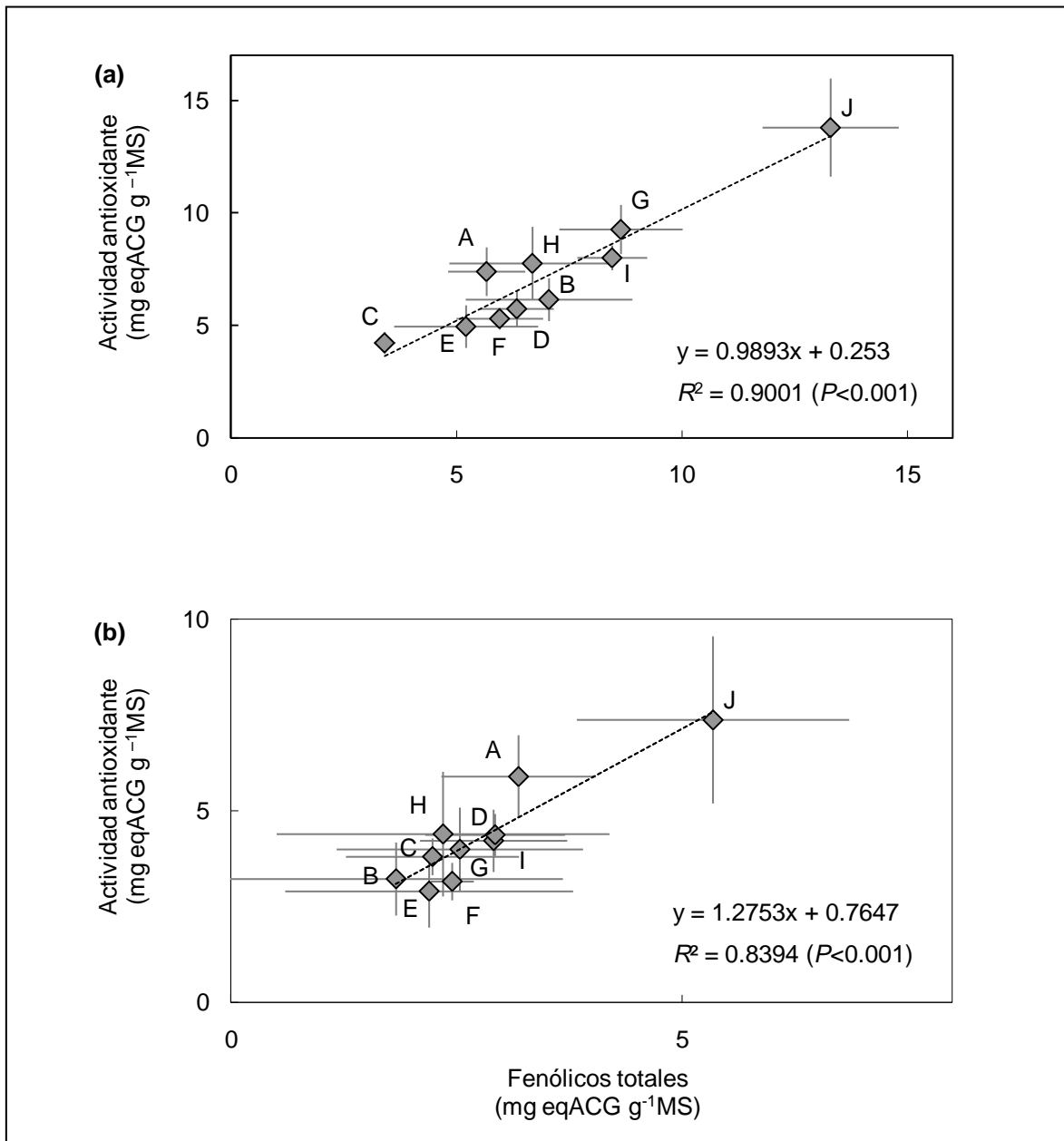
Parámetro		Irradiancia ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )				Nitrato (Mm)				I*N
		20	30	100	F (P)	13	2	0.2	F (P)	F (P)
Fenólicos totales (mgACGeq g <sup>-1</sup> MS)	Pa	5.59 b	6.60 b	9.47 a	6.93 (0.0059)	5.93 b	6.31 b	9.42 a	6.27 (0.0086)	ns
	Ra	2.32 b	2.39 b	3.53 a	8.97 (0.0020)	2.12 b	2.53 b	3.59 a	11.10 (0.0007)	3.60 (0.0200)
Actividad antioxidante (mgACGeq g <sup>-1</sup> MS)	Pa	5.35 b	6.49 b	9.84 a	12.39 (0.0004)	5.83 b	6.27 b	9.58 a	9.62 (0.0014)	ns
	Ra	3.52 b	3.56 b	5.37 a	7.83 (0.0036)	3.50 b	3.77 b	5.19 a	5.77 (0.0116)	ns
Ácido clorogénico (mg g <sup>-1</sup> MS)	Pa	0.12 b	0.15 b	0.37 a	9.67 (0.0014)	0.11 b	0.14 b	0.37 a	10.44 (0.0010)	ns
	Ra	0.01 b	0.02 b	0.06 a	10.52 (0.0009)	0.02	0.03	0.04	ns	ns
Actividad de PAL (U g <sup>-1</sup> MF)	Pa	1.74 b	1.91 b	3.59 a	5.55 (0.0133)	2.26	2.29	2.69	ns	ns
	Ra	2.82	3.11	3.13	ns	2.92	3.03	3.10	ns	ns

Los valores representan la media ( $n=9$ ) y son significativamente diferentes cuando son seguidos de letras diferentes en cada fila, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ); ns = no significativo.

El análisis de regresión lineal entre los contenidos de FT y la AA en los diferentes tratamientos de combinaciones de irradiancia y nitrato (Cuadro 1, Figura 9), se mostró que hay una correlación positiva significativa en partes aéreas ( $R^2 = 0.9$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ) y en raíces ( $R^2 = 0.8$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ). Al comparar las ecuaciones lineales de partes aéreas ( $y = 0.9893x + 0.253$ ) y raíces ( $y = 1.2753x + 0.7647$ ), se resalta el valor más alto de la pendiente en la ecuación que corresponde a las raíces.



Figura 9. Relación entre la actividad antioxidante y los fenólicos solubles totales de extractos de partes aéreas (a) y raíces (b) de plantas de *Cecropia peltata* desarrolladas con diferentes irradiancias y concentraciones de nitrato.

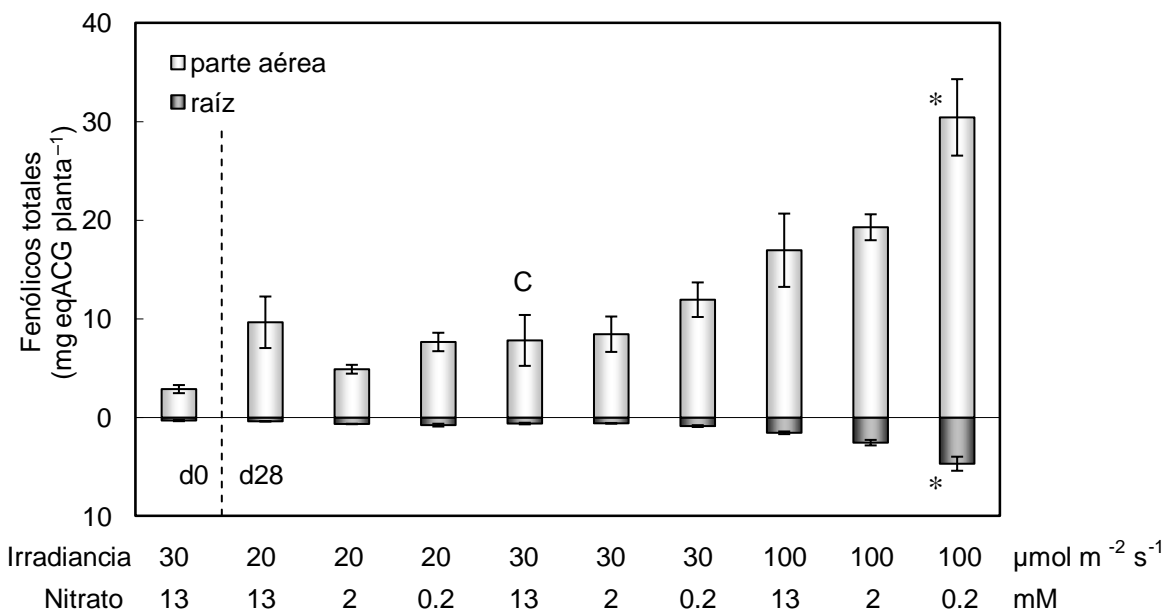


La línea 'mejor-ajustada' se generó por regresión lineal de los datos ( $n=10$ ). Las barras verticales y horizontales representan el error estándar (EE) de las medias ( $n=3$ ).

En las Figuras 10 y 11 están representados los rendimientos totales de FT y ACG en las diferentes condiciones de estudio. La acumulación de fenólicos es mayor en las partes aéreas (6.5-veces) que en raíces (Figura 10).

Los niveles de FT en partes aéreas aumentaron considerablemente en razón de la mayor irradiancia ( $F = 33.99$ ;  $p < 0.0001$ ;  $Tukey_{0.05} = 4.97$ ) y la menor concentración de nitrato ( $F = 5.34$ ;  $p = 0.0151$ ;  $Tukey_{0.05} = 4.97$ ). Con un incremento de 3.8-veces en partes aéreas y 7.6-veces en raíces con respecto al control. En el rendimiento de raíces, se determinó una interacción entre la mayor irradiancia y la menor concentración de nitrato ( $F_{3 \times 3} = 9.76$ ;  $p = 0.0002$ ;  $Tukey_{0.05} = 0.55$ ).

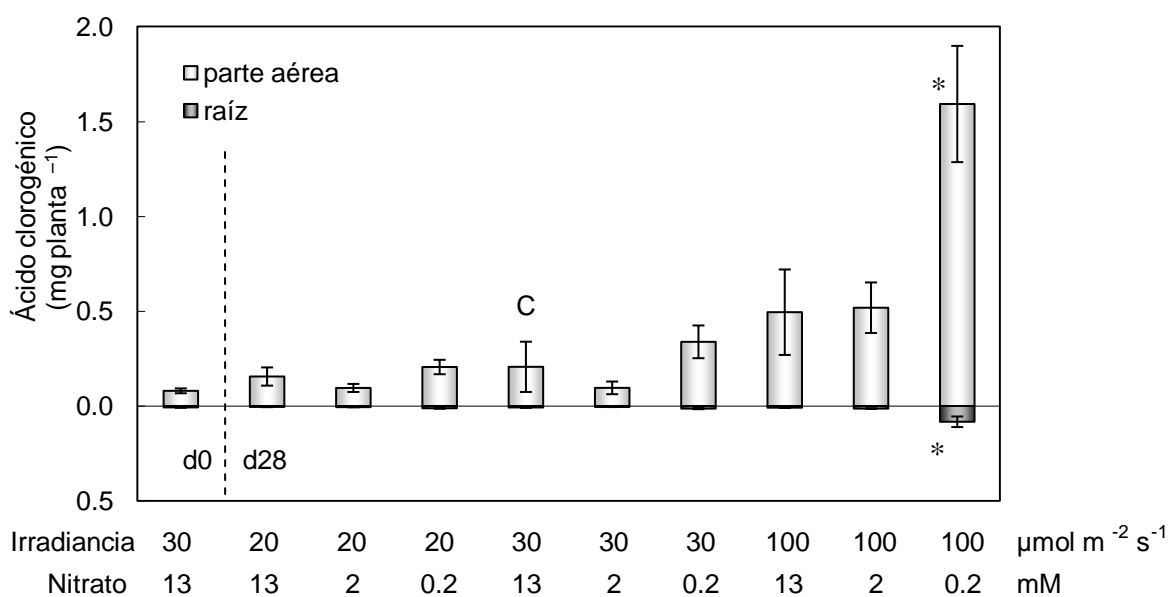
Figura 10. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de fenólicos totales (FT) en partes aéreas y raíces de plantas de *Cecropia peltata* cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Con respecto a ACG (Figura 11) los mayores incrementos se obtuvieron también por la mayor irradiancia y menor concentración de nitrato. El incremento en partes aéreas fue de 7.7-veces y de 10.4-veces en raíces en relación al control. Además, al término del tratamiento (d28), en la condición de mayor irradiancia y menor concentración de nitrato, el contenido de ACG en partes aéreas fue 19.2-veces mayor que en la raíz, lo que representa una diferencia muy importante en el rendimiento de fenólicos en partes aéreas. Cabe señalar que estas mismas condiciones permitieron también obtener la mayor biomasa en la planta (Figura 7).

Figura 11 Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de ácido clorogénico (ACG) en partes aéreas y raíces de plantas de *Cecropia peltata* cosechadas al inicio (d0) y al final del experimento (d28).

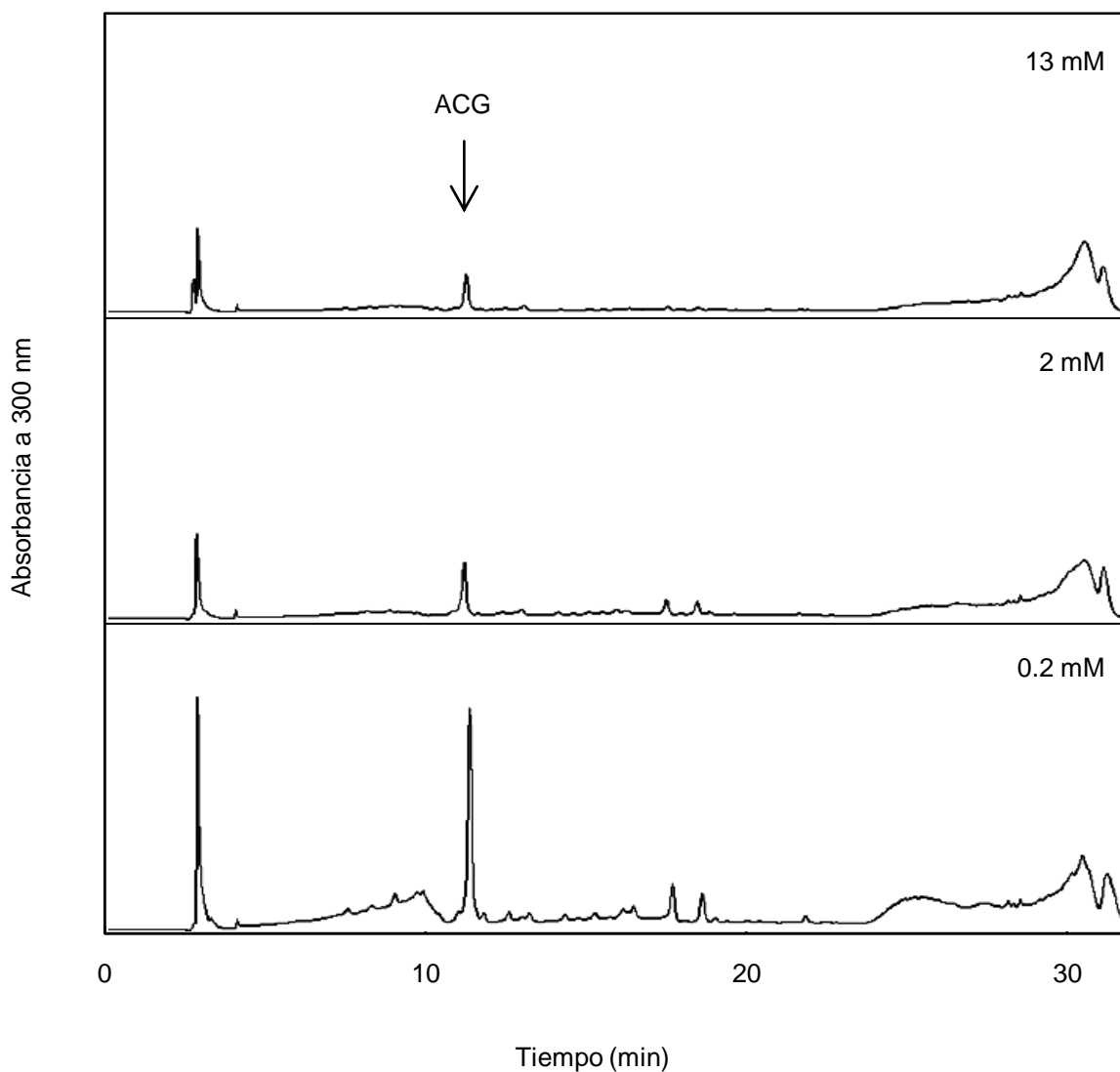


Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

En la Figura 12, se muestran los perfiles cromatográficos de extractos metanólicos de partes aéreas obtenidos bajo la condición de mayor irradiancia; donde se observa una tendencia general de aumento de la señal de la ACG (tiempo de retención = 11.0–11.9 min;  $\lambda_{\text{max}} = 326 \text{ nm}$ ) conforme disminuye la concentración de nitrato. El flavonoide ISO

(tiempo de retención = 16.0–16.5 min;  $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm) presentó niveles bajos que no pudieron ser cuantificados en las condiciones del sistema empleado. En las partes aéreas se observaron dos señales similares a ISO, que por su tiempo de retención (17.7 y 18.6 min) y longitud de máxima absorción en UV ( $\lambda_{\text{max}} = 337$  y 339 nm), podrían corresponder a compuestos relacionados estructuralmente a ISO.

Figura 12. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de extractos metanólicos de partes aéreas de plantas de *Cecropia peltata* desarrolladas en  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia y tres diferentes niveles de nitrato (13, 2 y 0.2 mM). Los contenidos de ácido clorogénico (ACG) corresponden a la señal del pico (tr = 11.0 –11.9 min;  $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm).



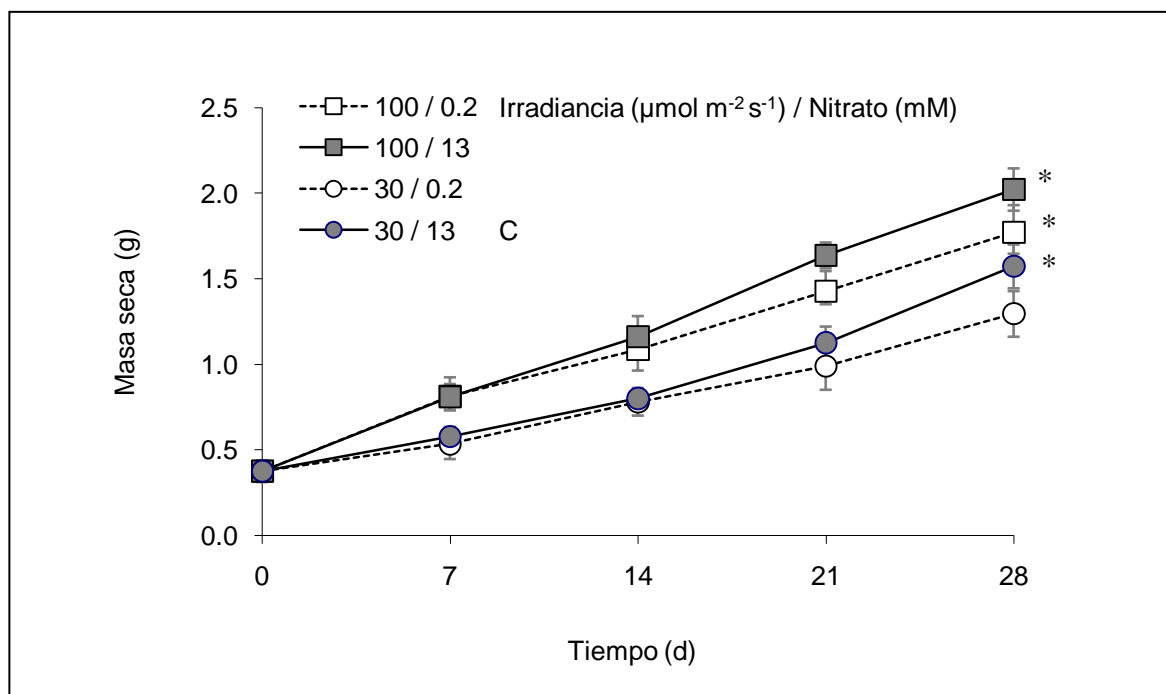
## Etapa C

### 6.4 CINÉTICA DE BIOMASA ACUMULADA EN PARTES AÉREAS

Con base en los resultados obtenidos en la etapa B, la siguiente fase de estudio se enfocó al análisis de las partes aéreas como una fuente más abundante de material vegetal y mayores rendimientos de FT y ACG.

En las cuatro combinaciones de irradiancia/nitrato (30/13, 30/0.2, 100/13 y 100/0.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/\text{mM}$ ) se observaron diferencias en el crecimiento de las plantas en el transcurso del experimento (Figura 13).

Figura 13. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de masa seca (MS) en partes aéreas de plantas de *C. peltata*, cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) en el punto de análisis, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

En los tratamientos 30/13 y 30/0.2, la acumulación de biomasa no se modificó por restricción de nitrato en los primeros 14 días; pero a partir del día 21, se observó que el desarrollo de partes aéreas es menor en las plantas cultivadas con restricción de nitrato (30/0.2).

En los tratamientos de mayor irradiancia, se obtuvo un incremento en la biomasa desde los primeros 7 días de cultivo hasta el final del estudio; en la condición de deficiencia de nitrato (100/0.2), la biomasa acumulada desde el día 14 fue menor en comparación con el que no tuvo deficiencia de nitrato (100/13). En esta condición, el incremento de biomasa seca de partes aéreas con respecto a la biomasa inicial es 1.2-veces estadísticamente superior al del control ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/13 \text{ mM}$ ).

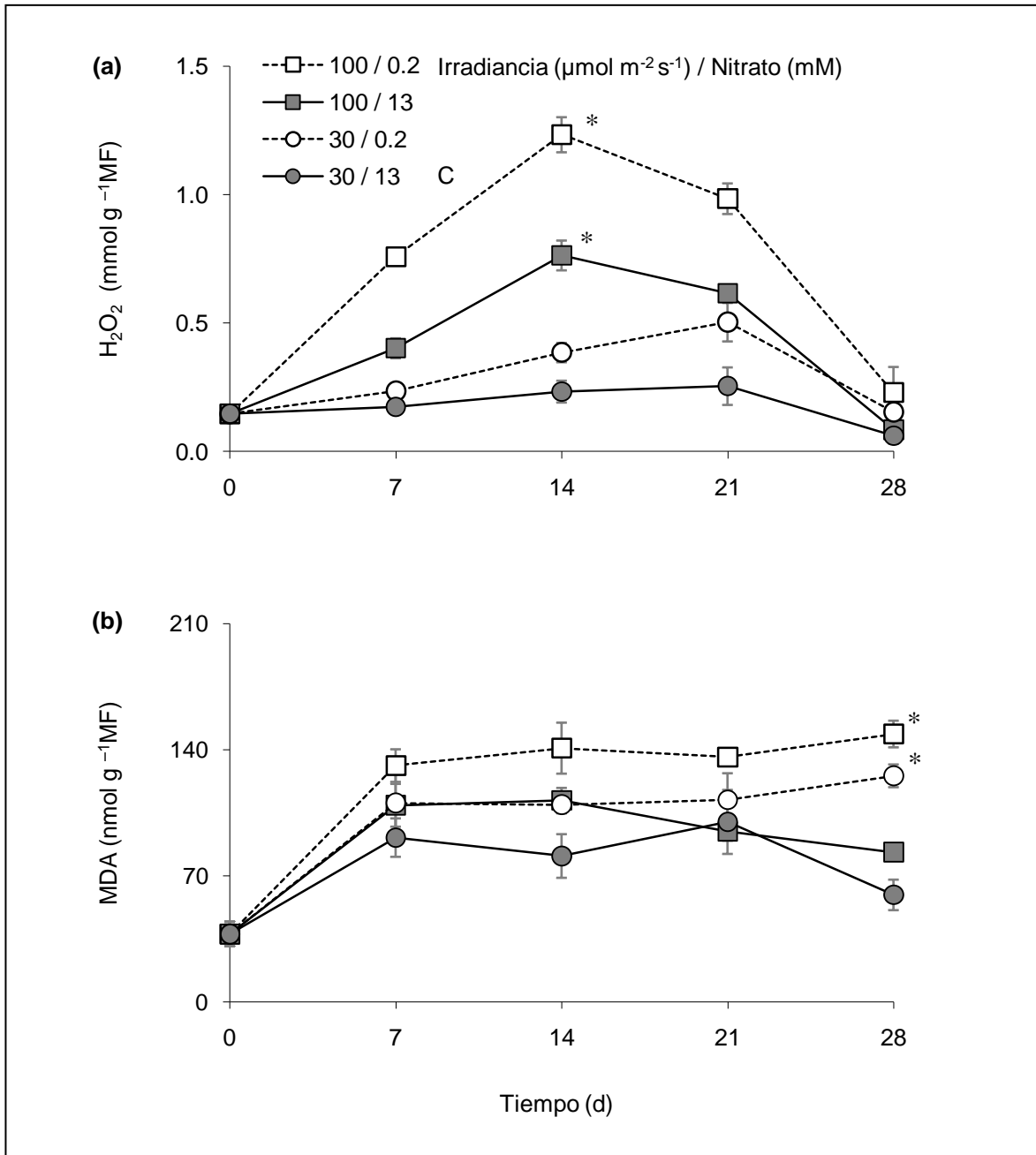
## 6.5 CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Como una referencia de la presencia de ERO, se analizó la concentración de peróxido de hidrógeno en el tejido vegetal mediante el complejo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-titanio. En las plantas control (30/13), los niveles basales se mantuvieron durante todo el periodo de cultivo (Figura 14a); en la misma condición de irradiancia con la disminución de nitrato (30/0.2), el contenido de peróxido se incrementó ligeramente a los 21 días. En las plantas desarrolladas en condiciones de mayor irradiancia, se observó que se acumulan los mayores niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el día 14, diferencias significativas de 5.3-veces (100/0.2) y 3.3-veces (100/13) superiores en comparación con el control. Posteriormente, el contenido de peróxido disminuyó hasta alcanzar los niveles basales.

Con respecto a la peroxidación de lípidos, valorado como contenido de MDA (Figura 14b), en el tratamiento 100/0.2 se produjo mayor daño en los lípidos de membrana desde el inicio y hasta el día 28, con un contenido significativamente 2.5-veces mayor que el determinado en las plantas control.

En los tratamientos 100/13 y 30/0.2, los niveles cuantificados de MDA fueron similares en los días 7 y 14; y hacia el final del experimento, en el tratamiento 100/13 los niveles de MDA disminuyeron a valores similares al control (30/13).

Figura 14. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (a) y malondialdehído (MDA) (b) en partes aéreas de plantas de *C. peltata*, cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) en el punto de análisis, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

## 6.6 CINÉTICA DE LA ACUMULACIÓN DE FENÓLICOS Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PAL

La acumulación de compuestos fenólicos solubles totales y ácido clorogénico (Figura 15), en las plantas control ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}/13 \text{ mM}$ ) se mantuvo constante durante los 28 días de cultivo.

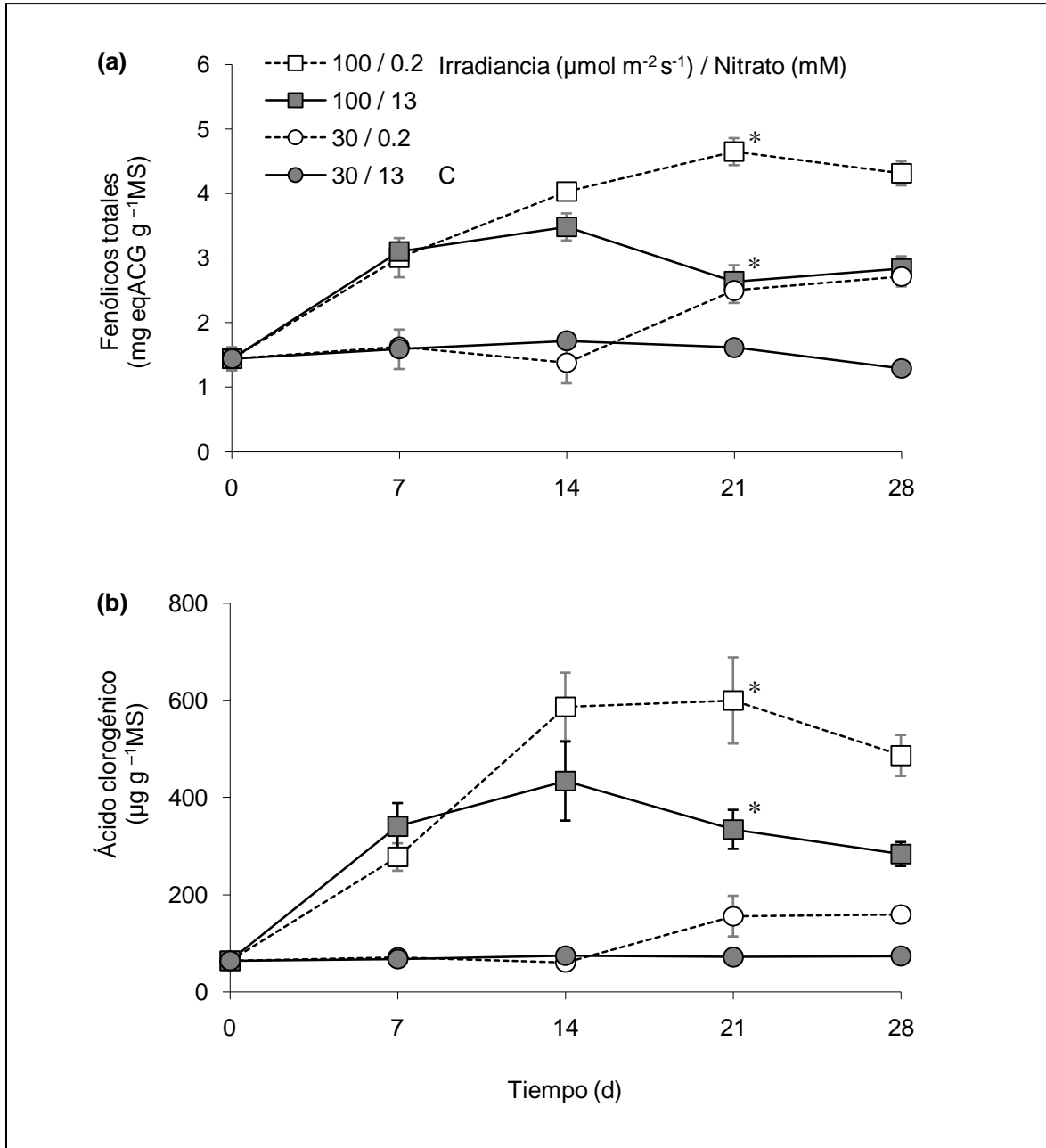
En el tratamiento de alta irradiancia sin deficiencia de nitrato (100/13), el contenido de fenólicos y ACG se incrementaron gradualmente desde el inicio hasta los 14 d; posteriormente los niveles de FT y ACG presentan una tendencia a disminuir al final del experimento. La deficiencia del contenido de nitrato (0.2 mM), favoreció la acumulación de FT y ACG. En el tratamiento 30/0.2, el incremento en los contenidos de fenólicos y ACG se presentó hasta los 21 días de cultivo. En tanto que en el tratamiento 100/0.2, los incrementos se observaron a partir del día 7 hasta el día 21; en este tratamiento se registraron los mayores niveles de estos parámetros, 2.8-veces de FT y 8.3-veces de ACG con respecto al control (Figura 15).

Al analizar el contenido de ligninas (compuestos fenólicos no solubles), con excepción del control, se observó una tendencia general de lignificación en las plantas (Figura 16a). Bajo las condiciones de 100/0.2, el contenido de ligninas se incrementó desde el día 7 hasta alcanzar el mayor contenido en el día 28, el cual fue estadísticamente superior (1.3-veces) al determinado en las plantas control. En las condiciones 100/13 y 30/0.2, los niveles cuantificados de lignina total, se incrementaron de manera similar a los 21 y 28 días.

En el tratamiento control (30/13), la actividad de la enzima PAL se mantuvo en niveles basales y al disminuir el contenido de nitrato en la misma condición de irradiancia (30/0.2), la actividad se incrementó ligeramente al día 21 de cultivo (Figura 16b). En los tratamientos de mayor irradiancia se observaron los cambios más importantes en la actividad de la enzima; el máximo de actividad enzimática se obtuvo en el día 14, con incrementos significativos de 2.5-veces (100/0.2) en comparación con el control. En esa misma condición de alta irradiancia en combinación con 13 mM de nitrato, la actividad de la PAL decayó drásticamente a valores cercanos al registrado al inicio del cultivo. En tanto que, al disminuir el contenido de nitrato a 0.2 mM, la actividad de la enzima se mantuvo alta a los 21 días y alcanzó los valores basales a los 28 días.

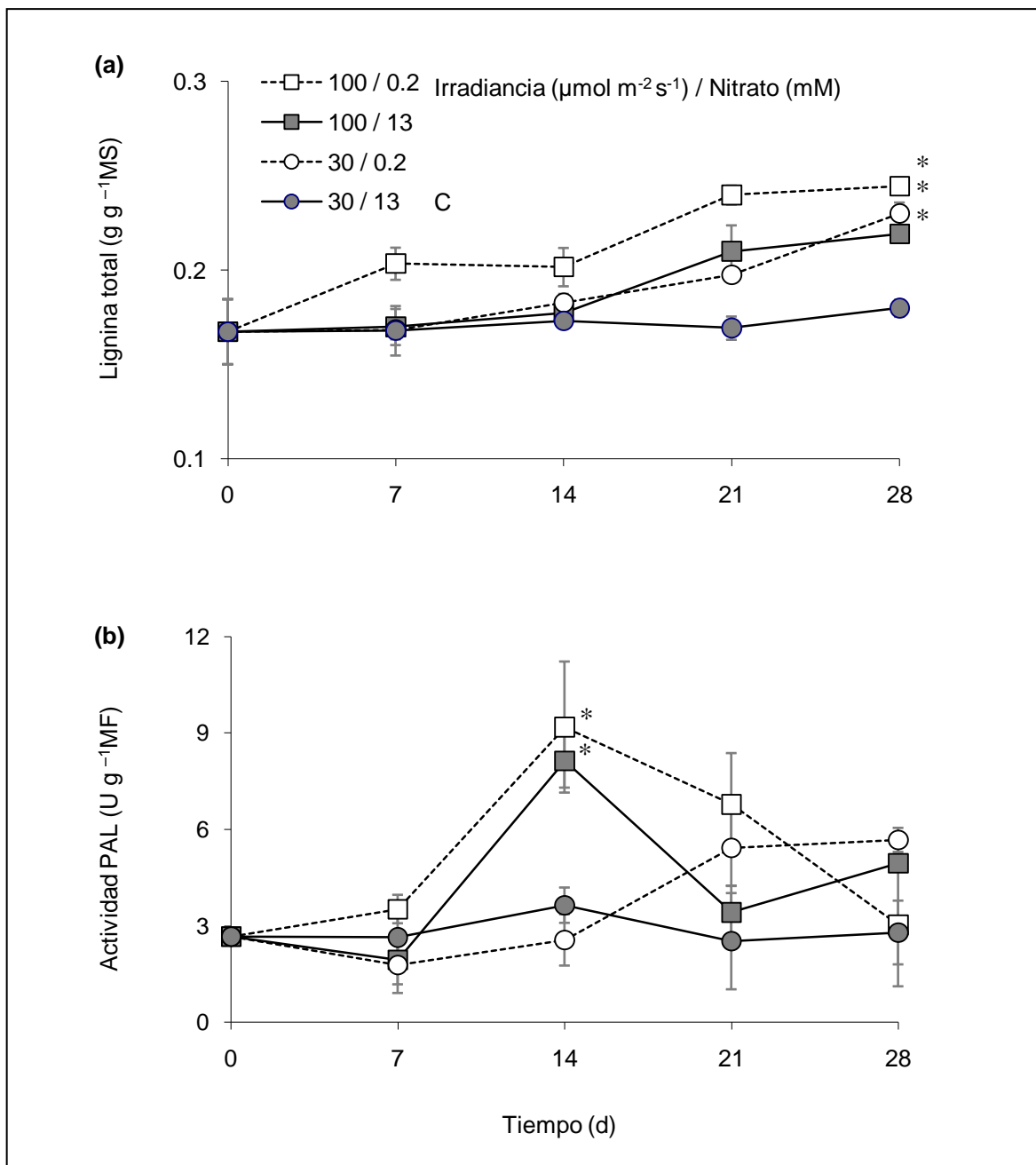


Figura 15. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de fenólicos totales (a) y ácido clorogénico (b) en partes aéreas de plantas de *C. peltata*, cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) en el punto de análisis, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Figura 16. Efectos combinados de irradiancia y suministro de nitrato en la acumulación de lignina total (a) y actividad de la enzima PAL (b) en partes aéreas de plantas de *C. peltata*, cosechadas al inicio (d0) y cada 7 días hasta el final del experimento (d28).



Las barras verticales representan el error estándar (EE) de la media ( $n=3$ ). El asterisco indica diferencia significativa con respecto al control (C) en el punto de análisis, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey.

## VII DISCUSIÓN



### 7.1 EFECTO DEL SUMINISTRO DE IRRADIANCIA EN COMBINACIÓN CON NITRATO

En las plantas control (irradiancia  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y nitrato 13 mM), la acumulación de biomasa total aumentó debido al efecto de crecimiento durante los 28 días del estudio. En relación con el resto de los tratamientos, la variación en el suministro de luz y nitrato alteró el rendimiento y la distribución de la biomasa en las plantas de *C. peltata*. Las plantas en los menores niveles de irradiancia ( $20$  y  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a pesar de no tener una limitación de nutrientes (13 mM de nitrato), el desarrollo del follaje en masa seca fue escaso (Figura 7). Durante el crecimiento, la capacidad fotosintética es dependiente de la intensidad de la luz; las plantas desarrolladas en baja irradiancia contienen una menor cantidad de sus componentes fotosintéticos y por lo tanto, una tasa inferior de fijación de  $\text{CO}_2$ , como fue reportado en plantas de arroz (Horton 2000), en *Hypericum perforatum* (Mosaleeyanon et al. 2005) y diferentes especies arbóreas (Poorter et al. 2006).

Por el contrario, bajo la misma condición de nitrato (13 mM) y con el aumento de la irradiancia hasta  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , las plantas incrementaron su biomasa significativamente, una respuesta que coincide con otros reportes en la literatura: *Dactylis glomerata* (Ryser y Eek, 2000), *Hypericum perforatum* (Mosaleeyanon et al. 2005) y *Vitis vinifera* (Grechi et al. 2007). Con el aumento de la irradiancia, la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  también aumentó; por lo tanto mayores niveles de fotosintatos están disponibles en las partes aéreas para la translocación hacia tejidos nuevos y por consiguiente el crecimiento (Horton 2000). Una característica visual de las plantas bajo el tratamiento de mayor irradiancia y alta concentración de nitrógeno, fué que el follaje presentó una tendencia a perder la turgencia relacionado con una mayor apertura de estomas, que a su vez permitió una mayor transpiración en hojas.

Bajo condiciones de mayor irradiancia, la disminución no significativa de la biomasa foliar causada por la reducción en el suministro de nitrato (2 y 0.2 mM) podría estar

relacionada con el proceso de fotoinhibición en las plantas. En las membranas tilacoides, la clorofila sobre-excitada puede conducir a la formación de oxígeno singulete (ERO), causando daños en los componentes fotosintéticos, especialmente en el fotosistema II, un efecto conocido como fotoinhibición. Se ha reportado que ocurre un cierre parcial de los estomas en condiciones de deficiencia de nitrato (Cabrera 2002); por lo tanto, la capacidad es limitada para el uso de altos niveles de luz, y las hojas absorben más energía luminosa que la requerida para la asimilación del CO<sub>2</sub> disponible.

En estos tratamientos con deficiencia de nitrato observamos una mayor turgencia en follaje, lo que sugiere una menor apertura estomática y, consecuentemente, la disminución del CO<sub>2</sub> disponible para la fotosíntesis. Otra característica importante se relaciona con los síntomas de clorosis en hojas (Figura 6), debido a la disminución del contenido de clorofila relacionado con la deficiencia de nitrógeno en los tejidos, como se menciona para plantas *Hypericum perforatum* (Briskin y Gawienowski 2001). Por otra parte, en plantas de arroz cultivadas en un ambiente de alta luminosidad, Horton (2000) refiere la disminución en el contenido de clorofila como una respuesta de foto-protección para el exceso de luz.

Las condiciones de deficiencia de nitrato (0.2 mM) favorecieron también la distribución de biomasa hacia las raíces (mayor RRB hasta casi 2.0-veces). Grechi et al (2007) mencionaron que cambios en la relación de RRB de plantas de *Vitis vinifera*, están controlados por aspectos de equilibrio en los niveles internos de C:N. López-Bucio et al. (2003), en plantas de *Arabidopsis* refiere el mismo efecto de reparto hacia las raíces y postula que nutrientes como el nitrato poseen funciones de señalización de un profundo impacto en la arquitectura del sistema radicular. Asimismo, se reportó que el nitrato no sólo ejerce un efecto sobre las raíces, sino que también tiene funciones como una señal para el metabolismo y el desarrollo de la planta entera (Takei et al. 2002; Urbanczyk-Wochniack y Fernie 2005; Miller et al. 2007).

Los resultados de este trabajo son consistentes con la hipótesis de equilibrio funcional (Marcelis y Heuvelink de 2007), en la cual la distribución de biomasa es modelada en la totalidad de la planta al presentarse una condición limitante de un recurso esencial. Por ejemplo, ante la deficiencia de nitrógeno, las plantas responden con un aumento en la aportación de biomasa hacia la raíz, que es la estructura responsable de la adquisición del elemento limitante (Wilson 1988; Grechi et al. 2007). Con estos

resultados, se ha corroborado la plasticidad de *C. peltata* para distribuir eficientemente sus recursos bajo condiciones limitadas de nutrientes.

En las partes aéreas, en los tratamientos de mayor irradiancia ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), el contenido de FT (Cuadro 2) aumentó en tanto disminuyó la concentración de nitrato (0.2 mM). La característica de la tonalidad rojiza en zonas de tejido vascular de hojas (Figura 6), podría estar relacionado con la acumulación de compuestos fenólicos (e.g. antocianinas). En estas condiciones, el aumento significativo de FT podría interpretarse en que la fotosíntesis supera a la demanda de crecimiento, y al haber un exceso de carbohidratos que se acumulan en las plantas con deficiencia de nitrato, el C asimilado está disponible para la biosíntesis de compuestos que no requieren N (por ejemplo, fenólicos).

La acumulación de fenólicos debido al incremento de luz y/o deficiencia de nitrato, ha sido reportado en diferentes especies: *Hypericum perforatum* (Briskin y Gawienowski 2001; Mosaleeyanon et al. 2005), *Gossypium hirsutum* (Coviella et al. 2002), (*Nicotiana tabacum* (Fritz et al. 2006), *Vitis vinifera* (Grechi et al. 2007), *Ilex vomitoria* (Palumbo et al. 2007), y *Solanum lycopersicum* (Le Bot et al. 2009). Bajo condiciones de alta-irradiancia y deficiencia de nitrato, el C asimilado se dirige hacia dos componentes clave: a) el incremento de la biomasa de raíces, como ya se ha mencionado, y b) hacia el aumento de los niveles de metabolitos secundarios ricos en carbono, tales como los fenólicos.

En el modelo experimental de este trabajo, la combinación de factores de alta-irradiancia y deficiencia de nitrato sugieren ser factores de estrés en plantas de *C. peltata*, mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que son moléculas fuertemente oxidantes (Laloi et al. 2006). La acumulación de ERO provoca desequilibrio redox intracelular, conocida como estrés oxidativo (Tewari et al. 2006; Khan y Panda 2008). Uno de los mecanismos celulares para evitar daños en los tejidos es la producción de compuestos de antioxidantes para la captación de ERO (Dixon y Paiva 1995; Grace y Logan 2000; Winkel-Shirley 2002; Cai et al. 2004).

De acuerdo con los resultados, en condiciones de la mayor irradiancia y menor concentración de nitrato (irradiancia  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y nitrato 0.2 mM), las partes aéreas presentan las más altas concentraciones de FT (hasta 6.5-veces) en comparación con el

contenido de las raíces, lo que sugiere que el nivel de estrés oxidativo en partes aéreas es mayor debido a que están expuestas directamente a la luz, mientras que las raíces no, por lo tanto, requieren niveles más bajos de la respuesta antioxidante. Los análisis de correlación sugieren que los compuestos fenólicos contribuyen de forma significativa a la respuesta antioxidante de los extractos evaluados; asimismo, en partes aéreas ( $R^2 = 0.9$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ) existe una mayor asociación entre el contenido FT y AA en comparación con las raíces ( $R^2 = 0.8$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ). Del mismo modo, la comparación de las pendientes de partes aéreas (0.9893) y raíces (1.2753) sugiere que los compuestos con mayor actividad antioxidante se encuentran en los extractos de raíz.

Como se mencionó anteriormente, bajo condiciones de mayor irradiancia y menor concentración de nitrato (irradiancia  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y nitrato 0.2 mM), el contenido ACG aumentó de manera importante (7.7-veces en partes aéreas y 10.4-veces en raíces, en relación con el control) (Cuadros 2 y 3). El ACG es un fenilpropanoide de bajo peso molecular que posee una función antioxidante importante en las células de los tejidos fotosintéticos (Sakihama et al. 2002; Heo et al. 2007), para contrarrestar los efectos dañinos de las ERO (Clé et al. 2008). En su función antioxidante (Figura 2) tiene tres características importantes por su relación estructura-función: a) el grupo de catecol; b) el doble enlace conjugado en la cadena del residuo propanoide y c) la esterificación del grupo carboxilo terminal de ácido caféico con un grupo  $-\text{OH}$  del ácido quínico para la formación de ACG; además, podría estar participando en un mecanismo de disipación de la energía fotoquímica (Grace y Logan 2000).

Un aumento de la concentración de ácido clorogénico ha sido reportado en otras especies de hasta 4-veces en plantas de *Nicotiana tabaccum* debido a la disminución del nitrato desde 12 hasta 0.2 mM (Fritz et al. 2006) y debido al exceso de luz en *Solanum lycopersicum* desde 200 hasta  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Urbanczyk-Wochniak y Fernie 2005). Con respecto a ISO, las condiciones de cultivo empleadas no estimularon su producción, lo que coincide con otros estudios que la refieren como una fitoalexina inducible en respuesta al estrés biótico (McNally et al. 2003); aunque otros factores tales como el estado del desarrollo o la exposición a la luz solar (UV), podrían ser necesarios para estimular su biosíntesis y acumulación en las plantas de *C. peltata* (Clé et al. 2008; Nicasio-Torres et al. 2009).

Los extractos de la planta de *C. peltata* tuvieron un perfil químico de compuestos bioactivos (mayor contenido de ACG que ISO), similar a los extractos evaluados en los estudios farmacológicos y clínicos, en el que sus propiedades antidiabéticas fueron corroboradas (Herrera Arellano et al. 2004; Nicasio et al. 2005; Revilla Monsalve et al. 2007). La actividad del extracto no es solamente debido a estos compuestos, sino también a la compleja mezcla de diferentes metabolitos que no han sido caracterizados químicamente (Nicasio-Torres et al. 2009).

La actividad de PAL se incrementó sólo en partes aéreas por efecto de la mayor irradiancia; sin embargo, al final del experimento, tanto en las partes aéreas como en las raíces, su actividad no se correlaciona con los incrementos en los niveles de fenólicos que se presentaron al disminuir el contenido de nitrato. Al evaluar la actividad de esta enzima a diferentes tiempos (Figura 16b), se observó que presentó su máximo en el día 14, principalmente por efecto de la luz; posteriormente disminuyó a niveles basales al final del experimento. La misma tendencia se reportó en *Solanum lycopersicum* (Bernards y Ellis 1991) y en *Matricaria chamomilla* (Kováčik y Bačkor 2007). En este sentido, se sabe que PAL es la enzima clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos, y se reporta que es activada y su expresión inducida en respuesta a condiciones de estrés, como el aumento de luz (Hemm et al. 2004; Jaakola et al. 2004) y por deficiencia de nitrato (Fritz et al. 2006).

## **7.2 CINÉTICA DE PARÁMETROS DE RESPUESTA EN PARTES AÉREAS: CRECIMIENTO Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS**

En la literatura es escasa la información acerca de las interacciones dadas entre las condiciones en las que se desarrollan las plantas y la cinética de acumulación de metabolitos secundarios cuando se encuentran sometidas a factores de estrés, información que es indispensable para establecer la etapa de mayor concentración de algún compuesto de interés. Vargas-Alvarez et al. (2006) en plantas de guayaba, identifican la etapa fenológica de mayor concentración de flavonoides, concluyendo con recomendaciones de cosecha del material vegetal como alternativas para su manejo comercial.

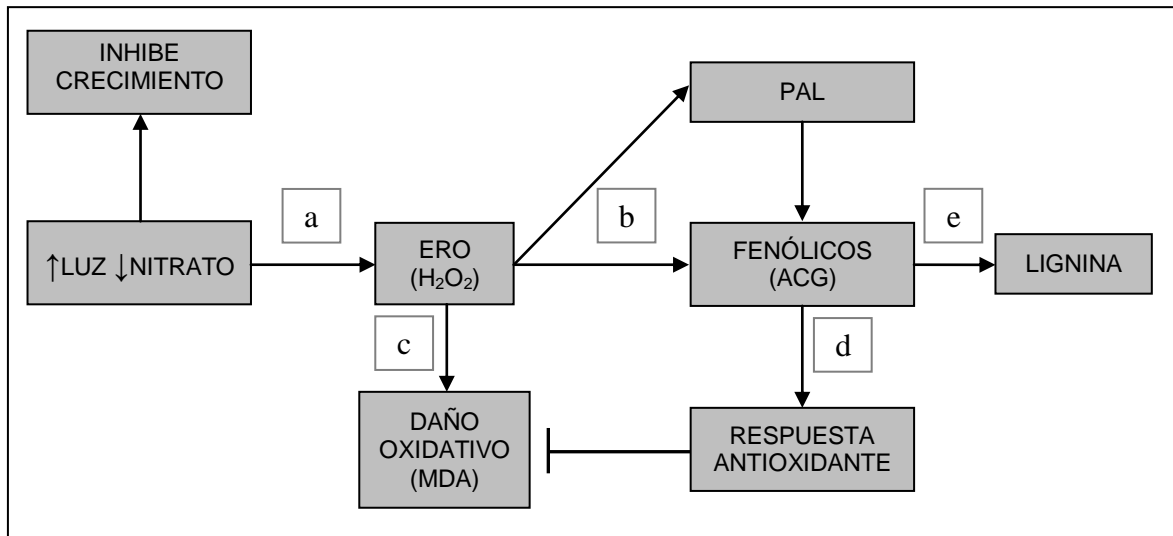
Cuando las plantas enfrentan una situación de estrés ya sea biótico o abiótico, modifican de manera importante su metabolismo tanto primario como secundario, con estrategias que les permiten tolerar esas condiciones adversas. En tal situación, ocurre una competencia por los esqueletos de carbono requeridos para la división celular (metabolismo primario) y la respuesta de defensa en la que se incluye la biosíntesis de metabolitos secundarios (Wink 1999).

En los estudios realizados en el modelo hidropónico de *C. peltata*, el incremento de irradiancia y la deficiencia de nitrato son factores de estrés que por sí mismos causan efectos sobre los parámetros evaluados en diferentes tiempos y magnitudes. En la combinación de alta irradiancia con deficiencia de nitrato (100/0.2) se obtuvieron los valores más altos de los parámetros evaluados como fueron la acumulación de fenólicos totales y CGA por interacción de ambos factores (Figura 15); es decir, la planta requiere una mayor concentración de compuestos antioxidantes como respuesta al estrés causado por cada uno de los factores, donde los esqueletos carbonados son dirigidos al metabolismo secundario, y a su vez, disminuye la división celular y crecimiento como se observa en la curva de crecimiento (Figura 13).

De acuerdo con el análisis de los eventos evaluados en este trabajo, se puede proponer una secuencia a partir de que las plantas reconocen las condiciones de estrés por alta irradiancia y/o deficiencia de nitrato como se ilustra en el diagrama de la Figura 17. La primera señal (a) ocurre por el incremento de los niveles de ERO ( $H_2O_2$ ) que cumplen con la función de segundos mensajeros (b) en la activación de enzimas y la inducción de la expresión de genes (Sudha y Ravishankar 2002; Sepúlveda et al. 2003; Gechev et al. 2006); sin embargo, también estarían causando un daño oxidativo a biomoléculas como los lípidos de membrana (c), que se reconoce por el incremento en los niveles de MDA. Por lo que requieren, a su vez, de una respuesta anti-oxidante (d) para evitar la muerte celular que ocurriría si el factor de estrés es agudo o demasiado prolongado. Estas primeras señales en el cambio del estado redox de las células activan el funcionamiento de enzimas del metabolismo secundario, específicamente de los fenólicos como la PAL, cuyo punto máximo de actividad coincide con los máximos de  $H_2O_2$ . Incluso también se reportó que las mismas señales redox pueden estimular la expresión de *novo* de enzimas del metabolismo secundario (Mittler et al. 2004).



Figura 17. Secuencia de eventos de respuesta a condiciones de estrés por alta irradiancia y/o deficiencia de nitrato en el modelo de cultivo hidropónico de *C. peltata*.



Los compuestos fenólicos (ACG) presentan una tendencia a incrementar sus niveles ligeramente posterior a los máximos de actividad de PAL, y esta última, disminuye su actividad cuando se bio-sintetizaron los fenólicos requeridos para contribuir con la respuesta antioxidante. Finalmente, después de contrarrestar el daño oxidativo por la presencia de ERO, los compuestos fenólicos solubles como ACG son movilizados hacia la biosíntesis de lignina que se deposita en la pared celular como polímeros insolubles de fenólicos. Este depósito de ligninas en condiciones de alta irradiancia, podrían funcionar como filtros que reducen el paso de luz hacia el interior de las células y al mismo tiempo como antioxidantes (en su naturaleza como fenólicos) en el simplasto; aunque se sabe también que otra de sus funciones es la de proteger como barrera física contra el ataque por patógenos y herbívoros (Sepúlveda et al. 2003).

Por otro lado, los patrones de distribución hacia compuestos de defensa (fenólicos) observados en este estudio, son congruentes con las predicciones de la hipótesis CNB: cuando la producción de C es mayor que la requerida para el crecimiento, el exceso de C se asigna a la formación de metabolitos secundarios (Bryant et al. 1983; Coviella et al. 2002; Mosaleeyanon et al. 2005; Le Bot et al. 2009). En el tratamiento control (30/13) se mantuvo el balance homeostático de C y N. Con la disminución en la concentración de

nitrate en el tratamiento 30/0.2 se pierde el balance C:N que es relacionado con el incremento de FT hacia los días 14-21 (1.5-veces mayor con respecto al control). Cuando se incrementó la irradiancia sin modificar la concentración de nitrato (tratamiento 100/13), la eficiencia fotosintética (incremento del CO<sub>2</sub> fijado), se estaría incrementando por la alta disponibilidad de luz y se pierde el balance C:N desde los primeros días (0-14), lo que coincidió con el aumento de FT (2-veces mayor en comparación con el control). Finalmente en la condición de alta irradiancia y deficiencia de nitrato, (tratamiento 100/0.2) también sugiere un incremento de la eficiencia fotosintética durante los primeros días, similar al tratamiento 100/13; adicionalmente, hacia los días 14-21, las plantas percibieron la deficiencia de nitrato que afecta el desbalance de C:N y provoca aún más la acumulación de FT, casi 3-veces superior al del control.

## VIII CONCLUSIONES



1. En plantas de *C. peltata*, la disponibilidad de luz y nitrato afecta la distribución del carbono asimilado para la formación estructural de los diferentes órganos (crecimiento) y/o la acumulación de compuestos fenólicos, en respuesta a tolerar los cambios en el ambiente.
2. Los niveles bajos de irradiancia ( $20$  y  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) limitaron el crecimiento de las plantas de *C. peltata*, incluso con alto abasto nutricional ( $13 \text{ mM}$  de nitrato).
3. El incremento de irradiancia a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y la deficiencia de nitrato a  $0.2 \text{ mM}$ , son condiciones que por sí mismas; y más aún en combinación, la planta percibe como factores de estrés y estimulan la producción de ERO.
4. La mayor irradiancia ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en combinación con la menor concentración de nitrato ( $0.2 \text{ mM}$ ) favorecieron la acumulación de biomasa, el incremento de la actividad de la enzima PAL, la acumulación de FT (particularmente de ACG) y el aumento de la AA en partes aéreas.
5. El incremento de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ERO) causan la oxidación de lípidos. La activación de la enzima PAL para la producción de compuestos fenólicos (FT), particularmente el ACG, es parte de la respuesta de las células para contrarrestar el daño oxidativo.

6. La lignificación de la pared celular está relacionada con la respuesta del metabolismo de los fenólicos en condiciones de estrés, afectando con ello la distribución de la biomasa en el desarrollo de la planta.
  
7. La distribución de compuestos fenólicos en los niveles de suministro de luz y de nitrato en plantas de *C. peltata*, son congruentes con las predicciones de la hipótesis del CNB.
  
8. El nivel de estrés por alta irradiancia en partes aéreas es mayor, debido a que están expuestas directamente a la luz.
  
9. Los resultados de este trabajo son la base para el establecimiento de un sistema de cultivo controlado de plantas de *C. peltata* en condiciones de limitación de nitrato y alta-irradiancia, como una herramienta biotecnológica para el suministro continuo de materia prima de alta calidad que asegure su seguridad y eficacia en la elaboración de preparaciones terapéuticas, útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus. Lo que servirá también para la conservación de las poblaciones silvestres.

## IX PERSPECTIVAS



- ❖ Con el fin de lograr una mejor caracterización, se propone realizar algunas mediciones adicionales en el modelo establecido de *C. peltata* con los cuatro tratamientos de las cinéticas (30/13, 30/0.2, 100/13 y 100/0.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiancia y mM de concentración de nitrato, respectivamente):
  1. Análisis del contenido de carbono y nitrógeno para conocer los cambios en el balance C:N, que permitan establecer la relación de los elementos hacia la distribución de biomasa y la formación de compuestos fenólicos en las condiciones de estrés.
  2. Análisis del contenido de asorbato, glutatión y tocoferol como antioxidantes no enzimáticos.
  3. Valorar la actividad de enzimas catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y superóxido dismutasa (SOD), como respuesta antioxidante de las células.
  4. Evaluar los cambios en el contenido de clorofila a, b y carotenoides totales para relacionar los cambios en los sistemas de captación de luz en los que participan estos compuestos.
  5. Medición de parámetros fisiológicos como son fluorescencia de clorofila, eficiencia fotosintética y conductancia estomática.
  
- ❖ Realizar el fraccionamiento químico de los extractos obtenidos de las partes aéreas de plantas cultivadas con alta irradiancia en combinación con la reducción de nitrato (100/0.2), para aislar e identificar los compuestos que podrían estar relacionados químicamente a ISO.

- ❖ Evaluar la actividad hipoglucemiante e hipolipemiante de los extractos de raíces; asimismo, realizar el fraccionamiento químico de los extractos para conocer el perfil de fenólicos que se biosintetizan en ese órgano.
  
- ❖ A nivel invernadero y condiciones semicontroladas, realizar estudios mediante el uso de mallas, para establecer el efecto de mayor irradiancia y de la luz UV proveniente del sol, sobre el desarrollo y metabolismo de los fenólicos en plantas de *C. peltata*.

## X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME (1994) Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, México. pp. 108-110
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME (1998) Plantas medicinales del herbario del IMSS, su distribución por enfermedades. Instituto Mexicano del Seguro Social y Grupo Roche Syntex de México, México, p. 40
- Aguilar C, Xolapa MS (2002) La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 53(2):24-26
- Aguilar L (2004) Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos de *Cecropia obtusifolia* Bertol. Tesis de Posgrado, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F. 92 pp
- Alonso-Castro AJ, Miranda-Torres AC, González-Chávez MM, Salazar-Olivo LA (2008) *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. J Ethnopharmacol 120:458-464
- Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H (2001) Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 78:145-149
- Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005) Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J Ethnopharmacol 99:325-348
- Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R (2008)  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. J Ethnopharmacol 116:27-32
- Argueta A, Cano L, Asselein L, Rodarte ME (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista (INI) II, México pp. 706-707
- Armstrong GM, Rice LMR, Wender SH (1970) The effect of nitrogen deficiency on the concentration of caffeoylquinic acids and scopolin in tobacco. Phytochem 9:945-948
- Bernards MA, Ellis BE (1991) Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. Plant Physiol 97:1494-1500
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci 161: 839-851
- Bowels BL, Miller AJ (1994) Caffeic acid activity against *Clostridium botulinum* spores. J Food Sci 59(4):905-908
- Brenan TI, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. Plant Physiol 59:411-416
- Briskin DP, Leroy A, Gawienowski M (2000) Influence on the production of hypericins by St. John's wort. Plant Physiol Biochem 38(5):413-420

- Briskin DP, Gawienowski MC (2001) Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol Biochem* 39:1075-1081
- Bryant JP, Chapin FS III, Klein DR (1983) Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40:357-368
- Bye R, Linares E, Estrada E (1995) Phytochemistry of medicinal plants. pp 65-82. In: Arnason JT, Mata R, Romeu JT (Eds.) *Recent advances in phytochemistry*. Plenum Press, New York
- Cabrera HM (2002) Ecophysiological responses of plants in ecosystems with Mediterranean-like climate and high mountain environments. *Revista Chilena de Historia Natural* 75:625-637
- Camacho-Cristóbal JJ, Anzellotti D, González-Fontes A (2002) Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiol and Biochem* 40:997-1002
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74:2157-2184
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochem* 69:2149-2156
- Conabio (1998) *La diversidad biológica de México: estudio del país*. Comisión Nacional para el conocimiento de la Biodiversidad, México. pp:127
- Coviella CE, Stipanovic RD, Trumble JT (2002) Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen in transgenic cotton plants. *J Exp Bot* 53(367):323-331
- Craker LE (1999) Trends in medicinal and aromatic plants production in the USA. *Acta hort* 502:71-75
- De Sotillo DR, Hadley M, Wolf-Hall C (1998). Potato peel extract a nonmutagenic antioxidant with potential antimicrobial activity. *J Food Sci* 63(5):907-910
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress induced phenylpropanoids metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097
- Estrada LE, Morales B JL (2002) *La prodigiosa yerba del sapo*. Edimich Inter Writers. México. pp 117-142.
- Fratti-Munari AC, Vera-Lastra O, Ariza-Andraca CR (1992) Evaluation of nopal capsules in diabetes mellitus. *Gaceta Med Méx* 128:431-436
- Fritz C, Palacios N, Fiel R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoids metabolism. *Plant J* 46:553-548
- García PE, Arreola CA, Castro ME (2004) Oxígeno, herramienta para fabricar defensas bioquímicas en la planta del chile. *Ciencia y Desarrollo* Julio-Agosto:2-5



- Gechev TS, Breusegem FV, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28:1091-1101
- González A (2005) Variación ontogénica y estacional en la acumulación de ácido clorogénico e isoorientina en árboles de *C. obtusifolia* y *C. peltata*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. pp. 56-60
- Grace SC, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:1499-1510
- Gray DE, Pallardy SG, Garret HE, Rottinghauss GE (2003) Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. *Planta Med* 69:1024-1030
- Grechi I, Vivin Ph, Hilbert G, Milin S, Robert T, Gaudillère JP (2007) Effect of light and nitrogen supply on internal C:N balance and control of root-to-shoot biomass allocation in grapevine. *Environ Exp Bot* 59:139-149
- Gupta MP (1995) 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYDET-SECAB, Bogotá. Pp. 405-406
- Gupta A, Gupta R, Lal B (2001) Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study. *Journal of Association of Physicians India* 49:1057-1061
- Gutiérrez-Domínguez MA, Betancourt-Aguilar Y (2008) El mercado de plantas medicinales en México: situación actual y perspectivas de desarrollo. <http://www.geocities.com/redmexicana/colombia.doc>
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125: 189-198
- Heo HJ, Jun Kim Y, Chung D, Kim D. (2007) Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem* 104:87-92
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C (2004) Light induces phenylpropanoids metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 38:765-778
- Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaría L, García-Hernández B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J (2004) Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomed* 11:561-566
- Hiriart M (2002) La historia natural de la diabetes. *Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* 53(3):4-7.
- Hoagland DR and Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Univ. of Calif. Agric. Exp. Station, Berkley. *Circ.* 347:1-32
- Horton P (2000) Prospects for crop improvement through the genetic manipulation of photosynthesis: morphological and biochemical aspects of light capture. *J Exp Bot* 51:475-485

- Izaguirre MM, Mazza CA, Svatoš A, Baldwin IT, Ballaré CL (2007) Solar ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger a partially overlapping phenolic responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflora*. *Ann Bot-London* 99:103-109
- Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A (2004) Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218:721-728
- Jansen MAK, Hectors K, O'Brien NM, Guisez Y, Potters G (2008) Plant stress and human health: do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci* 175:449-458
- Jassim SAA, Naji MA (2003) Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol* 95(3):412-427
- Jhonston KL, Clifford MN, Morgan LM (2003) Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr* 78:728-733
- Khan MH, Panda SK (2008) Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant* 30:81-89
- Ko FN, Chu CC, Lin CN, Chang CC, Teng CM (1998) Isoorientin-6"-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. (Abstract). *BBA* 1389:8190
- Kováčik J, Bačkor M (2007) Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in *Chamomile* tolerance to cadmium and copper excess. *Water Air Soil Pollut* 185:185-193
- Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H (2001) Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomed* 8(1):47-52
- Laloi C, Przybyla D, Apel K (2006) A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 57(8):1719-1724
- LaPierre LM (2001) Vegetative propagation of *Cecropia obtusifolia* (Cecropiaceae). *Rev Biol Trop* (3-4):1-4
- Le Bot J, Bénard C, Robin C, Bourgaud F, Adamowicz S (2009) The 'trade-off' between synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency. *J Exp Bot* 60(15):4301-4314
- Leiss KL, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PGL (2009) Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. *Plant Physiol* 150:1567-1575
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280-287
- Ludvik B, Neuffer B, Pacini G (2004) Efficacy of *Ipomoea batatas* (Caiapo) on diabetes control in type 2 diabetic subjects treated with diet. *Diabetes Care* 27:436-440

- Ma QH (2007) Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. *J Exp Bot* 58(8):2011-2021
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc Natl Acad Sci* 91:7802-7806
- Marcelis LFM, Heuvelink E (2007) Concepts of modeling carbon allocation among plant organs. In Vos J, Marcelis LFM, Visser PHB, Struik PC, Evers JB (eds) *Functional-structural plant modelling in crop production*, 1<sup>st</sup> edn. Springer, pp 103-111
- Marja K, Caldenty O, Inzé D (2004) Plant cell factories in the post genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci* 9:433-440
- Martínez M (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. Botas 5° ed., México, D.F. 151-153
- Massieu Y, Chapela F (2002) Acceso a recursos biológicos y bio-piratería en México. *El cotidiano*, UAM-I 114:72-87
- McCarty MF (2005) A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med Hypotheses* 64:848-853
- McNally DJ, Wurms KV, Labbé C, Quideau S, Bélanger RR (2003) Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. *J Nat Prod* 66:1280-1283
- Mellado V, Lozoya-Meckes M (1984) Effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* on the blood sugar of normal and pancreatectomized dogs. *International Journal of Crude Drug Research* 22:11-16
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport and signaling. *J Exp Bot* 58(9):2297-2306
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9(10):490-498
- Mondolot L, La Fisca P, Buatois B, Talansier E, De Kochko A, Campa C (2006) Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Ann Bot-London* 98:33-40
- Mosaleeyanon K, Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T (2005) Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. *Plant Sci* 169:523-531
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nicasio P, Aguilar S, Aranda E, Ortíz S, González M (2005) Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytother Res* 19:661-664
- Nicasio-Torres P, Erazo-Gómez JC, Cruz-Sosa F (2009) *In vitro* propagation of two antidiabetic species known as guarumbo: *Cecropia obtusifolia* and *Cecropia peltata*. *Acta Physiol Plant* 31(5):905-914
- Nielsen ET, Orcutt DM (1996) *The physiology of plants under stress: abiotic factors*. Wiley, USA 689 p

- Nugroho LH, Verporte R (2002) Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell Tiss Organ* 68:105-125
- Osuna L, Mora A, Ventura E, Jiménez E, Bazaldúa C, Jiménez A (2008) Micropropagation of *Aristolochia elegans* (Mast.). *J Crop Sci Biotech* 10(3):141-146
- Palumbo MJ, Putz FE, Talcott ST (2007) Nitrogen and gender effects on the secondary metabolism of yaupon, a caffeine-containing North American holly. *Oecologia* 151:1-9
- Pelt JM (1992) Las plantas medicinales florecen de nuevo. En: Estrada LE (ed.), *Plantas medicinales de México, introducción a su estudio*. Unidad de estudios etnobotánicos, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 4ª ed. México 499-504
- Pérez-Guerrero C, Herrera MD, Ortiz R, Álvarez de Sotomayor M, Fernández MA (2001) A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 76:279-284
- Pérez GPL, Pérez AJL (2000) Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar [en línea]* 29(3):192-198
- Pérez RM, Ocegueda A, Muñoz JL, Avila JG, Morrow WW (1984) A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. *J Ethnopharmacol* 12:253-262
- Poorter H, Pepin, S, Rijkers T, Jong Y, Evans JR, Körner C (2006) Construction costs, chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. *J Exp Bot* 57(2):355-371
- Raskin I, Ribnicky DM, Komamytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Comwell T, Pastor I, Friendler B (2002). *Plants and human health in the twenty-first century*. *Trends Biotechnol* 20:522-531
- Rates SMK (2001) *Plants as source of drugs*. *Toxicon* 39:603-613
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9/10):1231-1237
- Revilla MC, Andrade-Cetto A, Islas S, Wiedenfeld H (2002) Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *J Ethnopharmacol* 81:117-120
- Revilla-Monsalve MC, Andrade-Cetto A, Palomino-Garibay MA, Wiedenfeld H, Islas-Andrade S (2007) Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract on type 2 diabetic patients. *J Ethnopharmacol* 111:636-640
- Ríos A (2007) Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *C. peltata*, productores de compuestos hipoglucemiantes. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 85 pp
- Rivera AE (1999) Investigación reciente sobre las plantas medicinales mexicanas. *Arqueología Mexicana* 7:54-59

- Rodríguez de Sotillo DV, Hadley M (2002) Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr Biochem* 13:717-726
- Román-Ramos R, Flores-Saenz JL, Partida-Hernández G, Lara-Lemus A, Alarcón-Aguilar F (1991) Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica (México)* 22:87-93
- Ryser P, Eek L (2000) Consequences of phenotypic plasticity vs interspecific differences in leaf and root traits for acquisition of aboveground and belowground resources. *Am J Bot* 87(3):402-411
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamashi H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177:67-80
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2008) Web page: [http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia\\_obtusifolia.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia_obtusifolia.htm)
- Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing H, Rocha-Sosa M (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3):355-363
- Sezik E, Aslan M, Yesilada E, Ito S (2005) Hypoglycaemic activity of *Gentiana oliveri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. *Life Sci* 76:1223-1238
- Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y (2007) Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* 101:1012-1018
- Street RA, Van Staden SJ (2008) South African traditional medicinal plant trade-challenges in regulating quality, safety and efficacy. *J Ethnopharmacol* 119:705-710
- Sudha G, Ravishankar GA (2002) Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tiss Org* 71:181-212
- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J Exp Bot* 53(370):971-977
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Sci Hort* 108:7-14
- Upadhyay UM, Goyal RK (2004) Efficacy of *Enicostemma littorale* in Type 2 diabetic patients. *Phytother Res* 18:233-255
- Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR (2005) Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J Exp Bot* 56(410):309-321
- Vargas-Alvarez D, Soto-Hernández M, González-Hernández VA, Engleman EM, Martínez-Garza A (2006) Kinetics of accumulation and distribution of flavonoids in guava (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia* 40:109-115

- Wilson JB (1988) A review of evidence on the control of shoot:root ratio in relation to models. *Ann Bot* 61:433-449
- Wink M (1999) Functions of plant secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem* 64:3-19
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:218-223

# Changes in biomass allocation and phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in *Cecropia peltata* plants

Alejandro Mora Izquierdo · María del Pilar Nicasio Torres · Gabriela Sepúlveda Jiménez · Francisco Cruz Sosa

Received: 20 August 2010 / Revised: 7 March 2011 / Accepted: 28 March 2011  
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2011

**Abstract** *Cecropia peltata* is popularly known as “guarumbo” in Mexico and is used in traditional medicine for treatment of diabetes mellitus. *C. peltata* plants were cultivated in a hydroponic system under controlled conditions. Gradients of light (20, 30 and 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and nitrate concentrations (13, 2 and 0.2 mM) were applied to estimate their effect on biomass allocation and accumulation of bioactive (chlorogenic acid and isoorientin) phenolic compounds over a 28-day period. According to carbon nutrient balance (CNB) hypothesis predictions, biomass accumulation in foliage was stimulated by the highest irradiance (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); similarly, at highest irradiance in combination with lowest nitrate concentration (0.2 mM), root growth was stimulated (root-to-shoot ratio increased twofold with respect to the control). In these conditions, total phenolics (TP) and chlorogenic acid (CGA) contents were higher in aerial parts than in roots, with a 3.8-fold increase in TP and a 7.7-fold increase in CGA in foliage with respect to the control plants.

Isoorientin was accumulated at very low levels. Antioxidant activity and total phenolic content showed a strong positive correlation. Phenylalanine ammonia-lyase activity (PAL) in aerial parts exhibited significant changes (>two-fold) by highest irradiance. *C. peltata* plants allocate biomass and/or phenolic compounds to compensate the oxidative damage (increase in MDA levels) due to changes in light and nitrate restriction. The results are the basis for the establishment of a system of *C. peltata* culture in view of the potential use of *C. peltata* in therapeutic preparations for the treatment of diabetes mellitus.

**Keywords** Antioxidant · Chlorogenic acid · Hydroponics · Irradiance · Nitrate · PAL · Phenolics

## Abbreviations

AA	Antioxidant activity
CGA	Chlorogenic acid
CNB	Carbon nutrient balance
DM	Dry mass
FM	Fresh mass
ISO	Isoorientin
MDA	Malondialdehyde
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
ROS	Reactive oxygen species
RSR	Root-to-shoot ratio
TBA	Thiobarbituric acid
TP	Total soluble phenolics

Communicated by Z.-L. Zhang.

A. Mora Izquierdo · F. Cruz Sosa  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-Iztapalapa), Mexico City, Mexico

A. Mora Izquierdo · M. P. Nicasio Torres (✉)  
Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina No. 1, Col. Centro, 62790 Xochitepec, Morelos, México  
e-mail: pisoliva@yahoo.com.mx

G. Sepúlveda Jiménez  
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Yauatepec, Morelos, Mexico

## Introduction

Plants are an important source of secondary metabolites with pharmacological properties and have been used

throughout history to prevent and cure diseases in humans (Raskin et al. 2002; Cai et al. 2004). However, in the widespread consumption of some medicinal species from natural growing areas or field cultivation, essential topics regarding quality control, safety, efficacy and environmental conservation have not been fully considered (Mosaleeyanon et al. 2005; Street and Van Staden 2008). Within this context, the establishment of controlled crops is a potential strategy for an adequate supply of authentic plant raw material, with homogenous morphologic characteristics and chemical constituents that are likely to be commercially exploited (Raskin et al. 2002; Mosaleeyanon et al. 2005).

It is known that raw material quality in medicinal plant cultivation is determined by dry matter yield as well as by the content of bioactive compounds (target compounds, e.g., phenolics); both parameters are afforded mainly by the environment in which the plants grow, development status and seasonal collection (Gray et al. 2003). Biomass is partitioned among plant organs to optimize the uptake of light, carbon dioxide, nutrients and water to maximize plant growth rate (Ryser and Eek 2000). Furthermore, it has been reported that to improve the obtainability of a limited resource, the plant component responsible for its achievement (roots for minerals, shoots for light) grows relatively more than under unrestricted conditions (López-Bucio et al. 2003; Grechi et al. 2007).

Biomass allocation is commonly referred to as the distribution of carbon (C) among plant organs; however, the term is also applied to functional activities within organs, such as distribution of defensive compounds (Coviella et al. 2002). The carbon nutrient balance (CNB) hypothesis predicts that the pattern of allocation to defensive compounds depends on the relative availability of carbon and nutrients, as well as on their relationship with the plant growth rate. Under conditions of high photosynthesis rate or reduction of available nitrogen (N), production of C-based defense compounds will be favored, whereas under the opposite conditions, N-based defense compound synthesis will be carried out (Coviella et al. 2002; Fritz et al. 2006; Grechi et al. 2007). According to these predictions, it has been demonstrated that the production of phenolics can be stimulated by low nitrate levels (Armstrong et al. 1970; Fritz et al. 2006; Palumbo et al. 2007; Le Bot et al. 2009), high light (Hemm et al. 2004; Jaakola et al. 2004; Mosaleeyanon et al. 2005) and other biotic and abiotic stresses, e.g., pathogen attack, mechanic wounding, ultraviolet (UV) radiation, low temperatures and nutrient deficit (Bernards and Ellis 1991; Kováčik and Bačkor 2007; Clé et al. 2008; Jansen et al. 2008). Phenylalanine ammonia-lyase enzyme (PAL) catalyzes the conversion of phenylalanine into *trans*-cinnamic acid; therefore, this enzyme causes the flux of primary into

secondary metabolites in the phenolics pathway. PAL activity and other phenylpropanoid enzymes are mainly regulated via de novo synthesis. Hemm et al. (2004) showed that PAL genes are highly expressed in light-grown *Arabidopsis* roots, and Fritz et al. (2006) reported that PAL gene expression was induced by nitrate deficiency in *Nicotiana tabacum* plants.

*Cecropia peltata* (Loefl) and *C. obtusifolia* trees (Cecropiaceae), popularly known as “guarumbo” in Mexico, are used in traditional medicine for the treatment of diabetes mellitus (Argueta et al. 1994; Aguilar et al. 1998), and clinical studies have validated their effectiveness against this disease (Herrera-Arellano et al. 2004; Revilla-Monsalve et al. 2007). Guarumbo leaves contain phenolic compounds such as chlorogenic acid (CGA) and isoorientin (ISO) (Andrade-Cetto and Wiedenfeld 2001; Nicasio et al. 2005; Nicasio-Torres et al. 2009); both compounds possess hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties (Ko et al. 1998; Rodríguez de Sotillo and Hadley 2002). Additionally, it has been reported that CGA stimulates glucose uptake in both insulin-sensitive and -resistant adipocytes (Alonso-Castro et al. 2008). Some Mexican industries have been currently employing guarumbo leaves for the production of drugs (Químicos y Vegetales Rowi, S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco; Ciencia y Salud: Fórmulas Herbolarias, México, D.F.), and guarumbo leaves have been recently exported to Europe for the same purpose (Gutiérrez-Domínguez and Betancourt-Aguilar 2008).

The present need for a quality-controlled supply of *C. peltata* raw material for further clinical investigation and potential development of a phytopharmaceutical requires standardized and controlled production systems. *C. peltata* and *C. obtusifolia* multiplication was reported through in vitro plantlet apical buds, which preserved the ability to produce both bioactive compounds (Nicasio-Torres et al. 2009). Nonetheless, to our knowledge, studies have not been reported on guarumbo plants improving the bioactive compound contents by abiotic stress induction. Considering that biomass yield and phenolic contents in guarumbo are important parameters in the quality of this medicinal species, the aim of this study was to explore the effect of light and nitrate supply on biomass allocation, as well as bioactive CGA, ISO and total soluble phenolic compounds contents in a controlled hydroponic culture of *C. peltata* plants.

## Materials and methods

### Plant material

Mature fruits were obtained from a *Cecropia peltata* tree previously collected in Cunduacán, Tabasco State, and



acclimated in Xochitepec, Morelos State, Mexico. This specimen was identified (code number 14123) by Abigail Aguilar, Director of the Mexican Institute of Social Security's (IMSSM) medical plants herbarium of Mexico (Nicasio-Torres et al. 2009). Seeds were surface sterilized by successive immersion in 70% ethanol for 5 min, which was followed by immersion in a commercial bleach solution (Cloralex<sup>®</sup>:water, 1:5 v/v) for 10 min. Disinfected seeds were washed three times with sterile distilled water. Subsequently, the seeds were transferred aseptically to glass jars containing 30 ml of solid half-strength Murashige and Skoog (1962) medium, supplemented with 1.5% (w/v) sucrose and 0.3% (w/v) phytagel, and adjusted to pH 5.7 prior to autoclaving (121°C for 18 min). Seeds in glass jars were incubated at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  during a light:dark (16:8-h) photoperiod under  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance supplied by cool-white fluorescent lamp.

### Hydroponic culture

Eight-week-old seedlings (5 cm in height) were acclimated to ex vitro conditions as described by Osuna et al. (2008). For a short time, plantlets were hydroponically grown in plastic containers (covered with transparent plastic bags to prevent desiccation) with 60 ml of slightly modified Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1950): 13 mM  $\text{NO}_3^-$ , 6 mM  $\text{K}^+$ , 4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 1 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 46.2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 17.9  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ -K<sub>2</sub>EDTA, 9.1  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$ , 0.76  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ , 0.31  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  and 0.10  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  to pH 5.8. The nutrient solution was renewed every 7 days and relative humidity was reduced gradually until the plastic bags were removed from the plants. After 4 weeks, plants were transplanted to 300-ml potting foam cups filled with mineral perlite and were watered with nutrient solution (50 ml) every other day during 4 weeks. Conditions in the growth chamber were  $25^\circ\text{C}$  and light:dark (16:8-h) photoperiod under  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance supplied by cool-white fluorescent lamp. Sixteen-week-old plants were employed as experimental units.

### Experimental design

Nine treatments (Table 1) were applied by means of a combination of two factors: irradiance (20, 30 and  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and nitrate concentration in the nutrient solution (13, 2, and 0.2 mM). To ensure adequate supply of  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , the salts withdrawn from the nutrient solution were replaced by equivalent moles of  $\text{K}_2\text{SO}_4$  and  $\text{CaCl}_2$ . Plants were watered with 50 ml of nutritional solution every other day for a period of 28 days. All experiments were carried out in the growth room. Control conditions were  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance

**Table 1** Experimental design of two factors: irradiance, and nitrate supply, each at three levels

Treatment	Irradiance ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Nitrate (mM)
d0		
A (initial values)	30	13
d28		
B	20	13
C	20	2
D	20	0.2
E (control)	30	13
F	30	2
G	30	0.2
H	100	13
I	100	2
J	100	0.2

Initial values are sampled as reference parameters on the starting day (d0) and the remainder of treatments on day 28 (d28)

and 13 mM of nitrate concentration. Cool-white fluorescent lamps were utilized to modify the amount of light reaching the plants. At the beginning of the experiment (d0), three plants were harvested as referents of initial values from the parameters to be evaluated. The remainder samples were collected at day 28 (d28). A second experimental plant batch was achieved under 30 and  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiances in combination with 13 and 0.2 mM nitrate concentrations for chlorophyll, hydrogen peroxide and lipid peroxidation (MDA) evaluations in fresh vegetal material.

### Chemical analyses from fresh material

#### Chlorophyll

The concentration of total chlorophyll was determined using the method of Lichtenthaler (1987) in the acetone (80%) extract acquired from fully expanded third young leaf. The absorbance of cleared extract was measured at 663.2 and 648.8 nm.

#### Hydrogen peroxide and lipid peroxidation

The endogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  level was determined as  $\text{H}_2\text{O}_2$ -titanium complex produced as a result of the reaction of tissue- $\text{H}_2\text{O}_2$  with titanium tetrachloride by the method of Brennan and Frenkel (1977). Lipid peroxidation in leaf tissue was determined in terms of malondialdehyde (MDA) content by thiobarbituric acid (TBA) reaction as described by Heath and Packer (1968). MDA equivalent was calculated from the difference in absorbance at 532 and 600 nm utilizing extinction coefficient of  $155 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## Harvesting and growth parameters

Plants were carefully separated into aerial parts and roots, and were dried at room temperature under darkness conditions. Fresh mass (FM) and dry mass (DM) of each sample were registered, and root-to-shoot ratio (RSR) was determined as the relation of root/aerial part ( $\text{g g}^{-1}$ ) of DM.

## Chemical analyses from dry material

### Obtaining extract

Finely ground dry material (0.2 g) was separately extracted three times by maceration at room temperature with methanol (1:100, w/v) during 24 h, followed by filtration through filter paper (Whatman No. 1). Extracts were pooled and concentrated to dryness under reduced pressure and stored in glass containers (Nicasio et al. 2005; Nicasio-Torres et al. 2009).

### Total soluble phenolic compounds (TP)

The concentration of TP was determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method (Cai et al. 2004; Silva et al. 2007). Extracts were re-dissolved in methanol ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) and oxidized with Folin-Ciocalteu reagent (10% v/v); after 10 min, the reaction was neutralized with saturated sodium carbonate solution (8%, w/v). After incubation for 90 min at room temperature (23°C), absorbance was measured at 760 nm using a Jenway 6305 spectrophotometer. Quantification was performed on the basis of the CGA standard curve. Results were expressed as milligram of TP equivalents (eq) to CGA per gram DM, as well as milligram of TP equivalents (eq) to CGA per plant.

### Antioxidant activity (AA)

AA was carried out by the improved ABTS<sup>•+</sup> method described by Re et al. (1999). The ABTS<sup>•+</sup> radical cation was generated by reacting 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate after incubation at room temperature (23°C) under darkness conditions for 16 h. The ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with water to an absorbance of  $0.700 \pm 0.050$  at 734 nm (Jenway 6305 spectrophotometer). Extracts were re-dissolved in methanol ( $1.58 \text{ mg ml}^{-1}$ ), and 20  $\mu\text{l}$  was mixed thoroughly with 1 ml of ABTS<sup>•+</sup> solution. The reactive mixture was allowed to stand at room temperature for 5 min and absorbance was immediately recorded at 734 nm. CGA standard solutions in methanol ( $0\text{--}200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were prepared and assayed under the same conditions. Results were expressed in terms of CGA equivalent antioxidant activity per gram of DM.

## HPLC analysis

HPLC analyses for CGA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and ISO (Indofine Chemical Co., Inc., USA) were conducted on a Waters (Separation Module 2695) HPLC with a system controller (Millennium System Manager Software) and under conditions previously established by Nicasio-Torres et al. (2009). Samples (60- $\mu\text{l}$ ) were eluted onto a Spherisorb ODS-2 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) at a  $1 \text{ ml min}^{-1}$  flow rate with a binary gradient of mobile phases as follows: (A) H<sub>2</sub>O–(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%), and (B) CH<sub>3</sub>CN–CH<sub>3</sub>OH (1:1) within 32 min. Peak purity of the tested sample was determined by comparing its UV spectra with the authentic standard. Calibration curves were constructed with standard solutions of 20, 40, 80 and 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of CGA and ISO in methanol by monitoring absorbance at 300 nm employing a Waters 2996 photodiode array detector. Standard curve linear regressions based on peak area of standards utilizing a zero-intercept model showed  $R^2 = 0.999$ .

### Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity

PAL was extracted and its activity was determined, making some modifications to the method described by Kováčik and Bačkor (2007). Fresh samples (0.2 g) were mixed in the tissue homogenizer during 50 s with 3 ml of cold sodium borate buffer 0.1 M (pH 8.8) containing 20 mM of  $\beta$ -mercaptoethanol. The mixture was maintained for 30 min in an ice bath (4°C), then centrifuged at 12,500 rpm at 4°C during 20 min, and this final extract was employed for the enzymatic assay. The reaction mixture with 2.1 ml of sodium borate buffer 0.1 M (pH 8.8) and 0.5 ml of extract was pre-incubated at 40°C for 5 min; subsequently, the reaction was initiated by the addition of 0.3 ml of L-phenylalanine 100 mM. After 1 h of incubation at 40°C, the reaction was stopped by the addition of 0.1 ml of HCl 6 N. Simultaneously, the blank for every sample was carried out with 2.4 ml of sodium borate 0.1 M (pH 8.8), 0.5 ml of the extract and 0.1 ml of HCl 6 N. Change of absorbance was evaluated after 1 h at 277 nm. Enzymatic activity was reported as  $U \text{ g}^{-1}$  of fresh mass (FM), where  $U$  = difference of absorbance after 1 h at 277 nm  $\text{h}^{-1}$ .

### Statistical analysis

Data were analyzed by two-way analysis of factorial variance (ANOVA);  $p$  values of  $\leq 0.05$  were considered to be important. Significant differences among treatment means were calculated by Tukey test. After linear regression of the data of TP versus AA, the square of the Pearson correlation coefficient ( $R^2$ ) was reported along with its

$p$  value; correlations with  $p$  values of  $\leq 0.01$  were considered as significant (SAS, 9.1; SAS Institute, Inc.).

## Results

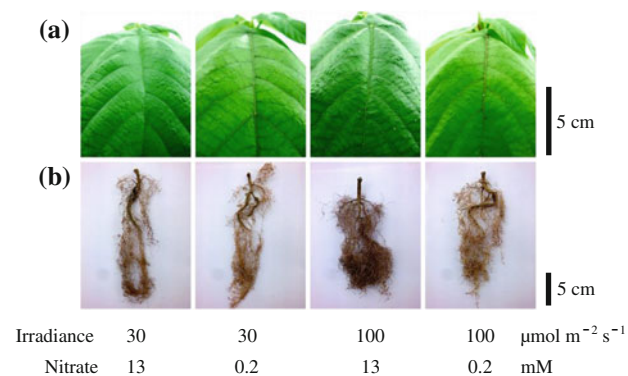
### Growth parameters

During plant development, we observed that at 30 and 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance, the plants' foliage presented leaves with chlorosis (yellowing) and a reddish tonality in the vascular tissue area with a nitrate deficiency (Fig. 1). Similarly, we observed that plants developed with greater irradiance presented more abundant secondary roots after 28 days of culture.

With regard to growth under control conditions (30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance and 13 mM nitrate), dry biomasses of aerial parts and roots (Fig. 2) increased nearly threefold with respect to initial biomasses (d0) at the end of the experiment.

In aerial parts, after 28 days, significant differences of dry mass (DM) were not found among low-irradiance treatments (20 and 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); however, in treatments with higher irradiance (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), DM increased significantly ( $F = 87.68$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\text{Tukey}_{0.05} = 0.22$ ), up to 1.7-fold more than that of the control. Under this higher-irradiance condition, we observed a non-significant decrease in DM accumulation on reducing the nitrate concentration (13, 2, and 0.2 mM).

At the beginning of the experiment, chlorophyll concentration was significantly higher than that obtained at the final time in all treatments (Table 2).  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration did not show significant differences among all treatments; however, MDA content was significantly increased 2.1- and 2.5-fold with respect to the control in the treatments with 0.2 mM of nitrate at 30 and 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance, respectively.



**Fig. 1** Physical characteristics of **a** leaves and **b** roots from *Cecropia peltata* plant development under two conditions of irradiance and nitrate levels after 28 days of culture

In roots, statistical analysis indicated that biomass accumulation was generated due to the interaction of greater irradiance and lower concentration of nitrate ( $F_{3 \times 3} = 5.92$ ;  $p = 0.0032$ ). In the treatment with highest irradiance, in an effect contrary to the tendency observed in aerial parts, DM increased on diminishing the concentration of nitrate.

By means of the root-to-shoot ratio (RSR) parameter (Fig. 3), we analyzed the difference in growth between aerial parts and roots. In the control, at 28 days we obtained a relation similar to that of the beginning (d0). Likewise, in low-irradiance treatments (20 and 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), we found no significant differences in RSRs at 28 days with respect to the control; in contrast, in 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  treatments, the relation of RSR increased significantly ( $F = 111.76$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\text{Tukey}_{0.05} = 0.02$ ), up to nearly 2.0-fold, which was favored on diminishing the concentration of nitrate ( $F = 29.37$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\text{Tukey}_{0.05} = 0.02$ ).

### Chemical analysis and PAL activity

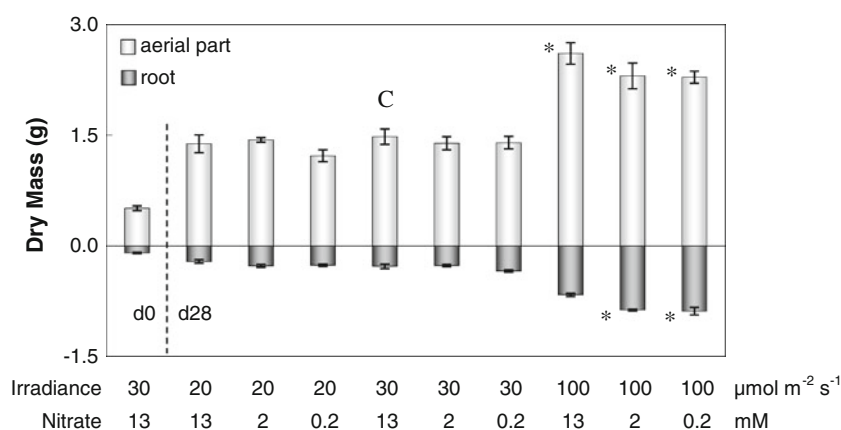
The accumulation of total soluble phenolics (TP) was determined both in aerial parts and in roots (Tables 3, 4). On initiation (d0), the concentration of aerial parts was 1.8 times greater than that of the roots, a relation that increased 2.3-fold at the end of the study (d28) under control conditions (30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance and 13 mM nitrate). The abundance of CGA in aerial parts is noteworthy; at the beginning (d0), a content presented that was twofold greater than that of the roots, and at 28 days this relation increased from six to eightfold in the different treatments. On the other hand, as a general tendency, PAL activity was greater in roots than in aerial parts.

As an important tendency in aerial parts, we observed that TP, AA and CGA contents increase as irradiance increases, and the concentration of nitrate decreases (Table 3), an effect contrary to that of biomass allocation (Fig. 2). Significant increments in the TP, AA and CGA parameters (Table 5) were obtained under the condition of greater irradiance (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and lower concentration of nitrate (0.2 mM), whereas PAL activity increased significantly only with greater irradiance.

Regarding roots, none of the factors evaluated affected PAL activity (Tables 4, 5). Significant increases in TP and AA parameters were obtained under the condition of greater irradiance (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and lower nitrate concentration (0.2 mM) because of the interaction of both factors for TP, and independently to the same extent by the irradiance as by the nitrate concentration in the case of AA. CGA content was favored only by the effect of greater irradiance (Table 5).

Through linear regression analysis between TP and AA contents obtained in the different treatments (Table 1;

**Fig. 2** Combined effects of irradiance and nitrate supply on dry mass accumulation in aerial parts and roots of *Cecropia peltata* plants sampled prior to (d0) and at the end of the experiment (d28). Vertical bars represent the standard error (SE) of mean ( $n = 3$ ). An asterisk indicates a significant difference against the control (C) according to the Tukey multiple range test



**Table 2** Combined effects of irradiance and nitrate supply on total chlorophyll, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and malondialdehyde (MDA) contents in *Cecropia peltata*-plant aerial parts

Treatment		Total chlorophyll	$\text{H}_2\text{O}_2$	MDA
Irradiance ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	Nitrate (mM)	( $\text{mg g}^{-1}$ FM)	( $\text{nmol g}^{-1}$ FM)	( $\text{nmol g}^{-1}$ FM)
d0				
30	13	$2.794 \pm 0.024$ a	$0.15 \pm 0.01$ ns	$18.82 \pm 3.41$ c
d28				
30 (control)	13	$1.817 \pm 0.176$ b	$0.06 \pm 0.03$ ns	$29.68 \pm 4.24$ bc
30	0.2	$1.784 \pm 0.227$ b	$0.15 \pm 0.01$ ns	$62.74 \pm 3.15$ a
100	13	$1.465 \pm 0.195$ b	$0.08 \pm 0.03$ ns	$41.56 \pm 1.56$ b
100	0.2	$1.166 \pm 0.042$ b	$0.23 \pm 0.10$ ns	$74.35 \pm 3.70$ a

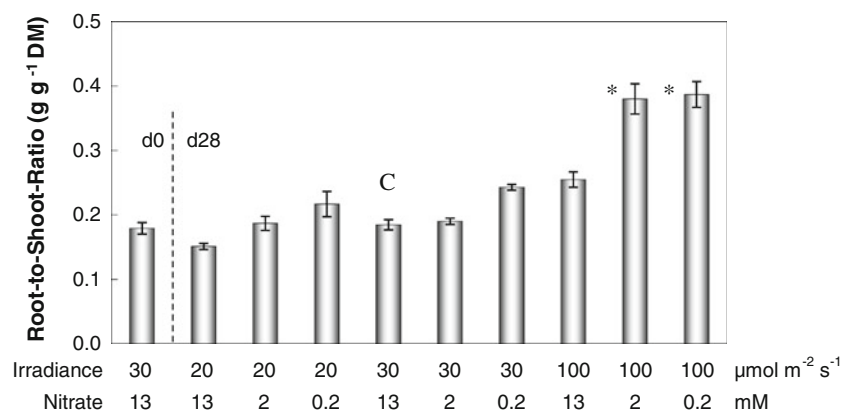
Plants were sampled prior to initiation (d0) and at the end of the experiment (d28). Values represent means ( $n = 3$ )  $\pm$  standard error (SE) and are significantly different when these are followed by dissimilar letters in each column, according to the Tukey multiple range test ( $p < 0.05$ )

ns not significant, FM fresh mass

Fig. 4), we found a significant positive correlation in the aerial parts ( $R^2 = 0.9$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ), as well as in the roots ( $R^2 = 0.8$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ). In the comparison of the straight-line equation of aerial parts ( $y = 0.9893x + 0.253$ ) and roots ( $y = 1.2753x + 0.7647$ ), the greater value of the slope for roots is highlighted.

A commercially useful expression of the results of FT and CGA contents is to consider total biomass per plant. In Figs. 5 and 6, total yields are represented under the different study conditions. We observe that accumulation of phenolics is greater in aerial parts (6.5-fold) than in roots (Fig. 5). TP levels in aerial parts increase significantly

**Fig. 3** Combined effects of irradiance and nitrate supply on root-to-shoot ratio (RSR) ( $\text{g g}^{-1}$ DM) of *Cecropia peltata* plants sampled prior to (d0) and at the end of the experiment (d28). Vertical bars represent the standard error (SE) of mean ( $n = 3$ ). An asterisk indicates a significant difference against the control (C) according to the Tukey multiple range test



**Table 3** Combined effects of irradiance and nitrate supply on total soluble phenolics (TP), antioxidant activity (AA), chlorogenic acid (CGA) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in *Cecropia peltata* aerial parts

Treatment		TP (mgCGAeq g <sup>-1</sup> DM)	AA (mgCGAeq g <sup>-1</sup> DM)	CGA (mg g <sup>-1</sup> DM)	PAL (U g <sup>-1</sup> FM)
Irradiance (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Nitrate (mM)				
d0					
30	13	5.66 ± 0.85	7.38 ± 1.07	0.16 ± 0.04	2.79 ± 0.04
d28					
20	13	7.04 ± 1.84	6.13 ± 0.95	0.12 ± 0.05	1.86 ± 0.52
20	2	3.40 ± 0.24	4.21 ± 0.48	0.07 ± 0.01	1.98 ± 0.36
20	0.2	6.33 ± 0.81	5.72 ± 0.81	0.17 ± 0.03	1.89 ± 0.56
30 (control)	13	5.21 ± 1.59	4.94 ± 0.94	0.14 ± 0.09	1.86 ± 1.01
30	2	5.95 ± 0.96	5.29 ± 0.48	0.07 ± 0.02	1.56 ± 0.80
30	0.2	8.64 ± 1.36	9.25 ± 1.09	0.25 ± 0.06	1.80 ± 0.28
100	13	6.68 ± 1.84	7.74 ± 1.62	0.20 ± 0.10	3.06 ± 0.41
100	2	8.45 ± 0.77	7.99 ± 0.54	0.23 ± 0.07	3.35 ± 1.46
100	0.2	13.29 ± 1.51	13.78 ± 2.18	0.70 ± 0.15	4.38 ± 0.48

Plants were sampled prior to initiation (d0) and at the end of the experiment (d28). Values represent means ( $n = 3$ ) ± standard error (SE)  
DM dry mass, FM fresh mass

**Table 4** Combined effects of irradiance and nitrate supply on total soluble phenolics (TP), antioxidant activity (AA), chlorogenic acid (CGA) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in *Cecropia peltata* plant roots

Treatment		TP (mgCGAeq g <sup>-1</sup> DM)	AA (mgCGAeq g <sup>-1</sup> DM)	CGA (mg g <sup>-1</sup> DM)	PAL (U g <sup>-1</sup> FM)
Irradiance (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Nitrate (mM)				
d0					
30	13	3.18 ± 0.50	5.89 ± 1.36	0.08 ± 0.00	3.23 ± 0.19
d28					
20	13	1.82 ± 0.14	3.21 ± 0.60	0.02 ± 0.01	3.06 ± 0.34
20	2	2.45 ± 0.21	3.15 ± 0.21	0.02 ± 0.00	3.02 ± 0.12
20	0.2	2.91 ± 0.44	4.21 ± 0.39	0.04 ± 0.01	3.25 ± 0.03
0 (control)	13	2.19 ± 0.05	2.89 ± 0.48	0.02 ± 0.00	3.01 ± 0.06
30	2	2.23 ± 0.25	3.79 ± 0.78	0.02 ± 0.00	2.95 ± 0.50
30	0.2	2.53 ± 0.17	3.99 ± 0.50	0.04 ± 0.01	2.50 ± 0.20
100	13	2.34 ± 0.26	4.39 ± 0.34	0.01 ± 0.00	3.84 ± 0.79
100	2	2.92 ± 0.28	4.36 ± 0.80	0.01 ± 0.00	3.14 ± 0.22
100	0.2	5.34 ± 0.94	7.37 ± 1.19	0.09 ± 0.03	3.02 ± 0.18

Plants were sampled prior to initiation (d0) and at the end of the experiment (d28). Values represent means ( $n = 3$ ) ± standard error (SE)  
DM dry mass, FM fresh mass

under greatest irradiance ( $F = 33.99$ ;  $p < 0.0001$ ; Tukey<sub>0.05</sub> = 4.97) and least nitrate concentration ( $F = 5.34$ ;  $p = 0.0151$ ; Tukey<sub>0.05</sub> = 4.97), that is, 3.8-fold in aerial parts and 7.6-fold in roots with respect to the control. In the roots, we found an interaction between greatest irradiance and least nitrate concentration ( $F_{3 \times 3} = 9.76$ ;  $p = 0.0002$ ; Tukey<sub>0.05</sub> = 0.55).

With respect to CGA (Fig. 6), its contents per plant is the result of the interaction of both factors (irradiance and

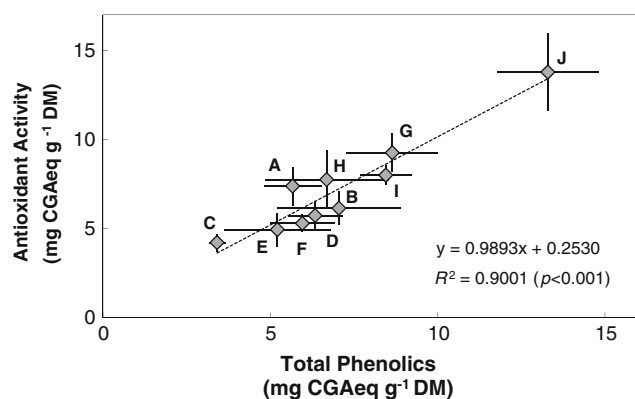
nitrate concentration), both in the aerial parts ( $F_{3 \times 3} = 4.8$ ;  $p = 0.0082$ ; Tukey = 0.305) and in the roots ( $F_{3 \times 3} = 5.35$ ;  $p = 0.0051$ ; Tukey<sub>0.05</sub> = 0.019). The greatest increments were also obtained with the highest irradiance and least nitrate concentration, that is, 7.7-fold in aerial parts and 10.4-fold in roots with respect to the control. In addition, CGA content in the aerial part was 19.2-fold greater than that in the root. Notwithstanding this, under the condition of highest irradiance, CGA

**Table 5** Summary of analysis of variance (ANOVA) results for parameters evaluated in *Cecropia peltata* aerial parts (Ap) and roots (Ro) due to the effect of two factors: irradiance, and nitrate concentration (I\*N = irradiance–nitrate interaction)

Parameter		Irradiance ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )				Nitrate (mM)				I*N
		20	30	100	F(p)	13	2	0.2	F(p)	
Total phenolics (mgCGAeq g <sup>-1</sup> DM)	Ap	5.59 b	6.60 b	9.47 a	6.93 (0.0059)	5.93 b	6.31 b	9.42 a	6.27 (0.0086)	ns
	Ro	2.32 b	2.39 b	3.53 a	8.97 (0.0020)	2.12 b	2.53 b	3.59 a	11.10 (0.0007)	3.60 (0.0200)
Antioxidant activity (mgCGAeq g <sup>-1</sup> DM)	Ap	5.35 b	6.49 b	9.84 a	12.39 (0.0004)	5.83 b	6.27 b	9.58 a	9.62 (0.0014)	ns
	Ro	3.52 b	3.56 b	5.37 a	7.83 (0.0036)	3.50 b	3.77 b	5.19 a	5.77 (0.0116)	ns
Chlorogenic acid (mg g <sup>-1</sup> DM)	Ap	0.12 b	0.15 b	0.37 a	9.67 (0.0014)	0.11 b	0.14 b	0.37 a	10.44 (0.0010)	ns
	Ro	0.01 b	0.02 b	0.06 a	10.52 (0.0009)	0.02	0.03	0.04	ns	ns
PAL activity (U g <sup>-1</sup> FM)	Ap	1.74 b	1.91 b	3.59 a	5.55 (0.0133)	2.26	2.29	2.69	ns	ns
	Ro	2.82	3.11	3.13	ns	2.92	3.03	3.10	ns	ns

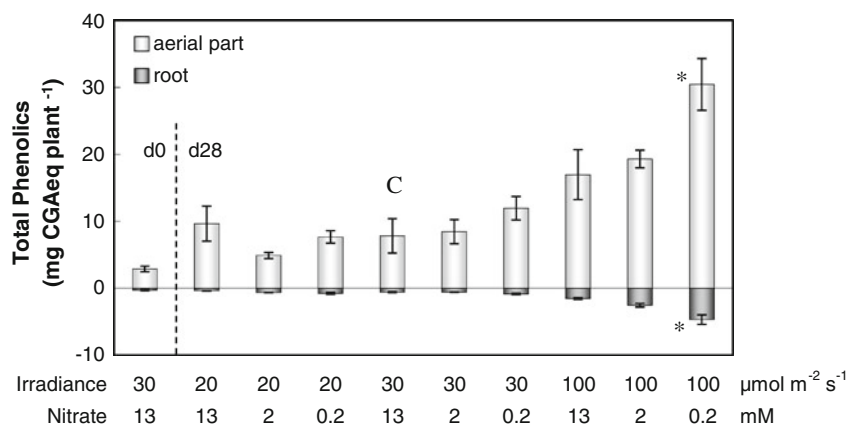
Values represent means ( $n = 9$ ) and are significantly different when these are followed by dissimilar letters in each row, according to the Tukey multiple range test ( $p < 0.05$ )

ns not significant



**Fig. 4** Relationship between antioxidant activity (AA) and total soluble phenolics (TP) of *Cecropia peltata* plant aerial part extracts grown with a range of irradiance and nitrate concentrations (Table 1). The ‘best-fit’ line shown was generated by linear regression of the data ( $n = 10$ ). Vertical and horizontal bars represent the standard error (SE) of means ( $n = 3$ )

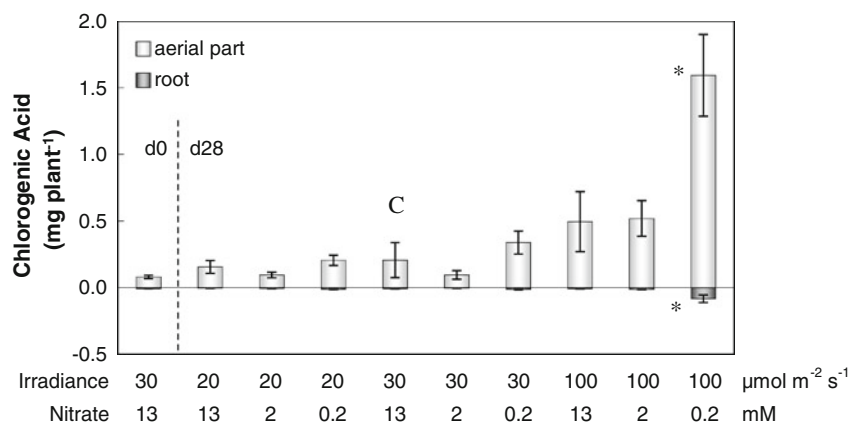
**Fig. 5** Combined effects of irradiance and nitrate supply on total soluble phenolics (TP) in *Cecropia peltata* plant aerial parts and roots sampled prior to (d0) and at the end of the experiment (d28). Vertical bars represent the standard error (SE) of mean ( $n = 3$ ). An asterisk indicates a significant difference against control (C) according to the Tukey multiple range test



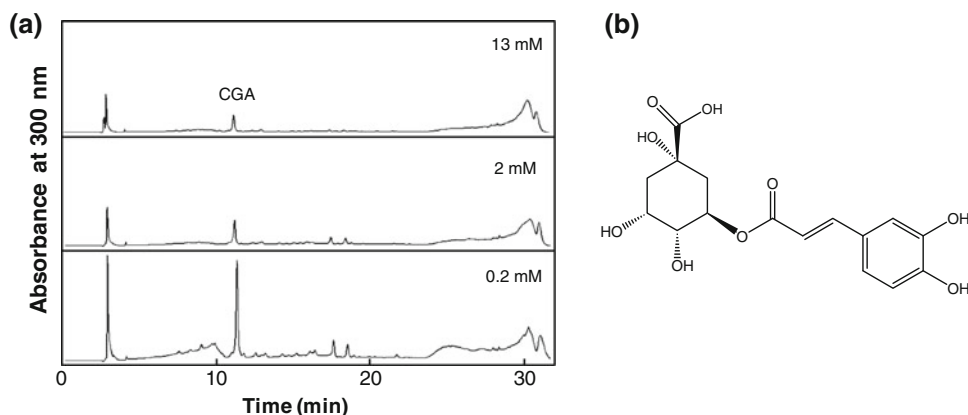
accumulation was greater under nitrate-deficiency conditions (0.2 mM). It is noteworthy that being under the same conditions also allowed obtaining greatest biomass in the plant (Fig. 2).

In Fig. 7, the chromatographic profiles of aerial-part extracts obtained under the greatest-irradiance condition are present, in which we observe a general tendency in the increase of CGA signal (retention time = 11.0–11.9 min;  $\lambda_{\text{max}} = 326.7$  nm) due to the effect of nitrate-concentration diminution, while the ISO flavonoid (retention time = 16.0–16.5 min;  $\lambda_{\text{max}} = 350.6$  nm) presented low levels that could not be quantified under the conditions of the system employed. Additionally, in aerial parts, we found two signals similar to isoorientin, which, because of its retention time (17.7 and 18.6 min) and maximal absorption in UV ( $\lambda_{\text{max}} = 337.4$  and 339.8 nm), might correspond to certain structurally related compounds.

**Fig. 6** Combined effects of irradiance and nitrate supply on chlorogenic acid content (CGA) in *Cecropia peltata* plant aerial parts and roots sampled prior to (d0) and at the end of the experiment (d28). Vertical bars represent the standard error (SE) of mean ( $n = 3$ ). An asterisk indicates a significant difference against the control (C) according to the Tukey multiple range test



**Fig. 7** **a** HPLC profiles of methanolic extracts of aerial parts from plant development with  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance and three different levels of nitrate; chlorogenic acid contents (CGA) correspond to the signal of chlorogenic acid peak ( $r_t = 11.0\text{--}11.9$  min;  $\lambda_{\text{max}} = 350.6$  nm). **b** Structural representation of chlorogenic acid



## Discussion

*C. peltata* is an arboreal species in its adult state and the gathering of its leaves in different status of development, in addition to environmental factors, can signify important variation in its chemical composition and have repercussions on its pharmacological efficacy (Alonso-Castro et al. 2008). The culture of “guarumbo” under controlled conditions is a viable alternative for obtaining reliable, safe and effective plant material, in addition to being a useful system for increasing the yields of quality parameters that favor the commercialization of this medicinal species. In the present study, by means of the manipulation of the light and nitrate supply, we modified the growth and phenolic compounds accumulation of *C. peltata* plants.

In control plants ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance and 13 mM of nitrate), accumulation of total biomass increased due to the growth effect during the 28 days of the study (Fig. 2). Regarding the remainder of the treatments, variation in light and nitrate supply exerted an impact on yield and distribution of biomass. Plants at least levels of irradiance (20 and  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), despite their not having a nutrient limitation (13 mM of nitrate), developed low biomass levels in foliage. It has been mentioned for

different species that during growth, photosynthetic capacity is dependent on the intensity of the light. Plants developed under low irradiance would contain a lower amount of their photosynthetic components and, consequently, a lower  $\text{CO}_2$  fixation rate (Horton 2000; Mosaleeyan et al. 2005; Poorter et al. 2006). Contrariwise, under the same nitrate condition (13 mM) and with the increase of irradiance up to  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , plants increased their biomass significantly, a response that coincided with other reports in the literature (Ryser and Eek 2000; Mosaleeyan et al. 2005; Grechi et al. 2007). With the irradiance increase,  $\text{CO}_2$  fixation increases, thus a greater content of photosynthates in leaves is available for new tissue translocation and growth (Horton 2000). One visual characteristic of plants under this treatment of high irradiance and high nitrogen concentration was the tendency of the foliage to lose turgidity, which may be related to a greater stomatic opening, which in turn permits greater transpiration in leaves.

Hydrogen peroxide concentration did not show significant changes in all treatments, probably due to an increase of antioxidant systems such as peroxidase enzyme (POD), as was observed by Konieczny et al. (2008) in zygotic embryos from *Heliantus annuus*.

Under greatest-irradiance conditions, no significant diminution of foliar biomass caused by reduction in nitrate supply (2 and 0.2 mM) could be related with the photoinhibition process in plants. The overexcited chlorophylls incite the formation of oxygen singlet (ROS) in the thylakoid membranes, causing damage in photosystem components, especially in photosystem II, an effect known as photoinhibition. In addition, it is well known that ROS-induced membrane lipid peroxidation is a reference for cellular damage based on oxidative stress (Khan and Panda 2008). MDA is formed by decomposition of polyunsaturated fatty acids and used as an indicator of oxidative stress (Tewari et al. 2006). The significant increase in MDA levels associated with lipid peroxidation are linked with oxidative stress in *C. peltata* plant development under conditions of nitrate deficiency (0.2 mM), mainly under  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance.

It has been reported that there is partial closing of the stomas under nitrate-deficiency conditions (Cabrera 2002); thus, the capacity is limited for utilizing high levels of light, and the leaves absorb more luminous energy than that required for the assimilation of available  $\text{CO}_2$ . In these treatments with nitrate deficiency, we observed greater turgidity in foliage, which suggests a smaller stomatic opening. Consequently, diminution of intracellular  $\text{CO}_2$  reduces photosynthesis and subsequently plant growth. Another important characteristic comprised symptoms of chlorosis in leaves (Table 2; Fig. 1) due to the diminution of chlorophyll related with nitrogen deficiency in the tissues, as reported previously in *Hypericum perforatum* plants (Briskin et al. 2000). On the other hand, in rice plants grown in a high-luminosity environment, Horton (2000) refers to the decrease in the chlorophyll content as a photoprotective response to the excess of light.

Nitrate-deficiency conditions (0.2 mM) also favored biomass allocation toward the roots (greater RSR value up to nearly 2.0-fold). Grechi et al. (2007) reported that changes in the RSR of *Vitis vinifera* plants are controlled by equilibrium aspects in the C:N internal levels. López-Bucio et al. (2003), in *Arabidopsis* plants, refer to the same allocation effect toward roots and postulate that nutrients such as nitrate possess signaling functions with a profound impact on radicular-system architecture. Also, it was reported that nitrate not only exerts an effect on the roots, but also functions as a signal for the metabolism and development of the entire plant (Takei et al. 2002; Urbanczyk-Wochniak and Fernie 2005; Miller et al. 2007).

The results of this study are consistent with the functional-equilibrium hypothesis (FEH) (Marcelis and Heuvelink 2007), in which biomass allocation was modeled on the whole plant, and in which it was established that plants, on finding themselves in an environment limited by an

essential resource (e.g., nitrogen), respond with an increase in allocation toward the structure responsible for acquisition of the element that is restricted (Wilson 1988; Grechi et al. 2007). With these results, the plasticity of *C. peltata* is corroborated to distribute its resources under limited nutrient conditions in an efficient manner.

Allocation patterns toward compounds of defense (phenolics) found in this study are congruent with the predictions of the CNB hypothesis: When the production of C is greater than that required for growth, the excess of C is allocated to the formation of secondary metabolites (Bryant et al. 1983; Coviella et al. 2002; Mosaleeyanon et al. 2005; Le Bot et al. 2009). The results of the production of secondary metabolites (TP) comply with the CNB hypothesis. In aerial parts, in highest-irradiance treatments ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance), TP content (Table 3) increases as nitrate concentration decreases (0.2 mM), a condition under which nitrogen limitation is perceived. Observation of the reddish tonality in vascular tissue zones of leaves (Fig. 1) might be related with the accumulation of phenolic compounds (e.g., anthocyanins). Under these conditions, the significant increase of TP can be interpreted as: photosynthesis surpasses the growth demand, and, on there being an excess of carbohydrates that accumulate in plants with nitrate deficiency, the C assimilated is available for biosynthesis of compounds that do not require N (e.g., phenolics). Phenolic accumulation due to light increase or nitrate deficiency has been reported in different studies (Briskin and Gawienowski 2001; Coviella et al. 2002; Mosaleeyanon et al. 2005; Fritz et al. 2006; Poorter et al. 2006; Grechi et al. 2007; Palumbo et al. 2007; Le Bot et al. 2009). Under high-irradiance and nitrate-deficiency conditions, the assimilated carbon is directed toward the following two key components: (a) the biomass increase in roots, as previously mentioned, and (b) toward the increase of levels of carbon-rich secondary metabolites, such as phenolics.

In the experimental model of this study, the combination of high-irradiance and nitrate-deficiency factors could be stress factors in *C. peltata* plants through the formation of reactive oxygen species (ROS), which are strongly oxidating molecules (Laloi et al. 2006). It has been established that accumulation of ROS causes disequilibrium in intracellular redox balance, known as oxidative stress (Tewari et al. 2006; Khan and Panda 2008). One of the cellular mechanisms for avoiding tissue damage is the production of antioxidant compounds for ROS uptake (Dixon and Paiva 1995; Grace and Logan 2000; Winkel-Shirley 2002; Cai et al. 2004). According to the results, under highest-irradiance and greatest nitrate-deficiency conditions ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance and 0.2 mM nitrate), aerial parts presented the highest concentrations of TP (up to 6.5-fold) in comparison with the content in roots, which



suggests that the oxidative-stress level in aerial parts is greater because these are in direct contact with light, while the roots are not, thus requiring lower levels of antioxidant response. Correlation analyses suggest that phenolic compounds contribute significantly to the antioxidant response of the extracts evaluated, and that in aerial parts ( $R^2 = 0.9$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ) there is a greater association between TP content and AA ( $R^2 = 0.8$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 10$ ). Likewise, comparison of the slopes of aerial parts (0.9893) and roots (1.2753) suggests that compounds with greater antioxidant activity are found in root extracts.

As mentioned previously, CGA content (Fig. 6) increased importantly (7.7-fold in aerial parts and 10.4-fold in roots with respect to the control) under greatest-irradiance and least nitrate-concentration conditions ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance and 0.2 mM nitrate). CGA is a low-molecular weight phenylpropanoid that possesses an important antioxidant function in the cells of photosynthetic tissues (Sakihama et al. 2002; Heo et al. 2007), counterattacking the damaging effects of the ROS (Clé et al. 2008). As an antioxidant, CGA (Fig. 7b) possesses three important characteristics for its structure–function relationship: (a) the catechol group; (b) the double link conjugated in the propanoid-residue chain and (c) the sterification of the caffeic-acid terminal carboxyl group with a quinic-acid–OH group for the formation of CGA (Grace and Logan 2000). Additionally, these authors have proposed that CGA could perform another important function in a dissipation mechanism of photochemical energy. An increase has been reported in other species of the concentration of CGA of up to fourfold in *Nicotiana tabacum* plants because of the diminution of nitrate from 12 to 0.2 mM (Fritz et al. 2006), and due to the excess of light in *Solanum lycopersicum* from 200 to 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Urbanczyk-Wochniak and Fernie 2005).

With respect to ISO, the culture conditions employed did not stimulate its accumulation, which coincides with other studies that refer to ISO as an inducible phytoalexin in response to biotic stress (McNally et al. 2003), although other factors, such as developmental state or exposure to sunlight (UV), might be required to stimulate its biosynthesis and accumulation in *C. peltata* plants (Clé et al. 2008; Nicasio-Torres et al. 2009).

The *C. peltata*-plant extracts obtained in this study presented a bioactive compound chemical profile (a greater content of CGA than ISO), similar to extracts evaluated in clinical and laboratory pharmacological assays in which its antidiabetic properties were corroborated (Herrera-Arellano et al. 2004; Revilla-Monsalve et al. 2007). In addition, the activity of the extract is not solely due to these compounds, but also to the complex mixture of the different metabolites, although the latter have not been chemically characterized (Nicasio-Torres et al. 2009).

PAL activity was observed to be increased only in aerial parts by the effect of greatest irradiance; however, its activity in aerial parts as well as in roots does not correlate with the increments presented in phenolic levels on diminishing nitrate content. In this respect, it is known that PAL is the key enzyme in phenolic-compound biosynthesis, and it has been reported that it is activated and its expression induced in response to different stress conditions, among these, an increase in light (Hemm et al. 2004; Jaakola et al. 2004) and nitrate deficiency (Fritz et al. 2006). Different studies mention that PAL-activity increases during the first days of stress, and once the required compounds have been synthesized, the enzyme's activity decreases (Bernards and Ellis 1991; Kováčik and Bačkor 2007). When *C. peltata* plants were submitted to different treatments, PAL activity could have increased to a maximum in days prior to the analysis, with which phenolics were synthesized and later diminished to levels observed at the end of the treatments (d28).

## Conclusion

In this study, we demonstrated that *C. peltata* plants distribute the carbon assimilated in photosynthesis as a response to the availability of light and nitrate, whether due to the structural formation of the different organs (biomass) and/or to the accumulation of secondary metabolites with functions of protection and employment of nutritional resources. Under the condition of high irradiance, growth of foliage and roots was favored; in addition to these latter components, nitrate limitation interacted with light to increase their biomass. Similarly, in the treatment with higher irradiance and low nitrate concentration, we obtained greater TP (3.8-fold) and CGA (7.7-fold) contents in plant foliage with respect to the control: TP and AA content correlated positively, while PAL activity increased mainly in the aerial parts due to the effect of greater irradiance, and there were no important changes in PAL activity in the roots. Allocation differences of phenolic compounds in the distinct supply levels of light and nitrate in *C. peltata* plants are congruent with the predictions of the CNB hypothesis.

The culture of *C. peltata* under controlled conditions does not require plant development until adult age, because it has been reported that the metabolites of interest are present in the early stages of their development (Nicasio-Torres et al. 2009). The results of this study are the basis for the establishment of a system of culture of *C. peltata* by means of nitrate limitation under high-irradiance conditions for supplying high-quality prime matter, in view of the potential use of *C. peltata* in therapeutic preparations for the treatment of diabetes mellitus.

**Acknowledgments** This research was partially supported by a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (CONACyT-México) (CVU 42514) and from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (99183755).

## References

- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jáquez P, López ME (1998) Plantas medicinales del herbario del IMSS, su distribución por enfermedades. Instituto Mexicano del Seguro Social y Grupo Roche Syntex de México, México, p 40
- Alonso-Castro AJ, Miranda-Torres AC, González-Chávez MM, Salazar-Olivo LA (2008) *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 120:458–464
- Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H (2001) Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 78:145–149
- Argueta A, Cano L, Asselein L, Rodarte ME (1994) Atlas de las Plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista (INI) II, México, pp 706–707
- Armstrong GM, Rice LMR, Wender SH (1970) The effect of nitrogen deficiency on the concentration of caffeoylquinic acids and scopolin in tobacco. *Phytochemistry* 9:945–948
- Bernards MA, Ellis BE (1991) Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiol* 97:1494–1500
- Brennan T, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol* 59:411–416
- Briskin DP, Gawienowski MC (2001) Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol Biochem* 39:1075–1081
- Briskin DP, Leroy A, Gawienowski M (2000) Influence on the production of hypericins by St John's wort. *Plant Physiol Biochem* 38:413–420
- Bryant JP, Chapin FS III, Klein DR (1983) Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40:357–368
- Cabrera HM (2002) Ecophysiological responses of plants in ecosystems with Mediterranean-like climate and high mountain environments. *Rev Chil His Nat* 75:625–637
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74:2157–2184
- Clé C, Hill LM, Niggeweg R, Martin CR, Guisez Y (2008) Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*: consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69:2149–2156
- Coviella CE, Stipanovic RD, Trumble JT (2002) Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen in transgenic cotton plants. *J Exp Bot* 53(367):323–331
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress induced phenylpropanoids metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097
- Fritz C, Palacios N, Fiel R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoids metabolism. *Plant J* 46:553–548
- Grace SC, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:1499–1510
- Gray DE, Pallardy SG, Garret HE, Rottinghauss GE (2003) Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. *Planta Med* 69:1024–1030
- Grechi I, Vivin Ph, Hilbert G, Milin S, Robert T, Gaudillère JP (2007) Effect of light and nitrogen supply on internal C:N balance and control of root-to-shoot biomass allocation in grapevine. *Environ Exp Bot* 59:139–149
- Gutiérrez-Domínguez MA, Betancourt-Aguilar Y (2008) El mercado de plantas medicinales en México: situación actual y perspectivas de desarrollo. <http://www.geocities.com/redmexicana/colombia.doc> (accessed July 2009)
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C (2004) Light induces phenylpropanoids metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 38:765–778
- Heo HJ, Jun Kim Y, Chung D, Kim D (2007) Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chem* 104:87–92
- Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaría L, García-Hernández B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J (2004) Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* 11:561–566
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. University of California Agricultural Experiment Station, Berkeley, pp 1–32
- Horton P (2000) Prospects for crop improvement through the genetic manipulation of photosynthesis: morphological and biochemical aspects of light capture. *J Exp Bot* 51:475–485
- Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A (2004) Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* 218:721–728
- Jansen MAK, Hectors K, O'Brien NM, Guisez Y, Potters G (2008) Plant stress and human health: do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci* 175:449–458
- Khan MH, Panda SK (2008) Alterations in root lipid peroxidation and antioxidant responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant* 30:81–89
- Ko FN, Chu CC, Lin CN, Chang CC, Teng CM (1998) Isoorientin-6''-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Genetiana arisanensis*. *BBA* 1389:8190. (Abstract)
- Konieczny R, Libik M, Tuleja M, Niewiadomska E, Miszalski Z (2008) Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. *Acta Physiol Plant* 30:71–79
- Kováčik J, Bačkor M (2007) Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in *Chamomile* tolerance to cadmium and copper excess. *Water Air Soil Pollut* 185:185–193
- Laloi C, Przybyla D, Apel K (2006) A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 57(8):1719–1724
- Le Bot J, Bénard C, Robin C, Bourgaud F, Adamowicz S (2009) The 'trade-off' between synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency. *J Exp Bot* 60(15):4301–4314
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350–382
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280–287
- Marcelis LFM, Heuvelink E (2007) Concepts of modeling carbon allocation among plant organs. In: Vos J, Marcelis LFM, Visser PHB, Struik PC, Evers JB (eds) Functional–structural plant modelling in crop production, 1st edn. Springer, Berlin, pp 103–111

- McNally DJ, Wurms KV, Labbé C, Quideau S, Bélanger RR (2003) Complex C-glicosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. J Nat Prod 66:1280–1283
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport and signaling. J Exp Bot 58(9):2297–2306
- Mosaleeyanon K, Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T (2005) Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. Plant Sci 169:523–531
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473–497
- Nicasio P, Aguilar S, Aranda E, Ortíz S, González M (2005) Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. Phytother Res 19:661–664
- Nicasio-Torres P, Erazo-Gómez JC, Cruz-Sosa F (2009) In vitro propagation of two antidiabetic species known as guarumbo: *Cecropia obtusifolia* and *Cecropia peltata*. Acta Physiol Plant 31(5):905–914
- Osuna L, Mora A, Ventura E, Jiménez E, Bazaldúa C, Jiménez A (2008) Micropropagation of *Aristolochia elegans* (Mast.). J Crop Sci Biotech 10(3):141–146
- Palumbo MJ, Putz FE, Talcott ST (2007) Nitrogen and gender effects on the secondary metabolism of yaupon, a caffeine-containing North American holly. Oecologia 151:1–9
- Poorter H, Pepin S, Rijkers T, Jong Y, Evans JR, Körner C (2006) Construction costs, chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. J Exp Bot 57(2):355–371
- Raskin I, Ribnicky DM, Komamytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Comwell T, Pastor I, Friendler B (2002) Plants and human health in the twenty-first century. Trends Biotechnol 20:522–531
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26(9/10):1231–1237
- Revilla-Monsalve MC, Andrade-Cetto A, Palomino-Garibay MA, Wiedenfeld H, Islas-Andrade S (2007) Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract on type 2 diabetic patients. J Ethnopharmacol 111:636–640
- Rodríguez de Sotillo DV, Hadley M (2002) Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. J Nutr Biochem 13:717–726
- Ryser P, Eek L (2000) Consequences of phenotypic plasticity vs. interspecific differences in leaf and root traits for acquisition of aboveground and belowground resources. Am J Bot 87(3):402–411
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamashi H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology 177:67–80
- Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y (2007) Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. Food Chem 101:1012–1018
- Street RA, Van Staden SJ (2008) South African traditional medicinal plant trade- challenges in regulating quality, safety and efficacy. J Ethnopharmacol 119:705–710
- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. J Exp Bot 53(370):971–977
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. Sci Hortic 108:7–14
- Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR (2005) Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. J Exp Bot 56(410):309–321
- Wilson JB (1988) A review of evidence on the control of shoot:root ratio in relation to models. Ann Bot 61:433–449
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr Opin Plant Biol 5:218–223



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00088

Matricula: 207381750

ESTUDIO DE LA ACUMULACION DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y OTROS EVENTOS BIOQUIMICOS RELACIONADOS CON LA RESPUESTA AL SUMINISTRO DE LUZ Y NITRATO EN PLANTAS DE *Cecropia peltata*.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 2 del mes de mayo del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA
- DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
- DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR
- DRA. GABRIELA SEPULVEDA JIMENEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: ALEJANDRO MORA IZQUIERDO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


*- Aprobar -*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.





ALEJANDRO MORA IZQUIERDO  
ALUMNO

REVISÓ




LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE



DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA

VOCAL



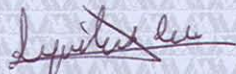
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

VOCAL



DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR

SECRETARIA



DRA. GABRIELA SEPULVEDA JIMENEZ