

ARTÍCULO CORTO

Cuantificación de fenoles y flavonoides en callos de *Psychotria erythrocarpa* Schldl

Leonardo Santiago-Segura, Miguel Ángel Ramírez-López, Jazmín Axél De la Cruz-López, Joseph Rodrigo Hernández-Hernández, Juan Antonio Maza-Ruiz, Erick Javier Sarmiento-Gómez, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli, José Alfredo Santiz-Gómez*

División de Estudios de Posgrado e Investigación, laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Resumen

La familia Rubiaceae se caracteriza por la producción de una gran diversidad de metabolitos bioactivos, los cuales han mostrado gran potencial farmacológico. El género *Psychotria* pertenece a esta familia. Para *Psychotria erythrocarpa* no existen reportes sobre el perfil fotoquímico y el cultivo *in vitro*. Por ello, el objetivo de esta investigación fue inducir la formación de callos en explantes de *P. erythrocarpa* para determinar el contenido de fenoles y flavonoides. Se desinfectaron explantes de tallos y hojas y se indujo la formación de callos empleando un diseño experimental multifactorial 2^3 evaluando el efecto del ácido naftalenacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y bencilaminopurina en concentraciones de 0 a 2 mg L⁻¹. Se obtuvieron valores de desinfección del 33% al 100% y no hubo diferencia significativa entre los tipos de explantes. Respecto a la formación de callos, el mejor tratamiento fue el que contenía ácido naftalenacético y bencilaminopurina para los explantes de tallos y para los explantes de hojas el tratamiento que contenía ácido 2,4-diclorofenoxiacético y bencilaminopurina. Los explantes de tallos mostraron diferencia significativa respecto a los explantes de hojas. Finalmente, el contenido de fenoles y flavonoides totales no presentó diferencia significativa entre los dos tipos de callos evaluados, pero sí fue significativamente diferente cuando se comparó con el tratamiento control. Esta investigación es el primer reporte sobre la desinfección de explantes para el establecimiento *in vitro*, inducción de callos y cuantificación de metabolitos secundarios en *P. erythrocarpa*.

Palabras clave:

Callogénesis
Desinfección
Metabolitos secundarios
Reguladores de crecimiento

Keywords:

Callogenesis
Disinfection
Secondary metabolites
Growth regulators

Quantification of phenols and flavonoids in callus of *Psychotria erythrocarpa* Schldl

Abstract

The Rubiaceae family is characterized by the production of a great diversity of bioactive metabolites which have shown great pharmacological potential. The *Psychotria* genus belongs to this family. In *Psychotria erythrocarpa* there are no reports about the phytochemical profile and *in vitro* culture. Therefore, the aim of this research was to induce callus formation in *P. erythrocarpa* explants to determine the phenol and flavonoid content. For this purpose, stem and leaf explants were disinfected, and callus formation was induced using a multifactorial experimental design 2^3 evaluating the effect of naphthaleneacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzylaminopurine in concentrations of 0 to 2 mg L⁻¹. The disinfection was from 33% to 100% and there was no significant difference between the types of explants. Regarding callus formation, the best treatment was the one containing naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine for stem explants and the treatment containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzylaminopurine for leaf explants. Stem explants showed a significant difference compared to leaf explants. Finally, the content of total phenols and flavonoids did not present a significant difference between the two types of calluses evaluated, but it was significant when compared with the control treatment. This research is the first report on the disinfection of explants for *in vitro* establishment, callus induction and quantification of secondary metabolites in *P. erythrocarpa*.

* Autor para correspondencia:

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km. 1080, Colonia Juan Crispin. C.P. 29050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Teléfono: + 52 9616150138 ext. 304-305. Correo-electrónico: jose.sg@tuxtla.tecnm.mx

1. Introducción

La familia de las Rubiaceae incluye aproximadamente 637 géneros y 13,000 especies. Tiene una distribución cosmopolita que se concentra principalmente en los trópicos (Mongrand et al., 2005; Pereira y Meireles, 2010). La familia Rubiaceae se caracteriza por la producción de una gran diversidad de metabolitos bioactivos como iridoides, alcaloides indol, antraquinonas, terpenoides, taninos, saponinas, esteroides, flavonoides y otros derivados fenólicos, muchos de ellos con gran potencial farmacológico y otros empleados en la medicina tradicional (Cardoso et al., 2008; Martins y Nunez, 2015). El número de productos descritos, la diversidad estructural y las actividades farmacológicas reportadas para varias especies de la familia Rubiaceae demuestran que es una fuente prometedora de nuevas sustancias bioactivas o productos como moléculas activas e incluso prototipos de fármacos. Muchas de estas plantas tienen uso generalizado en la medicina tradicional y algunas han mostrado efectos antiinflamatorios, analgésicos, antibacterianos, mutagénicos, antivirales, antioxidantes y actividad sobre el sistema nervioso central (Heitzman et al., 2005).

Su clasificación taxonómica es compleja y se divide en cuatro subfamilias: Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Ixoroideae (Martins y Nunez, 2015). Dentro de la subfamilia Rubioideae se encuentra el género *Psychotria*. Las plantas del género *Psychotria* son productoras de sustancias con actividad sobre el sistema nervioso central, como *P. viridis*, conocida popularmente como “ayahuasca” que significa “vino del alma”, la cual se utiliza en ceremonias religiosas (Freedland y Mansbach, 1999). *P. acuminata* es otra planta medicinal de interés comercial y farmacéutico debido a su capacidad para producir alcaloides como isoquinolina, emetina, cefaelina y psychotrina (Glinski et al., 1995).

P. ipecacuanha, es una planta medicinal que se encuentra en peligro de extinción, debido principalmente a la sobreexplotación y pérdida de su hábitat natural (Alves-García et al., 2005) debido a que el extracto de la raíz es utilizado y reconocido en la farmacopea como amebicida, emético y expectorante (Nomura y Kutchan, 2010). En esta especie la emetina, es el componente bioactivo que se encuentra en mayor proporción (60-70%), es extraído de la corteza del rizoma y de las raíces. Actúa inhibiendo la síntesis y actividad de proteínas, del ADN y ARN ribosomales y mitocondriales en ensayos realizados en células de mamífero, levaduras y vegetales (Akinboye y Bakare, 2011), también se ha reportado que este alcaloide tiene actividad antiviral significativa contra el virus del dengue (Low et al., 2009).

En cuanto al empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* en este género, en *P. ipecacuana* se ha reportado la propagación a partir de ápices, segmentos nodales y de raíz (Ideda et al., 1988; Jha y Jha, 1989; Yoshimatsu y Shimomura, 1991; Yoshimatsu y Shimomura, 1994), la embriogénesis somática (Naranjo et al., 2014; Rout et al., 2000) y el empleo de

sistemas de inmersión temporal (Batistini et al., 2002). En *P. acuminata* se han obtenido brotes a partir de hojas y se ha establecido la propagación clonal (Lara et al., 2003). Las especies de la familia Rubiaceae han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista fitoquímico. Por otro lado, pocos estudios han utilizado este conocimiento como herramienta en estudios de cultivo *in vitro* y se han limitado a estudiar solo algunas especies. En este sentido, es importante ampliar las investigaciones a otras especies del género *Psychotria* para aumentar la probabilidad de encontrar compuestos bioactivos, lo que permitirá descubrir nuevos fármacos originados en la naturaleza o encontrar otras alternativas en el cultivo *in vitro* para incrementar la producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico. Por ello, el objetivo de esta investigación fue inducir la formación de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* para determinar el contenido de fenoles y flavonoides en el cultivo *in vitro*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal

Plántulas de *P. erythrocarpa* Schltld de tres meses de edad cultivadas en invernadero fueron proporcionadas por el Jardín Botánico Faustino Miranda de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México (16°45' N, 93°07' O). Las plántulas se emplearon para obtener explantes asépticos para la posterior inducción de callos.

2.2. Desinfección de explantes

Se seleccionaron muestras de hojas y tallos y se desinfectaron. Primero se llevó a cabo un lavado con agua y jabón líquido comercial durante 10 min con agitación manual seguido de un enjuague con agua destilada. Posteriormente se realizó un lavado con captan (Metfaver®) y Agri-mycin 500® al 0.5% (p v⁻¹) durante 10 min con agitación manual y posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada. La desinfección se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (VECO®), las muestras se sumergieron en una solución de etanol (MEYER®) al 70% (v v⁻¹) durante 5 min, posteriormente se realizaron tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada esterilizada. Después, se realizó la desinfección con NaClO comercial al 50% (v v⁻¹) durante 10 min con agitación manual. Finalmente se realizaron tres enjuagues de 3 min cada uno con agua destilada esterilizada. Los explantes desinfectados se emplearon para la inducción de callos.

2.3. Inducción de callos

Los explantes desinfectados se establecieron en medio MS (Sigma-Aldrich®) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de fitagel (Sigma-Aldrich®). Para la inducción de callogenesis se empleó un diseño experimental factorial 2³, evaluando tres reguladores de crecimiento que fueron ácido naftalenacético (ANA, Sigma-Aldrich®), bencilaminopurina (BAP, Sigma-Aldrich®) y ácido 2,4-dicloroenoxiacético (2,4-D, Sigma-Aldrich®) cada uno con dos concentraciones

que fueron 0 y 2 mg L⁻¹, generando 8 tratamientos (Cuadro 1) con tres repeticiones cada uno. Finalmente, los cultivos se mantuvieron en cámara bioclimática con un fotoperiodo de 16 h a 25±2 °C durante 40 días y se determinó el porcentaje de desinfección y el porcentaje de formación de callos. Los mejores tratamientos en la inducción de callos se seleccionaron para continuar con la proliferación de callos y la posterior cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

Cuadro 1. Diseño experimental multifactorial 2³ empleado para la inducción de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* Schldl.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)		
	ANA	BAP	2,4-D
1	0	0	0
2	2	0	0
3	0	2	0
4	2	2	0
5	0	0	2
6	2	0	2
7	0	2	2
8	2	2	2

2.4. Obtención de extractos metanólicos

Los extractos metanólicos tanto de callos como de plantas mantenidas en invernadero (Control) se obtuvieron de acuerdo con Martínez-Silvestre et al. (2022). Se pesaron 250 mg de muestra vegetal y se adicionaron 50 mL de metanol (MEYER®), se mantuvo bajo sonicación (Ultrasonic, CO-Z PS-30) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mantuvieron en agitador rotatorio (Barnstead, SHKA3000) a 100 rpm por 24 h. Al término de este periodo, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró y el residuo se lavó dos veces con 5 mL de metanol para posteriormente volver a filtrar. Los sobrenadantes combinados se evaporaron a presión reducida en un rotavapor (BUCHI® R-100) y se almacenó como extracto seco a -20 °C hasta su uso para resuspender en 3 mL de metanol.

2.5. Determinación de fenoles totales

La cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por Singleton et al. (1999). Se tomaron 20 µL del extracto metanólico correspondiente y se añadieron 1.5 mL de agua destilada y 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®). Después de 5 min se añadieron 300 µL de solución de carbonato de sodio (Sigma-Aldrich®) al 20% (p v⁻¹). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. La absorbancia resultante se midió a 765 nm empleando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific®, GENESYS 150). El contenido fenólico total se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por g de peso seco. La cuantificación se realizó con respecto a la curva de calibración estándar de 0 a 1000 mg L⁻¹ de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) disuelto en metanol.

2.6. Determinación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides se llevó a cabo mediante el método establecido por Chang et al. (2002). A 250 µL del extracto metanólico correspondiente, se le adicionaron 750 µL de etanol (MEYER®) al 95% (v v⁻¹), 50 µL de cloruro de aluminio (MEYER®) al 10% (p v⁻¹), 50 µL de acetato de potasio (BAKER®) 1 M y 1.4 mL de agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 415 nm empleando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific®, GENESYS 150). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por g de peso seco. La cuantificación se realizó con respecto a la curva de calibración estándar de quercetina (Sigma-Aldrich®) a concentraciones de 0 a 100 mg L⁻¹.

2.7. Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron completamente al azar y para cada unidad experimental se tuvieron tres repeticiones. Con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza de una vía para conocer los efectos de las interacciones entre los niveles de los factores. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de LSD (P<0.05) con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion XVII.

3. Resultados y Discusión

3.1. Desinfección e inducción de callos

El principal requerimiento para el cultivo *in vitro* es la asepsia en los tejidos cultivados, por tal motivo el protocolo de desinfección debe brindar elevados porcentajes de desinfección en los explantes a utilizar. Sin embargo, tratamientos más fuertes de desinfección con los productos utilizados siempre resultan en un control total de la contaminación, pero asociado con la muerte de los explantes, sobre todo cuando se emplean agentes oxidantes como el NaClO. El protocolo de desinfección empleado permitió porcentajes de desinfección desde el 33% hasta el 100% tanto en los explantes de hojas como en los explantes de tallos (Cuadro 2). En ambos tipos de explantes no hubo diferencia estadística significativa (P<0.05) respecto al porcentaje de desinfección, por lo que fue posible la obtención de explantes asépticos para la inducción de callos. Resultados similares empleando NaClO y etanol se han reportado en brotes de *Psychotria ipecacuana* (Ideda et al., 1988). De igual manera los resultados obtenidos en esta investigación son correspondientes a lo reportado por Lara et al. (2003) en la desinfección de explantes de hojas y tallos de *Psychotria acuminata*.

Respecto a la inducción de callos, se obtuvo 33% de formación de callos en los tratamientos 5, 7 y 8 en los explantes de hojas. Así mismo, se obtuvo 66% y 100% de formación de callos en los tratamientos 4 y 6, respectivamente, en los explantes de tallos los cuales presentaron diferencia significativa (P<0.05) comparado con los explantes de hojas (Cuadro 2). La inducción de callo se hizo evidente inicialmente en las zonas de corte de las hojas,

en los bordes y en la zona de incisión de los tallos, debido a la tendencia que tienen los cultivos vegetales de formar callos

a partir de las heridas como una medida de defensa natural (George et al., 2008).

Cuadro 2. Valores de desinfección y formación de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* Schltldl.

Tratamientos	Explantes de hojas		Explantes de tallos	
	Desinfección (%)	Callogénesis (%)	Desinfección (%)	Callogénesis (%)
1	100 ^a	0 ^c	66 ^a	0 ^c
2	66 ^a	0 ^c	33 ^a	0 ^c
3	66 ^a	0 ^c	100 ^a	0 ^c
4	33 ^a	0 ^c	66 ^a	66 ^{ab}
5	66 ^a	33 ^{bc}	33 ^a	0 ^c
6	100 ^a	0 ^c	100 ^a	100 ^a
7	66 ^a	33 ^{bc}	66 ^a	0 ^c
8	100 ^a	33 ^{bc}	66 ^a	0 ^c
LSD	79.61	48.01	79.61	48.01

^{a-c}Letras diferentes por columna denotan diferencia significativa (P<0.05)

Después de 40 días de incubación, los callos obtenidos a partir de los explantes de tallos fueron friables con tonalidades de color beige traslucidos en los bordes y tonalidades verde-amarillo en el centro del callo (Figura 1A), mientras que los callos obtenidos a partir de los explantes de hojas también fueron friables, pero con tonalidades amarillas en los bordes y tonalidades verdes intensas en el centro del callo (Figura 1B).

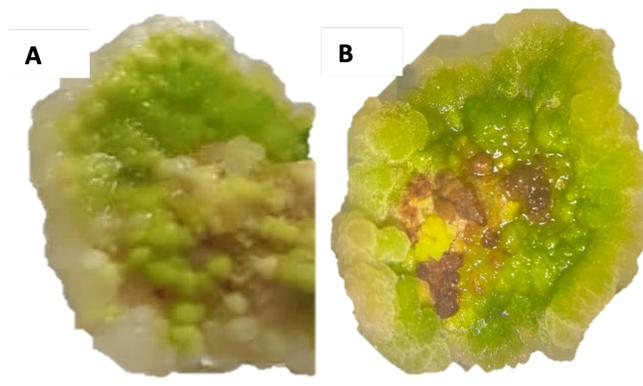


Figura 1. Formación de callos en explantes de *Psychotria erythrocarpa* Schltldl, después de 40 días de incubación. Callos desarrollados en explantes de tallos (A), callos desarrollados en explantes de hojas (B). Barra de escala= 1 cm.

En ambos tipos de callos se observó secciones con tonalidades café y marrón en el centro del callo, esto debido a la oxidación fenólica del explante original (tallo u hoja) sobre el cual se desarrolló cada tipo de callo, lo cual no afectó su crecimiento y desarrollo. Estos resultados son similares a lo reportado en *P. ipecacuana* cuando los explantes de hojas se agrandaron y desarrollaron callos en las superficies de corte y posteriormente cubrieron toda la superficie de los explantes (Rout et al., 2000). De igual manera, se ha reportado que los callos obtenidos en explantes de hojas de *P. ipecacuana* suplementados con cinetina y 2,4-D presentaron una tasa de crecimiento más rápida compara con los explantes que fueron suplementados con cinetina y ANA

mientras que la combinación de BAP y ANA redujo la inducción de callos (Rout et al., 2000). En *P. ipecacuana* también se ha reportado que las combinaciones de ANA y BAP son más efectivas para lograr la formación de brotes múltiples (Ideda et al., 1988). Así mismo, se ha reportado que la adición de ANA en explantes de hojas induce la formación de raíces en esta especie (Yoshimatsu y Shimomura, 1994). En *P. acuminata* se ha reportado que la combinación de BAP y ANA induce la formación de callos organogénicos en explantes de entre nudos (Lara et al., 2003). Por ello, para la proliferación de callos, se seleccionó el tratamiento 4 (ANA+BAP) para los callos provenientes de explantes de tallos y el tratamiento 7 (BAP+2,4-D) para los callos provenientes de los explantes de hojas, debido a que se requerían callos para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y no brotes, raíces o embriones. En este sentido, las especies perennes tienen en general menor plasticidad en respuesta al medio ambiente y una tasa de crecimiento más lenta que las especies herbáceas, por ello, requieren de concentraciones más elevadas de reguladores de crecimiento para generar una respuesta morfogénica (Yoshimatsu y Shimomura, 1991). Las concentraciones de reguladores de crecimiento empleadas en esta investigación son correspondientes a lo reportado en *P. ipecacuana* y *P. acuminata*, y permitieron la inducción de callos tanto en los explantes de hojas como en los explantes de tallos ya que la relación entre estos reguladores induce la división celular ilimitada al desencadenar su potencial proliferativo a través de callogénesis (Ikeuchi et al., 2013; Rahman et al., 2019).

3.2. Determinación de fenoles y flavonoides totales

El contenido de fenoles y flavonoides totales en callos proliferados a partir de explantes de tallos y hojas se comparó con el de plantas Control (Cuadro 3). El contenido de fenoles y flavonoides totales en las plantas control mostró diferencia significativa (P<0.05) respecto al contenido de fenoles y flavonoides totales en los callos proliferados. Sin embargo, no hubo diferencia significativa (P>0.05) entre los dos tipos de callos evaluados.

Cuadro 3. Concentración de fenoles y flavonoides totales en el cultivo de callos de *Psychotria erythrocarpa* Schltld.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)			Fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico g ⁻¹ de peso seco)	Flavonoides totales (mg equivalentes de quercetina g ⁻¹ de peso seco)
	ANA	BAP	2,4-D		
Control (plantas de invernadero)	0	0	0	0.262 ^a	0.129 ^a
4 (callos provenientes de tallos)	2	2	0	0.034 ^b	0.054 ^b
7 (callos provenientes de hojas)	0	2	2	0.137 ^b	0.064 ^b
LSD				0.1108	0.0303

^{a,b}Letras diferentes por columna denotan diferencia significativa (P<0.05)

El cultivo de tejidos vegetales representa una alternativa para la obtención compuestos o moléculas activas de plantas. En este sentido, la callogenésis es el proceso morfogénico mediante el cual se da lugar a la formación de estructuras desdiferenciadas en tejidos vegetales. El callo es una masa desorganizada de células poco diferenciadas que se da en respuesta a una lesión, herida o estímulo en una parte específica del tejido vegetal. Se forma como barrera protectora que ayuda a la planta a sellar una herida y promueve la regeneración del tejido, por lo que ocurre de manera natural como defensa ante daños como cortes, heridas o infecciones (Ikeuchi et al., 2013). La callogenésis puede ser inducida de forma controlada mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. El cultivo de células a partir de callo puede ser utilizado para la producción de metabolitos secundarios en biorreactores, lo que es ventajoso en plantas con propiedades medicinales (Lara et al., 2003) y pueden ser aplicadas en *P. erythrocarpa*. Para que haya una producción óptima de metabolitos secundarios, debe haber presencia de hormonas como las citoquininas ya que estas trabajan en sinergia con las auxinas endógenas. Por otra parte, la presencia equilibrada de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo puede mejorar la acumulación de metabolitos secundarios, ya que las auxinas promueven la formación de callos y la proliferación celular, mientras que las citoquininas promueven la diferenciación celular, lo que está estrechamente relacionado con la acumulación de metabolitos secundarios (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). En *P. erythrocarpa* no existen reportes sobre el perfil fitoquímico, sin embargo, se ha reportado el incremento en la producción de camptotecina en callos de *Nothapodytes foetida* suplementados con BAP y 2,4-D (Thengane et al., 2003), la producción de camptotecina y 10-hidroxicamptotecina en callos de *Camptotheca acuminata* suplementados con ANA y BAP (Wiefenfeld et al., 1997), así como la acumulación de fenoles y flavonoides en callos de *Sideroxylon capiri* suplementados con 2,4-D y TDZ (Martínez-Silvestre et al., 2022). Por lo que el cultivo de callos suplementados con ANA+BAP y 2,4-D+BAP representa una alternativa en la producción de metabolitos secundarios en esta especie.

4. Conclusión

Esta investigación es el primer reporte sobre la desinfección de explantes para el establecimiento del cultivo *in vitro*, inducción de callos y cuantificación de metabolitos secundarios en *Psychotria erythrocarpa* Schltld. Los explantes de *P. erythrocarpa*, fueron susceptibles a la desinfección y morfogénesis *in vitro* por lo que fue posible la inducción de callos en esta especie incrementando las fuentes de obtención de metabolitos secundarios a partir del cultivo de tejidos vegetales.

Agradecimientos

Los autores agradecen laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por proporcionar las instalaciones para la realización de la investigación y al Jardín Botánico Faustino Miranda de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México, por la donación de plántulas de *Psychotria erythrocarpa* Schltld.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Akinboye ES, Bakare O. 2011. Biological activities of emetine. *Open Natural Products Journal* 4: 8-5.
- Alves-García R, Oliveira L, Alves-Moreira M, Silva-Barros W. 2005. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 233-243.
- Batistini AP, Moro JR, França SC, Pereira AMS. 2002. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo "in vitro" para micropropagação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 5(1): 27-35.
- Cardoso CL, Silva DHS, Young MCM, Castro-Gamboa I, Bolzani, VDS. 2008. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 26-29.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary

- colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Freedland CS, Mansbach RS. 1999. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug and Alcohol Dependence* 54: 183-194.
- George EF, Hall MA, Klerk GJD. 2008. Plant Tissue Culture Procedure - Background. En: George EF, Hall MA, Klerk GJD. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht. Pp. 1-28.
- Glinski JA, David E, Warren TC, Hansen G, Leonard SF, Pitner P, Pav S, Arvigo R, Balick MJ, Panti E, Grob PM. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide "a", a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochemistry and Photobiology* 62(4): 144-150.
- Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66: 5-29.
- Ideda K, Teshima D, Aoyama T, Satake M, Shimomura K. 1988. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. *Plant Cell Reports* 7(4): 288-291.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 5(9): 3159-3173.
- Jha S, Jha TB. 1989. Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* rich. *Plant Cell Reports* 8(8): 437-439.
- Lara A, Valverde R, Gómez L, Hidalgo N. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(2): 7-20.
- Low SYJ, Caiyun CK, Xing WK, Mah-Lee NM, Jang HCJ. 2009. Antiviral activity of emetine dihydrochloride against dengue virus infection. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals* 1(1): 62-71.
- Martins D, Nunez CV. 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20(7): 13422-13495.
- Martínez-Silvestre KE, Santiz-Gómez JA, Luján-Hidalgo MC, Ruiz-Lau N, Sánchez-Roque Y, Gutiérrez-Miceli FA. 2022. Effect of UV-B radiation on flavonoids and phenols accumulation in tempisque (*Sideroxylon capiri* Pittier) callus. *Plants* 11: 473.
- Mongrand S, Badoc A, Patouille B, Lacomblez C, Chavent M, Bessoule JJ. 2005. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry* 66: 549-559.
- Naranjo EJ, Urrea AI, Atehortúa L. 2014. Avances en la propagación vía embriogénesis somática de *Psychotria ipecacuana* (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16(1): 86-92.
- Nomura T, Kutchan T. 2010. Three new o-methyltransferases are sufficient for all o-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. *The Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7722-7738.
- Pereira CG, Meireles MAA. 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology* 3: 340-372.
- Pérez-Alonso N, Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 11(4): 195-211.
- Rahman N, Rosli R, Kadzimin S, Hakiman M. 2019. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental and Applied Agriculture* 4(3): 928-932.
- Rout G, Samantaray S, Das P. 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae* 86(1): 71-79.
- Singleton V, Orthofer R, Lamuela R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. En: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology* Vol. 299. Academic Press. London, UK. Pp. 153-178.
- Thengane SR, Kulkarni DK, Shrikhande VA, Joshi SP, Sonawane KB, Krishnamurthy KV. 2003. Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(3): 247-251.
- Wiedenfeld H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W. 1997. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49(3): 213-218.
- Yoshimatsu K, Shimomura K. 1991. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Plant Cell Reports* 9(10): 567-570.
- Yoshimatsu K, Shimomura K. 1994. Plant regeneration on cultured root segments of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Plant Cell Reports* 14(2-3): 98-101.