



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades

Unidad Académica de los estudios Profesionales y de Postgrado

Sede: Instituto de Investigaciones Biomédicas

ESTUDIO SOBRE LA IMPLEMENTACION DE UN  
CULTIVO DE CELULAS VEGETALES DE  
*Digitalis purpurea* PARA LA BIOTRANS-  
FORMACION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A :  
ELDA MA. BELTRAN PEÑA

MEXICO, D. F.

1989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
1. FUNDAMENTACION	2
1.1. Importancia de los glucósidos cardiacos.	2
1.2. Características de la <i>Digitalis sp.</i>	2
1.3. Estructura química y síntesis de los glucósidos cardiacos.	4
1.4. Biosíntesis de los glucósidos cardiacos.	6
1.5. Metabolismo y acción inotrópica.	7
1.6. Cultivo de células y tejidos vegetales.	9
1.7. Producción de cardiotónicos a partir del cultivo de tejidos y células en suspensión.	18
1.8. Biotransformación de glucósidos cardiacos mediante el cultivo de células vegetales.	19
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL Y METODOS	33
4. RESULTADOS Y DISCUSION	41
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67

## INDICE DE FIGURAS

		Página
Fig. 1	Ejemplar de <i>Digitalis purpurea</i> L.	3
Fig. 2	Estructura química general de los glucósidos cardíacos.	5
Fig. 3	Intermediarios de la biosíntesis de glucósidos cardíacos.	8
Fig. 4	Estrategia de selección para líneas celulares con altos rendimientos.	13
Fig. 5	Transformación de digitoxigenina por cultivos celulares de <i>Digitalis</i> .	21
Fig. 6	Transformación de digitoxina, digoxina y gitoxina por cultivos de células de <i>Digitalis</i> spp.	23
Fig. 7	Transformación de $\alpha$ -acetildigitoxina por cultivos celulares de <i>Digitalis lanata</i> .	24
Fig. 8	Transformación del lanatósido A por cultivos celulares de <i>Digitalis lanata</i> .	26
Fig. 9	Transformación del lanatósido A por cultivos celulares de <i>Digitalis lutea</i> .	27
Fig. 10	Biotransformación de $\beta$ -metildigitoxina por las cepas 128, 293, BHL, 447, 445, 130, 508 y 216 de <i>D. lanata</i> .	28
Fig. 11	Biotransformación de $\beta$ -metildigitoxina por las cepas 9-14, 10-2, 347, B2, 72L, 293, 23-17, 364, E1, E2 y 22-6 de <i>D. lanata</i> .	30
Fig. 12	Transformación de $\beta$ -metildigitoxina por las cepas 291, 287, 72D y 285 de <i>D. lanata</i> .	31
Fig. 13	Curva tipo de glucosa	39
Fig. 14	Crecimiento del tejido calloso de <i>D. purpurea</i> en los medios Murashige-Skoog y Schenk-Hildebrant.	44
Fig. 15	Crecimiento del tejido calloso de <i>D. purpurea</i> en el medio Murashige-Skoog.	46
Fig. 16	Crecimiento del tejido calloso de <i>D. purpurea</i> en el medio Schenk-Hildebrant.	47

Fig. 17.	Crecimiento del tejido calloso de <i>D. purpurea</i> en el medio Schenk-Hildebrant con inóculo controlado.	48
Fig. 18.	Gráfica semilogarítmica de peso fresco contra tiempo de incubación del callo en medio Schenk-Hildebrant.	49
Fig. 19	Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares en el establecimiento de cultivos celulares de <i>D. purpurea</i> .	53
Fig. 20	Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los subcultivos celulares de <i>D. purpurea</i> .	54
Fig. 21	Gráfica semilogarítmica de peso seco contra tiempo de incubación de los subcultivos celulares de <i>D. purpurea</i> .	55
Fig. 22	Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares durante la biotransformación de digitoxina en los cultivos celulares de <i>D. purpurea</i> .	58
Fig. 23	Gráfica semilogarítmica de peso seco contra tiempo de incubación, en la biotransformación de los cultivos celulares.	59
Fig. 24	Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los cultivos celulares SH-A2 en los medios modificados.	62
Fig. 25	Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los cultivos celulares SH-A3 en los medios modificados.	63

## INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Comparación de las características de las células microbianas y vegetales.	17
Tabla 2	Desinfestación de semillas de <i>D. purpurea</i> .	34
Tabla 3	Composición de los medios de cultivo.	35
Tabla 4	Concentración de fitohormonas.	36
Tabla 5	Respuesta de las semillas de <i>D. purpurea</i> a los tratamientos de desinfestación.	41
Tabla 6	Efecto del medio nutritivo, reguladores de crecimiento y su concentración sobre los cotiledones de <i>D. purpurea</i> .	43
Tabla 7	Características de crecimiento del tejido calloso en las resiembras sobre medio sólido Schenk-Hildebrant.	45
Tabla 8	Características de crecimiento del tejido calloso en medio sólido Schenk-Hildebrant.	50
Tabla 9	Detección de cardiotónicos por cromatografía en capa delgada a diferentes tiempos de crecimiento del tejido calloso de <i>D. purpurea</i> .	51
Tabla 10	Características de crecimiento del subcultivo de células de <i>D. purpurea</i> en suspensión.	52
Tabla 11	Características de crecimiento de los cultivos celulares de <i>D. purpurea</i> durante la biotransformación.	57
Tabla 12	Detección de cardiotónicos en las cinéticas de biotransformación de digitoxina, por cromatografía en capa delgada.	60
Tabla 13	Detección de cardiotónicos por cromatografía en capa delgada, en las cinéticas de biotransformación de digitoxina por cultivos celulares en medios modificados.	64

## RESUMEN

El presente estudio se orientó hacia la implementación de cultivos en suspensión de *D. purpurea*, para efectuar la biotransformación de digitoxina. Con este propósito, se cultivaron cotiledones de *D. purpurea* sobre los medios sólidos Murashige-Skoog y Schenk-Hildebrandt. Estos medios se suplementaron con 1, 2, y 3 p.p.m. de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido naftalén acético (ANA) a 1, 2 y 3 p.p.m.; ácido indol acético (AIA) a 1, 3 y 5 p.p.m. y una mezcla 1/1 p.p.m. de 2,4-D/cinetina. Bajo tales condiciones, los medios adicionados con ANA indujeron la formación de callo con sistema radicular, mientras que en los medios con AIA los cotiledones desarrollaron la planta completa. Solamente los medios suplementados con 2,4-D fueron capaces de inducir tejido calloso, encontrándose también que el medio basal SH estimula mejor el crecimiento de callo friable.

Se estudió el crecimiento y el contenido de glucósidos cardiacos en el tejido calloso, inducido en los medios Schenk-Hildebrandt con 1, 2, y 3 p.p.m. de 2,4-D, así como con 1/1 p.p.m. de 2,4-D/cinetina (SH-A1, SH-A2, SH-A3 y SHD), siendo notable que la concentración de 3 p.p.m. de 2,4-D promueve un crecimiento lento del callo y una mayor acumulación de cardiotónicos, principalmente gitoxina.

En las condiciones de crecimiento en medio líquido, el cultivo SH-A3 es el que se adapta y crece mejor en este sistema.

Los cuatro cultivos en suspensión, fueron capaces de transformar la digitoxina añadida, pudiéndose determinar la glucosilación en la tercera digitoxosa de la cadena lateral de carbohidratos y la hidroxilación en la posición 16 $\beta$  del esqueleto esterooidal, por la formación de purpúrea glucósido A, purpúrea glucósido B y gitoxina.

Los estudios preliminares sobre la biotransformación de  $\beta$ -metildigitoxina con células de *D. purpurea*, mostraron que este compuesto es transformado a digitoxina, purpúrea glucósido A, purpúrea glucósido B y gitoxina.

## INTRODUCCION

Las plantas superiores continúan siendo hasta nuestros días fuentes importantes de fármacos, agroquímicos, perfumes y saborizantes. Un ejemplo particular es la industria farmacéutica, donde a pesar de que el mercado está dominado por medicamentos sintéticos y derivados de microorganismos, el reino vegetal contribuye con un 25 % de los medicamentos prescritos.

En años recientes se ha dificultado el suministro de estas plantas, debido a diversos problemas como son la explotación incontrolada, disturbios del medio ambiente, cambios de clima, presencia de plagas etc.. De ahí que se halla incrementado el interés, sobre la posibilidad de producir metabolitos secundarios por cultivo de células y tejidos vegetales, (Tabata, 1977).

Se ha mostrado que algunos cultivos de células vegetales, son capaces de producir metabolitos secundarios, mientras que otros efectúan reacciones de biotransformación, sobre compuestos orgánicos añadidos a los medios de cultivo. Esto hace posible elevar el valor comercial de una sustancia. Además algunos cultivos, pueden sintetizar sustancias de estructura desconocida y con nuevas propiedades químicas y farmacológicas.

Los glucósidos cardiotónicos, digoxina y digitoxina, aislados de plantas del género *Digitalis*, son fármacos indispensables para el tratamiento de insuficiencia cardiaca. El mejor comportamiento farmacocinético y la mayor potencia que presenta la digoxina respecto a la digitoxina, ha incrementado el uso de la primera en detrimento de esta última. Esto ha ocasionado en las industrias un problema de acumulación de digitoxina. La transformación de digitoxina a digoxina ha sido posible por la hidroxilación específica en C-12 de la molécula, por medio de un cultivo de células de *Digitalis lanata*.

Por medio de microorganismos se han efectuado hidroxilaciones sobre la aglicona, sin embargo, la hidroxilación en C-12 del glucósido no ocurre o es incompleta. Tampoco la hidroxilación por métodos químicos es aplicable. De ahí que la biotransformación de substratos poco útiles, por cultivo de células vegetales se muestre como una alternativa importante (Reinhard, 1980).

En base a estos antecedentes, el presente trabajo se propone establecer las condiciones adecuadas para la obtención de cultivos celulares en suspensión de *Digitalis purpurea*, a fin de estudiar éstos como sistemas de biotransformación de glucósidos cardiacos.

## 1. FUNDAMENTACION

### 1.1. Importancia de los glucósidos cardiacos.

Las enfermedades cardiovasculares han aumentado en nuestro país y están clasificadas dentro de los primeros cinco lugares como principales causas de morbimortalidad. Uno de los grupos de fármacos más útiles para aliviar estos padecimientos son los cardiotónicos, y entre éstos, los glucósidos cardiacos digoxina y digitoxina, ocupan un lugar importante y están considerados en el cuadro básico de medicamentos del país (Diario Oficial 1988).

La producción de cardiotónicos a nivel mundial se realiza a partir del género *Digitalis*, del cual se aíslan digoxina y digitoxina, sustancias que en México se importan en su totalidad, según datos del Instituto Mexicano de Comercio Exterior (1987).

Desde un punto de vista farmacológico, los cardiotónicos usados en terapia cardiaca están lejos de ser satisfactorios. El margen terapéutico que presentan es muy estrecho, adicionalmente hay diferencias amplias en la respuesta de los pacientes a estos compuestos. Por lo que es importante encontrar, sustancias en las cuales, la actividad inotrópica positiva no esté conectada con las propiedades tóxicas. En base a modificaciones químicas, se han fabricado muchos derivados de los cardiotónicos, sin embargo, a la fecha ninguna de éstas modificaciones ha producido un compuesto con propiedades farmacológicas superiores, o con un mayor índice terapéutico, respecto a los cardiotónicos ya conocidos (Gunter, 1977). Debido a lo antes mencionado, la permanencia de la digoxina y la digitoxina, en el mercado, se contempla por un buen tiempo.

### 1.2. Características de la *Digitalis sp.*

Esta planta pertenece al género *Digitalis*, familia Escrofulariaceae (Trease, 1984). Es nativa de la Cuenca del Danubio y de Grecia (Burger, 1964), se encuentra localizada principalmente en los terrenos silicosos de las montañas de los Pirineos, de Guadarrama, de Salamanca y algunos otros lugares de Europa (San Martín, 1967).

En nuestro país, la *Digitalis purpurea* L, fue introducida como planta de ornato. Actualmente se localiza en los Estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Guerrero y Chiapas. Su distribución en estas regiones, está dada por condiciones climatológicas templadas y húmedas pero soleadas (Younken, 1961).

La *Digitalis* (ver figura 1), es una planta herbácea bianual, la cual produce en el primer año, una roseta de hojas lanceoladas; de cuyo centro se eleva en el segundo año, un tallo que mide de 1 a 1.5 m. de altura y lleva hojas alternas. Dichas hojas son de aspecto áspero, de color verde grisáceo, y miden de 10 a 30 cm. de



Fig.1 Ejemplar de *Digitalis purpurea* L.  
 A, planta; B, hoja en la parte media del tallo; C, inflorescencia; D, parte de la corola y dos de los cuatro estambres; E, fruto; F,G, dos vistas de las semillas. (Hagimori, 1982).

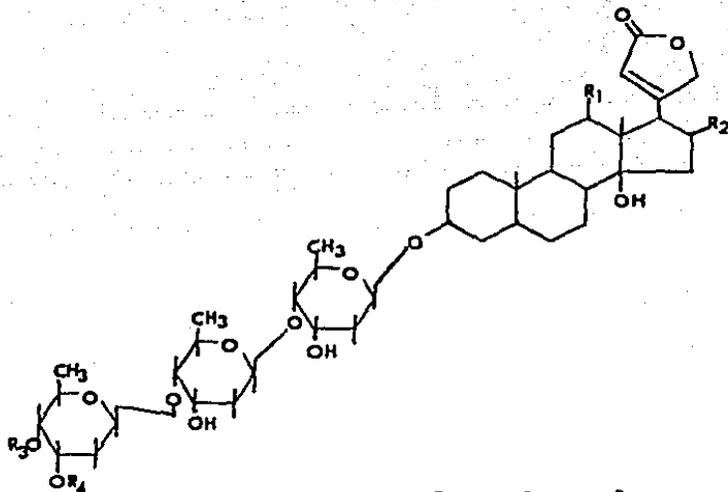
largo y de 4 a 10 cm. de ancho (Trease, 1984). Su olor es débil y su sabor es amargo y acre. Tiene racimos terminales de flores colgantes, de color blanco o púrpura. Existen dos tipos de hoja, las de la roseta inferior y las del tallo florido. El fruto es una cápsula piramidal de dos cavidades, las semillas son muy pequeñas de color amarillo pálido, la corola tiene una longitud de 4 a 5 cm compuesta por cinco pétalos (San Martín, 1967).

Dependiendo de la especie, el contenido de glucósidos cardiacos varía; así, las hojas de *D. lanata* contienen aproximadamente 1 % de cardenólidos totales, los cuales comprenden 60 compuestos diferentes. El lanatósido A y C constituyen el 50 % de los cardenólidos totales, y el lanatósido B, D, E, digoxina y digitoxina se presentan en bajas concentraciones. Mientras que las hojas de *D. purpurea*, presentan un contenido de cardenólidos totales de 0.15 a 0.4 %, con aproximadamente 30 glucósidos diferentes. Purpúrea glucósido A y B constituyen el 60 % de la mezcla, digitoxina 12 %, gitoxina y gitaloxina 10 % cada una (Wagner, 1984).

### 1.3. Estructura química y síntesis de los glucósidos cardiacos.

La fórmula estructural general de los glucósidos cardiacos se muestra en la figura 2. Dichos compuestos, son una mezcla de cicloacetales de azúcares y un alcohol esteroidal. La porción de la molécula sin el azúcar es llamada aglicona o genina. Todas las geninas de los glucósidos cardioactivos, tienen grupos hidroxilos unidos a C-3 y C-14, un grupo metilo en C-13, un grupo metilo, aldehído ó -CH<sub>2</sub>-OH en C-10 y un anillo lactona insaturado en C-17. Algunas de las geninas más complejas, pueden tener adicionalmente grupos metilo, hidroxilo o aldehído en otras posiciones. El núcleo esteroidal de los glucósidos cardiacos, difiere del esteroide perteneciente a hormonas sexuales y adrecorticales, en la fusión Cis/Trans/Cis de los anillos A/B, B/C y C/D respectivamente, (en las hormonas esteroidales, el arreglo es Cis/Trans/Trans, y el esqueleto esteroidal es prácticamente plano y extendido). El grupo metilo u otro substituyente en C-10 y C-13, el hidroxilo en C-14 y el anillo lactona, están todos en configuración  $\beta$ . El OH en C-3 del anillo A está usualmente orientado en  $\beta$ . El anillo lactona puede ser de cinco o seis miembros, con uno o dos dobles enlaces respectivamente. Los constituyentes de los cardenólidos, son de naturaleza esteroidal C-23 y contienen un anillo butenólido  $\alpha$  :  $\beta$ -insaturado  $\gamma$ -lactona, mientras que los bufadienólidos son esteroides C-24, que contienen una doble insaturación en la lactona de seis miembros. Estos anillos lactona presentan una estructura planar propia del doble enlace.

La porción del azúcar de los glucósidos, puede consistir de uno a cuatro monosacáridos. Aproximadamente 16 monosacáridos diferentes, se han aislado como productos de la hidrólisis de los glucósidos cardiacos. De éstos, solamente la glucosa, ramnosa y fucosa están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los monosacá-



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
DIGITOXINA	H	H	H	H
GITOXINA	H	OH	H	H
DIGOXINA	OH	H	H	H
PURPUREA GLUCOSIDO A	H	H	GLUC	H
PURPUREA GLUCOSIDO B	H	OH	GLUC	H
LANATOSIDO A	H	H	GLUC	ACETILO
LANATOSIDO B	H	OH	GLUC	ACETILO
LANATOSIDO C	OH	H	GLUC	ACETILO
DEACETIL LANATOSIDO C	OH	H	GLUC	H

Fig. 2 Estructura química general de los glucósidos cardiacos. (Burger, 1975).

ridos remanentes son muy raros, como el 2-deoxiglucosa. El azúcar terminal puede estar combinado con un grupo acetilo o formilo (Bowman, 1975).

En 1962 Sondhainer y col., reportaron las dificultades para la síntesis de estos compuestos, debido a la naturaleza lábil del grupo hidroxilo en C-14 de la genina. Dicho grupo es fácilmente removido por los ácidos, formando anhídrido genina.

Fritsh y col. en 1974, sintetizaron digitoxina a partir de 15-hidroxycortisona. En el mismo año Kruger, reportó la síntesis de  $3\beta$ -14 $\beta$ -19 oxigenado y de  $3\beta$ -19 oxigenado-14, 15 dihidrocardenólido de acetato de pregnenolona. Estos intentos nos muestran la complejidad de síntesis del grupo cardenólido, y es por esto que a la fecha se siguen obteniendo a partir de productos naturales.

#### 1.4. Biosíntesis de los glucósidos cardíacos.

Se ha establecido que el núcleo esteroideal, se origina a partir de ácido mevalónico, vía escualeno (Capstack, 1965). El ácido mevalónico, se obtiene a su vez de acetil-CoA, la cual puede ser obtenida a partir de varias rutas metabólicas (degradación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos). Reichstein (1964), encontró que el suministro de ácido mevalónico <sup>14</sup> C a plantas de *Digitalis*, producía digitoxigenina C-20 marcada.

En años recientes, la biosíntesis de cardenólidos se ha investigado en varios laboratorios. En plantas de *D. lanata*, la pregnenolona fue metabolizada a  $5\beta$ -pregnano-3,20-diona así como a cardenólidos. La *D. lanata*, también convierte la progesterona a  $5\beta$ -pregnano-3,20-diona y a  $5\beta$ -pregnano-3-ol-20-ona, estos dos compuestos son incorporados a los cardenólidos. Por lo tanto, se ha propuesto la siguiente ruta biosintética para la producción de cardenólidos, a partir de pregnenolona:

Pregnenolona  $\longrightarrow$  progesterona  $\longrightarrow$   $5\beta$ -pregnano-3,20-diona  $\longrightarrow$   
 $5\beta$ -pregnano-3-ol-20-ona  $\longrightarrow$   $5\beta$ -pregnano-3,14-diol-20-ona  $\longrightarrow$   
 $5\beta$ -pregnano-3,14,21-triol-20-ona  $\longrightarrow$  digitoxigenina  $\longrightarrow$   
 digitoxina. (Hirotsani, 1975).

La oxidación de la posición C-3 de la pregnenolona, para formar progesterona, es un paso obligatorio para la biosíntesis de cardenólidos (Caspi y Hornby, 1968). La reducción del enlace  $\Delta^4$  de la progesterona, da lugar a la formación de  $5\alpha$ -H-pregnano-3,20-diona y  $5\beta$ -H-pregnano-3,20-diona (Graves y Smith, 1967).

En *Digitalis*, los isómeros radioactivos 5 $\alpha$  son nueve veces mayores que los isómeros 5 $\beta$  (Bennett y col, 1968), y en otras especies vegetales, solamente se recuperan isómeros 5 $\alpha$  (Stohs y El-Olemy, 1972). En el siguiente paso, que es la formación de 5 $\beta$ -pregnano-3-ol-20-ona, otra vez los isómeros 5 $\alpha$ , muestran mayor radioactividad cuando se suministran precursores marcados. Esas observaciones crearon muchas dificultades, ya que los cardenólidos principales en *Digitalis* son derivados 5 $\beta$ .

El suministro de 5 $\beta$ -pregnano-3,20-diona y 5 $\beta$ -pregnano-3-ol-20-ona, fue convertido a digitoxigenina, digoxigenina y gitoxigenina. La introducción del grupo 14 $\beta$ -hidroxilo, precede a la formación del anillo butenólido, y el intermediario más probable es 5 $\beta$ -pregnano-3,14-diol-20-ona. La introducción del 14 $\beta$ -hidroxilo, no comprende un intermediario  $\Delta$ <sup>0(14)</sup>, u otra insaturación  $\Delta$ <sup>14(15)</sup> (Aberhart y col., 1973).

La parte glucosídica, de los cardenólidos comprende azúcares tales como glucosa o del tipo 2-deoxiglucosa. El enlace glucosídico siempre es  $\beta$  con el C-3 de la aglicona (Luckner, 1980). La figura 3 muestra los principales intermediarios, en la biosíntesis de los cardiotónicos.

### 1.5. Metabolismo y acción inotrópica.

El metabolismo de los cardiotónicos, se efectúa principalmente por enzimas en el hígado. Ningún cambio toma lugar en el sitio de acción, que es principalmente el corazón, por lo cual no se ha encontrado ninguna relación, entre el metabolismo y su mecanismo de acción.

Las principales rutas del metabolismo de los cardiotónicos, comprenden las hidroxilaciones en varios centros de la estructura; excepto el anillo lactona el cual no se afecta. La hidroxilación en 12 $\beta$  de la digitoxigenina, provoca que el compuesto liposoluble se convierta en un derivado polar, el cual es excretado más fácilmente. El 3 $\beta$ -oxidrilo, es otro sitio de acción enzimática, el cual da un producto 3 $\beta$ -hidroxilo inactivo, y este mecanismo se considera como una detoxificación. La unión del azúcar al 3 $\beta$ -hidroxilo, actúa como un grupo protector, ya que evita la epimerización y por lo tanto los glucósidos presentan una duración más prolongada (Burger, 1984).

El efecto inotrópico positivo de los cardiotónicos, consiste en aumentar la fuerza de contracción del miocardio. Los efectos resultantes son: un incremento del gasto cardiaco, disminución del tamaño del corazón, disminución de la presión venosa y del volumen sanguíneo, diuresis y alivio del edema (Goodman, 1978).

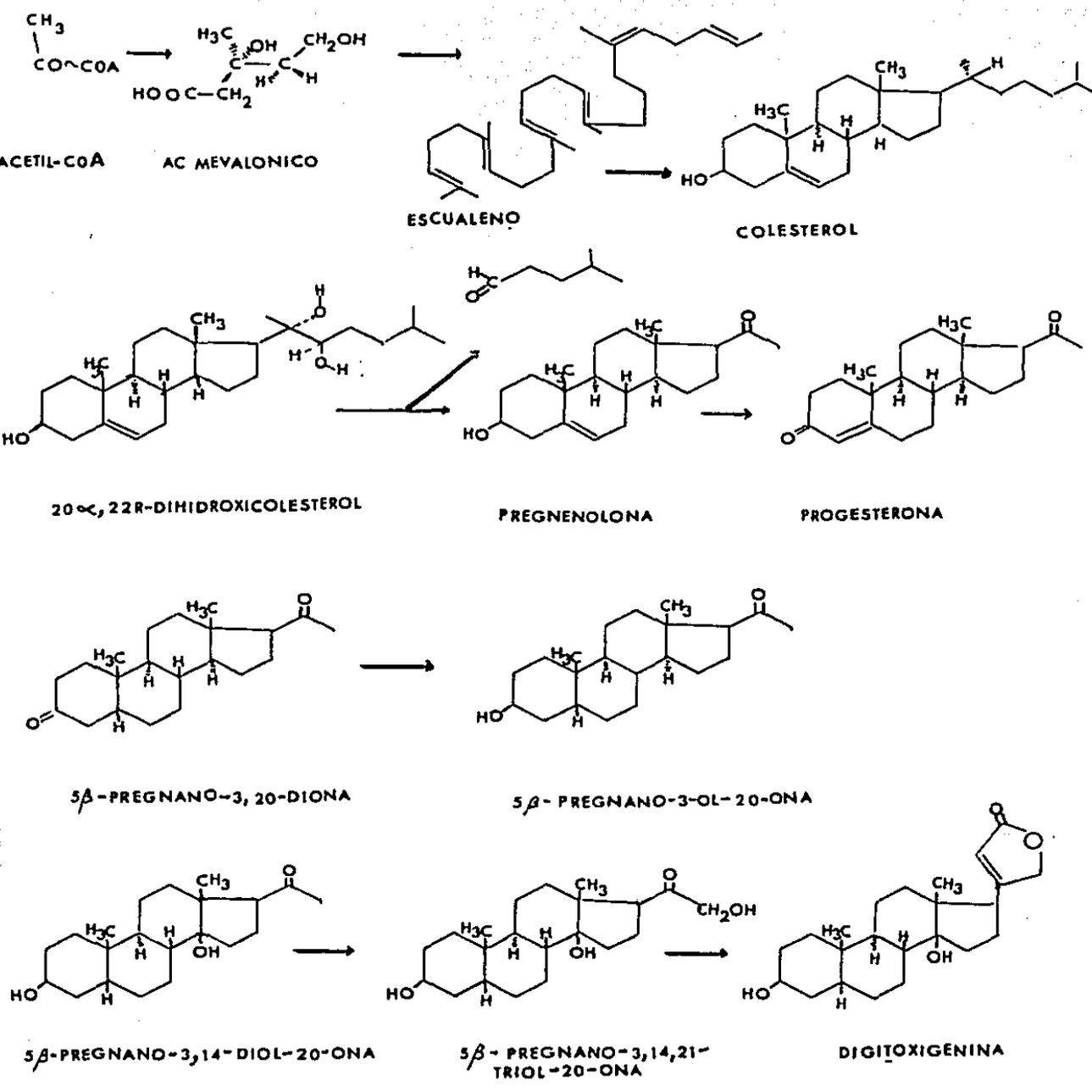


Fig. 3 Intermediarios de la biosíntesis de glucósidos cardiacos. (Luckner, 1984).

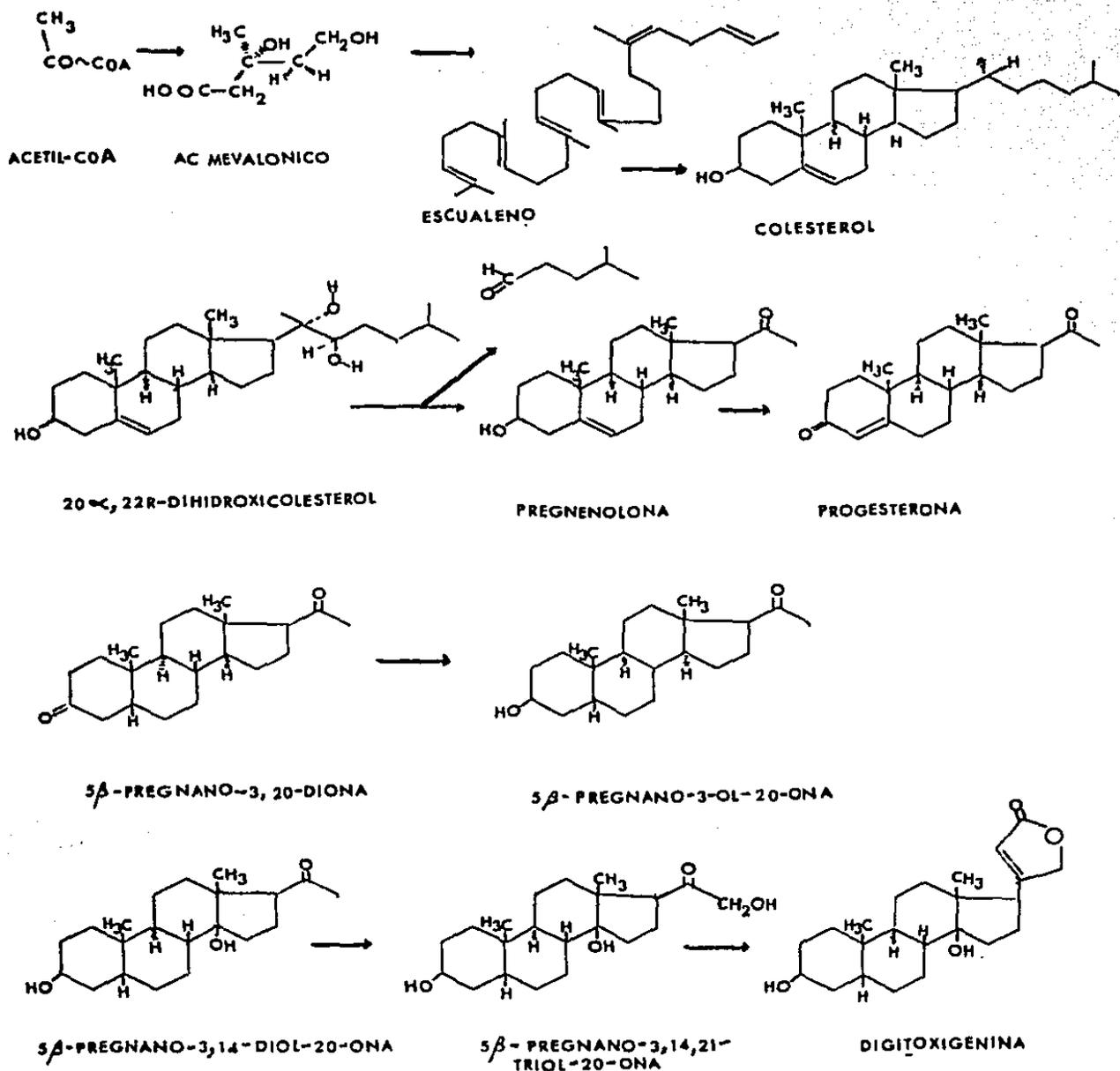


Fig. 3 Intermediarios de la biosíntesis de glucósidos cardiacos. (Luckner, 1984).

masa desorganizada a la que se denomina callo. Dicho tejido calloso, puede ser mantenido por subcultivos (cultivo de tejidos). Las células del callo, pueden mantenerse por subcultivos rutinarios y ser transferidas a un medio líquido similar, y agitarse de tal manera que se distribuyan en forma homogénea en el líquido (cultivo de células en suspensión). Tales células son en teoría totipotentes, esto es, la planta completa puede regenerarse al proporcionársele las condiciones ambientales apropiadas. Concomitantemente, dichas células deben tener el potencial para sintetizar cualquier compuesto asociado con la planta completa. Esta es la característica central que ha orientado al cultivo de células vegetales hacia la comercialización (Allan, 1985).

En la década de los treinta empezaron a aparecer publicaciones sobre la posibilidad de usar el cultivo de células como un sistema para la síntesis de productos naturales, pero fue hasta 1956 que Rutier y Nickell expusieron el proceso detalladamente, en una patente de Pfizer. Después de esto, aparecieron más y más reportes, sobre especies cultivadas y seleccionadas para producir los compuestos deseados. Una revisión de la literatura de 1972 a 1973, reveló que muy pocas líneas celulares, eran capaces de sintetizar los productos de interés comercial característicos de la planta madre. Sin embargo, donde ocurría la síntesis, las concentraciones del producto, eran excesivamente bajas. A finales de la década de los setentas, la situación cambió substancialmente; ya que empezó a incrementarse el número de reportes, donde los cultivos de células en suspensión sintetizaban los productos deseados, a niveles aproximados, o aún mayores que los de la planta intacta.

Esta misma década marcó el desarrollo del crecimiento en gran escala, y el proceso tecnológico para el cultivo de células vegetales. Investigadores japoneses, estudiaron el crecimiento de células de tabaco, en un reactor agitado convencional (CSTR) de 20 litros (Kato, 1975). Un grupo de investigadores alemanes, ensayó el reactor agitado con aire, para aplicarlo en un sistema de crecimiento, en gran escala para este tipo de cultivos. Numerosos laboratorios, empezaron a explorar los sistemas de células vegetales inmovilizadas. Otros grupos regresaron a investigaciones básicas de fisiología y bioquímica celular, así como de la relación que existe, entre el crecimiento y la biosíntesis de productos naturales (Fowler, 1984).

#### 1.6.2. Iniciación del cultivo y formulación del medio.

Un punto clave para la iniciación del cultivo, consiste en empezar con un tejido sano, sin daño y tener una técnica efectiva para eliminar la microflora del tejido.

Un desarrollo importante en la metodología del cultivo de células vegetales en años recientes, ha sido la formulación de medios químicos definidos. Dichos medios contienen los siguientes componentes:

- a) macronutrientes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^-$ )
- b) micronutrientes ( $Al^{2+}$ ,  $B^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ )
- c) fuente de carbono (sacarosa, glucosa)
- d) fuente de nitrógeno ( $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ , glutamato)
- e) reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas)
- f) vitaminas y aminoácidos (tiamina, glicina).

La formulación del medio, afecta no solamente la iniciación del cultivo, sino también la velocidad de crecimiento, la formación de biomasa (en términos de productividad) y la síntesis de productos específicos. La mayoría de los productos derivados de las plantas, son metabolitos secundarios y su síntesis está típicamente disociada del crecimiento. La consecuencia de esto, es que el régimen de cultivo (incluyendo la formulación de nutrientes), que mejore el crecimiento celular, la velocidad de división y la producción de biomasa, no necesariamente incrementará el nivel de síntesis del producto natural.

### 1.6.3. Crecimiento y producción de biomasa.

Rendimientos de biomasa en un rango de 5 a 20 gramos de peso seco/l, han sido reportados por numerosos investigadores. En particular Kato (1977) ha reportado rendimientos de 20 g/l, y Fowler (1984) ha obtenido niveles de biomasa que exceden los 50 g/l, sin embargo, es necesario señalar que en lo que se refiere a este último nivel de biomasa, el mezclado y el suministro de nutrientes son extremadamente ineficientes.

Se han hecho intentos para el crecimiento del cultivo de células en suspensión en una amplia variedad de fuentes de carbono, incluyendo azúcares refinados como glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, manosa y lactosa. Además de otras fuentes de azúcares no refinados como son almidón, suero de leche, melaza y jarabes de azúcar (Fowler, 1982; Sarkissian y Fowler, 1984). Aunque ocurre el crecimiento en las fuentes refinadas poco comunes como son manosa y lactosa, este crecimiento está restringido, comparado con sacarosa o glucosa. Existe una situación similar con las fuentes de carbono no refinadas, en el caso de la lactosa y el almidón, el bajo crecimiento parece ser que se debe a la baja actividad de la  $\beta$ -galactosidasa y la amilasa desramificadora respectivamente, en el medio nutritivo. Esto es muy desafortunado, ya que la capacidad para usar fuentes de carbono de bajo costo, haría una contribución importante en el área. Esto es debido a que un simple cálculo de costos, muestra que la fuente de carbono es probablemente la parte más cara del medio nutritivo.

Además de la fuente de carbono, se ha mostrado que otros factores son importantes, influyendo directamente sobre la producción de biomasa. Estos incluyen el nivel de aireación y la fuente de nitrógeno. Kato, Shimizu y Nagai (1975) con cultivos de células de tabaco, muestran que hay una relación directa entre el coeficiente de transferencia de gas ( $K_La$ ) y el rendimiento de biomasa. Para valores de  $K_La$  de 5-10/h, la relación entre el incremento del coeficiente de transferencia y el rendimiento de biomasa es lineal. Mientras que Smart (1984), con un cultivo de células en suspensión de *Catharanthus roseus*, encontró que hay una relación lineal entre la biomasa y el coeficiente de transferencia hasta un valor de 2/h. Valores más altos, traen como consecuencia una disminución en el rendimiento de biomasa. Los trabajos de otros investigadores, muestran que además del oxígeno, el nivel de bióxido de carbono es también un factor muy importante.

La fuente de nitrógeno, afecta marcadamente el rendimiento de biomasa (Dougall, 1980). Noguchi y col. (1977), reportaron que la naturaleza y el nivel de la fuente de nitrógeno, también afecta la velocidad de crecimiento, la cual es considerada en la productividad de la biomasa (peso seco/l/unidad de tiempo).

#### 1.6.4. Rendimiento del producto, su desarrollo y mejoramiento.

De todas las facetas para el desarrollo de un proceso biotecnológico, ésta es la más importante, ya que el nivel del producto es crucial y debe presentar ventajas en términos de concentración y productividad, comparado con los procesos tradicionales.

Como mencionamos anteriormente, en la década de los setentas aparecieron pocos reportes sobre cultivos que sintetizaban los productos naturales deseados, y donde ocurría la síntesis los niveles eran muy bajos. Además se había hecho casi un dogma, que la síntesis de metabolitos secundarios era improbable, al menos que el tejido presentara un estado de diferenciación avanzado o formación de órganos en el cultivo. La regeneración de la planta, a partir de los cultivos, producía el mismo espectro de productos que la planta madre. Esto sirvió para demostrar que la habilidad para sintetizar los productos, no se perdía durante el cultivo y por algunas razones desconocidas, no se expresaba.

Aunque recientemente, se ha incrementado el número de reportes, sobre cultivos de células en suspensión que sintetizan los productos deseados, hasta ahora no ha sido posible definir, las condiciones precisas para el desarrollo de tales sistemas. Sólo han podido establecerse tres condiciones distintas, todas basadas en asociaciones morfológicas, las cuales pueden dar como resultado la síntesis de productos naturales. Dichas condiciones se presentan a continuación:

- donde el desarrollo del tejido u órgano es, hasta el momento, un requerimiento absoluto.

- donde el cultivo se caracteriza, por algún grado de diferenciación celular.
- donde no se presentan señales aparentes de desarrollo o diferenciación, y el cultivo tiene la apariencia de un grupo de células meristemáticas.

La estrategia que ha sido muy adoptada, para desarrollar cultivos celulares de altos rendimientos, tiende a seguir la práctica microbiana tradicional, mostrada en la figura 4.

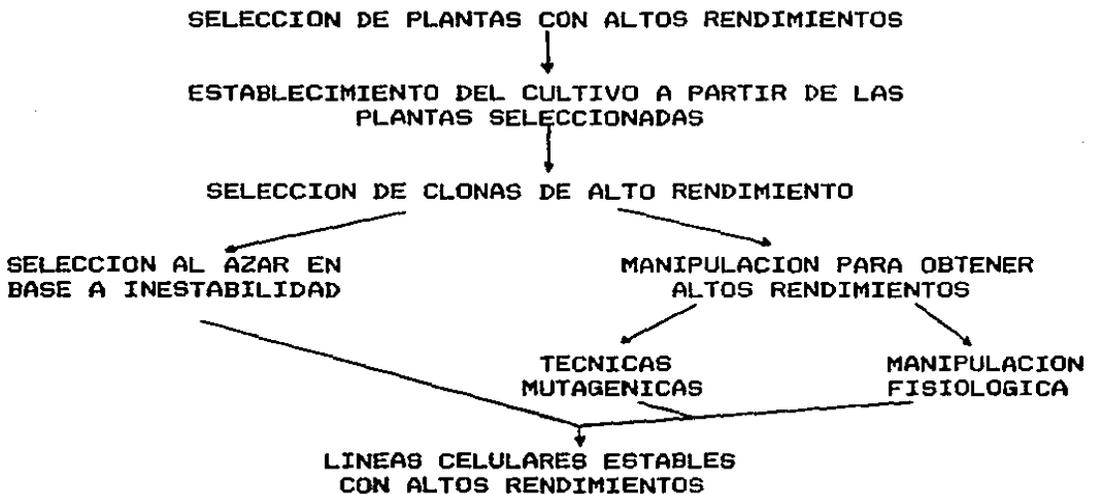


Fig. 4. Estrategia de selección para líneas celulares con altos rendimientos (Fowler, 1984).

La selección de un material apropiado, para la iniciación del cultivo ha sido un tema de mucha controversia. Hasta hace pocos años, había dos puntos de vista totalmente opuestos. El primero mantenía, que es necesario usar plantas con rendimientos altos del producto para la iniciación del cultivo (Zenk, 1977). El segundo sostenía, que esto no es necesario y que a través de la selección y clonación, podría ser posible obtener líneas celulares con altos rendimientos, partiendo de plantas con un bajo contenido del pro-

ducto (Doller, 1978). Experimentos más cuidadosos por el grupo de Dougall (1980), han mostrado que el primer punto de vista es el más acertado. Es decir, se obtendrán cultivos con altos rendimientos, partiendo de material vegetal que presente un alto contenido del producto.

Una vez que se ha iniciado el cultivo, la metodología clásica, consiste en seleccionar la población de individuos con altos rendimientos del producto, clonar y desarrollar la población. Sin embargo, para el desarrollo de esta metodología se presentan las siguientes restricciones: primera, la velocidad de crecimiento lenta de las células hace que se dificulte el desarrollo de grandes poblaciones celulares; segunda, la clonación celular, se ha establecido recientemente para las células vegetales, y es difícil; y tercera, las concentraciones de los productos deseados en células simples, son tan bajas que no se pueden detectar por las técnicas analíticas clásicas.

Aunque es muy dudoso si el problema de la velocidad lenta de crecimiento podrá ser superado, las técnicas para producir clonas se han mejorado, y, quizá el avance más importante, ha sido la implementación de técnicas de detección, como el radioinmunoanálisis (Zenk y col., 1977), que ha permitido analizar una gran variedad de cultivos y productos con mucho éxito.

Algunos constituyentes del medio, han mostrado afectar el rendimiento del producto, de los cuales la fuente de carbono, nitrógeno, el nivel de fosfatos y el contenido de fitohormonas han sido los más estudiados. Mantell y Smith (1983b), han revisado el tema completamente y las características sobresalientes se discuten a continuación.

- Fuente de carbono.

Se ha mostrado que la naturaleza y la cantidad de la fuente de carbono afectan el rendimiento del producto. En particular, el incremento en los niveles de sacarosa tiende a mejorar el nivel de la síntesis del producto. La glucosa, aunque tiene el mismo efecto sobre la productividad de biomasa a concentraciones equimoleculares respecto a la sacarosa, no sólo no afecta la síntesis del producto, sino que puede inhibirlo (Mantell y Smith, 1983a). Zenk y col. (1975), observaron que se mejoraba el nivel del alcaloide isoquinolina en cultivos de *C. roseus*, incrementando la concentración de sacarosa. También se encontró que un aumento en los niveles de sacarosa, tenía un efecto positivo, sobre la síntesis de nicotina (Mantell y Smith, 1983b); diosgenina (Tal y Golberg, 1983) y la producción de polifenoles (Davies, 1972). Sin embargo, también hay excepciones; en el cultivo de *Solanum ariculare* un incremento en sacarosa no mejora la producción de esteroides. No se entiende todavía, cual es la naturaleza precisa, del efecto de la concentración de sacarosa sobre la síntesis del producto.

### - Macronutrientes.

En general, una disminución en los macronutrientes claves, tales como fosfato, nitrato y amonio, tiende a mejorar el rendimiento del producto. Esto está generalmente acompañado, por una disminución en la velocidad de crecimiento.

Knobloch y Berlin (1981, 1983), al trabajar con cultivos de *C. roseus* y *Nicotiana tabacum*, mostraron que bajos niveles de fosfatos en el medio de inducción, disparaban la producción de metabolitos secundarios, permitiendo un incremento substancial en triptamina, alcaloides indólicos, nicotina y fenoles. Específicamente, ellos observaron un efecto marcado, a bajos niveles de fosfato sobre las enzimas claves de la síntesis de los metabolitos secundarios. Mantell y Smith (1983b) han sugerido que el efecto general de los bajos niveles de fosfato, sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios, puede ser el resultado de una disminución de las pozas de fosfato internas. Este efecto a su vez, baja la carga energética celular y desreprime la síntesis enzimática de los metabolitos secundarios. Aunque hay muchas observaciones que muestran el efecto anterior, hay otras que indican el efecto contrario. Por ejemplo, Hagimori, Matsumoto y Obi (1982), observaron aumentos en el crecimiento y contenido de digitoxina, cuando incrementaron tres veces la concentración de fosfato.

Aunque en general, la disminución en los niveles de nitrógeno mejora la síntesis de metabolitos secundarios, no hay un patrón consistente, que emerja entre las diferentes fuentes de nitrógeno a varias concentraciones. Una gran variedad de fuentes de nitrógeno, se han usado para el medio de cultivo de células vegetales, desde fuentes inorgánicas como nitrato y amonio, hasta una amplia variedad de aminoácidos y mezclas complejas de éstos.

### - Reguladores de crecimiento (fitohormonas).

Se sabe que los reguladores de crecimiento, tienen un efecto profundo sobre el metabolismo primario y secundario de las plantas. La gran mayoría de los cultivos celulares, muestran por ellos un requerimiento absoluto. De todos los reguladores de crecimiento la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D], tiene el efecto general de suprimir la síntesis de productos naturales, y se conocen muchos ejemplos de ésta acción.

Zenk, El-Shagi y Schulte (1975), trabajando con cultivos de *Morinda citrifolia*, encontraron que el 2,4-D, suprime totalmente la producción de antraquinona. En contraste al efecto del 2,4-D, está el efecto positivo sobre la síntesis de metabolitos secundarios, muchas veces observado con otras auxinas, tales como el ácido indol-3-acético [AIA] o el ácido naftalén acético [ANA] (Kamimura y Nishikawa, 1976).

Las citocininas (grupo de reguladores diferente de las auxinas), manifiestan un efecto diferencial, dependiendo del metabolismo y origen de la línea celular. Constabel, Shyluk y Gabor (1971) reportaron que un nivel ligeramente elevado de cinetina, tiene un efecto estimulante, sobre la producción de antocianina en cultivos de *Scopolia maxima*. En contraste, Shio y Otha (1973), encontraron que niveles elevados de cinetina, suprimen totalmente la síntesis de alcaloides en cultivos de *N. tabacum*.

También se ha argumentado que la asociación célula-célula y la producción de características morfológicas diferentes, pueden jugar (junto con la actividad de los reguladores de crecimiento) una parte clave en el desarrollo de sistemas que sintetizan metabolitos secundarios (Lindsey y Yoeman, 1983). Los datos definitivos, que indiquen un efecto claro sobre la síntesis de productos naturales son escasos. Existen varios problemas en esta área, primero, el nivel efectivo del regulador de crecimiento en las células vegetales, está por abajo de los límites de detección. Segundo, existen pocos datos disponibles, los cuales indiquen el destino del regulador, una vez que se ha aplicado a los cultivos y finalmente, está la ausencia de un modelo bioquímico de acción de los reguladores de crecimiento. Esto nos indica, que hay una necesidad urgente de tener una mejor comprensión de la bioquímica de la acción de los reguladores.

A pesar de la escasez, de la información básica de los factores que afectan el rendimiento del producto, la adopción en los últimos años de las técnicas microbianas empíricas, han permitido mejorar los rendimientos del producto.

#### 1.6.5. Estructura y fisiología celular.

El gran tamaño y la lenta velocidad de crecimiento de las células vegetales, las coloca en un rango diferente de consideración cuando se comparan con las células microbianas. Respecto al gran tamaño de las células vegetales, numerosos autores han señalado, que dichas células tienen un volumen alrededor de 200000 veces más grande que una célula de *E. coli* (Petiard, 1979). Las diferencias entre las células vegetales y microbianas se muestran en la tabla 1.

Una faceta importante en los cultivos de células vegetales, es el nivel de agrupamientos celulares, que se observan en casi todos los cultivos. Las células individuales se presentan muy raramente. En su lugar, es típico encontrar grupos que contienen de 2 a 100 células. El grado de heterogeneidad causado por estas agrupaciones celulares, hace que sea extremadamente difícil, si no es que imposible, el uso de técnicas turbidométricas para establecer el crecimiento del cultivo.

La pared exterior de celulosa de las células vegetales, las hace susceptibles a los esfuerzos de corte. En consecuencia, hay una tendencia general, a usar los bioreactores con características de bajos esfuerzos de corte (Wagner y Vogelman, 1977; Martin, 1980; Scragg y Fowler, 1984).

Las células vegetales tienen una actividad metabólica más baja que las células microbianas, y por lo tanto una baja demanda de oxígeno.

TABLA 1. COMPARACION DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS MICROBIANAS Y VEGETALES.

Características	Cel. microbiana	Cel. vegetal
Tamaño	2 $\mu\text{m}$	> 10 $\mu\text{m}$
Cel. individuales	muchas	normalmente agrupadas
Crec. de cel. individuales en colonias	si	no muchas
Tiempo de doblado	> 1 hora	días
Densidad del inóculo	pequeño	10-35 % del cultivo total
No. cromosomal	haploide/diploide	mezcla de haploide, diploide, poliploide y anaploide.
Sensibilidad al esfuerzo de corte	insensible	sensible
Variabilidad en el cultivo	más o menos estable	puede variar mucho
Desarrollo	esporas, pseudo micelio	organogenesis embriogenesis
Aireación	alta, 1-2 v/v/m	baja, 0.2-0.3 v/v/m
Formación del producto	muchas veces soluble en el medio.	vacuola

### 1.7. Producción de cardiotónicos a partir del cultivo de tejidos y células vegetales.

El primer estudio sobre esta área de investigación, se remonta a 1962 con Staba y col., quienes reportaron las condiciones óptimas para la inducción de tejido calloso de *Digitalis sp.* Un año después, Staba y Lamba, describen el establecimiento del cultivo en suspensión de *D. purpurea* y *D. lanata*.

Posteriormente los trabajos publicados sobre este tema, mencionan que los cultivos de células indiferenciadas, no producen cardiotónicos, o producen solamente trazas de ellos.

En 1977 Hirotsani, demuestra por vez primera que la producción de cardenólidos se restablece, cuando el tejido calloso se rediferencia a brotes. Este hecho fue confirmado más adelante por Lui y Staba (1979), en sus investigaciones sobre el establecimiento de tres líneas celulares. Ellos reportan, que el cultivo de células desorganizadas de *D. lanata*, produce 0.06 mg de digoxina % peso seco, mientras que el cultivo de raíces, presenta 1.9 mg de digoxina % peso seco, y finalmente el cultivo de hojas, muestra una producción de digoxina de 9 mg % peso seco.

Con el objeto de hacer una investigación más profunda, sobre los mecanismos de producción de cardenólidos, por cultivo de células en suspensión de *Digitalis*; Furuya y Kamaguchi (1973), reportaron que la progesterona era transformada a  $5\alpha$ -pregnano-3,20-diona,  $5\alpha$ -pregnano-3-ol-20-ona y sus glucósidos correspondientes. Como el primer paso en la biosíntesis de cardenólidos, en las plantas de *Digitalis*, es la reducción de la progesterona a  $5\beta$ -pregnano-3,20-diona, sus resultados sugerían, que la reducción

esteroespecífica  $\Delta$ , para dar la fusión del anillo A/B Cis, está bajo un control enzimático estricto. Posteriormente examinaron el metabolismo del  $5\beta$ -pregnano-3,20-diona (I) y del  $5\beta$ -pregnano-3-ol-20-ona (II), intermediarios claves en la ruta biosintética de los cardenólidos (Hirotsani y Furuya, 1975). Para este estudio, usaron dos cepas de tejido calloso de *D. purpurea*, una normal que requería auxinas y citocininas, y otra habituada que no necesitaba para su crecimiento de ningún regulador. En los cultivos de sus dos cepas, demuestran que la transformación de los metabolitos I y II, no procede hasta el final de la ruta biosintética. Ellos observan, que la transformación se detiene unos pasos adelante, con la correspondiente formación de sus glucósidos. Por lo cual concluyeron, que los pasos principales de la biosíntesis de cardenólidos que ocurren en la planta intacta de *Digitalis*, están inhibidos en los cultivos indiferenciados, tanto en la cepa normal como en la habituada y además que la biosíntesis de estos compuestos, no parece estar regulada por fitohormonas exógenas.

Yoshikawa y Furuya (1979), realizaron un estudio enzimático, sobre la purificación y propiedades de la esteroil:UDPG glucosil

transferasa. Este estudio lo efectuaron, en un cultivo de células de *D. purpurea* y en la planta intacta, encontrando que ambas enzimas tienen propiedades muy similares, por lo tanto concluyen que no es la glucosil transferasa, la que está inhibiendo muchos de los pasos de la ruta biosintética en los cultivos celulares; sino que más bien parece que esta inhibición, puede deberse a una compartimentación incompleta en dichos cultivos.

Los estudios más recientes, han sido efectuados por un grupo de investigadores japoneses, encabezados por Hagimori. En su primer reporte, demuestran una vez más, que el estado de rediferenciación a brotes, es el más adecuado para la síntesis de cardenólidos (Hagimori y col., 1980). En 1982, Hagimori, Matsumoto y Obi, reportaron el establecimiento de cuatro líneas celulares. Estas líneas celulares, fueron los cultivos rediferenciados a brotes verdes y blancos, y los cultivos indiferenciados verdes y blancos.

Su estudio muestra, que los cultivos verdes, ya sean rediferenciados a brotes o desdiferenciados, tienen el mismo contenido de clorofila y actividad de la ribulosa difosfato carboxilasa. Sin embargo, observaron que la cantidad de digitoxina en los primeros, era de 40  $\mu\text{g/g}$  peso seco, mientras que en los cultivos verdes desdiferenciados, era de 0.18  $\mu\text{g/g}$  peso seco, siendo este contenido aproximadamente igual al de un cultivo blanco desdiferenciado. En base a estos resultados, los autores sugieren que los cloroplastos no son esenciales, para la síntesis de la digitoxina. También reportan que el grado de diferenciación a brotes, es paralelo al grado de formación del cardenólido. En estudios posteriores, Hagimori y col. (1982), optimizaron el medio de cultivo, para la producción de cardiotónicos y en 1984 Hagimori, Matsumoto y Misaki, probaron el cultivo verde rediferenciado a brotes, en un fermentador tradicional agitado mecánicamente (CSTR) de 2.5 l, ésto lo hicieron para determinar, la factibilidad de escalar el proceso. En esta investigación, señalan los problemas que presenta este tipo de sistema, en lo que se refiere, a la heterogeneidad del cultivo y a las condiciones de iluminación.

#### 1.8. Biotransformación de glucósidos cardiacos mediante el cultivo de células vegetales.

La biotransformación es una técnica, la cual utiliza las enzimas localizadas en las células vegetales, para alterar los grupos químicos funcionales de los compuestos suministrados externamente. Dicha biotransformación, se usa en muchos casos para incrementar la actividad biológica de un compuesto, y comprende la acción de una o varias enzimas acopladas en una secuencia que permite ejecutar, una serie de reacciones químicas especializadas.

Las reacciones de biotransformación usualmente son estereoespecíficas, y comprenden procesos tales como oxidaciones, reduccio-

nes, hidroxilaciones, metilaciones, glucosilaciones, desmetilaciones, esterificaciones, epoxidaciones, isomerizaciones y saponificaciones (Morris, 1984)

#### 1.8.1. Transformación de agliconas.

La biotransformación de la digitoxigenina (figura 5), ha sido reportada por varios investigadores, usando cultivos celulares obtenidos de plantas que contienen cardenólidos (Furuya, 1978; Stohs y Staba, 1964; Alfermann, 1977), así como de plantas que no los contienen (Jones y Veliky, 1978). La hidroxilación de la digitoxigenina en C-12, por cultivos de células de *D. lanata* fue reportada por Alfermann y col. (1977); quienes además observaron que al adicionar digitoxosa, ocurre la formación del digitóxido. Si no se adiciona digitoxosa, ocurre una glucosilación (Doller, 1977; Furuya 1978), así como la oxidación a digitoxigenona (Stohs y Rosenberg, 1975).

La formación de digitoxigeninglucósido y digitoxigenona, ha sido reportada también por Doller (1977), con cultivos celulares de *Thevetia* y por Furuya (1978), usando cultivos de *D. purpurea*. En el último caso, se ha demostrado la formación adicional de epidigitoxigenina, epidigitoxigenin- $\beta$ -D-glucósido, 5 $\beta$ -hidroxi y 7 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina. Jones y col. (1978), han reportado biotransformaciones muy rápidas de la digitoxigenina por cultivos celulares de *Cannabis sativa*, *Ipomoea sp.* y *Daucus carota*. El producto fue identificado, como 5 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (periplogenina).

Así, observamos que los patrones de biotransformación de la digitoxigenina, con cultivos de células vegetales son muy similares a los obtenidos con los microorganismos (Gorlich, 1973; Charney, 1967; Izuka, 1969), excepto la formación de glucósidos.

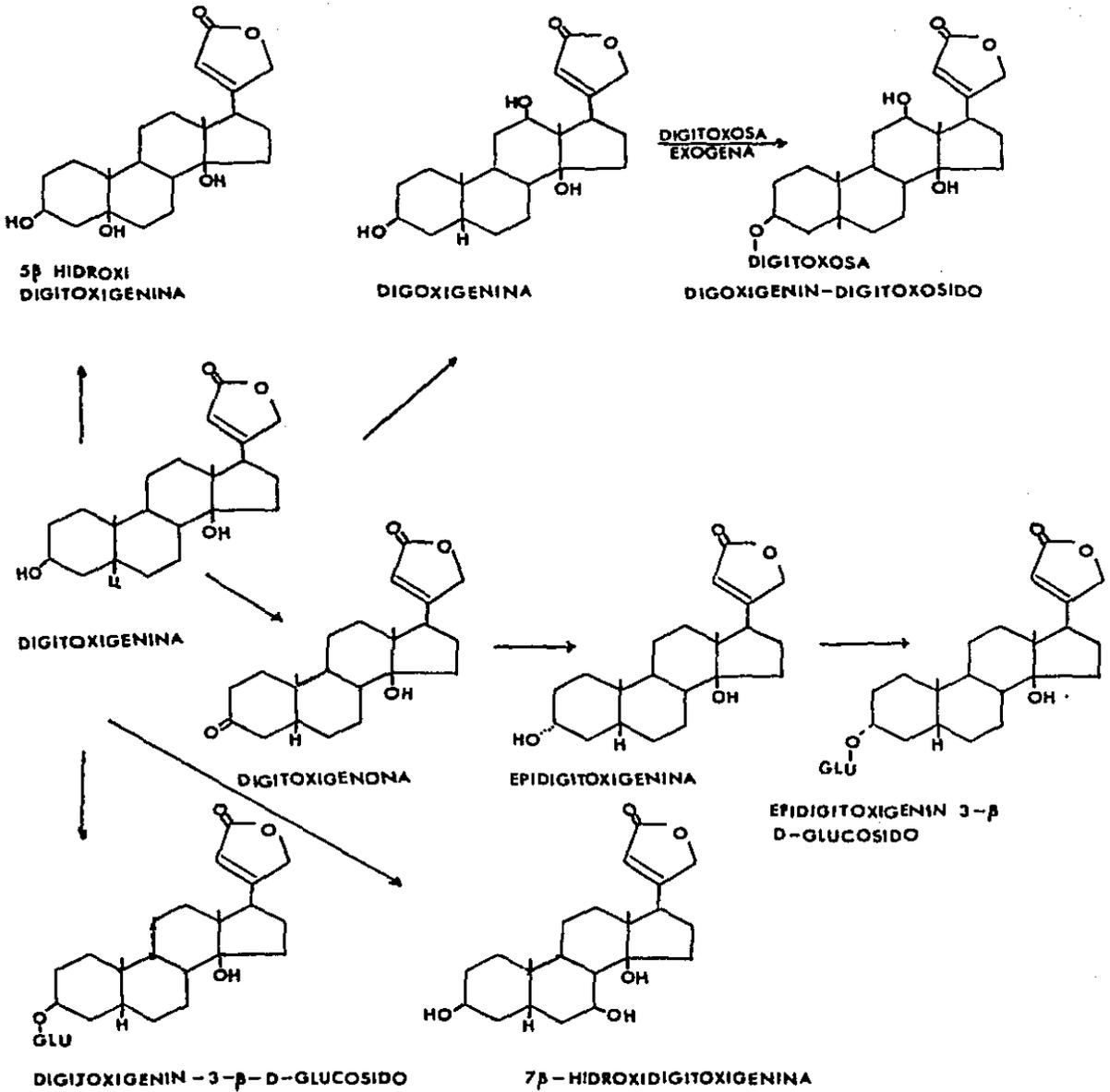


Fig. 5 Transformación de digitoxigenina por cultivos celulares de *Digitalis*. (Reinhard, 1980)

### 1.8.2. Transformación de triglucósidos.

La transformación de los triglucósidos cardiacos, por cultivos celulares de *Digitalis* y *Thevetia*, ha sido investigada intensamente por Furuya (1970, 1972) y el grupo de Reinhard (1974, 1975 y 1980).

La figura 6, resume los diferentes patrones de biotransformación encontrados, usando como sustratos digitoxina, digoxina y gitoxina. En todos los casos investigados, estos "glucósidos secundarios" son glucosilados. *D. mertonensis* y *D. purpurea*, son capaces de hidroxilar la digitoxina y el purpúrea glucósido A (PA) en C-16, produciendo gitoxina y purpúrea glucósido B (PB) respectivamente. En el caso de *D. purpurea*, además se observó la transformación de digitoxina a gitoxina, PA y PB (Furuya, 1970).

Los cultivos celulares iniciados de plantas que contienen lanatósidos, como son *D. cartensis ssp. trojana*, *D. grandiflora*, *D. lanata*, *D. lutea ssp. lutea* y *D. parviflora*, acetilan PA, PB y el deacetil lanatósido C (DC) a los correspondientes lanatósidos. Mientras que los cultivos celulares, que provienen de plantas, que contienen los llamados glucósidos C, hidroxilan los glucósidos A en C-12, y por lo tanto DC y el lanatósido C (LC), pueden encontrarse junto con la digoxina. Esta última, se puede obtener por una hidroxilación directa de la digitoxina, o por deacetilación y desglucosilación de LC y DC. Las cantidades de estos productos, difieren significativamente de cepa a cepa. Los cultivos celulares de *D. lutea*, también hidroxilan el lanatósido A en C-16, produciendo el lanatósido B. Esta reacción no se presenta en los cultivos de células de *D. lanata* y *D. leucophaea*, debido quizá a que estas cepas, se han aislado de plantas que contienen cantidades bajas de glucósidos B. Sin embargo, la gitoxina es glucosilada y acetilada por cultivos celulares de *D. lanata*, a purpúrea glucósido B y lanatósido B.

Por otro lado, los cultivos celulares de *D. mertonensis* son capaces de glucosilar digoxina a DC, esta reacción no ocurre en la planta, debido a que ella es incapaz de producir el precursor de digoxina.

La  $\alpha$ -acetildigitoxina (figura 7), es glucosilada por cultivos de *D. lanata* a lanatósido A, el cual a su vez es hidroxilado a lanatósido C. El sustrato es simultáneamente deacetilado a digitoxina, esta última es entonces glucosilada a purpúrea glucósido A, el cual puede ser hidroxilado a DC. Estas últimas reacciones han sido reportadas por Reinhard y col. (1974, 1975).

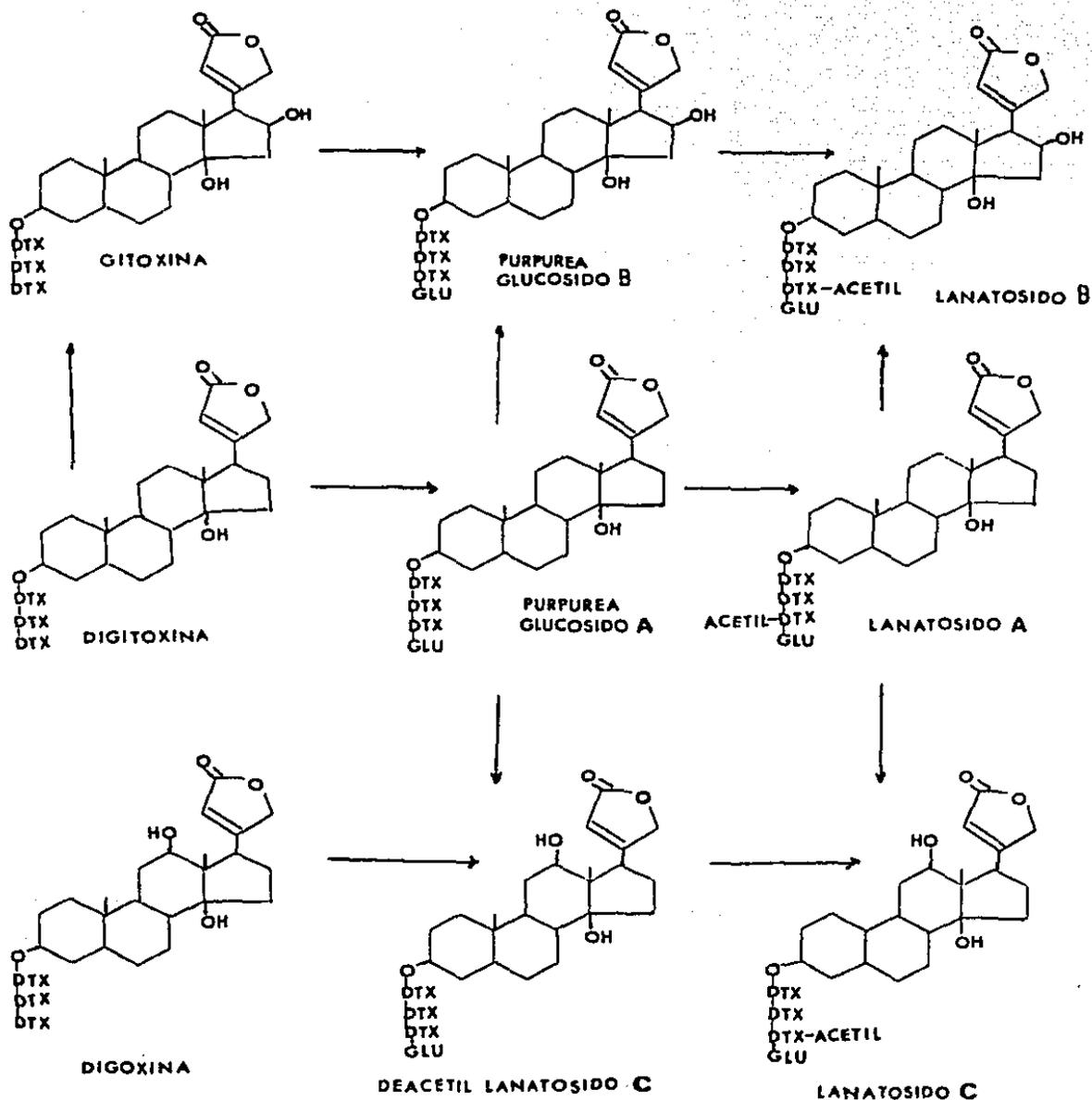


Fig. 6 Transformación de digitoxina, digoxina y gitoxina por cultivos de células de *Digitalis* ssp. (Reinhard, 1980).

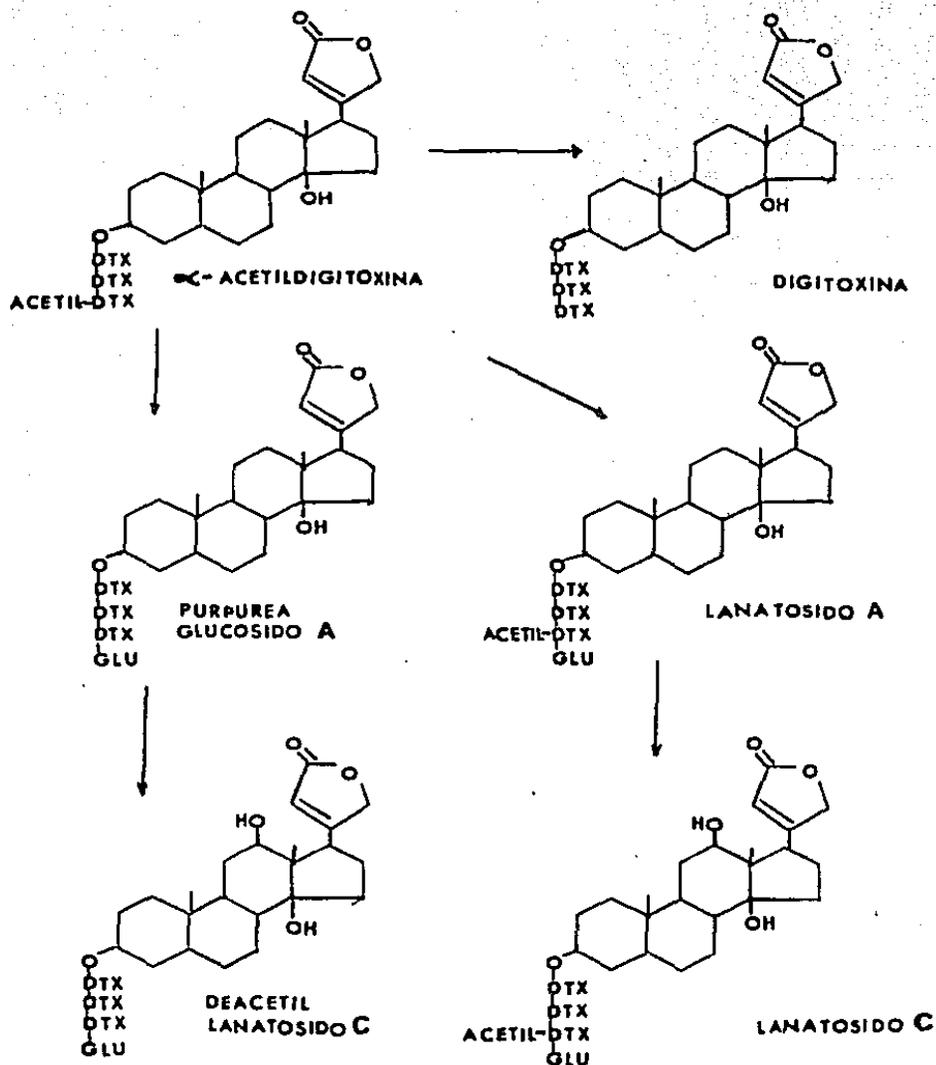


Fig. 7 Transformación de  $\alpha$ -acetildigitoxina por cultivos celulares de *Digitalis lanata*. (Reinhard, 1980).

### 1.8.3. Transformación de tetraglucósidos.

El lanatósido A (figura 8) es metabolizado rápidamente por cultivos celulares de *D. lanata*, los patrones de biotransformación encontrados, dependen de las cepas y de las condiciones del cultivo. Bajo condiciones de luz, la cepa 72L produce LC, PA y DC; mientras la cepa 72D (condiciones de obscuridad) solamente forma LC, sin observarse los productos deacetilados (Reinhard, 1974, 1975).

Alfermann y col. (1972), encontraron que después de aplicar LA (figura 9), los cultivos celulares de *D. lutea*, producen  $\alpha$ -acetildigitoxina y  $\alpha$ -acetildigoxina, además de lanatósido C.

### 1.8.4. Selección de cepas de *Digitalis* en base a su capacidad de hidroxilación.

La hidroxilación en C-12 de los glucósidos A, es la reacción más importante desde un punto de vista medicinal. El uso de esta reacción a escala biotecnológica, debe llenar el prerequisite de que el sustrato administrado sea transformado rápida y totalmente a un sólo producto. La digitoxina se presenta como un sustrato ideal, debido a que se obtiene durante el aislamiento de la digoxina. Anteriormente, se mostró que la digitoxina es transformada a diferentes productos, y que la hidroxilación en C-12 es incompleta. Por lo que Alfermann (1977) y Heins (1978), investigaron la biotransformación de diferentes derivados de digitoxina; sus primeros experimentos mostraron que la  $\beta$ -metildigitoxina, era transformada cuantitativamente a  $\beta$ -metildigoxina. Esta última es usada como medicamento, y hasta ahora es obtenida por la metilación química de la digoxina.

Usando cultivos en suspensión, estos autores hicieron una selección de cepas, con el propósito de encontrar líneas celulares con mejor capacidad de hidroxilación. Estos cultivos se iniciaron con plantas de alto contenido de glucósidos C, estableciendo tres tipos de cepas.

a) cepas que efectúan reacciones de desmetilación y glucosilación (figura 10).

Este primer grupo de cepas (128, 293BHL, 447, 445, 130, 228, 508 y 216), carecen de la capacidad de hidroxilar la  $\beta$ -metildigitoxina en C-12, solamente la desmetilan y glucosilan produciendo el purpúrea glucósido A. La cepa 447, también produce lanatósido A en muy pequeñas cantidades. En los experimentos con la cepa 216, solamente pudieron detectarse trazas de PA y casi todo el sustrato añadido permaneció inalterado (Heins, 1978).

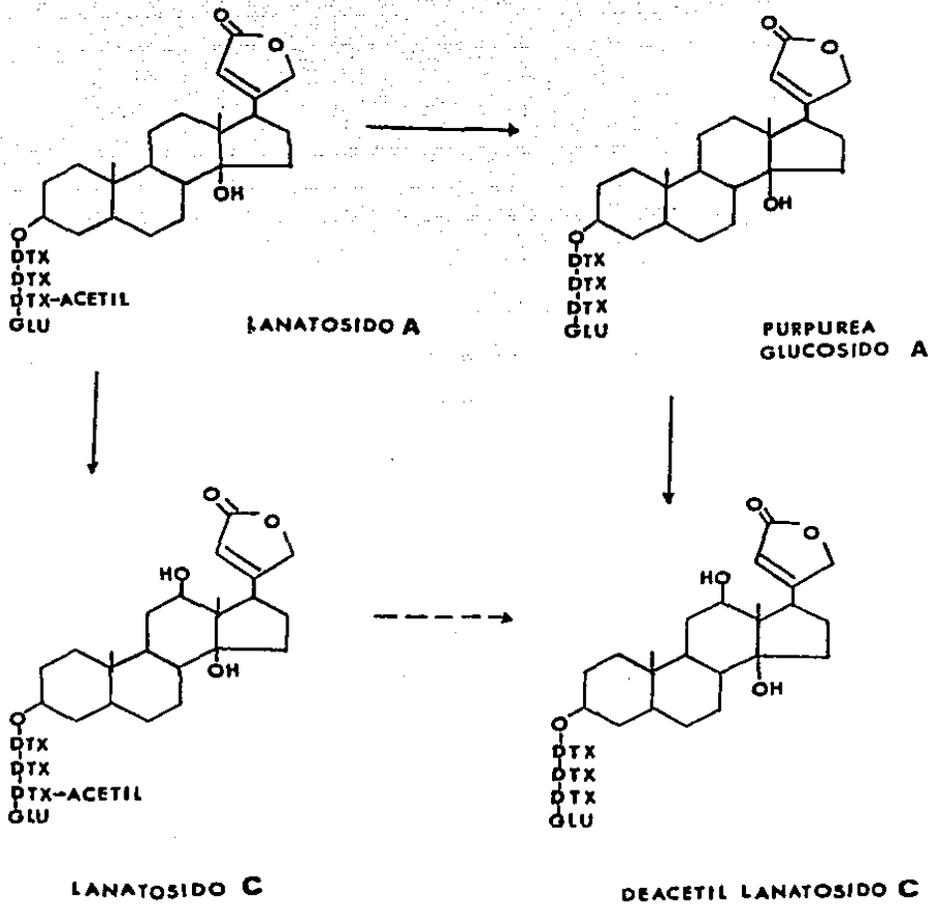


Fig. 8 Transformación del lanatosido A por cultivos celulares de *Digitalis lanata*. (Reinhard, 1980).

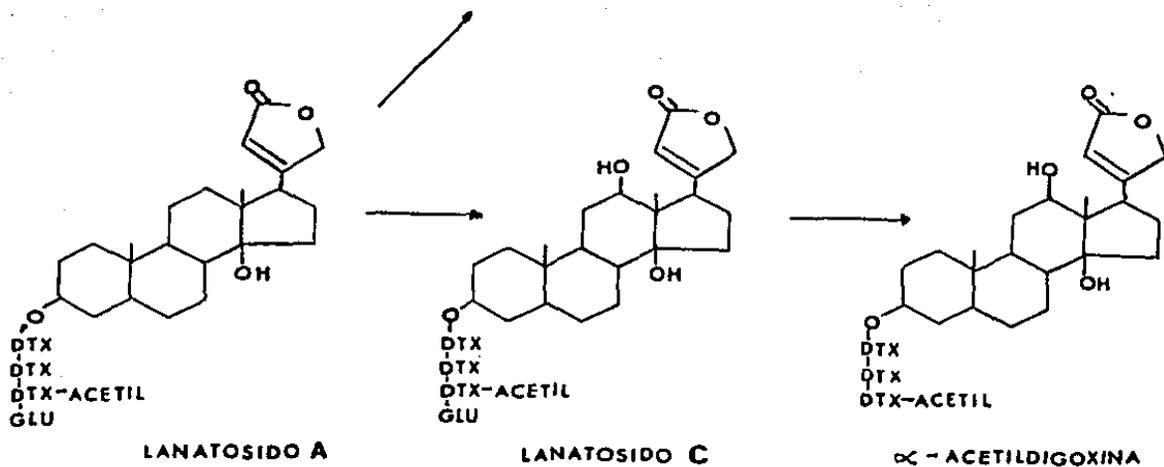
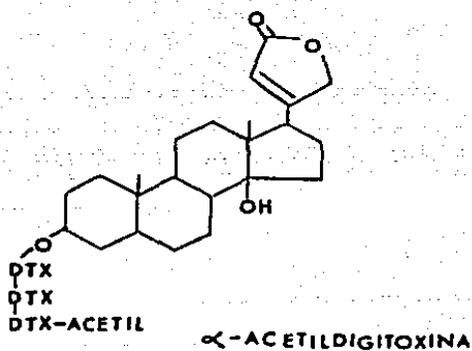


Fig. 7 Transformación del lanatosido A por cultivos celulares de *Digitalis lutea*. (Reinhard, 1980).

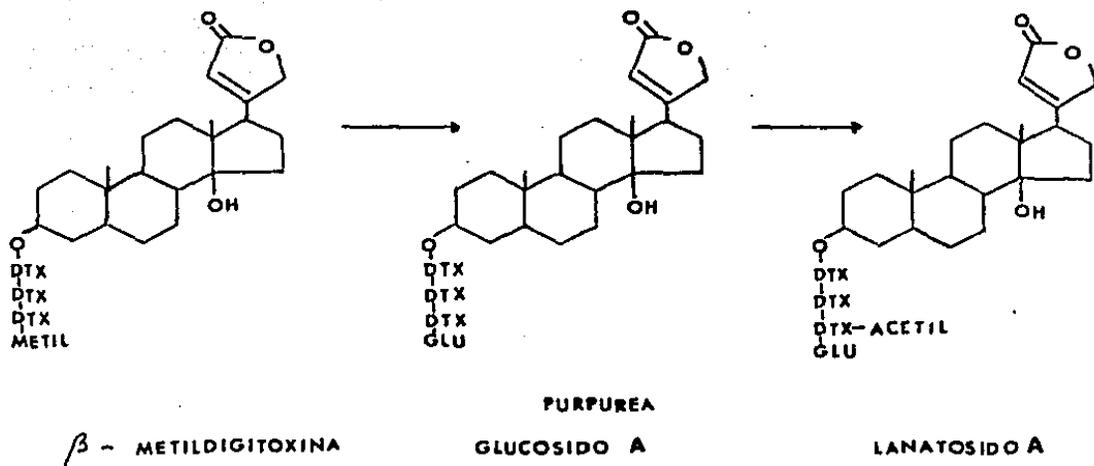


Fig. 10 Biotransformación de  $\beta$ -metildigitoxina por las cepas 12B, 293, BHL, 447, 445, 130, 50B y 216 de *D. lanata*. (Reinhard, 1980).

b) Cepas que realizan la hidroxilación en C-12, conectada simultáneamente con desmetilaciones, glucosilaciones y acetilaciones (figura 11).

Las cepas 9-14, 10-2, 347, B2, 72L, 293, 23-17, 364, E1, E2 y 22-6 de *D. lanata* representan un segundo grupo, cuya característica reside en la capacidad de hidroxilar el sustrato en C-12. Sin embargo, simultáneamente estas cepas desmetilan la  $\beta$ -metildigitoxina y la glucosilan a purpúrea glucósido A. Por otro lado, el producto principal de la reacción puede ser PA (con la cepa E2) o  $\beta$ -metildigoxina (con la cepa 9-14). También pueden formarse pequeñas cantidades de LC o DC (Heins, 1978).

c) cepas que efectúan la hidroxilación selectiva en C-12 (figura 12).

Un tercer grupo de cepas, 291, 287, 285 y 72D de *D. lanata* hidroxilan el sustrato casi cuantitativamente a  $\beta$ -metildigoxina.

Tales cepas fueron seleccionadas, para la implementación de un proceso técnico de biotransformación de glucósidos A a C (Alfermann y col., 1977; Heins, 1978).

#### 1.8.5. Biotransformación de $\beta$ -metildigitoxina en bioreactores.

El propósito de usar las reacciones de biotransformación, efectuadas por cultivos de células vegetales en una escala mayor, condujo a varios investigadores a reproducir en bioreactores, los resultados obtenidos con matraces agitados.

En la mayoría de los casos reportados, fueron usados bioreactores agitados mecánicamente (Kato, 1975; Yasuda, 1972; Naguchi, 1977), así como también columnas burbujeadas (Kato y Shimizu, 1975) y reactores "airlift" (Wagner, 1977; Vogelmann, 1978).

Wahl (1977), reportó que los cultivos celulares de *Digitalis*, son sensibles a la agitación y no pueden por lo tanto efectuar las reacciones de biotransformación en reactores con agitación mecánica. El reactor "airlift", que se caracteriza por dar bajos esfuerzos de corte, fue usado por Wagner y Vogelmann, quienes mostraron que la formación de metabolitos secundarios, por cultivos celulares de *Morinda*, fue más alta en este reactor que en cualquier otro tipo. Por lo tanto, los experimentos posteriores, con cultivos de *Digitalis*, se efectuaron en un reactor "airlift" con un volumen de trabajo de 20 litros. Las cepas probadas fueron la 72L, E1, 291 y 287, que al igual que en los experimentos a nivel de matraz, difirieron grandemente una de otra con respecto a su capacidad de hidroxilación. A pesar de algunas desviaciones, en general los resultados obtenidos con cultivos en matraces pudieron reproducirse en el bioreactor. En contraste a los experimentos a nivel de

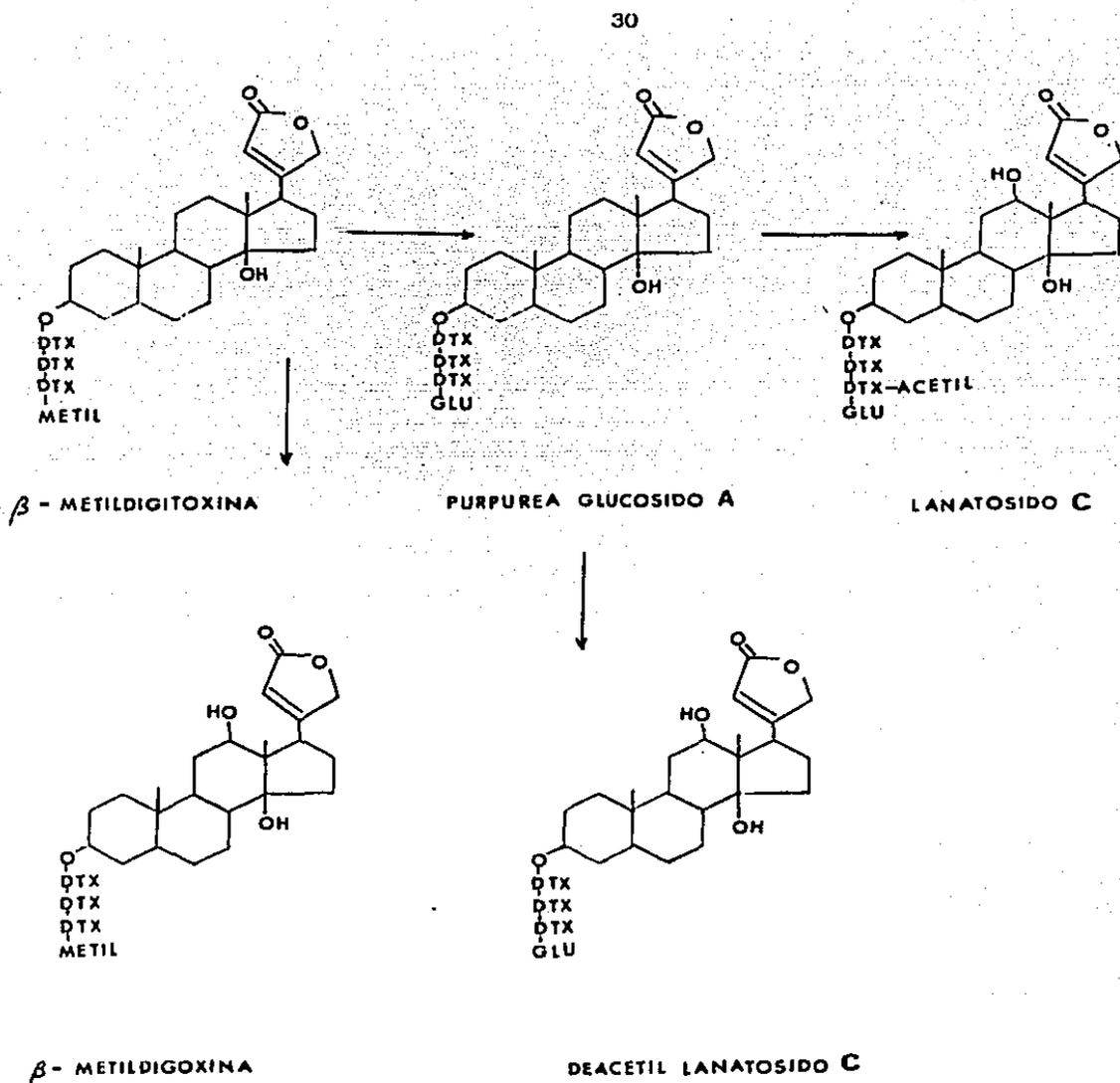


Fig. 11 Biotransformación de  $\beta$ -metildigitoxina por las cepas 9-14, 10-2, 347, B2, 72L, 293, 23-17, 364, E1, E2 y 22-6 de *D. lanata*. (Reinhard, 1980).

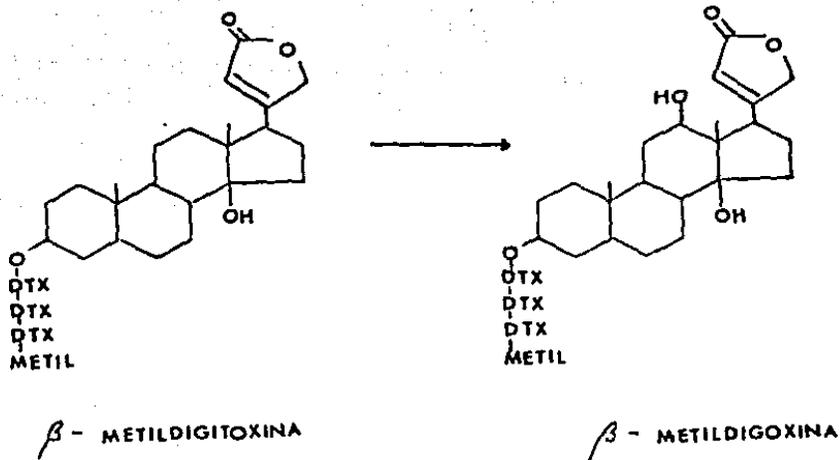


Fig. 12 Transformación de  $\beta$ -metildigitoxina por las cepas 291, 287, 72D y 285 de *D. lanata*. (Reinhard, 1980).

matraz, la cepa 72L produjo cantidades bajas de  $\beta$ -metildigoxina, cuando se añadió  $\beta$ -metildigitoxina durante la fase de crecimiento y no se reguló el pH; siendo el producto principal purpúrea glucósido A. En los experimentos, ajustando el pH a 6, solamente ocurría la hidroxilación en C-12, y después de 24 días de incubación se obtenían aproximadamente 20 mg/l de  $\beta$ -metildigoxina.

En los cultivos con las cepas 291, 347 y 287, no fue necesaria la regulación del pH durante la fase de crecimiento y estacionaria, para la producción de  $\beta$ -metildigoxina. Dicha producción fue de 1.96 g a los 11 días de incubación con  $\beta$ -metildigitoxina, la cual fue añadida cinco veces en dosis de 800 mg durante el período de incubación.

Con la cepa 287 se obtuvieron velocidades altas de biotransformación, dicha cepa, pudo transformar incubaciones repetidas de 40 mg/l de medio del sustrato en un período de dos días. A los cinco días del cultivo, fue adicionada la  $\beta$ -metildigitoxina disuelta en etanol y posteriormente la adición se realizó cada tercer día, de tal manera que a los 26 días de incubación se produjeron 400 mg/l de  $\beta$ -metildigoxina. Este proceso se mejoró posteriormente cambiando el etanol por metanol como disolvente del sustrato, reportándose la formación de 475 mg/l de  $\beta$ -metildigoxina durante 14 días de incubación. Además de la  $\beta$ -metildigoxina, se formaron también cantidades bajas de PA y DC que se encontraban en la fracción del tejido, mientras que aproximadamente el 90 % de la  $\beta$ -metildigoxina, pudo recuperarse del medio de cultivo. Se observó que niveles de sustrato más alto de 40 mg/l son tóxicos para la célula.

## 2. OBJETIVOS.

- Determinar las condiciones adecuadas para el establecimiento del cultivo de tejido calloso y del cultivo de células en suspensión de *Digitalis purpurea*.
- Estudiar el cultivo de células en suspensión, como un sistema de biotransformación de glucósidos cardiacos.

### 3. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1.1. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron marca Baker grado analítico, mientras que las vitaminas, fitohormonas y glucósidos cardíacos fueron marca Sigma o Aldrich.

#### 3.1.2. Material biológico.

Las semillas de *D. purpurea*, se recolectaron en Huauchinango, Puebla, Km 37 de la carretera Tulancingo-Poza Rica sobre el puente Totolapa (Presa Necaxa). Con dichas semillas se implementó un cultivo (en suelo) en Tepetlixpa, Edo. de México. Las semillas usadas en este estudio, fueron recolectadas de este último.

#### 3.2. Métodos.

##### 3.2.1. Desinfestación y germinación de semillas.

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por un amplio rango de microorganismos que no son patogénicos bajo condiciones normales, sin embargo cuando el tejido u órgano es cultivado "in vitro" en un medio enriquecido, el crecimiento de los microorganismos es acelerado a un grado tal, que puede limitar el desarrollo de las células vegetales. Debido a esto, muchos investigadores prefieren emplear como fuente de material vegetativo a plántulas obtenidas de semillas germinadas bajo condiciones asepticas. Los métodos y productos utilizados para la desinfestación de las semillas, varían de acuerdo a las condiciones en que se desarrolle la planta y a la disponibilidad de los desinfestantes. Diversos compuestos químicos han sido utilizados para la desinfestación superficial, destacando entre ellos las soluciones de blanqueadores comerciales a base de hipoclorito de sodio (Villegas, 1985).

Con el propósito de efectuar la germinación de semillas en condiciones de asepsia, éstas fueron sometidas a diferentes tratamientos de desinfestación, para lo cual utilizamos agua oxigenada, hipoclorito de sodio y etanol, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición como se indica en la tabla 2.

TABLA 2. DESINFESTACION DE SEMILLAS DE *D. purpurea*.

Tratamiento	Agua oxigenada		Etanol 70%	Hipoclorito de sodio *	
	15 %	30%		1:4 v/v	1:1 v/v
1	10 min.				
2	20 min.				
3		20 min.			
4			1 min.	10 min.	
5			1 min.	20 min.	
6				20 min.	
7					20 + 5 min.

\* Cloralex (5 % de cloro activo).

Las semillas luego de ser sometidas a la acción de los diferentes desinfectantes, siempre fueron enjuagadas 3 o 4 veces con agua destilada estéril.

El tratamiento 7 difirió del resto, debido a que después de exponerse las semillas al hipoclorito de sodio por 20 min. y ser enjuagadas, éstas se dejaron en remojo durante 24 horas, al cabo de las cuales se continuó el tratamiento con hipoclorito por 5 minutos más.

Las semillas desinfectadas se sembraron en frascos previamente esterilizados, que contenían una cama de algodón húmedo, y se incubaron a 28 grados centígrados en fotoperíodo de 16 horas.

Para cada tratamiento de desinfección, se sembraron 20 frascos con 50 semillas cada uno, el porcentaje de contaminación se calculó contando las semillas contaminadas después de una semana de incubación.

En lo que se refiere al porcentaje de germinación, éste se obtuvo contando las semillas que germinaron después de un mes de incubación.

### 3.2.2. Composición y preparación de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados, fueron los de Murashige-Skoog (1962) y Schenk-Hildebrandt (1972), denominados MS y SH respectivamente (tabla 3), suplementados con las fitohormonas 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D = A), ácido indolacético (AIA = B), ácido naftalenacético (ANA = C) y 2,4-D + cinetina (D), a diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 4.

Para los estudios correspondientes a la inducción y crecimiento del tejido calloso, los medios se prepararon en la siguiente forma: los macro y micronutrientes en solución, se mezclan perfectamente con la sacarosa, se llevan a un volumen determinado con agua destilada y se ajusta el pH a 5.8, posteriormente se adiciona el agar a 0.7 % y se esteriliza esta parte en autoclave a 121 grados centígrados por 15 minutos. La parte orgánica se mezcla por separado, se ajusta el pH a 5.8 y se pasa a través de un filtro millipore estéril. Posteriormente se mezcla con la parte inorgánica previamente esterilizada, y se vacía el medio en frascos estériles. La operación de mezclado y vaciado del medio se realiza en condiciones asépticas. En los experimentos de cultivo en suspensión, el medio se prepara en la forma antes descrita, omitiendo la adición de agar.

TABLA 3. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Sales	Medio Murashige-Skoog mg/l	Medio Schenk-Hildebrandt mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.0	200.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0	--
KNO <sub>3</sub>	1900.0	2500.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0	--
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.0	400.0
KI	0.83	1.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	--	300.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	5.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	10.0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.2
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	1.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	15.0
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	20.0
Inositol	100.0	1000.0
Ac. nicotínico	0.5	5.0
Piridoxina-HCl	0.5	0.5
Tiamina-HCl	0.1	5.0
Glicina	2.0	--
Sacarosa	30000.0	30000.0
Agar	7000.0	7000.0

TABLA 4. CONCENTRACION DE FITOHORMONAS.

Fitohormonas (mg/l)	Medio Murashige-Skoog	Medio Schenk-Hildebrant
2,4-D		
0.0	MS-0	SH-0
1.0	MS-A1	SH-A1
2.0	MS-A2	SH-A2
3.0	MS-A3	SH-A3
AIA		
1.0	MS-B1	SH-B1
3.0	MS-B3	SH-B3
5.0	MS-B5	SH-B5
ANA		
1.0	MS-C1	SH-C1
2.0	MS-C2	SH-C2
3.0	MS-C3	SH-C3
2,4-D/Cinetina		
1.0/1.0	MSD	SHD

A = 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

B = AIA: ácido indol acético.

C = ANA: ácido naftalén acético.

### 3.2.3. Inducción del tejido calloso.

Dependiendo del explante, la proliferación del callo puede surgir del cambium, cortex, floema o del parénquima del xilema. Al callo le toma de 3 a 8 semanas alcanzar un tamaño adecuado para poder ser resembrado por transferencia del tejido a medio fresco. Una vez que el callo ha sido establecido, deba dividirse y resembrarse a intervalos regulares (cada 3 o 4 semanas).

En la producción o biotransformación de metabolitos secundarios es importante establecer si existe dependencia entre la formación del metabolito y el crecimiento del tejido calloso. Si los callos de *D. purpurea*, retienen la actividad para producir cardiotónicos, es posible garantizar la presencia del sistema enzimático para llevar a cabo reacciones de biotransformación.

Con el fin de establecer el tejido calloso, se tomaron los cotiledones de plántulas de *D. purpurea* de un mes de edad, y se sembraron en los diferentes medios de cultivo. Este procedimiento se efectuó en condiciones de asepsia.

Se colocaron cuatro pares de cotiledones por frasco, en un total de diez frascos por cada tratamiento; se incubaron a 28 grados centígrados en fotoperíodo de 16 horas.

El porcentaje de inducción de tejido calloso, regeneración de la planta y callo con raíces, se determinó contando los explantes, que dieron las diferentes respuestas después de seis semanas de incubación.

### 3.2.4. Determinación del crecimiento del tejido calloso en medio sólido.

a) Cinéticas de crecimiento para determinar el número de resiembras en los medios MS Y SH.

A las seis semanas de incubación del tejido calloso inducido a partir de los cotiledones, se realizó la primera resiembra en medio fresco, posteriormente se efectuaron las resiembras subsiguientes cada tres semanas, evaluando en cada resiembra el aumento en peso fresco por frasco. Esto se realizó por transferencia del tejido a un frasco con medio nuevo, previamente tarado; la diferencia de peso dió el valor de peso húmedo.

b) Cinéticas de crecimiento del tejido calloso en medio SH.

A las seis semanas de incubado el tejido calloso, se hizo la evaluación de éste, se resembró un gramo de callo en medio fresco y se incubó por cuatro semanas más. Cada semana se tomaron alícuotas que fueron evaluadas por los parámetros siguientes:

**Peso húmedo:** se tomó el tejido y se transfirió a un vial previamente tarado, se pesó y la diferencia de peso dió el valor de peso húmedo.

**Peso seco:** se colocó el tejido en cajas de petri puestas previamente a peso constante, se secaron a 90 grados centígrados por 24 horas; se pesaron y la diferencia en peso dió el valor de este parámetro.

**Presencia de cardiotónicos en tejido calloso:** un gramo de tejido calloso puesto en maceración durante 24 horas con 5 ml de una mezcla cloroformo-metanol 1:1, se homogeneizó y filtró (lavando con la mezcla el homogenizador y el residuo), el filtrado se recogió en un matraz balón, se evaporó casi a sequedad y se redisolvió con 5 ml de agua; la muestra se trató con heptano para eliminar lípidos. Finalmente la fase acuosa se extrajo con 5 ml de cloroformo por tres veces. La detección de cardiotónicos se efectuó por cromatografía en capa delgada de sílica gel, con un sistema de elución cloroformo-metanol 9:1, y con ayuda de estándares de referencia. Los compuestos se detectaron por revelado con solución de ácido tricloroacético-cloramina T y calentamiento a 100 grados centígrados.

### 3.2.5. Establecimiento y subcultivo de células en suspensión.

Los cultivos de células vegetales en suspensión, proporcionan una población de células relativamente homogénea, accesible a sustancias químicas aplicadas exógenamente. La mayoría de los cultivos en suspensión, se obtienen transfiriendo una masa de callo friable a medio líquido, de la misma composición que el usado para el crecimiento del callo. En el primer subcultivo en medio fresco, se remueven los agregados grandes del inóculo inicial. Para cada línea celular, hay un tamaño de inóculo mínimo, abajo del cual el cultivo no crece. El crecimiento de los cultivos en suspensión, puede ser monitoreado midiendo uno o más de los siguientes parámetros, volumen del paquete celular, número de células, peso fresco o seco, contenido de proteína o DNA y viabilidad celular (Morris, 1985).

#### a) Inicio del cultivo en suspensión y determinación de la cinética de crecimiento.

Se tomaron 5 g de tejido calloso peso fresco, y se depositaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio nutritivo, adicionado de la misma concentración hormonal que dió origen a dicho tejido. Se colocaron en un baño metabólico a 28 grados centígrados y con una agitación recíproca de 100 r.p.m.. La cinética de crecimiento se efectuó tomando 3 ml del cultivo a diferentes tiempos y evaluando los siguientes parámetros:

- i) Peso seco: la alícuota del cultivo de células en suspensión, se filtró sobre papel filtro a peso constante, se secó por 24 horas a 90 grados centígrados, se pesó y la diferencia en peso dió el valor de esta variable.
- ii) Determinación de azúcares totales. Se llevó a cabo por el método de la antrona (Spiro, 1956).

Preparación del reactivo: se disolvieron 200 mg de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico al 95 %.

Se tomó una alícuota de la muestra problema, se depositó en un tubo de ensayo y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada, se colocaron los tubos en un baño de hielo y se añadieron (resbalando por la pared) 2 ml de reactivo de antrona, de modo que las capas no se mezclaran. Al cabo de 2 o 3 minutos se mezclaron perfectamente, la solución adquirió entonces una coloración verde, se llevaron los tubos a un baño de agua hirviente, donde se mantuvieron por 10 minutos. Una vez fríos, se procedió a efectuar la lectura de las muestras a 620 nm. Los valores obtenidos se interpolan en la curva tipo (figura 13) establecida con una solución de glucosa de 0 a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

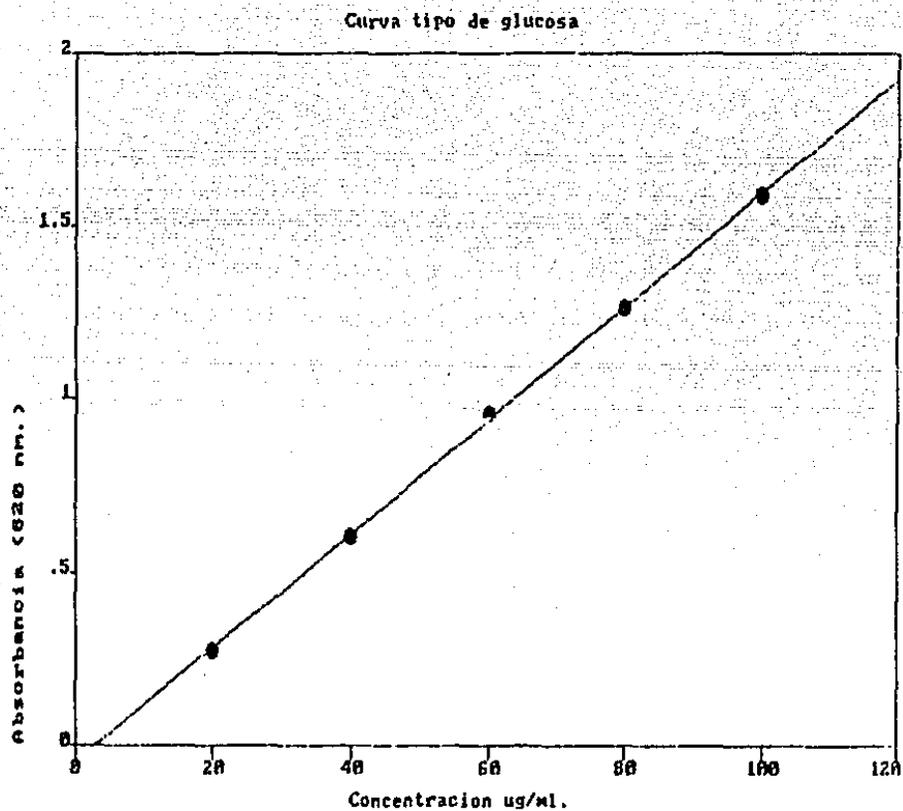


Fig. 13 Curva tipo de glucosa.

#### b) Subcultivo de las células en suspensión.

Se tomaron 25 g de tejido calloso peso fresco y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 1 l con 250 ml de medio nutritivo. Se incubó en un baño metabólico a 28 grados centígrados y con una agitación recíproca continua de 100 r.p.m.. Se tomó una alícuota de 20 ml al tiempo de máximo crecimiento (determinado previamente en los experimentos de establecimiento, para cada cultivo), y se adicionó a matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 30 ml de medio fresco. Las cinéticas de crecimiento, se efectuaron tomando alícuotas de 50 ml a diferentes tiempos, evaluando los parámetros de peso seco y azúcares totales.

#### 3.2.6. Estudios de biotransformación de digitoxina y $\beta$ -metildigitoxina.

Los experimentos se efectuaron en los subcultivos, a los tres días de inoculados, por adición de 1 mg del sustrato a transformar; previamente disuelto en 1 ml de metanol al 50 % y esterilizado por filtración.

Las cinéticas de biotransformación se determinaron tomando a diferentes tiempos de incubación, una alícuota de 50 ml, donde se evaluaron los siguientes parámetros:

- i) peso seco.
- ii) azúcares totales.
- iii) detección de cardiotónicos en el medio de cultivo.

El filtrado recuperado al separar las células para la determinación de peso seco, se depositó en un embudo de separación y se extrajo con 10 ml de cloroformo por tres veces. Estos extractos se reunieron y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo se redisolvió en 0.5 ml de cloroformo-metanol 1:1, de esta solución se depositó una muestra en una placa cromatográfica de sílica gel, así como los estándares de referencia. La placa se desarrolló en un sistema de disolvente cloroformo-metanol 9:1, los compuestos se detectaron por revelado con solución de ácido tricloroacético-cloramina T y calentamiento a 100 grados centígrados.

#### 3.2.7. Estudios de biotransformación de digitoxina, en medios de cultivo modificados.

Las dos modificaciones a estos medios se indican a continuación: en el medio de cultivo se sustituyó el 2,4-D por AIA a la misma concentración, identificando cada medio con su respectiva clave y en paréntesis la modificación. En el medio basal se incrementó 4.7 veces la cantidad de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , manteniendo la misma concentración de auxina. La identificación de estos medios se hizo como en el caso anterior. Las cinéticas de biotransformación se realizaron como se indicó en el punto 3.2.6..

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

##### 4.1. Desinfestación y germinación de las semillas de *D. purpurea*.

En la selección del tratamiento de desinfestación de las semillas de *D. purpurea*, básicamente se emplearon tres tipos de agentes desinfestantes, encontrando que el mejor fue el tratamiento 7, ver tabla 5, dicho tratamiento comprende una exposición al hipoclorito de sodio (1:1 v/v) de 20 minutos, seguido por un remojo de 24 horas, y finalmente la exposición por 5 minutos en la misma solución desinfestante. Esta concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición son muy altos comparados a los reportados por Staba (1962) para las semillas de *D. purpurea* y *D. lanata*, lo cual puede ser atribuido a la procedencia de las semillas.

TABLA 5. RESPUESTA DE LAS SEMILLAS DE *D. purpurea* A LOS TRATAMIENTOS DE DESINFESTACION.

Tratamiento	% Contaminación
1 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 %, 10 min.)	50.0
2 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15 %, 20 min.)	10.0
3 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % 20 min.)	21.0
4 (etanol 1 min., hipocl.1:4, 10 min.)	6.6
5 (etanol 1 min., hipocl.1:4, 20 min.)	87.5
6 (hipocl. 1:4, 20 min.)	25.0
7 (hipocl. 1:1, 20 min.; 5 min.)	0.0

Respuesta: % de contaminación a los 10 días de incubación.

Las pruebas de germinación, con las semillas de estos tratamientos, mostraron que el tratamiento 4, promueve la germinación en un 90 %, mientras que el 7 lo hace en un 95 %. Cabe señalar que este último tratamiento, dió una respuesta más consistente y homogénea en cuanto a la germinación de las semillas, por lo cual fue el seleccionado.

##### 4.2. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción del tejido calloso.

De los diferentes medios de cultivo ensayados (tabla 6), solamente los suplementados con 2,4-diclorofenoxiacético a diferentes concentraciones, fueron capaces de inducir la formación del tejido calloso en los cotiledones. Estos resultados están acordes a lo reportado por varios investigadores (Furuya, 1970; Garve, 1980; Gurny, 1980; Hagimori, 1980 y Staba, 1962), en ensayos con diferentes especies y explantes de *Digitalis*.

El efecto que tuvo el ácido naftalén acético sobre los explantes ensayados, fue la formación de tejido calloso con raíces abundantes (tabla 6). Este resultado es similar al reportado por Staba (1962) con semillas de *D. purpurea* y *D. lanata* en el medio Murashige-Skoog, suplementado con 6 p.p.m de ANA. Hagimori (1980) observó el mismo comportamiento en plántulas y hojas de seis especies de *Digitalis*, en medio MS adicionado con 2 p.p.m. de ANA.

Finalmente los medios ensayados a tres concentraciones de ácido indolacético, indujeron la regeneración de la planta completa tabla (6). La respuesta de diferentes explantes de *Digitalis* a la acción de AIA, ha presentado variaciones muy notables. Lui y Staba (1979), reportan que los cotiledones de *D. lanata* en medio MS con 3 p.p.m. de AIA forman callos con raíces, esto mismo fue observado por otros investigadores (Gurny, 1981) con plántulas de *D. purpurea* en medio MS con 1 p.p.m. de AIA y 0.1 p.p.m. de cinetina. Hagimori y col. (1982) han encontrado que la plántula de *D. purpurea* induce tejido calloso en un medio idéntico al reportado por Lui y Staba. En tanto Rucker (1976), reportó que los explantes de hoja de *D. purpurea* sobre medio de Heller, forman raíces a una concentración de AIA de 0.01 p.p.m., y que el tejido responde a un incremento de 10 p.p.m. de AIA, mejorando la formación de raíces.

En nuestro caso los resultados obtenidos discrepan totalmente con estos reportes, ya que los cotiledones tomados de la plántula de un mes e inoculados en los medios MS y SH con 1, 3 y 5 p.p.m. de AIA, crecieron y desarrollaron la planta completa.

El desarrollo de la planta, fue también observado en los testigos (tabla 6), comportamiento igualmente reportado por Lui y Staba. No obstante, una diferencia significativa entre las plantas desarrolladas en medio con AIA y éstas de los testigos, fue el mayor contenido de cardiotónicos determinado en las primeras. Estos datos no se muestran en el presente trabajo, por considerarlos fuera de los objetivos propuestos, aunque actualmente son objeto de estudio en nuestro laboratorio.

TABLA 6. EFECTO DEL MEDIO NUTRITIVO, REGULADORES DE CRECIMIENTO Y SU CONCENTRACION SOBRE LOS COTILEDONES DE *D. purpurea*.

Fitohormona mg/l	Medio			
	Murashige-Skoog		Schenk-Hildebrant	
2,4-D	% de inducción de tejido calloso			
1	MS-A1	90	SH-A1	100
2	MS-A2	100	SH-A2	100
3	MS-A3	100	SH-A3	97
1 2,4-D/1 cinetina	MSD	100	SHD	100
AIA	% de regeneración de planta			
	MS-0	90	SH-0	80
1	MS-B1	55	SH-B1	95
3	MS-B3	70	SH-B3	70
5	MS-B5	50	SH-B5	90
ANA	% de inducción de tejido calloso con raíces			
1	MS-C1	87	SH-C1	91
2	MS-C2	93	SH-C2	100
3	MS-C3	90	SH-C3	93

#### 4.3. Determinación del crecimiento de tejido calloso en medio sólido.

a) Cinéticas de crecimiento para determinar el número de resiembbras en los medios Murashige-Skoog y Schenk-Hildebrant.

La figura 14, muestra el crecimiento del tejido calloso en los medios MS y SH suplementados con diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En dicha figura observamos que el medio MS permitió un mayor crecimiento (peso fresco), el cual se alcanzó a las 12 semanas (3a. resiembra), en tanto que en el medio SH, la mayor cantidad de peso fresco se obtuvo a las 15 semanas (4a. resiembra). La influencia del 2,4-D, fue diferente en cada medio, encontrándose que el medio MS con 1 p.p.m. de 2,4-D promueve un mayor crecimiento, mientras que el medio SH presenta el mismo efecto cuando se adicionan 2 p.p.m. de 2,4-D.

Aparentemente existe una diferencia en el crecimiento del tejido calloso en estos medios, sin embargo, el análisis estadístico de los resultados, mostró que no existe una diferencia significativa entre el efecto de los medios de cultivo, ni entre las diferentes concentraciones de auxina.

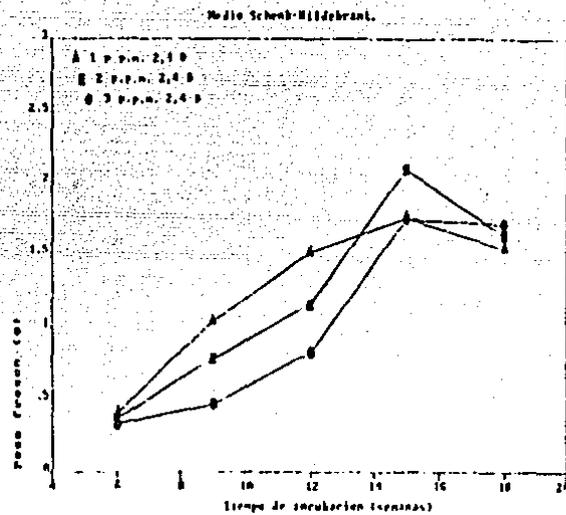
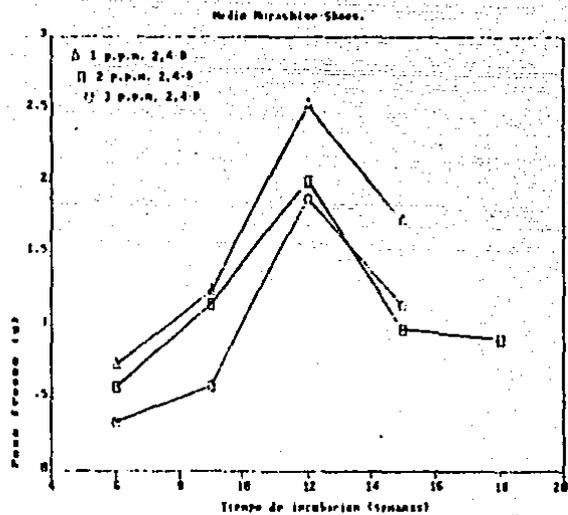


Fig. 14 Crecimiento del tejido calloso de *D. purpurea* en los medios Murashige-Skoog y Schenk-Hildebrandt.

Sin embargo, se encontró una diferencia notable en la consistencia del tejido inducido en éstos dos medios de cultivo. Los medios MS produjeron callos compactos, a diferencia de los callos friables (disgregables) inducidos en los medios SH.

Esta característica de friabilidad es necesaria para el establecimiento del cultivo de células en suspensión, por tal razón fue seleccionado el medio Schenk-Hildebrant.

Las figuras 15 y 16, presentan el error estándar de las cinéticas de crecimiento (fig. 14) del tejido calloso inducido en los medios MS y SH respectivamente, mientras que la tabla 7, muestra la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de doblado de la masa celular del tejido calloso en el medio SH con 1, 2 y 3 p.p.m. de 2,4-D.

TABLA 7. CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO EN LAS RESIEMBRAS SOBRE MEDIO SOLIDO SCHENK-HILDEBRANT.

Medio	$\mu$ (1/semana)	td (semanas)
SH-A1	0.315	2.2
SH-A2	0.195	3.5
SH-A3	0.160	4.3

$\mu = dx/dt \ 1/x =$  velocidad específica de crecimiento.  
 $td = \ln 2/\mu =$  tiempo de doblado.

b) Cinéticas de crecimiento del tejido calloso en medio Schenk-Hildebrant.

Las cinéticas de crecimiento del tejido calloso en los medios SH, estandarizando el inóculo a 1 g de peso fresco (figura 17), muestran que el callo alcanzó un crecimiento mayor, evaluado como peso fresco, cuando el medio se suplementó con 1 y 2 p.p.m. de 2,4-D, respecto a los medios adicionados con 3 p.p.m. de 2,4-D y 1 p.p.m. + 1 p.p.m. de cinetina.

Por otro lado la duplicación de la masa celular (figura 18), se alcanzó más rápidamente en el medio SH-A1, mientras que la duplicación más lenta se presentó en los medios SHD y SH-A3 (tabla 8). Comparando los resultados de las tablas 7 y 8, observamos que un inóculo mayor promueve un crecimiento más rápido.

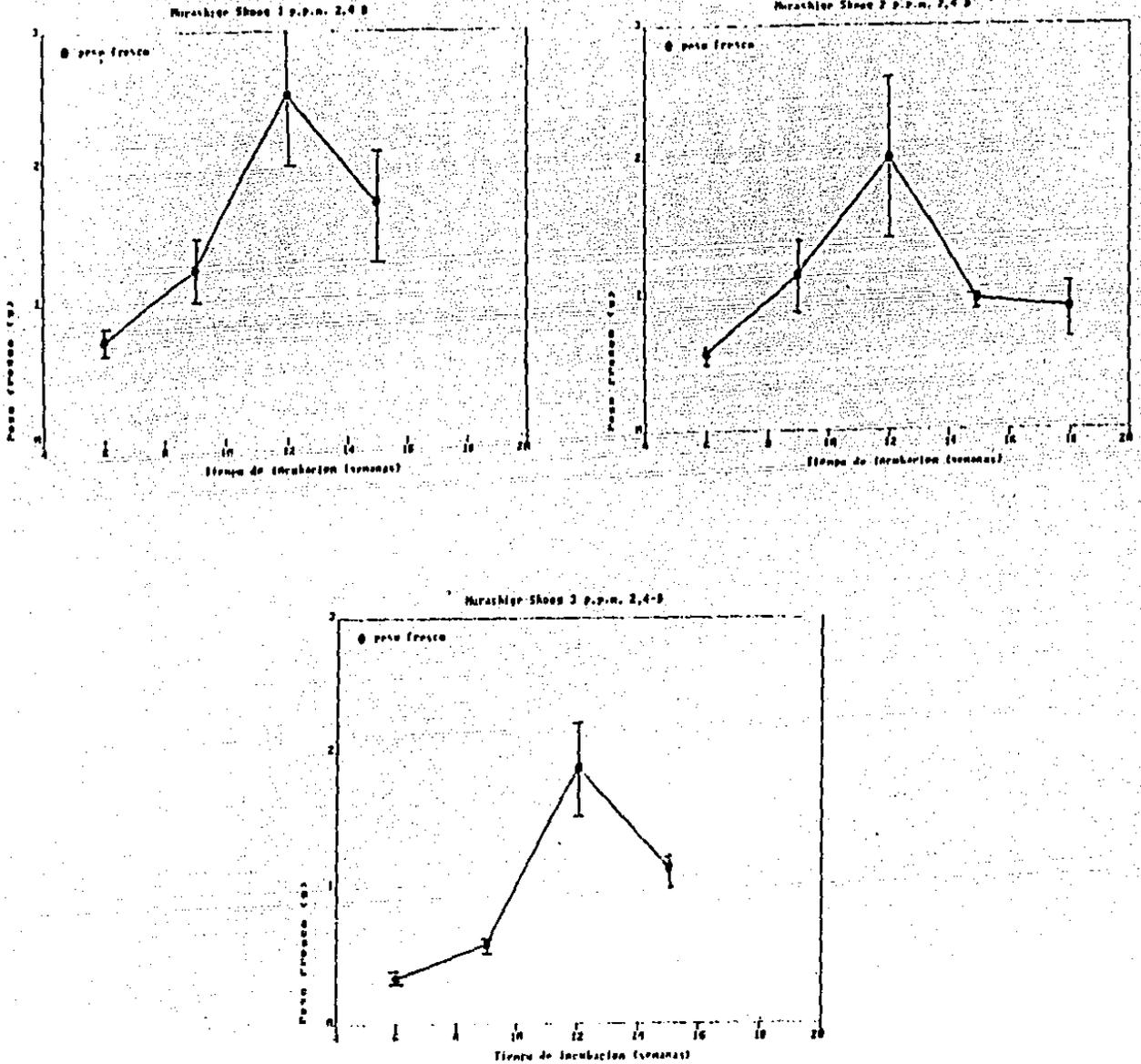


Fig. 15 Crecimiento del tejido caloso de *D. purpurea* en el medio Murashige-Skoog.

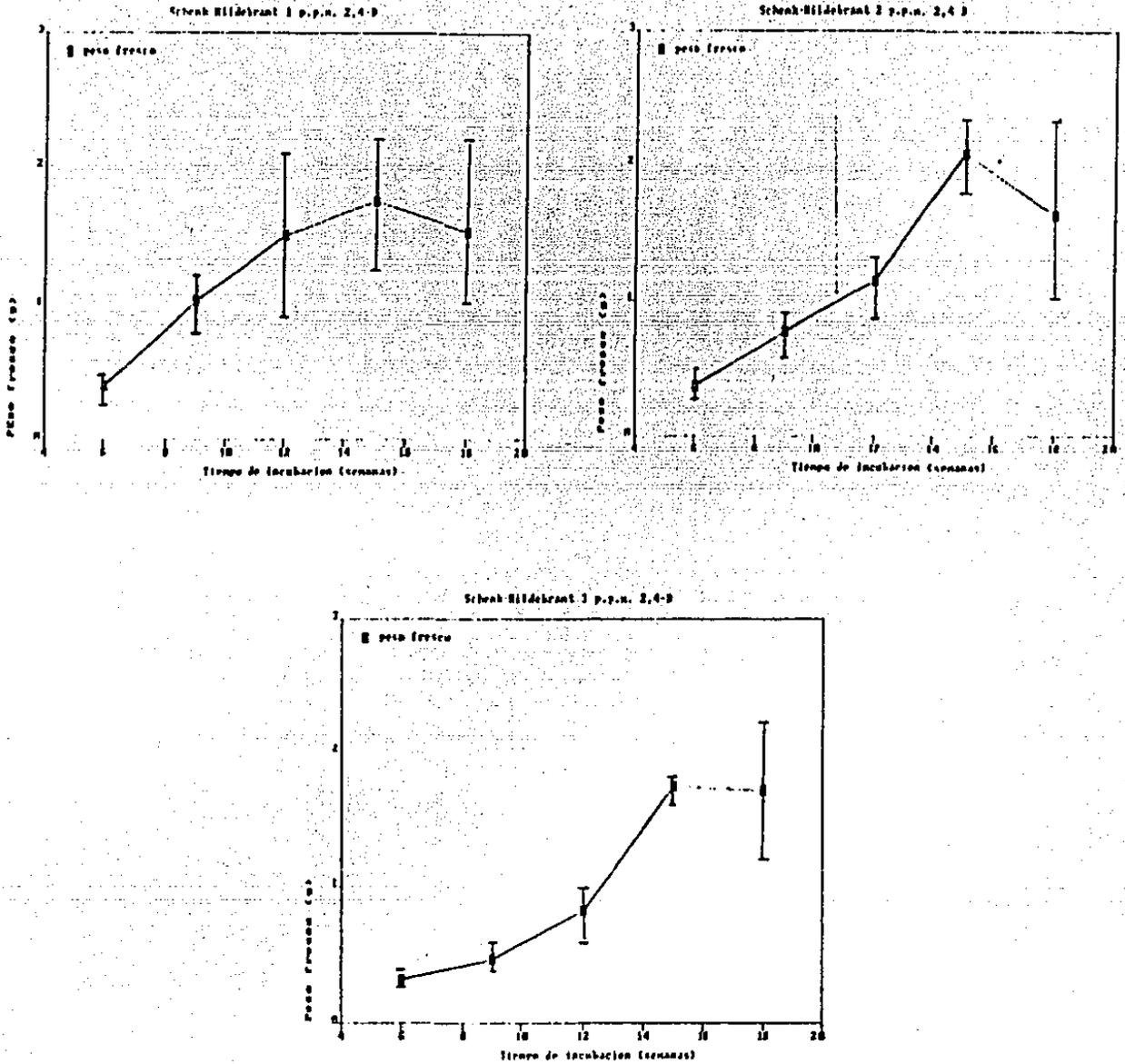


Fig. 16 Crecimiento del tejido calloso de *D. purpurea* en el medio Schenk-Hildebrandt.

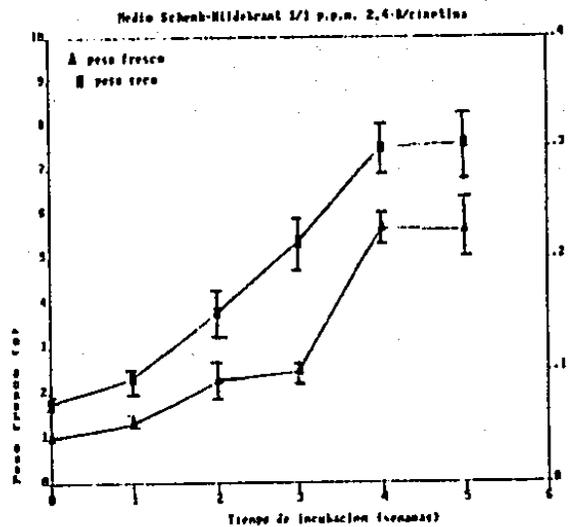
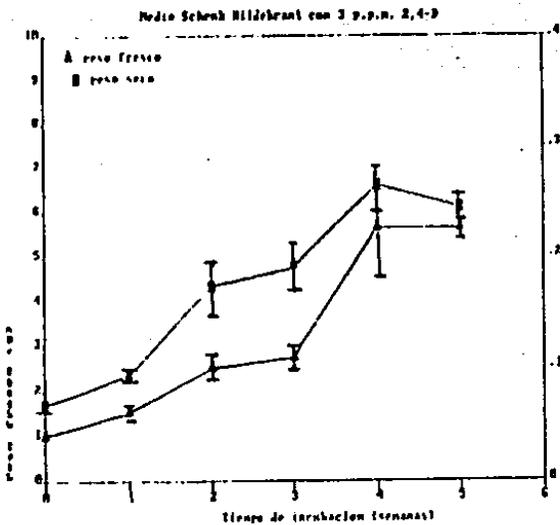
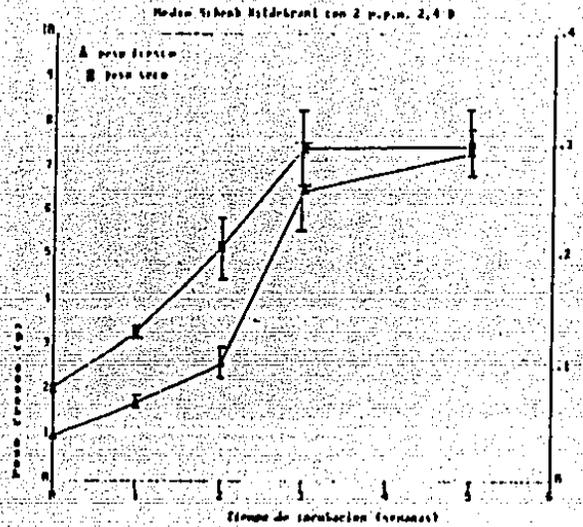
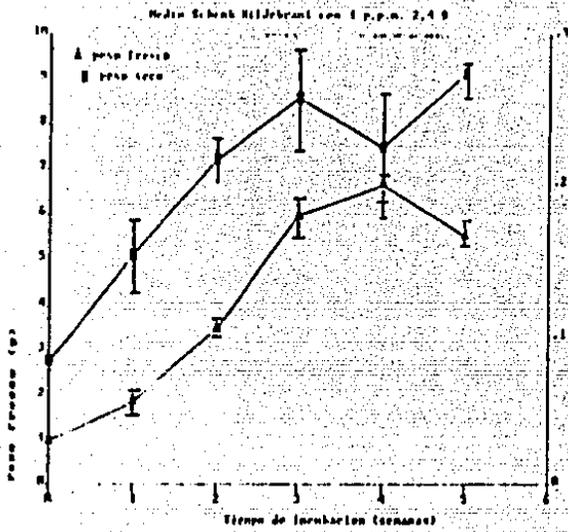


Fig. 17. Crecimiento del tejido calloso de *D. purpurea* en el medio Schenk-Hildebrandt con inóculo controlado.

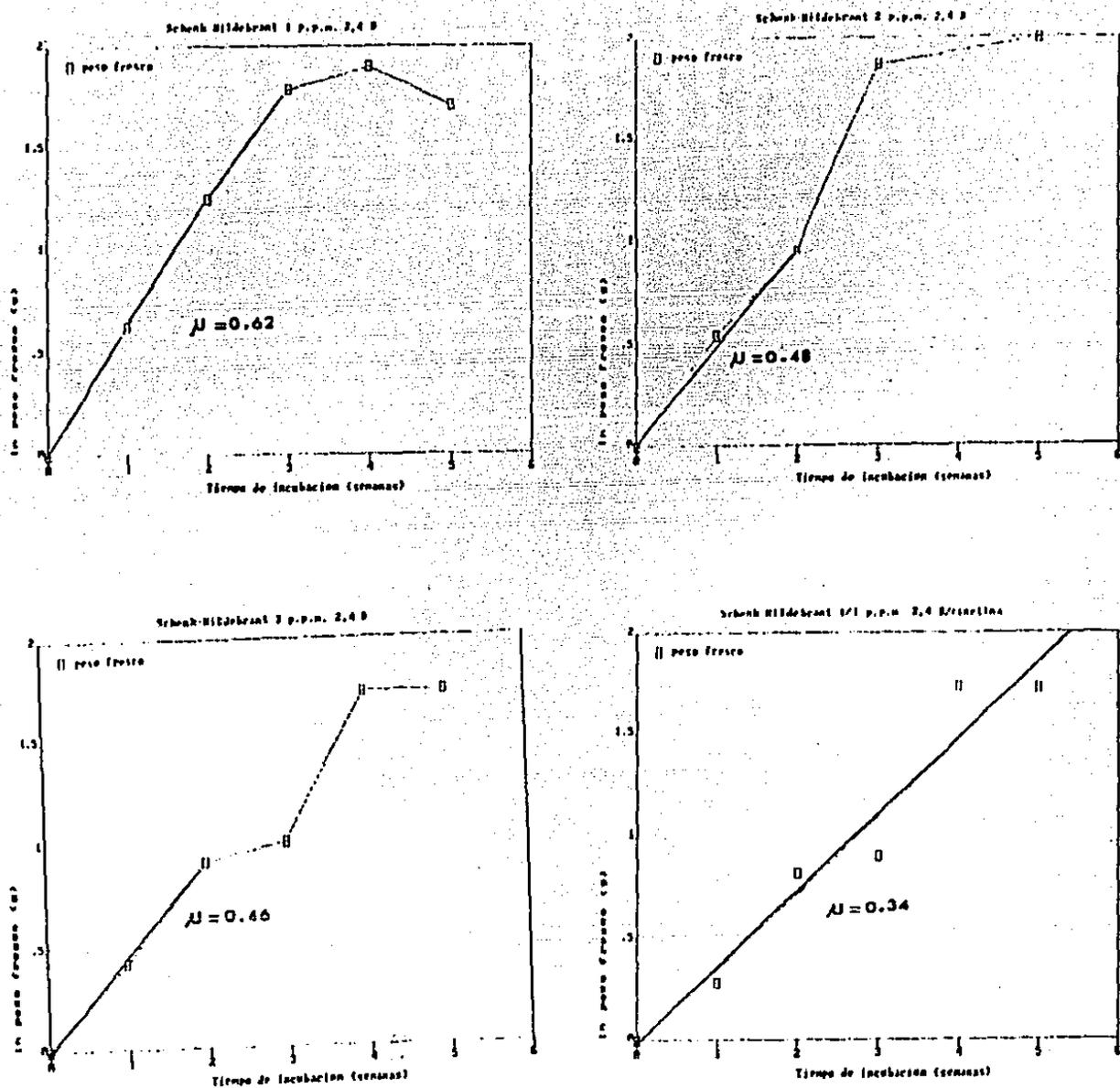


Fig. 18. Gráfica semilogarítmica de peso fresco contra tiempo de incubación del callo en medio Schenk-Hildebrandt.

TABLA 8. CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO EN MEDIO SOLIDO SCHENK-HILDEBRANT.

Medio	$\mu$ (1/semana)	td (semanas)
SH-A1	0.62	1.1
SH-A2	0.48	1.4
SH-A3	0.46	1.5
SHD	0.34	2.0

$\mu = dx/dt \cdot 1/x =$  velocidad específica de crecimiento.  
 $td = \ln 2/\mu =$  tiempo de doblado.

En lo que respecta a la detección de cardiotónicos en el tejido calloso (tabla 9), en el callo inducido en el medio SH-A1, se hizo más evidente la presencia de digitoxina que en el tejido inducido en los otros medios de cultivo. Es importante señalar, que el tejido calloso proveniente del medio SH-A3, fue el que presentó un mayor contenido de gitoxina.

Los resultados del presente estudio sobre el efecto de la concentración del 2,4-D (A), mostraron que ésta tiene una influencia importante en la velocidad de crecimiento del callo de *D. purpurea* y en la acumulación de cardiotónicos. Los callos inducidos en el medio SH-A3, presentaron una velocidad de crecimiento lenta y un mayor contenido de cardiotónicos, principalmente de gitoxina, no obstante que en los callos inducidos en los medios SH-A1, SH-A2 y SHD, también se detectó la presencia de estos compuestos. La evidencia en la literatura, mantiene el punto de vista, que la máxima acumulación de metabolitos secundarios, ocurre cuando los cultivos en suspensión disminuyen su velocidad de crecimiento. En este estudio mostramos que este mismo efecto, se presenta en el tejido calloso en medio sólido.

Las investigaciones sobre la producción de cardenólidos, por cultivo de tejidos *in vitro* de *D. purpurea* ha llevado a muchos autores a conclusiones diametralmente opuestas. Kartnig (1977) demostró la presencia de cardiotónicos en callos de *D. purpurea* y *D. lanata* por cromatografía en capa delgada, mientras que para Hirotsani y col. (1977) al igual que Gurny (1981), la presencia de estos compuestos en tejido calloso de *D. purpurea* fue negativa, no obstante las grandes cantidades de callo que emplearon (cerca de 100 g peso fresco) en este sentido nuestros resultados coinciden con los reportados por Kartnig. Es indudable que la confiabilidad y la sensibilidad del método analítico para la identificación de cardenólidos, juegan un papel importante en la evaluación de los resultados. Por otra parte, la evolución de un cultivo *in vitro*, depende de un gran número de parámetros que varían en función de las condiciones de experimentación, como son: patrimonio genético

TABLA 9. DETECCION DE CARDIOTONICOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA, A DIFERENTES TIEMPOS DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO DE *D. purpurea*.

Cultivo	Tiempo (semanas)	Peso fresco (g)	Cantidades relativas de cardiotónicos	
			Digitoxina	Gitoxina
SH-A1	0	11.5	++	+
	1	16.9	+++	+++
	2	21.3	+	+++
	5	33.5	+++	+++
SH-A2	0	13.3	-	+++
	1	9.8	-	+++
	2	7.9	-	-
	3	20.84	-	++++
	5	51.15	-	+++
SH-A3	0	10.7	+	+++
	1	15.6	+	++++
	2	10.5	+	++++
	3	16.0	+	++++
	5	29.3	+	++++
SHD	0	9.4	+	+++
	1	13.0	+	+++
	2	15.0	-	+++
	3	17.4	-	+++
	4	23.0	-	+++
	5	30.2	-	+++

- : no se detectó; +, ++, +++, ++++ : indican el incremento en la intensidad de la mancha correspondiente al cardiotónico.

de la planta utilizada para el establecimiento de los cultivos, selección involuntaria de las cepas al resembrar, composición y modo de preparación del medio, naturaleza y concentración de las fitohormonas usadas etc.

#### 4.4. Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión

##### a) Inicio del cultivo en suspensión y determinación de la cinética de crecimiento.

La figura 19 muestra las cinéticas de crecimiento y el consumo de azúcares, determinados en el establecimiento de los cultivos de células en suspensión, en ellas se observa que los tiempos de máximo crecimiento fueron de 18, 21, 10 y 13 días para los cultivos SH-A1, SH-A2, SH-A3 y SHD respectivamente.

##### b) Subcultivo de las células en suspensión.

Las cinéticas de crecimiento de los subcultivos (figura 20), muestran que el máximo crecimiento para los cultivos SH-A1, SH-A2 y SHD se alcanza a los 14, 16 y 14 días respectivamente. Estos tiempos fueron más cortos que los determinados en el establecimiento de los cultivos. El tiempo de máximo crecimiento para el cultivo SH-A3 fue de 13 días (3 días más largo que para su establecimiento). Sin embargo, cabe señalar que este cultivo presenta una fase de adaptación más pequeña en relación a los otros.

La velocidad de crecimiento y el tiempo de doblado (fig. 21, tabla 10) de los diferentes subcultivos, mostraron que el crecimiento más rápido se presentó en el cultivo SH-A3.

TABLA 10. CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DEL SUBCULTIVO DE CELULAS DE *D. purpurea* EN SUSPENSION.

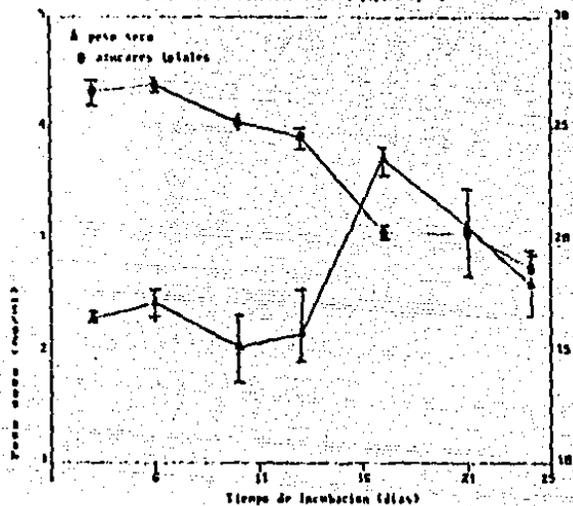
Cultivo	$\mu$ (1/días)	td (días)
SH-A1	0.1022	6.7
SH-A2	0.126	5.5
SH-A3	0.19	3.6
SHD	0.1	6.9

$\mu = dx/dt \cdot 1/x =$  velocidad específica de crecimiento.

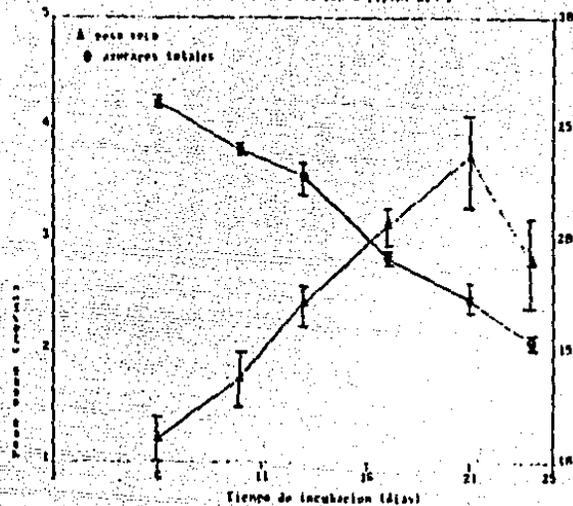
td =  $\ln 2/\mu =$  tiempo de doblado.

La facilidad de establecer el cultivo en suspensión depende de su friabilidad, pero aún con un tejido calloso friable, el cultivo en suspensión puede requerir de un período de adaptación en medio líquido. A este respecto, el crecimiento alcanzado por los cultivos SH-A1, SH-A2, SH-A3 y SHD fue menor y la fase lag más prolongada en relación a los resultados obtenidos en el subcultivo, lo que indica que durante este último, ocurre una mejor adaptación de las células al sistema en suspensión.

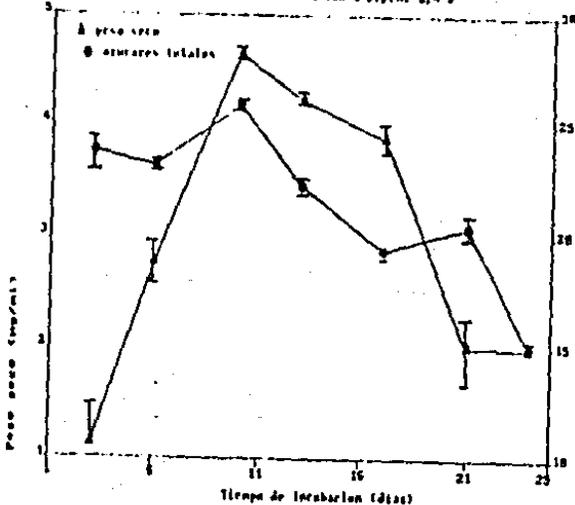
Medio Schenk-Hildebrandt con 1 p.p.m. 2,4-D



Medio Schenk-Hildebrandt con 2 p.p.m. 2,4-D



Medio Schenk-Hildebrandt con 3 p.p.m. 2,4-D



Medio Schenk-Hildebrandt 1/1 p.p.m. 2,4-D/citocina

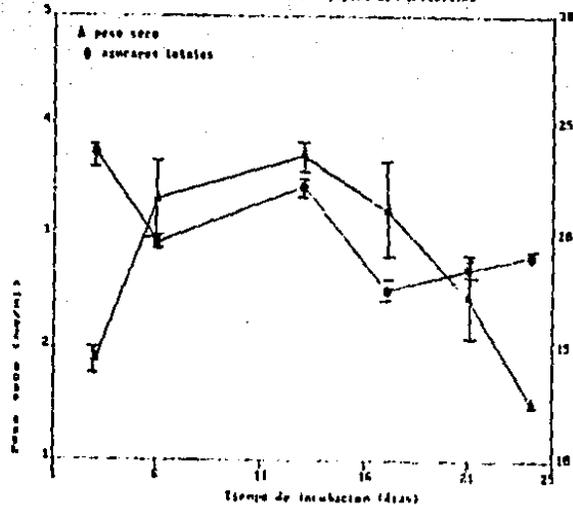


Fig. 19 Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares en el establecimiento de cultivos celulares de *D. purpurea*.

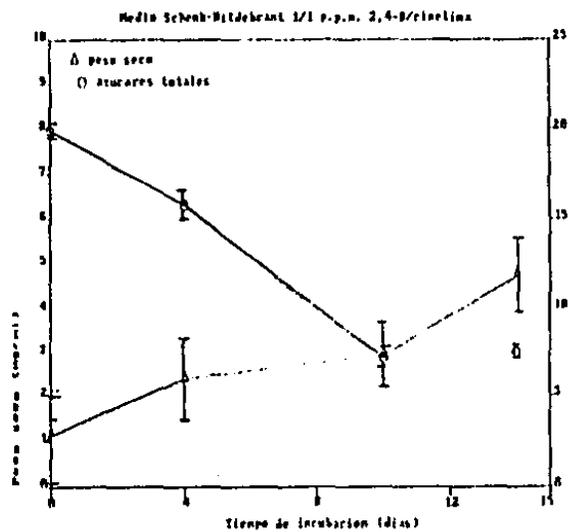
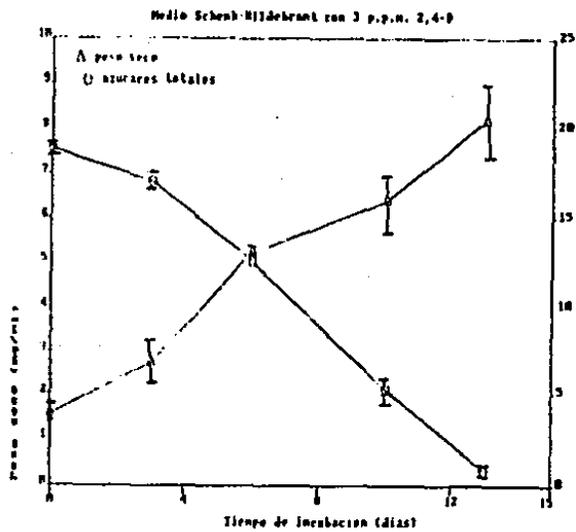
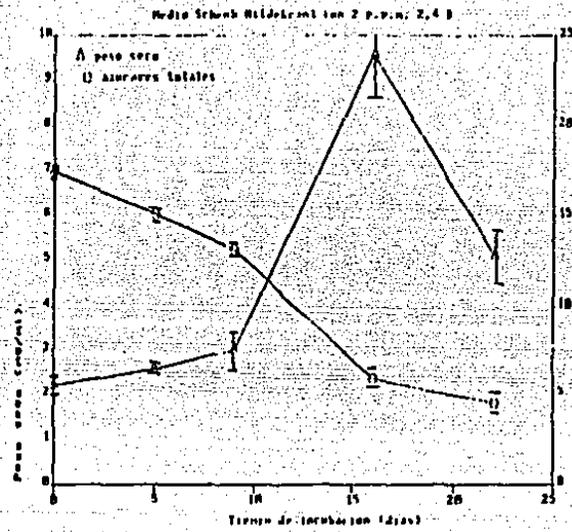
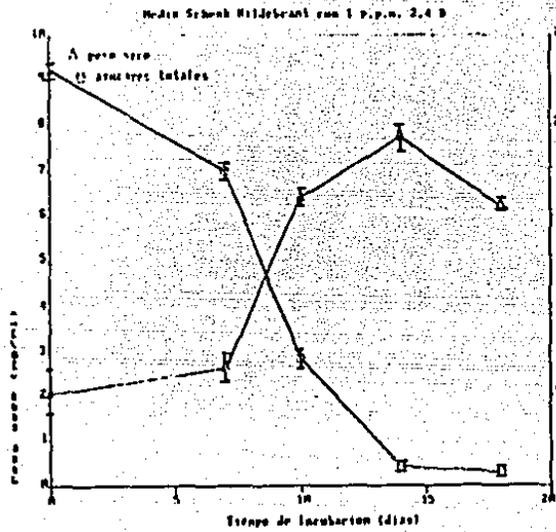


Fig. 20 Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares, de los subcultivos celulares de *D. purpurea*.

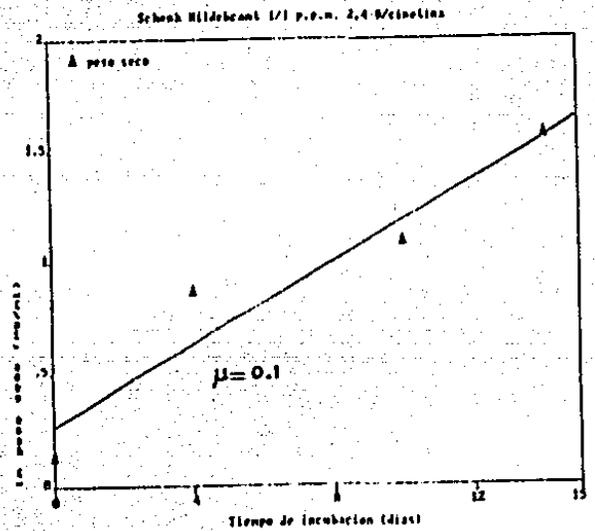
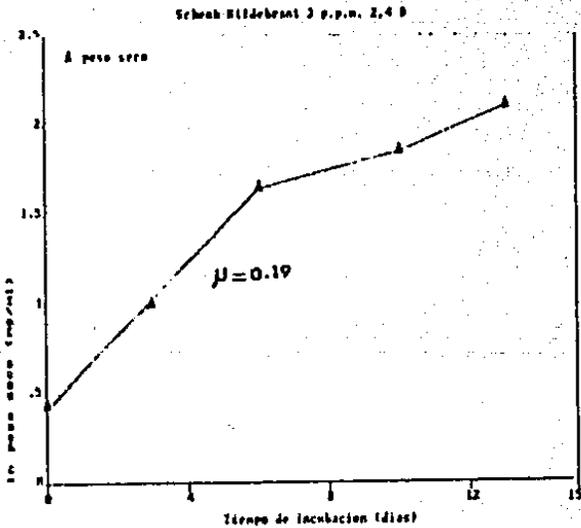
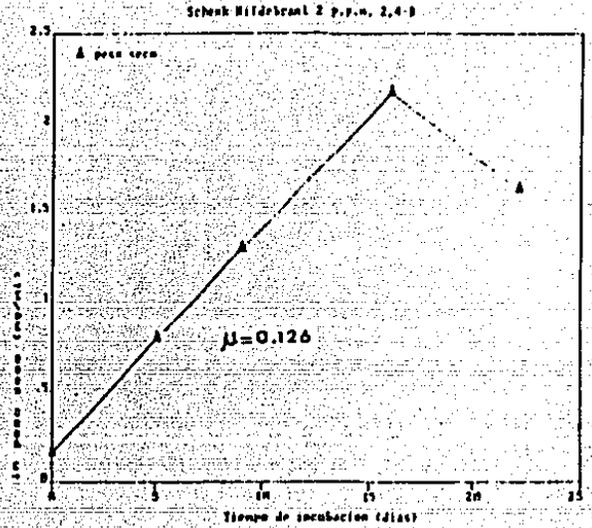
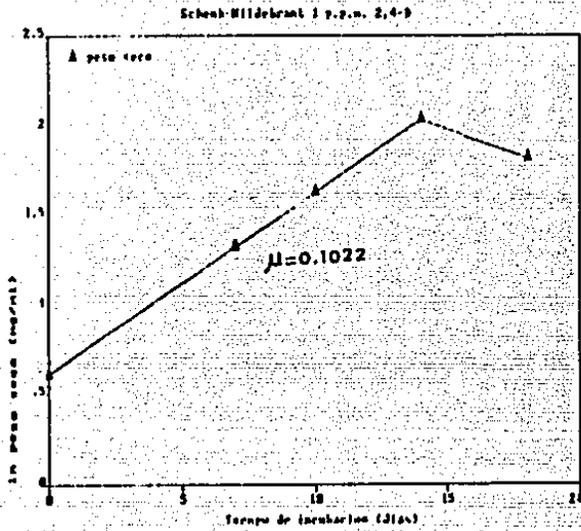


Fig. 21 Gráfica semilogarítmica de peso seco contra tiempo de incubación de los subcultivos celulares de *D. purpurea*.

El mayor crecimiento, y la fase lag más corta, fueron determinados en el subcultivo SH-A3. Es importante señalar el comportamiento del cultivo SH-A3, debido a que en medio sólido, la masa celular (callo) creció lentamente respecto a los otros cultivos, en cambio en las condiciones en suspensión, tuvo una adaptación rápida y un crecimiento mayor.

En investigaciones sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de *Digitalis*, Staba y Lamba (1963), determinaron un valor de 3 mg/ml (peso seco) a las ocho semanas, en un cultivo de células de *D. purpurea* en medio MS con 5 p.p.m. de 2,4-D. Hagimori y col. (1982) reportaron que el cultivo de *D. purpurea* alcanzó un crecimiento de 15 mg/ml (peso seco) a los veinte días en medio MS suplementado con 1 p.p.m. de AIA, finalmente Garve y Luckner (1980) encontraron que el cultivo de células de *D. lanata* en medio MS con 1 p.p.m. de 2,4-D y 0.02 p.p.m. de cinetina creció hasta 12 mg/ml en ocho días.

El crecimiento alcanzado por los cultivos SH-A1, SH-A2 y SHD fue de 7.3 mg/ml a los catorce días en promedio, a diferencia del cultivo SH-A3, que creció 8.5 mg/ml en trece días. Consideramos que los cultivos analizados en este estudio, a excepción del SHD crecen y se adaptan bien a las condiciones en suspensión.

Respecto al crecimiento bajo y lento reportado por Staba, podemos atribuirlo al inóculo empleado, 0.2 mg/ml, mientras que el inóculo utilizado en este estudio fue de 1 mg/ml, igual al usado por Garve e Hirotsani.

Garve y col. reportaron un tiempo de doblado (td) de 1.6 días para el cultivo en suspensión de *D. lanata* de la cepa I, que crecía como una suspensión fina de agregados de 10 a 30 células. En tanto que la cepa V presentó un td de 4 días y crecía formando agregados celulares organizados (agrupaciones embriogénicas). En este estudio, los cultivos SH-A1, SH-A2 y SHD presentaron un td de 6.4 días en promedio, mientras que el cultivo SH-A3 mostró un td de 3.6 días. A diferencia de lo observado por Garve, todos los cultivos crecieron como una suspensión fina de agregados celulares.

#### 4.5. Estudios de biotransformación de digitoxina y $\beta$ -metil digitoxina.

La figura 22, muestra las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los cultivos SH-A1, SH-A2, SH-A3 y SHD, adicionados de digitoxina, donde se observa que el mayor crecimiento de las células se alcanzó a los once días en los cultivos SH-A1 y SH-A3, en el cultivo SH-A2 se obtuvo a los veinte días, mientras que en el cultivo SHD se presentó a los diez días. En comparación a los cultivos originales (tabla 10), el tiempo de duplicación (fig.23 y tabla 11), se vió disminuído en los cultivos SH-A1, SH-A3 y SHD, mientras que la velocidad de crecimiento para el cultivo SH-A2 disminuyó considerablemente.

TABLA 11. CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES DE *D. purpurea* DURANTE LA BIOTRANSFORMACION.

Cultivo	$\mu$ (1/días)	td (días)
SH-A1	0.153	4.5
SH-A2	0.071	9.7
SH-A3	0.40	1.7
SHD	0.14	4.9

$\mu = dx/dt \cdot 1/x =$  velocidad específica de crecimiento.  
 $td = \ln 2/\mu =$  tiempo de doblado.

Los resultados de biotransformación de digitoxina por los cultivos SH-A1, SH-A2, SH-A3 y SHD (tabla 12), indicaron que a excepción del SH-A2, que sólo transforma digitoxina a gitoxina, todos los cultivos tienen la capacidad de transformar la digitoxina a purpúrea glucósido A y B, y el cultivo SHD la transforma además a gitoxina.

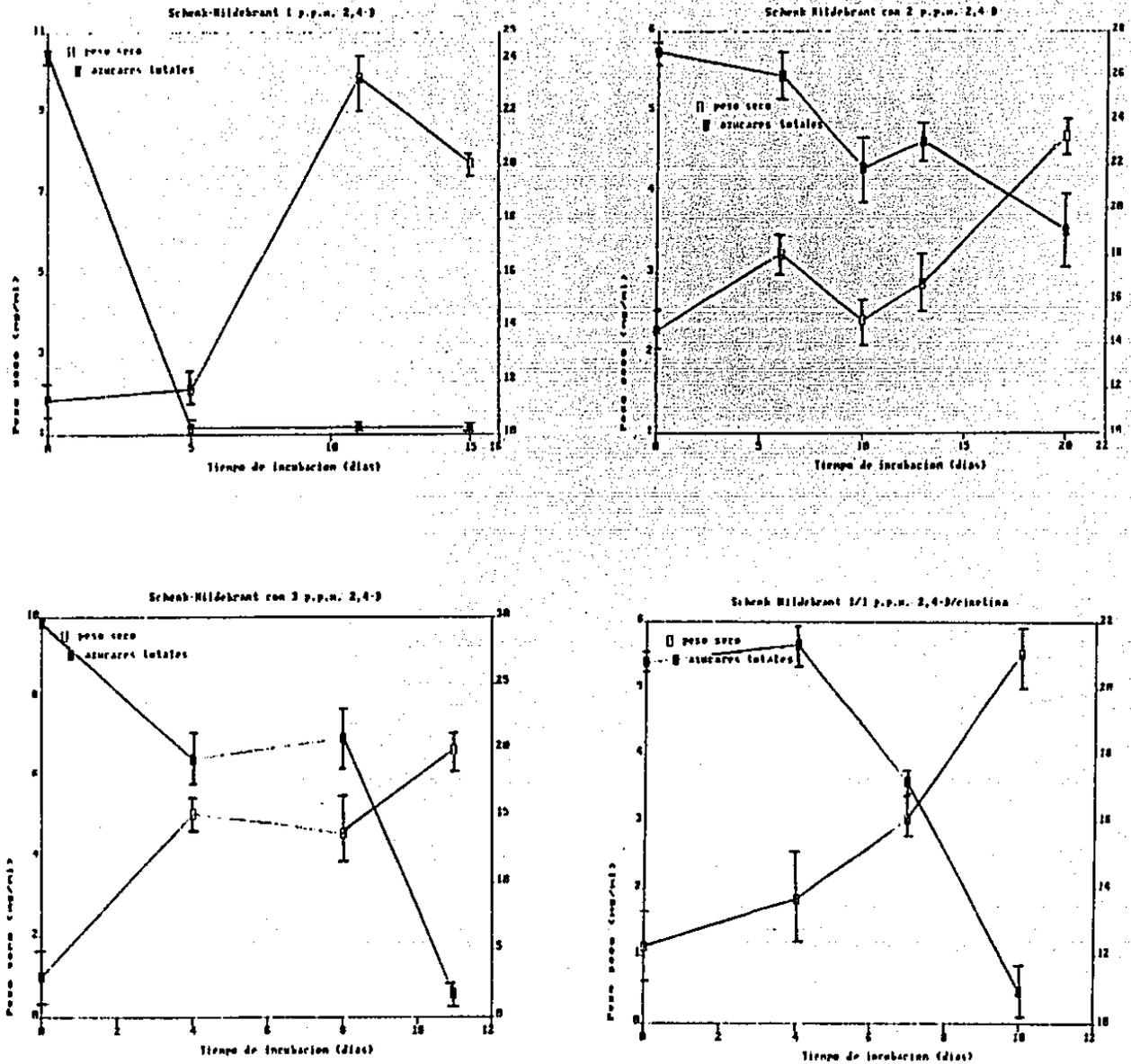


Fig. 27. Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares durante la biotransformación de digitoxina en los cultivos celulares de *D. purpurea*.

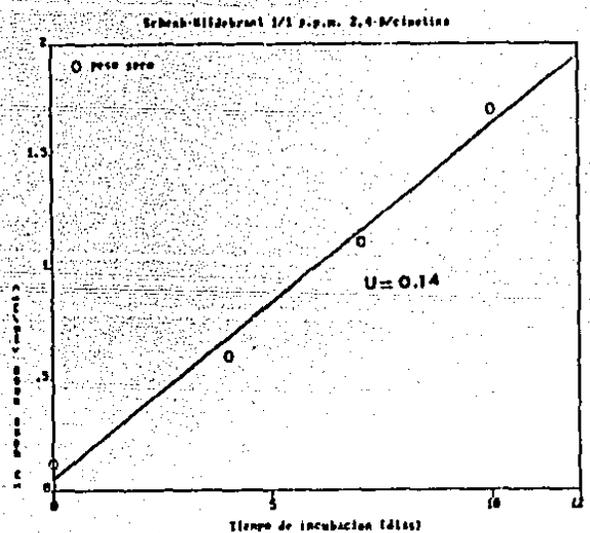
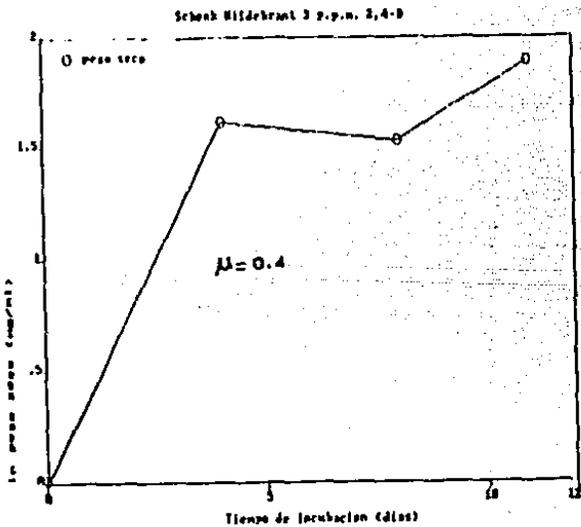
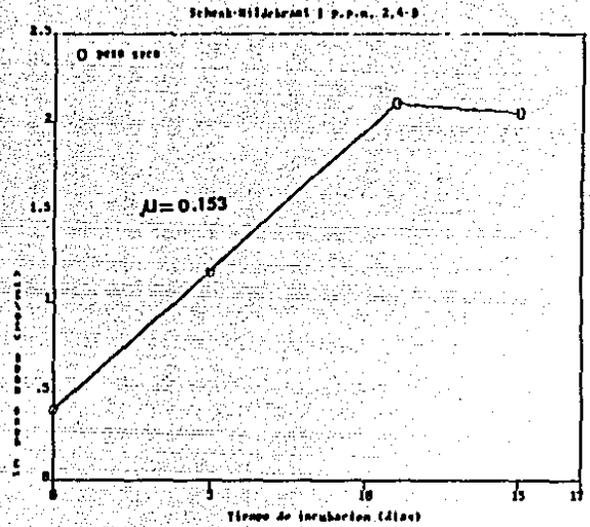
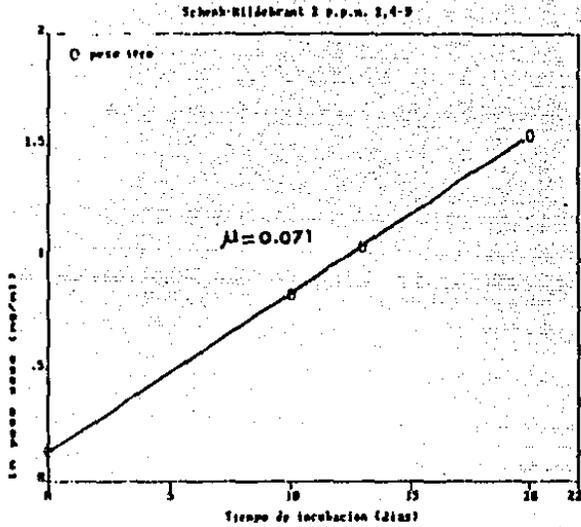


Fig. 23 Gráfica semilogarítmica de peso seco contra tiempo de incubación, en la biotransformación de los cultivos celulares.

TABLA 12. DETECCIÓN DE CARDIOTONICOS EN LAS CINETICAS DE BIOTRANSFORMACION DE DIGITOXINA, POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Cultivo	Crecimiento (días)	Cantidades relativas de cardiotónicos			
		digitoxina	gitoxina	Purpúrea glucósido A	B
SH-A1	0	+++++	-	-	-
	5	++++	-	++++	++++
	11	+++++	-	+++	++
	15	++++	-	+++	++++
SH-A2	0	+++++	-	-	-
	4	+++++	+ *	-	-
	7	+++++	++++	-	-
SH-A3	0	++++	-	-	+++
	4	++++	-	+++	++++
SHD	0	+++++	-	-	-
	4	++++	+ *	++++	++++
	7	+++	+ *	+++	+

\* mancha intensificada en luz U.V. 365 nm.

- : no detectado; +, ++, +++, +++++, ++++++: indican el incremento en la intensidad de la mancha correspondiente al cardiotónico.

La biotransformación de  $\beta$ -metil digitoxina, ensayada en los cultivos SH-A2 y SH-A3, mostró que este sustrato fue convertido por ambos cultivos a digitoxina, gitoxina, purpúrea glucósido A y purpúrea glucósido B.

Autores como Alfermann (1977), Furuya (1970), Heins (1978) y Reinhard (1980), han reportado la transformación de glucósidos cardiacos por cultivos celulares de *Digitalis*. Sin embargo, sólo Alfermann y Reinhard han hecho énfasis en la influencia que tiene el disolvente de disolución del sustrato sobre el crecimiento de los cultivos, según estos autores el metanol disminuye el crecimiento del cultivo de *D. lanata*. En el presente estudio, la adición de digitoxina en metanol, afectó el crecimiento de los cultivos, mejorando la velocidad de crecimiento en los cultivos SH-A1, SH-A3 y SHD, ésto se observó por la disminución de los valores de td, comparados con los valores de los cultivos sin digitoxina.

Furuya reportó en sus experimentos de transformación de digitoxina por cultivos celulares en suspensión de *D. purpurea*, que este sustrato es convertido a purpúrea glucósido A, B y gitoxina.

El purpúrea glucósido A, es obtenido por la glucosilación de la digitoxina, mientras que el purpúrea glucósido B es formado por la glucosilación de gitoxina, o por la  $16\beta$  hidroxilación del purpúrea glucósido A. Estos resultados fueron observados al analizar la fracción celular de su cultivo.

Reinhard y col., en cultivos celulares de *D. lanata*, encontraron que la digitoxina es glucosilada a purpúrea glucósido A, y que este último es hidroxilado en C-12 formando deacetil lanatosido C. La característica importante de su proceso, es que 90 % del producto se encontró en el medio, y el 10 % almacenado en las células.

En los cultivos SH-A1, SH-A3 y SHD, encontramos que éstos tienen la capacidad de transformar la digitoxina a purpúrea glucósido A y purpúrea glucósido B, y que sólo el cultivo SHD lo hace además a gitoxina. Mientras que el cultivo SH-A2, sólo transforma digitoxina a gitoxina. Estos resultados de transformación de la digitoxina a purpúrea glucósido A, B y gitoxina, concuerdan con los reportados por Furuya, con la diferencia que nosotros analizamos la transformación en el medio.

La transformación de  $\beta$ -metil digitoxina, ha sido ampliamente estudiada en cultivos celulares de *D. lanata* (Heins, 1978), no así en cultivos de *D. purpurea*, la cual se realizó en el presente trabajo, donde encontramos que este sustrato es transformado a digitoxina, gitoxina, purpúrea glucósido A y B.

#### 4.6. Biotransformación de digitoxina en medios de cultivo modificados.

Las figuras 24 y 25, muestran el efecto del fosfato y del ácido indol acético sobre el crecimiento de los cultivos SH-A2 y SH-A3 respectivamente. Observamos que ambas modificaciones en el cultivo SH-A2, reducen notablemente el crecimiento, en tanto que para el cultivo SH-A3, el cambio a AIA mejora el crecimiento alcanzando un valor de 11 mg/ml a los catorce días.

La tabla 13 resume los resultados de biotransformación de digitoxina en los medios modificados, en ella se observa que la transformación de digitoxina ocurre en pequeñas proporciones a purpúrea glucósido B, y una importante degradación de la digitoxina.

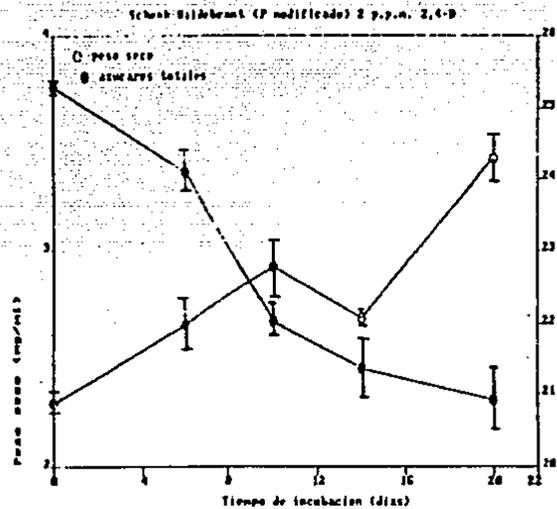
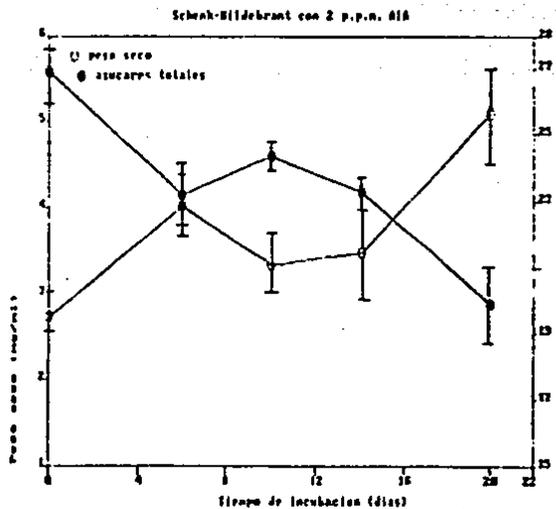


Fig. 24 Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los cultivos celulares SH-A2 en los medios modificados.

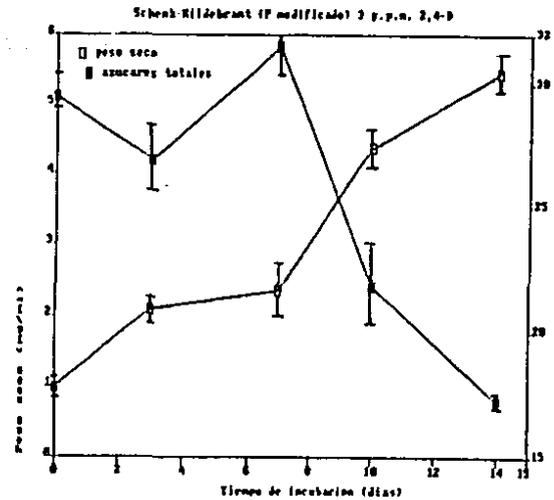
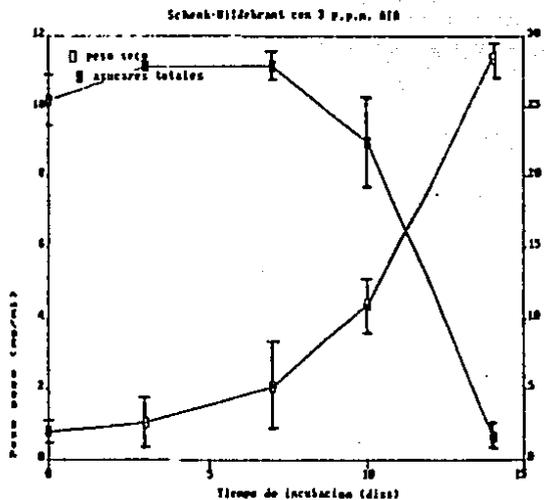


Fig. 25 Cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de los cultivos celulares SH-A3 en los medios modificados.

TABLA 13. DETECCION DE CARDIOTONICOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA EN LAS CINETICAS DE BIOTRANSFORMACION DE DIGITOXINA POR CULTIVOS CELULARES EN MEDIOS MODIFICADOS.

Cultivo	Crecimiento (días)	Cantidades relativas de cardiotónicos	
		Digitoxina	Purpúrea glucósido B
SH-A2 (AIA)	0	+++++	+
	6	+++	+++
	10	++	+++
	14	++	++++
	20	+++	++
SH-A2 (PO <sub>4</sub> )	0	+++++	+
	6	+++	+++
	10	++	++
	14	++	++
	20	+++	+++
SH-A3 (AIA)	0	+ *	+++
	3	+ *	++
	7	+ *	+++
	10	++	++
	14	-	-
SH-A3 (PO <sub>4</sub> )	0	+++++	+++
	3	+++	++++
	7	++	++
	10	+++	+
	14	-	-

\* mancha intesnsificada en luz U.V. 365 nm.

-: no se detectó; ++, +++, ++++ y +++++: indican el incremento en la intensidad de la mancha del cardiotónico.

Los resultados que esperábamos al modificar el medio de cultivo de acuerdo a lo reportado en la literatura, era una disminución del crecimiento y una mayor capacidad de biotransformación. Lo que observamos al modificar los cultivos SH-A2 con ácido indol acético y fosfatos, fue un retraso en el crecimiento de los cultivos, pero no una mayor biotransformación; por el contrario se presentó una degradación del sustrato. En cuanto al cultivo SH-A3 con 3 p.p.m. de ácido indol acético, observamos un mayor crecimiento y una pérdida en su capacidad de biotransformación.

De manera sucinta, los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de la influencia determinante que tienen las fitohormonas y su concentración sobre la inducción y crecimiento del tejido calloso. Sin embargo, a diferencia de otros autores, mostramos que la capacidad de síntesis de cardiotónicos influida también

por las fitohormonas, no se pierde durante el proceso de dediferenciación. Así mismo, nuestros resultados señalan que la concentración de la fitohormona 2,4-diclorofenoxiacético influye en la capacidad de los cultivos celulares de *D. purpurea* para hidroxilar y glucosilar a la digitoxina, lo cual no ha sido reportado.

## CONCLUSIONES

Los medios de cultivo Murashige-Skoog y Schenk-Hildebrant con 1, 2 y 3 p.p.m. de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético indujeron la formación de tejido calloso en cotiledones de *Digitalis purpurea*.

El medio Schenk-Hildebrant suplementado con 1 p.p.m de 2,4-D, y 1 p.p.m. de cinetina también estimuló la formación de tejido calloso. Las características de friabilidad de los tejidos obtenidos en los medios Schenk-Hildebrant, fueron determinantes en su selección para el establecimiento de cultivos de células en suspensión.

La concentración de 2,4-D influyó en forma importante sobre el crecimiento y la producción de cardiotónicos del tejido calloso. El tejido calloso inducido en el medio SH-A3 (3 p.p.m. de 2,4-D), presentó una velocidad de crecimiento lenta y un mayor contenido de cardiotónicos en relación a los tejidos inducidos en los otros medios de cultivo.

El comportamiento cinético de las células en suspensión, mostró que el cultivo SH-A3 se adapta mucho mejor a este sistema, razón por la cual, dicho cultivo sería el más adecuado para continuar los estudios de biotransformación a una escala mayor.

Los cultivos SH-A1, SH-A3 y SHD, presentaron la capacidad de biotransformar la digitoxina mediante una glucosilación en la tercera digitoxosa de la cadena lateral, así como de efectuar la hidroxilación en C-16 de la aglicona. El cultivo SH-A2 sólo fue capaz de hidroxilar la digitoxina en C-16, transformándola a gitoxina.

Cabe remarcar la importancia que tuvo el 2,4-D sobre la inducción de tejido calloso en *D. purpurea*, así como el efecto determinante de la concentración de esta auxina en el comportamiento cinético del crecimiento, acumulación y biotransformación en los cultivos de callo y células en suspensión.

Finalmente, este estudio se presenta como un modelo de experimentación para el establecimiento de cultivos celulares de *Digitalis* con la capacidad de efectuar reacciones de glucosilación e hidroxilación sobre cardiotónicos.

## BIBLIOGRAFIA

- Aberhart D.J., Lloyd-Jones J.G. and Caspi E., 1973. Biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 12, 1065-1071.
- Alfermann A.W., Boy H.M., Doller P.C., Hagedorn W., Heins M., Wahl J. and Reinhard E., 1977. Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures. In: *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 125.
- Allan E.J. and Fowler M.W., 1985. Biologically active plant secondary metabolites perspectives for the future. *Chemistry and Industry*, 17, 408-410.
- Bennet R.D., Sauer H.H. and Heftmann E., 1968. Progesterone metabolism in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 7, 41-50.
- Bowman W.C. and Rand M.J., 1975. *Textbook of pharmacology*. 2a. Ed. Blackwell Scientific Publication. Oxford, Londres.
- Burger A., 1964. *Química médica, química, bioquímica, acción terapéutica y farmacológica de las drogas naturales y sintéticas*. Tomo I. Ed. Aguilar. S.A. Madrid España.
- Caspi E. and Hornby G.M., 1968. Biosynthesis of plant steroles. III. Mechanism of saturation of ring B in pregnenolone during its conversion to digitoxigenin in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 7, 423-427.
- Capstack E., Rosin N.L., Blondin G.A. and Nes W.R., 1965. Squalene in *Pisum sativum*. Its cyclization to  $\beta$ -amyrin and labeling pattern. *J. Biol. Chem.*, 240, 3258.
- Constabel F., Shyluk J. and Gamburg O.L., 1971. The effect of hormones on anthocyanin accumulation in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Planta*, 96, 306-316.
- Charney W. and Herzog H.L., 1977. *Microbial transformation of steroids*. New York-London. Academic Press.
- Davies M.E., 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta*, 104, 50-65.
- Doller P.C., Alfermann A.W. and Reinhard E., 1977. Biotransformation von cardenoliden durch zellsuspensionskulturen von *Digitalis lanata* und *Thevetia nerifolia*. *Plant. Med.*, 31, 3-6.
- Doller V., 1978. Selection of plant tissue cultures with high content of serpentine and ajmalicine. In: *Production of Natural Compounds by Cell Cultures Methods*. Alfermann A.W. and Reinhard E. (eds.). Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung. MBH, Munich. pp. 95-108.

- Dougall D.K., 1980. Nutrition and metabolism. In: Plant Tissue Culture as a Source of Biochemical. Staba E.J. (ed.). CRC.Press, Boca Raton Florida. pp. 2158.
- Fowler M.W., 1982. Substrate utilization by plant cell cultures. J. Chem. Tech. Biotech., 320, 328-346.
- Fowler M.W., 1984. Plant cell culture: natural products and industrial application. Biotech. and Genetics Eng. Reviews., 2, 41-67.
- Fritsch W., Haede W. and Roschig H., 1974. J. Liebig's. Ann. Chem., 621.
- Furuya T., 1978. Biotransformation by cell culture. In: Frontiers of Plant Tissue Culture. Thorpe T.A. (ed.). University of Calgary. pp. 191-200.
- Furuya T., Hirotsani M. and Shinohara T., 1970. Biotransformation of digitoxin by suspension callus culture of *Digitalis purpurea*. Chem. Pharm. Bull., 18(5), 1080-1082.
- Furuya T., Kamaguchi K. and Hirotsani M., 1973. Biotransformation of progesterone by suspension cultures of *Digitalis purpurea* cultures cells. Phytochemistry, 12, 1621-1626.
- Furuya T., Syono K., Kojima H., Hirotsani M., Ikuta A., Hikichi M., Kamaguchi K. and Matsumoto K., 1975. Chemical constituents and transformation capacity of medicinal plant callus tissues. Proc. IV IFS, Ferment. Technol. Today, pp. 705-709.
- Garve R., Luckner M., Vogel E., Tewes A. and Nover L., 1980. Growth, morphogenesis and cardenolide formation in long-term culture of *Digitalis lanata*. Plant. Med., 40, 92-103.
- Goodman L.S. and Gilman A., 1982. Bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Interamericana, México.
- Graves J.M. and Smith W.K., 1967. Transformation of pregnenolone and progesterone by cultured plant cells. Nature (Lond.), 214, 1248-1249.
- Gunter Th.W. and Linde H.H.A., 1977. Cardiac glycosides: Prerequisites for the development of new cardiotonic compounds. Experientia, 33(6), 697-703.
- Gurny L., Vuagnat P., Gurny R. et Kapetanidis I., 1980. Cultures de cals de *Digitalis purpurea* L. 1re partie: Etude de la croissance par analyse de variance. Pharm. Acta. Helv., 55, 302.
- Gurny L. Tabacci R., Baund C. et Kapetanidis I., 1981. Cultures de cals de *Digitalis purpurea* L. 2e. parties: Etude des métabolites dérivés du stérane. Pharm. Acta Helv., 56, 49.

Hagimori M., Matsumoto T. and Kisaki T., 1980. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue cultures I. Determination of digitoxin content in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay. *Plant Cell Physiol.*, 21(8), 1391-1404

Hagimori M., Matsumoto T. and Obi Y., 1982. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture II. Effects of light and plant growth substances of digitoxin formation by undifferentiated cell and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. growth in liquid media. *Plant Physiol.*, 69, 653-656.

Hagimori M., Matsumoto T. and Obi Y., 1982. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture III. Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. growth in liquid media. *Plant Cell Physiol.*, 23(7), 1205-1211.

Hagimori M., Matsumoto T. and Obi Y., 1983. Effects of mineral salts, initial pH and precursor on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. growth in liquid media. *Agric. Biol. Chem.*, 47(3), 565-571.

Hagimori M., Matsumoto T. and Mikami Y., 1984. Jar fermenter culture of shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. using a revised medium. *Agric. Biol. Chem.*, 48(4), 965-970.

Heins M., 1978. Screening of *Digitalis lanata* plants and cell cultures for hydroxylation capacity. In: *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods*. Alfermann A.W. and Reinhard E. (eds). Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung. MBH, Munich. pp. 39.

Heins M., Wall J., Lerch A., Kaiser F. and Reinhard E., 1978. Preparation of  $\beta$ -methyl digoxin by hydroxylation of  $\beta$ -methyl digitoxin in fermenter cultures of *Digitalis lanata*. *Plant. Med.*, 33, 57-62.

Hirotsani M. and Furuya T., 1975. Metabolism of  $5\beta$ -pregnane-3,20-dione and  $3\beta$ -hydroxy- $5\beta$ -pregnan-20-one by *Digitalis* suspension cultures. *Phytochemistry*, 14, 2601-2606.

Hirotsani M. and Furuya T., 1977. Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoot from callus cultures of *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*, 16, 610-611.

Izuka H. and Naito A., 1969. *Microbial biotransformation of steroids and alkaloids*. University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, State College, Pennsylvania.

- Jones A., Veliky I.K. and Dzubco R.S., 1978. Biotransformation of cardenolides by plant cell suspensions cultures. I. Isolation and identification of periplogenine from cultures of *Daucus carota* incubated by digitoxigenin. *Lloydia*, 41(5), 476-487.
- Kamimura S. and Nishikawa M., 1976. Growth and alkaloids production of the cultured cells of *Papaver bracteatum*. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 907-911.
- Kartnig T., 1977. Cardiac glycosides in cell cultures of *Digitalis*. In: *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.44-51.
- Kato A., Kamazoe S., Iijima M. and Shimizu J., 1976. Continuous culture of tobacco cells. *J. Ferment. Technol.*, 54, 82.
- Kato A., Shimizu Y. and Nagai S., 1975. Effect of initial  $K_{la}$  on the growth of tobacco cells in batch culture. *J. Ferment. Technol.* 53, 744-751.
- Kato A., Shiozawa Y., Yamada A., Nishida K. and Noguchi M., 1972. A jar fermentor culture of *Nicotiana tabacum* L. cell suspension. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 899-902.
- Kinnerslay A.M. and Dougall P.K., 1980. Correlation between the nicotine content of tobacco plant and callus culture. *Planta*, 149, 205-206.
- Knobloch K.H. and Berlin J., 1981. Phosphate-mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*. *Plant. Med.*, 42, 167-172.
- Knobloch K.H. and Berlin J., 1983. Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. I. Comparison of enzymes activities and products accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2, 333-340.
- Korolkovas A. and Burckhalter J.H., 1979. *Compendio Esencial de la Química Farmacéutica*. Ed. Reverté. Barcelona España. pp. 389-395.
- Kruger G., 1974. *Can. J. Chem.*, 52(24), 4139-4142.
- Lindsey K. and Yoeman M.M., 1983. Novel experimental system for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: *Plant Biotechnology*. Mantell S.H. and Smith H. (eds). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 39-66.
- Luckner M., 1980. Expression and control of secondary metabolism. *Encyclopedia of plant physiology*. New Series. Vol.8. Secondary plant products. Bell E.A. and Charlwood B.V. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 23-63.

- Luckner M., 1984. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. 2a.Ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Lui J.H.P. and Staba E.J., 1979. Effects on precursors on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and roots cultures. *Phytochemistry*, 18, 1913-1916.
- Mantell S.H. and Smith H., 1983b. Cultural factors that influence secondary metabolites accumulations in plant cell and tissue culture. In: *Plant Biotechnology*. Mantell S.H. and Smith H. (eds)., Cambridge University Press, Cambridge. pp. 75-110.
- Mantell S.H. and Smith H. 1983a. *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 334.
- Martin S.M., 1980. Mass cultures system for plant cell suspensions. In: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. Staba J. (ed.). CRC. Press, Boca Raton, Florida. pp. 149-168.
- Morris P., Scragg A.H., Smart N.J. and Stafford A., 1985. Secondary product formation by cell suspension cultures. In: *Plant Cell Cultured a practical approach*. Dixon R.A. (ed.). IRL, Press, Oxford-Washington. D.C. pp. 127.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497.
- Noguchi M., Matsumoto T., Hirata Y., Yamamoto K., Katsuyama A., Kato A., Azechi S. and Kato K., 1977. Improvement of growth rates of plant cell cultures. In: *Plant Tissue Cultures and Its Biotechnological Application*. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 85-94.
- Petiard V., 1979. Production de metabolites par les cellules vegetales cultivées "in vitro". Exemple de filiere methodologique. In: *Production de substances naturelles par culture*. APRIA. Paris. pp. 5.
- Reinhard E., 1974. Biotransformation by plant tissue cultures. In: *Tissue Culture and Plant Science*. Street H.E. (ed.). Academic Press, New York. pp. 443.
- Reinhard E., Boy H.M. and Kaiser F., 1975. Umwandlung von digitalin glykosiden durch zellsuspensionskulturen. *Plant Med., Suppl.*, 163-168.
- Reinhard E. and Alfermann A.W., 1980. Biotransformation by plant cell cultures. In: *Advances in Biochemical Engg.* Fiechter A. (ed.). Springer-Verlag, Berlin.

- Routier J.B. and Nickell L.G., 1956. Cultivation of plant tissue. U.S. Patent. 2,747,334.
- Rucker W., Jentzsch K. and Wichtl M., 1976. Root differentiation and glycoside formation in tissues of *Digitalis purpurea* L. cultured *in vitro*. Z. Pflanzenphysiol., 80, 323-335.
- San Martin C.R., 1967. Farmacognosia descriptiva. Ed. Científica-Médica. Barcelona España. pp. 87-98.
- Sarkissian G.S. and Fowler M.W., 1984. Carbohydrate metabolism of plant cell cultures. In: Carbohydrate Metabolism of Cultural Cells Murga M.J. (ed.) Plenum Press. New York.
- Schenk R.V. and Hildebrandt A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50, 199-204.
- Shio I. and Ohta S., 1973. Nicotine production by tobacco callus tissue and effect of plant growth regulators. Agric. Biol. Chem., 37, 1857-1864.
- Smart N.J. and Fowler M.W., 1984. An airlift column bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspension. J. Experimental Botany, 35, 531-537.
- Sondheiner O. and Reinchtein T., 1956. Helv. Chim. Acta, 39, 1876.
- Staba E.J., 1962 Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. I. Nutritional requirements in tissue cultures of *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. J-Pharm. Sci., 51, 249-254.
- Staba E.J. and Lamba S.S., 1963. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. II. Growth of *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea* in suspension cultures. Lloydia, 20(1), 29-35.
- Stohs S.J. and Staba E.J., 1964. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures. IV. Biotransformation of digitoxigenin and related substances. J. Pharm. Sci., 54, 56-58.
- Stohs S.J. and El-Dlemy M., 1972. Pregnenolone and progesterone metabolism by cardenolide producing plants. Phytochemistry, 11, 2409-2413.
- Stohs S.J. and Rosenberg H., 1975. Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures. Lloydia, 38(3), 181-194.
- Tabata M., 1977. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: Plant Tissue Cultures and Its Bio-technological Application. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

- Tal B. and Golberg I., 1982. Growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cell in batch and continuous culture. *Plant. Med.*, 44, 107-110.
- Trease G.E. and Williams E., 1984. *Pharmacognosia*. Compañía Editorial Continental. S.A. de C.V. 1a. Ed. México. pp. 136-139.
- Villegas A., 1985. Métodos asepticos. En: *Fundamentos Teóricos - Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Villalobos V.M. (ed.). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Vogelmann H., Bischof A., Pape D. and Wagner F., 1978. In: *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods*. Alfermann A.W. and Reinhard E. (eds.). Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung, MBH, Munich. pp. 130.
- Wagner H., Blad S. and Zgainski E.M., 1984. Cardiac glycoside drugs. In: *Plant Drugs Analysis*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 195-211.
- Wagner F. and Vogelmann H., 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation secondary metabolites. In: *Plant Tissue Cultures and Its Bio-technological Application*. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 245-252.
- Yasuda S., Satoh K. and Ishii T., 1972. Studies on the cultural conditions of plant cell suspension cultures. *Proc. IV. IFS. Ferment. Technol. Today*, 697-703.
- Yoshikawa T. and Furuya T., 1979. Purification and properties of sterol: UDPG-glucosyltransferasa in cell cultured of *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*, 18, 239-241.
- Younken H.W., 1961. *Tratado de farmacognosia*. Ed. Atlanta. S.A. 1a. Ed. México. pp. 1020-1033.
- Zenk M.H., El-Shagi H. and Shulte U., 1975. Anthraquinone production by cell suspension culture of *Morinda citrifolia*. *Plant. Med. Suppl.*, 79-104.
- Zenk M.H., El-Shagi H., Arens H. Stockigt J., Weiler E.W. and Deus B., 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*. Barz W., Reinhard E. and Zenk M.H. (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.27-32