



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

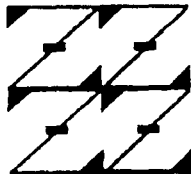
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**OBTENCION DE ALCALOIDES DE
INTERES FARMACOLOGICO DE
Erythrina americana A PARTIR
DE CULTIVO DE TEJIDOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JUAN MANUEL GUTIERREZ RODRIGUEZ

DIRECTOR: DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

**UNAM
FES
ZARAGOZA**



**LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION**

MEXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

PAGINACION DISCONTINUA

H. Jurado

PRESIDENTE

Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARÍN

VOCAL

DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

SECRETARIO

M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

SUPLENTE

Q.F.I. MA. DEL CARMEN NIÑO DE RIVERA OYARZABAL

SUPLENTE

M. en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ



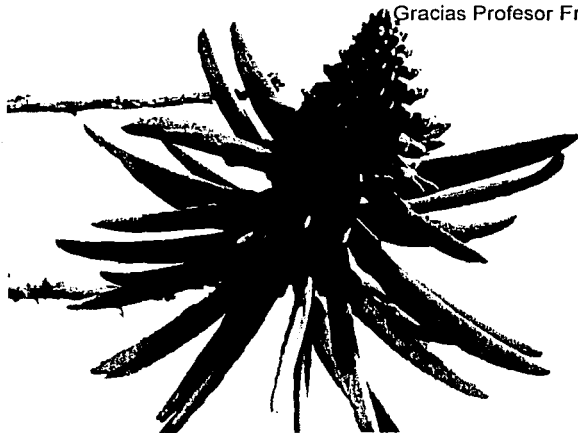
Agradecimientos

Quiero agradecer a tres personas, cuya enorme confianza hizo posible la realización de este trabajo de Tesis, al Dr. Marcos Soto Hernández (Investigador en el Programa de Botánica), el Dr. Angel Villegas Monter (Investigador en el Programa de Fruticultura), ambos miembros del Colegio de Postgraduados, y en forma muy especial agradezco a la Dra. Ma. del Rosario García M. (Profesor-Investigador en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo) por su constante apoyo e infinita paciencia durante todo el proceso de este trabajo.

También agradezco al M. en C. Arturo E. Cano Flores, Profesor-Investigador de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" U.N.A.M., por sus observaciones a este trabajo, las cuales ayudaron mucho para hacerlo más sustancioso.

Dedico este trabajo a una persona, cuyo ejemplo de vida y trabajo, trazó en mi vida un horizonte con valores como la honestidad, perseverancia y rectitud:

Gracias Profesor Francisco Oliva García



*"El ver un mundo en un grano de arena
y un cielo en una flor silvestre,
sostener el infinito en la palma de la mano
y la eternidad en una hora"*

*Los Augurios de Inocencia,
William Blake (1757-1827).*





En memoria

Antonia López Reina (1900-2000)

Manuel Gutiérrez Sánchez (1919-2001)

Esperanza López Velázquez (1926-1984)

Rosa López Velázquez (1929-1994)

Dr. Carl Edward Sagan (1934-1996)

Arturo Sánchez Esquivel (1975-1995)



Tabla de contenido

Lista de Tablas.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Anexos.....	v
Resumen.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	4
2.1. Aspectos relevantes en la obtención de metabolitos secundarios por cultivo de células vegetales.....	4
2.2. Los alcaloides del género <i>Erythrina</i> y su obtención por cultivo de tejidos.....	8
2.2.1. Generalidades sobre alcaloides.....	8
2.2.2. El género <i>Erythrina</i> y sus alcaloides.....	11
2.2.2.1. Taxonomía.....	11
2.2.2.2. Usos tradicionales.....	14
2.2.2.3. Fitoquímica.....	15
2.2.2.4. Farmacología de los alcaloides del género <i>Erythrina</i>	19
2.2.2.5. Obtención de alcaloides del género <i>Erythrina</i> , a través del cultivo de tejidos.....	21
3. Planteamiento del problema.....	23
4. Objetivos.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos particulares.....	25
5. Hipótesis.....	26
6. Parte experimental.....	27
6.1. Colécta del material vegetal.....	27
6.2. Metodología.....	27

6.2.1. Cultivo <i>in vitro</i>	27
6.2.1.1. Germinación.....	27
6.2.1.2. Formación de callo.....	28
6.2.1.3. Multiplicación del callo.....	29
6.2.2. Extracción de alcaloides.....	29
6.2.2.1. Alcaloides libres.....	29
6.2.2.2. Alcaloides liberados.....	30
6.2.3. Identificación.....	30
6.2.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	30
6.2.3.2. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.....	30
7. Resultados.....	32
8. Análisis de resultados.....	37
9. Conclusión.....	42
10. Referencias.....	43
11. Anexos.....	51

Lista de Tablas.

Tabla	Pag.
1. Compuestos obtenidos por cultivo de tejidos en un laboratorio durante 25 años de investigación.....	6
2. Biotransformaciones de compuestos obtenidos por cultivo de tejidos.....	7
3. Algunos grupos importantes de alcaloides derivados de aminoácidos..	10
4. Especies del género <i>Erythrina</i> en México.....	12
5. Nombres comunes de <i>E. americana</i> en México.....	13
6. Alcaloides Diénicos.....	17
7. Alcaloides Alquénicos.....	18
8. Contenido de alcaloides en las fracciones de semillas, cotiledones y callos.....	32
9. Porcentaje del contenido de alcaloides en semillas, cotiledones y en callos.....	33
10. Tiempos de retención relativos por Cromatografía de Líquidos de los alcaloides obtenidos.....	33
11. Estructura de los alcaloides identificados en el análisis.....	34
12. Alcaloides de la especie <i>E. americana</i> , identificados en este y en estudios previos.....	39

Lista de Figuras.

Figura	Pag.
1. Estructuras de alcaloides ejemplares.....	9
2. Distribución mundial del género <i>Erythrina</i>	11
3. Distribución del género <i>Erythrina</i> en mesoamérica.....	12
4. <i>Erythrina americana</i>	13
5. Esqueleto Eritrinano.....	16
6. Alcaloides Lactónicos.....	18
7. Mecanismo de acción de los relajantes musculares no despolarizantes.....	20
8. Extracción de alcaloides.....	31
9. Total de alcaloides hallados en cada uno de los tejidos	32
10. Estructuras de α - y β -eritroidina	34
11. Distribución de alcaloides en semillas, cotiledones y callos.....	35
12. Distribución de los alcaloides lactónicos en la fracción de alcaloides libres.....	36

Lista de Anexos.

Anexo	Pag.
A. Medio de cultivo modificado Murashige-Skoog.....	51
B. Preparación del reactivo de Dragendorff.....	51
C. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto hexánico (semillas).....	52
D. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (semillas).....	53
E. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (semillas).....	54
F. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (cotiledones).....	55
G. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (cotiledones).....	56
H. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (1^{er} subcultivo).....	57
I. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (1^{er} subcultivo).....	58
J. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (3^{er} subcultivo).....	59
K. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (3^{er} subcultivo).....	60
L. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (5^o subcultivo).....	61
M. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (5^o subcultivo).....	62
N. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (7^o subcultivo).....	63
O. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (7^o subcultivo).....	64

Resumen.

Los alcaloides tetracíclicos del tipo eritrinano del género *Erythrina* (Leguminosae) han llamado la atención por sus efectos en el sistema nervioso periférico (relajante muscular) y sistema nervioso central. En México, las propiedades medicinales atribuidas a *E. americana* son el uso de la raíz como sudorífico, las infusiones preparadas con las flores se emplean para afecciones del tórax y la corteza es conocida como purgante y diurético. También se ha empleado como agente hipnótico y narcótico. Con el propósito fundamental de evaluar el potencial farmacológico de los alcaloides, se consideró como parte preliminar, analizar una alternativa para la obtención de los principios activos derivados de *Erythrina americana* a partir de varios subcultivos de tejidos de callo. Las fracciones de alcaloides libres y conjugados se identificaron por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, permitiendo establecer diferencias importantes en las proporciones de los alcaloides a través de varios subcultivos. Se detectaron estructuras no identificadas en esta especie.

La mayoría de los subcultivos presentaron un bajo contenido de alcaloides en comparación con los cotiledones y las semillas. Se detectó la presencia de los alcaloides lactónicos α - y β -eritroidina en callos, ambos metabolitos se encontraron en mayor proporción en comparación a los alcaloides restantes de los tejidos analizados, estos resultados contrastan notablemente con los descritos en un estudio previo al no ser detectados.

1. Introducción

Las plantas contienen una gran variedad de compuestos orgánicos que han sido usadas en varias formas por el hombre desde los primeros días de la historia. Estas sustancias incluyen aminoácidos, terpenoides, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros. El empleo de esas sustancias para la producción de productos farmacéuticos, insecticidas, herbicidas, tinturas, aceites, lubricantes, jabones, fragancias, etc., se expandió considerablemente durante los últimos 60-70 años, principalmente, debido a los avances de la tecnología química que permitió el aislamiento, purificación, elucidación estructural y síntesis de compuestos con especificidad bioactiva.

Durante ese período de avances tecnológicos surgieron dos problemas potenciales: a) dificultad de síntesis de algunas sustancias aisladas debido a problemas técnicos o a costos prohibitivos, y b) el agotamiento de la fuente natural por la producción continua del compuesto deseado, lo cual requirió de una constante cosecha del material vegetal. Alternativamente, el cultivo de una especie vegetal pudo verse afectada debido a condiciones ambientales, ecológicas, climáticas, tiempo de propagación, o necesidad de suelo agrícola adecuado para su producción.

Mientras tanto, se fueron desarrollando métodos que tomaron en cuenta células vegetales para obtener cultivos estacionarios o en suspensión. Tales investigaciones se basaron en la idea de que cada célula viviente de un organismo pluricelular puede ser capaz de desarrollarse individualmente en las condiciones externas apropiadas. Actualmente, el uso de la técnica de cultivo *in*

in vitro permite producir células y tejidos de organismos "madre" para subsecuentemente ser estudiadas como unidades biológicas separadas.

Adicionalmente, el cultivo de células vegetales se ha convertido en un instrumento esencial de la manipulación genética de plantas. Recientemente, se están desarrollando técnicas de micropropagación a escala comercial para la producción rápida de un gran número de especies vegetales; asimismo, para la producción industrial de compuestos característicos de origen vegetal en cantidades significativas de metabolitos útiles como son antimicrobianos, alcaloides antitumorales, saborizantes, edulcorantes, vitaminas, insecticidas, enzimas, etc.

Para lograr acumular una gran cantidad de esos materiales, esta tecnología se basa en los procesos para la producción de sustancias biofarmacéuticas por cultivo de bacterias y hongos, confirmando ser una alternativa de obtención en vez de utilizar la planta completa. Este enfoque determinó una serie de ventajas: a) la producción de biomasa es más rápida que en la planta misma, b) las condiciones nutricionales y ambientales de óptimo crecimiento pueden ser controladas más fácilmente que en la planta progenitora, y c) el cultivo de células vegetales es fácilmente manipulable para producir compuestos análogos, con tal vez mayor actividad fisiológica. Sin embargo, para hacer que la producción de compuestos biológicamente activos por cultivo de tejidos sea confiable, un número de puntos necesitan ser cubiertos. Entre otros, que el compuesto deseado debe tener un alto valor comercial para garantizar el largo tiempo de experimentación invertido, para iniciar un sistema de cultivo de tejidos vegetales y para la selección de líneas celulares de alta productividad.

Entre todas las sustancias candidatas para, ser obtenidas por esta técnica y ser explotadas con fines de investigación y comercialización, sobresale un grupo de compuestos estructuralmente heterogéneos; cuya distribución se localiza solamente en un pequeño grupo de organismos; de hecho, algunos de estos

productos han sido identificados en solo algunas variedades de una misma especie. Estas sustancias son conocidas como metabolitos secundarios, los cuales no solo se han detectado en plantas y microorganismos, sino también, algunos distribuidos en el reino animal y organismos marinos.

Los metabolitos secundarios, primero como preparación de extractos crudos, y luego, como sustancias puras, han resultado poseer las características necesarias para la investigación, debido a su gran importancia comercial para ser aprovechados de forma muy diversa, como fármacos (esteroides, alcaloides o glucósidos), saborizantes, colorantes naturales (antocianinas), fragancias (aceites esenciales), tintes, gomas (caucho natural), herbicidas e insecticidas.

Aunque estos compuestos se relacionan mucho con las plantas, solamente una pequeña cantidad de ellas esta siendo analizada para la obtención de metabolitos secundarios, y en menor número son sometidas al cultivo de tejidos para obtener los productos naturales importantes. Sin embargo, no sorprende que el aislamiento y la caracterización de nuevas estructuras continua sin cesar. De hecho, el escrutinio para extraer de las plantas nuevos compuestos con actividad biológica, aún parece ser un campo promisorio hoy en día, junto con las ventajas que proporciona la técnica de cultivo de tejido en el análisis de estas sustancias.

Con lo antes expuesto, en este trabajo se pretende desarrollar una alternativa a través del cultivo de tejidos, para la obtención de metabolitos secundarios que podrían tener aplicación en el campo de la medicina como fármaco opcional en la relajación muscular. Específicamente, se estudiará la obtención de alcaloides del tipo eritriano, empleando la técnica del cultivo de tejidos utilizando como materia prima, semillas de la especie *Erythrina americana*.

2. Marco teórico

2.1. Aspectos relevantes en la obtención de metabolitos secundarios por cultivo de células vegetales

De naturaleza química extraordinariamente diferente, las sustancias vegetales presentan propiedades también muy diversas, aunque su papel fisiológico en la planta muchas veces no es del todo conocido. Hay dos categorías de productos aislados de las plantas: los metabolitos llamados primarios y los metabolitos secundarios.

Los primeros, mas abundantes, son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta¹, se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y su explotación es relativamente económica².

Con los metabolitos secundarios aún no queda bien determinado su función en el metabolismo de la planta. Se ha propuesto que en algunos casos, son el resultado de un proceso evolutivo vegetal que confiere mayor aptitud de sobrevivencia a las especies vegetales que los presentan, pero actualmente se confirma un papel ecológico importante³⁻⁴.

Los metabolitos o productos secundarios no tienen un papel definido en los procesos de respiración, asimilación, transporte, a diferencia de los metabolitos primarios como los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos⁵.

Las investigaciones sobre la explotación potencial de las células vegetales, para la producción de metabolitos secundarios, han tenido un desarrollo mucho más tardío, en comparación a lo que al cultivo de tejidos se refiere. Este retraso se ha debido, en parte, a los resultados contradictorios en la capacidad de biosíntesis en las células cultivadas. Los investigadores supusieron entonces que algunos compuestos, que en la planta se acumulan principalmente en órganos particulares bien diferenciados, no pueden ser producidos por células en estado no diferenciado en cultivo. Esta idea contribuyó en gran parte a la falta de interés incluso al abandono de ciertos equipos en lo que respecta a cultivos de células vegetales.

Solo a partir de 1976, quedó definitivamente resuelto este problema gracias a los trabajos de Zenk⁶ en Alemania, quién demostró que la naturaleza y la cantidad de metabolitos producidos son muy diversos de un cultivo a otro, aún con células procedentes de una misma planta. Posteriormente, esto quedó confirmado por numerosos estudios realizados a la postre, como lo demuestra recientemente la presencia de alcaloides quinolínicos de importancia comercial, en cultivos celulares de varias especies de *Cinchona*⁷; así mismo, la biosíntesis de alcaloides morfínicos fue inducida en medios de cultivo aún cuando se cuestionaba que esto fuera posible⁸; o también se puede hablar de la hiosciamina y escopolamina de gran importancia médica, que se obtuvieron aplicando esta técnica de cultivo a partir de líneas celulares de *Hyoscyamus niger*⁹. El adelanto obtenido con esta técnica, en lo que respecta a la producción de metabolitos secundarios, se ve reflejado en la tabla 1, en donde se muestran metabolitos obtenidos durante 25 años de investigación.

No obstante, no todo lo que se refiere a la producción de estas sustancias por esta técnica es lo deseable o esperado. Existen algunos aspectos en la expresión del metabolismo secundario de las células vegetales durante el cultivo, que promueven investigaciones más profundas al respecto.

Tabla 1. Compuestos obtenidos por cultivo de tejidos en un laboratorio durante 25 años de investigación¹⁰.

Tipo de compuesto	Cultivo	Compuesto aislado
Terpenoide	<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosides Rb1, Rg1
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cicloartenol
	<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxina
Alcaloide	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina, anabacina
	<i>Papaver spp.</i>	Morfina, codeína, protopina
	<i>Coptis japonica</i>	Berberina, coptisina
	<i>Coffea arabica</i>	Cafeína
Cumarina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Escopoletina
Flavonoide	<i>Sofora angustifolia</i>	1-maaquiaina
Antraquinona	<i>Digitalis lanata</i>	7-metilpurpurina
Glucosinolato	<i>Wasaba japonica</i>	Sinegrina

Uno de esos aspectos y en el que la experimentación se ocupa en resolver, se presenta cuando al pretender establecer una línea celular de alto rendimiento, surgen consideraciones tales como la estabilidad genética del cultivo. Para poder explicar esta problemática, es necesario entender que el metabolismo de una planta, sea primario o secundario, es "un todo" que se integra en el programa de desarrollo de una planta, el cual se encuentra estrictamente controlado en su expresión genética. Esto implica que cada uno de los pasos del metabolismo se expresarán solamente en un estado y tiempo de desarrollo definido en la planta. Si se restringe esa expresión a unas células especializadas y a una diferenciación morfológica, como lo que se hace en el cultivo de tejidos, esto reprimirá una parte de ese programa de desarrollo, ocasionando una ruta metabólica distinta en ocasiones¹¹, de ahí que se vuelva importante tomar en consideración estos aspectos en el cultivo *in vitro* de células. Este fenómeno se ha observado en algunos metabolitos producidos en cultivos de células, en donde se han determinado epoxidaciones, esterificación, glicosidación, hidrólisis, isomerización, metilación, reducción de grupos funcionales, entre otros, ejemplos de estos cambios se muestran en la tabla 2.

Por otro lado, a menudo las secuencias y controles involucrados para la inducción en la formación de metabolitos secundarios son desconocidos; por lo que los métodos empleados para este propósito, son el resultado de repetidos ensayos hasta lograr diseñarlos satisfactoriamente. De este modo, un número de

reglas generales en la acumulación de metabolitos secundarios empiezan a ser descritas; como sería un cambio en el caso de reguladores de crecimiento (citocininas, auxinas) que tienden a estimular la producción de estas sustancias, o también un cambio en las condiciones del cultivo que provoque situación de estrés en las células, por ejemplo, el remover de todo el cultivo, otros componentes que no sean fuentes de carbono¹².

Tabla 2. Biotransformaciones de compuestos obtenidos por cultivo de tejidos¹⁰.

Tipo de compuesto	Cultivo	Substrato	Producto
Terpenoide	<i>Nicotina tabacum</i>	Linalul	8-hidroxilinalul, Acetato de linalul
	<i>Cannabis sativa</i>	Geraniol	Citral, Nerol
	<i>Mentha ssp.</i>	Pulegona	Isomentona
	<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxina	Glucósido de purpurea B
	<i>Nicotina tabacum</i>	Pregnenolona	Palmitato de pregnolona
		Progesterona	Palmitato de progesterona
	<i>Panax ginseng</i>	Panaxatriol	3 β - y 6 β -Glucósido de panaxatriol
Alcaloide	<i>Papaver somniferum</i>	(R)-Reticulina (-)-Codeína	(S)-Queilantifolina (-)-Codeína
Acido	<i>Aconitum japonicum</i>	Fenilacetico	β -Glucósido
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Trópico	β -Glucósido

Aunque no existe una respuesta expedita para estas cuestiones, la forma con la que la biotecnología salva estos obstáculos, es aplicando tres estrategias que son: (1) Iniciar un "pool" de muchos callos provenientes de diferentes individuos y diferentes órganos, de una sola especie; (2) probar esos callos en diferentes medios de cultivo; y (3) realizar un análisis por escrutinio para determinar, de entre las células clones, las variedades más productivas¹¹.

2.2. Los alcaloides del género *Erythrina* y su obtención por cultivo de tejidos

2.2.1. Generalidades sobre alcaloides.

Los alcaloides son los constituyentes herbales más usados durante siglos por el hombre; utilizados desde dilatadores de la pupila por las damas del renacimiento con la *Atropa belladonna* (atropina), hasta psicotrópicos como fue con la *Cannabis sativa* (1-tetrahydrocannabinol), utilizada desde el 3000 antes de Cristo. Otros alcaloides se emplearon por todo el mundo, como venenos en la cacería y para cometer homicidios. Ejemplo de ello, tenemos la estrofantidina del *Strophanthus* en Africa, el látex del árbol *Antiaris toxicaria* en Java, la acointina del *Aconitum napellus* en Europa y Japón¹³. Actualmente, más de 4000 nuevas estructuras químicas de alcaloides han sido descritas, y de estas un número sustancial se han identificado para ser usadas por el humano¹⁴, lo que nos habla de una importante actividad científica alrededor de estas sustancias.

Los alcaloides son metabolitos secundarios que contienen en su estructura átomos de nitrógeno secundarios, terciarios, o cuaternarios. Estos son metabólicamente activos y juegan un papel importante en la fisiología de plantas y otros organismos. Repeler y disuadir a depredadores y patógenos, son algunas de las funciones de los alcaloides en los vegetales.

Los alcaloides se clasifican en tres grupos, ampliamente aceptados: alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los verdaderos alcaloides son derivados de aminoácidos y muestran una amplia variedad de actividad fisiológica. Los protoalcaloides son simples aminas donde el nitrógeno del grupo aminoácido, no se encuentra en un anillo heterocíclico, por ejemplo la mescalina y la efedrina. Los pseudoalcaloides, no son derivados de los

aminoácidos, ejemplo de ello, los alcaloides esteroideos (conesina) y los alcaloides de purina (cafeína) (figura 1).

La mayoría de los alcaloides son sintetizados en las plantas, a partir de uniones covalentes de unidades de acetato y terpenos, a través de reacciones como hidroxilaciones aromáticas, metilaciones, etc. A estas unidades se adicionan otros compuestos tales como aminoácidos, núcleos de purina, amonio, o alquilaminas, para dar lugar a los alcaloides derivados de esos compuestos.

Los alcaloides se agrupan de acuerdo a los aminoácidos precursores o a las rutas biosintéticas de donde provienen. En la tabla 3 se muestran aminoácidos precursores de algunos grupos importantes de alcaloides¹⁴. En este estudio, resulta de interés, aquellos alcaloides, que por su ruta biosintética, son derivados de la fenilalanina.

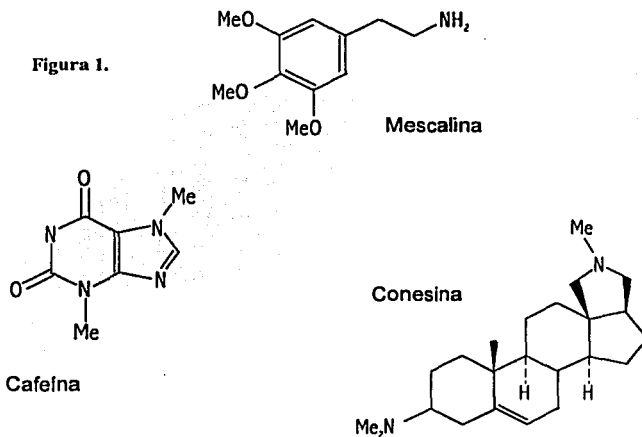


Tabla 3. Algunos grupos importantes de alcaloides derivados de aminoácidos¹⁴.

Ornitina

Tropano, pirrolidina, nicotina, pirrolizidina

Lisina

Quinolizidina, sedum, lobelina, piperidina, anabasina, peletierina, litrina

Tirosina y Fenilalanina

Morfina, isoquinolina, eritrina, alcaloides de las *Amarillidaceae*, securinina, betanidin, melanina, mescalina, efedrina, pelotina, aporfina, pavina, protopina, protoberdina, rocadina, benzofenantridina, dibenzopirrocolina, morfinandienona, cularina

Triptofano

Indol, alcaloides del género *Rauwolfia*, estricnina, ergot, diquetopiperazina, chinchona, yohimbina, pirrolnitrina, secodina, carbazol, fisostigmina, iboga, pandolina, corinanto, melodinus, camptotecina, ajmalicina, sarpagina, β -carbolina

Histidina

Alcaloides del Imidazol

En el grupo de los derivados de la fenilalanina, encontramos a los alcaloides de eritrina, que desde las décadas de los cuarenta y cincuenta, varios investigadores estudiaron y señalaron, una importante actividad farmacológica del tipo curariforme¹⁵⁻¹⁷. Estas sustancias se encuentran en los extractos obtenidos de diversas especies de vegetales del género *Erythrina* y que destacan por su amplia distribución e innumerables aplicaciones que se le han atribuido en México y en algunas partes del mundo; en cuyo contexto se desprende el presente trabajo.

Como información adicional, la actividad curariforme se deriva del modelo farmacológico producido por un veneno conocido con el nombre de curare. Los fármacos que poseen esa actividad, pueden producir relajación muscular esquelética, específicamente interfieren en la acción neurotransmisora de la acetilcolina en la placa motora sobre el músculo esquelético (bloqueadores neuromusculares). El curare es un extracto complejo de numerosos ingredientes, que se extrae del *Chondrodendro tomentosum*, utilizado por los indígenas amazónicos jíbaros, para la caza y la guerra. Actualmente, se conoce que el fármaco responsable de esa actividad en esta planta, es la d-tubocuradna¹⁸.

2.2.2. El género *Erythrina* y sus alcaloides

2.2.2.1. Taxonomía

El género *Erythrina* (del griego erithros [*ἔρυθρος*]: rojo, debido al color rojo de las flores) pertenece a la subfamilia Papilionoidae en la familia de las Leguminosas (Fabaceae). Entre otros vegetales que pertenecen a esta subfamilia, tenemos al frijol (*Phaseolus vulgaris*), garbanzo (*Cicer orientinum*) y la lenteja (*Lens esculenta*).

Se conocen cerca de 115 especies del género *Erythrina*, comprendiendo una gran diversidad de variaciones morfológicas y ecológicas¹⁹. El mayor número de especies se encuentra localizado en el continente americano (70 especies), 31 especies se ubican en África y 12 especies en Asia y Oceanía. En la figura 2, se muestra la distribución mundial de este género y en la figura 3, su distribución en mesoamérica.

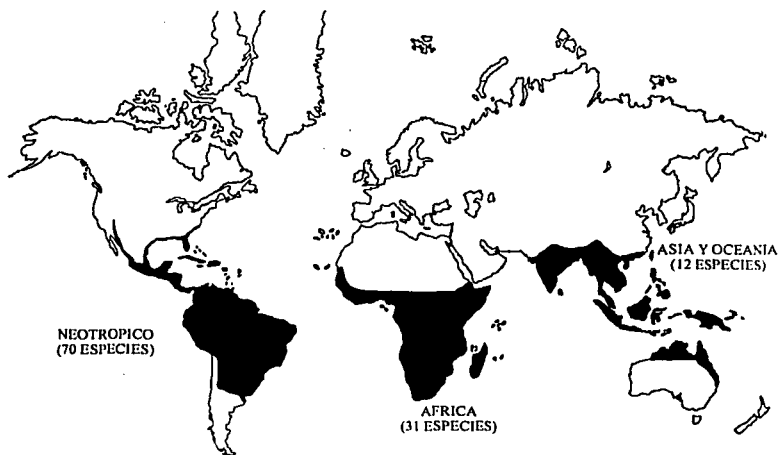


Figura 2. Distribución mundial del género *Erythrina*.

Fuente: Neil, D. A. The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation.

En: Westley, S. B. y Powell, M. H. comp. Hawaii: NAFTA, 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En México se han identificado alrededor de 27 especies, pero probablemente existen algunas especies no identificadas taxonómicamente en las zonas tropicales, en la tabla 4 se presentan las especies de este género en nuestro país. Su gran distribución justifica la existencia de varios nombres comunes, en algunos estados de la República. Se le conoce a la especie *E. americana* como colorín, chontal, cocchoquelite, chicolote, madre del cacao, patol, pito, sompantle^{20,21}. En la tabla 5 se puede apreciar la gran diversidad de nombres que recibe una sola especie de este género en el país.

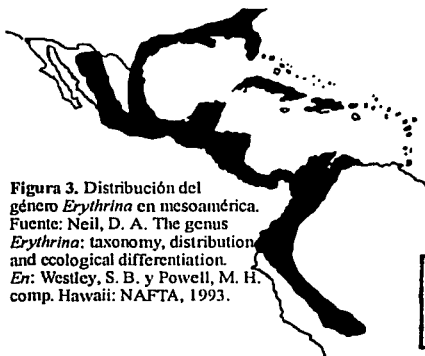


Figura 3. Distribución del género *Erythrina* en mesoamérica.
Fuente: Neil, D. A. The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation. En: Westley, S. B. y Powell, M. H. comp. Hawaii: NAFTA, 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

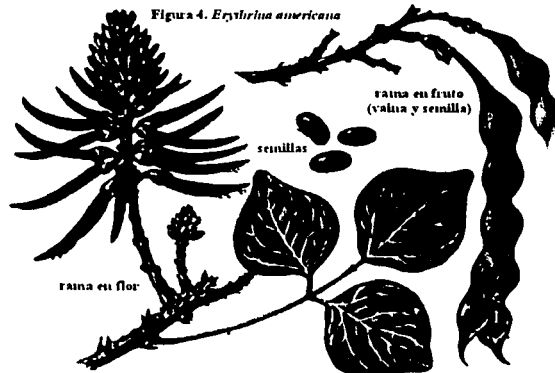
Tabla 4. Especies del género *Erythrina* en México (27 especies y 3 subespecies)²⁰.

<i>E. breviflora</i>	<i>E. lanata subsp. lanata</i>
<i>E. petraea</i>	<i>E. lanata subsp. occidentalis</i>
<i>E. oaxacana</i>	<i>E. lanata subsp. calvenscens</i>
<i>E. batolobium</i>	<i>E. goldmanii</i>
<i>E. montana</i>	<i>E. caribacea</i>
<i>E. leptorhiza</i>	<i>E. folkersii</i>
<i>E. horrida</i>	<i>E. Tuxtiana</i>
<i>E. sousae</i>	<i>E. chiapasana</i>
<i>E. herbacea susp. herbacea</i>	<i>E. tajumicensis</i>
<i>E. herbacea susp. nigrorosea</i>	<i>E. florenciae</i>
<i>E. standleyana</i>	<i>E. berenices</i>
<i>E. flabeliformis</i>	<i>E. americana</i>
<i>E. coralloides</i>	<i>E. berteroaana</i>
<i>E. aff. Coralloideeds</i>	<i>E. mexicana</i>
<i>E. pudica</i>	<i>E. oliviae</i>

Tabla 5. Nombres comunes de *E. americana* en México (el lenguaje, cuando se menciona, es dado entre paréntesis²¹).

Nombre	Región	Nombre	Región
Alcaparra	Tabasco	Pipal	Chiapas
Colorín	Puebla, México, Morelia	Pito	Veracruz
Chak-mol-che (mayán)	Yucatán	Purenchecua	?
Chocolín	Hidalgo	Puregue	Michoacán
Chotza (otomí)	Hidalgo	Quemite	San Bartolo, Hidalgo
Colchoquelite	?	Quimite	San Bartolo
Coralina	Baja California	Sompantle	Valle de México
Demti (otomí)	Hidalgo	Sumpantle	Valle de México
Equimite	Puebla	Te'batai (otomí)	?
Iquemite	Puebla	Tlalni (tononaca)	?
Jiquimite	Puebla	Tsejch (mixe)	San Juan
Lakatilá (tononaca)	Norte de Puebla	Tsizch	?
Lak'tanga (tononaca)	?	Tzinacancuahuitl (nahuatl)	?
Lakatilo (tononaca)	Sierra norte de Puebla	Tzompancuahuitl (nahuatl)	?
Li-pa-shcua (chontal)	Oaxaca	Tzompantli	?
Madre brava	?	Tzompantli (nahuatl)	Tetelcingo, Morelos
Madre del cacao	?	Xoyo (mayán)	?
Madre chontal	Tabasco	Zompantel	?
Ma-ja-flu (chinanteco)	Oaxaca	Zumpantle (nahuatl)	?
Parencsuni (tarascan)	Michoacán	Zompantli (nahuatl)	Yucatán
Patol	?		
Pichoco	El Tajín, Veracruz		

Este género se encuentra representado por árboles, arbustos y hierbas perennes con un largo tallo, subterráneo y leñoso. Presenta hojas trifoliadas con cáliz corto, la corola es roja o anaranjada; el fruto es una legumbre bivalvada de color y tamaño variable; las semillas son comúnmente rojas, café o negras²² (figura 4).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2.2.2. Usos tradicionales

Cabe hacer notar que en los últimos años, ha llamado la atención el conocimiento empírico que existe sobre la gran diversidad de usos que se le ha dado a algunas especies del género; asimismo, se han realizado numerosos estudios de diversas especies con la finalidad de aprovechar su potencial derivado de la versatilidad, aceptación y popularidad que se le atribuye en muchas partes del mundo²³.

Por mencionar algunas de esas aplicaciones, diremos que en agronomía, el árbol se asocia a otros cultivos para proporcionar sombra y afectar el rendimiento del cultivo principal; sin embargo, esta asociación puede representar una competencia por los nutrientes en el suelo, pero en algunos casos esto sería una ventaja cuando se trata de suelos con baja fertilidad, dado que este tipo de vegetales se caracterizan por ser fijadores del nitrógeno^{21, 24-26}.

Como alimento, tanto para humanos como para animales de corral, los pétalos y semillas son utilizados de diversas maneras en muchos países de latinoamérica^{20, 27-29}. Por otro lado, muchas especies de *Erythrina* son usadas como plantas ornamentales en calles, parques y jardines, llegando incluso a ser emblemas en algunas ciudades de otros países.

Como uso medicinal, podemos citar que se utiliza como purgante y en el tratamiento de la disentería en la India, empleando las hojas y la corteza; también se usa para estimular la menstruación y la lactancia²⁶. En Asia y América Central, la corteza se emplea como laxante, diurético, expectorante, antimalárico, en casos de asma y como sedante. En México se le atribuyen las propiedades de sudorífico, purgante, diurético e incluso como veneno para eliminar animales nocivos. También se ha llegado a emplear como agente hipnótico, narcótico y sedante; en algunos estados del país se le atribuyen efectos tranquilizantes^{20, 25, 27}. En otros países de América latina se emplea para

enfermedades de la piel, para inflamación de la vejiga y para contrarrestar la irritación en los ojos²⁸.

2.2.2.3. Fitoquímica

En general la investigación fitoquímica sobre este género se ha enfocado a la caracterización estructural de sus constituyentes o productos naturales²⁹. Así se han identificado alcaloides y otros metabolitos de naturaleza diversa: saponinas, flavonoides con propiedades antimicrobianas y fitoalexinas³⁰⁻³⁴. Otras investigaciones incluyen el reconocimiento de lectinas y evaluaciones enzimáticas de los inhibidores de proteasas³⁵.

Desde hace algunos años, los alcaloides de *Erythrina* han sido objeto de una intensa investigación en la que se ha incluido aspectos relacionados con su biosíntesis e identificación de nuevas estructuras³⁶⁻³⁹; todo esto debido a los primeros, hallazgos de la actividad curariforme o de relajante muscular^{40, 41}. Millinton *et al.* en Illinois han examinado especies americanas,⁴² a sí como, los grupos de Jackson en Cardiff^{43, 44}. Barton en Londres^{45, 46}, Ito en Japón⁴⁷, Singh y Chawla en la India⁴⁸, han estudiado especies de todo el mundo. Específicamente, Hargreaves⁴⁹ y Games⁵⁰ revisaron la presencia de alcaloides en especies de América, Africa, Asia, Polinesia y Australia, encontrando que existen diferencias significativas en la presencia y concentración de alcaloides entre las distintas especies del género.

Se sabe que los alcaloides presentes en las especies del género *Erythrina*, se distribuyen en toda la planta y por lo general, se acumulan en las semillas. Sin embargo, existen estudios que señalan a las hojas jóvenes de la planta, como los sitios de síntesis de estos metabolitos⁵¹. De cualquier manera, los estudios se han centrado en el análisis de las semillas, que normalmente los contienen en una concentración del 0.05 al 0.10% en peso seco, aunque también se han aislado de hojas, corteza, tallos, raíces y flores⁵².

Los alcaloides se encuentran en dos formas en la planta: libres o conjugados formando glucósidos. Según el procedimiento de Folkers y Unna⁴⁰, se pueden obtener a partir del material vegetal previamente desengrasado, seguido de una extracción con metanol. Del residuo vegetal se obtienen los alcaloides libres y del residuo del extracto metanólico se obtienen los alcaloides liberados por una hidrólisis ácida.

Estructuralmente, los alcaloides aislados del género *Erythrina* son del tipo isoquinolínico y contienen como esqueleto base al denominado eritrinano (figura 5), que es una espiroamina tetracíclica. Se han clasificado con base a su estructura en tres grupos: alcaloides diénicos, alcaloides alquénicos y alcaloides lactónicos. A continuación en las tablas 6 y 7, se muestra una lista de estos compuestos, a si como sus estructuras.

Figura 5. Esqueleto Eritrinano

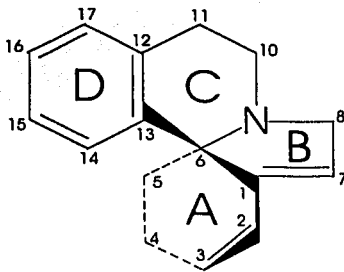
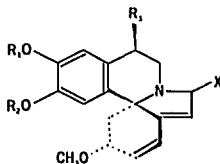


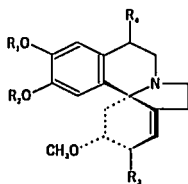
Tabla 6. Alcaloides Diénicos⁵³.



	Alcaloides	R ₁	R ₂	R ₃	X
1	Erisotrina	Me	Me	Me	H
2	Erisotramida	Me	Me	Me	-O
3	Eritravina	Me	Me	H	H
4	Eritralina		-CH ₂	Me	H
5	8-Oxoeritralina		-CH ₂	Me	-O
6	Eritrocarina		-CH ₂	H	H
7	Erisolina	Me	OH	H	H
8	Erisonina	OH	Me	H	H
9	Erisodina	OH	Me	Me	H
10	Erisovina	Me	OH	Me	H
11	8-Oxoerisovina	Me	OH	Me	-O
12	Erisopina	OH	OH	Me	H
13	Erisotiovina	Me	a	Me	H
14	Glucoerisodina	b	Me	Me	H
15	Erisotopina	a	OH	Me	H
16	Erisofoquina	Me	c	Me	H
17	Eritartina	Me	Me	OH	H
18	Eritristemina	Me	Me	OCH ₃	H
19	Eritrinina		-CH ₂	OH	H
20	8-Oxoeritrinina		-CH ₂	OH	-O
21	Eritrascina	Me	Me	OAc	H
22	11β-Metoxieritralina		-CH ₂	OCH ₃	H
23	11-Oxoeritralina		-CH ₂	-O	H
24	11β-Hidroxi-erisovina	Me	H	OH	H
25	11β-Metoxierisovina	Me	H	OCH ₃	H
26	11-Oxoerisovina	Me	H	-O	H
27	11β-Hidroxi-erisodina	H	Me	OH	H
28	11β-Metoxierisodina	H	Me	OCH ₃	H
29	11-Oxoerisodina	H	Me	-O	H
30	11β-Metoxierisopina	H	H	OCH ₃	H
31	8-Oxo-11β-metoxieritralina		-CH ₂	OCH ₃	-O
32	11-Oxoerisopina	H	H	-O	H

a: HO₂CCH₂SO₂; b: 1β-glucosil; c: hipafoquina-ester

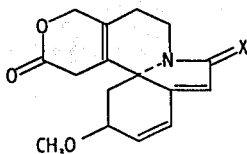
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Alcaloides Alquénicos⁵³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

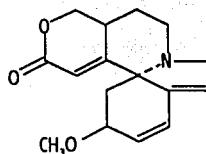
Alcaloides Alquénicos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
33	Dihidroerisotrina	Me	Me	H	H
34	Eritratidina	Me	Me	α-OH	H
35	Epieritratidina	Me	Me	β-OH	H
36	Eritratidinona	Me	Me	-O	H
37	Eritramina		-CH ₂ -	H	H
38	Eritratina		-CH ₂ -	β-OH	H
39	Epieritratina		-CH ₂ -	α-OH	H
40	Eritratinona		-CH ₂ -	-O	H
41	Dihidroerisovina	Me	H	H	H
42	Erisosalvina	Me	H	α-OH	H
43	Epierisosalvina	Me	H	β-OH	H
44	Erisosalvinona	Me	H	-O	H
45	Dihidroerisodina	H	Me	H	H
46	Erisotina	H	Me	α-OH	H
47	Epierisotina	H	Me	β-OH	H
48	Erisotinona	H	Me	-O	H
49	Erisopitina	H	H	OH	H
50	Erisoflorinona	H	H	-O	H
51	11-Hidroeritratina		-CH ₂ -	OH	OH
52	11-Hidroerisotinona	H	Me	-O	OH
53	11-Hidroeritratidina	Me	Me	α-OH	OH
54	11-Hidroepieritratidina	Me	Me	β-OH	OH
55	Hidroerisotina	H	H	OH	OH
56	11-Hidroerisosalvina	Me	Me	OH	OH
57	8-Oxoeritratinona		-CH ₂ -	-O	H

Figura 6. Alcaloides Lactónicos



X = H, β-eritroidina

X = O 8-oxo-β-eritroidina



α-eritroidina

2.2.2.4. Farmacología de los alcaloides del género *Erythrina*

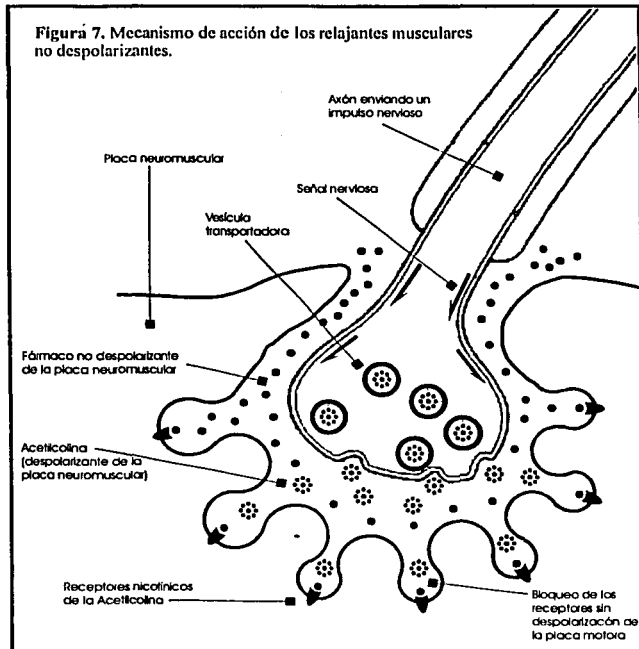
La primera investigación de tipo farmacológica realizada con los extractos de *Erythrina* se realizó en 1888 por Altamirano⁵⁴, siendo el quién diera el nombre de eritrina al extracto de *E. americana*, y demostrando su actividad curariforme en ranas. Estudios posteriores demostraron que la eritrina era la mezcla de α y β -eritroidina^{20, 49}, alcaloides con una lactona cíclica (figura 6).

Para 1937 se realizaron los primeros estudios formales para evaluar fisiológicamente los alcaloides de *Erythrina* a partir del aislamiento de la β -eritroidina⁵⁵, y se dio el primer paso para considerarlos como posibles fármacos comerciales. Esto derivó en estudios más finos con β -eritroidina y su dihidro derivado semisintético, demostraron que la dihidro- β -eritroidina es la sustancia que presenta una actividad farmacológica mayor^{55, 56}.

El mecanismo exacto de acción de estos alcaloides es todavía desconocido. Pero se sabe que el efecto farmacológico de estos bloqueadores neuromusculares antidespolarizantes, se debe a la competencia que existe entre estos y la acetilcolina por los receptores nicotínicos de la membrana postsináptica en la placa motora, cuya activación abre los canales iónicos, permitiendo el flujo de iones que provoca la despolarización y la posterior contracción del músculo⁵⁷. Al realizar este antagonismo competitivo, los curarizantes disminuyen la frecuencia de apertura de canales iónicos, tapizando en forma de pentámeros la apertura de los mismos, produciendo la relajación del músculo (figura 7).

La actividad de los alcaloides de *Erythrina* esta asociada con el residuo espiroamina y sus características de amina terciaria⁵⁷, en contraste con los alcaloides del curare que son sales cuaternarias de amonio. Por otro lado, la

disminución de la presión sanguínea se presenta a bajas dosis de la β -eritroidina y la actividad de la colinesterasa no se ve afectada por esta⁵⁸.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los compuestos curarizantes como el curare, fueron usados en cirugía para producir un grado de anestesia imposible de obtener con óxido nítrico o etileno⁵⁵. El sistema nervioso central no es afectado por estos fármacos, conservándose la conciencia y la sensibilidad dolorosa. Un sujeto paralizado con d-tubocurarina (curare), que no estuviese anestesiado, sería incapaz de ver con precisión y de hablar, pero conservaría lucidez de conciencia y sensibilidad⁵⁹.

La β -eritroidina es de los compuestos con actividad curarizante que se convirtió en un prospecto para emplearse en el quirófano como relajante musculare, por que facilitan una excelente relajación de toda la musculatura esquelética, especialmente en la pared abdominal, permitiendo la administración de menores cantidades de anestésicos al paciente que va a ser intervenido quirúrgicamente. También son empleados en algunos procedimientos ortopédicos para corregir dislocaciones y para facilitar laringoscopia, broncoscopia y esfaringoscopia, en combinación con un anestésico²⁰.

Otro factor que hizo de la β -eritroidina un fármaco de elección, es el hecho de que esta puede ser administrada oral o intravenosamente, en contraste, el curare tiene que ser administrado intravenosamente. Sin embargo, existe el hecho de que el margen de seguridad de la β -eritroidina para su uso como anestésico, es muy estrecho en comparación con los estándares de hoy en día (LD_{50} en humanos = 15-17 mg/kg⁵⁵); a pesar de que su margen de seguridad es más amplio con respecto al del curare⁵⁹.

El uso más frecuente de la β -eritroidina fue el de controlar los ataques y convulsiones en el tratamiento médico de la esquizofrenia y otras enfermedades mentales⁵⁵, gracias a su actividad en el sistema nervioso central, a diferencia del curare y otros compuestos curarizantes^{61, 62}. Cottingtons⁵⁵, señaló que el uso de β -eritroidina en el tratamiento con metrazol en niños con esquizofrenia reducía la severidad, duración de los ataques y proporcionaba alivio en la ansiedad de los pacientes.

2.2.2.5. Obtención de alcaloides del género *Erythrina*, a través del cultivo de tejidos

Los cultivos de células vegetales son capaces de producir un vasto conjunto de alcaloides isoquinolínicos⁶³. En lo que respecta a la obtención de

alcaloides de *Erythrina*, García-Mateos *et al.* en 1998⁶⁴ realizan el primer estudio en este campo, con el objeto de conocer el contenido y concentración de estos compuestos en callos subcultivados, particularmente β -eritroidina⁶⁵ (el que posee una actividad farmacológica reconocida). Siendo este trabajo el punto de partida para estudiar detalladamente la obtención de estos metabolitos por la técnica de cultivo *in vitro*, como una alternativa para la producción de alcaloides de importancia farmacológica presentes en el género *Erythrina*.

3. Planteamiento del problema

México cuenta con una gran diversidad vegetal, ocupa el cuarto lugar mundial en megadiversidad, albergando aproximadamente el 10% de las especies vegetales conocidas y con una alta proporción de endemismos. Igualmente importante es su etnobotánica, expresada entre otros aspectos, por la amplia utilización de los recursos naturales que hacen los 58 grupos étnicos reconocidos en el país con diversos fines, entre ellos la reconocida riqueza de la herbolaria.

Como ejemplo de esa riqueza se encuentra una especie del género *Erythrina*, conocida popularmente como colorín (*E. americana*). Esta especie es apreciada en nuestro país por múltiples razones, debido a que representa un gran potencial para obtener beneficios de ella. Estos beneficios van desde plantas de ornato, artesanías, forraje, alimento de consumo humano, hasta aplicaciones agronómicas.

En la medicina tradicional, a esta planta se le han atribuido propiedades narcotizantes, diuréticas, hipnóticas, purgantes, entre otras. En general, esas propiedades se deben a la presencia de un cierto tipo de alcaloides, que pueden ser extraídos de diferentes partes en la planta. Sin embargo, para poder explotar el potencial farmacológico de esos alcaloides, al nivel que se exige para la investigación y desarrollo de medicamentos, se presenta el inconveniente del suministro constante y de altos rendimientos de la materia prima.

En ocasiones, estos inconvenientes representan un impedimento para el aprovechamiento de muchas sustancias útiles, que podemos encontrar en las plantas consideradas como medicinales en el ámbito cultural de nuestro país.

Aunado a lo anterior, desde hace algunos años el enorme incremento en el conocimiento sobre los procesos biológicos, han permitido el desarrollo de técnicas capaces de generar una fuente continua y estable de compuestos naturales, en células vegetales cultivadas a gran escala. A si mismo, al manipular genéticamente, estos procesos hacen posible la propagación de especies vegetales con características de calidad que las hacen más provechosas para la explotación de los recursos naturales.

Por lo anterior, el presente proyecto tiene como finalidad contribuir en la investigación de los metabolitos secundarios presentes en los cultivos *in vitro* de *E. americana*, como una posible metodología para la obtención de alcaloides con importante actividad farmacológica, además de revalorizar una especie que goza de mucha aceptación en el país.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar y comparar por Cromatografía de líquidos acoplada a Espectrometría de Masas, los alcaloides de interés farmacológico, presentes en semillas, cotiledones y subcultivos *in vitro* de *Erythrina americana*.

4.2. Objetivos particulares

- ☞ Recolectar el material vegetal durante el mes Mayo de 1999, en Tepetitla, Edo. de México.
 - ☞ Seleccionar y desinfectar semillas sanas y viables.
 - ☞ Inducir la germinación de las semillas en condiciones de asepsia.
 - ☞ Inducir la formación y multiplicación del callo a partir de los cotiledones obtenidos en la germinación, en condiciones controladas de luz y temperatura.
 - ☞ Extraer los alcaloides de los diferentes tejidos y subcultivos, a partir de los extractos crudos (alcaloides libres) y de una hidrólisis ácida (alcaloides liberados).
 - ☞ Identificar los alcaloides obtenidos utilizando Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía de líquidos acoplada a Espectrometría de Masas.
 - ☞ Integrar y discutir los resultados.
-

5. Hipótesis

- En la literatura especializada se ha informado que existe una gran diferencia en la producción de metabolitos secundarios en una planta intacta con respecto a los obtenidos por la técnica de cultivo de tejidos⁶⁶. Berlin señala al respecto variaciones en el perfil y en el rendimiento de metabolitos secundarios obtenidos por cultivo *in vitro*, lo cual parece ser atribuido a una fisiología diferente en las células no diferenciadas⁶⁷ y a la inestabilidad genética entre subcultivos¹⁰, modificando su biosíntesis. Con base a lo anterior, se plantea que el perfil y concentración de alcaloides, puede variar a través de cada uno de los subcultivos de callos, siendo diferentes estos con respecto a los obtenidos en las semillas progenitoras de *Erythrina americana*, lo cual permitiría la obtención de nuevos alcaloides de interés farmacológico.
-

6. Parte experimental

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1. Colecta del material vegetal

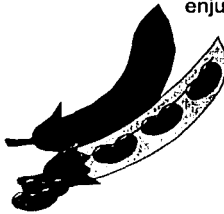
Las semillas de *Erythrina americana* se colectaron de diferentes especímenes elegidos al azar en Tepetitla, Edo. de México, su autenticidad se confirmó por el taxónomo responsable del herbario CHAPA de la Especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Para el criterio de selección de estas semillas se consideraron solo aquellas que se encontraron en madurez fisiológica, libres de patógenos y viables. La variable de estudio se consideró como el perfil de alcaloides, que se obtendría en los subcultivos y en los tejidos iniciales del material a prueba.

6.2. Metodología.

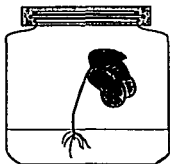
6.2.1. Cultivo *in vitro*.

6.2.1.1. Germinación.

Las semillas colectadas se lavaron cepillándolas con agua y jabón, a continuación las semillas se desinfectaron con solución de "Irgasan" en agitación constante por 10 minutos. Se enjuagaron con agua estéril y para continuar con el tratamiento de desinfección, se utilizó hipoclorito de sodio al 50% durante otros 15 minutos, finalmente se enjuagaron con agua destilada.



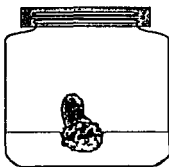
En una campana de flujo laminar en condiciones asepticas, las semillas se escarificaron según la metodología señalada por Meyer y Staden⁶⁸, con H₂SO₄ concentrado por espacio de 30 min a una temperatura de 25°C y enjuagadas con agua destilada 5 X 50 mL. Las semillas se colocaron para ser incubadas en frascos limpios, con algodón húmedo y esterilizados en autoclave durante 15 min a 15 lbs de presión (1.05 kg/cm²) y a una temperatura de 120°C.



Después de 48 h de incubación, se les quito la testa y se establecieron para su germinación por 72 h en frascos con 20 mL de medio esterilizado, preparado únicamente con 15 g de sacarosa y 6 g/L de agar, ajustando el pH a 5.7.

6.2.1.2. Formación de callo

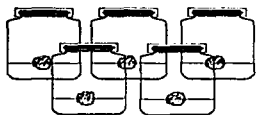
En una cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia, mediante disección se separaron los cotiledones y se incubaron en el medio descrito por García-Mateos et al.⁶⁴ (Anexo A). El medio consistió en un medio modificado de Murashige y Skoog⁶⁹, enriquecido con azúcar al 3%, 2 mg de 2,4-D, 0.5 mg/L benciladenina y 6 g/L de agar. El pH se ajusto a 5.7. Los frascos con el inoculo se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de 27°C, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una intensidad luminosa de 2500 lux durante 3 semanas. Una parte de los cotiledones, se secaron en una estufa a 30°C y se molieron para realizar una extracción de alcaloides libres y los disueltos en el extracto metanólico.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.1.3. Multiplicación del callo

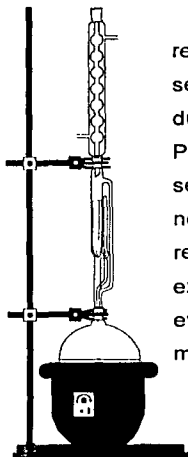
Una vez formado el callo, se eligieron los callos sanos y jóvenes, y se subcultivaron por intervalos de cuatro semanas hasta obtener suficiente tejido (aproximadamente 100 g peso fresco) para la extracción de los alcaloides. Se realizaron un total de 7 subcultivos. De los subcultivos 1, 3, 5 y 7 se realizó una separación del tejido con apariencia más viable manualmente, se secaron a temperatura ambiente y se molieron separadamente los de cada subcultivo. La parte descrita se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Especialidad de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, posteriormente se realizó la extracción de los alcaloides.



6.2.2. Extracción de alcaloides

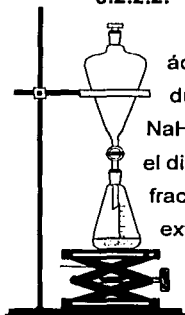
6.2.2.1. Alcaloides libres

La preparación de los extractos crudos de alcaloides se realizó conforme a la metodología de Games *et al.*⁵⁰. El residuo se seco a temperatura ambiente y se extrajo con metanol durante un período de 48-72 h en un equipo Soxhlet. Posteriormente el disolvente se eliminó a presión. El extracto se disolvió en una solución de H_2SO_4 al 2%. La fase acuosa se neutralizó con $NaHCO_3$ hasta alcanzar un pH 8 o 9, después se realizaron extracciones con diclorometano (3 X 50 mL). El extracto de diclorometano se seco con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó obteniendo la fracción de alcaloides extraídos con metanol.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.2.2. Alcaloides liberados



El remanente de la fase acuosa se acidificó a pH = 2 con ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se llevó a reflujo durante 3 h ($T = 60 - 70^{\circ}\text{C}$). La mezcla fría, se neutralizó con NaHCO_3 hasta pH = 8 y se extrajo con diclorometano (3 X 50 mL), el disolvente se evaporó por medio del rotavapor, obteniéndose la fracción de alcaloides liberados⁴¹. La preparación de los extractos se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal y Fitoquímica de la Especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Méx.

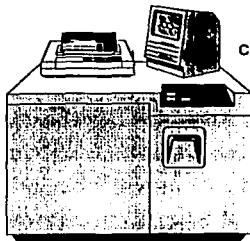
6.2.3. Identificación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 GF₂₅₄, Merck), el eluyente empleado fue diclorometano : metanol en una proporción de 8 : 2. Las placas se revelaron con el reactivo de Dragendorff (Anexo B).

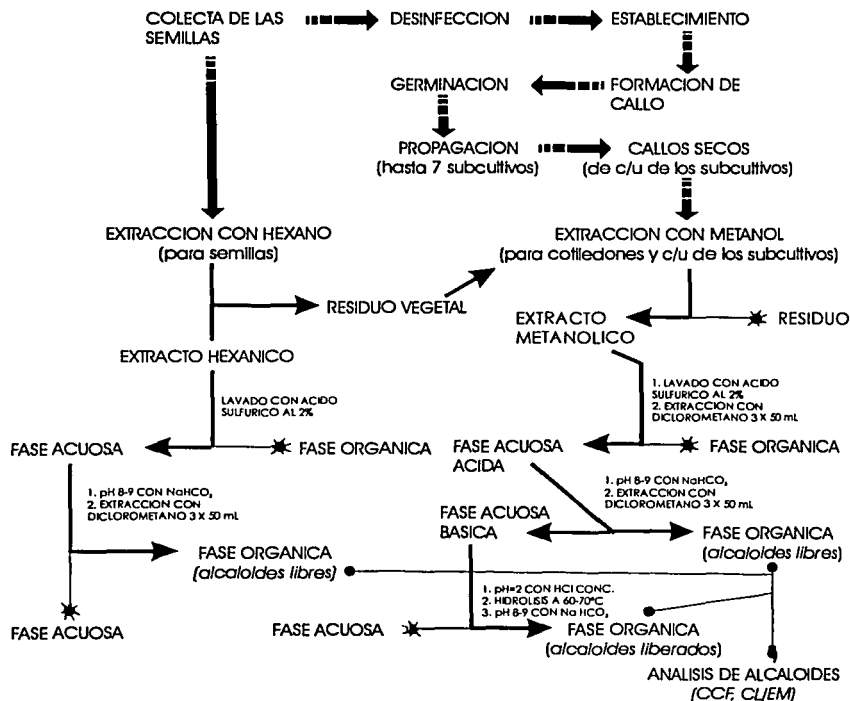
6.2.3.2. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas



Los análisis se realizaron en fase reversa en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters 600 acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan Mat LCQ. En el cromatógrafo se usó una columna (250 mm X 4.6 mm.) Sum Discovery, C18. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min, y como fase móvil se utilizó una mezcla de acetato de amonio 0.1%/MeOH/ACN (75:20.5; 50:45.5; 50:45.5 correspondientes a tres

tiempos programados), equipado con detector UV a 230 nm. Por espectrometría de masas se confirmaron e identificaron los alcaloides, comparando los espectros con los de muestras auténticas y biblioteca de espectros.

Figura 8. Extracción de alcaloides



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

7. Resultados

Las muestras se trataron siguiendo la metodología de extracción de alcaloides descrita por Games *et al.*⁵⁰, los rendimientos se muestran en la tabla 8, así mismo, se presenta el contenido de alcaloides en los extractos de los tejidos analizados.

Tabla 8. Contenido de los alcaloides en semillas, cotiledones y callos.

	Semillas	Cotiledones	Subcultivo 1	Subcultivo 3	Subcultivo 5	Subcultivo 7
Contenido de agua (%)	*	70.76	94.24	95.90	94.89	94.20
Peso fresco (g)	*	65.00	193.28	381.10	217.50	129.48
Peso seco (g)	20.00	19.00	11.10	15.60	11.10	7.50
Extracto metanólico ^b	23.50	38.94	63.06	48.71	49.54	40.05
Alcaloides libres ^c	0.55	0.48	0.18	0.12	0.08	0.10
Alcaloides liberados ^c	0.06	0.07	0.05	0.10	0.01	0.04
Alcaloides totales	0.62 ^d	0.56	0.24	0.23	0.10	0.14

* No se determinó

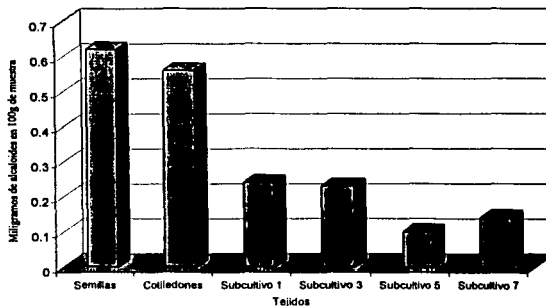
^b Gramos de extracto obtenidos de 100 g de tejido seco.

^c Miligramos de alcaloides presentes en 100 g de tejido seco.

^d No se consideró la fracción hexánica.

En la figura 9 se muestra en forma esquemática la información anterior, con respecto a la acumulación de alcaloides totales generados durante el proceso de subcultivos en cada uno de ellos.

Figura 9. Total de alcaloides hallados en cada uno de los tejidos.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

El análisis cromatográfico permitió establecer el contenido relativo de alcaloides en los diferentes tejidos estudiados, los cuales se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje del contenido de alcaloides en semillas, cotiledones y en callos*.

	Semillas	Cotiledones	Subcultivo 1	Subcultivo 3	Subcultivo 5	Subcultivo 7
Erisodina	trazas					6.74
Erisovina	1.38					10.00
Eritralina	trazas	14.85	0.94			
Eritrinina		1.81	6.61	3.50	0.75	
8-Oxo-eritralina	trazas					
Eritratidina			3.09	3.09	1.23	
Eritratina-N-óxido		1.75	0.39	0.39		
α -Eritroidina	40.77	45.51	43.26	43.26	45.58	38.55
β -Eritroidina	58.73	36.08	49.75	49.75	52.44	44.71

* Las proporciones relativas de los alcaloides fueron calculadas de las áreas en los picos de la cromatografía de líquidos. Las trazas se consideraron cuando el porcentaje fue $\leq 0.01\%$. Las estructuras se muestran en la tabla 11 y en la figura 9, los espectros en el anexo correspondiente.

En la tabla 10, se presentan los tiempos de retención de cada uno de los alcaloides identificados por esta técnica.

Tabla 10. Tiempos de retención relativos por Cromatografía de Líquidos de los alcaloides obtenidos.

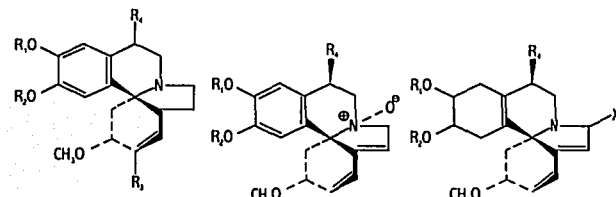
Alcaloide	Tiempo de retención*
Erisodina	1.23
Erisovina	1.30
Eritralina	1.89
Eritrinina	1.69
8-Oxo-eritralina	1.67
Eritratidina	1.29
Eritratina-N-óxido	1.76
α -Eritroidina	1.00
β -Eritroidina	1.16

* Expresados con respecto al tiempo de retención de α -eritroidina

Las estructuras de los alcaloides identificados se muestran en la tabla 11, agrupándolos en diénicos, alquénicos y en alcaloides N-óxidos. Los alcaloides lactónicos se muestran separadamente debido a su relevancia farmacológica en la figura 10. Se identificaron 5 estructuras de naturaleza diénica y dos del tipo alquénico. Es importante destacar la presencia de la estructura de un N-óxido,

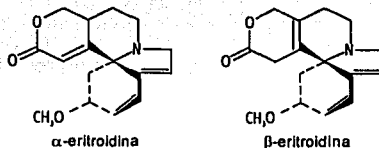
debido a que este tipo de alcaloides han sido identificado en investigaciones efectuadas sobre otras especies del género^{70,71}. Así de importante, fue confirmar el hecho de que las estructuras identificadas se encuentran formando parte el grupo de alcaloides que han sido detectados en las especies de *Erythrina* del continente americano como lo señala Hargreaves⁴⁹.

Tabla 11. Estructura de alcaloides identificados en el análisis.



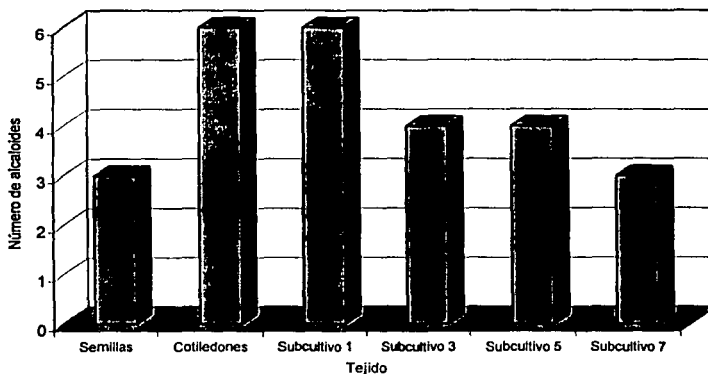
	Alcaloides alquénicos (A)		Alcaloide n-óxido (N)		Alcaloides diénicos (D)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X
Erisodina (D)	H	Me	H	-	H
Erisovina (D)	Me	H	H	-	H
Erisotrina (D)	Me	Me	H	-	H
Eritralina (A)		-CH ₂ -	H	-	H
8-Oxoeritralina		-CH ₂ -	H	-	=O
Eritrinina (D)		-CH ₂ -	OH	-	H
Eritratidina (A)	Me	Me	α-OH	-	-
Eritrartina N-óxido (N)	Me	Me	Me	OH	-

Figura 10. Estructuras de α- y β-eritroidina



En la figura 11, se muestra el número de alcaloides presentes en cada uno de los tejidos analizados.

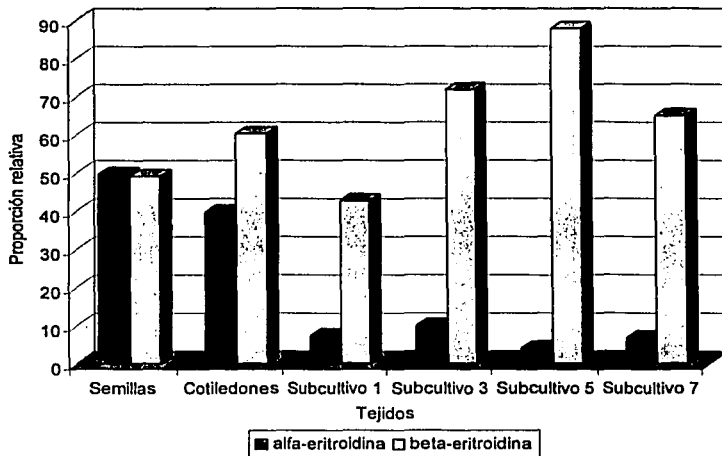
Figura 11. Distribución de alcaloides en semillas, cotiledones y callos.



Al ser los alcaloides lactónicos α - y β -eritroidina, el eje de interés en esta investigación, vale la pena observar de que manera se distribuyeron estos alcaloides en las fases de alcaloides libres, a través de los diferentes subcultivos efectuados, los cuales se muestran en la figura 12. La variación de los alcaloides lactónicos en la fracción de alcaloides liberados no se observó tendencia alguna.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Distribución de los alcaloides lactónicos en la fracción de alcaloides libres



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. Análisis de resultados

En la tabla 8 se muestra el rendimiento y el contenido total de alcaloides en los diferentes tejidos analizados de *E. americana*. Esta información se comparó con el único estudio previo realizado con la misma especie, para poder hacer una interpretación de los resultados y determinar que tan factible era la obtención de alcaloides a través de la técnica de cultivo de células. Así entonces, observamos lo siguiente:

En la parte que se refiere a la extracción de los alcaloides (tabla 8), el total de alcaloides contenidos en semillas es alto con respecto a los hallados en los cotiledones y callos, tanto a si que, en callos resultó ser el rendimiento más bajo en la obtención de estos metabolitos, de hecho, se aprecia una tendencia a la baja conforme fue aumentando el número de subcultivos (figura 10).

En el entendido de que en las semillas no se lleva a cabo síntesis alguna, según Mantle y Coleman⁵¹ al usar precursores marcados para identificar los sitios de biosíntesis, concluyeron que los tejidos jóvenes como las hojas y meristemos son los lugares de síntesis de este tipo de estructuras; por lo tanto, los compuestos ahí detectados son el resultado de la acumulación durante el desarrollo normal de la planta, y solo cuando da comienzo la germinación de las semillas es cuando la maquinaria biosintética comienza a generar otros compuestos a partir de aquellos que se acumulan previamente; eso explica el por qué se obtuvieron más alcaloides en las semillas, consideradas como tejido en un estado de letargo y de almacenaje, que en los cotiledones y en callos, poseedores de una mayor actividad bioquímica y de desarrollo.

A cerca de ello, se sabe por ejemplo, que los alcaloides aromáticos, en todos los estados de desarrollo del fruto de *Erythrina* pueden no estar presentes o no ser detectados en cantidades significantes, por que parte de ellos o todos son rápidamente utilizados en la síntesis de β -eritroidina⁶⁵, producto final de la biosíntesis, lo cual justifica ser uno de los alcaloides más abundantes en *E. americana*.

El cultivo *in vitro* se considera a partir de que el tejido seleccionado es expuesto a un medio que contiene los factores de crecimiento y nutrientes para que las células continúen sus procesos fisiológicos y puedan ser estudiados. Lo obtenido en la extracción de alcaloides en las semillas y cotiledones sirvió para apreciar si se presentaba algún cambio cualitativo y/o cuantitativo en el perfil alcaloide con respecto al proceso de subcultivo.

Como se mencionó anteriormente la cantidad de alcaloides totales en callos fue menor a los obtenidos en los otros tejidos estudiados, disminuyendo paulatinamente con el número de subcultivos. Este hecho, nos habla quizá, de una supresión en la síntesis de alcaloides, a partir de la inducción en la formación del callo, pudiendo deberse a la presencia del 2,4-Dicloro fenoxiacético en el medio de cultivo. Este efecto ha sido descrito como una inhibición en la producción de alcaloides por la presencia de ese tipo de auxina⁷².

Por otro lado, también se observó que la fracción de alcaloides libres fue más alta que en la fracción de alcaloides liberados en todas las muestras analizadas; esto quiere decir que una cantidad mayor de alcaloides no se encuentra asociado a glucósidos, como es la forma en la que son almacenados por las células de la planta intacta, en cambio se ha visto que para su translocación se encuentran glucosilados⁷³. Este aspecto en los resultados, demostró tener una correspondencia positiva con lo observado en los trabajos de García-Mateos *et al.*^{64,74-75}, al hacer este tipo de análisis químico, tanto en

cultivo *in vitro* de *E. americana* como en diferentes órganos de la planta intacta, para describir el perfil de alcaloides. Se infiere entonces, que no se afectó la disposición de esos metabolitos en las células a lo largo del proceso de subcultivo.

Sobre los alcaloides obtenidos acoplando la técnica de cromatografía de líquidos con espectrometría de Masas (CL/EM), existen escasos estudios en donde se hayan aplicado estas técnicas^{53,55}, pero se observa un mismo perfil semejante al descrito por García-Mateos *et al*⁶⁴, identificando estructuras con un perfil mayor de oxidación que las detectadas en los tejidos analizados de plantas intactas, los cuales se muestran en la tabla 12. Así mismo, la técnica permitió identificar trazas de algunos alcaloides no informados por cultivo *in vitro* en esta especie.

Tabla 12. Alcaloides de la especie *E. americana*, identificados en este y en estudios previos.

	Hargreaves ⁵³	Sotelo ⁵⁵	Abdulah ⁶⁴	García ⁶⁴	Este estudio
Erisodina (D)	S	S	-	S/C	S/C
Erisovina (D)	S	S	S	S/C	S/C
Erisotrina (D)	-	-	-	-	S/C
Eritralina (A)	-	-	-	C	S/C/C
8-Oxocitralina (D)	-	-	-	-	C/C
Eritrinina (D)	-	-	-	-	C
Eritritidina (A)	-	-	-	-	C/C
Eritratrina N-óxido (N)	-	-	-	-	-
Erisopina (D)	-	-	S	S/C	-
Erisonina (D)	-	-	-	C	-
8-Oxo-erisovina (D)	-	-	-	C	-
11-Hidroxierisotina (A)	-	-	-	C	-
Eritristemina N-óxido (N)	-	-	-	-	-
α -Eritroidina (L)	S	S	S	S	S/C
β -Eritroidina (L)	S	S	S	S	S/C

S = se encontró en semillas

D = alcaloide Diénico

Ct = se encontró en cotiledones

A = alcaloide Alquénico

C = se encontró en callos

L = alcaloide Lactónico

En este sentido, los cotiledones fueron los tejidos con alto contenido de alcaloides, a diferencia de los callos en los subcultivos. En semillas fueron detectados los mismos alcaloides descritos por otros investigadores (tabla 12). En la tabla 11, se muestran las estructuras de los alcaloides detectados, muchos de ellos agrupados en la serie de los diénicos (erisodina, erisovina, eritralina, 8-

oxo-eritralina) y otros en la serie alquénica (eritratidina) y los alcaloides lactónicos (α - y β -eritroidina).

Un hallazgo singular, fue el detectar nuevamente la presencia de los alcaloides N-óxidos en algunas especies de esta género, en particular el N-óxido de eritratina, el cual solamente ha sido identificado en vainas, pericarpio inmaduro y semillas inmaduras de esta especie⁷⁴. Sin embargo, García-Mateos *et al.*⁶⁴ solamente detectaron el alcaloide N-óxido eritristemina en *E. coralloides* en un estudio semejante de obtención de alcaloides por cultivo de tejidos. Estos compuestos inicialmente fueron considerados como artefactos o compuestos que se generan durante la preparación de la muestra, pero se descartó la idea cuando se demostró que en realidad se trataban de productos naturales⁷¹. Estos compuestos poseen una alta solubilidad en el agua y al utilizar métodos de extracción con disolventes orgánicos, se aumenta la probabilidad de que se pierdan durante el proceso como lo propusieron Phillipson y Handa⁷⁶; por tal motivo es que no fueron detectados previamente.

Resulta interesante el que se encontraran los alcaloides lactónicos en callos, por que contrasta notablemente con los informados en el estudio previo de García-Mateos *et al.*⁶⁴ al no ser detectados en cultivo *in vitro* para *E. americana*; inclusive ambos metabolitos se encontraron en una proporción mayor en comparación con los alcaloides restantes en los tejidos analizados. Por otro lado, β -eritroidina en comparación con el otro alcaloide lactónico (α -eritroidina), mostró una mayor proporción en las fracciones de alcaloides libres (figura 12), pero en las fracciones de alcaloides liberados no se detectó una tendencia clara en cuanto a la variación de ambos alcaloides.

Aquí es importante señalar las posibles causas que propiciaron la aparición de alcaloides no hallados en el estudio previo sobre el cultivo de tejidos en esta especie; dado que se pretende determinar lo factible de este proceso para obtener los alcaloides de importancia farmacológica. Para lograr eso, es

necesario obtener la reproducibilidad de los resultados, en los múltiples experimentos que se realicen.

En el trabajo al que se hace referencia⁶⁴, se pensó que posiblemente α - y β -eritroidina no eran los productos finales por cultivo *in vitro* en la ruta biosintética de los alcaloides propios de la especie, ya que solo se encontraron compuestos considerados precursores de ellos (alcaloides diénicos). Con los resultados obtenidos en este ensayo, podría pensarse que sí se llevó a cabo la síntesis de esos alcaloides y de forma muy activa, por la abundancia relativa en los callos analizados: pero no se puede ser contundente al respecto con la escasa información que se tiene, por lo tanto no es posible pronunciarse por alguna teoría para resolver esta discrepancia. Por el momento, las razones bioquímicas de por qué una serie de reacciones metabólicas se expresan en un tejido y otras son inactivadas cuando se aplica esta técnica, son completamente desconocidas aún¹¹.

Las células vegetales son menos especializadas que las animales en sus capacidades metabólicas, y esto también se hace ver en el cultivo celular cuando sus propiedades metabólicas se alteran; en algunos casos se aprecia esto al no expresarse un metabolito de forma espontánea en un cultivo, debido quizá a factores ambientales en el medio de crecimiento¹¹. Consecuentemente hay que encontrar las condiciones necesarias para su formación y acumulación, o en el caso de este experimento hallar las condiciones que lo hicieron posible.

El hecho de haber encontrado estas sustancias en los callos generados, es una prueba de como se ve afectada la fisiología de un tejido o de un sistema que tiene una organización en extremo compleja y que basa su regulación en la interacción de todos sus componentes. Sin embargo, de estas alteraciones se puede obtener provecho, en el sentido de la posibilidad que representa hallar compuestos no contemplados en un tejido, y que tales compuestos puedan tener una utilidad importante.

9. Conclusión.

El objetivo principal de identificar y comparar los alcaloides que se obtuvieran de los diferentes tejidos analizados, se cumplió cabalmente junto con los demás objetivos particulares; y de acuerdo con los resultados, el perfil de alcaloides mostró la presencia de algunos de los alcaloides más comunes descritos en el género *Erythrina*. En este aspecto no se halló una variación substancial, que indicara que el tejido cambiara su biosíntesis o que estas sustancias fueran degradadas. Sin embargo, se obtuvieron alcaloides del tipo lactónico y el rendimiento de los alcaloides totales obtenidos en los subcultivos, fue inferior con respecto al de las semillas, lo que nos habla de una probable inhibición por alguno de los constituyentes del medio de cultivo.

Estos resultados nos permite aceptar que se cumplió la hipótesis planteada, y de hecho sienta un precedente que hace necesario realizar más pruebas, que nos permitan entender un poco más la biosíntesis de esta clase de compuestos con esta técnica de producción, y así conducir las investigaciones para lograr una mejor expresión en la acumulación, principalmente de aquellos compuestos relacionados con su importante actividad farmacológica.

10. Referencias.

1. Petiard, V. y Bariaud-Fontanel, A. El cultivo de células, *Mundo Científico* 1987; 7, 730-736.
 2. Balandrin M. F., Klocke J. A., Syrkin E. H., W. Hugh Bollinger. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 1985; 228: 1154-160.
 3. Harborne, J. H. y Roberts, L. W. Recent advances in chemical ecology. *Natural Products Reports* 1989; 6: 95-108.
 4. Gros, E. G., Pomillo, A. B., Seldes, A. M. y Burton, G. Introducción al estudio de los productos naturales. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D. C. Organización de los Estados Americanos, 1985: 1-11.
 5. Taiz, L. y Zeiger, E. Surface protection and secondary defense compounds. *En: Plant Physiology*. USA: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1991: 318-345.
 6. Zenk, M. H. y Deus, B. Natural products synthesis by plants cell cultures. *En: Fujiwara, A. comp. Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Japan: The Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982.
 7. Staba, E. J., y Chung, A. Quinine and quinidine production by *Cinchona* leaf, root and unorganized cultures. *Phytochemistry* 1981; 20: 2495.
 8. Schuchmann, R., y Wellmann, E. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationships to alkaloid and lipid metabolism. *Plant Cell Rep.* 1983; 2: 88.
-

-
9. Yamada, Y. y Hashimoto, T. Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep.* 1982; 1: 101.
 10. WinK, M. Physiology of secondary product formation in plants *En*: Charlwood, B. V. y Rhodes, M. J. C. comp. Secondary products from plant tissue culture. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. USA: Oxford University Press, 1990: 23-41.
 11. Berlin, J. Secondary products from plant cell cultures. *En*: Phem, H, J. y Reed, G. comp. Biotechnology. VcH Veriagsgesell Schaft mbH. R. F. Alemana, 1982: 632-633.
 12. Scragg H. Alan. Alkaloid secondary products from *Catharanthus roseus* cell suspension. *En*: Plollard W. Jeffry and John M. Waker comp. Methods in Molecular Biology. New Jersey: Human Press, 1990: vol. 6: 537-544.
 13. Nakanishi, K. An historical perspective of natural products chemistry. *En*: Kelly, J. W. comp. Comprehensive natural products chemistry. New York: Elsevier, 1999: vol. 4: 23-40.
 14. Neelam, M., Rajesh, L., Kiran, L. S. y Sushil, K. Recent advances in biosynthesis of alkaloids. *En*: Kelly, J. W. comp. Comprehensive natural products chemistry. New York: Elsevere, 1999: vol. 4: 25-138.
 15. Craig, L. E. *Erythrina* alkaloids. *En*: R. H. F. and Holmes, H. L. comp. The alkaloids. London: Academic Press, 1995: Vol. 5: 265-293.
 16. Folkers, H. y Unna, K. *Erythrina* alkaloids. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1938; 27: 693-699.
 17. Lehman, A. Actions of *E. americana* a possible curare substitute. *J. Pharmacol.* 1937, 60: 69-69.
 18. Modell, W. y Lansing, A. Drogas. México: Time-Life, 1973. 193-194.
 19. Neill, D. A. Botany and ecology. *En*: Westley, S. B. and Sidney, B. comp. Nitrogen. *Erythrina* production and use: A Field Manual. Hawaii: Nitrogen Fixing Tree Association (NFTA), 1993: 2-6.
-

-
20. Lozoya, X. y Lozoya, M. Tzomplantli. *Erythrina americana*. En: Flora medicinal de México. Plantas indígenas. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 1982: 174-192.
 21. Musálem, M. A. *Erythrina* en México: distribución, uso e investigación. En: Westley, S. B. y Powell, M. H. comp. Nitrogen fixing tree association. *Erythrina* in the new and old world. Hawaii: (NFTA), 1993: 46-54.
 22. Martínez, M. y Matuda, E. Flora del estado de México. México: Biblioteca Enciclopédica del Estado de México, 1979: vol 2: 543.
 23. Budowski, G. Part I. *Erythrina* in the new and old worlds. En: Westley, S. B. y Powell, M. H. comp. Hawaii: NFTA, 1993.
 24. Glover, N. y Muschler, R. Shade and support for perennial crops. En: Westly, S. B. y Sidney, B. comp. *Erythrina* production and use. Hawaii: NAFTA, 1993.
 25. Castellanos, B. J. F. Ensayo de estacado de Colorín en terrenos degradados de la región Mixteca. En: Iª Reunión Científica Forestal y Agropecuaria del CIPAF-Oaxaca: Oaxaca, 1988.
 26. Russo, R. O. The use of *Erythrina* species in the Americas. En: Westley, S. B. y Powell, M. H. comp. *Erythrina* in the New Worlds. Hawaii: NAFTA, 1993.
 27. Morton, J. F. Pito (*Erythrina berteroa*) and chipilin (*Crotalaria longirostata*), (Fabaceae). Two soporific vegetable of Central America. *Economic Botany* 1994; 48: 130-38.
 28. Pezo, D. A., Kass, M. L., Romero, F. y Benavides, J. Foodder production and use. En: Westley, S. B. y Sidney, B. comp. *Erythrina* production and use: A field manual. Hawaii NAFTA, 1993.
 29. Anónimo. Plants and their constituents. En: Bisby, F. A., Buckingham, J. A., Harborne, J. B. comp. Phytochemical dictionary of the leguminosae. International legume Database and Information Service (ILDIS) y Chapman and Hall Chemical Database (CHCD). U. K.: Chapman & Hall, 1994.
-

-
30. Kamat, V. S., Chu, F. Y., Kubo, I. y Nakanishi, K. Antimicrobial agents from an east african medicinal plant *Erythrina ayssinical*. *Heterocycles* 1981; **15**: 1163-1170.
 31. Mitscher, L. A., Ward, J. A., Drake, S. y Gollapudi, S. Antimicrobial agents from higher plants. Erycristagallin, a new pterocarpene from the roots of the bolivian coral tree, *Erythrina crista-galli*. *Heterocycles* 1984; **22**: 1673-1675.
 32. Mitscher, L. A., Drake, S. y Gollapudi, S. y Okwute, S. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 1987; **50**: 1025-1040.
 33. Wandiji J. A., Nkengfack, E. Fomun, Z. T., Ubillas, R., Killday, K. B. y Tempesta, M. J. A new prenylated isoflavone and long chain esters from two *Erythrina* species. *Lloydia* 1990; **56**: 1425-1429.
 34. Ingham, J. L. Isoflavonoids phytoalexins from the fungus-inoculated leaflets of *Erythrina* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 1991; **19**: 497-506.
 35. Foddy, L. y Hughes, R. C. Interactions of lectins with normal, swainsonine-treated and ricin-resistant baby hamster kidney BHK. *Carbohydr. Res.* 1986; **151**: 293-304.
 36. Barton, D. H. R., Potter, C. J. y Widdowson, D. A. Phenol oxidation and biosynthesis. Part 23. On the benziltetrahydroisoquinoline origins of the *Erythrina* alkaloids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1973; **1**: 346-348.
 37. Boar, R. B. y Widdowson, D. A. Mass spectra of *Erythrina* alkaloids: a novel fragmentation of the spiran system. *J. Chem. Soc. (Lon)* 1970; **B**: 1591-1595.
 38. Chawala, A. S. y Jackson, A. H. *Erythrina* and related alkaloids. *Natural Products Reports* 1989; **6**: 56-66.
 39. Craig, L. E. *Erythrina* alkaloids. *En: Manske, R. H. F. y Holmes, H. L. comp. The Alkaloids*. London: Academic Press, 1955: vol. V: 265-293.
 40. Folkers, H. y Unna, K. *Erythrina* alkaloids. A review, and new data on the alkaloids of the species of the genus *Erythrina*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1938, **27**: 693-699.
-

-
41. Folkers, H. y Unna, K. *Erythrina* alkaloids, Comparative curare like potencies of species of the genus *Erythrina*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1938; **28**: 1019-1028.
 42. Millington, S., Steinman, H. y Rinehart, K. L. Jr. Isolation, gas chromatography, mass spectrometry and structures of new alkaloids from Barneby. *J. Am. Chem. Soc.* 1974; **96**: 1909-1914.
 43. Jackson, A. H., Ludgate, P., Mavraganis, V. y Redha, F. M. Studies of *Erythrina* alkaloids. Part 5. GC/MS investigations of alkaloids in the seeds of *E. suburnbrans*, *E. lanata*, *E. rubinervia*, *E. acanthocarpa*, *E. variegata* and *E. malanacantha*. *Allertoina* 1982; **3**: 47-51.
 44. Jackson, A. H. y Chawla, S. Studies of *Erythrina* alkaloids. Part 4. GC/MS investigation of alkaloids in the leaves of *E. poeppigiana*, *E. macrophylla*, *E. berteriana* and *E. salviflora*. *Allertonia* 1982; **3**: 39-45.
 45. Barton, D. H. R., James, R., Kirby, G. W. y Widdowson, D. A. The biosynthesis of the *Erythrina* alkaloids. *Chemical Communications* 1967; 266-268.
 46. Barton, D. H. R., Bracho, R. D., Potter, C. J. y Widdowson, D. A. Phenol oxidation and biosynthesis. Part 24. Origin of chirality in the erythrinan system and derivation of the lactone rings of α y β -erythroidine. *J. Chem. Soc. Parkin Trans.* 1974; **1**: 2278-2283.
 47. Ito, K., Furukawa, H. y Tanaka, H. Structure of erythrinine, a new alkaloid from *Erythrina indica* Lam. *Chem. Commun.* 1970; 1076-1077.
 48. Shing, H. y Chawla, A. S. Isolation of erysodine, erysothrine and hypaphorine from *Erythrina suberosa* Roxb. seeds. *Experientia* 1969; **25**: 785-896.
 49. Hargreaves, R. T., Johnson, R. D., Millington, D. S., Mondal, M. H., Breavers, W., Becker, L., Young, C. y Rinehart Jr., K. L. Alkaloids of american species of *Erythrina*. *Lloydia* 1974; **37**: 569-580.
-

-
50. Games, D. E., Jackson, A. H., Khan, N. A. y Millington, D. S. Alkaloids of some african, asian, polynesian and australian species of *Erythrina*. *Lloydia* 1974; **37**: 581-588.
 51. Mantle, P. G. y Coleman, M. J. Biosynthesis of radiolabelled alkaloids from ¹⁴C-tyrosine in *Erythrina crista-galli*. *Phytochemistry* 1984; **23**: 1617-1518.
 52. Dyke, S. F. y Quessy, S. N. *Erythrina* and related alkaloids. *En*: Manske, R. F. H. comp. New York: Academic Press, 1981: vol. 18.
 53. Soto, H. M. Chemical and structural studies of *Erythrina* alkaloids. Ph. D. Thesis. University of Wales. Cardiff, U.K. 1989.
 54. Altamirano, A. D. *Gaceta Médica de México* 1888; **23**: 369.
 55. Payne, L. G. The alkaloids of *Erythrina*: Clonal evaluation and metabolic fate. Ph. D. Thesis. Department of Chemistry. Louisiana State University. USA. 1991.
 56. Unna, K., Kniazuk, M. y Greslin, J. G. Pharmacologic action of *Erythrina* alcaloids. I. β -Erythroidine and substances derived from it. *Pharmacol. Exper. Therap.* 1944; **80**: 39-52.
 57. Deulofeu, V. The curarizing alkaloids of *Erythrina* species. *En*: Bovet, Nittiand, F. y Marine, Bettolo, G. B. comp. Amsterdan: Elsevier Publishing Co., 1959.
 58. Pichard, R. y Luco, J. V. A pharmacological study of an extract of *Erythrina crista-galli* (ceibo), *J. Pharm. Exp. Ther.* 1944; **80**: 62-69.
 59. Smith, S. M., Brown, H. O., Toman, J. E. P. y Goodman, L. S. The lack of cerebral effects of d-tubocurarine. *Anesthesiology* 1947; **8**: 1-14.
 60. Berger, F. M. y Schwartz, R. P. The toxicity and muscular effect of d-tubocurarine combined with β -erythroidine, myanesin or evipal. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1948; **93**: 362-367.
 61. Pick, E. P. y Unna, K. The effect of curare and curare-like substances on the central nervous system. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1945; **83**: 59-70.
-

62. Pick, E. P. y Richards, G. V. The synergism of anesthetics and hypnotics with curare and curare-like alkaloids. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1947; **90**: 1-1 3.
 63. Phillipson, J. D. Plants as sources of valuable products. *En*: Charlwood, B. V. y Rhodes, M. J. C. comp. Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon Press, 1990: 1-21.
 64. Garcia-Mateos, R., Soto-Hernández, Martínez-Vázquez, M. y Villegas-Monter, A. Isolation of alkaloids of *Erythrina* from tissue culture. *Phytochemical Analysis* 1998; **10**: 1-5.
 65. Payne, L. G. y Foley, J. P. Gas chromatography and mass spectrometry of genetic clones of three *Erythrina* species. *En*: Ahuja, S. comp. Chromatography and pharmaceutical analysis. American Chemical Society Symposium Series No. 512. USA: American Chemical Society, 1992: 85-99.
 66. Ramawat, K. G. Production of alkaloids. *En*: Ramawat, K. G. y Mérillon, J. M, comp. Biotechnology secondary metabolites. USA: Science Publishers. 1999: 193-218.
 67. Berlin, J. Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and it's impact on pharmacy. *En*: Bajaj, Y., Springer V. comp. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin: Medicinal and Aromatic Plants, 1988: vol 4: 37-59.
 68. Meyer, H. J. y Staden, J. V. Occurrence of an inhibitor of tissue-type plaminogen activator in seeds and in vitro cultures of *Erythrina caffra* Thumb. *Plant Physiology* 1991; **96**: 1150-1156.
 69. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biomass assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 1962; **15**: 473-497.
 70. Sarragiotto, M. E., Filho, H. L. y Marsaiolo, A. Erysoitrine-N-oxide and erythartine-N-oxide, two novel alkaloids from *Erythrina mulungu*. *Canadian Journal Chemistry* 1981; **59**: 2771-2775.
-

71. Soto, H. M. y Jackson, A. H. *Erythrina* alkaloids: isolation and characterisation of alkaloids from seven *Erythrina* species. *Planta Medica* 1994; **60**: 175-177.
72. Merillon, J. M., Ramawat, K. G. *En*: Ramawat, K. G., Merillon, J. M. comp. *Biotechnology Secondary Metabolites*. USA: Science Publishers, 1999: 241-156.
73. Toopel, G., Witte, L. y Hartmann, T. N-oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria Scassellatii*. *Phytochemistry* 1988, **27**: 3757-3760.
74. García-Mateos, R., Lucas, B., Zendejas, M., Soto-Hernández, M., Martínez, M., Sotelo, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, **4**: 2987-2991.
75. García-Mateos, R., Soto, H. M., y Kelly, D. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology* 1998, **26**: 545-551.
76. Phillipson, J. D. y Handa, S. S. Alkaloid N-oxide. A review of recent developments. *Lloydia* 1978; **41**: 381-431.
77. Sotelo, A., Soto, M., Lucas, B. y Giral, F. Comparative studies of the detoxified seeds. *Journal Agricultural Food Chemistry* 1993, **41**: 2340-2343.
78. Abdullah, M. I., Barakat, I. E., Games, D. E., Ludgate, P., Mavraganis, V. G. y Jackson, A. H. Studies of *Erythrina americana* Part III. GC/MS investigations of alkaloids in the seeds of a further fourteen species. *Ann. Mo. Bot. Gard* 1979; **66**: 533-540.
-

11. Anexos.

Anexo A. Medio de cultivo modificado Murashige-Skoog.

Substancia	Fórmula	Concentración
Agar		
Sacrosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0.03 g/ml
Glicina	$C_2H_3NO_2$	1.0 ppm
Ac. Nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0.5 ppm
Piridoxina	$C_8H_{12}ClNO_3$	0.5 ppm
Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	0.200 M
Nitrato de potasio	KNO_3	0.160 M
Nitrato de calcio	$Ca(NO_3)_2$	0.015 M
Fosfato ácido de Potásio	$MgSO_4$	0.013 M
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4$	0.015 M
Quelatos	(EDTA- $FeSO_4$)	
Micronutrientes		
Sulfato de Manganeseo	$MnSO_4$	169×10^{-2} ppm
Acido Bórico	H_3BO_3	620×10^{-3} ppm
Sulfato de Zinc	$ZnSO_4$	860×10^{-3} ppm
Molibdato de Sodio	Na_2MoO_4	250×10^{-4} ppm
Sulfato de Cobre	$CuSO_4$	2.50×10^{-5} ppm
Vitaminas		
Tiamina	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$	1 ppm
<i>mio</i> -Inositol	$C_6H_{12}O_6$	100 ppm
Hormonas		
Bencilaminopurina		0.5 ppm
Ac. 2,4-Dicloro-fenoxiacético	$C_8H_6Cl_2O_3$	2.0 ppm
Ac. Indolbutírico	$C_{17}H_{17}NO_3$	0.1 ppm

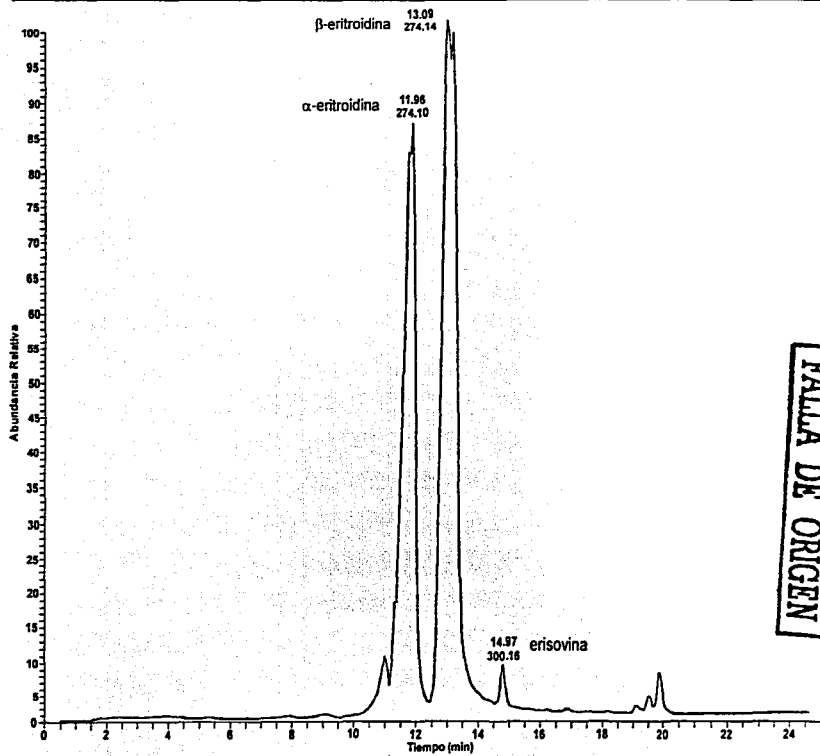
Anexo B. Reactivo de Dragendorff⁶⁵.

Solución A): Se pesan 0.25 g de Nitrato de bismuto y se disuelven en una mezcla de ácido acético : agua, en una proporción de 10 : 40.

Solución B): Se pesan 8 g de yoduro de potasio y se disuelven en 20 mL de agua. Se prepara una solución stock a partir de la solución A y B, mezclando las dos soluciones en una proporción de 1:1.

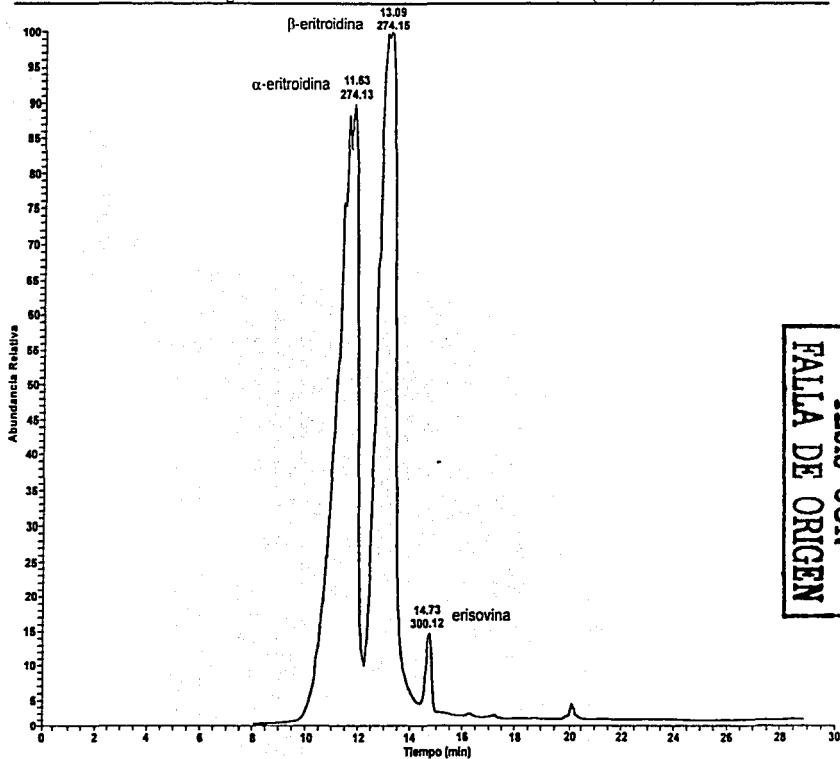
La solución para asperjar se prepara al momento, tomando 1 mL de la solución stock, posteriormente se disuelve en 2 mL de ácido acético y 10 mL de agua.

Anexo C. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto hexánico (semillas).



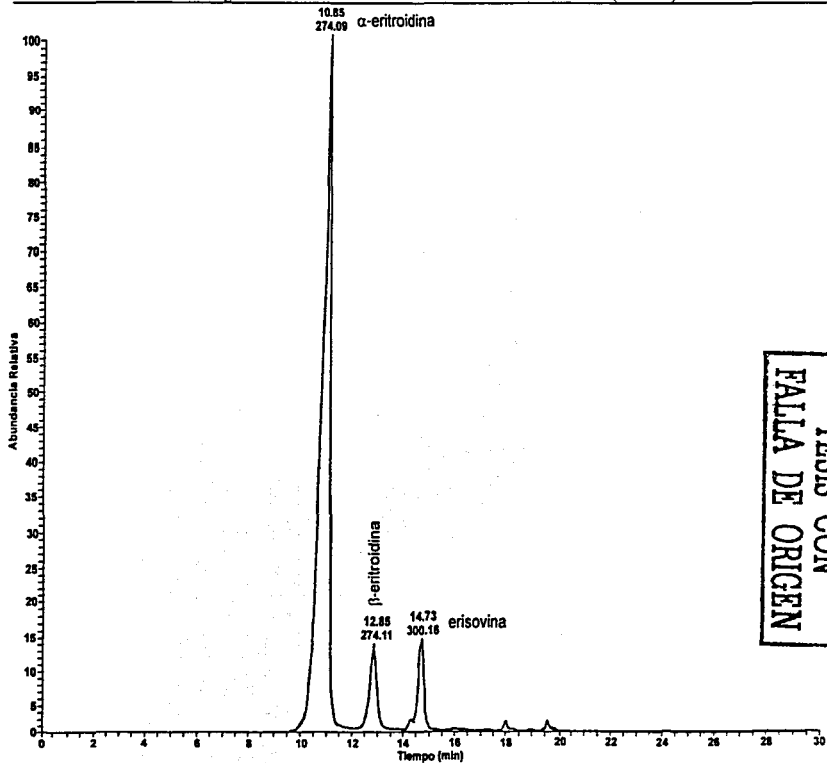
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo D. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (semillas).



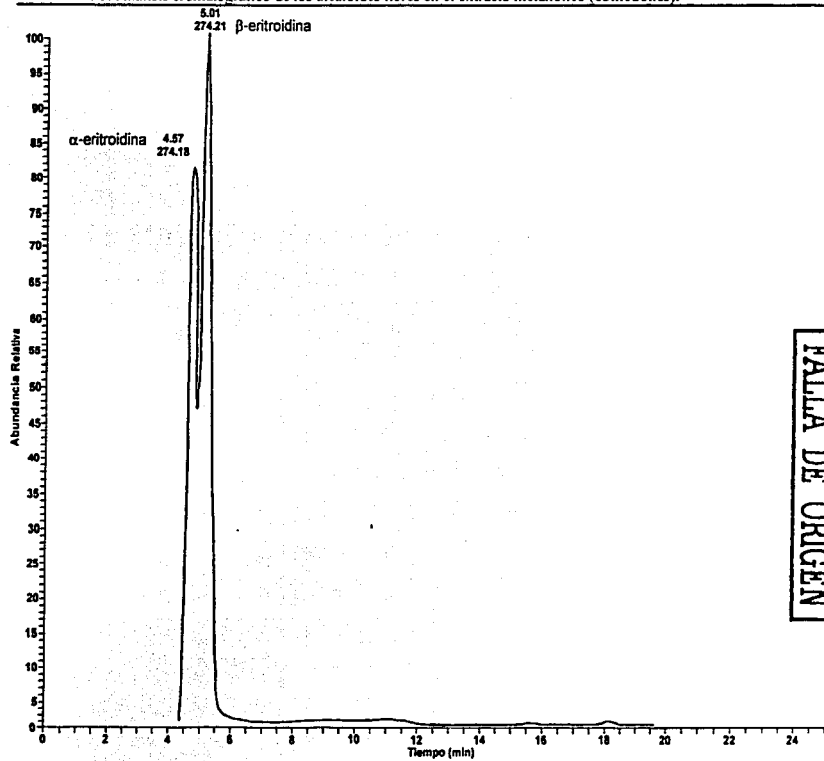
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo E. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (semillas).



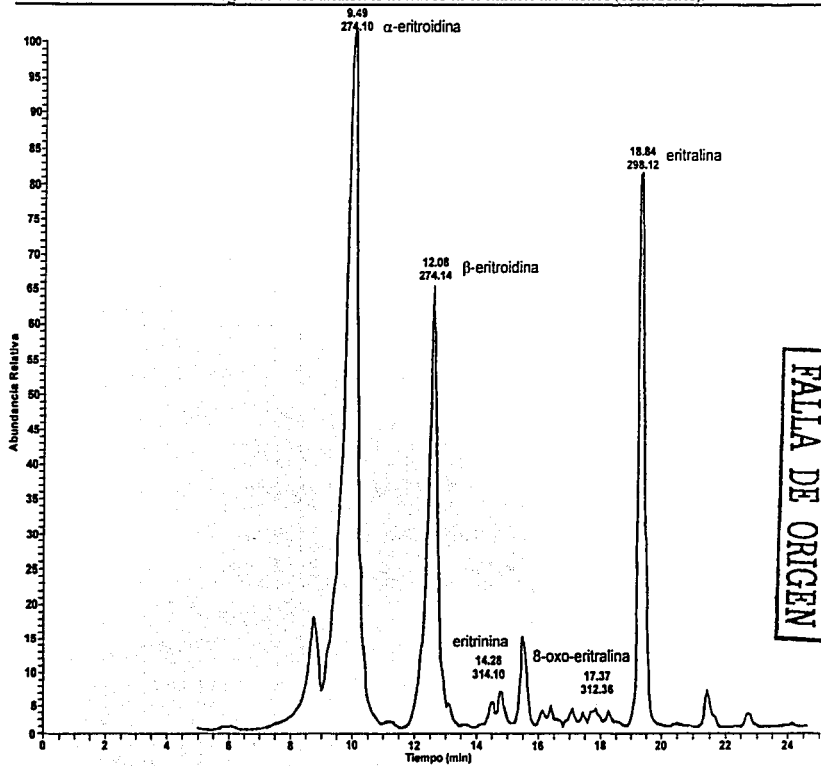
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo F. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (cotifedones).



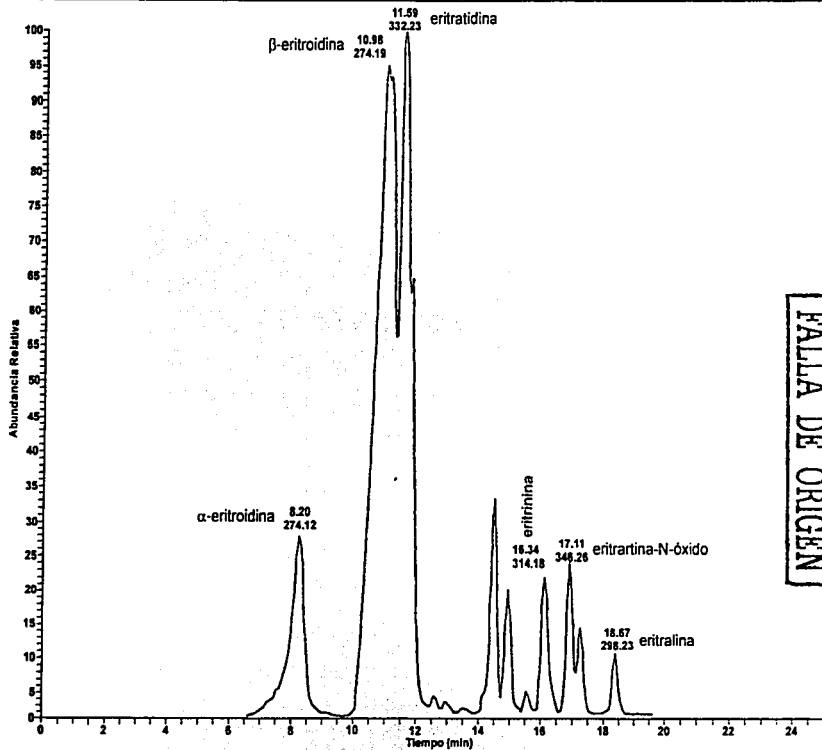
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo G. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (cotiledones).



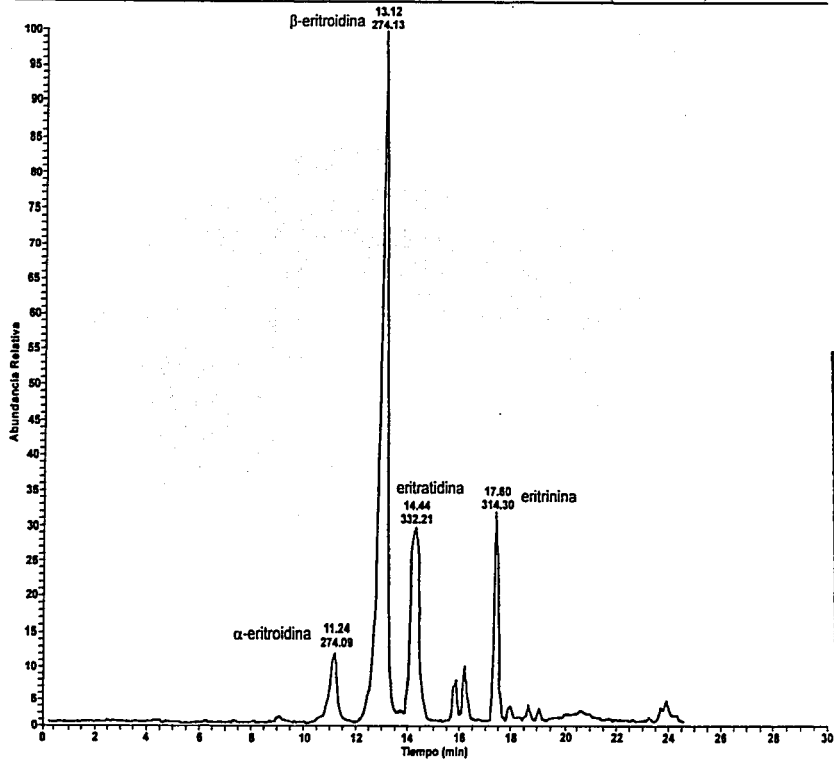
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Anexo H. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (1^{er} subcultivo).



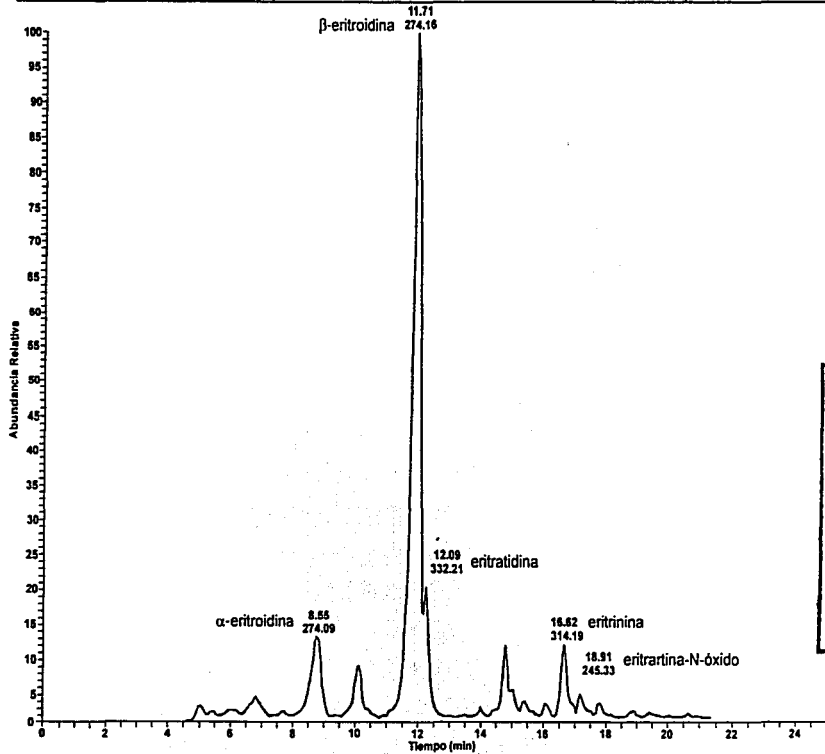
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo I. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (1^{er} subcultivo).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

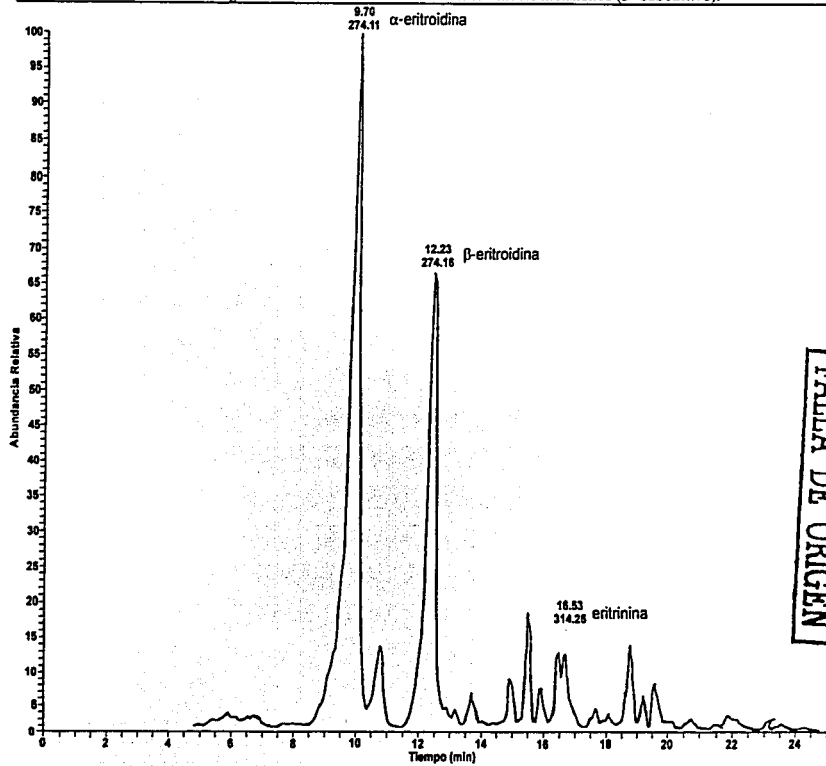
Anexo J. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (3^o subcultivo).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

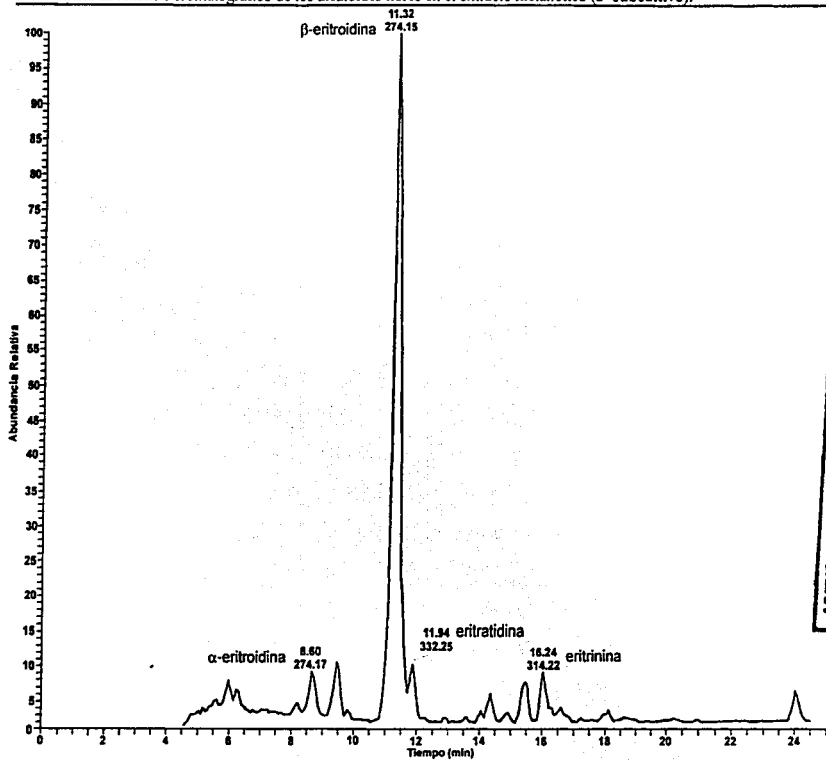
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Anexo K. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (3^{er} subcultivo).



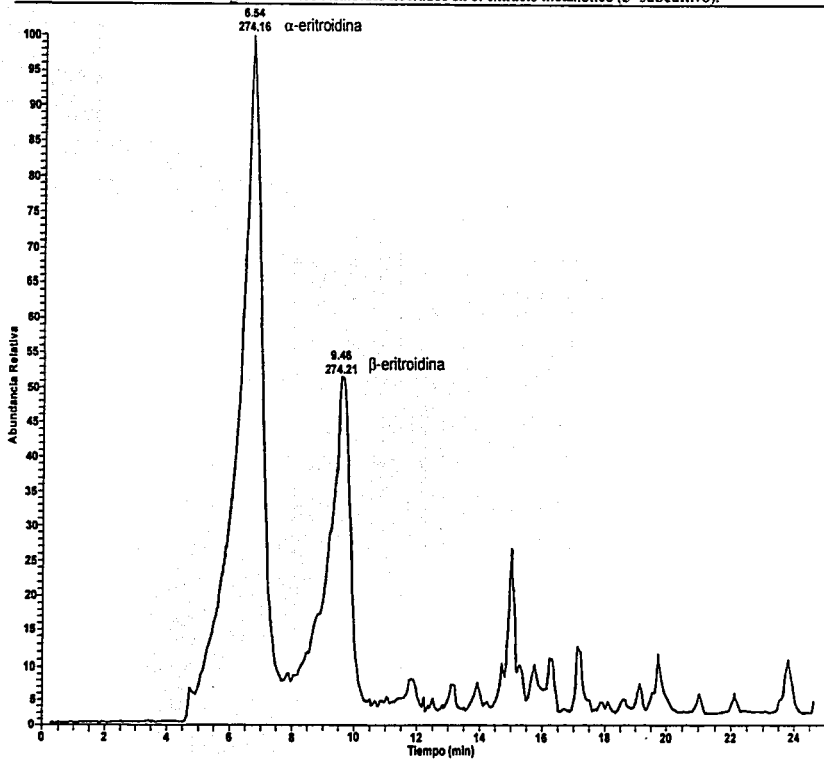
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo L. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (5° subcultivo).



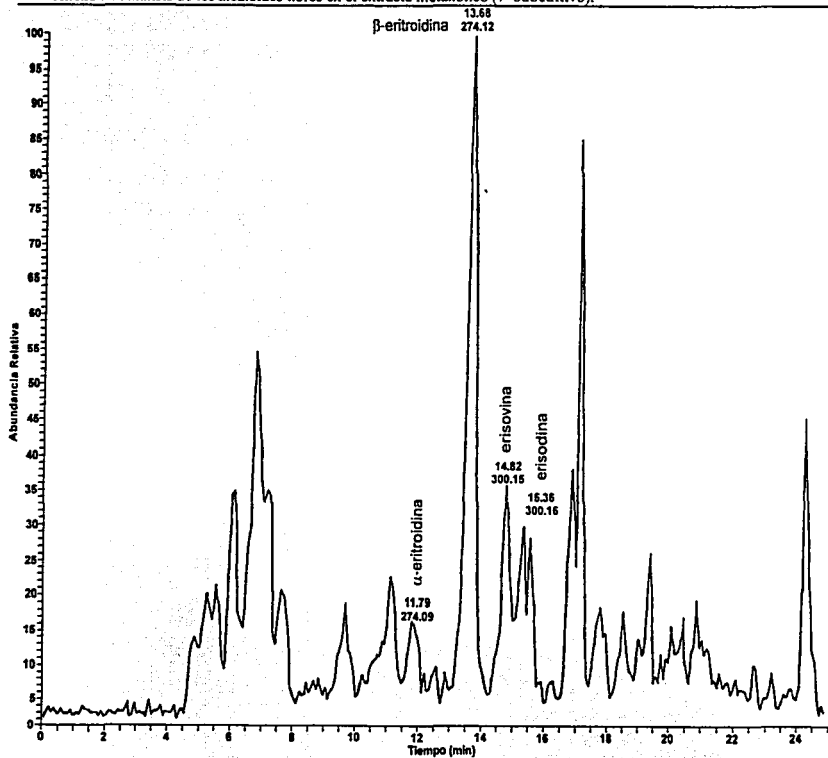
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Anexo M. Análisis cromatográfico de los alcaloides liberados en el extracto metanólico (5° subcultivo).



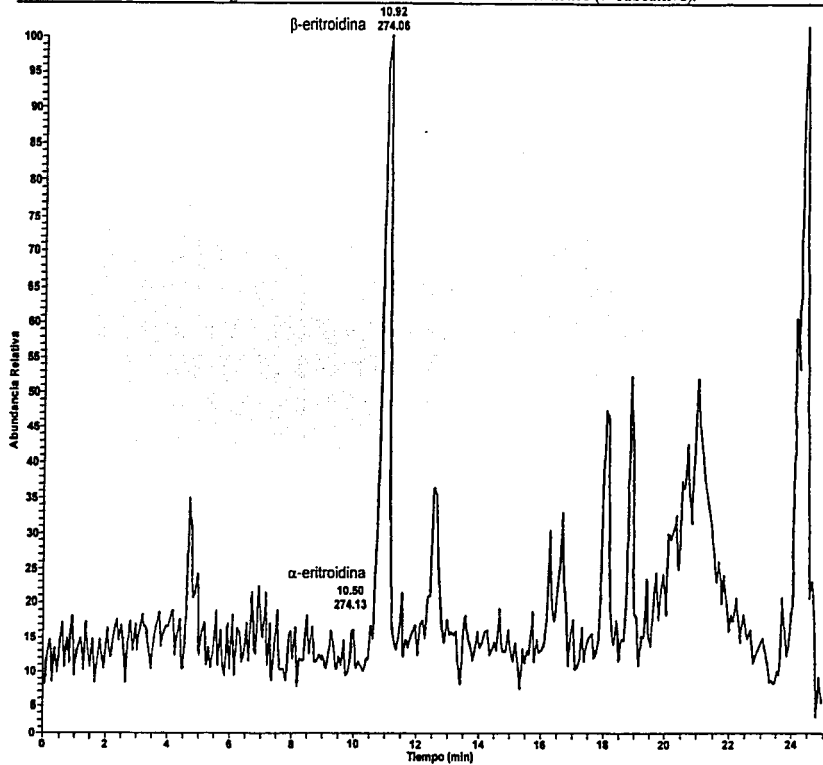
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Anexo N. Análisis de los alcaloides libres en el extracto metanólico (7^o subcultivo).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo O. Análisis cromatográfico de los alcaloides libres en el extracto metanólico (7° subcultivo).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN