



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO DE CÉLULAS EN
SUSPENSIÓN DE CASSIA SP. PARA SU
USO COMO BIOCATALIZADOR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ALEJANDRA FLORES HERNÁNDEZ



m340171

MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandra Flores

Hernández

FECHA: 20/10/05

FIRMA: [Firma manuscrita]

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Prof. Eduardo Bárzana García
Secretario	Prof. Arturo Navarro Ocaña
1 ^{er} Suplente	Prof. Francisco Ruiz Terán
2 ^o Suplente	Prof. Mari Carmen Quirasco Baruch

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 116, Departamento de Bioquímica, Laboratorio 321, Departamento de Alimentos, Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM.

Asesor:  Dr. Arturo Navarro Ocaña

Supervisor técnico: M. en C. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores



Sustentante:  Alejandra Flores Hernández

DEDICATORIAS

- * *Especialmente a las dos personas que me dieron la vida y las bases para continuar por mi propio pie este camino maravilloso que es la vida J.R.A.C.I.A.S esta meta cumplida es tanto suya como mía. A ti mamá por ser mi guía , mi apoyo y mi ejemplo: a ti papá porque se que estás conmigo en las buenas y en las malas. Les amo.*

- * *A mi hermana Azalea, porque a pesar de...., después de.... y además de..... : cuentas conmigo siempre.*

- * *A toda mi familia por estar siempre presente cuando lo he necesitado, no los nombro pero no los olvido a cada uno de ustedes mi más grande agradecimiento.*

- * *A mis tías Chees, Josefita, Mari y July por ser mi refugio, mi ayuda y por darme tanto cariño, para ustedes con el orgullo de hacerles sentir mi amor.*

- * *A mis abuelos gracias por todo su amor y enseñanza. Qui aquí esta lo que te prometí te quiero mucho.*

- * *A mis amigos Gabi, Claudia, Roberto, Miguel, Wilbert, Aloni, Maru, Carmen y Cynthia por formar parte de una de las mejores épocas de mi vida la UNIVERSIDAD.*
- * *A mi asesor el Prof. Arturo Navarro por su paciencia y confianza en la finalización de este trabajo.*
- * *A mi querida asesora Mayte gracias por compartir conmigo momentos muy difíciles de mi vida. Y sigue siendo para todos tus alumnos un gran apoyo.*
- * *Y por último y no menos importante a mi novio Arturo por estar conmigo en todo momento ser mi amigo, cómplice, compañero y confidente. Aneku Kai Apokhu. Te amo*
- * *Por supuesto a la Universidad Nacional Autónoma de México mi más grande agradecimiento por darme el honor y el privilegio de ser universitaria*

*Hasta una carrera
de diez kilómetros
comienza con
un paso*

INDICE

Abreviaturas	8
Resumen	10
1. Introducción	12
2. Objetivos	15
3. Antecedentes	16
3.1 Clasificación taxonómica de <i>Cassia sp.</i>	16
3.1.1 Distribución geográfica y condiciones ambientales de <i>Cassia</i>	
3.1.2 Ubicación Taxonómica y descripción de la especie.	
3.1.3 Propiedades químicas de <i>Cassia</i> .	
3.2 Cultivos de células vegetales	22
3.2.1 Obtención de cultivos de células vegetales	
3.2.2 Uso de los cultivos de células vegetales.	
3.3 Biotransformaciones	29
3.3.1 Definición	
3.3.2 Sistemas de biotransformación	
3.3.3 Métodos de biotransformación	
3.3.4 Utilidad y Adversidad de las biotransformaciones	
3.4 Ejemplos de Biotransformaciones con células vegetales	35
3.5 Acoplamiento oxidativo con peroxidasas	44
4. Hipótesis	46
5. Materiales y métodos	47
5.1 Materiales	48
5.1.1 Material biológico	
5.1.2 Medio de cultivo	
5.2 Métodos	49
5.2.1 Preparación de medios de cultivos	
5.2.2 Condiciones de incubación	

PARTE I Obtención del biotransformador	50
5.2.3 Germinación de semillas	
5.2.4 Inducción y proliferación del callo	
5.2.5 Curva de crecimiento del callo	
5.2.6 Establecimiento de células en suspensión	
5.2.7 Cinética de crecimiento del cultivo en suspensión	
PARTE II Biotransformación	55
5.2.8 Adición de Eugenol a el cultivo en suspensión	
5.2.9 Extracción del producto	
5.2.10 Cromatografía en capa fina	
6. Resultados y discusión	57
PARTE I Obtención del biotransformador	57
6.1 Germinación de semillas	
6.2 Inducción y proliferación del callo	
6.3 Evaluación del crecimiento del callo	
6.4 Establecimiento de células en suspensión	
6.5 Evaluación de crecimiento del cultivo en suspensión	
PARTE II Biotransformación	75
6.6 Biotransformación a través de la adición de Eugenol en el cultivo en suspensión	
6.7 Extracción del producto	
6.8 Cromatografía en capa fina	
6.9 Perspectivas	
7. Conclusiones	81
8. Anexo	83
9. Bibliografía	85

Abreviaturas

ANA	Ácido Naftalenacético
AIA	Ácido Indol acético
2, 4 - D	Ácido 2,4 - Diclorofenoxiacético
BAP	Bencilaminopurina
C.A.	Carbón Activado
C.C.F.	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
C.C.V.	Cultivos de Células Vegetales
dnc	Cultivo en callo
dns	Cultivo en suspensión
g	Gramos
H ₂ SO ₄ con.	Ácido sulfúrico concentrado
Hrs	Horas
Kg cm ⁻²	Kilogramos por centímetro cuadrado
KPa	Kilo pázcales
M	Molar
mL	mililitro
mm	milímetro
mML ⁻¹	Mili molar por litro
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)

mg L ⁻¹	Miligramos por litro
mM	Milimolar
NaSO ₄ anh.	Sulfato de sodio anhidro
μ Em ² s ⁻¹	Microeinstein por metro cuadrado por segundo (unidad de intensidad lumínica)
PF	Peso Fresco
PM	Peso molecular
PS	Peso Seco
Rf	Factor de retrazo
rpm	Revoluciones por minuto

Resumen

Las peroxidasas son enzimas que se caracterizan por catalizar el acoplamiento orto-oxidativo (dimerización) de compuestos fenólicos, lo cual es importante en la acción de los antioxidantes, ya que se tiene reportado que el poder antioxidante del dímero es mayor que el del monómero y que para esto se necesita un enlace C-C que una a las dos moléculas; esta unión se lleva a cabo gracias al acoplamiento oxidativo (43,60).

Se ha encontrado que *Cassia sp.* contiene una concentración alta de peroxidasas(7). Sin embargo la obtención de estas enzimas se hace difícil manejando plantas completas ya que se requieren de grandes espacios por ser un arbusto, además de mano de obra, lo que eleva los costos de producción. Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo principal el establecer el cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* para utilizarse como biocatalizador.

Durante este trabajo se logró establecer el cultivo de células en suspensión de la especie *Cassia sp.*, para lo cual se determinaron las condiciones adecuadas para la germinación de las semillas, evaluando distintos métodos de esterilización y lográndose la obtención de plántulas donadoras de explantes para utilizarlos en la producción de callo; en la inducción de éste, se probaron distintos medios de cultivo, utilizándose como medio básico los compuestos inorgánicos, así como las vitaminas del medio MS y distintas combinaciones de reguladores del crecimiento, lográndose la producción del

mismo en presencia de 2 mgL^{-1} de ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP. Posteriormente se proliferó el callo para después utilizarse como explante en el establecimiento de los cultivos en suspensión; dichos cultivos se probaron como un sistema biotransformador, al ponerlos en contacto con eugenol un antioxidante natural, observándose en la cromatografía de capa fina un compuesto con un Rf de 0.32(33,42).

1.- Introducción

A partir de las plantas se han podido extraer un gran número de compuestos orgánicos, los cuales son usados como fármacos, colorantes, saborizantes, aromatizantes, insecticidas y enzimas(39). Sin embargo, la producción de estas sustancias depende directamente de la disponibilidad que se tenga de las plantas, lo que a su vez, se ve limitada por varios factores tales como la distribución geográfica, variaciones ambientales y de comercialización entre otros.

Algunas de las reacciones bioquímicas que ocurren en las células de las plantas son muy complejas además de específicas y pueden no ser logradas por medio de los métodos tradicionales de síntesis químicas en las cuales se utilizan condiciones extremas, por ejemplo de presión o temperatura y además con bajos rendimientos. Este tipo de reacciones es posible lograrlas por medio del cultivo *in vitro* de células, órganos o enzimas de las plantas, es por ello que el cultivo de tejidos como parte de la biotecnología, resulta ser una alternativa en la producción de compuestos utilizados en la industria de la química y en particular en la producción de aditivos de alimentos de interés comercial, ya que aprovecha la habilidad que poseen las células para biotransformar sustancias exógenas, ya sean naturales o sintéticas, en sustancias potencialmente útiles.

Los compuestos químicos, que pueden sufrir biotransformaciones mediante las enzimas de las plantas son de naturaleza variada, entre los cuales encontramos esteroides, alcaloides, cumarinas, terpenoides y otros.

Las transformaciones químicas de algunos compuestos son extremadamente complicadas y costosas, por lo tanto las biotransformaciones usando cultivo de tejidos vegetales y enzimas aisladas tienen un inmenso potencial de producción. Las biotransformaciones con enzimas de plantas pueden ser aplicadas tanto para la producción de nuevos compuestos como para modificar los ya existentes mejorando en algunos casos su espectro de bioactividad o reduciendo los efectos secundarios de las mismas modificando la molécula de origen(3,48).

La biotransformación de compuestos orgánicos por medio de estas técnicas tiene una alta capacidad para obtener compuestos naturales, puesto que a través de dichas técnicas las células son capaces de ejecutar biotransformaciones regioespecíficas y estereoespecíficas.

Las peroxidasas son enzimas que se han estudiado en el campo de las biotransformaciones debido a su poder en la síntesis de antioxidantes, mismos que sirven para controlar procesos de envejecimiento. Una de las características más importantes que tiene este grupo de enzimas es la de catalizar el acoplamiento oxidativo. Se ha reportado recientemente la presencia de peroxidasas en *Cassia sp.* (4).

En base a las razones expuestas, se justifica la realización del presente estudio, que consiste en establecer las condiciones adecuadas para el crecimiento de células en suspensión de *Cassia sp.* y con ello poder obtener en el laboratorio, compuestos y enzimas que esta planta produce.

2.- Objetivo General

Determinar las condiciones adecuadas para el cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* y utilizarlo como biotransformador.

2.1 Objetivos particulares

Establecer las condiciones adecuadas para llevarse a cabo la germinación *in vitro* de semilla de *Cassia sp.*

Probar y seleccionar distintos medios de cultivos en base a reguladores de crecimiento para la obtención del callo a partir de distintos explantes.

Determinar las condiciones adecuadas para el establecimiento del cultivo en suspensión de *Cassia sp.*

Determinar la cinética de crecimiento de cultivo de células en suspensión a través de peso seco y fresco.

Realizar biotransformaciones con el cultivo en suspensión de *Cassia sp.*

3.- Antecedentes

3.1 Clasificación taxonómica de *Cassia sp.*

3.1.1 Distribución Geográfica y Condiciones Ambientales de *Cassia sp.*

El género *Cassia* se encuentra ampliamente distribuido tanto: al Norte de África, como en Asia (India, Japón y Corea), lugares de donde provienen reportes recientes en el estudio de estas plantas. Así mismo existen varias especies del género *Cassia* que son muy importantes en la parte alta de los Andes. Para el caso de *Cassia sp.* (*Senna multiglandulosa* también clasificada como *Cassia tomentosa*) es aparentemente nativa de la cordillera de los Andes y las cordilleras de América Central y México. En este último se ha localizado en los estados de: Querétaro, Hidalgo, Oaxaca y Morelos.(9,19)

El género *Cassia* es exigente en sus necesidades de luz, y no soportan las heladas, se adaptan a muchas clases de suelos y se le encuentra principalmente en las quebradas húmedas (con suelos profundos y buena cantidad de materia orgánica), donde el arbusto alcanza su máximo desarrollo; pero también crece en suelos pobres, erosionados, pedregosos y poco profundos. Al parecer el pH preferido es neutro, con ligera variación hacia ácido o alcalino.(5,19,48)

3.1.2 Ubicación Taxomómica y Descripción de la Especie.

El género *Cassia* es una leguminosa perteneciente a la familia leguminosae; a continuación se presenta ampliamente su ubicación taxonómica:

DIVISIÓN	<i>Angiospermae</i>
CLASE	<i>Dicotyledoneae</i>
SUBCLASE	<i>Arquiclamideae</i>
ORDEN	<i>Rosales</i>
FAMILIA	<i>Leguminosae</i>
SUBFAMILIA	<i>Caesalpinioideae</i>
TRIBU	<i>Cassieae</i>
GÉNERO	<i>Cassia</i>
ESPECIE	<i>Sp.</i>

Fuente: Evans,1995

Cassia sp. es un arbusto erguido que mide de 50 cm hasta 3,5 m de altura, con fuste cilíndrico, casi siempre torcido y ramificación alterna desde la base. Las flores son completas y racimosas, de color amarillo, dispuestas en racimos axilares; alargados o corimbiformes. Planta herbáceas o leñosas, con las hojas piñadas (5,48).

Los frutos son vainas sub-cilíndricas de cubierta lisa o con pilosidad, las vainas miden de 7 a 10 cm de largo y 1 cm de ancho, con ligeras contracciones entre semilla y semilla.

Las flores de *Cassia* constan de cáliz con 5 sépalos imbricados. Corola de 5 pétalos de prefloración imbricada, cigomorfa, con los pétalos subiguales libres entre sí. Androceo de 10 estambres libres, fértiles o algunos transformados en estaminodios; en nuestras especies los 3 posteriores son estaminodios, los 4 medios son fértiles y los 3 anteriores son también fértiles, pero de filamentos más cortos y anteras más largas, curvas. Ovario multiovulado con el estilo de longitud variable y el estigma terminal, truncado. Legumbresa multiseminadas, dehiscentes o indehiscentes(26, 56).

En la figura No. 1 se puede observar una fotografía de *Cassia*, en donde es posible apreciar las flores de la misma, en color (amarillo) y forma (racimosas, con corola de cinco pétalos) (30).



Figura No.1 Fotografía de *Cassia* sp.

Fuente: www.ncl.ac.uk/airweb/fluoride/SAF.htm

3.1.3 Propiedades químicas de *Cassia*.

Las especies del genero *Cassia* han sido poco estudiadas en México, aunque se tiene conocimiento de sus propiedades medicinales desde la época prehispánica. Así pues, la Flor del Secreto (Yucatán) (*Cassia alata*) según Reko es el Ecapatli de Hernández que los indios usaban contra la sífilis; además también era conocida como Totoncaxihuitl (hierba de la fiebre) y que se emplea contra la fiebre. Standley añade que, " se dice que las hojas tienen

propiedades purgantes, diuréticas y sudoríficas y que se emplea como remedio contra varias enfermedades cutáneas”(5,15,56).

La mayor parte de las especies de *Cassia* presentan como compuestos mayoritarios Antraquinonas (4,5,41), Flavonoides (4,5,19), Esteroles (22,23), Polisacáridos (5,56).

En el cuadro No.1 se presentan diferentes especies de *Cassia*, así como su principio activo y la actividad biológica que este presenta. En el cuadro No.2 se presentan los compuestos obtenidos de diferentes especies de *Cassia*

Cuadro No. 1 Actividad biológica y principio activo aislado de diferentes especies de *Cassias*.

<i>Cassia</i>	Parte de la planta	Act. Biológica	Principio activo
<i>Cassia italica</i>	Hojas	Antibacterial Actividad (en papas)	1,5-dihidroxi-3-metilantraquinona
<i>Cassia obtusifolia</i>	Semillas	Inhibición de la Actividad plaquetaria	Derivados de 9,10 antraquinona
<i>Cassia tora</i>	Semillas	Actividad antihepatotóxica	Glicósidos de Naftopirona

Fuente: Arrieta, 1995

Cuadro No. 2 Compuestos obtenidos de diferentes especies de cassia

Cassia	Parte	Compuestos
<i>C. nodosa</i>	Hojas	Kaempferol, kaempferol-3-ramnosido
<i>C. ovata</i>	Semillas	Polisacáridos
<i>C. siamea</i>	Flores	Cassianina, lupenona, bakarol, colesterol, 24-metilcolesterol, sigmásterol, sitosterol.
<i>C. sophera</i>	Flores	Crisofanol, ramnetin-3-0-β-D-Glucósido, sitosterol, campesterol, fucosterol.
<i>C. fistula</i>	Flores	Rhein y glicósidos, Senosidos A y B, β-sitosterol, stigmásterol, 28-isofucosterol.
<i>C. noname</i>	Semilla	Emodin-9-antrona, fiscion 10-10 biantrona
	Partes aéreas	Crisofanol, phiscyon y emodin
<i>C. fistula</i>	Hojas	Crisofanol, rhein y phiscyon
<i>C. longiracemosa</i>	Hojas	Crisofanol, toracrisom, crisofanol biantrona, crisofanol-isophiscyon biantrona, isophiscyon biantrona, rubrofusarin, nataloe-emodin.
<i>C. corymbosa</i>	Hojas	Crisofanol, emodin, hidroquinona, metoxihidroquinona, hidroquinona-metileter, β-sitosterol, stigmásterol.
<i>C. floribunda</i>	Hojas	Floribundona-1, floribundona-2, phiscion, N1-N8-dibenzoilespermidina.
<i>C. siamea</i>	Hojas	Siamina A, B y C

Fuente: Arrieta 1995

3.2 Cultivo de células vegetales

La tecnología de los cultivos de células ha empezado a ser conocida en los últimos veinte años y los principios del tema pueden buscarse a finales del siglo diecinueve. El primer trabajo documentado es el de Haberlandt, quién en 1898, intentó cultivar células únicas, aisladas de varias partes de la planta. Aunque los cultivos celulares de Haberlandt aparentemente permanecieron viables durante algún tiempo, no mostraron signos de división celular. Así que otros investigadores repitieron sus experimentos y a finales de los años 30, White y Gautheret en particular, fueron capaces de describir el crecimiento y la división celular en cultivos establecidos a partir de diferentes especies. A medida que empezaron a entenderse los requerimientos necesarios para obtener cultivos con éxito, se establecieron cultivos de más especies. Un desarrollo importante fue la regeneración de plantas enteras a partir de células cultivadas. Muchas células de plantas tienen la propiedad de totipotencia, es decir, cada célula contiene en el genoma la información completa requerida para dar lugar a una copia exacta de la planta parental. En consecuencia es posible regenerar plantas enteras a partir de células tomadas de las raíces, hojas o tallos (11, 37).

3.2.1 Obtención de cultivos de células vegetales

Los cultivos de células de plantas se inician a través de la formación de un callo que es esencialmente una masa de células no diferenciadas. El callo, aunque es un principio obligatorio al proceso de cultivo, está lejos de ser un sistema ideal con el cual trabajar. Su crecimiento lento y heterogéneo no es adecuado para hacer experimentos a gran escala, o como sistema de

producción y es igualmente insatisfactorio como herramienta para experimentos bioquímicos y fisiológicos. Por consiguiente, mucha gente que trabaja con cultivos de tejidos se mueve rápidamente a la etapa siguiente, que es el cultivo líquido. El callo se obtiene por excisión de una pieza de tejido, llamada explante, de la planta parental, que se coloca sobre una base nutritiva o bien llamado medio de cultivo solidificado con agar u otro agente como gellan.

El éxito de los cultivos de tejidos vegetales se debe en gran medida a la naturaleza del medio de cultivo. Para un crecimiento vigoroso y saludable, las plantas necesitan de un suelo con macronutrientes (sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre) y micronutrientes (sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto). El medio de cultivo no sólo debe contener sales de micro y macronutrientes, también debe contener una fuente de carbono, comúnmente sacarosa, así como otros compuestos orgánicos entre los que se encuentran algunas vitaminas, antioxidantes y reguladores de crecimiento(14, 29,49).

El proceso entero debe ser llevado a cabo bajo condiciones asépticas y antes de que la pieza de tejido del explante sea transferida al medio de cultivo, su superficie debe ser cuidadosamente desinfectada de lo contrario los microorganismos sobrepasan el desarrollo de las células de las plantas. La desinfección de las superficies se lleva a cabo normalmente lavando el tejido con hipoclorito sódico al 5%, cloruro de mercurio al 2% o etanol al 80% durante tiempos variables, después de lo cual el agente esterilizante se elimina por lavado repetido del tejido en agua destilada estéril. Debe igualmente tenerse precaución en no exponer excesivamente los tejidos a los agentes esterilizantes lo que puede resultar en un descenso de la viabilidad

de las células y en la dificultad de establecer un cultivo. En lugar de los explantes de la planta, existe una creciente tendencia a iniciar cultivos a partir de semillas. Estas son generalmente más fáciles de esterilizar, su superficie y en muchos casos las semillas darán lugar a callos al igual de fácil que los explantes de los tejidos.

Una vez esterilizado el explante o la semilla, se coloca sobre el nutriente solidificado en un frasco cubierto con material permeable a gases pero que no permita la entrada de bacterias. Una vez cerrado el frasco que contienen el explante, se coloca en un incubador, generalmente a 25 °C, a veces con luz y a veces en la oscuridad. Después de 1 a 2 semanas, dependiendo de la variedad de factores que incluyen la especie, el origen del tejido, régimen nutritivo, etc., el explante comienza a proliferar células en la forma de una masa general de material celular. Cuando esta masa de callo ha alcanzado un tamaño razonable, se separa del explante parental y se coloca en medio nutritivo fresco. Luego se continúa proliferando, típicamente hasta una gran masa rugosa.

El éxito del cultivo líquido con células vegetales depende en gran medida de la formación de un callo; friable esto es, cuando se introduce en medio líquido en un matraz, colocado sobre una plataforma rotatoria, se rompe bajo el movimiento turbulento, para dar un cultivo compuesto de una mezcla de células libres y agregados celulares. Tal sistema es mucho más manejable que el callo para las investigaciones bioquímicas y los estudios del proceso de desarrollo; el crecimiento es generalmente mucho más rápido, hay más células en contacto directo con el nutriente y el grado de heterogeneidad del cultivo es mucho más reducido(10,13,16, 45).

En la figura No.2 se muestran los métodos para la iniciación de cultivos vegetales en medios líquidos; llamados también cultivos de células en suspensión.

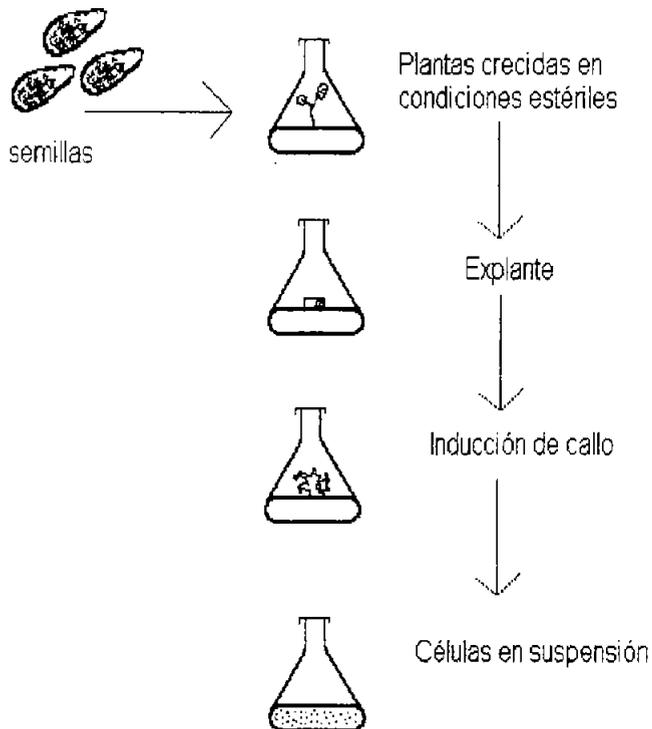


Figura No.2 Establecimiento de una línea de cultivos de células vegetales

Sin embargo la producción industrial de cultivos de tejidos presenta un gran número de retos tecnológicos que aún no quedan totalmente resueltos, entre los que se pueden citar los siguientes:

- Las células vegetales presentan paredes rígidas y son de mayor tamaño, esto obliga al biotecnólogo a emplear sistemas de agitación apropiados que no dañen las estructuras de las células.
- Los tiempos de duplicación son mucho más prolongados que en el caso de los microorganismos, creando la necesidad de diseñar biorreactores con un mayor grado de sofisticación y disminuir con esto, la probabilidad de contaminación inherente.
- Las células vegetales en los biorreactores presentan una tendencia natural a la agregación, reduciendo sensiblemente los coeficientes de transferencia de oxígeno.
- Las células vegetales normalmente no excretan sus productos metabólicos al medio que los rodea, por lo que es necesario romperlas por medios físicos o químicos para separarlos(21).

3.2.2 Uso de los cultivos de células vegetales.

En la actualidad la técnica de cultivos de células vegetales se utiliza en cuatro vertientes esencialmente: propagación de plantas *in vitro* (micro propagación) en horticultura y silvicultura, principalmente; producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos en masa de células vegetales, en tercer lugar la utilización de técnicas de DNA recombinante para la modificación genética de plantas y por último en la preservación de germoplasma agronómico y silvestre.

Micro propagación: El procedimiento de propagación básico consta de tres estadios: (1) selección y esterilización de explantes adecuados y su transferencia a un medio nutritivo, (2) proliferación de los brotes en un medio de multiplicación y (3) transferencia de los brotes a un medio de arraigue y plantación. De esta manera se pueden acumular en meses, en lugar de en años, stocks libres de enfermedades de cientos de plantas. Esta técnica ha demostrado su éxito en la propagación de plantas ornamentales (2,6, 8, 36).

Preservación de germoplasma: La disminución de especies cultivadas y silvestres es debida a dos causas fundamentales: la destrucción de los ecosistemas por sobreexplotación, contaminación y a la introducción de variedades de alta productividad que han sustraído por completo las variedades tradicionales. Por tal motivo es necesario mantener resguardada la gran riqueza genética con la que se cuenta (8,29).

Mejoramiento genético: La obtención de nuevas variedades tolerantes a la sequía a la salinidad y resistentes a los hongos patógenos y plaguicidas, se puede lograr directamente a partir de células cultivadas *in vitro* a través de: selección de clonas somáticas con las características fisiológicas deseadas o aumentando el rango de entrecruzamiento entre especies genéticamente distantes por medio del rescate de embriones de híbridos incapaces de desarrollarse en condiciones naturales(10, 39).

Producción de metabolitos secundarios: La información genética requerida para la manufactura de metabolitos secundarios está también presente en las células indiferenciadas y cuando son activados darán lugar a la producción de estos. Esto ha despertado el interés de llevar a cabo el crecimiento de determinadas células a escala comercial para la producción de metabolitos

apreciados. Mediante el intenso estudio de los medios nutrientes y la selección de razas de alto rendimiento, a lo largo de varios años se han logrado algunos casos en donde los rendimientos son hasta diez veces mayores que los obtenidos en la planta (18,17, 27,28).

Otra aplicación de los cultivos de células vegetales es la biotransformación de muchos compuestos orgánicos. La adición de precursores es un campo muy promisorio, lo cual puede incrementar el rendimiento en la obtención de metabolitos secundarios. La biotransformación de compuestos se encuentra aún en la fase inicial lo que requerirá de una gran investigación antes de ser explotada comercialmente.

En el cuadro No.3 se muestran algunas de las sustancias que ya han sido obtenidas de cultivos de tejidos, así como el tipo de cultivo utilizado para algunos casos o precursor en otros.

Cuadro No.3 Principales productos obtenidos por cultivos de células vegetales

Sustancia	Especie productora	Tipo de cultivo / precursor
Ácido cinámico	<i>Nicotiana tabacum</i>	d.n.c.
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	<i>Linum usitatissimum</i>	d.n.c.
Lariofileno	<i>Lindera strychnifolia</i>	d.n.c.
2- Undecanona y 2-undecil acetato	<i>Ruta graveolens</i>	d.n.c.
Steviosido	<i>Stevia rebaudiana</i>	d.n.c.
Limoneno, linanol	<i>Perilla frutescens</i>	d.n.c.
Anetol	<i>Foeniculum vulgare</i>	d.n.c.

Dialil sulfato	<i>Allium cepa</i>	d.n.c.
Famesol	<i>Andrographis paniculata</i>	d.n.s.
2- Fenil glucósido	<i>Tropeaeolum majus</i>	d.n.s.
Glicimicin	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	d.n.s.
Aroma de manzana	<i>Malus silvestris</i>	d.n.s.
L-glutamina	<i>symphytum officinale</i>	d.n.s.
Notkatone	<i>Citrus sp.</i>	valencena
Digoxin	<i>Digitalis lanata</i>	Digitoxin
Sesquiterpenos	<i>Solanum tuberasum</i>	solavetivona
Carvoxona	<i>Nicotiana tabacum</i>	carvoxima
5-formil elipticina	<i>Choisya ternata</i>	elipticina
Antraquinonas	<i>Galium moolugo</i>	2- succinil benzoato
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	Ácido isocáprico
Quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	
Menta	<i>Menta sp.</i>	

Fuente: (García, 1999)

d.n.c. cultivo en callo

d.n.s. cultivo en suspensión

3.3 Biotransformaciones

3.3.1 Definición

El termino biotransformación o también llamado bioconversión se aplica a los procesos en donde un compuesto orgánico es transformado a un producto diferente recuperable, mediante una serie de reacciones químicamente definidas, catalizadas por enzimas contenidas o no en las células (38,57,59).

Las biotransformaciones frecuentemente se prefieren a los procesos químicos cuando se requiere alta especificidad, para atacar un sitio específico sobre el sustrato, y para preparar un único isómero del producto. Esto se justifica por el alto rendimiento típico de las conversiones biológicas, que frecuentemente excede el 90 % con células microbianas. Las biotransformaciones se llevan a cabo a temperatura (20-40 °C) y presión ambiente (0-34 kPa), ventajas sobre los procesos químicos que frecuentemente requieren un significativo aporte de energía, y se llevan a cabo generalmente en medio acuoso, que produce menos contaminación que los solventes orgánicos utilizados en las conversiones químicas. Por otra parte las diluciones a las que operan las biotransformaciones constituyen una desventaja debido a la dificultad de recuperar el producto(3, 38, 49).

3.3.2 Sistemas de biotransformación.

Las biotransformaciones pueden ser llevadas a cabo por distintos sistemas entre los cuales encontramos: células microbianas, de plantas o de animales, así como organelos que pueden suministrar las enzimas para la transformación(29).

Los microorganismos superan a las células de las plantas y de los animales en varios aspectos. Su alta relación superficie volumen les confiere un crecimiento rápido y altas velocidades de metabolismo, que conducen a la eficiente transformación de los sustratos que les añaden(11, 38).

Los cultivos de células animales y las preparaciones de órganos pueden ser útiles en la transformación de compuestos orgánicos pero son complejos de

operar incluso a escala de laboratorio. La β -hidroxilación de la desoxicorticosterona a corticosterona condujo al primer proceso industrial para la transformación biológica de la hidrocortisona a partir del compuesto S de Reichstein, pero esta observación también incitó a los microbiólogos a buscar microorganismos capaces de 11- β hidroxilar esteroides y el proceso con glándulas suprarrenales fue pronto reemplazado por el proceso microbiano mucho más eficiente(38).

Las células de las plantas que nos ocupan en este trabajo, poseen un repertorio de enzimas muy amplio como son proteolíticas, oxido-reductasas peroxidasas, glucohidrolasas etc., para la transformación que incluso pueden sobrepasar a los microorganismos en la consecución de ciertas reacciones, como la hidroxilación de los cardenólidos.

Sin embargo las células de plantas crecen lentamente en cultivo artificial y la transformación de un precursor natural o sintético, a un producto puede requerir varias semanas. Durante los pasados veinte años, se han conseguido avances significativos en el cultivo de células de plantas y pueden esperarse procesos industriales en los que la reacción deseada sea exclusiva de las células de plantas(8,16,52).

3.3.3 Métodos de biotransformación.

Para Leuengerger (37), una biotransformación se puede llevar a cabo por cualquiera de los siguientes métodos:

- Mediante el uso de células en crecimiento. En este caso el precursor, se incorpora al medio de cultivo desde la inoculación o bien durante el transcurso de etapas posteriores en donde el crecimiento celular aún no ha terminado.
- Mediante el uso de células cosechadas. La primera etapa de este método consiste en permitir un crecimiento celular abundante en un medio de cultivo especial llamado de crecimiento. Después estas células se separan por centrifugación o filtración para incorporarlas a un segundo medio; el de bioconversión, que contiene el precursor. Un ejemplo de este proceso es el uso de esporas microbianas como biocatalizadores.
- Mediante el uso de células inmovilizadas. Aquí es necesario producir las células en un medio apropiado, para después separarlas e inmovilizarlas. Esto último puede realizarse con el uso de cualquiera de las siguientes técnicas: atrapamiento en polímeros porosos, adsorbiendo a las células sobre la superficie de soportes insolubles, induciendo ligaduras covalentes a los soportes o bien induciendo una agregación física o química
- Mediante el uso de enzimas purificadas. En algunos casos es necesario emplear enzimas con un alto nivel de purificación, esto se debe a que: o bien hay una difusión inapropiada de los precursores a través de la membrana de las células, o bien que el producto de la transformación no se difunda una vez producido. Una condición indispensable para recurrir a este método es que la enzima debe separarse y purificarse con cierta facilidad. El uso de estas enzimas puede ser en su forma libre o también inmovilizada.

- Mediante el uso de sistemas multifase. En el caso de los precursores y productos, al menos uno de ellos, insolubles en agua, se recomienda trabajar en dos fases, una acuosa que contiene la enzima o las células y un solvente no miscible en agua.
- Mediante el uso de multiconversión. Para el caso en que la bioconversión requiera de dos o más pasos secuenciales.

A continuación se resumen algunas razones para usar biotransformaciones:

- Transformación de moléculas naturales poco reactivas.
- Modificación de las propiedades físico-químicas.
- Estudio del metabolismo.
- Modificación de arquitecturas moleculares complejas.
- Aumento de la actividad biológica.
- Disminución de los efectos de disponibilidad.
- Poca cantidad del fitocompuesto e importante actividad biológica.

El método convencional para llevar a cabo una biotransformación es el siguiente: una suspensión de células se utiliza para inocular un matraz que se mantiene en agitación conteniendo un medio adecuado. Después de algunos días de incubación (dependiendo del tipo de célula) a la temperatura óptima, el sustrato se añade frecuentemente en un solvente miscible en agua (propilenglicol, etanol, metanol, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida) hacia el final de la fase de crecimiento. Y se permite que proceda la transformación; se toman muestras para seguir el curso de la biotransformación. Las estructuras de los productos transformados se elucidan por los métodos químicos clásicos.

3.3.4 Utilidad y adversidad de las biotransformaciones

Las biotransformaciones ofrecen una extensa serie de reacciones, unas pocas han emergido como importantes procesos industriales. En la fabricación de productos químicos orgánicos, la elección de los industriales oscila entre la síntesis orgánica tradicional y la biotransformación. Y esta decisión es determinada únicamente por las ventajas económicas que éstas ofrecen(3).

Los procesos biotecnológicos introducidos requieren frecuentemente importantes inversiones para asegurar el equipo necesario para manejar grandes volúmenes de reactivos biológicos en condiciones asépticas. Las bajas concentraciones de los substratos y de los productos y las reacciones lentas son típicas de los procesos biológicos. Sin embargo las biotransformaciones serán preferidas cuando reemplacen varias etapas químicas en un solo paso.

El rendimiento de las bioconversiones por cultivos de células u órganos dependerá de la variación de factores incluyendo la solubilidad de los precursores, la cantidad de enzima activa presente en el medio, la localización de las enzimas, presencia de reacciones que producen moléculas no deseadas y la presencia de enzimas que degraden el producto deseado. La elicitación, permeabilización (dimetil sulfoxido y alcoholes orgánicos), variaciones en el pH y los efectos osmóticos pueden también influenciar en la capacidad de bioconversión de las células(3,52).

El campo de las biotransformaciones está evolucionando a medida que se diseñan y desarrollan nuevos procesos de transformación: la inmovilización de células, esporas y enzimas para aumentar la estabilidad y operación continua, los sistemas de fase reversa para la transformación de sustratos insolubles en agua(47).

La aportación de la genética a la biotransformación ha sido modesta. Se espera que la tecnología del DNA recombinante sea explotada para clonar en un organismo único los genes de diferentes organismos, que codifiquen para las reacciones deseadas. Tal clon podría llevar a cabo una secuencia de reacciones en una etapa única y mejorar así la naturaleza económica de las biotransformaciones(38,45).

3.4 Ejemplos de biotransformaciones con células vegetales

Numerosas reacciones que han utilizado la técnica de las biotransformaciones por medio de células completas, órganos o enzimas vegetales, han sido estudiadas; a continuación se presentan las más representativas:

Hidroxilaciones: Las células poseen la habilidad de hidroxilar con regio y estereoselectividad de dobles enlaces carbono-carbono en la posición alílica. Las hidroxilaciones se han utilizado principalmente en la preparación de precursores útiles en la síntesis de compuestos naturales, como es la bioconversión de la waferina a su alcohol correspondiente por *Catharanthus roseus* ya ha sido reportado (25).

También *C. roseus* hidroxiló geraniol y nerol a 5 β - hidroxineodihydroxycarveol (3). La bioconversión de β -metidigitoxina en β -metildigoxina (hidroxilación 12- β) por medio de los cultivos de células de *Digitalis lanata* se muestra en la figura No. 3 (1,44,40).

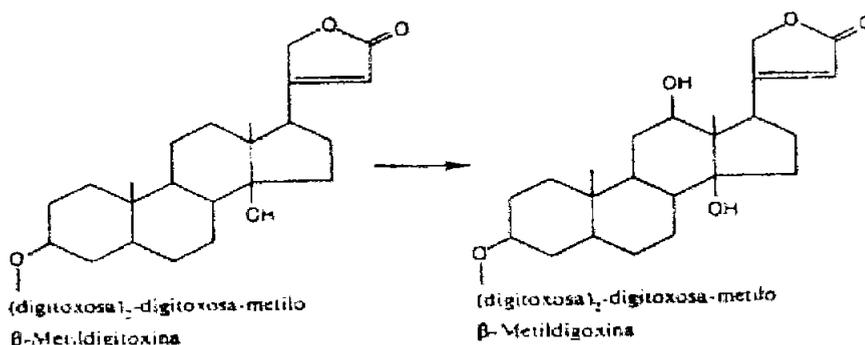


Figura No. 3 Bioformación de β -metildigoxina, a partir de cultivos de células de *Digitalis lanata*.

Glicosilaciones: En este tipo de reacciones los cultivos de células vegetales son de gran interés ya que es difícil ejecutar esta reacción por microorganismos o por síntesis química. Las reacciones de glicosilación son de vital importancia debido a que facilitan la solubilidad en agua de compuestos insolubles en la misma. El ac. Butírico ha sido glicosidado a 6-O-butiril-D-glucosa, por *Nicotiana plumbaginifolia* con lo cual logra aumentar su vida media y prolongar su actividad como potente inhibidor de tumores (34). Utilizando el eugenol como precursor se ha logrado glucosidarlo en el grupo

hidroxilo mediante cultivos celulares de *Eucalyptus perriana*.(2) Otro ejemplo de glucosilación es la que sufre la hidroquinina a arbutina por medio de cultivos de *Digitalis purpurea*, que se puede ver representada en la figura No.4 (58).

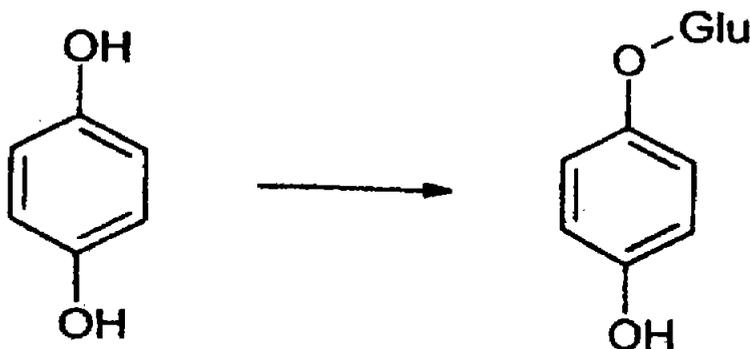


Figura No. 4 Glucosidación de la hidroquinona

Oxido – Reducciones entre alcoholes y cetonas: Los alcoholes pueden ser transformados a la cetona correspondiente por medio de los cultivos de células vegetales. Algunas oxidaciones enantioselectivas también pueden ser llevadas a cabo, mismas que son útiles para la preparación de compuestos quirales(1).

La biotransformación de ácido ferúlico a vainillina mediante cultivos en suspensión de *D. carota* como se puede observar en la figura No. 5. Otro ejemplo de oxidación fue el de la gitoxigenina al compuesto 5 β-hidroxigitoxigenina que se obtuvo mediante cultivos de *D. Carota*. (2,3)

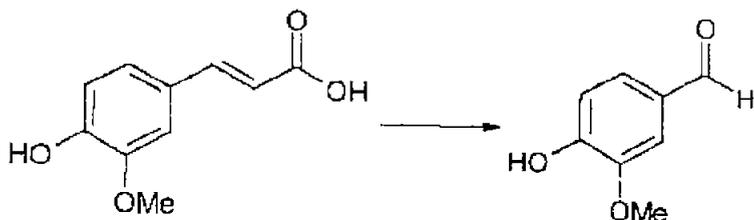


Figura No. 5 Oxidación del Ac. Ferúlico a vainillina.

Desesterificación: La hidrólisis enantioselectiva es útil para la resolución de óptica de acetatos racémicos y ha sido observado en la biotransformación de (RS)-1 fenilacetato, que al ponerlos en contacto con CCV de *Spirodela oligorrhiza* se forman (R) -alcoholes (44).

Reducción del grupo carbonilo: Se ha reportado la reducción del grupo carbonilo de cetonas y aldehídos a su correspondiente alcohol por medio de cultivos celulares vegetales. El ataque del hidrógeno en la reducción toma lugar preferentemente en el grupo carbonílico, lo que da como resultado compuestos hidroxilados con S-quiralidad en la posición del grupo hidroxílico. Las células de los cultivos de *C. roseus* o *N. Sylvestris* pueden dar reacciones de este tipo, lo que es atribuido a la secreción extracelular de peroxidasa al medio de cultivo(3,8). Un ejemplo de este tipo de reacciones se presenta en C.C.V. inmovilizadas de *Gardenia jasminoides* al reducir la acetofenona a 1-feniletanol como se presenta en la siguiente figura No. 6 (2).



Figura No. 6 Reducción de la acetofenona a 1-feniletanol.

Se conocen otras reacciones como son: nitroreducción, reducciones de doble enlace C-C, epoxidaciones, descarboxilaciones, esterificaciones, metilaciones, desmetilaciones, pero es necesario seguir investigando. Se pueden observar en el cuadro No. 4 algunos ejemplos de las muchas biotransformaciones que se han publicado en los últimos diez años y que se están llevando a cabo en todo el mundo(3,35,40).

Cuadro No.4 Reacciones más representativas de biotransformación realizadas por cultivos de células de plantas y órganos *in vitro*.

Planta	Precursor	Producto	Referencia
<i>Acer nikoense</i>	(RS)-Rododendrol	2-O-β-D-glucopiranosido, @-Rododentrol, 2-O-β-D-xilopiranosil-(1β6)- β-D-glucopiranosido	Fujita et al.(1995)
<i>Artemesia annua</i> (cultivo de células)	Ac. artemisinico	Ac. Artemisinico, β-D-glucopiranosil ester, ac. 9-β-hidroxiartemisinico, ac.3-β-hidroxiartemisinico	Kawamoto et al (1998)
<i>Astasia longa</i>	(R) y (S) Carvona	Dihidroxicarvona e isodihydrocarveol	Shimoda e Hirata (2000)
<i>Capsicum frutescens</i> (cultivos de células inmovilizadas)	Ac. Ferúlico y vainillilamina	Capsaicina y vainillina	Jonson et al (1996)
<i>C.frutescens</i> (células inmovilizadas)	Ac. Caféico	Capsaicina y vainillina	Ramahandra Rao y Ravishankar (2000)
<i>C.frutescens</i>	Ac. Ferúlico y vainillilamina	Capsaicina y vainillina	Sadhakar.
<i>Catharanthus roseus</i> (Cultivos de células en suspensión)	Vinblastina	Vincristina	Hamada y Nakazawa (1991)

Planta	Precursor	Producto	Referencia
<i>C.roseus</i> (Cultivos de células en suspensión)	Tabersonina	Locnerinina locnericina	Furuya et al. (1992)
<i>C.roseus</i> (Cultivos de células en suspensión)	Hidroquinina	Arbutin	Inomata et al. (1991)
<i>C.roseus</i> (Cultivos de células en suspensión)	Gliciricina	Ac. glicirricínico	Hamada y Nakata (1992)
<i>C.roseus</i> (Cultivos de células en suspensión)	Geraniol, nerol, (+) y (-) carvona	5 β -hidroxi-dihidroxicarveol	Hamada et al (1997)
<i>C.roseus</i> (Cultivos de células inmovilizadas)	4-Piridil- 1-etanol	(R)- 4-piridil- 1 etanol	Takemoto y Achiwa (1998)
<i>C.roseus</i> (cultivo de raices)	2,4,6 Trinitrotolueno	Aminodinitrotoluenos	Hughes et al (1997)
<i>Centella asiatica</i>	Tiocolchicina	2-O- y 3-O-monoglucosil derivados	Solet et al (1993)
<i>Coffea arabica</i>	Teobromina	cafeína	Furuya et al (1991)
<i>C. aradica</i>	vainillina	Vainillina- β -D-glucosidos	Kometani et al (1993)
<i>Crocus sativus</i> (cultivo de células)	Crocetina	Di-neapolitanosil-crocetina	Dufresne et al (1999)
<i>Datura innoxia</i> (cultivos de células en suspensión)	2,4,6-trinitrotolueno	Aminodinitrotoluenos	Lucetro et al (1999)
<i>D.carota</i> , <i>N.Tabacum</i> y <i>Gardenia jasminoides</i> (cultivo de células inmovilizadas)	Acetofenona	(R) y (S)- β fenetil alcohol	Akakabe y Naoshima (1994)

Planta	Precursor	Producto	Referencia
<i>D. lanata</i> (células de plantas inmovilizadas)	β -Metildigitoxina	β -Metildigoxina	Alfemmann et al (1980)
<i>D. lanata</i> (cultivo de brotes)	Diacetilalanatosida	21'-di-dihidro-diacetilalanatosida C	Rhenius et al. (1980)
<i>Eucalyptus perminiana</i> (cultivo de células en suspensión)	Isoeugenol y eugenol	Eugenol β -rutinosida, isoeugenil β -gentiobiosida	Orihara et al. (1992)
<i>E. perminiana</i> (cultivo en suspensión)	(+)- y (-)-Fencona	(1R,4R,5S)-5 hidroxifencona-2-ona 5-O- β -gentiobiosida	Furuya y Orihara(1994)
<i>E. perminiana</i> (cultivo en suspensión)	Ac. aminobenzoico	p-aminobenzoil, β -D-glucopiranosida, β -D-glucopiranosido	Furuya et al (1998)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> (cultivo de células en suspensión)	Papaverina	Papaverinol	Dorisse et al(1998)
<i>G. glabra</i> (cultivo de células en suspensión)	Ac. 18 β -Glicirretinico	Ac. 3-O- β -D-glucopiranosil 24-hidroxi-18 β glicirretinico	Hayashi et al (1992)
<i>Ilex paraguariensis</i> (cultivo de células en suspensión)	Etanol y metanol	1-O-etil- β -glucopiranosido 1-O-metil- β -glucopiranosido	Kraemer et al (1999)
<i>Lonicera japónica</i> (cultivos en suspensión)	Cardiona	(2S)-2 hidroxicurdiona (2R)-2 hidroxicurdiona (8S)-2 hidroxicurdiona (2R,8S)-8 hidro-2-hidroxicurdiona	Horiike et al (1997)

Planta	Precursor	Producto	Referencia
<i>Mentha sp.</i> (células inmovilizadas)	(-)- Mentona	(+)- Neomentol	Galun et al (1985)
<i>Macuna pruriens</i>	L- Tirosina	L-DOPA	Wichers et al (1983)
<i>Myriophyllum sp.</i>	2,4,6- Trinitrotolueno	Aminodinitrotoluenos	Hughes et al (1997)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (cultivos de células en suspensión)	Ac. butírico	6-O-Butiril-D-glucosa	Kamel et al (1992)
<i>N. tabacum</i> (células inmovilizadas)	α y β Iononas	Correspondientes cetonas y alcoholes saturados	Xiong Tang y Suga (1994)
<i>Peganum harmala</i> (cultivos de células en suspensión)	Geranil acetato Linalil acetato	Geraniol, Linalol	Zhu y Lockwood (2000)
<i>Papaver somniferum</i> (células inmovilizadas)	Codeinona	Codeina	Furuya et al (1984), Corchete y Yeoman (1989)
<i>Pinus radiata</i> (cultivos de células en suspensión)	6-npentil-2H-piran-2ona	5-(2piron-6il)5 -pentanol	Cooney et al (2000)
<i>Rauwolfia serpentina</i> (células en suspensión)	Hidroquinina	Arbutin	Lutterbach y Stockight 1992)
<i>Rhodiola rosea</i> (cultivo de células)	Trans-cinamil alcohol	Rosavin	Furmanowa et al (1999)
<i>Solanum amosum</i> Cultivos en suspensión)	O- y pAc. Aminobenzoico y Ac. N-acetil -p-aminobenzoico	p-Ac. Aminobenzoico N- acetil, 7-O- β -D-glucopiranosil ester Syahrani et al (1999)	Syahrani et al (1999)

Planta	Precursor	Producto	Referencia
<i>S. aviculare</i> y <i>Dioscorea deltoidea</i> (cultivo de células inmobilizadas)	(S)-(-)- y (R)-(+)-limonona	Cis y Trans carveol Carvone	Vanek et al. (1999 a,b)
<i>Strophanthus</i> (células híbridas)	Digitoxigenina	17 β H-periplogenico β -D-Glucosido	Kawaguchi et al (1998).

Fuente: Arcana, 2001.

3.5 Acoplamiento oxidativo con peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas implicadas en procesos como lignificación, diferenciación y crecimiento. También están involucradas como indicadores primarios en la organogénesis y embriogénesis, además participan en el mecanismo de defensa, así como en el entrecruzamiento de polisacáridos de la pared celular. A estas enzimas se les puede encontrar tanto en las plantas como en los microorganismos. Y por su amplio rango de pl se pueden clasificar como alcalinas y ácidas(31, 32).

Entre las funciones específicas de estas enzimas hay que destacar su papel catalizador en reacciones de oxidación de gran importancia fisiológica(31). También catalizan la deshidrogenación de una gran cantidad de compuestos aromáticos(2). Otra de las reacciones que catalizan estas versátiles enzimas es el acoplamiento oxidativo, el cual da pauta para la dimerización de compuestos aromáticos.

El uso de ensayos *in vitro* se ha revelado como un medio idóneo para el estudio del metabolismo fenólico y más concretamente; la implicación de las

peroxidasas en los procesos de acoplamiento oxidativo que sufren este tipo de compuestos para dar lugar a la formación de dímeros, trímeros o polímeros de alto peso molecular, no es algo novedoso. La utilización de suspensiones celulares tiene la ventaja de que las peroxidasas ligadas iónicamente pueden ser liberadas en el medio y pueden ser separadas de las peroxidasas de células intactas(32).

4.- Hipótesis

Por medio de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, es posible determinar las condiciones adecuadas de germinación, inducción y proliferación de callos, así como el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* para su posterior uso como biotransformador.

5.-Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivos vegetales del departamento de Bioquímica y el laboratorio 321 del departamento de Alimentos, ambos pertenecientes a la división de Estudios de Postgrado de la Facultad de Química.

Para el cumplimiento de los objetivos de este trabajo se siguieron los pasos que se muestran en la figura No. 7:

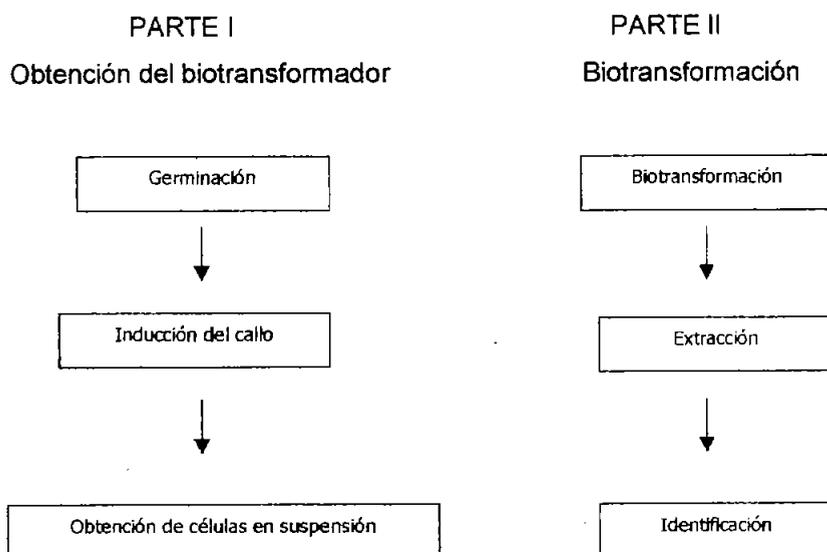


Figura No. 7 Rutas críticas para la obtención del cultivo en suspensión de *Cassia* sp. Y su uso como biotransformador.

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

Las semillas utilizadas en esta investigación se obtuvieron de una colecta realizada en las instalaciones de Ciudad Universitaria en noviembre de 1999 y enero del año 2000, colectando del arbusto vainas secas, para posteriormente guardar la semilla en un frasco a temperatura de 4 °C para su conservación

5.1.2 Medio de cultivo

Todos los explantes, tanto semillas como segmentos de hojas y tallos se colocaron en medio básico el cual estuvo constituido con las sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos del medio Murashige y Skoog (1962) conocido como MS, suplementado con sacarosa comercial al 3 %, carbón activado al 0.05 % y reguladores de crecimiento según se explica en cada ensayo. La concentraciones, cantidades y sales utilizadas para la preparación del medio utilizado se encuentran al final de este trabajo en el anexo I.

Los recipientes utilizados fueron frascos de alimento infantil con tapas de plástico para la germinación, mientras que en la inducción, proliferación y cinética de crecimiento de callo fueron frascos de 55 mL con tapa de plástico. Para las células en suspensión se utilizaron matraces de 250 mL y 125 mL estos últimos para la cinética de crecimiento. El medio se vertió a razón de 30 mL por frasco de alimento infantil, 15 mL en los de 55 mL de capacidad y en los matraces de 250 mL se vertieron 60 mL, mientras que en los de 125 mL

tan solo 30 mL de medio líquido. Se sometieron a esterilización en autoclave vertical (121 °C y 1.2 kg / cm² de presión), durante 18 minutos. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

El material de cristalería, así como pinzas y bisturí que se utilizaron en la siembra del explante, se esterilizó en autoclave vertical a una temperatura de 121 °C y 1.2 kg / cm² de presión durante 30 minutos.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100 x en un vaso de precipitados con agua desionizada estéril, en agitación constante, se vertió la cantidad necesaria de dichas sales, así como aminoácidos, vitaminas, reguladores de crecimiento y carbón activado para finalmente adicionar la fuente de carbono (azúcar), posteriormente se ajustó el pH a 5.7 ± 0.1 , con NaOH ó HCl 0.1M, se agregó el gellan (0.25 %), y se aforó con agua desionizada estéril para obtener el volumen deseado. Posteriormente se prosiguió con la esterilización en las condiciones ya antes mencionadas, se dejaron enfriar y solidificar según el caso, para su posterior uso. Es recomendable esperar aproximadamente unos cinco días antes de utilizar los medios para garantizar que una buena esterilización se llevo a cabo, al no encontrar ningún tipo de crecimiento que pudiera contaminar el cultivo se continuó con la técnica.

5.2.2 Condiciones de incubación

Todos los cultivos se mantuvieron bajo un ambiente controlado en un cuarto de incubación, con una temperatura promedio de 25 ± 2 °C con un foto periodo de 16 horas / 8 horas oscuridad, con una intensidad lumínica de $29 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$.

PARTE I Obtención del biocatalizador

5.2.3 Germinación de las semillas

Para poder llevarse a cabo la germinación de las semillas, fue necesario someterlas a un proceso de escarificación con H_2SO_4 concentrado variando el tiempo como se describe a continuación en el cuadro No. 5:

Cuadro No. 5. Tratamientos utilizados para lograr la germinación de las semillas de *Cassia* sp. variando el tiempo en contacto en H_2SO_4 e iluminación

ILUMINACIÓN	SEMILLAS POR FRASCO	TIEMPO EN H_2SO_4 conc.		
		2.5 MINUTOS	5 MINUTOS	10 MINUTOS
SI	5	2.5 MINUTOS	5 MINUTOS	10 MINUTOS
NO	5	2.5 MINUTOS	5 MINUTOS	10 MINUTOS

Ensayo 1:

En este ensayo se tuvo como objetivo la germinación de las semillas y así poder dar continuidad a la siguiente etapa de esta investigación. Por tal motivo se pesaron 3.92 g de semillas, las cuales estuvieron en contacto con H_2SO_4 concentrado en agitación constante y se dejaron en escarificación por distintos tiempos, como lo muestra el cuadro No.5. Después de transcurrido el tiempo de cada tratamiento se realizaron 3 enjuagues de 3 minutos cada uno con agua desionizada estéril.

Se introdujo el material a la campana de flujo laminar y se sembraron 5 semillas en cada frasco con medio MS suplementando únicamente con sacarosa comercial. Se realizaron quince repeticiones para cada tratamiento.

Los frascos con semillas se mantuvieron en un cuarto de incubación, la mitad de los frascos se dejaron en oscuridad y la otra mitad en foto periodo.

Ensayo 2 :

En base a los resultados en el primer ensayo se modificó el método de escarificación de la siguiente manera: Se incrementaron los tiempos de escarificación como se puede observar en el cuadro No 6. Después de la escarificación como se describió anteriormente las semillas se dejaron reposar en agua estéril por 24 hrs, transcurrido este tiempo se sembraron las semillas de igual manera que en el ensayo anterior.

Cuadro No. 6. Tratamientos utilizados en el segundo ensayo para lograr la germinación de las semillas de *Cassia sp.* variando el tiempo en contacto en H₂SO₄ e iluminación

ILUMINACIÓN	SEMILLAS POR FRASCO	TIEMPO EN H ₂ SO ₄ conc.		
		5 MINUTOS	10 MINUTOS	15 MINUTOS
SI	5	5 MINUTOS	10 MINUTOS	15 MINUTOS
NO	5	5 MINUTOS	10 MINUTOS	15 MINUTOS

5.2.4 Inducción y proliferación del callo

Ya germinadas las semillas, se tomaron plántulas de 12 días y se disectaron de dichas plantas segmentos de tallos y hojas como explantes; en el caso de los tallos se cortaron en segmentos de 1.5 cm de largo mientras que las hojas se sembraron completas desprendiéndolas del tallo con un corte con bisturí además se les hicieron heridas sobre su superficie. Para la inducción del callo el medio MS se modificó con 2 mgL⁻¹ de ANA ó 2-4 D según el tratamiento y 0.3 mgL⁻¹ de BAP. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad.

En cuanto a la proliferación, los callos fueron separados del tejido madre y subcultivado en el mismo medio; el subcultivo se realizó cada 15 días aproximadamente.

Cabe señalar que los cultivos de callos en medio con 2,4-D se subcultivaron a medio ANA, dados los resultados obtenidos en la curva de crecimiento.

5.2.5 Curva de crecimiento del callo

Como en la etapa anterior, se observó la proliferación de dos tipos de callos uno con una coloración verde y otro con un color negro, dichos callos se sembraron en medio 2,4-D ó ANA como se presenta en el cuadro No 7.

Cuadro No 7. Tratamientos utilizados para la proliferación del callo de *Cassia sp.* probando dos tipos de reguladores de crecimiento

TIPO DE CALLO	TIPO DE REGULADOR CRECIMIENTO	
	NEGRO	2,4-D
VERDE	2,4-D	ANA

Para determinar la curva de crecimiento se utilizó el callo después de la primera resiembra. Se pesó 1 g para cada frasco con cinco repeticiones para cada tratamiento. Los callos fueron evaluados a través de la cinética de crecimiento midiendo el peso fresco registrándose a intervalos de 48 horas durante 20 días.

5.2.6 Establecimiento de células en suspensión

Para el establecimiento del cultivo de células en suspensión se utilizaron los dos diferentes tipos de callos que se obtuvieron de la inducción y proliferación. Se transfirieron aproximadamente 3 g de callo a matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 60 mL del mismo medio del que

provenían sólo que en estado líquido. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con agitación a 100 rpm y con una temperatura de 25° C, en condiciones de oscuridad durante siete días; transcurrido este tiempo, los cultivos madre se filtran en un dispersor, la suspensión (primera generación) se transfirió a los matraces y el callo que no se disgregó (cultivo madre) se le adicionó medio nutritivo nuevo. Ambos cultivos se dejaron nuevamente en las mismas condiciones de crecimiento.

5.2.7 Cinética de crecimiento del cultivo en suspensión.

Para poder realizar la cinética de crecimiento del cultivo en suspensión el callo del cultivo madre se pasó por un dispersor con malla de 0.2 mm con el objetivo de homogenizar y disminuir la presencia de agregados de gran tamaño. Las células se dispersaron con ayuda de un pistilo de vidrio. Todo el material a emplear estuvo estéril y las operaciones se realizaron en campana de flujo laminar.

Los pesos fresco y seco se obtuvieron a partir de alícuotas de un mililitro y medio. Las cuales se centrifugaron por 20 minutos a una velocidad de 3000 rpm, eliminando el sobrenadante y por la diferencia de pesos se obtiene el peso fresco. El tubo ependoff es pesado previamente y después restado al peso del ependoff más el paquete celular. En cuanto al peso seco, éste se obtuvo de igual forma que el fresco, salvo que antes de ser pesado se secó en el cuarto de incubación hasta obtener peso constante; las muestras se tomaron cada 48 horas durante 20 días.

PARTE II Biotransformación

5.2.8 Adición de Eugenol en el cultivo en suspensión

Para probar la capacidad de biotransformación de las células en suspensión, se estableció nuevamente el cultivo en suspensión colocando en 3 matraces con 35 mL de medio MS con 2 mgL^{-1} de ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP e inoculando células a una densidad celular de 0.9 g/mL en contacto con eugenol disuelto en acetona a una concentración de $35 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. A cada matraz se le agregó 1 mL de la solución del eugenol. Los matraces se dejaron en un agitador bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de $23 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ y 100 rpm. Después de cinco días se realizó la extracción.

5.2.9 Extracción del producto

Una vez concluido el periodo de biotransformación, los matraces se retiraron de la incubación. Cada matraz fue filtrado con vacío en embudo Büchner con papel filtro de poro grande recibiendo el filtrado en un matraz Kitasato.

El filtrado fue colocado en un embudo de separación de 500 mL junto con 30 mL de acetato de etilo. Posteriormente se realizó la extracción (esto se repitió dos veces más). La fracción que se recuperó fue la orgánica; a esta se le quitó la humedad mediante Na_2SO_4 anhidro, el extracto fue concentrado en un rotavapor ($35 \text{ } ^\circ\text{C}$).

El paquete celular se colocó en un mortero, se le agregó un poco de acetona y se maceró con un pistilo. El paquete celular se lavó con acetato de etilo y se

volvió a filtrar por vacío en un matraz Kitasato. Este extracto también fue concentrado con rotavapor (35°C).

5.2.10 Cromatografía en capa fina

Con ayuda de la cromatografía en capa fina se evaluó el extracto concentrado, éste se colocó en una placa preparativa con ayuda de un capilar de manera horizontal a como avanzaría el disolvente.

Entre tanto se preparó una mezcla de disolventes hexano : acetato de etilo (7:3) que fue agregada a la cámara de elusión. Esta última fue tapada para permitir la saturación de los disolventes en la misma y posteriormente la placa con los extractos fue llevada a una cámara dejando migrar los disolventes hasta 0.5 cm antes del borde. Seguidamente la placa se retiró y se dejó secar para agregarle el revelador que en este caso fue sulfato cérico revelando con aplicación de calor.

6.- Resultados y discusión

PARTE I Obtención del biotransformador

6.1 Germinación de las semillas

ENSAYO 1

En este primer ensayo se tuvo como objetivo la germinación de las semillas. Tomando como precedente el estudio de propagación en *Senna alata* en donde la escarificación con H_2SO_4 fue el mejor tratamiento para favorecer la germinación(20).

Como se puede ver en el cuadro No. 8, la germinación de las semillas fue nula en los tratamientos 1, 2, 4 y 5; y solamente en los tratamientos 3 y 6 se observó un 33% y 26% respectivamente de germinación. Para tener un punto de comparación en la investigación con *Senna alata* se consiguió un porcentaje de germinación del 100 % lo que nos indica que el método para remover la testa es muy eficiente.

Estos resultados demuestran que el tiempo de escarificación con H_2SO_4 conc. no fue lo suficiente para remover la testa. A la ruptura de la barrera de recubrimiento seminal se le conoce como escarificación, para llevarse a cabo ésta se han utilizado cuchillos, limas y lijas a nivel laboratorio.

En la naturaleza, la abrasión quizá se debe a la acción microbiana, al paso de la semilla a través del tracto digestivo de un ave o de otro animal, una exposición a temperaturas extremas u otras. En el laboratorio y en la

agricultura cuando es necesario, se puede utilizar alcohol u otros solventes de grasa, que disuelven materiales cerosos que a veces bloquean la entrada de agua.(12,47)

La germinación no es posible sin una toma de agua y un intercambio gaseoso. En la figura No.8 se muestran las semillas de *Cassia sp.* antes de iniciar el proceso de germinación.

Cuadro No. 8. Porcentaje de semillas germinadas a los 19 días de la siembra en los distintos tratamientos (primer ensayo).

No. Tratamiento	Tiempo en H ₂ SO ₄	Condiciones de incubación	% de germinación
1	2.5 min	Oscuridad	0
2	5 min	Oscuridad	0
3	10 min	Oscuridad	33
4	2.5 min	Luz	0
5	5 min	Luz	0
6	10 min	Luz	26

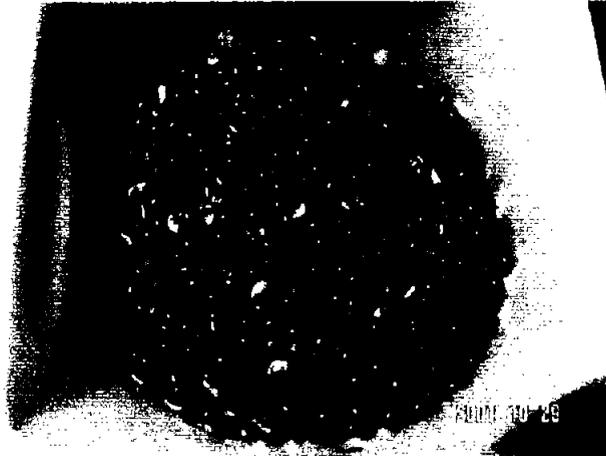


Figura No.8 Semillas de *Cassia* sp. antes de la escarificación

ENSAYO 2

En base a los resultados obtenidos en el primer ensayo se llevó a cabo una escarificación de las semillas al ponerlas en contacto con H_2SO_4 conc., probando 5, 10 y 15 minutos, además se adicionó un remojo de 24 horas con agua destilada estéril, este método fue utilizado en el trabajo de germinación *in vitro* para *Acacia nilotica* (20).

Los resultados arrojados de este segundo ensayo se presentan en el cuadro No. 9.

Cuadro No. 9. Porcentaje de semillas germinadas a los 7 días de la segunda siembra en los distintos tratamientos.

No. Tratamiento	Tiempo en H ₂ SO ₄	Condiciones de incubación	% de germinación
1	5 min	Oscuridad	42.6
2	10 min	Oscuridad	74.6
3	15 min	Oscuridad	82.3
4	5 min	Luz	36.0
5	10 min	Luz	58.6
6	15 min	Luz	82.3

En el cuadro No. 9 se puede observar que el tratamiento en el que se obtuvo mayor porcentaje de germinación fue 15 minutos en ácido sulfúrico y en condiciones de luz, siguiendo 15 minutos ácido sulfúrico pero en condiciones de oscuridad; finalmente los demás tratamientos obtuvieron menor porcentaje de germinación aunque cabe mencionar que estos resultados fueron mejores que los del primer ensayo.

En este segundo ensayo se logró germinar un mayor número de semillas un porcentaje de mas del 80 %, además de reducir el tiempo de germinación ya que a los 3 días de haberse realizado la siembra de las semillas éstas comenzaron a presentar señales de germinación. Para tener una representación de la facilidad o dificultad de la germinación de semillas *in vitro*, se muestran a continuación datos que se obtuvieron en trabajos de investigación realizados en otras especies, y de esta forma equiparar los

rendimientos. Se tiene que para las semillas de *Acacia nilotica* se obtuvo un rendimiento de casi el 90% y para semillas de zanahoria un rendimiento del 100 %.(21,54) teniendo que los resultados para *Cassia sp.* son de un elevado porcentaje de germinación, aunque no tan eficaz como para las otras especies.

Estos resultados se deben en primer lugar a que se aumentaron los tiempos de contacto en el ácido sulfúrico, el cual ya es reconocido como un buen agente escarificante y con esto se logró eliminar la testa de la semilla lo que permitió el paso del agua más eficientemente y, por otro lado, se dejaron en agua por 24 horas lo cual ayudó a que la imbibición de agua por las semillas se realizara más eficientemente, haciéndose evidente con el visible aumento de tamaño de las semillas, éste es un proceso puramente físico.

Grupos hidrófilos, por ejemplo $-NH_2$ $-COOH$ y $-OH$ atraen al dipolo de agua y forman a su alrededor una cubierta de hidratos. Las macromoléculas que tienen este tipo de grupos hidrófilos pueden ser proteínas y carbohidratos (12). El agua comenzó un proceso de activación o formación de enzimas que da lugar a un incremento en la actividad metabólica se llega a la síntesis de mRNA para diversos procesos y también una difusión del ácido gibberélico a la aleurona(12,46).

En la aleurona, el ácido gibberélico induce la síntesis de una serie de hidrolasas que movilizan sustancias de reserva. A ellas pertenece por ejemplo la α -amilasa, que degrada el almidón, pero también pertenecen a este grupo nucleasas y proteasas que atacan a los ácidos nucleicos y proteínas respectivamente(39).

A través de la actividad de las nucleasas se liberan también citoquininas contenidas en los ácidos nucleicos y a través de la actividad de las proteasas, junto con otros aminoácidos, se puede formar triptófano a partir del cual se forma AIA. Las citoquininas y el AIA actúan ahora sobre el embrión: las citoquininas inducen las divisiones celulares y el AIA el alargamiento celular. El embrión que crece de este modo se abre paso haciéndose evidente en el momento que la radícula atraviesa la cubierta seminal(12, 46).

A continuación se podrán observar las plántulas obtenidas por tratamientos utilizados, para la germinación de las semillas de *Cassia sp.* En la figura No. 9 tenemos a las plántulas que se encontraron en contacto con el ácido sulfúrico por 15 minutos, en donde se puede observar plántulas bien desarrolladas y completas.



Figura No. 9 Plántulas de *Cassia sp.* del segundo ensayo tratamiento No 6

6.2 Inducción y proliferación del callo

INDUCCIÓN

Cuando las plantas tuvieron 12 días se llevo a cabo la inducción del callo. En este ensayo se probaron dos explantes, tallo y hoja observándose que el tejido que se obtuvo no fue homogéneo, se observó una diferencia de coloración entre los callos. En un principio a los 9 días aproximadamente se presentó el crecimiento de un callo color verde cristalino, posteriormente se dio la formación de un callo negro y por último se originó la formación de un callo que presentó coloración blanquecina.

Los callos que fueron incubados en condiciones de oscuridad presentaron crecimiento de raíces. A continuación en la figura No.10 se presenta la imagen de los segmentos de tallos con un crecimiento notable de callo en los extremos, partes donde se llevó a cabo las incisiones con bisturí.

El crecimiento y morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y balance de los reguladores de crecimiento suplementados en el medio y las sustancias de crecimiento producidas endogenamente por el cultivo de células. Además ejerciendo un efecto directo en el mecanismo celular, muchos reguladores sintéticos pueden en realidad modificar el nivel de sustancias endógenas de crecimiento. Las auxinas son frecuentemente usadas en el trabajo de micro propagación y son incorporadas en el medio para promover el crecimiento de callo, suspensiones celulares o de órganos (6,16).

Las auxinas son el promotor del crecimiento en cultivo de tejidos en dos formas: a) Induciendo la secreción de iones H^+ a través de la pared celular, la acidificación de la pared incrementa la extensibilidad. Los iones K^+ son llevados al interior de la célula para contrarrestar la exportación electrogenita de los iones H^+ y esto tiene el efecto de decrementar el potencial de las células así como el que el agua ingrese y la célula se expanda; b) por un efecto en el metabolismo del RNA (y de aquí la síntesis de proteína) posiblemente por la modulación de la transcripción de moléculas de RNA(14,16).

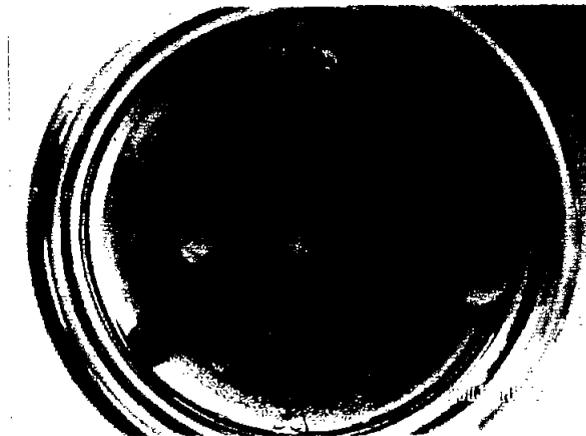


Figura No. 10 Proliferación de callo de *Cassia sp.* en explantes de tallo.

PROLIFERACIÓN

Los subcultivos se realizaron cada 15 días en un medio nutritivo y fresco tratando de eliminar la mayor cantidad de tejido madre con la finalidad de obtener solamente callo.

Un problema que se presentó fue que ninguno de los tipos de callo era friable por lo tanto en la curva de crecimiento de éstos se decidió probar con el regulador de crecimiento ANA.

El cambiar de auxina en la proliferación del callo produjo resultados muy favorables que en este ensayo el callo fue notablemente más friable al utilizar ANA (a 2 mgL^{-1}) que 2-4 D (a 2 mgL^{-1}). Las características morfológicas de los callos obtenidas en este ensayo se encuentran en el Cuadro No. 10.

Cuadro No. 10 Características morfológicas de los callos obtenidos a partir de los explantes de hoja y tallos.

REGULADOR DE CRECIMIENTO	COLORACIÓN DEL CALLO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
2-4 D	Negro	Tejido compacto muy poco disgregable
2-4 D	Verde	Tejido compacto y duro se formó en condiciones de luz
2-4 D	Blanco	Tejido compacto más duro que el verde se formó en condiciones de luz y oscuridad
ANA	Negro	Tejido disgregable y suave
ANA	Verde	Tejido compacto y duro
ANA	Blanco	Tejido compacto y duro

En las figuras No. 11 y 12 se presentan las fotografías de los callos obtenidos tras la inducción de los mismos. En estas imágenes se pueden apreciar algunas de las características que presentaron los callos especialmente las de coloración. Se prefirió presentar los callos cultivados en medio adicionado con 2 mgL^{-1} ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP ya que fue el medio en el que se dieron los mejores resultados para el establecimiento del cultivo de células en suspensión.



Figura No. 11 Callo negro de *Cassia* sp. cultivado en medio adicionado con 2 mgL^{-1} ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP

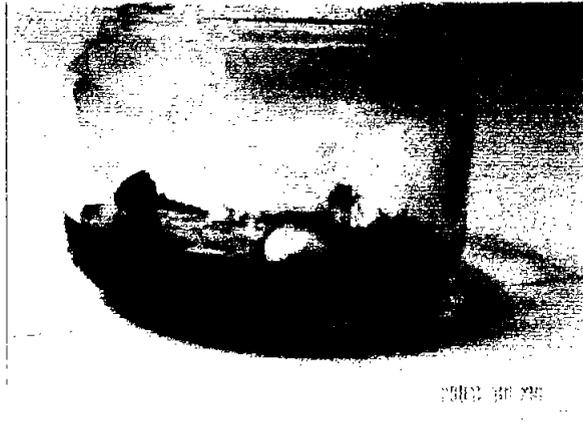
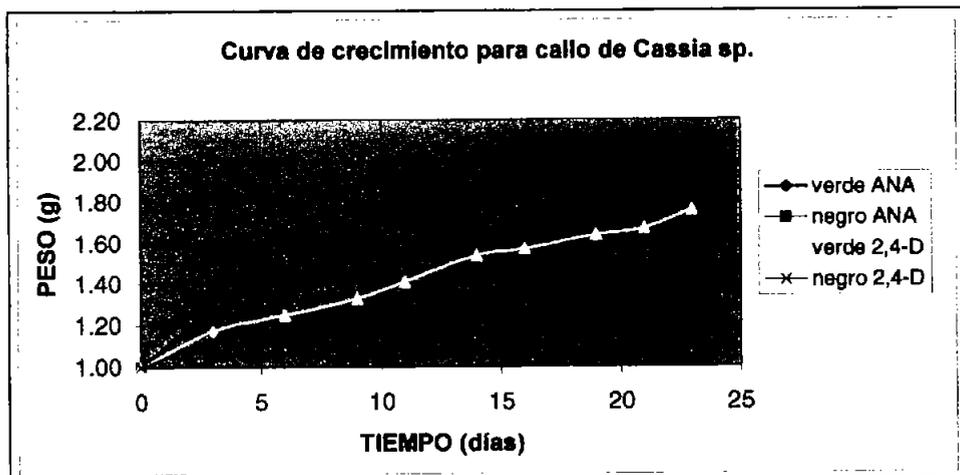


Figura No. 12 Callo verde de *Cassia* sp. en medio suplementado con 2 mgL^{-1} ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP

6.3 Evaluación del crecimiento del callo

Dentro de este ensayo se utilizaron dos diferentes reguladores de crecimiento ANA y 2-4 D. Se encontró que el mejor fue ANA (a 2 mgL^{-1}), aunque en ambos se obtuvo un crecimiento; en este último el callo fue considerablemente más friable característica que se busca en un callo que posteriormente se utilizará en la obtención de un cultivo de células en suspensión.

Los resultados que arrojó este ensayo se presentan a continuación en la gráfica No. 1



Grafica No. 1 Promedio del peso fresco en los diferentes reguladores de crecimiento donde 1 callo verde ANA 2 callo negro en ANA, 3 callo verde en 2-4, D callo negro en 2-4 D.

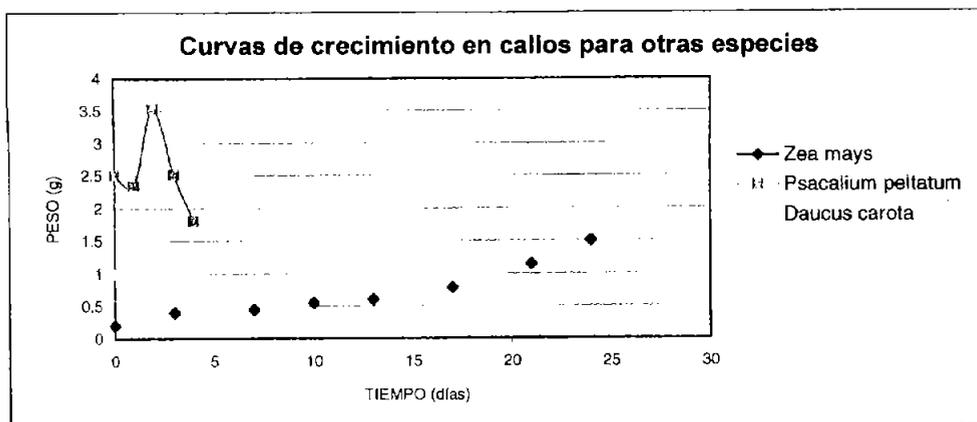
Como se puede observar en la gráfica No. 1, cuando se inoculan algunas células a un medio de cultivo y éstas son cuantificadas a intervalos de tiempo es posible representar una curva de crecimiento celular. En general las curvas obtenidas, presentan un periodo de crecimiento paulatino seguido de un mayor incremento en el peso y por último un peso constante que es más evidente en la gráfica del callo verde en ANA (16).

En un principio se tiene el periodo en donde las células se están acoplando al medio de cultivo fresco periodo conocido como Lag o fase de latencia, en esta etapa las células se están preparando para reproducirse y comienzan a sintetizar enzimas, en las curvas de crecimiento que se obtuvieron por los distintos tipos de callo se puede apreciar la etapa lag desde el día de la inoculación hasta el día 9 (50,55).

En la siguiente etapa se presenta un mayor peso debido a la división y crecimiento de las células que ya lograron acoplarse a su nuevo medio, esta fase es llamada log o exponencial, este periodo lo encontramos en las gráficas hasta el día 19 en donde se puede apreciar un mayor desarrollo de las células.

En los días sucesivos no se registra un gran incremento en el peso se podría decir que se ha iniciado la siguiente fase llamada estacionaria en donde el número de células muertas compensa el de células nuevas y la población se estabiliza, además se piensa que los productos desecho del metabolismo tienden a acumularse y a hacerse tóxicos para las células, además de que el aporte de oxígeno no es el más adecuado debido al gran número de células existentes en el medio provocando la muerte celular(51,55), esta fase la encontramos en el último lapso de la gráfica No. 1. La última etapa de las curvas de crecimiento es la llamada fase de muerte en donde el número de células muertas sobrepasa al de células formadas esto puede llegar hasta la destrucción total de las células en nuestra gráfica no logramos advertir esta etapa, debido que fue insuficiente el número de muestras, sería necesario aumentar más días para ver este período (6,51).

En la grafica No. 2 se muestran las curvas de crecimiento de callos de distintas especies, algunas de ellas como la de Zanahoria tienen un crecimiento mas acelerado que otras, por lo tanto ofrecen menos probabilidad de contaminación, disminución en el trabajo de laboratorio, reducción de esfuerzos. Así tenemos que para *Daucus carota* a los diez días ya produjo un gramo de callo, mientras que para maíz como para *Cassia* tardaron más de veinte días(24,54).



Grafica No. 2 Curvas de crecimiento de callos para *Zea mays* en azul, *Psacalium peltatum* en rosa y para *Daucus carota* en amarillo.

6.4 Establecimiento de células en suspensión

ESTABLECIMIENTO

También para el establecimiento del cultivo de células en suspensión se utilizó callo verde y negro, pero para continuar con este trabajo se decidió trabajar con el callo negro por su uniformidad y su friabilidad que son muy necesarias para la disgregación del callo al medio de cultivo.

En la figura No. 13 se muestra el tipo de callo utilizado para el establecimiento y proliferación del cultivo de células en suspensión, dicho callo cultivado en ANA y BAP, posee características morfológicas deseables como son suavidad y friabilidad, para el establecimiento de la células en suspensión.

Al llevar acabo el establecimiento de los cultivos de células en suspensión se probaron los distintos tipos de callo que se obtuvieron en el ensayo dando un mejor resultado el callo negro cultivado en medio suplementado con ANA (2 mgL⁻¹). A los pocos días de iniciarse el establecimiento se veían los fragmentos de este callo dispersos en el medio, situación que no ocurrió con los demás. En las figuras No. 14 y 15 se aprecian la fotografías de los cultivos de células en suspensión de *Cassia sp.* que finalmente fueron utilizados para llevar a cabo la biotransformación del eugenol.

Figura No 13 Callo utilizado para el establecimiento del cultivo en suspensión

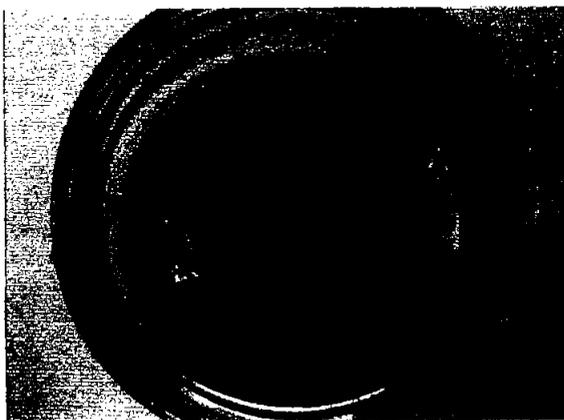
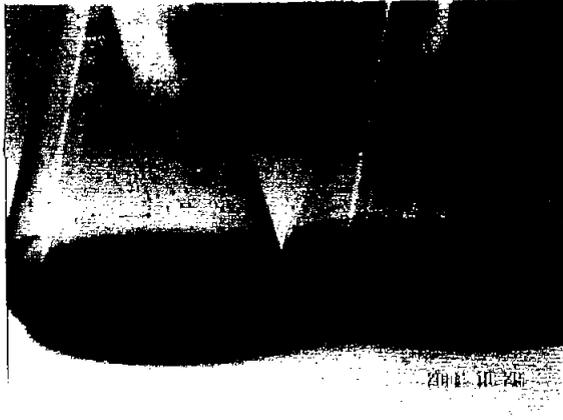


Figura No. 14 Cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.*

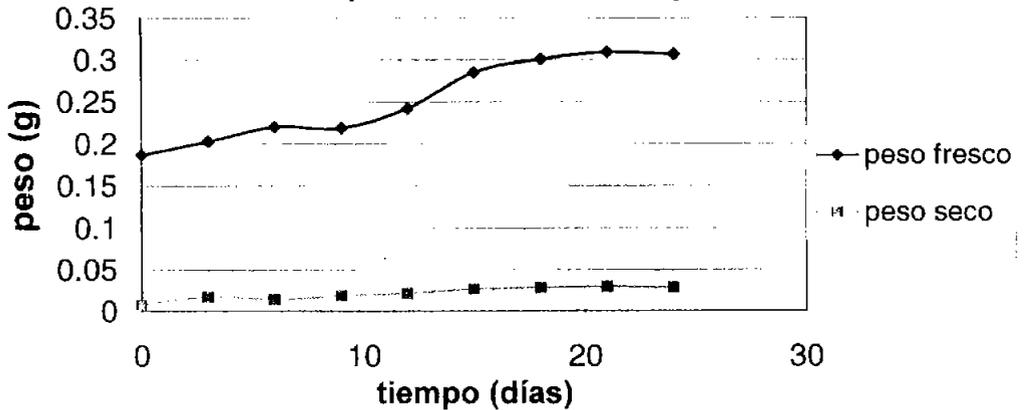


6.5 Evaluación de crecimiento del cultivo en suspensión

El objetivo de dejar el callo crecer en un medio líquido con agitación es el de obtener una suspensión de células libres, en el mejor de los casos y agregados celulares.

Los resultados obtenidos de las mediciones de peso fresco y peso seco de los cultivos de células en suspensión se muestra en la siguiente gráfica.

curva de crecimiento del cultivo de células en suspensión de cassia sp.



Gráfica No.3 Curvas de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* En donde el color azul es el promedio del peso fresco y el color rosa es el promedio de peso seco.

En la Gráfica No. 3 se puede apreciar la curva de crecimiento de células en suspensión de *Cassia sp.* en la cual se observa al principio una fase de reposo en donde el inóculo no presenta ninguna señal de división celular ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones esta fase es conocida como Lag o de rezago.

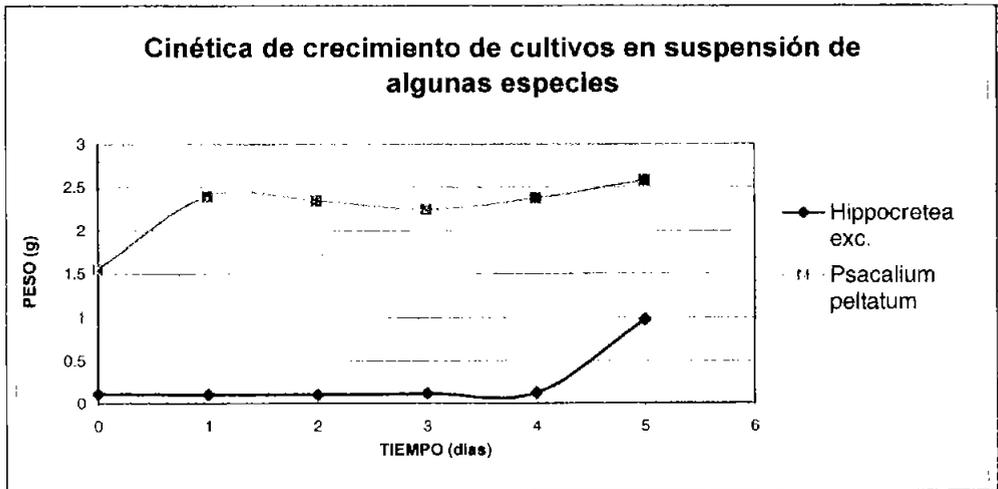
Después de unos nueve días se registra un crecimiento lo cual indica que la división celular ha iniciado. Esta etapa es conocida como log o fase logarítmica y por el día 20 se puede observar que se logró la máxima densidad celular en este momento las células son viables y es el adecuado para llevar a cabo una biotransformación o bien un subcultivo.

Al final quedan en una etapa de escaso crecimiento a la cual se le llama estacionaria en donde por lo menos uno de los nutrientes se ha acabado y/o la acumulación de los productos de degradación tóxicos para las células.

La siguiente y última etapa es la de muerte que en esta gráfica no es posible observar debido a la falta de más muestreos. Gracias a esta cinética de crecimiento se puede saber cual es el momento adecuado para llevarse a cabo la biotransformación del eugenol en el cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.*

Figura No 15 Cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.*





Grafica No. 4 Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *Hippocretaea excelsa* y *Psacalium peltatum* en peso fresco.

Como se puede observar en la gráfica No. 4 el crecimiento de los cultivos vegetales en suspensión es diverso, mientras que para *Psacalium peltatum* a los cinco días de su subcultivo produce un gramo de masa celular mientras que para *Hippocretaea excelsa* en el mismo periodo de tiempo tan solo produce 0.02g. Entre tanto para *Cassia sp.* se tiene que produce 0.1 g de masa celular en 15 días de cultivo(27,28).

PARTE II Biotransformación

6.6 Biotransformación a través de la adición de Eugenol en el cultivo en suspensión

Para llevar a cabo la biotransformación del eugenol, éste se adicionó disuelto en acetona, en el cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* Los

matraces se mantuvieron en un agitador bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 23 ± 2 °C y 100 rpm por un periodo de cinco días. Después de cumplirse el tiempo establecido para llevar a cabo la biotransformación del eugenol y se procedió a la extracción(53).

6.7 Extracción del producto

Después de transcurrir los cinco días de la biotransformación del eugenol se realizó la extracción por disolvente del posible producto, como se describe en el apartado de métodos (5.2.9).

Se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente para la fase acuosa pero al no observarse ningún compuesto en la C.C.F. se decidió desechar esta fracción.

El paquete celular fue macerado con acetona primero para lograr romper la pared celular, de esta manera, si el producto que se busca permanece en el interior de la célula saldrá al exterior y después con acetato de etilo se podrá extraer de medio, posteriormente el filtrado obtenido de estas acciones se mezcló con la fase orgánica, siguiendo así el tratamiento descrito en el apartado de métodos.

6.8 Cromatografía en capa fina

Para realizar el análisis de este extracto se utilizó la Cromatografía en capa fina usando como estándares al eugenol disuelto en acetona y un extracto del

cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* sin tener ningún tipo de tratamiento posterior a la proliferación.

Orden de aplicación de las muestras en la placa cromatográfica.

1. - Estándar de eugenol con acetona
2. - Estándar del cultivo de células en suspensión
3. - Aplicación de la muestra testigo

Se presentan los perfiles cromatográficos que arrojaron los análisis de los extractos, como podemos observarlos en las figuras No. 16, 17 y 18:

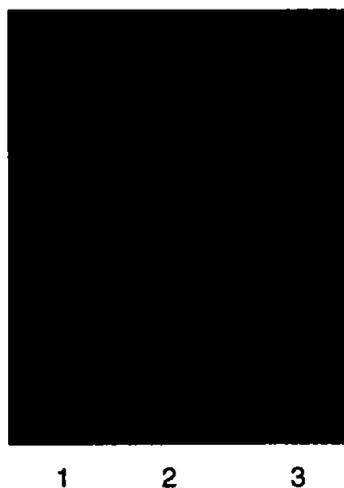


Figura No. 16 Perfil cromatográfico de eugenol, cultivo celular y el concentrado de la extracción después de la biotransformación

Para la realización de la placa cromatográfica anterior y la siguiente (figuras No. 16 y17) se utilizó como eluyente una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (7 :3) y sulfato cérico como agente revelador

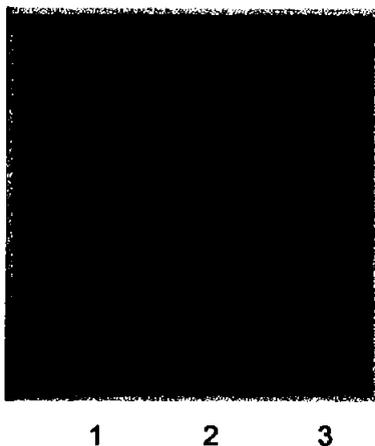


Figura No. 17 Perfil cromatográfico de eugenol, cultivo celular y el concentrado de la extracción después de la biotransformación

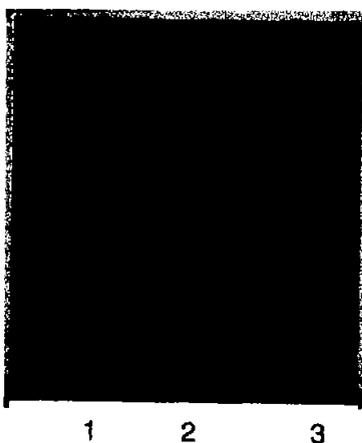


Figura No. 18 Perfil cromatográfico de eugenol, cultivo celular y el concentrado de la extracción después de la biotransformación

Para la realización de esta última placa cromatográfica (Figura No. 18) se utilizó como eluyente una mezcla de Hexano:Acetato de etilo (5:5) y sulfato cérico como agente revelador .

Como se puede observar en las cromatografías, en la aplicación No. 2 proveniente del extracto obtenido tras la biotransformación del eugenol con cultivos de células vegetales de *Cassia sp.* se observa una mancha que no aparece en ninguna de las otras aplicaciones o testigos, con un Rf de 0.32, la cual se trata del dimero del eugenol. Este se obtuvo después de la biotransformación del eugenol por las células en suspensión de *Cassia sp.* (53). También se puede observar en esta misma aplicación la existencia de Eugenol no transformado lo cual se puede comprobar con la aplicación No. 1 (estándar de Eugenol y acetona).

6.9 Perspectivas

Estos resultados nos llevan a preguntarnos ¿Que hay más halla?. Los alcances que tiene la técnica de cultivo de tejidos son aplicables a varios campos, como son: medicina, bioquímica, ingeniería, agricultura, economía y muchos más. A continuación se muestra el valor de ampliar esta línea de investigación.

Se conocen las propiedades purgantes y diuréticas de *Cassia sp.* Esto es ocasionado por su alta concentración de antroquinonas y flavonoides; así que se podrían utilizar los cultivos de células en suspensión para obtenerlos y usarlos en el campo farmacéutico. Además el incremento en la producción de metabolitos secundarios a través de la inducción de algún tipo de estrés

biótico o abiótico es una línea de investigación que se advierte muy prometedora y factible.

A la vez se podría específicamente llevar a cabo la caracterización de las rutas metabólicas de los metabolitos secundarios; la cual encierra: la identificación de metabolitos intermediarios, aislamiento y caracterización individual de las enzimas responsables y la localización de éstas dentro de la célula. Los conocimientos actuales en esta área son además de incompletos y limitados son un obstáculo real para la explotación de las biotransformaciones.

Tomando en consideración la presencia de peroxidasas en *Cassia sp.* se podrían realizar pruebas para aislar, purificar, cuantificar y caracterizar a la enzima o a los sistemas enzimáticos presentes en este cultivo. Lo cual podría ofrecernos una nueva fuente de peroxidasas además de las ya conocidas comercialmente.

Aunque el progreso en el campo de las biotransformaciones es lento, la posibilidad del éxito en la formación de compuestos es enorme.

7.-Conclusiones

- La germinación de semillas de *Cassia sp.* se logra, después de una escarificación con H_2SO_4 concentrado, seguido de un remojo con agua estéril por 24 hrs. Una vez sembradas en medio MS suplementado con sacarosa al 3 %. Son incubadas a una temperatura de 27 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas / 8 horas oscuridad y con una intensidad lumínica de $29 \mu Em^2s$.
- Se estableció y proliferó callo friable de *Cassia sp.* Tomando como explantes hojas y tallos sembrados en medio sólido MS, adicionando 3 % de sacarosa como fuente de carbono, 2 mgL^{-1} de ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP como reguladores de crecimiento. Incubados a una temperatura de 27 ± 2 °C ,en oscuridad.
- El establecimiento del cultivo de células en suspensión se logró en medio líquido MS adicionando 3 % de sacarosa, 2 mgL^{-1} de ANA y 0.3 mgL^{-1} de BAP. Incubados a una temperatura de 27 ± 2 °C, en oscuridad.
- En la cinética de crecimiento, para el cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* se determinó que el momento adecuado, para un subcultivo es después de 15 días, en donde se obtiene la mayor densidad celular sin llegar a la muerte de las células.

- Las células del cultivo de *Cassia sp.*, presentan una curva de crecimiento del tipo sigmoideal localizándose las fases de reposo, lineal ,exponencial y estacionaria.
- Las células en suspensión de *Cassia sp.* son capaces de realizar de manera cualitativa una biotransformación al Eugenol después de estar en contacto por cinco días .

8.-Anexo

MEDIO BÁSICO (MURASHIGE &SKOOG 1962).

COMPUESTO	mgL ⁻¹	PM(g)	mML ⁻¹
MACRONUTRIENTES			
KNO ₃	1900	101.108	18.8
NH ₄ NO ₃	1650	80.040	20.6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0	147.020	2.99
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.0	246.480	1.5
KH ₂ PO ₄	170.00	136.090	1.25
MICRONUTRIENTES			
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	169.010	0.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	287.300	0.029
H ₃ BO ₃	6.20	61.860	0.100
KI	0.83	166.010	4.9x10 ⁻³
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	249.680	1x10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250	241.950	1x10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	237.930	1.05x10 ⁻⁴
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80	237.930	0.1
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.30	372.300	0.1

REGULADORES DE CRECIMIENTO

REGULADOR	FORMULA	PM(g)	mg/L ⁻¹	μML ⁻¹
2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	1.0	4.52
ANA	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186.2	1.0	5.37
BAP	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	1.0	4.43

MEZCLA DE VITAMINAS Y AMINOÁCIDOS DENOMINADA CÓCTEL 20

COMPUESTO	FORMULA	mg/L ⁻¹	PM(g)	mML ⁻¹
L-Asparagina	C ₆ H ₈ N ₂ O ₃ H ₂ O	10	150.1	0.067
L-Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	10	174.2	0.057
L-Aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	7.5	133.1	0.564
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	23	75.07	0.306
Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	60	146.2	0.410
Ac. glutámico	C ₅ H ₉ NO ₄	7.5	147.1	0.051
biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1	244.3	4.1μM
Ac. Fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	1	441.4	2.3μM
Ac. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	1.5	123.1	12.2μM
Piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl	1.5	205	7.3μM
Riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	0.1	376.4	0.266μM
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OSCI HCl	3	337.3	8.89μM
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	145	180.2	0.805
Urea	CH ₄ N ₂ O	45	60.1	0.745

9.-Bibliografía

1. Akakabe Y, Takahashim M, Tachibana H. Biocatalytic Preparation of Chiral Alcohols by Enantioselective Reduction with Immobilized Cell of Carrot. *J. Chem Soc.* **1995**; 35: 1295-1298.
2. Alatorre, S. 2001. **Biotransformación de Ac. Ferúlico y Eugenol con cultivos de células vegetales**. Tesis licenciatura, Facultad de química UNAM, México D.F.
3. Archana G, Vikas D, Giri C, Ward O, Narasu L. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*. **2001**; 19: 175-199.
4. Arrieta D. 1999. **Acoplamiento oxidativo de 1,10-Antraquininas catalizadas por peroxidasas**. Tesis de doctorado, Facultad de química U.N.A.M., México D.F.
5. Arrieta D. 1995. **Estudio fitoquímico de *Cassia multiglandulosa***. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias químicas UAP, Puebla, Pue.
6. Bonilla G. 1999. **Diferenciación de brotes adventicios de caoba**. Tesis de licenciatura, Facultad de biología UNAM, México D. F.
7. Botta B, Monache G. Studies with plant cell cultures of *Cassia diclymobotrya*. *Heterocycles*. **1996**; 43: 2443-56.
8. Brown C. Campbell P; "Introducción a la biotecnología"; Ed. Acribia; 1991. España.
9. Bruneton J;" Elementos de fitoquímica y farmacognosia"; Ed. Acribia; 1991. México.
10. Bu'Lock J. Kristiansen B;" Biotecnología Básica"; Ed. Aricia; 1991. España.
11. Byoung H; "Fundamentos de Biotecnología de alimentos" ; Ed. Acribia; 2000. España.
12. Dieter H; " Fisiología Vegetal"; Ed. Omega; 1998. Barcelona.
13. Dixon, R. Gonzales, A; "Plant Cell Culture the practical Approach Series"; Ed. IRLPRESS; 1988. Oxford University.
14. Dixon, R; "Plant cell a practical approach"; Ed. IRLPRESS; 1985. Washington.
15. Edward, T. Evans, Ch; "Tratado de farmacognosia"; Ed. Interamericana; 1988. México.
16. Edwin, F. George, Ph; "Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of comercial laboratories" Edt. Sherrington; 1994.
17. Ellis B. Production of plant secondary metabolites with out plants a perspective. *Biotechnology*. **1986**; 15: 279-288.

18. El-Sayed N, Ross S. *Phytochemistry*.**1992**; 31-86: 2187. citado en 3
19. Evans, W. Trease; "Farmacognosia"; Ed. Interamericana Mc Graw Hill; 1995.México.
20. Fett-Neto A, Palma J, Alves M, Ferreira A. In vitro propagation of *Senna alata*. *Planta medica*.**2000**; 66: 195-196.
21. García, G. Quintero, R; "Biotecnología Alimentaria"; Ed. Limusa; 2da; 1999. México.
22. Ghosh P, Thakur S, Itoh T. *Indian J Chem*. **1982**; 21B(8): 796-7.
23. Gritsanapan W, Tantisewie B. *J Pharm*.**1985**; 8: 98-72.
24. Guerrero O. 1998.**Transformación de células de malz (*Zea mays* raza tuxpeña) por medio del bombardeo de partículas**. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias UNAM, México D.F.
25. Hamada H, Fuchikami Y, Jansing R. Regioselective hydroxylation of warferin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*. **1993**; 33: 599-600.
26. Heber, W. Youngken G; "Tratado de Farmacognosia"; Ed. Atlante;1951. México.
27. Hernández A. 1999. **Determinación de los metabolitos secundarios producidos por *Psacalium peltatum***. Tesis de maestría en ciencias, Facultad de química UNAM, México D.F.
28. Herrera J. 2001. **Estudio comparado de la producción de metabolitos secundarios de *Hippocratea excelsa Kunth* (Hippocrateaceae) en condiciones *in vitro* e *in vivo***. Tesis de maestría en ciencias, Facultad de química UNAM, México D.F.
29. Hurtado, D. Merino, E; "Cultivo de tejidos vegetales"; Ed. Trillas; 1994. México.
30. Internet : www.ncl.ac.uk/airweb/fluoride/SAF.htm
31. Internet: www.sefv.org/ www.sefv.org/web. Determinación de la naturaleza química de la actividad oxidasa-peroxidasa presente en el fluido extracelular de suspensiones celulares de pimiento.
32. Internet: www.sefv.org/ www.sefv.org/web. Actividad peroxidásica soluble en callos embriogénicos de *Medicago arborea* L.
33. Irving, N. Lewis, R; "Diccionario de química y productos químicos"; Ed. Omega; 1993. España.
34. Kamel S, Brazier M, Desmet G, Fliniaux M. Glucosylation of butyric acid by cell suspension culture of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Phytochemistry*. **1992** ;31: 1581-3.
35. KutneyJ P, Han K, Kuri-Brena F, Milanova RK, Roberts M. Studies with plant cell cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii* síntesis and biotransformation of diterpene analogues. *Heretocycles*.**1997**;44:95-104.

36. Lemes H. Estudio de propagación en *Senna alata* (L.)Roxb. Rev cubana Plant med. **1998**;3(2): 64-68.
37. Leueberger H. Methodology Biotechnology. Verlag Chemie. **1984**; 5.
38. Loughlin W. Biotransformations in Organic Chemistry. Bioresource Technology. **2000**; 74: 49-62.
39. Loyola, M. Robert, V; "Cultivos Vegetales en México"; Ed. CICY;1985. México.
40. Manoj KM, Lakner FJ, Hager LP. Epoxidation of indene by chloroperoxidase. J Mol Catal B: Enzym **2000**;9:107-11.
41. Martínez, M; "Las plantas medicinales de México"; Ed. botas, 4ta edición; 1959. México.
42. Neil M; "The merck index"; Ed. Whitehouse station; 2001.
43. Ogata M, Hoshi M. Antioxidant Activity of Eugenol and Related Monomeric and Dimeric Compounds. Chem Pharm Bull. **2000**; 48(10): 467-1469.
44. Pawlowicz P, Wawrzencyk C, Siewinski A. Uncommon type of hydroxylation of 3-Alkenyl substituted derivatives of citronellol and citronelic acid by *Spirodela punctata*. Phytochemistry. **1992**; 31: 2355-7.
45. Roberts S. Preparative Biotransformations. J Chem Soc **1999**; 1:1-21.
46. Rojas, M; "Principios de fisiología Vegetal"; Ed. manuales universitarios UNAM; 1959. México.
47. Salisdury, F. Ross, C; "Fisiología Vegetal"; Ed. Iberoamericana; 1994. México.
48. Sánchez, O; "La flora del valle de México"; Ed. Herrero; 6ta; 1980. México.
49. Sazón, A; "Las biotecnologías desafíos y promesas"; Ed. Unesco, CIB; 1984. Cuba.
50. Schlegel, H; "Microbiología general"; Ed. Omega;1997. Barcelona.
51. Tortora, G; "Introducción a la microbiología"; Ed. Acribia; 1993. España.
52. Turner N. Recent Advances in the Use of Enzymes-Catalysed Reactions in Organic Synthesis. Nat Prod. **1994**; 11:1-15.
53. Valcárcel, C. Gómez, H; "Técnicas de separación"; Ed. Reverté S.A.;1990. España.
54. Villanueva G. Violeta A.2003. Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota L.*) y su regeneración con la proteína "G" del virus de la rabia; Tesis de licenciatura, Facultad de química UNAM, México D.F.
55. Volk, W; "Microbiología Básica";Ed. Harla Oxford; 1996. México.
56. Wallis, T; "Manual de Farmacognosia"; Ed. Continental; 1998. México.
57. Wilhelm A, Reinhard E. Biotransformation by Plant Cultures. Bull Soc. Chem. **1980**;1-2 :II-35-II-45.

58. Williamson, G. Plumb, G. Garcia-Conesa, M; "Glycosylation, Esterification and Polymerization of Flavonoids And Hydroxycinnamates: Effects on Antioxidant Properties. En Plant Polyphenols2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology"; Ed. Gross G; 1999.
59. Withaker R, Evans. Plant Biotechnology and the production of comounds Food. Technol. **1987**;41 (9):86.
60. Yasumune H, Hamada H. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)- and (-)- carvone by suspension cultured cell of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry. **1997**; 44(4): 615-621.