



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**Transformación de isoeugenol con cultivo de
células vegetales de *Bouvardia ternifolia***

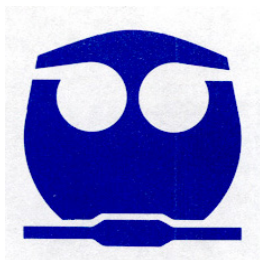
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIANA LEÓN PÉREZ MARTOS



MÉXICO, D.F

2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Arturo Navarro Ocaña
Vocal	Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén
Secretario	Prof. Enrique Martínez Manrique
1 ^{er} Suplente	Prof. Maricarmen Quirasco Baruch
2 ^{do} Suplente	Prof. María de Lourdes Osnaya Suárez

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

Asesor: Dr. Arturo Navarro Ocaña

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

Sustentante: Mariana León Pérez Martos

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A la Universidad Nacional Autónoma de México mi más grande agradecimiento por darme el honor y el privilegio de ser universitaria.*
- ❖ *A mi asesor el Dr. Arturo Navarro Ocaña por su paciencia y confianza en la finalización de este trabajo*
- ❖ *A mi asesora Mayte, muchas gracias por todo su apoyo y comprensión, por todas las facilidades otorgadas, por el interés hacia mi trabajo, pero sobre todo por escucharme.*
- ❖ *A la maestra Hilda por todo el apoyo brindado en la utilización del HPLC, gracias por sus consejos y recomendaciones, me fueron de gran utilidad.*

DEDICATORIAS

- ❖ *Principalmente a las dos personas más importantes en mi vida: a mis padres, Roberto y Ana, por darme las bases para seguir siempre adelante, gracias por ser ejemplo y apoyo incondicional. Este logró es tanto suyo como mío. A ti mamá por tu inmenso amor, gracias por ser mi guía y mi fuerza. A ti papá por que se que estas conmigo en todo y pase lo que pase estaremos juntos. Los amo con todo mí ser.*
- ❖ *A mis hermanas Citlalli, Yazmin y Aislinn, por estar siempre presentes en todo momento. A ti Citli gracias por estar siempre al pendiente de mi, por tu apoyo ya que sin él no hubiera sido posible éste logro, recuerda que te quiero muchísimo y cuentas conmigo siempre. A ti Yayita por todos aquellos momentos que pasamos desde pequeñas en aquel patio de escuela, gracias por defenderme y sobre todo gracias por ser como eres, te quiero con toda mi alma. Y por último y no por ser la menos importante a mi chiquita hermosa; Ais eres mi fuerza y mi todo, te adoro princesa.*
- ❖ *A mi princesita linda mi sobrinita; Sofi gracias por hacer todo ese ruido (llorar, gritar, saltar, ensuciar, etc.) te quiero princesa siempre estaré contigo.*
- ❖ *A mi cuñado Orlando, gracias amigo, por todo el tiempo compartido, por tus consejos y por estar ahí siempre que te necesito.*

- ❖ *A ti, Daniel por todo el apoyo incondicional, por tu paciencia, comprensión, dedicación pero sobre todo por todo el amor, en fin. No terminaría de expresar mi agradecimiento, ya que eres parte importante de este logro. Te quiero muchísimo y lo sabes.*
- ❖ *A mis mejores amigas de la Facultad: Cristina, Jaqueline y Sandra, niñas saben que las quiero gracias por todos los momentos que pasamos juntas, por esas desveladas, por esas pláticas, por todos sus consejos, pero sobre todo, gracias por formar parte de una de las mejores épocas de mi vida.*
- ❖ *A mis amigos Bere, Manuel, Vero, Rodrigo, gracias por compartir todos los buenos momentos, por contar siempre con su amistad y apoyo, los quiero.*
- ❖ *A mis incondicionales Susy, Ana, Paola, Paco, Claudio, no los olvido siempre están conmigo, muchas gracias por seguir con nuestra amistad, que cada vez es más fuerte.*
- ❖ *A mi amigo Reyó gracias por alentarme y darme los mejores consejos para no dejarme caer y superar los problemas, gracias por escucharme siempre, pero sobre todo por brindarme tu amistad, con todo mi cariño.*

*Si me dices que el tiempo guarda
la voz de las personas, la luz, la sombra,
la sonrisa de un ángel o el estallido
de esta bomba que sueña cada latido.
Si me juras que todo pasa y se queda
prisionero en las alas de algún segundo,
yo, montado a la luz, romperé tu espera
donde quiera que estés, sea cual sea tu mundo*

Índice

1. Resumen	12
2. Introducción	14
3. Objetivos	17
Objetivo General	
Objetivos Particulares	
4. Antecedentes	19
4.1. Biotransformaciones	20
Métodos de biotransformación	20
4.2. Biotransformaciones con cultivo de tejidos vegetales	23
Metodología general para la biotransformación de un sustrato con CCV	24
4.3. Cultivo de tejidos vegetales	25
Uso de los cultivos de células vegetales	26
Tipos de cultivos	27
Inducción de callos y cultivo de callos	30
Técnicas de cultivos en suspensión	36
4.4. Monoterpenos	41
4.5. Eugenol e Isoeugenol	42
Actividad antioxidante del eugenol e isoeugenol	44
4.5.1. Métodos químicos usados para la síntesis de diferentes dímeros de eugenol e isoeugenol	47
4.6. Desventajas de los métodos químicos sobre los métodos biotecnológicos	50
4.7. Peroxidasas	51
4.7.1. Versatilidad química	53
4.7.2. Peroxidasas de plantas	55

4.7.3. Acoplamiento <i>orto</i> -oxidativo de peroxidasas y uso de CCV	58
4.8. Acoplamiento oxidativo del eugenol e isoeugenol mediado por enzimas	61
4.9. Polifenol oxidasas	64
5. Materiales y Métodos	66
5.1. Material y Equipo	67
5.2. Métodos	71
5.2.1. Etapa I. Obtención de la línea celular	71
Preparación del medio de cultivo	72
Esterilización del material vegetal	72
Siembra del explante	73
Células en suspensión	73
Cinética de crecimiento	74
5.2.2. Etapa II A. Biotransformación a partir de isoeugenol	75
5.2.2.1. Ensayos cualitativos por cromatografía en capa fina (CCF)	76
Ensayo 1: Biotransformación con el extracto crudo de <i>Bouvardia ternifolia</i>	76
Ensayo 2: Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja e inflorescencia de <i>Bouvardia ternifolia</i>	76
Ensayo 3: Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja de <i>Bouvardia ternifolia</i> , en presencia de H ₂ O ₂	77
5.2.2.2. Ensayos cuantitativos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	77
Ensayo 4: Biotransformación de isoeugenol a partir de callo	

de <i>Bouvardia ternifolia</i> ; con extracto total y extracto enzimático, en presencia y ausencia de H ₂ O ₂	78
Ensayo 5: Pruebas de estrés nutritivo	79
Ensayo 6: Pruebas de estrés nutritivo con y sin H ₂ O ₂	81
Recuperación y análisis del producto	83
5.2.3. Etapa II B. Implementación de un método de análisis (HPLC)	85
6. Resultados	86
6.1. Etapa I. Obtención de la línea celular	86
6.2. Etapa II A. Biotransformación a partir de isoeugenol	89
Ensayos cualitativos por cromatografía en capa fina (CCF)	89
6.3. Etapa II B. Implementación de un método de análisis	95
Ensayos cuantitativos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	95
7. Discusión	106
8. Conclusiones	128
9. Anexo	130
10. Bibliografía	140

Abreviaturas

HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
kPa	kilo Pascales
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
Pd-C	Paladio-Carbono
C.C.V	Cultivo de Células Vegetales
g	gramos
L	litro
mL	mililitro
μ L	microlitro
λ	longitud de onda
t_R	tiempo de retención
h	hora
M	molar
mM	milimolar
mM/L	milimolar sobre litro
mg/L	miligramos sobre litro
$\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$	Microeinstein por metro cuadrado sobre segundo (unidad de intensidad lumínica)
rpm	Revoluciones por minuto
Rf	Frente de referencia
pH	potencial de hidrógeno
p.e.	por ejemplo

°C	grados Celsius
cm	centímetro
mm	milímetro
CCF	Cromatografía en capa fina
kg/cm ²	kilogramo sobre centímetro cuadrado
min	minuto
pl	punto isoeléctrico
µm	micrometro
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Vol	volumen

1. Resumen

Las biotransformaciones con cultivos de células vegetales para producir compuestos de interés industrial se han presentado como una alternativa a los métodos tradicionales de síntesis de diversos compuestos, a partir de materias primas de bajo costo. Las reacciones involucradas en las transformaciones de compuestos orgánicos por el cultivo de células vegetales incluyen principalmente la oxidación, hidroxilación, glicosilación, reducción, etc. Existen diversos métodos para realizar ensayos de biotransformación con CCV, siendo uno de los más importantes la adición de un compuesto (ya sea de origen natural o sintético) que pueda servir de sustrato a las enzimas contenidas en los CCV.

El eugenol (2-metoxi-4-(2)-propenilfenol) e isoeugenol (2-metoxi-4-(1)-propenilfenol) son componentes naturales que se obtienen del aceite esencial de clavo (*Caryophylliflos*), el cual es comúnmente utilizado como aditivo en la industria de alimentos y como segmentante por odontólogos. El isoeugenol es producto de la isomerización del doble enlace C-C del eugenol; por otro lado, el α -diisoeugenol y el dehidrodiisoeugenol (dímeros de isoeugenol); son compuestos que presentan una actividad biológica antioxidante y anti-inflamatoria benéfica.

La formación de los dímeros es importante en el campo de los antioxidantes, ya que se tiene reportado que el poder antioxidante del dímero es mayor que el del monómero; la preparación de los dímeros se hace mediante una reacción de acoplamiento oxidativo mediado por agentes oxidantes. Se sabe que las peroxidasas son enzimas que se caracterizan por catalizar el acoplamiento *orto*-oxidativo (dimerización/polimerización) de compuestos fenólicos.

El presente trabajo evaluó la transformación de isoeugenol a su respectivo dímero con el cultivo de células vegetales de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y estrés nutritivo (Fig.1). Para lograr lo anterior se obtuvo la línea celular de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y con/sin estrés nutritivo. Se realizó la cinética de crecimiento de la línea celular, con la finalidad de identificar el tiempo (días) de mayor producción de biomasa.

La transformación del isoeugenol a su respectivo dímero se realizó por medio del CCV de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y con/sin estrés nutritivo y extractos crudos enzimáticos, en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno.

El curso de la reacción de biotransformación fue seguido por Cromatografía en capa fina (CCF). Los resultados obtenidos en cromatografía de capa fina mostraron la presencia de los dímeros del isoeugenol como producto principal y la posible formación de vainillina como producto secundario.

Se logró la implementación de un método de análisis del producto principal de la transformación por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La diferencia entre las condiciones utilizadas consistió en la cantidad de productos formados; así como el efecto del peróxido de hidrógeno en el rendimiento de la biotransformación.

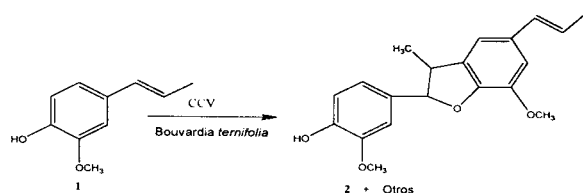


Fig.1 Biotransformación de isoeugenol

Introducción

Los derivados químicos producidos por los organismos vivos (desde microorganismos hasta organismos superiores, como las plantas), han sido de gran importancia para la humanidad. Productos diversos tales como medicamentos, insecticidas, saborizantes, colorantes, fragancias y alimentos son obtenidos a partir de ellos.

Los productos derivados de las plantas dependen directamente de la disponibilidad que se tenga de éstas; lo que a su vez, se ve limitada por varios factores como: la distribución geográfica, variaciones ambientales, o que se traten de especies protegidas y de comercialización entre otros, afectando así la obtención de los compuestos que resultan de interés. Es aquí donde surgen como opción las biotransformaciones; aprovechando la maquinaria enzimática de las células, para mejorar los rendimientos. Otro de los factores a considerar, es la ventaja de trabajar en condiciones de temperatura y pH fisiológicos, con respecto a la síntesis química tradicional, en la cual se requieren de condiciones extremas, por ejemplo de presión o temperatura y además con bajos rendimientos.

La creciente tendencia hacia el consumo de ingredientes naturales (esencias, saborizantes, antioxidantes) de los alimentos ha traído como consecuencia una sobreexplotación de los recursos naturales. Es por ello que el cultivo de tejidos vegetales es una alternativa biotecnológica en la producción de este tipo de sustancias, utilizadas en la industria de la química y en particular en la producción de aditivos de alimentos de interés comercial.

Es importante señalar que algunas reacciones que ocurren en las células vegetales son complejas. Para producir esas reacciones, las células vegetales,

el cultivo de órganos y las enzimas de las plantas son los catalizadores adecuados. Debido a esto, las enzimas presentes en las células vegetales son de suma importancia, para lograr la biotransformación de los compuestos orgánicos presentes en las células vegetales, a productos recuperables y útiles. Las biotransformaciones a partir de sustratos exógenos en células en suspensión, es un medio económico que permite el amplio uso de sustratos con la finalidad de convertir materias primas de bajo costo en compuestos de mayor uso; 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. La biotransformación de compuestos orgánicos se ha convertido en una herramienta dentro de la química sintética, principalmente debido a que se realizan transformaciones químicas de manera regio, químic y estereoselectiva y, por lo regular se llevan a cabo a temperatura y pH fisiológicos.

Una ventaja que presentan las biotransformaciones, es el obtener compuestos que no se encuentran de manera natural en las plantas, gracias a los diversos grupos de enzimas presentes en ellas.

Las peroxidases son un grupo de enzimas que se han estudiado dentro del campo de las biotransformaciones. Una de las características más importantes que posee este grupo de enzimas, es catalizar el acoplamiento orto-oxidativo (dimerización) de compuestos fenólicos y aminas aromáticas; entre los que están los flavonoides y los fenilpropanoides, los cuales son antioxidantes naturales. Estos compuestos son oxidados por peroxidases en presencia de peróxido de hidrógeno, para formar productos diméricos, oligoméricos o poliméricos.

Resumen

Las biotransformaciones con cultivos de células vegetales para producir compuestos de interés industrial se han presentado como una alternativa a los métodos tradicionales de síntesis de diversos compuestos, a partir de materias primas de bajo costo. Las reacciones involucradas en las transformaciones de compuestos orgánicos por el cultivo de células vegetales incluyen principalmente la oxidación, hidroxilación, glicosilación, reducción, etc. Existen diversos métodos para realizar ensayos de biotransformación con CCV, siendo uno de los más importantes la adición de un compuesto (ya sea de origen natural o sintético) que pueda servir de sustrato a las enzimas contenidas en los CCV.

El eugenol (2-metoxi-4-(2)-propenilfenol) e isoeugenol (2-metoxi-4-(1)-propenilfenol) son componentes naturales que se obtienen del aceite esencial de clavo (*Caryophylliflos*), el cual es comúnmente utilizado como aditivo en la industria de alimentos y como segmentante por odontólogos. El isoeugenol es producto de la isomerización del doble enlace C-C del eugenol; por otro lado, el α -diisoeugenol y el dehidrodiisoeugenol (dímeros de isoeugenol); son compuestos que presentan una actividad biológica antioxidante y anti-inflamatoria benéfica.

La formación de los dímeros es importante en el campo de los antioxidantes, ya que se tiene reportado que el poder antioxidante del dímero es mayor que el del monómero; la preparación de los dímeros se hace mediante una reacción de acoplamiento oxidativo mediado por agentes oxidantes. Se sabe que las peroxidasas son enzimas que se caracterizan por catalizar el acoplamiento *orto*-oxidativo (dimerización/polimerización) de compuestos fenólicos.

El presente trabajo evaluó la transformación de isoeugenol a su respectivo dímero con el cultivo de células vegetales de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y estrés nutritivo (Fig.1). Para lograr lo anterior se obtuvo la línea celular de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y con/sin estrés nutritivo. Se realizó la cinética de crecimiento de la línea celular, con la finalidad de identificar el tiempo (días) de mayor producción de biomasa.

La transformación del isoeugenol a su respectivo dímero se realizó por medio del CCV de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y con/sin estrés nutritivo y extractos crudos enzimáticos, en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno.

El curso de la reacción de biotransformación fue seguido por Cromatografía en capa fina (CCF). Los resultados obtenidos en cromatografía de capa fina mostraron la presencia de los dímeros del isoeugenol como producto principal y la posible formación de vainillina como producto secundario.

Se logró la implementación de un método de análisis del producto principal de la transformación por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La diferencia entre las condiciones utilizadas consistió en la cantidad de productos formados; así como el efecto del peróxido de hidrógeno en el rendimiento de la biotransformación.

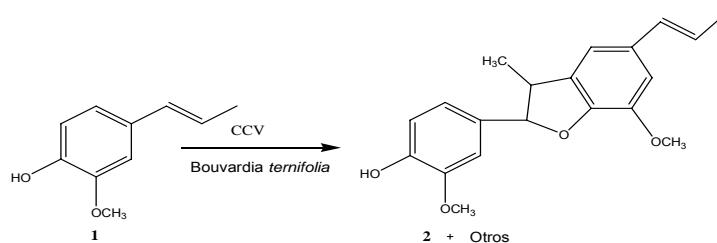


Fig.1 Biotransformación de isoeugenol

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la biotransformación de isoeugenol a dímero de isoeugenol y vainillina con el cultivo de células vegetales de *Bouvardia ternifolia*, en callo, suspensión y estrés nutritivo, con la finalidad de identificar si el cultivo presenta la maquinaria enzimática para la transformación.

Objetivos particulares

- Verificar que se realiza la biotransformación de isoeugenol con hojas de *Bouvardia ternifolia*.
- Obtener la línea celular de *Bouvardia ternifolia*, tanto en callo como en suspensión.
- Elaborar una cinética de crecimiento de la línea celular en suspensión de *Bouvardia ternifolia*.
- Obtención de los extractos crudos enzimáticos en callo, células en suspensión con y sin estrés nutritivo.
- Transformar el isoeugenol con cultivos de callo y células en suspensión de *Bouvardia*, bajo condiciones de estrés nutritivo así como, en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno, evaluando los extractos enzimáticos para verificar la conversión de isoeugenol a dímero de isoeugenol y vainillina.
- Evaluar la formación del dímero de isoeugenol y vainillina como productos principales de la transformación.

- Analizar y cuantificar por un método de HPLC, tanto sustratos como productos de la transformación (dímero de isoeugenol, vainillina e isoeugenol residual).

Antecedentes

4.1. Biotransformaciones

El término biotransformación o también llamado bioconversión se aplica al proceso en donde un compuesto orgánico es transformado a un producto diferente, mediante una serie de reacciones químicamente definidas, catalizadas por enzimas contenidas en organelos de las células.

Esta técnica conjuga la síntesis química con el uso de organismos vivos. Ya sea que se empleen materiales celulares completos o que se aislen de éstos las enzimas, los catalizadores naturales ofrecen grandes ventajas para la producción de sustancias tradicionales o nuevas.

Algunas de las características por las que se opta por las biotransformaciones sobre la química tradicional, son: éstas poseen una alta especificidad (en términos de regio, quimio y estereoespecificidad) con respecto a los sustratos sobre los que actúan; los procesos en los que son empleadas suelen ser más rápidos; trabajan en condiciones fisiológicas, por lo que no demandan condiciones extremas de reacción; pueden dar altos rendimientos en productos enantioméricamente puros; debido a su especificidad sobre el sustrato, no forman subproductos; y son capaces de producir compuestos nuevos a partir de sustratos distintos a los que suelen transformar a nivel celular (Loughlin, 2000; Roberts, 1999; Tuner, 1994).

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. Se llevan a cabo a temperatura (20-40° C) y presión ambiente (0-34 kPa) (Flores, 2004).

Métodos de biotransformación

Para Leuengerger (1984), 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 del aroma, 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.
- ❖ Mediante el uso de células inmovilizadas. Aquí es necesario producir las células en un medio apropiado, para después separarlas e inmovilizarlas.
- ❖ 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 apropiada de los precursores a través de la membrana microbiana, o bien que el producto de la transformación no se difunda una vez producido.
- ❖ Mediante el uso de sistemas multifase. Se recomienda trabajar en dos fases, una acuosa que contiene la enzima o los microorganismos y un solvente no miscible en agua.

- ❖ Mediante el uso de sistemas de multiconversión. Para el caso en que la bioconversión requiera de dos o más pasos secuenciales (García *et al.*, 1993).

Las biotransformaciones pueden ser llevadas a cabo por distintos sistemas entre los cuales se encuentran: células microbianas, de plantas o de animales, así como organelos que pueden suministrar las enzimas para la transformación (Hurtado y Merino, 1994). 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 substratos que se les añaden (Byong, 1996).

Como ejemplo de estos sistemas de biotransformación se tiene: la biotransformación de isoeugenol a vainillina por *Bacillus fusiformis*. Este sistema de biotransformación es un sistema por medio de células microbianas, en donde el aceite esencial del eugenol e isoeugenol es mejor y más económico para la producción de vainillina por bioconversión; por tanto la bioconversión de isoeugenol a vainillina se vuelve más atractiva. Recientemente algunas investigaciones han llevado a cabo conversiones microbianas y enzimáticas de isoeugenol a vainillina (Shimoni *et al.*, 2000; Washisu *et al.*, 1993); sin embargo, en estos sistemas los rendimientos del proceso de bioconversión de eugenol e isoeugenol, hacia la producción de vainillina fueron relativamente bajos.

Algunas cepas conocidas para convertir eugenol e isoeugenol a vainillina incluye a *Bacillus*, *Pseudomonas putida*, *A. niger*, *Corynebacterium*

glutamicum, *Corynebacterium*, *Arthrobacter globiformis*, *Pseudomonas sp.* y *Serratia marcescens* (Priefert *et al.*, 2001).

Los ensayos de biotransformación con CCV que se han realizado utilizando el eugenol (1) e isoeugenol (2) como precursor (Fig. 2 y 3), han sido orientados a glicosidarlos en el grupo hidroxilo (Orihara *et al.*, 1992).

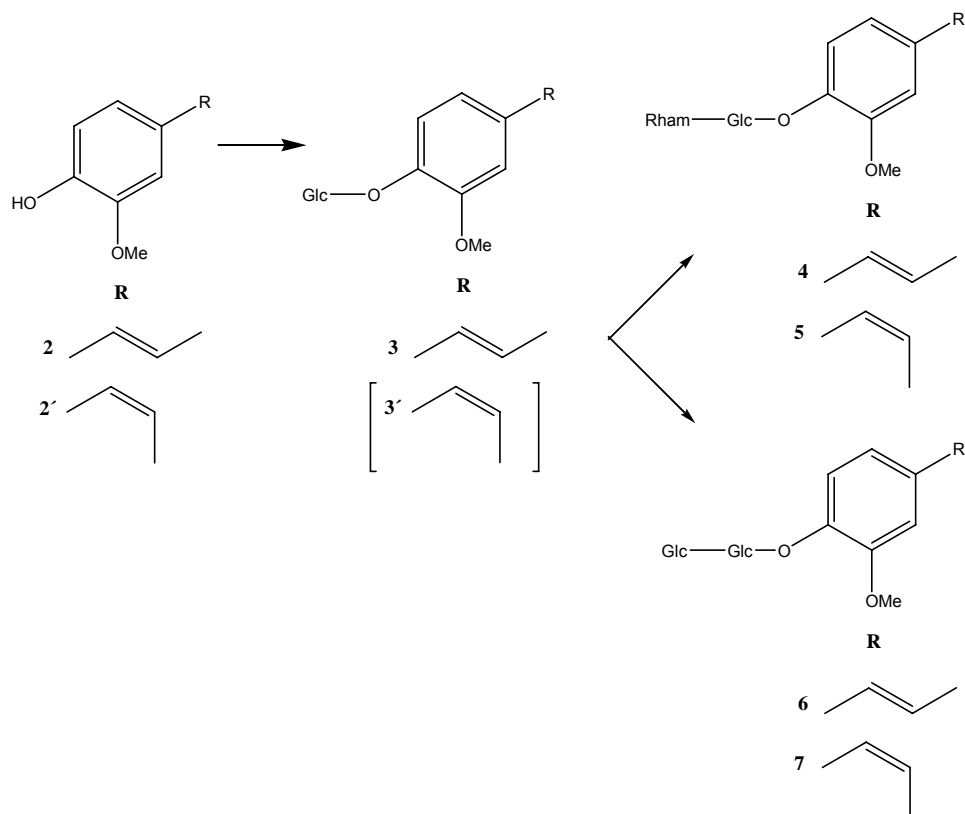


Fig.2. Glicosidación de isoeugenol mediante CCV de *Eucalyptus perriniana*

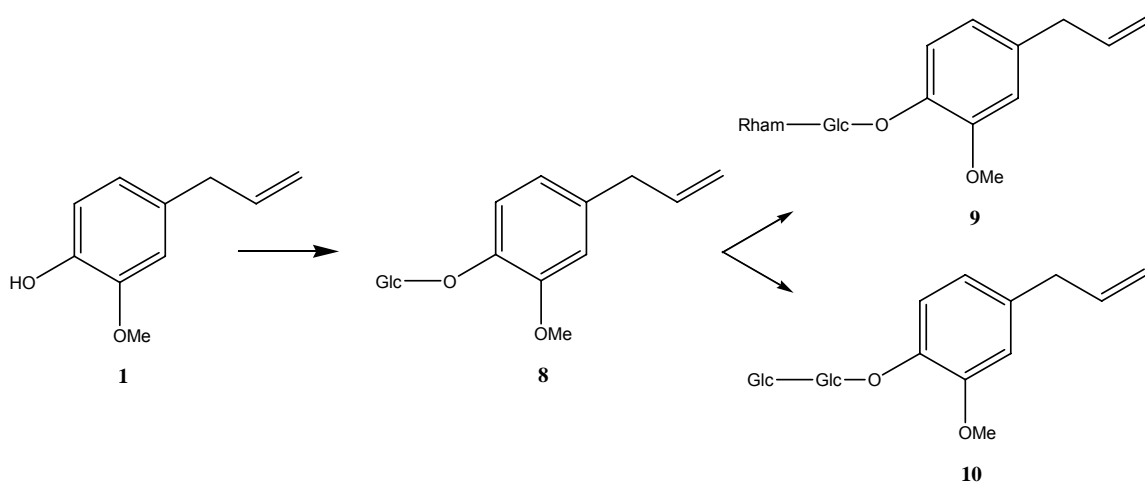


Fig.3. Glicosidación de eugenol mediante CCV de *Eucalyptus perriniana*

4.2. Biotransformaciones con cultivo de tejidos vegetales

Las plantas son fuente de diversos compuestos que se utilizan en la industria alimentaria. Sirven como fuente de saborizantes, antioxidantes, colorantes y aromatizantes, entre otros. A pesar de que se han logrado grandes avances en la producción de muchos de estos aditivos a partir de fermentaciones microbianas, no se puede dejar a un lado el incremento en la demanda de productos de origen natural (Sahai, 1994; Scragg, 1994).

Las células de las plantas poseen un repertorio de enzimas para transformación y pueden incluso sobrepasar a los microorganismos en la consecución de ciertas reacciones, como las hidroxilaciones y glicosidaciones.

Las biotransformaciones con cultivo de células vegetales son consideradas como un método importante para convertir compuestos orgánicos abundantes y de bajo costo, en compuestos recuperables y útiles, de acuerdo a la capacidad de los cultivos de células vegetales (Suga & Hirata, 1990). Además sirven como herramientas utilizadas en la modificación estructural de moléculas, para dar compuestos que poseen propiedades benéficas. Los tipos de reacciones regioselectivas y estereoespecíficas, en la biotransformación de compuestos exógenos, es esencial en el desarrollo de la biotecnología, para el uso de células de plantas superiores (Ishihara *et al.*, 2003).

Las reacciones involucradas en las biotransformaciones de compuestos orgánicos, por medio del cultivo de células vegetales incluye: oxidación, reducción, hidroxilación, esterificación, metilación, isomerización, hidrólisis y glicosilación (Ishihara *et al.*, 2003).

En la Fig.4, se plantea el método general para la biotransformación de un sustrato con CCV.

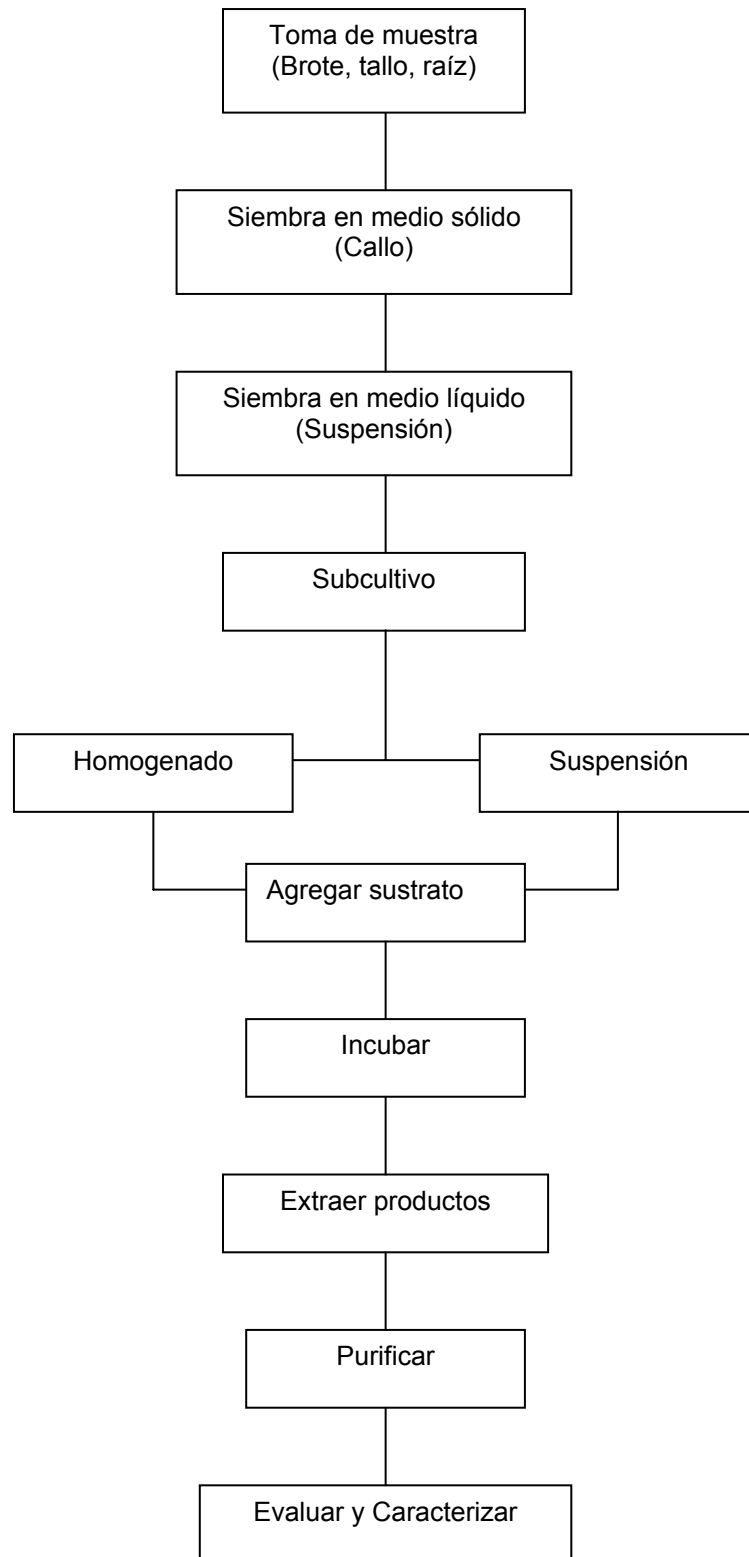


Fig.4. Metodología general para la biotransformación de un sustrato con CCV.

4.3. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de células, tejidos, y órganos de vegetales es una de las áreas de crecimiento de la biotecnología, debido a su potencial para rendir productos de alto valor añadido, y para conseguir cultivos y plantas ornamentales mejoradas. Los cultivos de células vegetales (CCV) actualmente constituyen una alternativa para sintetizar sustancias cuya producción comercial se ve limitada por factores externos (problemas con la disponibilidad de las plantas), o porque la síntesis convencional resulta económicamente inviable (Navarro y Vera, 1994).

El cultivo de tejidos vegetales es el proceso mediante el cual pequeños fragmentos de un tejido vivo (explante) se aíslan de un organismo y se cultivan asépticamente durante un período indefinido de tiempo en un medio nutritivo.

Los términos intercambiables cultivos de tejidos vegetales y cultivos celulares designan todas las formas de cultivos vegetales crecidas *in vitro*, que van desde células sueltas y proliferaciones celulares indiferenciadas hasta masas multicelulares y cultivos de órganos. El cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*, que consiste en la propagación de células vegetales en un medio estéril, ofrece grandes posibilidades de producción de sustancias químicas de alto valor e ingredientes alimentarios naturales (Byoung, 2000).

Uso de los cultivos de células vegetales

En la actualidad la técnica de cultivos de células vegetales se utiliza en cuatro vertientes esencialmente: 1) propagación de plantas *in vitro* (micropropagación) en horticultura y silvicultura, principalmente; 2) producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos en masa de células vegetales, 3) la utilización de técnicas de DNA recombinante para la modificación genética de plantas y 4) en la preservación de germoplasma agronómico y silvestre (Hernández, 1991).

Estas técnicas se caracterizan porque:

1. Ocurren a microescala p.e. sobre una superficie relativamente pequeña.
2. Se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales.
3. Se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nemátodos).
4. Generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, permitiendo que un tejido aislado puede dar origen a un callo, o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (por ejemplo, formación de órganos, embriogénesis somática).
5. La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes eran imposibles. (Pierik, 1990).

Tipos de cultivos

Una planta se compone de diferentes órganos, cada uno de los cuales contiene diferentes tejidos, los cuales a su vez están constituidos por células individuales. Hay muchos tipos diferentes de cultivo *in vitro*, de la misma forma que se encuentran materiales diferentes en la constitución de las plantas (George y Sherrington, 1984).

Estos tipos de cultivo son:

1. Cultivo de plantas intactas: Se siembra la semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.
2. Cultivo de embriones: Se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Se cultiva *in vitro* un órgano aislado. Se pueden distinguir distintos tipos p.e. cultivo de meristemas, cultivo de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc. Generalmente una porción (de tejido, o un órgano), aislada de una planta, se denomina explante, y a su cultivo, cultivo de explante.
4. Cultivo de callo: Se llama así, cuando una porción de tejido se desdiferencia *in vitro*, originando un callo.
5. Cultivo de células aisladas: Es el crecimiento de células individuales, obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
6. Cultivo de protoplastos: Se obtiene a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

De Fossard (1977) distinguía tres tipos de cultivo *in vitro* en las plantas superiores:

1. *Organizado*: Se refiere al cultivo de plantas completas o casi completas (embriones, semillas), o al cultivo de órganos, donde se mantiene la estructura característica del órgano o de la planta. Se parece mucho a la propagación vegetativa in vivo, por esqueje, división, estolones y yemas o vástagos axilares. Si la estructura orgánica no se destruye, la descendencia obtenida es idéntica al material vegetal original.
2. *No organizado*: Si las células y/o los tejidos se aíslan de una porción organizada de una planta, se desdiferencian y cultivan, se obtiene un crecimiento no organizado (en forma de callo). Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivo en suspensión). El crecimiento no organizado se induce fundamentalmente por el uso de altas concentraciones de auxina y/o citocinina en el medio nutritivo. La estabilidad genética de los cultivos no organizados es frecuentemente baja.
3. *No organizado/Organizado*: Se trata de un intermedio entre los dos anteriores. Las células de un órgano o tejido aislado, primero se desdiferencian, para posteriormente formar tejidos o una capa de tejido calloso. A partir de estos se desarrollan rápidamente órganos (p. e. raíces y/o vástagos), o incluso individuos completos (pro-embryones o embryones). Se debe tener en cuenta que las estructuras organizadas se pueden desarrollar a partir de cultivos no organizados espontáneamente o por medio de técnicas especiales. En todos estos casos la descendencia no es completamente idéntica con respecto al material original.

En la Fig.5 se explica de manera general como se establece una línea de CCV:

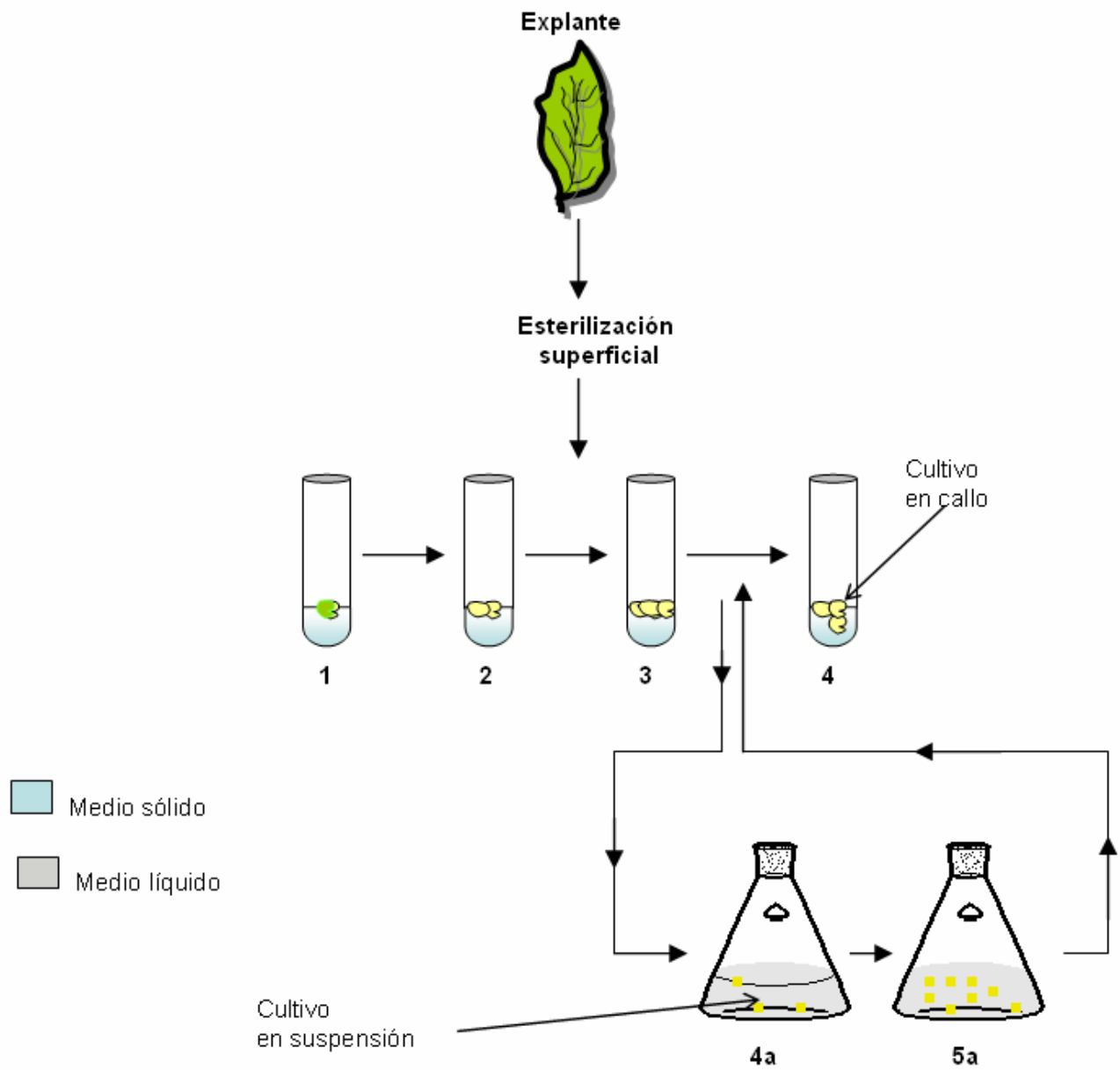


Fig.5. Desarrollo de cultivo de células vegetales

En el tubo 1 se ha producido el aislamiento de un explante, sobre un medio sólido, para obtener un tejido calloso sobre las superficies lesionadas. Esto último se consigue en el tubo 2. En el tubo 3 se realiza un subcultivo del callo sobre un medio sólido: para ello, el callo formado en el tubo 2 es separado en pequeños fragmentos y sembrado en el tubo 3: consiguiéndose un gran desarrollo en el tubo 4. El desarrollo posterior al tubo 4 puede tener lugar sobre un medio sólido, pero también se puede desarrollar en el seno de un medio líquido. En el matraz 4a se han sembrado algunos agregados de células del callo que han sido capaces de multiplicarse en el transcurso de unas semanas (matraz 5a).

Inducción de callos y cultivo de callos

Un callo es básicamente un tejido tumoral, más o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Se llama inducción del callo al inicio de su formación. Es posible la formación de callos con muchas especies diferentes, posteriormente los callos se cultivan en un medio diferente, y nos referimos a ellos como subcultivos de callo. En condiciones excepcionales, y a veces de forma espontánea, se puede producir la regeneración de órganos adventicios y/o embriones, a partir de callos. En un medio líquido, un callo puede formar agregados (masas de células), o células individuales. Se pueden regenerar plantas completas incluso a partir de células individuales.

Inducción de callo

Si en el explante aislado sólo existen células diferenciadas, es necesario producir una desdiferenciación, antes de que tenga lugar la división celular, siendo las células parenquimáticas las que generalmente pueden sufrir este proceso. Si un explante contiene tejido meristemático en el momento de su aislamiento, este puede dividirse de forma inmediata, sin necesidad de que se produzca una desdiferenciación. La desdiferenciación juega un papel muy importante, ya que permite, a las células maduras de un explante, de una planta adulta, presentar una redefinición. En este proceso, las células adultas son capaces, de forma temporal, de pasar desde su forma adulta a su forma juvenil (rejuvenecimiento). Este rejuvenecimiento puede tener consecuencias muy importantes: Las células son inducidas a dividirse de forma intensiva; las células rejuvenecidas, si se comparan con las células adultas, presentan un

mayor crecimiento y potencial de división; las células rejuvenecidas son capaces, en circunstancias especiales, de regenerar órganos y/o embriones.

Después de la desdiferenciación, las células pueden empezar a dividirse de forma intensiva, bajo la influencia de algunos factores como los reguladores de crecimiento que puedan existir en el medio; así se forma un tumor que recibe el nombre de callo. Un callo es en principio un tejido no organizado y poco diferenciado; sin embargo se pueden encontrar tejidos diferenciados en agregados grandes de tejido calloso. Cuando se examina de forma crítica un tejido de callo, puede verse que está lejos de ser algo homogéneo, ya que generalmente está constituido por dos tipos de tejidos: Uno diferenciado y otro no diferenciado.

Cualquier tipo de órgano (raíz, tallo, hoja, flor, etc.) o tejido puede ser utilizado como material inicial para la inducción de callo. Si ésta resulta difícil o se precisa un callo juvenil, se utilizan embriones (inmaduros) o fragmentos de plántulas. Debe tenerse en cuenta, que tanto el material inicial (adulto o juvenil), como la posición del explante sobre la planta (que refleja el nivel de hormonas endógenas), pueden tener una gran influencia en procesos como la división celular y formación de órganos y embriones.

Para iniciar la formación de callos a partir de un explante, se recomienda el suministro de reguladores exógenos. Las exigencias de regulador exógeno (tipo de regulador, concentración, proporción auxina/citocinina), dependen en gran medida del genotipo y de su contenido en hormonas endógenas. Estas necesidades en principio pueden dividirse en tres categorías:

1. Sólo se necesitan auxinas (especialmente monocotiledóneas).
2. No se requieren más que citocininas.
3. Se precisan tanto auxinas como citocininas.

Antes del descubrimiento de las citocininas, ya se había observado la extremada eficacia para inducir la formación de callo, de una combinación de la auxina 2,4-D con la leche de coco. Después del descubrimiento de la citocinina, se pudo ver que, en la mayor parte de los casos, aunque no en todos, la leche de coco podía ser reemplazada por la citocinina. La auxina y la citocinina son esenciales para la formación de callo. También son importantes para la formación de callo muchos otros factores y reguladores, como por ejemplo: el genotipo, la composición del medio nutritivo, factores físicos del crecimiento (luz, temperatura, etc.). Como medio mineral se suele utilizar el de Murashige y Skoog (1962), o algunas otras formulaciones (B₅, N₆, White, etc.). Como fuente de azúcar se suele usar sacarosa o glucosa al 2-4%. Si no se conocen las exigencias nutritivas exactas, para la formación de callo, se pueden añadir al medio, otros compuestos como: Hidrolizado de caseína, extracto de malta, extracto de levaduras. El efecto de la irradiación sobre la formación de callo depende de la especie vegetal; en algunos casos es necesaria la presencia de luz mientras que en otros se precisa oscuridad. Para la formación de callo resulta generalmente ventajosa la temperatura elevada (22-28°C). (George y Sherrington, 1984).

Cultivo de callos

Después de conseguida la inducción, el callo se cultiva sobre un medio nuevo. El primer subcultivo suele llevarse a cabo sobre un medio sólido, aunque en algunos casos es posible empezar directamente sobre un medio líquido. Si el callo presenta un crecimiento pobre en el primer subcultivo, puede ser necesario subcultivar también una porción del explante. Las condiciones de crecimiento (medio nutritivo, factores físicos del crecimiento) son generalmente semejantes a las que se utilizan para la inducción del callo, sólo las concentraciones de auxina y citocinina son normalmente más bajas. Si el crecimiento del callo se detiene después del subcultivo, indica que el medio de subcultivo no resulta adecuado.

El tejido calloso procedente de diferentes especies vegetales, puede presentar diferencias en estructura y hábito de crecimiento; puede ser: Blanco o coloreado, libre (que se separa fácilmente) o fijo, blando (acuoso) o duro, fácil o difícil para dividirse en células o agregados en medio líquido. El crecimiento de un callo dentro de una misma especie vegetal puede depender también de factores como la posición original del explante sobre la planta, y las condiciones de crecimiento. Por otro lado, a veces se pueden ver diferencias en color y estructura en un callo, que no pueden ser atribuidas a los factores anteriores, debiéndose considerar en estos casos la posibilidad de que se hayan producido algunas mutaciones.

La habituación puede jugar un papel en el cultivo de callos; los callos pueden perder sus exigencias en auxina y/o citocinina, después de subcultivos sucesivos; de esta manera el callo se hace autótrofo con respecto a los reguladores.

Existe gran controversia en la bibliografía para definir qué proporción de este cambio se debe a las mutaciones y qué proporción se debe al ambiente.

Si se van a utilizar los callos como medio para la multiplicación vegetativa de las plantas, aquéllos deben reunir los siguientes requisitos:

1. El potencial regenerativo no se debe perder después de sucesivos subcultivos, ya que puede desaparecer el potencial de un callo, para formar órganos y embriones (Thomas y Street, 1970), en particular este hecho ha sido demostrado en zanahoria (Syono, 1965a, 1965b, 1965c).
2. Estabilidad genética: El material obtenido debe ser idéntico al inicial. Esto, claramente, no siempre es posible.

Sobre medios sólidos

En las referencias bibliográficas antiguas, el cultivo de callos estaba casi siempre descrito, sobre medio sólido, ya que los medios líquidos no se habían desarrollado. El cultivo de los callos es generalmente mucho más lento sobre un medio sólido, que sobre un medio líquido que puede ser agitado. Las razones para que existan estas diferencias son:

1. La porción de callo presenta sólo un contacto limitado con el medio sólido y, por lo tanto, puede absorber menos compuestos del medio.
2. El suministro de oxígeno es mejor sobre medios líquidos.
3. Los callos pueden fragmentarse cuando se encuentran en medio líquido, incrementando así su superficie, y, por lo tanto, la de absorción de materiales del medio.

4. En los medios sólidos se producen gradientes, que pueden ser causa de diferenciaciones tempranas, y por consiguiente, de la inhibición del crecimiento del callo.

En medios líquidos

Los matraces Erlenmeyer colocados sobre un agitador rotatorio se han convertido en un medio muy usual para la proliferación de callos.

Reglas generales para el cultivo de callos en medio líquido:

1. Normalmente se utilizan agitadores rotativos, para impedir la pérdida del medio de crecimiento líquido, cuando los matraces alcanzan altas velocidades.
2. Los matraces nunca se deben llenar más de un 20-30% de su capacidad total.
3. La cantidad de medio en el matraz se puede reducir, siempre que se siembren menos células o agregados celulares.
4. En general se considera que la velocidad de giro debe situarse entre 80 y 100 rpm, aunque a veces se utilizan velocidades más bajas (40) o más altas (120).
5. El crecimiento de las células, callos, etc., generalmente se produce de la siguiente forma: Inicialmente (fase de latencia) no existe prácticamente crecimiento. Después éste aumenta de forma exponencial, para hacerse después lineal, y caer posteriormente hasta detenerse (Street, 1973).
6. La producción rápida de células en los cultivos en suspensión es proporcional a la densidad celular, en el momento de inicio del cultivo.

El cultivo en medio líquido puede ser un cultivo en suspensión (mezcla de células separadas y agregados celulares) o un cultivo de porciones de callo. El

que sea de uno u otro tipo, depende en gran manera de la especie vegetal y del tipo de células que se consideren.

Técnicas de cultivos en suspensión

Los cultivos en suspensión se inician con la adición de trozos de callo no diferenciado a un medio líquido el cual es agitado durante la incubación. El éxito de un cultivo en suspensión depende del callo empleado (de preferencia debe ser friable; es decir que los agregados celulares son débiles). Para conseguir un callo friable es indispensable el uso de fitohormonas en el medio.

Durante el primer periodo de incubación en el medio líquido algunas células son liberadas del explante y son multiplicadas. Para subcultivo se emplea una pipeta Pasteur o jeringa lo suficientemente fina como para evitar la entrada de partículas grandes derivados de una fragmentación parcial del trozo inicial.

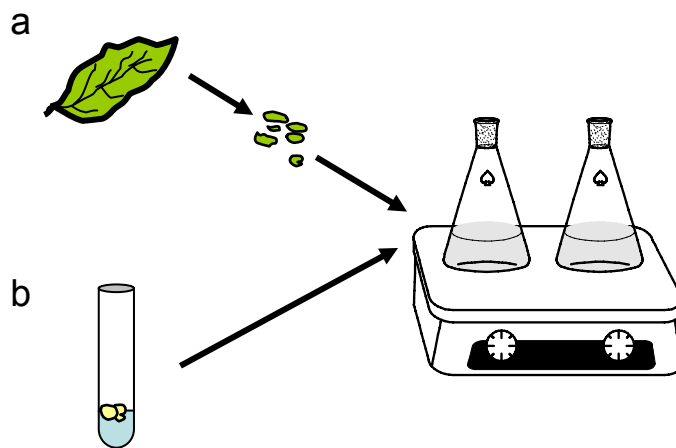
La suspensión transferida en subcultivo debe de consistir de células libres de agregados pequeños. El medio de cultivo empleado debe de ser aquel que permita un crecimiento adecuado del callo, es posible que se requiera de una modificación en cuanto al contenido de fitohormonas para así lograr un crecimiento alto y una separación celular en el medio líquido (Sánchez de Jiménez, 1985).

Generalmente se emplean agitadores orbitales para la iniciación y propagación en serie de cultivos celulares en suspensión. Deben de tener un control de velocidad (30-150 rpm) y el movimiento orbital debe de ser 2-4 cm. El agitador debe de estar en un cuarto con aire acondicionado (con un buen control de temperatura que oscile entre 24-30°C) o la plataforma debe estar en el interior de una incubadora. La plataforma debe de llevar soportes que sostengan los

recipientes donde se tenga el cultivo. Se le puede poner luz fluorescente o bien cubrirlos con papel aluminio si es que requiere de crecer en oscuridad.

Los recipientes usados generalmente son matraces Erlenmeyer de boca ancha. Estos matraces son sellados con papel aluminio. El volumen de medio empleado debe de ser el apropiado. Por ejemplo 20 mL para 100 mL y 70 mL para 250 mL.

En la Fig.6., se observa el establecimiento del cultivo de células en suspensión (Street, 1988)



a) Explante de hoja, b) Callo *in vitro*

Fig.6. Establecimiento del cultivo de células en suspensión

Estos cultivos en lote o “batch” aumentan su biomasa mediante división y crecimiento celular hasta que un factor en el medio de cultivo sea limitante (nutrientes u oxígeno). Las células entran en una fase estacionaria durante la cual el peso seco disminuye. La estabilidad de las células en la fase estacionaria depende de la especie y en la naturaleza del factor que limita su crecimiento. Cuando estas células son subcultivadas en fase estacionaria

pasan por una fase lag, una fase exponencial corta y una fase de declinación de crecimiento para volver a entrar en una fase estacionaria.

“Al iniciarse un cultivo en suspensión el comportamiento que presentan las células en crecimiento es típicamente sigmoide” (Hurtado y Merino, 1994).

Como se puede apreciar en la Fig.7., existen 5 fases: reposo, exponencial, lineal, disminución progresiva o desaceleración y estacionaria.

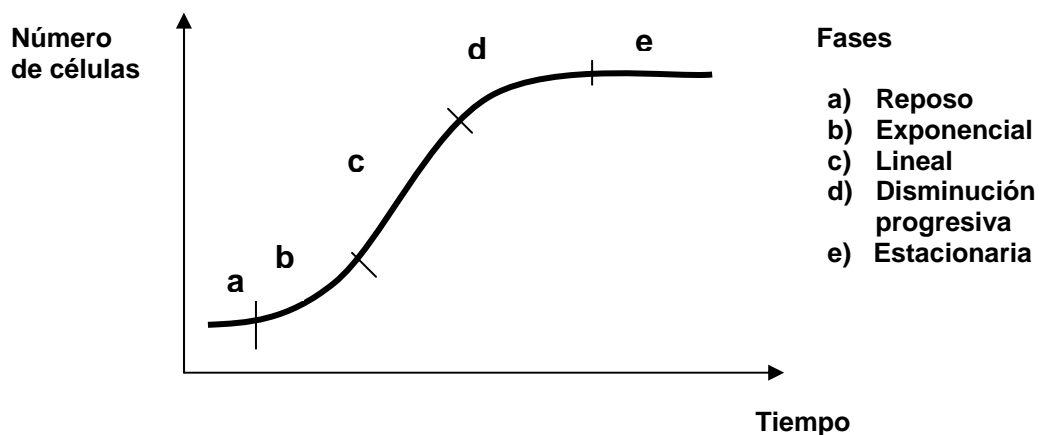


Fig.7. Curva de crecimiento de las células en un cultivo en suspensión

Durante la fase de reposo el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales para, posteriormente, iniciar e incrementar la velocidad de la división celular durante las fases exponencial y lineal. La velocidad de división va disminuyendo gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, que será en el momento en que se hayan agotado los nutrientes, o al menos alguno de ellos. Durante esta fase las células han alcanzado su máxima densidad celular permaneciendo viables pero sin división (Hurtado y Merino, 1994). La mayoría de los cultivos en suspensión alcanza su máxima densidad celular entre los 18

y 25 días, aunque pueden existir cultivos extremadamente activos, que la alcanzan entre 6 y 9 días.

Es recomendable determinar la densidad celular antes de subcultivar las células.

El crecimiento de las células puede expresarse cualitativamente, pues conforme las células se multiplican se observará un aumento en la turbidez del medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento también se expresa cuantitativamente mediante la determinación periódica de parámetros específicos de crecimiento, como son:

1. El peso fresco y peso seco de las células cultivadas.
2. El número de células por unidad de volumen, cuantificadas con ayuda de un hematocitómetro.
3. El volumen total ocupado por las células en una alícuota del cultivo. Las células se compactan mediante centrifugación y el volumen de estas se expresa como un porcentaje del volumen de la alícuota (Hurtado y Merino, 1994).

Los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, con células aisladas y pequeños agregados celulares. La proporción entre ambos, así como su tamaño, depende de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, de la edad del tejido en cultivo, de la composición del medio y de las condiciones ambientales. En la mayoría de los cultivos, el 60 % de las células pueden estar aisladas o formar racimos de dos células; es muy común encontrar racimos celulares de más de 2 mm de diámetro (Hurtado y Merino, 1994).

Una vez establecida la línea celular de CCV, se realiza la biotransformación. De manera general, esta puede ser de dos formas: adicionando un metabolito secundario, que se encuentre en pequeñas cantidades en la ruta biosintética, beneficiando la sobreproducción de algún compuesto conocido de la planta; adicionando un compuesto llamado “elicitador”, el cual produce una respuesta de las células y en donde por lo regular se aumenta la concentración del metabolito; o adicionando un sustrato que mediante la maquinaria enzimática de las células produzca un compuesto que no esté presente o se presente en concentraciones bajas de manera normal en la naturaleza. Esto gracias a que las enzimas presentes en las células de las plantas son capaces de catalizar reacciones de tipo regio y estereoespecíficas (Villa *et al.*, 1998).

Se debe resaltar que la simple adición de un precursor no es sinónimo de que la biotransformación sea realizada. Diversos factores deben ser tomados en cuenta, por ejemplo: la capacidad del precursor (en caso de que sea un compuesto químico sintético) de penetrar la célula; los efectos tóxicos o de retroalimentación en la acumulación del producto; la disponibilidad de las enzimas de entrar en contacto con el precursor (ya sea porque las enzimas no están siendo producidas, o tanto las enzimas como el precursor se encuentran en compartimientos distintos) (Chin y Pederson, 1992). Este último punto puede ser resuelto homogeneizando las células (esto es realizar una lisis mecánica, preferentemente con un aparato con cuchillas de acero inoxidable), dejando así los complejos enzimáticos libres en el medio de reacción para que entre en contacto con el precursor.

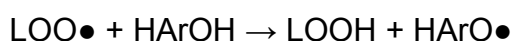
4.4. Monoterpenos

Los monoterpenos son compuestos volátiles que confieren a las plantas una gran parte de su fragancia. Han sido utilizados desde la antigüedad como medicinas y fragancias, parte fundamental de los aceites esenciales, poco solubles o insolubles en agua; la manera más común de obtenerlos es por una extracción directa de la planta. El nombre terpeno deriva de los compuestos aislados de la trementina, un líquido volátil obtenido de algunas coníferas.

Con una ocurrencia natural en la mayoría de las plantas, considerados por algunos autores como parte de los componentes fenólicos de la planta (Bowers, 1992), este tipo de compuestos también están asociados al color y al sabor de diversas frutas (p. e. manzanas, cerezas, y peras).

Los compuestos derivados de los monoterpenos, que poseen un grupo fenilo unido a una cadena alifática de 3 carbonos son conocidos como fenilpropanoides. Estos se encuentran ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal y son utilizados, entre otras cosas, como aditivos alimentarios. Siendo la característica más importante de este tipo de compuestos el poder antioxidante.

Se cree que los antioxidantes de tipo fenólico funcionan donando un hidrógeno del grupo hidroxilo a un radical peróxido, de acuerdo al siguiente esquema, evitando así que se inicie o propague la oxidación:



Donde $\text{LOO}\bullet$ representa un lípido en el proceso inicial de oxidación, mientras que HArOH es el compuesto fenólico. La efectividad de los diferentes antioxidantes fenólicos depende del tipo y posición de los grupos asociados al anillo bencénico y a la factibilidad para donar el hidrógeno. (Alatorre, 2001).

4.5. Eugenol e Isoeugenol

En la mayoría de los aceites esenciales están presentes compuestos como thymol, carvacrol, y eugenol, los cuales provienen de hierbas y especias; tales como el tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum syriacum*), y el clavo (*Caryophylliflos*) (Cimanga *et al.*, 2002). Estos compuestos son producidos por las plantas como un mecanismo de defensa en contra de microorganismos fitopatógenos (Vázquez *et al.*, 2001). Por consiguiente estos tres compuestos han atraído gran atención en la industria alimenticia. Han sido utilizados en alimentos tales como quesos para prevenir el crecimiento de hongos como un conservador natural (Juven *et al.*, 1994; Vazquez *et al.*, 2001; Venturini *et al.*, 2002). Por otro lado, como medicamentos ya que tienen actividades fisiológicas específicas como antiséptico, antiespasmódico, tónico. Sin tener en cuenta sus actividades biológicas y fisiológicas, presentan un uso limitado como conservadores naturales de alimentos y medicamentos, ya que son insolubles en agua, presentan sublimación y descomposición por la luz. (Mastelic *et al.*, 2004).

Los o-metoxifenoles tal como el eugenol (2-metoxi-4-(2)propenilfenol) y el isoeugenol (2-metoxi -4-(1)propenilfenol) son componentes del aceite esencial de clavo, los cuales son comúnmente utilizados como agentes saborizantes en cosméticos y productos alimentarios. Además se sabe que estos compuestos tienen propiedades benéficas, antioxidantes y antiinflamatorias; altas concentraciones de estos compuestos tienen efectos adversos causando inflamación y reacciones alérgicas, causadas por intermediarios de quinona. La actividad biológica antioxidante que poseen los metoxifenoles; tal como el

eugenol e isoeugenol puede ser útil para evitar o disminuir los efectos adversos de estos compuestos (Murakami *et al.*, 2005).

El eugenol es isomerizado a su correspondiente alquenil alcoxi benceno, (isoeugenol) en donde el doble enlace del grupo alqueno migra hacia una posición conjugada del anillo bencénico como se muestra en la Fig.8.

El producto encontrado presenta una gran aplicación en productos farmacéuticos y en una amplia variedad de componentes de flores en fragancias.

La isomerización del eugenol generalmente se lleva a cabo en un medio homogéneo usando una solución de KOH alcohólica, a altas temperaturas (Fig.8.) (Kishore y Kannan, 2004).

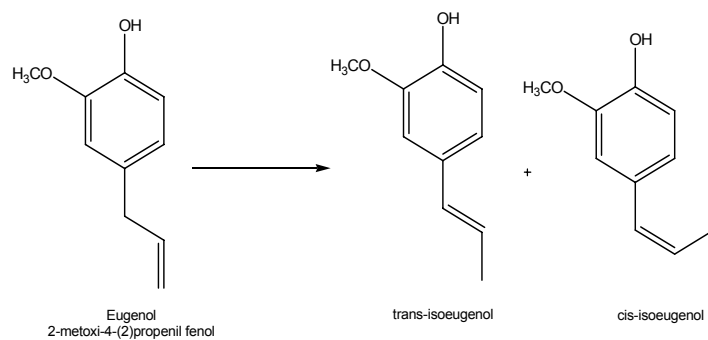


Fig.8. Isomerización de eugenol a isoeugenol

Actividad antioxidante del eugenol e isoeugenol

La capacidad oxidante de los compuestos fenólicos, depende de la estructura química, en particular de la deslocalización de electrones en el anillo aromático (Ogata *et al.*, 2000).

El estrés oxidativo es producido cuando el balance entre la estimulación oxidativa y varios sistemas antioxidantes son dañados (Sies, 1991). A pesar de que el eugenol e isoeugenol son usados a bajos niveles, estos compuestos fueron reportados previamente de tener capacidad de sensibilizar la piel (Barratt y Basketter, 1992) y de causar reacciones alérgicas (Frosh *et al.*, 1995), probablemente debido al estrés oxidativo.

Los orto-metoxifenoles tal como el eugenol e isoeugenol poseen una buena actividad prooxidativa como antioxidante (Ogata *et al.*, 2000) bajo ciertas circunstancias.

En general, bajas concentraciones de eugenol muestran su acción antioxidante, con efectos anti-inflamatorios benéficos; puesto que altas concentraciones actúan como prooxidantes, dirigido al daño del tejido como resultado de la formación de radicales fenoxilo tóxicos (Suzuki *et al.*, 1985; Decker, 1997).

Sin embargo los mecanismos que determinan la actividad antioxidante/prooxidante del eugenol e isoeugenol son pobremente entendidos (Fig.9.) (Atsumi *et al.*, 2005).

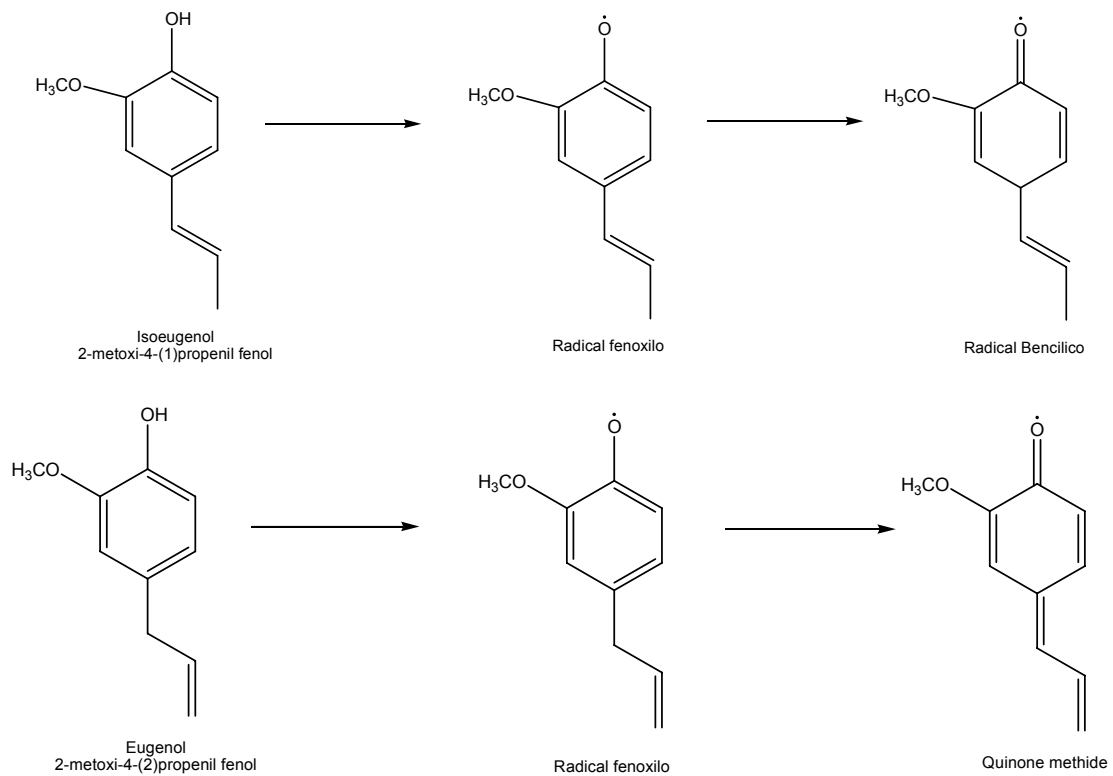


Fig.9. Mecanismos que determinan la actividad antioxidante/prooxidante del eugenol e isoeugenol

Nagababu *et al.*, 1992, revelaron que el eugenol podría inhibir la peroxidación de lípidos en el estado de iniciación, propagación o ambos, varios intentos por la elucidación del mecanismo de reacción de la actividad antioxidante del eugenol se han llevado a cabo. Sin embargo los detalles del mecanismo son todavía desconocidos.

Se sintetizaron algunos compuestos como el dieugenol, el cual es un compuesto derivado de la oxidación del eugenol, dihidroeugenol y tetrahidrodieugenol, los cuales son sintetizados con la finalidad de entender el efecto antioxidante del grupo alquil (Fig.10) (Ogata *et al.*, 2000).

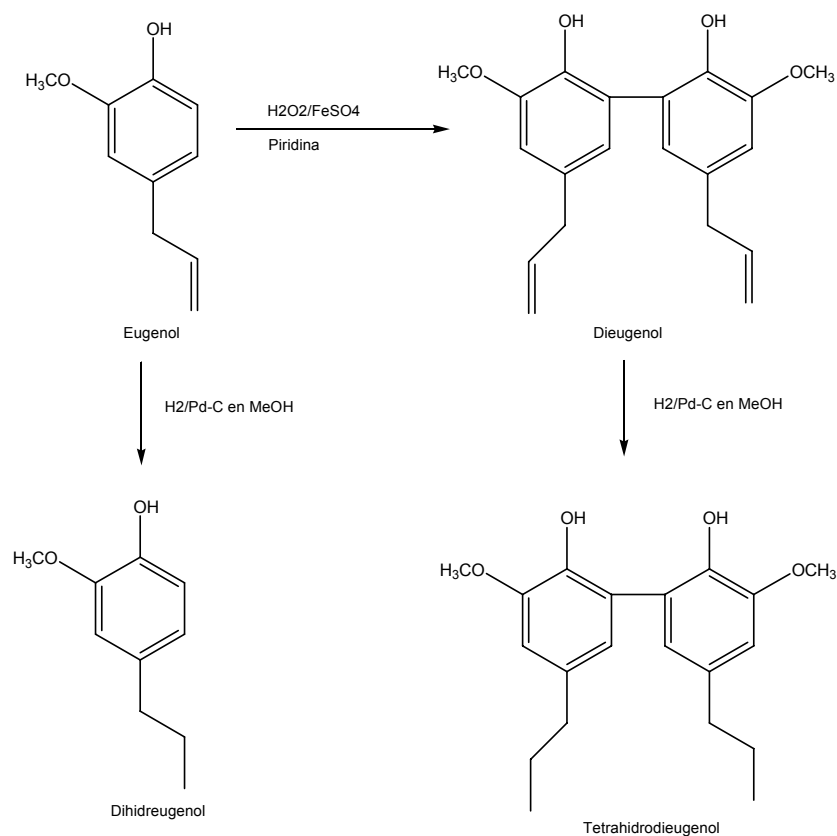


Fig.10. Mecanismo del efecto antioxidante del grupo alquil del eugenol

Aunque las actividades del eugenol en la peroxidación de lípidos por sí mismas son menores que las del α -tocoferol *in vitro*; es conocido que tiene un efecto protector comparado con el α -tocoferol, en organismos afectados por varios estrés oxidativos, por un mecanismo de inhibición entre el monómero y el dímero (Fig.11) (Ogata *et al.*, 2000).

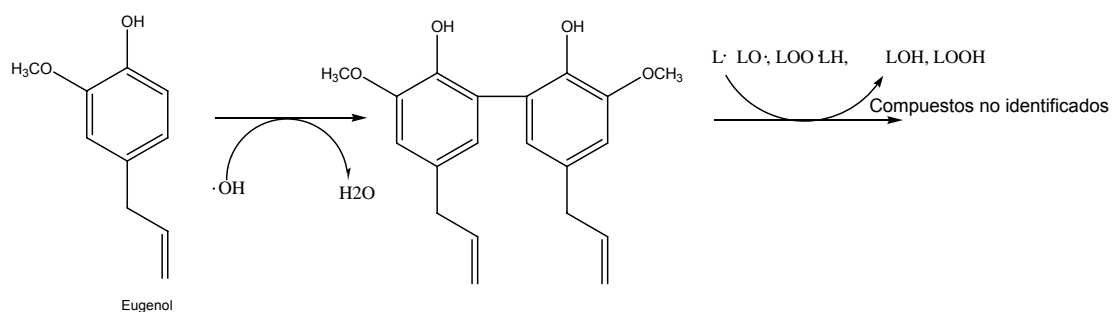


Fig.11. Mecanismo de inhibición entre el monómero y el dímero de eugenol, en la peroxidación de lípidos

4.5.1. Métodos químicos usados para la síntesis de diferentes dímeros de eugenol e isoeugenol.

Síntesis del eugenol

Es obtenido por medio de una disolución de 4-alil-anisol en diclorometano, adicionada con un complejo BBr_3 -Dimetilsulfóxido. Después la mezcla de reacción es sometida por 1h bajo una atmósfera de nitrógeno. La fase acuosa es separada y extraída con dicloroetano. La fase orgánica es secada con Sulfato de Sodio y concentrada a presión reducida. Después separada por cromatografía en columna (Tzeng y Liu, 2004).

Síntesis del dehidrodiisoeugenol

Este compuesto se sintetiza químicamente, desde monómeros de isoeugenol por una reacción de acoplamiento catalizada por FeCl_3 (Murakami *et al.*, 2005).

Síntesis del α -Diisoeugenol

Es sintetizado desde monómeros de isoeugenol, por una reacción de acoplamiento α -configuracional, catalizada con ácido trifluoroacético (Murakami *et al.*, 2005).

Síntesis del bis-Eugenol

Este compuesto puede ser sintetizado desde monómeros de eugenol, por una reacción de orto acoplamiento, catalizada por $\text{CuCl}(\text{OH})$ (Murakami *et al.*, 2005).

Otra forma en la que puede ser sintetizado, es a partir de: eugenol disuelto en piridina y mezclado con Sulfato de fierro (FeSO_4) y 31% de H_2O_2 a 60°C durante 24 hrs, el producto de la reacción fue extraído con Acetato de Etilo y concentrado por destilación al vapor. Los residuos fueron recristalizados a partir de etanol para dar dieugenol como un sólido blanco (Ogata *et al.*, 2000).

Síntesis de dihidroeuogenol

Se llevó a cabo a partir de eugenol, el cual se disuelve en etanol y es hidrogenado al 10% de Pd-C a temperatura ambiente durante 5 hrs. Después se filtró la mezcla de reacción, se evaporó y secó al vacío.

Los residuos fueron concentrados por destilación al vapor para dar dihidroeuogenol como un aceite amarillo (Ogata *et al*, 2000).

Síntesis de tetrahidroeuogenol

Fue sintetizado a partir de dieugenol, los cuales fueron disueltos en etanol e hidrogenados al 10% de Pd-C a temperatura ambiente por 5 hrs. Después de la filtración la mezcla de reacción fue evaporada al vacío. Los residuos fueron recristalizados desde etanol para dar tetrahidroeuogenol, como un sólido blanco (Ogata *et al*, 2000). (Fig.12)

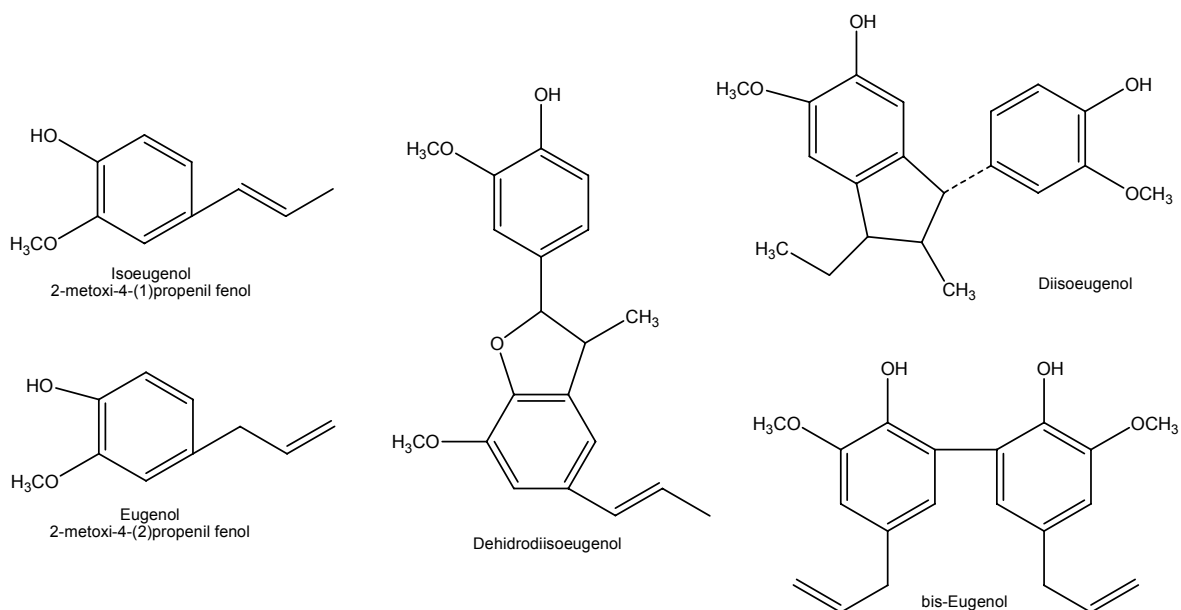


Fig.12. Estructuras de algunos dímeros de eugenol e isoeugenol sintetizados químicamente

Acoplamiento oxidativo del 4-alil-fenol, en presencia de FeCl₃ (Fig.13)

Una solución de magnolol en 95% de EtOH, adicionada con una solución acuosa de FeCl₃. La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante durante 48 h y es acidificada con Et₂O (Sy, Brown, 1998).

Acoplamiento oxidativo de 4-alil-fenol, en presencia de de K₃Fe(CN)₆

Una solución de K₃Fe(CN)₆, adicionada después de 30 min de agitación una solución acuosa de magnolol Na₂CO₃ a 0°C. La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante, es acidificada y extraída con Et₂O (Sy, Brown, 1998).

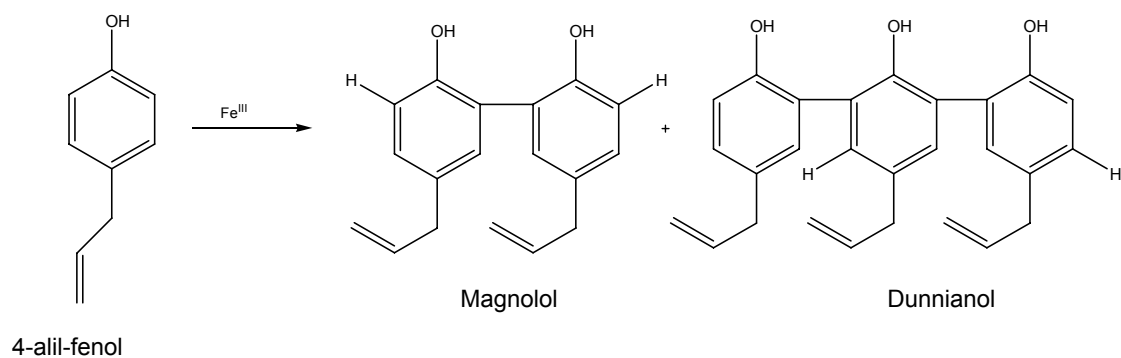


Fig.13. Acoplamiento oxidativo del 4-alil-fenol, en presencia de FeCl₃

4.6. Desventajas de los métodos químicos sobre los métodos biotecnológicos.

1. Son poco específicos en cuanto al tipo de reacción que catalizan, para las estructuras del sustrato y producto formado.
2. Requieren de condiciones extremas; altas temperaturas y tiempos de reacción prolongados.
3. Los reactivos utilizados son tóxicos y difíciles de obtener, generando desechos que requieren de un tratamiento previo antes de eliminarlos.
4. Se obtienen bajos rendimientos.
5. Requieren mayor aporte energético.
6. Generan problemas ambientales o toxicológicos.
7. Mayor costo y menos seguros.

4.7. Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos (Gaspar *et al.*, 1982). En las plantas, estas enzimas participan en diversos procesos: regulación hormonal, mecanismos de defensa, control de la elongación, biosíntesis de lignina, entrecruzamiento de polisacáridos de la pared celular (Vitali *et al.*, 1998). Debido a que estas enzimas tienen un intervalo amplio de pI que va desde 3.5 hasta 9.5 (Pomar *et al.*, 1997), se pueden clasificar en dos grupos como ácidas y alcalinas. Por otro lado son interesantes catalizadores; para realizar oxidaciones selectivas usando oxidantes. Catalizan transformaciones oxidativas de sustratos orgánicos, con peróxido, usualmente peróxido de hidrógeno (Van Deurzen *et al.*, 1997).

Entre las peroxidasas que contienen un grupo hemo; presentes en eucariotas y procariotas, las peroxidasas de las plantas se agrupan en una superfamilia de peroxidasas fungicas y bacterianas, de las cuales han sido definidas tres clases diferentes. La clase I se compone de la citocromo c peroxidasa mitocondrial, cloroplasto y citosol, ascorbato peroxidasas de plantas superiores, y peroxidasas bacterianas. Clase II agrupa todas las peroxidasas fungicas secretoras (del manganeso), mientras que la clase III contiene todas las peroxidasas secretoras de plantas, que demuestran características distintas de otras peroxidasas de plantas, tales como las peroxidasas del ascorbato antes mencionadas (Ros Barceló y Pomar, 2002).

Aplicaciones comerciales de las peroxidasas

Las peroxidasas tienen aplicaciones comerciales en diversas áreas. El campo de desarrollo para su uso comercial, está en el diagnóstico analítico, por ejemplo en biosensores e inmuno-análisis. Por otra parte, las peroxidasas se están estudiando ampliamente como inductor del blanqueo, por ejemplo: como detergente y en las industrias de pulpas, en aplicaciones anti-microbianas, como catalizador para el acoplamiento orto-oxidativo. Recientemente se ha puesto atención sobre el uso de las peroxidasas como catalizadores de oxigenaciones selectivas y como catalizadores de polimerizaciones.

Aunque las peroxidasas tienen potencial para una gran variedad de usos comerciales, se tienen técnicas disponibles para producirlas comercialmente a gran escala, usándolas en procesos comerciales, como catalizadores en la síntesis orgánica todavía son limitadas. La limitada disponibilidad y estabilidad comercial y la baja productividad (espacio-tiempo, rendimiento) son las características que afectan el uso comercial de las peroxidasas (Van Deurzen *et al.*, 1997).

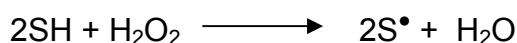
4.7.1. Versatilidad química de las reacciones catalizadas por peroxidasas

La clase III de peroxidasas de plantas, catalizan numerosas oxidaciones, de los sustratos ricos en electrones, algunos de los cuales están presentes en células de plantas y otros no (sustancias extrañas o xenobióticos) (Barceló y Muñoz, 2000). Estas reacciones incluyen la dimerización/polimerización de fenoles, el oxi-funcionamiento de fenoles y aminas aromáticas, la epoxidación y halogenación de olefinas, la oxigenación de heteroátomos y la reducción enantio-selectiva de los hidroperóxidos racémicos (Adam *et al.*, 1999).

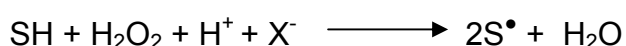
Muchas peroxidasas contienen un grupo prostético hemo (iron(III) protoporphyrin IX), aunque algunas peroxidasas tienen diferentes centros catalíticos.

Las reacciones de las peroxidasas pueden ser divididas en cuatro categorías (Van Deurzen *et al.*, 1997):

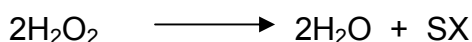
1. Deshidrogenación oxidativa



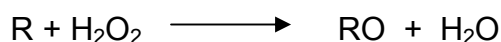
2. Halogenación oxidativa



3. Desproporcionalización de H_2O_2



4. Reacciones de transferencia de Oxígeno



Una reacción típica de peroxidasa es con sustratos orgánicos ricos en electrones, tales como los fenoles (guaiacol, p-cresol, o-resorcina) o aminas aromáticas (anilina, bencidina, o-fenildiamina, o-dianicidina), así como NADPH

y NADH que son oxidados por el H_2O_2 o hidroperoxidasas, a través de la transferencia de un electrón. Las peroxidasas en particular las catalasas también descomponen hidroperoxidos y perácidos, en ausencia de un donador de electrón. La actividad de catalasa realiza la desproporcionalización del H_2O_2 en oxígeno y agua (Faber, 2000).

Otra de las reacciones que catalizan es la oxidación de compuestos aromáticos (Williamson *et al.*, 1999), la cual da la pauta para la dimerización de este tipo de compuestos y que es conocido como acoplamiento oxidativo.

El acoplamiento oxidativo es de gran importancia en la química de los productos naturales (McDonald *et al.*, 1973). Diversos compuestos heterocíclicos, como lo son: alcaloides, glicopéptidos o ciclopéptidos (Dhingra *et al.*, 1982); así como la dimerización de compuestos como flavonoides e hidroxicinamatos (Williamson, 1999), son biosintetizados gracias a la formación de enlaces C-C ó C-O que catalizan este tipo de enzimas.

Las peroxidasas de la lignina catalizan la degradación oxidativa de la lignina. Aunque el papel exacto de las haloperoxidasas (peroxidasas que puedan almacenar sustratos orgánicos) no está todavía claro, los halometabolitos probablemente juegan un papel importante en el sistema de defensa de organismos.

4.7.2. Peroxidasas de plantas

Las peroxidasas de las plantas son enzimas oxido-reductoras, poseen una amplia variedad de especificidad del sustrato y pueden oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos en presencia de H_2O_2 . Debido a esta característica, las peroxidasas de las plantas han sido utilizadas ampliamente en la oxidación catalítica de contaminantes fenólicos y otros aromáticos en aguas residuales industriales por H_2O_2 ; para formar radicales aromáticos libres, que posteriormente continúan formando productos de alto peso molecular, los cuales precipitan en solución debido a su baja solubilidad.

La peroxidasa de la soya, es una de las peroxidasas de plantas, la cual; es un subproducto económico de la semilla de soya. Puede ser detectada en la raíz, en la hoja y en la semilla de la soya. La peroxidasa es obtenida de la semilla contiene la actividad más alta, en comparación con la peroxidasa obtenida de otras partes de la planta de soya (Geng *et al.*, 2001).

Peroxidasas como catalizadores en la síntesis de compuestos fenólicos bioactivos naturales de plantas

Ácido elágico

El ácido elágico (Fig.14) se encuentra en plantas dicotiledóneas del género *castanea*, *eucalyptus*, *Eugenia*, *euphoria*, *gerinimum*, *magnifera*, *platycarya*, *quercus*, *rhus* y *terminalia*.

Es importante su particular abundancia en algunas frutas y vegetales, tal como uvas, fresas, mangos, té verde, etc. Se ha encontrado que este compuesto presenta cierta actividad farmacológica como antioxidante, antimutagénico y agente anticarcinogénico.

El ácido elágico es la dilactona del dímero del ácido gálico. La biosíntesis del ácido elágico en plantas ocurre vía oxidación de un electrón del ácido gálico, seguido de una dimerización de radicales del ácido gálico y luego procede la estabilización de los dímeros del ácido gálico vía lactonización. De tal manera que la oxidación monoelectrónica puede ser catalizada por peroxidasas de plantas de la clase III (Ros Barceló y Pomar, 2002).

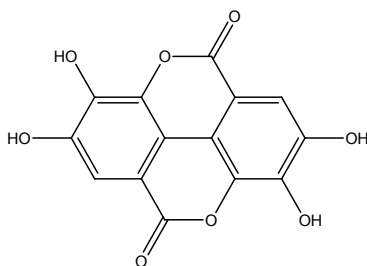


Fig.14. Estructura del ácido elágico

Ácido ferúlico

El ácido ferúlico (Fig.15) es un compuesto que se encuentra en la mayoría de las plantas (principalmente monocotiledóneas), formando parte de la pared celular y constituyendo puente de unión entre polisacáridos (conjugados glicosídicos) y raramente se encuentra de manera libre. Se encuentra como un éster ligado a polisacáridos de la pared celular primaria de las gramíneas (Ros Barceló y Pomar, 2002). Desarrolla un papel muy importante en la defensa de la planta y es precursor de compuestos antimicrobianos y antimicóticos. También se le ha asociado con actividad antihepatóxica, antitumoral, antiestrogénica, antimicótica y colesterolémica; inhibidor de sabores amargos. Es un potente anticarcinógeno que bloquea la formación de nitrosaminas en el fluido gástrico.

La dimerización del ácido ferúlico se lleva a cabo en la pared celular por peroxidasas formando varios neoligandos, y es la reacción de acoplamiento

orto-oxidativo más estudiada. Sin embargo la reacción que hasta el momento ha sido poco estudiada es el acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico por medio de CCV. Esta reacción es importante ya que la dimerización de compuestos del tipo del ácido ferúlico (p.e. Diferulatos) afecta la capacidad antioxidante siendo esta dependiente de la posición del enlace entre los monómeros (Williamson, 1999).

Así la actividad antioxidante que se presenta al formarse el dímero dependerá de la terminación de la cadena alifática, el número total de grupos hidroxilo fenólicos y del número de sitios disponibles en los que se puede acomodar un electrón desapareado (Yamamoto *et al.*, 1999).

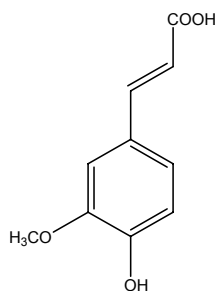


Fig.15. Ácido ferúlico

Ligninas

Las ligninas son compuestos fenólicos heteropoliméricos asociados con polisacáridos y proteínas. Su formación resulta desde la polimerización oxidativa de tres alcoholes cinamílicos; alcohol *p*-coumarílico (1), alcohol coniferílico (2) y alcohol sinapílico (3), en una reacción catalizada por peroxidasas de plantas de tipo III (Fig.16).

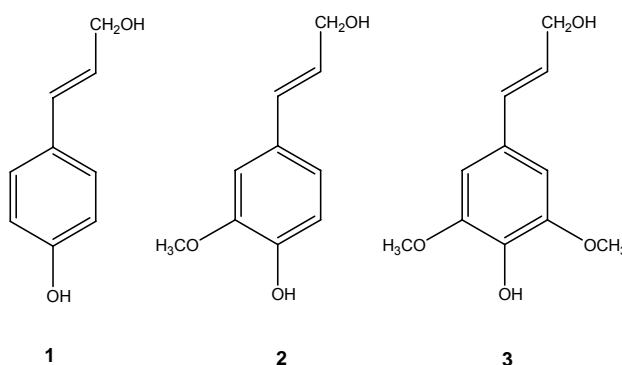


Fig.16. Alcoholes cinamílicos

Los alcoholes cinamilicos son dimerizados en la pared celular por peroxidasas, mediante una reacción catalizada con H_2O_2 . El principal producto de la dimerización de los alcoholes coniferilicos son los neoligandos, pironesinol, alcohol dehydroconiferilico y un éter alcohol guaiacylglicerol- β -O-coniferilico (Ros Barceló y Pomar, 2002).

4.7.3. Acoplamiento *orto*-oxidativo de peroxidasas y uso de CCV

Las peroxidasas (donador: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), han sido utilizadas para catalizar el acoplamiento oxidativo de los fenoles y las aminas aromáticas. Estos compuestos son oxidados por peroxidasas en presencia de peróxido de hidrógeno, para formar productos diméricos, oligoméricos o poliméricos.

Recientemente, el acoplamiento oxidativo catalizado por peroxidasas ha sido usado completamente para sintetizar dímeros derivados de naftol, tirosina, hidroxifenilglicina, eugenol y alcoholes coniferílicos con rendimientos satisfactorios (Tzeng y Liu., 2004).

El acoplamiento *orto*-oxidativo es de gran importancia en la química de productos naturales (McDonald *et al.*, 1973). Diversos compuestos heterocíclicos, como lo son: alcaloides, glicopéptidos o ciclo-péptidos (Dhingra *et al.*, 1982); así como la dimerización de compuestos como flavonoides e hidroxicinamatos (aumentando así la actividad antioxidante de estos) (Williamson, 1999), son biosintetizados gracias a la formación de enlaces C-C o C-O que catalizan este tipo de enzimas. Diversos ensayos se han realizado en este campo utilizando CCV, por ejemplo la dimerización de la quercetina por

medio de la enzima peroxidasa aislada de cultivos de células vegetales de *Senna angustifolia* (Fig.17.)

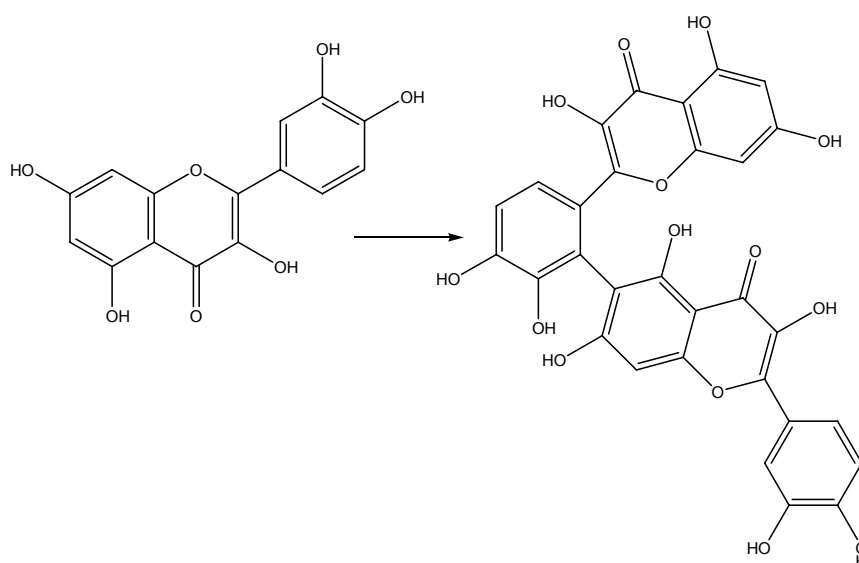


Fig.17. Dimerización de quercetina a 2', 6''-biquercetina, mediante una peroxidasa aislada de CCV de *S. angustifolia* en presencia de H_2O_2 .

La peroxidasa del rábano, se encuentra comercialmente disponible y ha sido establecida como un eficaz biocatalizador para las reacciones orgánicas e inorgánicas usando el peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos orgánicos. Kutney *et al.* Divulgaron la formación de peroxidasa de rábano, por el enlace C-C con sistemas fenólicos. Desde este punto de vista se ha investigado el cultivo de células, en donde la pared celular de las peroxidases metabolizan rápidamente una cantidad enorme de sustratos exógenos producidos por la adición de H_2O_2 (Takemoto *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha encontrado que el cultivo de células de *Camellia sinensis* es una fuente muy eficiente de peroxidases. Se han establecido sistemas de cultivo de células de *Camellia sinensis*, con alta actividad de peroxidases, aplicados al acoplamiento oxidativo de dibencilbutanolidos con buenos rendimientos cuantitativos. Algunos ejemplos del acoplamiento orto-

oxidativo generado con el cultivo de células de *Camellia sinensis* son (Fig.18 y Fig.19):

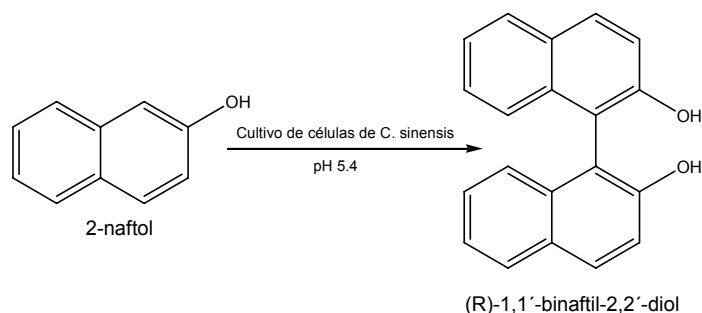


Fig.18. Acoplamiento orto-oxidativo del 2-naftol, en presencia de H_2O_2

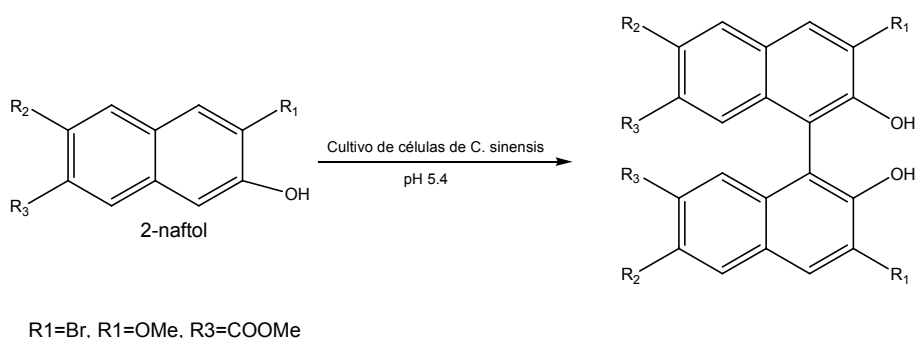


Fig.19. Acoplamiento orto-oxidativo de diferentes derivados del 2-naftol, en presencia de H_2O_2

Los resultados cuantitativos de los acoplamientos oxidativos anteriores, catalizados por el cultivo de células de *Camellia sinensis* (Takemoto *et al.*, 2002), mostraron que al agregar altas concentraciones de peróxido al cultivo de células para la transformación, ocasiona que las células del cultivo sean sometidas a un estrés excesivo; lo que origina que disminuyan los rendimientos del producto. Por tanto lo anterior indica que la concentración de peróxido necesaria para lograr un mayor estrés en las células sin llegar a ser excesivo y así obtener un mayor rendimiento del producto, debe ser probada con la finalidad de identificar la cantidad de peróxido necesaria y lograr así un mayor rendimiento del producto de la reacción.

4.8. Acoplamiento oxidativo de eugenol e isoeugenol mediado por enzimas

Un acoplamiento enzimático de compuestos de fenol ha sido reconocido como una posible ruta para la síntesis de cierta clase de alcaloides. Se creyó que la lactona macrocíclica o parte del éster de alcaloides de *Lythraceae* puede llevarse a cabo desde precursores de fenol. Sin embargo estos acoplamientos por métodos químicos, en algunos casos da bajos rendimientos o completamente nulos. Por otro lado los derivados de fenolpropanoides han sido estudiados previamente con la finalidad de entender la biogénesis de ligninas. Por estas dos razones, el acoplamiento oxidativo enzimático es necesario utilizar sustratos apropiados con estructura general de fenol con una cadena de carbono de diferente funcionalidad (Fig.20) (Krawczyk *et al.*, 1991).

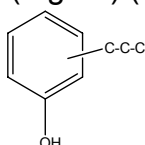


Fig.20. Estructura general de fenol

Se ha examinado el acoplamiento de fenol-ésteres, en la reacción catalizada por peroxidasas de rábano (HRPO) dirigida por una síntesis enzimática de alcaloides bifeníl, de la familia *Lythraceae*.

Por otro lado se ha estudiado que el acoplamiento oxidativo del eugenol e isoeugenol a través de peroxidasas de rábano da como resultado la obtención de productos diméricos. Por ejemplo, Krawczyk *et al.*, 1991 obtuvieron el 22% de dímero de eugenol y el 19% de dímero de isoeugenol (Fig.21), usando las siguientes condiciones:

Una mezcla de: Buffer a pH 6, 1g de eugenol, 140ml de metanol, 0.3mg de HRPO y 0.5 mmol de H₂O₂ durante 25hrs a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo se obtuvo un precipitado crudo (300mg), el cual fue filtrado secado y cristalizado con benceno:hexano, obteniendo 220mg del producto. En resumen la reacción se llevó a cabo por un acoplamiento *orto-orto* (Fig.21), el cual es un producto común del acoplamiento oxidativo de sustratos fenolicos.

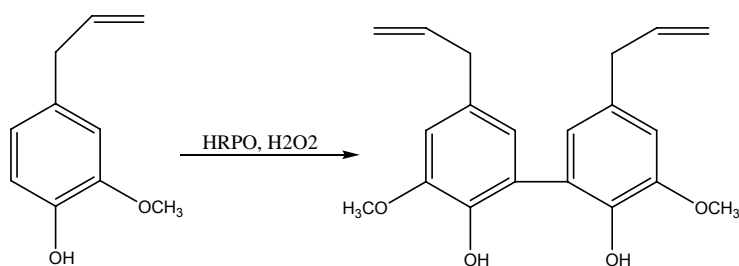


Fig.21. Reacción de acoplamiento oxidativo de eugenol a partir de peroxidasa de rábano

La oxidación del isoeugenol fue realizada en las mismas condiciones después de una purificación cromatográfica. La estructura del producto de la reacción (dehidrodi-isoeugenol Fig.22) se obtuvo por análisis elemental y espectroscopia; el resultado de lo anterior fue un dímero producto de un acoplamiento del grupo fenol y el carbono orto de un compuesto con cadena lateral propenil, de la segunda molécula del sustrato.

En un estudio previo, Sarkanen *et al.*, 1973, realizó la oxidación del isoeugenol por medio de peroxidasa de rábano. A partir de 5g de isoeugenol el cual fue previamente disuelto en una mezcla de acetona agua (5:8), que contenía la peroxidasa de rábano y 5ml de H₂O₂ el cual se fue adicionando lentamente a la mezcla, se mantuvo en agitación constante durante 45min a 20°C. Después de transcurrido el tiempo se observó un color amarillo debido a la presencia de un radical quinona; seguido de la formación de un precipitado producto de la

reacción de acoplamiento. Este último se filtró y lavó con acetona, obteniendo así cristales blancos del dehidrodi-isoeugenol (Fig.22).

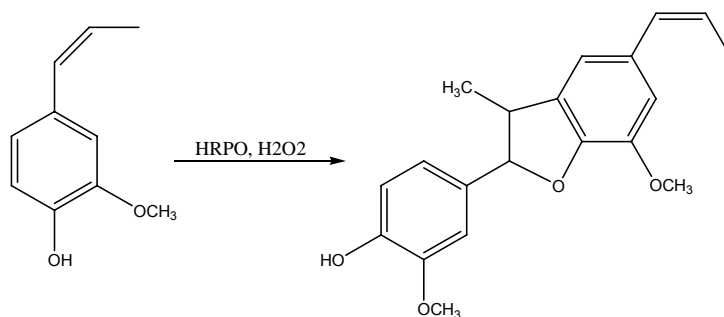


Fig.22. Reacción de acoplamiento oxidativo de isoeugenol a partir de peroxidasa de rábano

4.9. Polifenol oxidasas

Las polifenol oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación del fenol, con la reducción del oxígeno. Se subdividen en tirosinasas y lacasas. Las tirosinasas contienen un sitio activo binuclear de cobre. Catalizan la orto-hidroxilación de mono fenoles, la oxidación de dos electrones de o-difenoles a las o-quinonas (actividad del o-difenoloxidasas o de la catecolasa) (Mayer & Staples, 2002).

Las lacasas (oxidasa del p-difenol) pertenecen a un pequeño grupo de enzimas llamado cobre azul. Contienen por lo menos cuatro sitios activos vecinos de cobre (Solomon, Sundaram, & Machonkin, 1996). Los sustratos típicos de las lacasas son: aminas (alifáticas y aromáticas) y fenoles.

Estas enzimas pueden oxidar a mono, orto, y para-difenoles, metoxi-fenoles, polifenoles, poliaminas, ligninas y aril diaminas (Thurston, 1994). Las lacasas difieren de las tirosinasas, en que catalizan la oxidación de un electrón del sustrato, para formar un radical libre de semi-quinona (Mustafa *et al.*, 2005).

El acoplamiento de fenoles catalizado por lacasas (no limita a las hidrolasas), para influenciar el funcionamiento enzimático. Las lacasas catalizan la dimerización y polimerización del naftil o derivados 5,6,7,8-tetrahidronaftil, proporcionando así acceso a nuevos ligandos Fig.23 y 24 (Intra *et al.*, 2005).

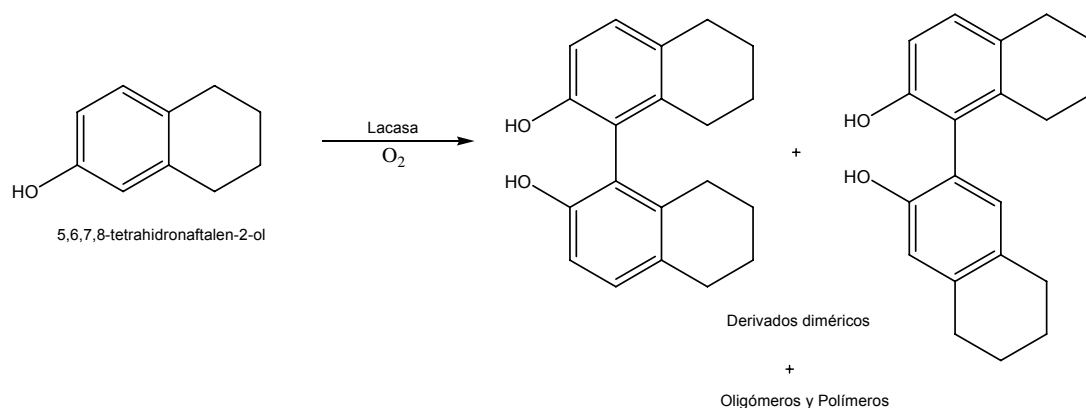


Fig.23. Dimerización de 5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol catalizada por lacasas

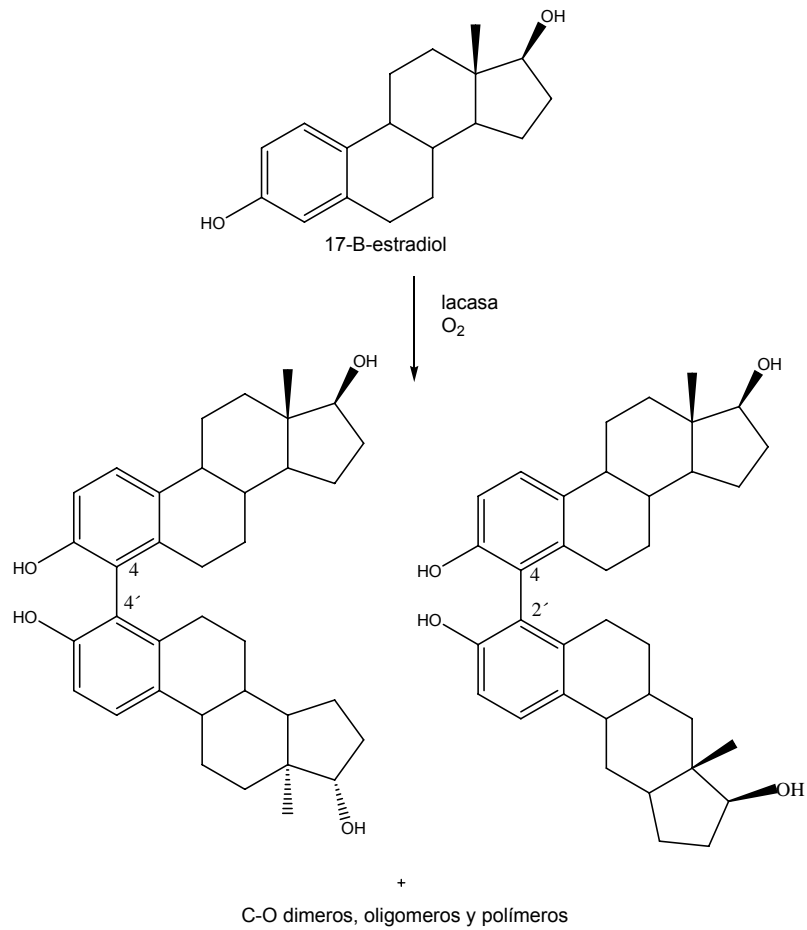
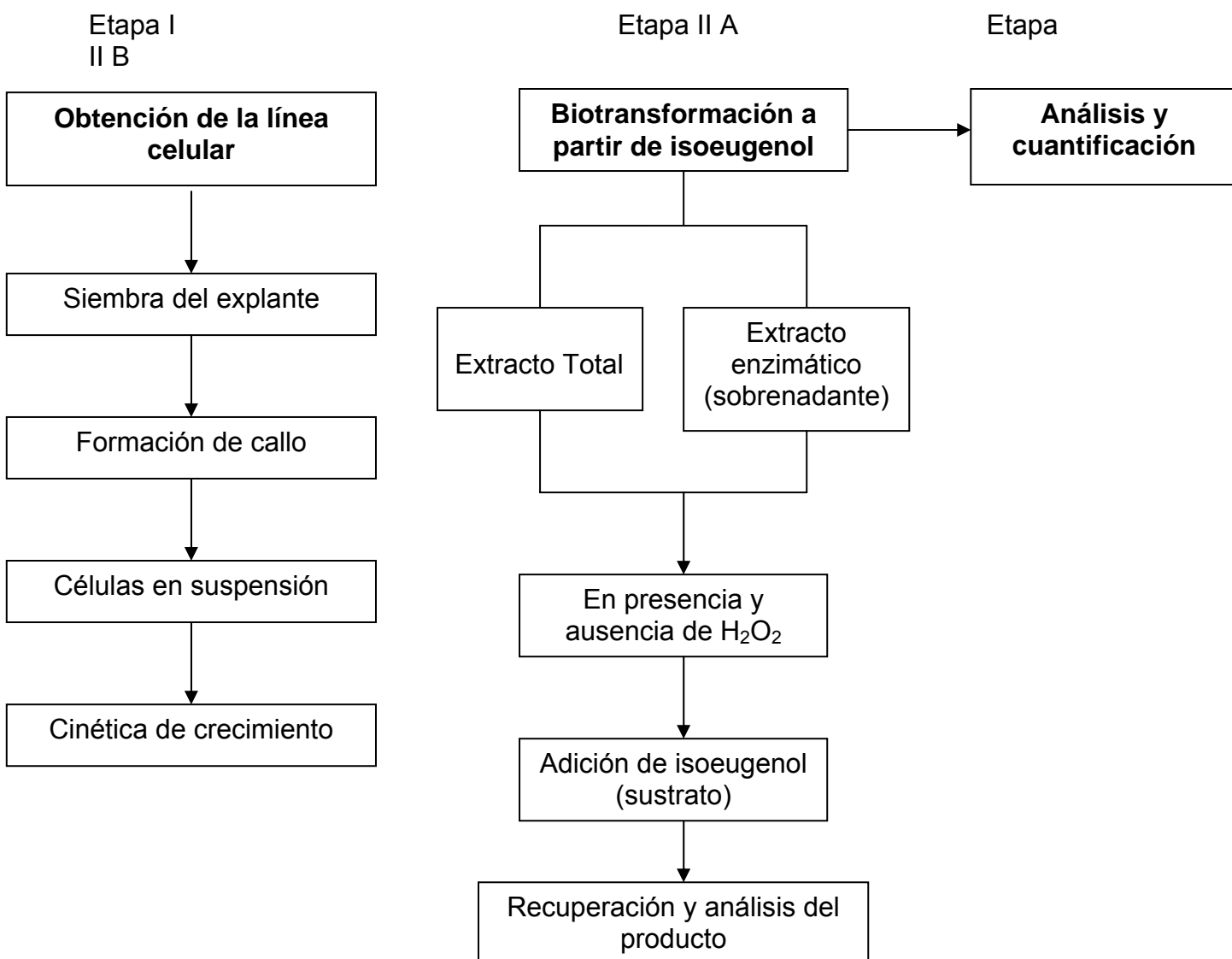


Fig.24. Dimerización de 17β-estradiol catalizada por lacasas

Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en dos etapas: Obtención de las líneas celulares; la cual se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Bioquímica y la etapa II correspondiente a la transformación a partir de isoeugenol; la cual se llevó a cabo en el laboratorio 321 del departamento de Alimentos.

Diagrama general del proceso



5.1. Material y Equipo

Material biológico

El material biológico utilizado en este experimento consistió de hojas y flores de *Bouvardia ternifolia*, mejor conocida como trompetilla, obtenidas en diferentes zonas dentro de las instalaciones de Ciudad Universitaria.

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la siembra de los explantes estuvo compuesto por sales inorgánicas, vitaminas, del medio MS (Murashige y Skoog 1962), reguladores de crecimiento y sacarosa al 3% como fuente de carbono. En el anexo se muestra a detalle la composición del medio MS.

Tabla1. Composición del medio de cultivo utilizado en el cultivo *in vitro* de *Bouvardia ternifolia*.

Compuesto	Cantidad agregada para preparar 1L de medio
Sales inorgánicas de medio MS	+
Vitaminas MS	+
Glicina	2mg
2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético)	1mg
Ácido ascórbico y Ácido Cítrico	50mg de cada uno
Cinetina	0.05mg
Azúcar	30 g
Gellan	2.5 g
pH	5.7±0.1
Cefotaxime	250mg

+ Presencia. Describas en anexo

Los recipientes utilizados para el medio de cultivo, en la primera etapa de crecimiento del callo fueron frascos de alimento infantil con tapas de plástico y se agregaron 30 mL del medio de cultivo. Una vez que se obtuvo el callo limpio (sin restos de explante) se utilizaron frascos de vidrio de mayor tamaño (aproximadamente de 500 mL) agregando 60 mL de medio de cultivo.

Para las células en suspensión, así como en la cinética de crecimiento se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250mL, con 60 mL de medio de cultivo en ambos casos.

Todo el material de cristalería, así como pinzas y bisturí se esterilizó en autoclave vertical a una temperatura de 121° y 1.2 kg/cm² de presión durante 30 min.

Amortiguador de Fosfatos

Se preparó un amortiguador de Fosfatos 0.1M a pH 6.

Para su preparación se utilizaron dos soluciones de sales de fosfato, las cuales fueron:

Solución A: NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (0.066M)	}	Para 100 mL de amortiguador a pH 6 se utilizaron 88.9 mL de la solución A y el resto fue de la solución B.
Solución B: Na ₂ HPO ₄ (0.066M)		

Isoeugenol purificado

El isoeugenol utilizado para cada prueba de transformación fue purificado en una columna de gel de sílice con una mezcla de disolventes (diclorometano:hexano) (1:1). Tomando 10 fracciones de 25 mL aproximadamente y concentrando las fracciones en un rotavapor Buchi modelo V-800, equipado con un controlador de vacío, un baño de calentamiento de la

marca Buchi modelo B-400, un controlador de temperatura digital marca Poly Science.

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno utilizado fue un reactivo analítico al 30%.

Placas de sílica

En la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de sílica ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 0.2 mm de grosor, con identificador de fluorescencia UV₂₅₄, de la marca Macherey-Nagel (catálogo Art.-Nr. 818 133).

Disolventes

En esta etapa los disolventes utilizados fueron:

Acetato de Etilo reactivo Meyer 99.7% de pureza, Metanol al 99.5% de pureza, Diclorometano reactivo Baker 99.8% de pureza, Hexano grado QP, Cloroformo al 99% de pureza.

La transformación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL; durante el proceso de transformación se utilizó una agitadora orbital con control de tiempo y temperatura, de la marca Lab-Line.

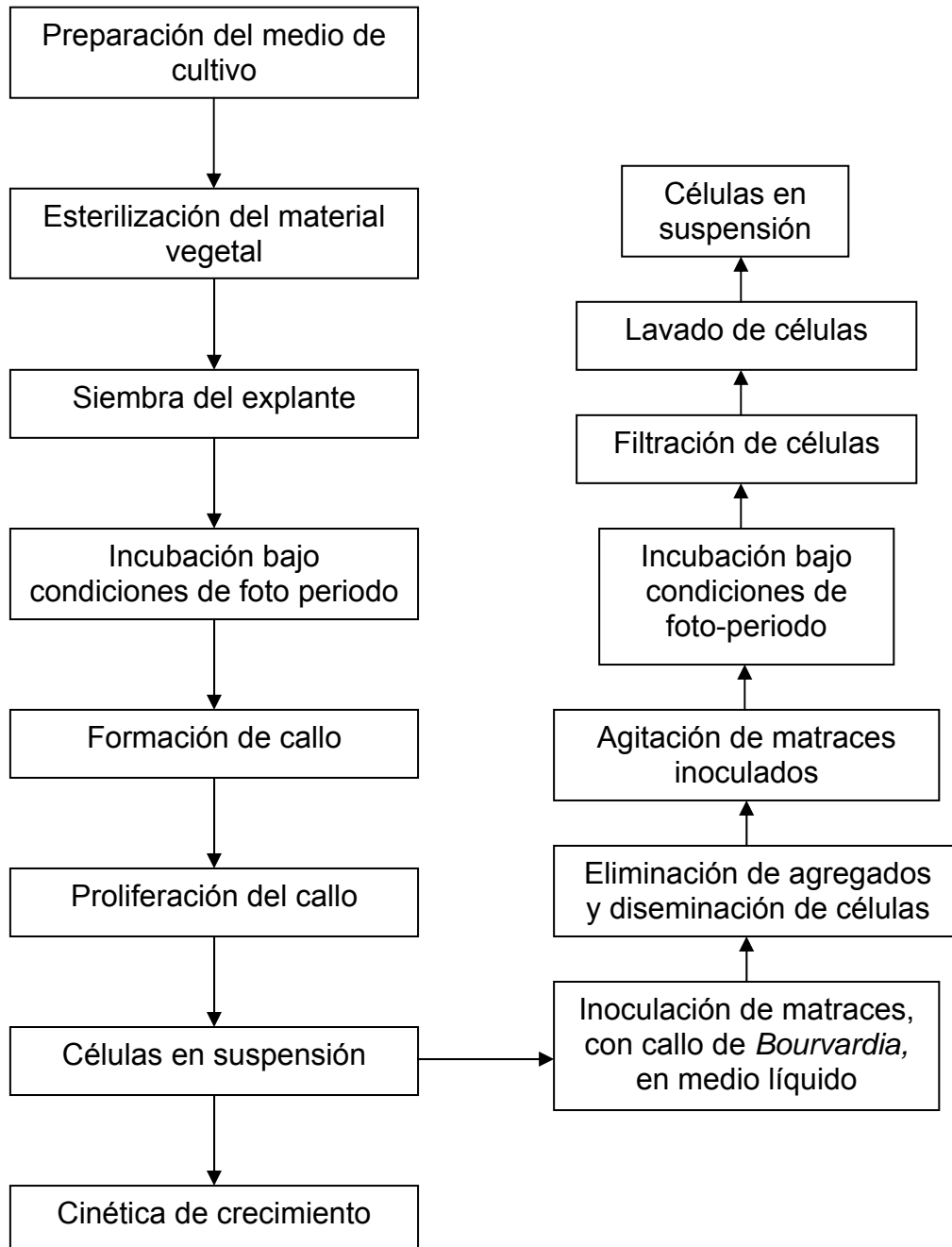
Para la implementación de un método de análisis se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC), de la marca Waters modelo 1525, equipado con una bomba binaria, y un detector UV de la marca Waters modelo 2487, con detector de longitud de onda dual. La columna utilizada para el HPLC fue una columna Simmetry® C₁₈ 5µm, 3.9*150mm de la marca Waters (catálogo WATO 469080), el cual se utilizó en la identificación, cuantificación y análisis de los productos principales, formados durante la transformación.

La fase móvil se preparó con Acetonitrilo grado HPLC de la marca Burdick & Jackson, y una solución de Ácido fórmico al 0.1%. El Ácido fórmico utilizado fue reactivo analítico al 91.3% de pureza de marca J.T. Baker.

Las muestras se prepararon con metanol grado HPLC de la marca Burdick & Jackson.

5.2. Métodos

5.2.1. Etapa I. Obtención de la línea celular



Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado se preparó a partir de soluciones concentradas 100X, el medio estuvo compuesto por sales inorgánicas y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog 1962), así como reguladores de crecimiento y sacarosa comercial en una proporción del 3% como fuente de carbono. Los medios se solidificaron con un polímero llamado gellan a razón de 2.5g L⁻¹. Se ajustó el pH a 5.7 con NaOH o HCl 1 N según fue necesario. El medio se esterilizó en una autoclave vertical a 120° C durante 18 minutos. Una vez esterilizado el medio, se le agregó 250 mg de Cefotaxime; se envasó en frascos de alimento infantil a razón de 30 mL.

Esterilización del material vegetal

Se disectaron las hojas más jóvenes de la planta, así como algunas inflorescencias (flor), se lavaron con agua de la llave y jabón común, para eliminar piedras y polvo, una vez realizado el lavado se eliminó el agua. En campana de flujo laminar, se les adicionó alcohol al 70% durante un minuto y se enjuagaron con agua desionizada estéril. Posteriormente, se les agregó una solución de hipoclorito de sodio comercial (con 6% de ingrediente activo) al 20 % junto con un bactericida comercial (Microdín®) y un detergente suave (Tween-20) en agitación constante durante 20 min y se enjuagaron con agua desionizada estéril dos veces. Se les agregó un funguicida comercial (PROMIL® 2g/250mL) permitiéndole actuar durante 30 min en agitación constante. Transcurrido el tiempo, se enjuagaron con agua desionizada estéril tres veces, y se les adicionó una solución de un bactericida comercial (AGRIMICIN® 1g/250mL) en agitación durante 20 min enjuagándose cuatro

veces con agua desionizada estéril para eliminar adecuadamente los restos del bactericida.

Siembra del explante, Inducción y Proliferación del callo

Se colocaron tanto las hojas como las inflorescencias en una solución de antioxidante (100 mg de ácido ascórbico + 100 mg de ácido cítrico por L). Las hojas se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 cm² (explante) y se colocaron 8 segmentos de hoja en cada frasco con medio de cultivo (ver preparación de medio de cultivo) con el haz hacia abajo y el envés hacia arriba. A las inflorescencias se les realizó un corte transversal y uno longitudinal, obteniéndose cuatro segmentos; éstos se colocaron en el mismo medio de cultivo empleado para las hojas con cuatro o seis explantes por frasco.

El cultivo se mantuvo bajo un ambiente controlado en una cámara de incubación, con una temperatura promedio de 25± 2° C con un foto-período de 16h luz / 8h oscuridad, con una intensidad lumínica de 29 μEm² s⁻¹, para inducir la formación y proliferación de callo.

En el primer subcultivo el callo se separó del tejido madre, y para el mantenimiento y proliferación se realizaron subcultivos de tres a cuatro semanas retirando material muerto y/u oxidado.

Células en suspensión

A partir de callo de *Bouvardia ternifolia* se establecieron los cultivos madre, inoculando tres matraces E.M. de 250 mL con 10.350 g (aproximadamente) de callo por matraz, en 60 mL de medio de cultivo líquido (MS), eliminando los grumos del callo antes de agregarlo al matraz, procurando diseminar las células; y se colocaron en agitación a 100 rpm durante nueve días en condiciones de incubación antes descritas. Posteriormente, se filtraron las

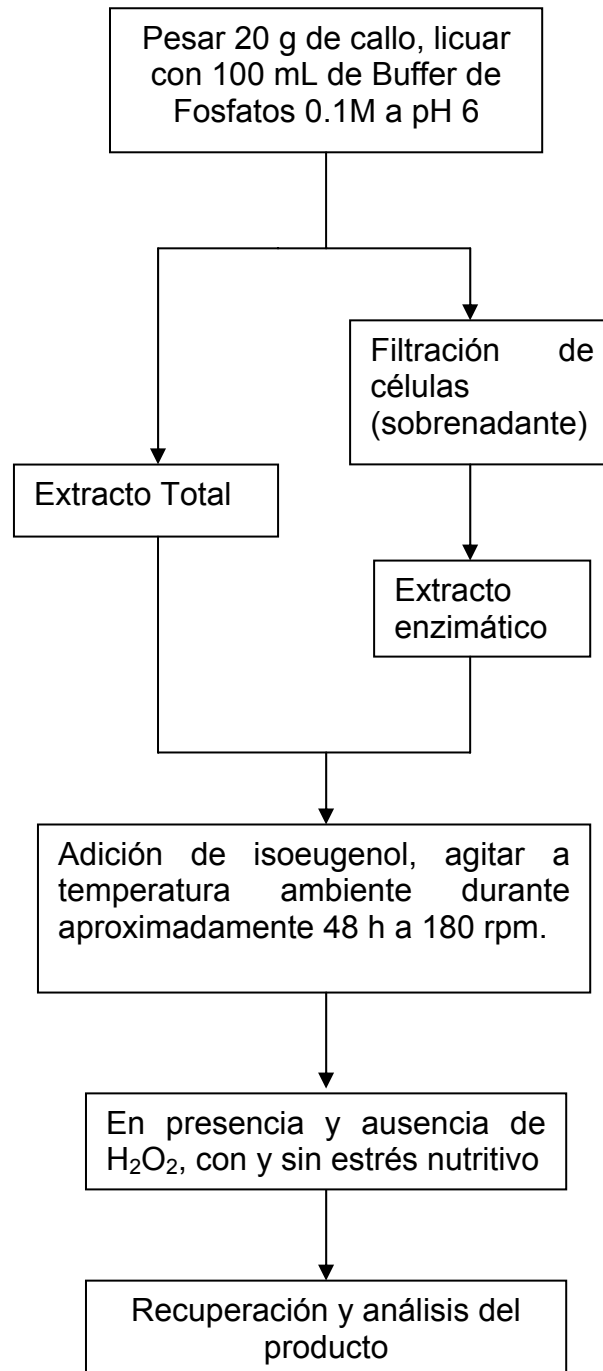
células con una gasa lavándolas con medio de cultivo líquido. Las células se vertieron en seis matraces (de 250 mL) agregando 60 mL de células en suspensión a cada matraz.

Cinética de crecimiento

A partir de las células madre se realizó la cinética de crecimiento, la cual se inició en el día cero, tomando una alícuota homogénea de 1 mL de cada matraz y se depositó respectivamente en tres tubos eppendorf (previamente pesados). Los tubos eppendorf se centrifugaron por 10 min a 13,000 rpm; con una pipeta Pasteur se eliminó el sobrenadante y se registró el peso de cada tubo lo que constituyó el peso fresco de las células. En el caso del peso seco, éste se obtuvo dejando secar las células dentro de los tubos.

Para el registro de peso fresco y peso seco, se tomaron alícuotas de las muestras, cada dos días durante dos semanas.

5.2.2. Etapa II A. Biotransformación a partir de isoeugenol



5.2.2.1. Ensayos cualitativos por cromatografía en capa fina (CCF)

Ensayo 1: *Biotransformación con el extracto crudo de hojas de *Bouvardia ternifolia**

Se pesaron 100 g de hojas de *Bouvardia*, se homogenizaron en una licuadora común con 400 mL de amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 6; de esta mezcla, se vertió 100 mL en seis matraces Erlenmeyer de 250 mL (aproximadamente 16.6 g de extracto crudo en cada matraz). Se agregó 50 mg de isoeugenol previamente disueltos en 1 mL de acetona por matraz, excepto al control. Se colocaron los matraces en agitación constante (180 rpm) a 25° C durante 48 h. Posteriormente se realizó la extracción y recuperación del producto.

Ensayo 2: *Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja e inflorescencia de *Bouvardia ternifolia**

Se realizó el primer ensayo de biotransformación de isoeugenol por triplicado y un control, con el callo de hoja e inflorescencia de *Bouvardia ternifolia*.

Para cada callo (hoja e inflorescencia) se pesó aproximadamente 20 g de callo por matraz, se mezcló con 100 mL de amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 6, se homogeneizó, agregando a cada matraz 25 mg de isoeugenol previamente disueltos en 0.5 mL de acetona, excepto a cada control. Se colocaron los matraces en agitación continua (180 rpm) a 25° C durante 48 h. Posteriormente se realizó la extracción y recuperación del producto de la transformación.

Ensayo 3: *Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja de Bouvardia ternifolia, en presencia de H₂O₂*

Este ensayo se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en el ensayo 2. La diferencia fue que el callo utilizado para esta transformación fue únicamente de hoja. La biotransformación se realizó por triplicado y dos controles como se muestra en la tabla 2; en donde se tiene la composición de cada matraz.

Tabla 2. Composición de los tratamientos realizados para la transformación de isoeugenol a partir de callo de hoja de *Bouvardia ternifolia*.

Tratamientos	Repeticiones	Callo (g)	Amortiguador de PO ₄ (mL)	Isoeugenol (mg)	H ₂ O ₂ (μl)
1	3	20	100	25	34.3
Control 1	1	20	100	0	34.3
control 2	1	0	100	25	0

Control 1: Corresponde sin isoeugenol

Control 2: Corresponde sin callo y sin H₂O₂

Posteriormente se realizó la extracción y recuperación del producto de la transformación.

5.2.2.2. Ensayos cuantitativos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

Una vez realizados los tres ensayos anteriores se decidió cuantificar los productos de la transformación realizando nuevos ensayos de acuerdo a la siguiente metodología. Previo a la cuantificación se determinó cualitativamente la presencia de los productos de la transformación en CCF con el fin de que fuera reproducible, que los productos se mantuvieran estables y con el mismo valor de R_f.

Ensayo 4: *Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de Bouvardia ternifolia; con extracto total y extracto enzimático, en presencia y ausencia de H₂O₂*

Para este ensayo, las transformaciones se efectuaron como en los ensayos anteriores (extracto total) y sobrenadante (extracto enzimático). En la tabla 3 se muestran las series de transformaciones realizadas a partir de 20 g de callo fresco de siete semanas de crecimiento, mismos que se homogenizaron en 100 mL de amortiguador de fosfatos 0.1M pH 6.

Tabla 3. Composición de los tratamientos realizados para la transformación de isoeugenol a partir de callo de *Bouvardia ternifolia*; con extracto total y extracto enzimático, en presencia y ausencia de H₂O₂

Tratamientos	Repeticiones	Callo fresco (20 g)	Extracto enzimático (100 mL)	H ₂ O ₂ (34.3 µl)	Isoeugenol (25 mg)
1	3	+	-	-	+
2	3	+	-	+	+
3	3	+	+*	-	+
4	3	+	+*	+	+
Control 1	1	+	-	-	-
Control 2	1	+	-	+	-
Control 3	1	-	+*	-	-
Control 4	1	-	+*	+	-
Control 5	1	-	-	-	+
Control 6	1	-	-	+	+

(+) Presencia

(-) Ausencia

(+*) Se partió de 20 g de callo fresco por matraz, el cual fue filtrado para obtener el extracto enzimático (sobrenadante)

En los dos primeros tratamientos (1 y 2) se realizaron con el extracto total más 25 mg de isoeugenol previamente disuelto en 0.5 mL de acetona. Para los tratamientos 3 y 4, la transformación se realizó con el filtrado o sobrenadante (extracto enzimático), de las células del callo, más 25 mg de isoeugenol previamente disuelto en 0.5ml de acetona. Los matraces se colocaron en

agitación (180 rpm) a 25° C durante 48 h. Posteriormente se realizó la extracción y recuperación del producto de la transformación; así como su cuantificación por medio de la implementación de un método de análisis (HPLC).

Ensayo 5: Pruebas de estrés nutritivo

Con la finalidad de generar un estrés nutritivo en las células en suspensión, se preparó medio de cultivo líquido con los componentes del cultivo original (tabla 1), pero modificando el porcentaje de nitratos del medio.

Tabla 4. Porcentajes de Nitratos utilizados en las primeras pruebas de estrés nutritivo

Medio de cultivo (MS)	% de Nitratos
I	100%
II	50%
III	25%

Nota: El medio al 100% de nitratos es el medio normal.

En ocho matraces Erlenmeyer de 250 mL; previamente esterilizados en autoclave vertical a 120° C durante 18 min y rotulados con el tipo de medio, se colocaron 60 mL de medio de cultivo por matraz correspondiente a cada porcentaje de nitratos.

Con la finalidad de inducir la proliferación de células en suspensión del callo de *Bouvardia*, bajo los diferentes tratamientos de estrés nutritivo, se sembraron aproximadamente 8 g de callo por matraz previamente diseminado (procurando eliminar los cúmulos celulares). Todo lo anterior realizado bajo condiciones de

esterilidad, posteriormente se incubaron los matraces durante 15 días en agitación constante (125 rpm), bajo un ambiente controlado en una cámara de incubación, con una temperatura promedio de $25\pm 2^{\circ}$ C con un foto-período de 16 h luz/8 h oscuridad, con una intensidad lumínica de $29 \mu\text{Em}^2 \text{ s}^{-1}$. Finalmente, se inició la transformación de los extractos totales de las células en suspensión; utilizando todo el paquete celular, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Series de tratamientos realizados para las primeras pruebas de transformación en estrés nutritivo

Tratamientos	Repeticiones	% de Nitratos	Callo fresco (g)	Isoeugenol (25 mg)
1	3	100	23	+
2	3	50	32	+
3	3	25	29	+
Control 1	1	100	23	-
Control 2	1	50	32	-
Control 3	1	25	29	-

(+) Presencia
 (-) Ausencia

Para realizar la transformación se filtraron las células en suspensión producidas; esto con la finalidad de pesarlas y ajustar los pesos para cada tratamiento como se muestra en la tabla anterior. Por tanto para la tratamiento al 100% de nitratos se pesó aproximadamente 23 g de células por matraz; así como para los tratamientos de 50% y 25% de nitratos, se pesó 32 g y 29 g respectivamente. Estas células se resuspendieron con 100ml de amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 6, hasta homogenización. Posteriormente se agregó 25 mg de isoeugenol previamente disuelto en 0.5 mL de acetona; utilizando así el extracto total de las células en suspensión para la transformación. Se colocaron los matraces en agitación (180 rpm) a 25° C durante 48 h. Posteriormente se

realizó la extracción y recuperación del producto de la transformación; así como su cuantificación por medio de la implementación de un método de análisis (HPLC).

Ensayo 6: *Pruebas de estrés nutritivo con y sin H₂O₂*

Para este ensayo las transformaciones se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que en el ensayo anterior (ensayo 5). Nuevamente fue necesario preparar medios de cultivo líquidos, con una modificación en la composición del medio como se explica en el ensayo anterior, sólo se prepararon dos medios de cultivo diferentes uno al 100% de Nitratos y el otro al 25%. Debido a que en el ensayo 5 se obtuvo un mejor estrés con el medio al 25% de Nitratos.

La diferencia consistió en que, después de los 15 días de incubación de las células en suspensión, se filtraron y se pesaron 20 g de las células en suspensión producidas ajustando así los pesos en cada matraz; además al resuspender y homogeneizar las células en el amortiguador de fosfatos, se realizó nuevamente una filtración de las células ya resuspendidas utilizando para la transformación únicamente el sobrenadante de ésta filtración teniendo así el extracto enzimático de las células en suspensión, el cual se utilizó para las transformaciones, adicionando a este extracto 25 mg de isoeugenol previamente disuelto en 0.5 mL de acetona y 34.3 µL de H₂O₂. Se colocaron los matraces en agitación (180 rpm) a 25° C durante 48 h.

Se realizaron las siguientes series de transformaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Series de tratamientos realizados para las pruebas de transformación en estrés nutritivo con y sin H₂O₂

Tratamientos	Repeticiones	% de Nitratos	Callo fresco (20 g)	Extracto enzimático (100 ml)	H ₂ O ₂ (34.3 µl)	Isoeugenol (25 mg)
1	3	100	+	+*	+	+
2	3	100	+	+*	-	+
3	3	25	+	+*	+	+
4	3	25	+	+*	-	+
Control 1	1	100	+	+*	+	-
Control 2	1	100	+	+*	-	-
Control 3	1	25	+	+*	+	-
Control 4	1	25	+	+*	-	-

(+) Presencia

(-) Ausencia

(+*) Se partió de 20 g de células en suspensión, las cuales fueron filtradas para obtener el extracto enzimático (sobrenadante)

Posteriormente se realizó la extracción y recuperación del producto de la transformación; así como su cuantificación por medio de la implementación de un método de análisis (HPLC).

Recuperación y análisis del producto

Extracción: Una vez concluido el tiempo de biotransformación, los matraces se retiraban de la incubación y se filtraban con vacío en un embudo Buchner con papel filtro de porosidad grande. El filtrado (extracto) se colocó en un embudo de separación de 500ml. Se le adicionó 50mL de acetato de etilo para realizar la extracción por disolvente. Se separaron ambas fracciones. La fracción que se recuperó fue la orgánica; se secaba de humedad mediante Na₂SO₄ anhidro. Se concentró en rotavapor (35°C), se trasvasó a un frasco bial y se confirmó la presencia del producto mediante cromatografía en capa fina (CCF). Esta se

realizó con una mezcla de disolventes Cloroformo:Metanol (95:5) o con la mezcla agregando como revelador DPPH o Sulfato cérico y aplicación de calor, teniendo el sustrato original como referencia.

Para confirmar que el compuesto fuera producido como resultado de la biotransformación del sustrato, se colocó un blanco. Este blanco consistía de un matraz con biocatalizador, sin sustrato, incubado a las mismas condiciones. El proceso de extracción y monitoreo fue el mismo que se le realizó a los demás.

Purificación: Según la cantidad de producto obtenido, se trabajaron dos procedimientos análogos: cromatografía en columna o cromatografía en placa preparativa. Esto dependía de la cantidad de producto esperado. En los casos en que se esperaba poco producto, se utilizó la cromatografía en placa preparativa.

En el primer caso se purificó el isoeugenol (sustrato) utilizado en la biotransformación. A continuación se describe el proceso: al isoeugenol concentrado se le agregó sílica gel hasta formar una “pasta” para facilitar su adición a la columna. La columna se preparó adicionando sílica gel a razón de 20 partes de sílica por cada parte de sustrato, con una mezcla eluyente Diclorometano:Hexano (1:1); ya lista la columna, se agrega la “pasta”; las fracciones se colectaron en tubos de ensaye (25ml por fracción). Las fracciones eran monitoreadas por CCF y en las que se encontraba contenido el producto se juntaron y concentraron.

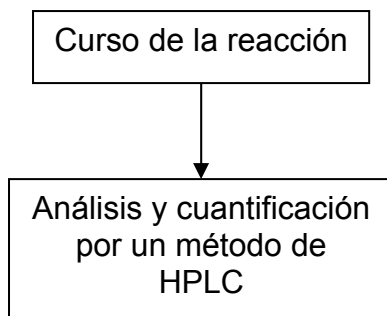
Para el producto purificado con placa preparativa (producto de la biotransformación del isoeugenol con *Bouvardia ternifolia*), el proceso fue el

siguiente: en una cámara de elusión se agregó la mezcla de eluyentes Hexano:Metanol:Acetato (3.5:0.5:1.0), tapando la cámara para permitir la saturación de disolventes de la misma; con ayuda de un tubo capilar se colocó toda la fracción concentrada en rotavapor en la superficie de la placa preparativa (de manera horizontal a como avanzaría el disolvente); se colocó la placa en la cámara de elusión y se dejó migrar hasta 1cm antes del borde.

Una vez que se evaporó la mezcla de disolventes, mediante una cámara de luz UV se observó la migración y se marcó la banda en donde se encontraba el producto (lo cual se sabía mediante la CCF); la banda se cortó y toda la sílica gel que contenía el producto se colocó en un matraz Erlenmeyer. Ahí, se extrajo el producto con Acetato de etilo y se concentró en rotavapor.

En el producto obtenido (dímero de isoeugenol) de la extracción por cromatografía preparativa de la biotransformación del isoeugenol. Se realizó estudios de espectroscopia resonancia (RMN) para identificar la estructura correcta del dímero obtenido. En el anexo se muestran los espectros realizados para el dímero de isoeugenol obtenido.

5.2.3. Etapa II B. Análisis y cuantificación



El curso de la reacción se realizó por medio de cromatografía en capa fina, la cual se explicó en la Etapa II A.

Para implementar el método de análisis de los productos formados después de la transformación, se utilizó un método para el HPLC (Ramachandra y Ravishankar, 1999). Este método consistió de las siguientes condiciones: $\lambda = 280\text{nm}$, $t_{\text{corrida}} = 12\text{ min}$, flujo = 1 mL/min, T = ambiente, Vol. inyección = 10 μL

Gradiente:

A: Acetonitrilo

B: Ácido fórmico 0.1%

Tabla 7. Gradiente de concentración utilizado en el HPLC

Tiempo (min)	% A	% B
0	20	80
5	40	80
6	80	20
8	80	20
10	20	80
12	20	80

6. Resultados

6.1. Etapa I. *Obtención de la línea celular*

Los primeros cambios observables de desdiferenciación de explantes de hoja y flor hacia la formación de callo, ocurrieron alrededor de las heridas, después de dos a tres semanas de la siembra e incubación del tejido, se obtuvo un cultivo viable con características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas favorables para la transformación del isoeugenol. Dentro de estas características destacan:

- No contiene compuestos susceptibles a la oxidación.
- Es un cultivo friable (los agregados celulares son débiles).
- Presenta un desarrollo abundante en un periodo de incubación relativamente corto.

A las ocho semanas de crecimiento y dos subcultivos, en el tejido se observó la desdiferenciación de los explantes ya que se generó tejido de coloración blanca que correspondió al callo espumosa (callo) y los restos de explante mantuvo un color verde (Fig. 25 a y b).

En las figuras 25 a y b se observa la formación del callo de hoja con los restos del explante. Las figuras 25 c y d muestran la formación del callo de flor con las mismas características que el callo de hoja (Fig. 25 a y b), a diferencia que en éste, los brotes del callo se distinguen con mayor claridad.

Las figuras 25 e y f muestran los callos de hoja y de flor respectivamente a diez semanas de crecimiento y tres subcultivos. En esta etapa el tejido se desdiferenció en su totalidad. Sin embargo, el callo procedente de inflorescencias presentó una

coloración más oscura con respecto al callo de hoja, probablemente producto de la oxidación, del tejido de las inflorescencias.

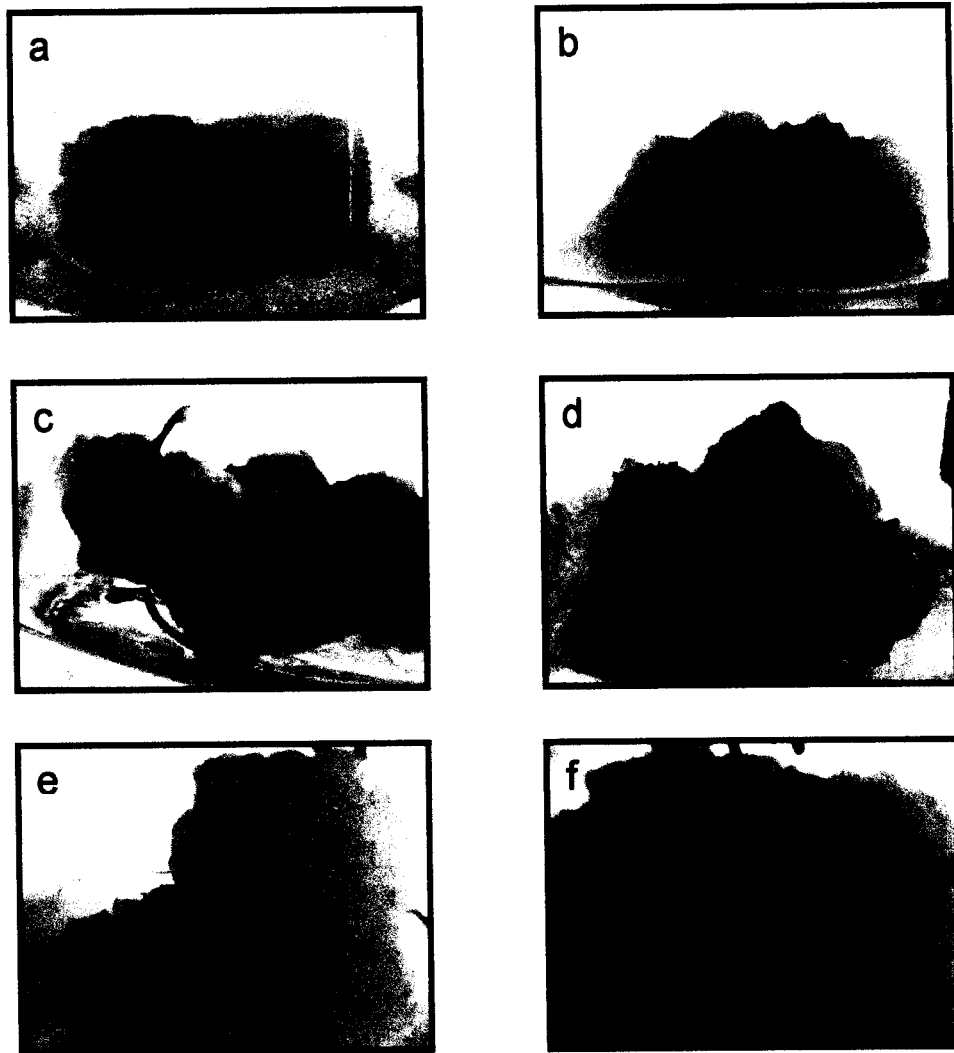


Fig.25. Obtención de la línea celular

Fig.25 a y b. Callo de hoja

Fig.25 c y d. Callo de inflorescencia

Fig.25 e. Callo de hoja

Fig.25 f. Callo de flor

Cinética de crecimiento

Con la finalidad de establecer el tiempo en el que se obtuvo la cantidad de biomasa necesaria para la biotransformación se dejó crecer el callo en un medio líquido con agitación constante durante quince días. Los resultados mostraron que las células en suspensión crecieron de forma exponencial, sin presentarse la fase estacionaria o de agotamiento de los nutrientes debido a que el crecimiento fue demasiado rápido formándose agregados y cúmulos celulares. En el caso de peso seco y en el peso fresco, se presentó una disminución no significativa a los 10 días, seguido nuevamente de una fase logarítmica.

En las Fig. 26 a y b se observan los pesos seco y fresco, con respecto al tiempo.

Curvas de crecimiento para callo de *Bouvardia termifolia* en peso seco y peso fresco

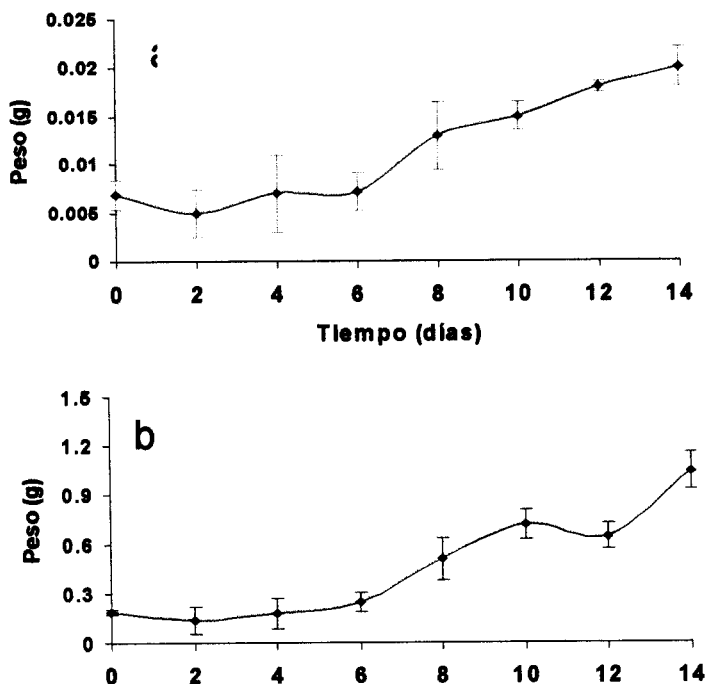


Fig. 26. Curvas de crecimiento para callo de *Bouvardia termifolia*; a. Peso seco; b. Peso fresco.

Una vez establecida la línea celular de CCV, de *Bouvardia ternifolia* se realizó la biotransformación, concluyendo así esta etapa del proceso.

6.2. Etapa II A. Biotransformación a partir de isoeugenol

Ensayos cualitativos por cromatografía en capa fina (CCF)

Ensayo 1: Biotransformación con el extracto crudo de hojas de *Bouvardia ternifolia*.

La transformación se realizó con el extracto de hojas en amortiguador de fosfatos e isoeugenol en condiciones de agitación constante a 25°C durante 48 hrs. En la Fig.27 se muestra la cromatoplaaca en la que puede observarse la formación de productos, entre ellos los posibles dímeros del isoeugenol; así como, la posible presencia de vainillina; debido a que se observa un producto al mismo R_f que el estándar. Cabe mencionar que también se detectó la presencia del sustrato (isoeugenol) sin transformar, indicando que la transformación no fue al 100%.



Fig.27. Biotransformación con el extracto crudo de *Bouvardia ternifolia*.

Orden de las muestras: 1,2) Transformación con las hojas, 3) Vainillina, 4) Estándar Bouvardia CCV.
Sistema: Hexano:Acetato de Etilo (3:7). revelada con Sulfato Cérico.

Los ensayos de la biotransformación del isoeugenol con el CCV de *Bouvardia* se probaron con tres materiales celulares: en callo, en suspensión, en suspensión con estrés nutritivo.

En el caso de los ensayos realizados en callo, la metodología general para la biotransformación se describe a continuación: se pesó 20g de callo y se agregó 100ml de amortiguador de fosfatos (pH 6), se homogeneizó y en algunos casos se filtraron los restos celulares después de la homogenización, separando el sobrenadante (extracto enzimático) el cual también fue utilizado; por tanto se utilizó extractos totales y extractos enzimáticos. Así para llevar a cabo la biotransformación, a los extractos totales y extractos enzimáticos, se les adicionó 25mg de isoeugenol previamente disuelto en 1ml de acetona (en matraces Erlenmeyer de 250ml).

En el caso de los ensayos realizados en suspensión y en suspensión con estrés nutritivo, la metodología general fue la misma que se describe para los ensayos realizados en callo. La diferencia de estas condiciones consistió en que se utilizaron cultivos de células en suspensión con y sin estrés nutritivo.

Posteriormente los matraces se colocaron en incubación a temperatura ambiente y 180rpm durante 48h. Una vez transcurrido el período de incubación, el producto se recuperó mediante extracciones con acetato de etilo. Mediante CCF (con una mezcla eluyente de Hexano:Metanol:Acetato (3.5:0.5:1.0), se observaron los posibles productos y se purificaron por cromatografía en capa preparativa y se caracterizaron por sus datos espectroscópicos (RMN). Obteniendo el siguiente producto de la reacción de biotransformación del isoeugenol con el CCV de *Bouvardia* (Fig.28):

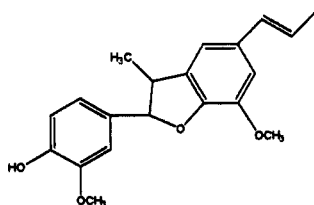


Fig.28 Estructura dímero de isoeugenol

A continuación se mencionan los resultados obtenidos para cada ensayo de biotransformación a diferentes condiciones. Todos los ensayos se realizaron siguiendo la metodología general ya descrita (pág. 86).

Ensayo 2: Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja e inflorescencia de *Bouvardia ternifolia*.

Se realizó el primer ensayo (Fig.29) de biotransformación de isoeugenol con el callo de *Bouvardia ternifolia* proveniente tanto de hoja como de inflorescencia; se realizó por triplicado y se tomó un control para cada tipo de callo.

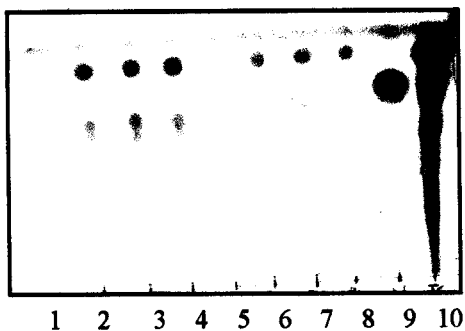


Fig.29. Primera biotransformación con el callo obtenido de *Bouvardia ternifolia*.

Orden de las muestras: 1) Callo de hoja control, 2,3,4) Callo de hoja con isoeugenol (triplicado), 5) Callo de flor control, 6,7,8) Callo de flor (triplicado), 9) Estándar de Vanillina, 10) Estándar de Isoeugenol
Sistema: Cloroformo:Metanol (95:5), revelada con Sulfato Cérico

Los resultados obtenidos mostraron que, la transformación en callo de hoja como en el de flor hubo productos formados. Sin embargo, aún puede observarse la presencia del sustrato (isoeugenol) el cual no se transformó en su totalidad y la de los dímeros del isoeugenol; lo cual indicó que el callo utilizado tiene la maquinaria enzimática para llevar a cabo la transformación.

Por otro lado, a la altura de la vainillina no se observa ninguna mancha, por lo que se decidió concentrar más los extractos. En la Fig.30, se muestra la cromatoplaca con los extractos concentrados, los resultados obtenidos demostraron que la vainillina no se obtuvo en la transformación; o no fue posible detectarla debido a que se encuentra en bajas concentraciones.

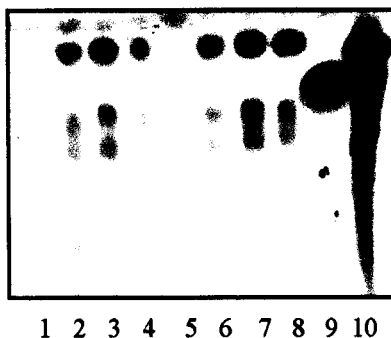


Fig.30. Biotransformación con el callo de *Bouvardia ternifolia*.

Orden de las muestras: 1) Callo de hoja control, 2,7,8) Callo de hoja con isoeugenol (triplicado), 5) Callo de flor control, 3,4,6) Callo de flor con isoeugenol (triplicado), 9) Estándar de Vainillina, 10) Estándar de isoeugenol.
Sistema Cloroformo:Metanol (95:5), revelada con Sulfato Cérico.

Ensayo 3: Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja de *Bouvardia ternifolia*, en presencia de H_2O_2 .

La transformación se realizó sólo con callo de hoja, debido a que los resultados anteriores fueron similares usando callo de flor. A diferencia de la primera transformación (ensayo 2), la segunda (ensayo3) consistió en agregar H_2O_2 (un oxidante fuerte). Se agregó el doble de moles de H_2O_2 en función de la cantidad de moles de isoeugenol presentes ($1.52 \cdot 10^{-4}$ moles en 25mg de isoeugenol). Por tanto la cantidad de H_2O_2 agregada por matraz fue de $3.04 \cdot 10^{-4}$ moles; lo que equivale en volumen a 34.3 μ L.

Al realizar la extracción y recuperación del producto se obtuvo la siguiente cromatoplaqa (Fig.31).

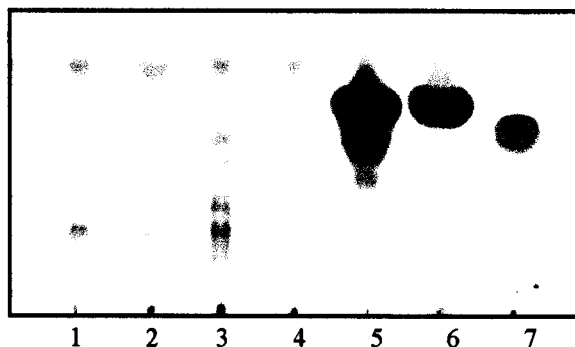


Fig.31. Esta placa fue de la transformación de *Bouvardia ternifolia* agregando H_2O_2 .

Orden de las muestras: 1) Control: Callo de hoja + H_2O_2 , 2,3,4) Callo de hoja con isoeugenol + H_2O_2 (triplicado), 5) Estándar de Isoeugenol, 6) Isoeugenol + Buffer, 7) Estándar de Vainillina.
Sistema: Cloroformo:Metanol (95:5), revelada con Sulfato Cérico.

La tabla 8 y fig.31, muestran los resultados cualitativos obtenidos de la transformación; así como los valores de R_f .

Tabla 8. Resultados cualitativos de la transformación de isoeugenol a partir de callo de hoja, en presencia de H₂O₂

Carril	Transformación	Dímero de isoeugenol	Rf	Vainillina	Rf	Isoeugenol residual	Rf
1	Control (Callo sin isoeugenol)	-		-		-	
2,3,4	Callo con isoeugenol	+	1.52	+		+	1.26
5	Estándar de isoeugenol	+	1.52	+		+	1.26
6	Control (Isoeugenol sin callo)	+	1.52	+		+	1.26
7	Estándar de vainillina	-		+	1.4	-	

(+) Presencia
 (-) Ausencia

En la fig.31 se observa la transformación del isoeugenol con la formación de productos y en la tabla 8 se describen los resultados obtenidos para esta transformación.

En los carriles 2,3,4 se observa la presencia del sustrato (isoeugenol) en bajas concentraciones, lo que indica que la transformación se llevó a cabo casi por completo. Por otro lado, los dímeros del isoeugenol pudieron observarse con baja resolución lo que indica que se formó el dímero a bajas concentraciones. También puede observarse la posible presencia de vainillina a la misma distancia que el estándar, por lo que se sugiere que la formación de vainillina probablemente ocurrió en la biotransformación. Los carriles 1 y 6 corresponden a controles y los carriles 5 y 7 corresponden a estándares.

6.3. Etapa II B. Implementación de un método de análisis

Ensayos cuantitativos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Los siguientes ensayos se realizaron con la finalidad de reproducir y cuantificar los productos de la transformación (dímero del isoeugenol, la vainillina, así como el isoeugenol residual).

Ensayo 4: *Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de Bouvardia ternifolia; con el extracto total y enzimático, en presencia y ausencia de H₂O₂.*

En la tabla 9 se describen los resultados cualitativos de las transformaciones que se muestran en la siguiente cromatoplaque (Fig.32), indicando la presencia o ausencia de los productos principales de la transformación.

Tabla 9. Resultados cualitativos de la biotransformación de isoeugenol con el extracto total y enzimático de *Bouvardia*, en presencia y ausencia de H₂O₂.

Carril	Transformación	Clave de muestra:	Dímero de isoeugenol	Rf	Vainillina	Isoeugenol residual	Rf
1	Control: Callo + H ₂ O ₂	B C/P C	-		-	-	
2	Callo + isoeugenol + H ₂ O ₂	B C/P	+	1.76	ND	-	
3	Control: Callo sin isoeugenol	B S/P C	-		-	-	
4	Callo + isoeugenol	B S/P	+	1.83	ND	+	1.51
5	Control: Extracto enzimático de callo fresco + H ₂ O ₂	B E.enz C/P C	-		-	-	
6	Extracto enzimático de callo fresco + H ₂ O ₂ + isoeugenol	B E.enz C/P	+	1.83	ND	-	
7	Control: Extracto enzimático de callo fresco	B E.enz S/P C	-		-	-	
8	Extracto enzimático de callo fresco + isoeugenol	B E.enz S/P	+	1.83	ND	+	1.51
9	Control: Buffer + isoeugenol		+	1.83	ND	+	1.51
10	Control: Buffer + isoeugenol + H ₂ O ₂		+	1.83	ND	+	1.51
11	Estándar de isoeugenol		+		ND	+	1.51
12	Estándar dímero de isoeugenol		+	1.76	-	-	

(+) Presencia
 (-) Ausencia
 (ND) No detectado

Se realizó una CCF de esta biotransformación obteniendo la siguiente cromatoplaaca

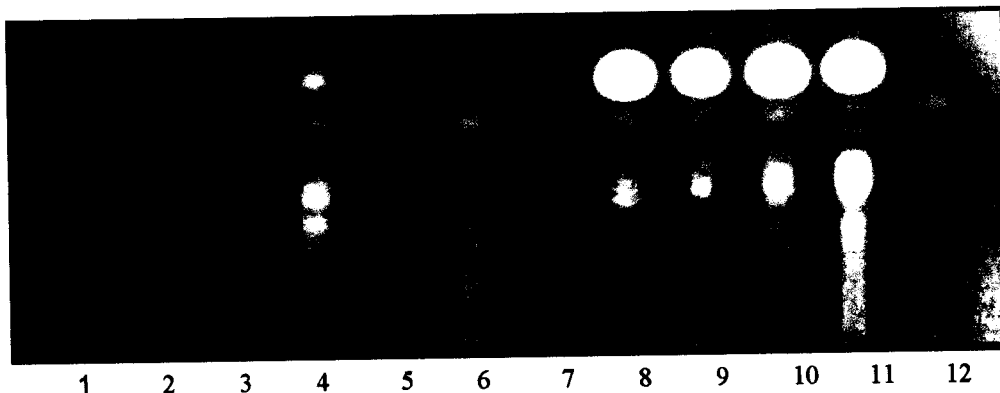


Fig.32. Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de *Bouvardia ternifolia*; con el extracto total y el extracto enzimático, agregando H_2O_2 .

Orden de las muestras:

- | | |
|--|---|
| 1) Control: Callo + H_2O_2 | 7) Control: Extracto enzimático de callo fresco |
| 2) Callo + isoeugenol + H_2O_2 | 8) Extracto enzimático de callo fresco + isoeugenol |
| 3) Control: Callo sin isoeugenol | 9) Control: Buffer + isoeugenol |
| 4) Callo + isoeugenol | 10) Control: Buffer + isoeugenol + H_2O_2 |
| 5) Control: Extracto enzimático de callo fresco + H_2O_2 | 11) Estándar de isoeugenol |
| 6) Extracto enzimático de callo fresco + H_2O_2 + isoeugenol | 12) Estándar dímoro de isoeugenol |

Sistema: Hexano:Metanol:Acetato (3.5:0.5:1.0), revelada con DPPH

En la cromatoplaaca anterior (Fig.32) se muestra que en los carriles 1,3,5 y 7 no hay productos de la transformación, debido a que, en estos carriles las muestras son controles y no presentaron sustrato (isoeugenol) al inicio de la transformación por tanto no se observan manchas significativas en estos carriles. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se observa la formación de productos de la transformación, debido a que estas muestras sí presentaron sustrato (isoeugenol). Los carriles 9 y 10 corresponden a controles y los carriles 11 y 12 son estándares.

En la tabla 10 se presentan los resultados cuantitativos de los productos de la transformación para este ensayo, indicando las cantidades exactas de éstos

después de la transformación. Los cálculos se realizaron con base en las curvas patrón que se encuentran en el anexo.

Tabla 10. Resultados cuantitativos de la biotransformación de isoeugenol a partir de callo de *Bouvardia*, con el extracto total y enzimático, en presencia y ausencia de H₂O₂.

Carril	Clave de muestra	Peso muestra inicial (mg)	Dímero de isoeugenol				Isoeugenol				Vainillina			
			t _R	g de dímero	moles	% de transformación	t _R	g de isoeugenol	moles	% de isoeugenol residual	t _R	g de vainillina	moles	Cantidad de veces producida
1	B C/P C*	2.2	8.72	0.00072	2.22E-06	2.9	7.52	2E-04	1E-06	0.8	3.82	9.72E-06	6.40E-08	
2	B C/P*	22.5	8.73	0.00318	9.78E-06	12.9	7.53	1E-03	6E-06	3.9	3.83	7.55E-05	4.97E-07	14 veces más que el control
3	B S/P C*	1.1	8.72	0.00083	2.56E-06	3.4	7.53	0	0	0	3.82	1.28E-06	8.40E-09	
4	B S/P*	17.8	8.72	0.01113	3.42E-05	45	7.51	0.006	4E-05	24.2	3.82	0.0001559	1.03E-06	7370 veces más que el control
5	B E.enz C/P C*	1.2	8.73	0.00034	1.05E-06	1.4	7.51	4E-04	2E-06	1.4	3.82	4.52E-06	2.97E-08	
6	B E.enz C/P*	10.1	8.72	0.01083	3.32E-05	43.7	7.55	5E-04	3E-06	1.9	3.82	2.13E-05	1.40E-07	15 veces más que el control
7	B E.enz S/P C*	1.5	8.72	4E-05	1.24E-07	0.2	7.52	5E-05	3E-07	0.2	3.82	2.70E-06	1.78E-08	
8	B E.enz S/P*	18.4	8.72	0.01085	3.33E-05	43.8	7.51	0.005	3E-05	20.5	3.81	0.0001602	1.05E-06	73 veces más que el control
9	Buffer + Isoeugenol	18.4	8.75	0.00495	1.52E-05	20	7.51	0.006	3E-05	22.1	3.86	0.0003671	2.42E-06	
10	Buffer + Isoeugenol + H ₂ O ₂	19	8.75	0.00660	2.03E-05	26.6	7.51	6E-06	4E-08	0.02	3.86	0.0004542	2.99E-06	

* Ver tabla 9 t_R= tiempo de retención

Ensayo 5: Pruebas de estrés nutritivo

En la tabla 11, se muestran los resultados cualitativos de las biotransformaciones que se muestran en la cromatoplaque de la fig.33, indicando la presencia o ausencia de los productos principales de la transformación.

Tabla 11. Resultados cualitativos de la biotransformación del isoeugenol con células en suspensión en estrés nutritivo de *Bouvardia*.

Carril	Transformación	Clave de muestra	Dímero de Isoeugenol	Rf	Vainillina	Isoeugenol residual
1	Control: Callo al 100% de Nitratos sin isoeugenol	B 100% C	-		-	-
2	Callo al 100% de Nitratos + isoeugenol	B 100%	+	1.76	ND	-
3	Control: Callo al 50% de Nitratos sin isoeugenol	B 50% C	-		-	-
4	Callo al 50% de Nitratos + isoeugenol	B 50%	+	1.83	ND	-
5	Control: Callo al 25% de Nitratos sin isoeugenol	B 25% C	-		-	-
6	Callo al 25% de Nitratos + isoeugenol	B 25%	+	1.83	ND	-
7	Estándar de isoeugenol		+		-	-
8	Estándar dímero de isoeugenol		+	1.83	ND	-

(+) Presencia. (-) Ausencia. (ND) No detectado

Se realizó una CCF del ensayo anterior obteniendo la siguiente cromatoplaca

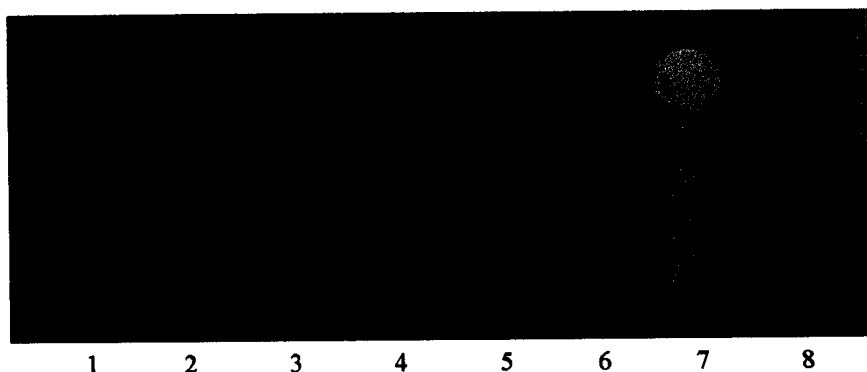


Fig.33. Transformaciones de las primeras pruebas de estrés nutritivo

Orden de las muestras:

- | | |
|--|---|
| 1) Control: Callo al 100% de Nitratos sin isoeugenol | 5) Control: Callo al 25% de Nitratos sin isoeugenol |
| 2) Callo al 100% de Nitratos + isoeugenol | 6) Callo al 25% de Nitratos + isoeugenol |
| 3) Control: Callo al 50% de Nitratos sin isoeugenol | 7) Estándar de isoeugenol |
| 4) Callo al 50% de Nitratos + isoeugenol | 8) Estándar dímero de isoeugenol |

Sistema: Hexano:Metanol:Acetato (3.5:0.5:1.0), revelada con DPPH

En los carriles 2,4 y 6 (Fig.33) se observa la formación de productos de la transformación, el ensayo se realizó en presencia de isoeugenol y los productos pudieron ser detectados en la cromatoplaca. Los carriles 1,3 y 5 son controles y los carriles 7 y 8 son estándares. En los tres tratamientos probados se detectó la presencia del dímero de isoeugenol, a excepción de los controles.

En la tabla 12 se presentan los resultados cuantitativos de los productos de la transformación obtenidos por HPLC. Los cálculos se realizaron con base en las curvas patrón que se encuentran en el anexo.

Tabla 12. Resultados cuantitativos de la biotransformación del isoeugenol con células en suspensión en estrés nutritivo de *Bouvardia*.

Carril	Clave de muestra	Peso muestra inicial (mg)	Dímero de isoeugenol				Isoeugenol				Vainillina			
			t _R	g de dímero	moles	% de transformación	t _R	g de isoeugenol	moles	% de isoeugenol residual	t _R	g de vainillina	moles	Cantidad de veces producida
1	B 100% C*	1.2	8.34	0.000043	1.32E-07	0.17	7.1	0.000013	7.74E-08	0.05	2.83	0.000007	4.71E-08	
2	B 100%*	16.91	8.34	0.001234	3.78E-06	5.0	7.1	0.002263	1.38E-05	9.1	2.83	0.000129	8.49E-07	37 veces más que el control
3	B 50% C*	1.2	8.31	0.000127	3.89E-07	0.51	6.9	0.000025	1.54E-07	0.1	2.83	0.000003	1.87E-08	
4	B 50%*	11.65	8.31	0.001560	4.79E-06	6.3	6.9	0.000684	4.17E-06	2.7	2.83	0.000110	7.26E-07	53 veces más que el control
5	B 25% C*	5.4	8.31	0.000166	5.08E-07	0.66	7	0.000021	1.30E-07	0.08	2.83	0.000004	2.61E-08	
6	B 25%*	11.19	8.31	0.001716	5.26E-06	6.3	7.1	0.001241	7.57E-06	5.0	2.83	0.000054	3.57E-07	10 veces más que el control

*Ver tabla 11 t_R= tiempo de retención

Ensayo 6: Pruebas de estrés nutritivo con y sin H₂O₂

A continuación en la tabla 13 se muestran los resultados cualitativos, de las biotransformaciones realizadas para este ensayo, los cuales se muestran en la cromatoplaca (Fig.34), indicando la presencia o ausencia de los productos de la transformación.

Tabla 13. Resultados cualitativos de la biotransformación del isoeugenol con células en suspensión en estrés nutritivo de *Bouvardia* con y sin H₂O₂.

Carril	Transformación	Clave de muestra	Dímero de Isoeugenol	Rf	Vainillina	Isoeugenol residual	Rf
1	Control: Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos + H ₂ O ₂ sin isoeugenol	B E. enz 100% C/P Control	-		-	-	
2	Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos + isoeugenol + H ₂ O ₂	B E. enz 100% C/P	+	1.70	ND	-	
3	Control: Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos sin isoeugenol	B E. enz 100% S/P Control	-		-	-	
4	Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos + isoeugenol	B E. enz 100% S/P	+	1.71	ND	+	1.54
5	Control: Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos + H ₂ O ₂ sin isoeugenol	B E. enz 25% C/P Control	-		-	-	
6	Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos + H ₂ O ₂ + isoeugenol	B E. enz 25% C/P	+	1.71	ND	-	
7	Control: Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos sin isoeugenol	B E. enz 25% S/P Control	-		-	-	
8	Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos + isoeugenol	B E. enz 25% S/P	+	1.71	ND	+	1.54
9	Estándar de Isoeugenol		-		ND	-	1.54
10	Estándar dímero de isoeugenol		+	1.7	ND	-	

(+) Presencia, (-) Ausencia, (ND) No detectado

Se realizó una CCF del ensayo anterior obteniendo la siguiente cromatoplaca

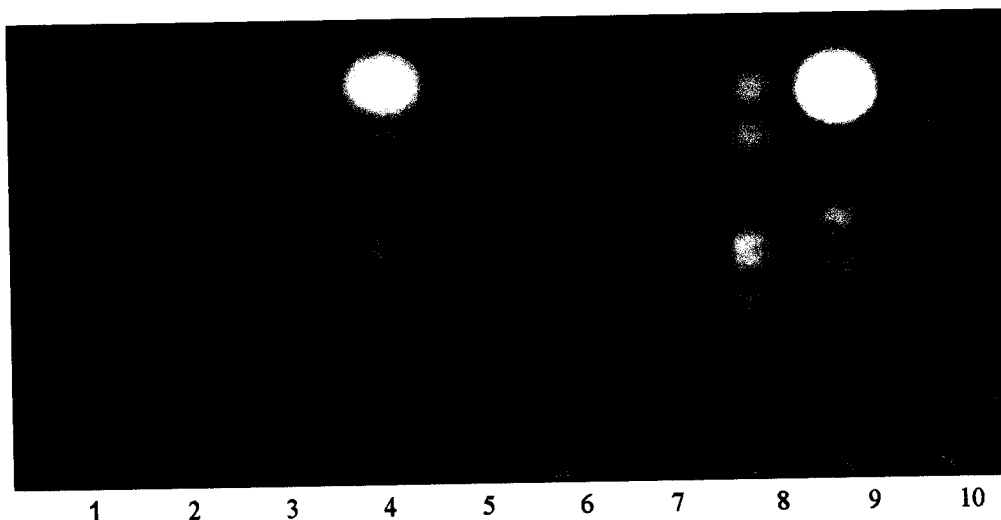


Fig.34. Esta cromatoplaca muestra las biotransformaciones de las pruebas de estrés nutritivo con y sin H_2O_2

Orden de las muestras:

- 1) Control: Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos + H_2O_2 sin isoeugenol
- 2) Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos + isoeugenol + H_2O_2
- 3) Control: Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos sin isoeugenol
- 4) Extracto enzimático de callo fresco al 100% de Nitratos + isoeugenol
- 5) Control: Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos + H_2O_2 sin isoeugenol
- 6) Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos + H_2O_2 + isoeugenol
- 7) Control: Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos sin isoeugenol
- 8) Extracto enzimático de callo fresco al 25% de Nitratos + isoeugenol
- 9) Estándar de isoeugenol
- 10) Estándar dímero de isoeugenol

Sistema: Hexano:Metanol:Acetato (3.5:0.5:1.0), revelada con DPPH

En la Fig.34 se muestra la cromatoplaca de las pruebas de estrés nutritivo con y sin H_2O_2 , descrita en la tabla 13.

En los carriles 1, 3, 5 y 7 se observa la ausencia de productos de la transformación, debido a que, en estos carriles las muestras son controles, (sin isoeugenol). En los carriles 2, 4, 6 y 8 se observa la formación de productos de la transformación, debido a que estas muestras si presentaron isoeugenol (sustrato).

Los carriles 9 y 10 corresponden a estándares de isoeugenol y dímero de isoeugenol respectivamente.

En la tabla 14 se presentan los resultados cuantitativos de los productos de la transformación para este ensayo, indicando las cantidades exactas de éstos después de la transformación. Los cálculos se realizaron con base en las curvas patrón que se encuentran en el anexo.

Tabla.14 Resultados cuantitativos de la biotransformación del isoeugenol con células en suspensión en estrés nutritivo de *Bouvardia* con y sin H₂O₂.

Carril	Clave de muestra	Peso muestra inicial (mg)	Dímero de isoeugenol				Isoeugenol				Vainillina			
			t _R	g de dímero	moles	% de transformación	t _R	g de isoeugenol	moles	% de isoeugenol residual	t _R	g de vainillina	moles	Cantidad de veces producida
1	B E. enz 100% C/P Control*	2.1	8.7	0.000460	1.41E-06	1.85	7.52	0.000018	1.11E-07	0.07	3.8	1.64E-06	1.08E-08	
2	B E. enz 100% C/P*	10.2	8.7	0.000104	3.18E-07	0.42	7.53	0.000206	1.25E-06	0.82	3.8	1.44E-05	9.46E-08	8 veces más que el control
3	B E. enz 100% S/P Control*	2.2	8.7	0.000994	3.05E-06	4.01	7.51	0.000159	9.70E-07	0.63	3.8	5.19E-06	3.42E-08	
4	B E. enz 100% S/P*	14.6	8.7	0.018197	5.58E-05	73	7.5	0.002344	1.43E-05	9.4	3.8	6.32E-05	4.16E-07	7 veces más que el control
5	B E. enz 25% C/P Control*	3.4	8.7	0.000851	2.61E-06	3.44	7.52	0.000033	2.00E-07	0.13	3.8	3.64E-06	2.39E-08	
6	B E. enz 25% C/P*	10.5	8.7	0.011359	3.48E-05	45.8	7.5	0.000760	4.63E-06	3.05	3.8	1.95E-05	1.28E-07	11 veces más que el control
7	B E. enz 25% S/P Control*	17.4	8.7	0.001954	5.99E-06	7.89	7.51	0.000133	8.13E-07	0.53	3.8	3.21E-06	2.11E-08	
8	B E. enz 25% S/P*	16.8	8.7	0.019170	5.88E-05	77.4	7.51	0.002764	1.69E-05	11.1	3.8	2.28E-05	1.50E-07	6 veces más que el control

*Ver tabla 13 t_R= tiempo de retención

7. Discusión

Etapa I. *Obtención de la línea celular*

En esta etapa fue importante la eliminación de patógenos del material vegetal; la desinfección química llevada a cabo con diferentes sustancias resultó ser sencilla, y efectiva ya que se logró la eliminación de bacterias y hongos de las hojas e inflorescencias de la planta; se lograron resultados satisfactorios desde la primera siembra de explantes. Así mismo se demostró que la concentración y tiempo de exposición a los agentes químicos como etanol, cloro, Tween 20, Microdyn®, la utilización de un bactericida y un fungicida, así como la adición de un antibiótico al medio de cultivo, fue la adecuada permitiendo la formación de callo bajo condiciones asépticas.

Lo anterior se debe a factores físicos y químicos tales como la agitación, adición de agentes desinfectantes y antibióticos, tanto en el proceso de desinfección como en el medio de cultivo, tienen efectos determinantes e intensos en todas las actividades de los microorganismos.

A este respecto, Alvarado (1998) hace notar que los contaminantes más frecuentes en el cultivo *in vitro* son hongos filamentosos y bacterias.

George y Sherrington (1984) y Pierik (1990) recomiendan que antes de la esterilización, se debe realizar un lavado con agua, eliminar la capa más externa en este caso las cubiertas de los cotiledones, para facilitar la entrada de las soluciones químicas.

Se utilizó hipoclorito de sodio comercial (NaClO_2 con 6% de ingrediente activo) al 20%, como agente desinfectante y oxidativo ya que actúa sobre proteínas y ácidos

nucleicos, eliminando hongos, bacterias y esporas; al cloro se le adicionó plata coloidal Microdyn® (10 gotas en 25ml de agua), el cual contiene partículas que permanecen suspendidas, que al reaccionar con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben la respiración, logrando así matar a las bacterias presentes en la superficie de las hojas e inflorescencias. Así mismo se agregó el Tween 20 (agente surfactante), con una concentración de 20 gotas en 250ml de agua, el cual actuó en la disminución de la tensión superficial, permitiendo la penetración de las otras sustancias desinfectantes, eliminando las ceras de las plantas, (George y Sherrington 1984, Pierik, 1990 y Uribe, 1998).

Para lograr la asepsia total estos mismos autores recomienda el empleo de bactericidas y fungicidas, en tiempos prolongados. George y Sherrington (1984) emplean desinfectantes útiles en la eliminación de patógenos, elaborados a base de bactericidas, como es el caso de Agri-mycin 500®, el cual está compuesto por antibióticos como sulfato de estreptomicina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre monohidratado, siendo muy importantes para la eliminación de dichas bacterias; en este trabajo se utilizó una concentración de 1g/250ml, durante 20min, la cual fue adecuada debido a que ya no aparecieron bacterias por el efecto del Agrimycin 500®. El fungicida utilizado para eliminar los hongos presentes fue Promil®, en un inicio se probó una concentración de 1g/250ml durante 15min y no fue suficiente debido a que se presentó contaminación; por tal motivo se aumentó la concentración y el tiempo a 2g/250ml, durante 30min logrando así la eliminación de hongos. El fungicida es sistémico, de amplio espectro, no tóxico para plantas, que actúa sobre una gran variedad de hongos,

como: *ascomycetos*, *deuteromycetos* y *basidiomycetos*.

Alvarado (1988) reporta que la esterilización superficial produce la destrucción de organismos saprófitos y esporas superficiales en las capas más externas del material vegetal, pero que no elimina infecciones dentro de los tejidos, los cuales son llamados infecciones sistémicas. Por lo que estos microorganismos están asociados a los tejidos de las plantas, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos como lo explican; generalmente no se eliminan con procedimientos de desinfección superficial ya que requieren de medidas adicionales como la incorporación de uno o más antibióticos, ya sea en el proceso de desinfección o en los medios de cultivo, quimioterapia y/o termoterapia.

En este trabajo se recurrió a un antibiótico con un ingrediente activo llamado cefotaxime, con nombre comercial de claforan, el cual fue de gran utilidad en la eliminación de microorganismos bacterianos. Este antibiótico pertenece al grupo de las cefalosporinas, bactericida de amplio espectro, su forma de acción es inhibiendo la biosíntesis de péptidos de la pared celular bacteriana, rompiéndola en pedazos a la célula y causando la muerte de bacterias gram-positivas y gram-negativas (www.micro.magnet.fsu.edu, www.healthtoch.com, www.rxlist.com).

El éxito de la eliminación de organismos patógenos se logró al 100% debido a la eficacia del método de esterilización.

Con respecto a la inducción y proliferación de callo se puede decir que el crecimiento celular es un proceso controlado por reguladores, los cuales juegan un papel importante, no sólo dentro de las plantas, sino también a nivel de órgano,

tejido y célula (Esau, 1985), es por ello que los explantes de *Bouvardia* trabajados respondieron favorablemente al formar callo esta producción de células es la manifestación de las interacciones que se establecen entre los medios nutritivos, suplementados con reguladores de crecimiento, con las condiciones fisiológicas y bioquímicas endógenas de los explantes.

Todos los tejidos probados (hoja e inflorescencia) de *Bouvardia*, indujeron callo, el cual proliferó y logró la formación de agregados de callo, la respuesta celular a la formación de callo depende de muchos factores, como son el origen del tejido, las condiciones fisiológicas y bioquímicas de los tejidos, la composición de los medios de cultivo y las condiciones ambientales, entre otras (Álvarez, 1994).

En este ensayo se probó que tanto el explante de hoja como el de flor indujeron callo en un medio MS, en la Fig.25 se aprecia una producción de callo muy similar. Los cultivos de hojas e inflorescencia de *Bouvardia* son órganos diferenciados que permitieron la obtención de callo mediante la dediferenciación acelerada de sus células.

En este trabajo se observó que la dediferenciación de las células de los explantes tiene mucho que ver con la composición anatómica de éstos, por lo que, la composición celular de cada explante fue tomada en cuenta, principalmente a nivel meristemático. En el caso de *Bouvardia* se observó que los dos explantes utilizados tienen la capacidad de formar callo, debido a que poseen zonas meristemáticas capaces de diferenciarse. El explante de hoja utilizado presentan un tipo de meristemo foliar, con un funcionamiento simultáneo o secuencial, permite la morfogénesis de la hoja. Funcionamiento limitado en tiempo y cesa cuando la hoja ha alcanzado su forma y dimensiones definidas.

Otros factores que influyen en la formación de callo como son: los micro y macroelementos del medio de cultivo, las vitaminas, los reguladores de crecimiento, las condiciones de cultivo, los explantes involucrados, etc., todos los elementos interactúan, para modular la expresión genética, es por ello que la respuesta morfogénica no recae en un solo factor, sino que es el resultado de interacciones, aún cuando uno de ellos tenga mayor efecto.

Otro factor importante para la inducción y proliferación de los callos además de la anatomía, son los medios de cultivo. El medio de cultivo utilizado en este caso fue el medio MS como ya se mencionó, este medio ha demostrado una acción estimulante sobre la organogénesis (formación de yemas). El medio MS está caracterizado por un contenido fuerte de nitrógeno (60 meq/l) del cual 1/3 está aportado en forma reducida (NH_4^+) y por una concentración igualmente elevada de potasio (Ramos, 2006).

Debido a lo anterior, el callo de *Bouvardia* se proliferó de forma acelerada, muy similar tanto en el explante de hoja como el de flor en un medio de cultivo MS, el cual mostró un bajo porcentaje de oxidación en el callo producido, logrando una cantidad de biomasa considerable para las pruebas de biotransformación necesarias.

Con respecto a la coloración del callo obtenido Álvarez (1994) señala que la coloración del tejido de callo varía, aún derivando de la misma especie, se pueden presentar callo que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo. El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales, se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas. El callo de *Bouvardia* Fig.18.

presentó una coloración amarillenta formando un tejido esponjoso en donde hay una gran cantidad de espacios intercelulares.

La cinética de crecimiento del cultivo de callo de *Bouvardia* se asemeja a una curva sigmoideal (Fig.26a y 26b), que presenta una línea recta con una tendencia totalmente ascendente, presentando dos fases: la fase lag y la exponencial o lineal, donde la tasa de crecimiento muestra una aceleración constante, como lo reportó Razdan, 2003. Una vez que la división celular ha sido inducida, la fase exponencial se presenta rápidamente, elevando el número de células de callo debido a un proceso mitótico aumentando la actividad respiratoria, medida a través del consumo de O_2 y niveles de ARN, como mencionan Lindsey y Jones, 1989. En la llamada fase *lag* o de reposo, reportada por George y Sherrington, 1984, el inóculo si presenta señal de división celular, donde únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones de nutrición, si se observa en la cinética de crecimiento de *Bouvardia*., aunque a pesar de que si se tuvo una fase de reposo, fue de pocos días por tanto el callo no presenta dificultad para adaptarse al medio donde se cultivó. Es por ello que durante los primeros 5 días de crecimiento se estableció la fase de reposo y a partir del sexto día se pudo observar un crecimiento exponencial hasta el último día de la cinética (día quince); por tanto no se logró determinar la fase estacionaria ni de muerte; ya que durante los 15 días el crecimiento se mantuvo constante de forma exponencial. Por otro lado, la toma de muestras se dificultó debido a que la cantidad de biomasa se incrementó considerablemente en agregados o cúmulos celulares.

La actividad fisiológica de las plantas está mediada por reguladores de

crecimiento, que ejercen efectos en el desarrollo y diferenciación. La totipotencia celular hace posible que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tengan la capacidad para formar callo, diferenciarse en meristemas adventicios, lo que permitió la división celular.

Cabe destacar que el callo de *Bouvardia* presenta un crecimiento acelerado debido a que las células del cultivo consumen de forma acelerada los reguladores de crecimiento contenidos en el medio de cultivo, teniendo como resultado un incremento notable en la proliferación de las células del callo. Lo que sugiere que en 15 días es un tiempo corto para determinar la cinética completa; o la cantidad de inóculo inicial fue demasiada para el tiempo de la cinética. Lo que indicó que el callo de *Bouvardia ternifolia* se prolifera con gran velocidad confirmando que es un cultivo viable ya que la obtención de biomasa necesaria para las biotransformaciones puede obtenerse después de quince días de incubación de las células.

Etapa II A. Biotransformación a partir de isoeugenol

Ensayos cualitativos por cromatografía en capa fina (CCF)

Ensayo 1: Biotransformación con el extracto crudo de *Bouvardia ternifolia*

Con el objetivo de comprobar que *Bouvardia ternifolia* lleva a cabo la biotransformación del isoeugenol, se realizó un ensayo con extracto crudo de hojas maduras de *Bouvardia*, los resultados obtenidos mostraron (Fig.27) la formación de productos que sugieren la formación de dímeros así como la presencia de vainillina. Con base en estos resultados se decidió generar una línea celular por medio de cultivo de tejidos dado que el uso del tejido directo de la planta podría resultar en posible contaminación del medio de transformación. Por otro lado, por medio del cultivo celular se obtiene biomasa suficiente para los ensayos requeridos y las células se encuentran en la misma etapa de crecimiento. Los resultados de la transformación fueron de gran relevancia para este trabajo ya que se ha reportado que los compuestos fenólicos están relacionados con la actividad antioxidante como el eugenol e isoeugenol, cuyos dímeros presentan una mayor actividad antioxidante que los monómeros (Ogata et al., 2000; Williamson et al., 1999).

Ensayo 2: Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja e inflorescencia de *Bouvardia ternifolia*

Una vez que se demostró que el extracto de hoja fue capaz de formar dímeros y posible vainillina, se usó callo obtenido de hoja e inflorescencia de *Bouvardia ternifolia* con fin de probar si tejidos diferentes de la planta poseían la capacidad de desdiferenciarse en callo y realizar actividad de biosíntesis; ya que algunos

autores han demostrado que células en suspensión o callos, los cuales están en una división constante, poseen, al igual que una planta completa, la capacidad de producir metabolitos secundarios (Hurtado y Merino, 1994), lo cual quedó demostrado que las células de *Bouvardia ternifolia* tienen esa capacidad.

Los resultados obtenidos en ambos tejidos mostraron que poseían la misma capacidad enzimática para llevar a cabo la biotransformación del isoeugenol lo que se confirmó por CCF (Fig.30). Posiblemente porque la presencia de la maquinaria enzimática no depende del tipo de tejido y por ello los dos tipos de callo realizaron la transformación.

Los carriles 2,3 y 4 corresponden a la transformación del isoeugenol con callo de hoja y en los carriles 6,7 y 8 la transformación del isoeugenol con callo de flor, en donde cualitativamente se pudo observar la formación de los mismos productos, los cuales se compararon con un estándar de vainillina (carril 9) y un estándar de isoeugenol (carril 10). Con base en la comparación con estos estándares se pudo comprobar que la formación de vainillina no se llevó a cabo debido a que las células de *Bouvardia* no producen el metabolito, sin embargo las condiciones en las que se encontraban no eran las adecuadas para la formación de éste, a pesar de que fueron las adecuadas para la formación del dímero de isoeugenol (Orihara *et al*, 1992).

Ensayo 3: *Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de hoja de Bouvardia ternifolia, en presencia de H₂O₂*

Con el fin de favorecer la formación del dímero de isoeugenol, se decidió agregar peróxido de hidrógeno ya que es el cofactor de las peroxidasas, con esto se

asegura la cantidad de peróxido para la cantidad de enzima presente en los extractos logrando un mayor rendimiento de transformación. Las condiciones se realizaron como en los ensayos anteriores y la concentración del peróxido se determinó añadiendo lo equivalente al doble de moles de isoeugenol, ya que se sabe que la reacción es (2:1) es decir que por cada 2 moles de isoeugenol se obtiene 1 mol de dímero (Murakami *et al*, 2005).

La Fig.31 muestra que la adición del H_2O_2 a las muestras generó un aumento en la formación de productos; los productos de interés se mantuvieron como productos principales de la transformación.

En los carriles 2,3 y 4 se tiene la transformación del isoeugenol con callo de hoja en presencia de peróxido de hidrógeno. En estos carriles se obtuvo el dímero de isoeugenol a con un valor de Rf de 1.52, el isoeugenol residual con un Rf de 1.26 en lo que se refiere a la vainillina no se observó con claridad la mancha que revelara su presencia, por lo que el valor de Rf no se pudo determinar (Fig.31). Sin embargo, en los carriles antes mencionados se observó un producto a la altura del estándar de la vainillina por tanto no se descarta su presencia, debido a que la CCF es un método poco sensible para detectar concentraciones muy pequeñas (alrededor de nanogramos). En los controles realizados para esta transformación (Fig.31), se observó que en el control 1 (carril 1) no se llevó a cabo la formación de productos de interés, debido a que la biotransformación es específica para la presencia del sustrato (isoeugenol o con compuestos similares); en el control 2 (carril 6), se obtuvo el dímero de isoeugenol con un valor de Rf de 1.52, el isoeugenol residual con un Rf 1.26 y la posible presencia de vainillina; esto debido a que este control presentó sustrato.

7.3. Etapa II B. Implementación de un método de análisis

Ensayos cuantitativos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Ensayo 4: *Biotransformación de isoeugenol a partir de callo de *Bouvardia ternifolia*; con el extracto total y el extracto enzimático, en presencia y ausencia de H_2O_2*

Con el fin de investigar la capacidad de transformación de isoeugenol en células de suspensión de *Bouvardia ternifolia* en extracto totales y de extracto enzimáticos con y sin peróxido, se realizó un ensayo donde se analizó por medio de una CCF los productos de la biotransformación en estas condiciones.

La tabla 9 y Fig.32 muestran los resultados cualitativos donde se determinó la presencia de isoeugenol, así como la del dímero con un valor de Rf 1.83 que corresponde a los valores de Rf de los estándares. En los carriles 1,3,5 y 7 se muestra a los controles que corresponden a ensayos realizados sin sustrato (isoeugenol); por lo que en los resultados no se observa producto alguno de la biotransformación. Los carriles 2 y 4 muestran la biotransformación del isoeugenol con el extracto total, en presencia y ausencia de H_2O_2 respectivamente. En el carril 2 se detectó el dímero de isoeugenol con un valor de Rf de 1.76, de forma interesante no se observó el isoeugenol residual lo que indicó probablemente se transformó por completo, lo anterior puede explicarse debido a que el peróxido es el cofactor de las peroxidasas como ya se mencionó; por tanto al estar presente ocasiona que las peroxidasas presenten en las células de *Bouvardia* reaccionen con mayor facilidad transformando el sustrato casi en su totalidad; aunque no al 100% hacia la formación del dímero del isoeugenol.

En el carril 4 se detectó el dímero de isoeugenol con un Rf de 1.83, isoeugenol residual con un Rf de 1.51 y como se observó en ensayos anteriores la vainillina no fue detectada en ambas condiciones.

Los carriles 6 y 8 muestran la transformación del isoeugenol con el extracto enzimático de *Bouvardia* en presencia y ausencia de H₂O₂ respectivamente.

En el carril 6 (con peróxido de hidrógeno) se detectó el dímero de isoeugenol con un valor de Rf de 1.83, el isoeugenol residual se detectó en baja cantidad, lo que sugiere que la transformación se llevó a cabo casi por completo, es decir, pudo transformarse en otros compuestos, debido a que la proporción del isoeugenol y la del dímero no es uno a uno. El carril 8 (sin peróxido de hidrógeno) se detectó el dímero de isoeugenol con un Rf de 1.83, por otro lado, no se observó la presencia de isoeugenol residual lo que indicó que se transformó casi por completo. Al igual que en otros ensayos la vainillina no fue detectada.

Los carriles 9 y 10 muestran controles realizados con la finalidad de determinar si el sustrato por si solo puede transformarse de forma espontánea con el amortiguador de fosfatos en ausencia de las células en suspensión. Estos ensayos se realizaron en ausencia y presencia de H₂O₂ respectivamente con el fin de verificar si podría participar en este proceso. En ambos casos se muestra la presencia del dímero de isoeugenol con un Rf de 1.83, el isoeugenol residual fue detectado con un Rf de 1.51. Al igual que ensayos anteriores la vainillina no fue detectada en ninguno de estos carriles.

En los carriles 11 y 12 se tienen los estándares de isoeugenol y dímero de isoeugenol respectivamente con un valor de Rf de 1.51 y 1.76 respectivamente.

La tabla 10 muestra los resultados cuantitativos de los productos, en la transformación (ensayo 4), obtenidos a partir de un método de análisis por HPLC. Los resultados obtenidos a partir de las muestras con sustrato (isoeugenol), que corresponden a los carriles 2, 4, 6 y 8, muestran un porcentaje de transformación, con respecto al dímero del isoeugenol de 12.9, 45, 43.7, 43.8, respectivamente. Con respecto al porcentaje de isoeugenol residual después de la transformación fue de 3.9, 24.3, 1.9, 20.53, respectivamente, y con respecto a la vainilina no fue posible determinar el porcentaje de transformación a vainilina ya que los valores obtenidos eran muy bajos (alrededor de 10^{-6} y 10^{-7}), por tanto se determinó la cantidad de veces producida referida al control: 14, 7370, 15, 73, respectivamente. Los carriles 2 y 4 corresponden a muestras de extracto total con y sin peróxido de hidrógeno, los resultados muestran que en ausencia del agente oxidante favorece la transformación del isoeugenol al dímero de éste, lo cual no era lo esperado, debido a que el peróxido es el cofactor de las peroxidases (Barceló y Pomar, 2002) y el cultivo de *Bouvardia* presenta actividad de estas enzimas esperando se favoreciera la formación del dímero del isoeugenol; lo cual no ocurrió, debido a que probablemente se agregó un exceso de peróxido de hidrógeno a los extractos, lo que ocasionó que la enzima inhibiera su actividad catalítica como lo explican Takemoto et al 2002, en donde ellos señalan que la cantidad de peróxido agregada debe ser en concentraciones que permitan una catálisis eficiente sin llegar a un exceso ya que esto se ve afectado en el rendimiento de la formación del dímero.

El porcentaje de isoeugenol residual (3.9%) es menor en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que sugiere que se favoreció la transformación del isoeugenol; pero

no propiamente hacia la formación del dímero ya que sin peróxido el porcentaje es mayor (24.3%); lo que indica que en presencia del peróxido la transformación se llevó a cabo casi por completo favoreciendo la formación de otros compuestos como posibles polímeros de éste. A diferencia de lo que se había determinado en CCF, la formación de vainillina se pudo detectar aunque en bajas concentraciones y con un ligero aumento en ausencia de peróxido de hidrógeno, lo anterior pudo ser debido a que la concentración de las muestras aplicadas en la CCF fue mayor. Los carriles 6 y 8 corresponden a muestras de extracto enzimático con y sin peróxido de hidrógeno, los resultados indicaron que los porcentajes de isoeugenol residual es menor en presencia de peróxido de hidrógeno, favoreciendo la transformación del isoeugenol al dímero. Al igual que el caso anterior la formación de vainillina es mayor en ausencia de peróxido de hidrógeno.

Los resultados obtenidos a partir de los controles sin sustrato (isoeugenol), corresponden a los carriles 1, 3, 5, 7, muestran un porcentaje de transformación, con respecto al dímero de isoeugenol de 2.9, 3.4, 1.4, 0.2, respectivamente. Con respecto al porcentaje de isoeugenol residual después de la transformación fue de 0.8, 0, 1.4, 0.2, respectivamente.

Los carriles 1 y 3 corresponden a muestras control de extracto total con y sin peróxido de hidrógeno, indicando que la ausencia del compuesto oxidante favorece la transformación del isoeugenol al dímero de éste; por tanto el porcentaje de isoeugenol residual es menor en ausencia de peróxido de hidrógeno, favoreciendo la transformación del isoeugenol.

Los carriles 5 y 7 corresponden a muestras control de extracto enzimático con y sin peróxido de hidrógeno, indicando que la presencia del compuesto oxidante

favorece la formación del isoeugenol; por tanto el porcentaje de isoeugenol residual es menor en ausencia de peróxido de hidrógeno.

En resumen, los resultados de las biotransformaciones realizadas para este ensayo indican que, con peróxido la cantidad del dímero fue mayor en el extracto enzimático con respecto al extracto total como se muestra en la tabla 10. Por otro lado, en ausencia de peróxido la cantidad de dímero es mayor en el extracto total con respecto al extracto enzimático lo que indica que la actividad enzimática en este ensayo se ve favorecida al no separarse el tejido. Lo anterior indica que las peroxidases (enzimas responsables de la biotransformación) se encuentran en mejores condiciones para reconocer al sustrato.

Sin embargo la condición del carril 4 (Tabla 10) la cual fue un extracto total en ausencia de peróxido, fue la mejor condición de biotransformación ya que presentó el mayor porcentaje de dímero de isoeugenol, además de mayor cantidad de vainillina producida en comparación con todas las condiciones probadas. Los resultados obtenidos en los extractos en presencia de peróxido indicaron que el peróxido no mostró algún efecto, lo que indica que probablemente no era necesario agregarlo para la transformación, ya que se esperaba que los rendimientos del dímero fueran mayores.

Ensayo 5: Pruebas de estrés nutritivo

Con la finalidad de investigar el efecto de la biotransformación sobre el estrés nutritivo de nitratos en extracto total y determinar la mayor actividad enzimática en células en suspensión del cultivo de *Bouvardia ternifolia*, se redujo la cantidad de nitratos a un 25 y 50%.

La tabla 11 muestra los resultados cualitativos de las biotransformaciones realizadas bajo ciertas condiciones de estrés nutritivo (descritas en la tabla) donde se determinó el rendimiento de la biotransformación en presencia o ausencia del isoeugenol, así como la del dímero con su respectivo valor de Rf. Los carriles 1,3 y 5 corresponden a controles respectivamente como se indica en la tabla 11, estos controles no presentaron sustrato (isoeugenol); por lo que como era de esperarse no se observó productos de la transformación. Otro control que se incluyó fue el del carril 2 con el porcentaje de nitratos al 100%, en el que se obtuvo el dímero de isoeugenol con un valor de Rf de 1.76 y al igual que en otros ensayos la vainillina no fue detectada. Es importante mencionar que no se observó la presencia de isoeugenol residual lo que indicó que probablemente se transformó por completo (Fig.33). Los carriles 4 y 6 muestran la transformación del isoeugenol con el extracto total de células en suspensión sometidas al 50% y 25% de nitratos respectivamente. El carril 4 fue el estrés al 50% en presencia del isoeugenol, en los resultados se observa al dímero de isoeugenol con un Rf de 1.83, de igual forma la vainillina no fue detectada y no hay presencia de isoeugenol residual lo que indica que se transformó por completo (Fig.33).

El carril 6 fue el estrés al 25% de nitratos en presencia del sustrato (isoeugenol), los resultados mostraron la presencia del dímero del isoeugenol con un Rf de 1.83, vainillina ausente y como en el caso anterior tampoco se observa la presencia de isoeugenol residual.

Los carriles 7 y 8 muestran los estándares de isoeugenol y dímero de isoeugenol respectivamente con un valor de Rf de 1.51 y 1.83 respectivamente.

La tabla 12 muestra los resultados cuantitativos de los productos en las biotransformaciones del ensayo 5 obtenidos a partir de un método de análisis por HPLC. Estos resultados fueron obtenidos a partir de muestras con sustrato (isoeugenol), que corresponden a los carriles 2, 4 y 6 muestran un porcentaje de transformación con respecto al dímero del isoeugenol de 5.0, 6.3 y 6.3, respectivamente, lo que confirma que se llevó a cabo la transformación debido a que el eugenol residual disminuyó obteniéndose valores de porcentaje de 9.1, 2.7 y 5.0 respectivamente, lo anterior sugiere que el isoeugenol no sólo se transformó al dímero, sino en productos poliméricos.

Con respecto a la vainilina no fue posible determinar el porcentaje de transformación a vainillina ya que los valores obtenidos eran muy bajos (alrededor de 10^{-6} y 10^{-7}), por tanto se determinó la cantidad de veces producida referida al control: 37, 53 y 10.

Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a muestras control de extracto total de células en suspensión bajo las condiciones de estrés ya descritas con anterioridad (tabla 11), a diferencia que estas muestras no presentaron el sustrato para la transformación. Por tanto las cantidades del dímero de isoeugenol así como la cantidad de isoeugenol y vainillina son muy bajas ya que no hay biocatalizador que actúe con el sustrato y la biotransformación prácticamente no se llevó a cabo. En resumen los resultados de las biotransformaciones realizadas para este ensayo indican que, para un estrés nutritivo al 50% y 25% de nitratos en un extracto total de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia*, la cantidad del dímero fue igual para los dos casos, con respecto a la cantidad de isoeugenol residual en los dos casos fueron valores pequeños, lo que indica que el isoeugenol

se transformó casi por completo aunque no, hacia la formación del dímero como puede observarse en la tabla 12, sino hacia la formación de otros productos, posiblemente polímeros. Por último, con respecto a la formación de vainillina si hay diferencia entre el estrés al 50% y al 25%, ya que es mayor la cantidad de vainillina al 50% en comparación con el estrés al 25% extracto enzimático con respecto al extracto total como se muestra en la tabla 10, esto pudo deberse a que posiblemente el estrés al 25% fue un estrés un poco fuerte para las células y esto generó que se inhibiera la enzima, aunque las cantidades siguen siendo demasiado bajas.

Sin embargo, la condición del carril 4 (Tabla 12), fue la mejor condición de estrés nutritivo para la biotransformación ya que a pesar de que presentó el mismo porcentaje de dímero de isoeugenol que la condición del carril 6, al 50% de nitratos se obtuvo menor cantidad de isoeugenol y mayor cantidad de vainillina, lo que indica: si hay menos isoeugenol residual, una mayor cantidad de isoeugenol inicial fue transformado a otros productos.

Ensayo 6: *Pruebas de estrés nutritivo con y sin H_2O_2*

Este último ensayo fue realizado con la finalidad de investigar el efecto de la biotransformación sobre el estrés nutritivo al 25% de nitratos en células en suspensión del extracto enzimático, en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno. Este ensayo se realizó debido a que los resultados cualitativos del ensayo 5 se obtuvo un mejor rendimiento de transformación del isoeugenol con un estrés del 25% de nitratos como se observa en el carril de la cromatoplaca (Fig.33).

La tabla 13 muestra los resultados cualitativos de las biotransformaciones realizadas bajo ciertas condiciones de estrés nutritivo, al 25% de nitratos (condiciones descritas en la tabla) donde se determinó la presencia o ausencia del isoeugenol, así como la del dímero con su respectivo valor de Rf.

Como se indica en la tabla 13, los carriles 1,3,5 y 7 corresponden a controles, éstos no presentaron sustrato (isoeugenol); como se esperaba no se observó productos de la transformación (Fig 34). Los carriles 6 y 8 muestran la transformación del isoeugenol con el extracto enzimático de células en suspensión sometidas a un estrés del 25% con y sin peróxido respectivamente, en éstos se obtuvo la presencia del dímero de isoeugenol con un Rf de 1.7. Los carriles 2 y 4 muestran la transformación del isoeugenol a partir del extracto enzimático de células en suspensión sin estrés nutritivo, es decir al 100% de nitratos, con y sin peróxido, en el carril 2 se obtuvo el dímero de isoeugenol con un valor de Rf de 1.70, en este ensayo la vainillina no fue detectada y en el carril 4 se detectó la presencia de isoeugenol residual con un Rf de 1.71, e isoeugenol residual con un Rf de 1.54 lo que indicó probablemente no se transformó por completo el isoeugenol agregado inicialmente (Fig. 34).

En los carriles 9 y 10 corresponden a estándares de isoeugenol así como de su dímero con un valor de Rf de 1.54 y 1.7 respectivamente.

En la Fig.34 donde se tienen los ensayos cualitativos ya descritos, puede observarse que comparando los carriles 2 y 4, los cuales son la misma muestra a diferencia que en el muestra del carril 2 se agregó peróxido. El resultado de esto ocasionó que entre estas dos muestras la mejor fue en la que no se agregó peróxido (carril 4) ya que se pueden observar con mayor claridad la presencia del

isoeugenol residual, lo que indica que una parte del isoeugenol inicial no se transformó.

Entre las muestras del carril 6 y 8, en las que presentan la mismas condiciones que el ensayo anterior a diferencia que en la muestra del carril 6 se agregó peróxido, lo que dio como resultado que entre estas dos muestras el resultado fue mejor con la muestra del carril 8 (sin peróxido) ya que los productos formados se observan con mayor claridad, además de que la presencia de isoeugenol residual es baja debido a que la mancha es pequeña, esto indica que el isoeugenol agregado inicialmente se transformó casi por completo.

La tabla 14 muestra los resultados cuantitativos de los productos en las biotransformaciones del ensayo 5 obtenidos a partir de un método de análisis por HPLC. Estos resultados se obtuvieron a partir de muestras de extractos enzimáticos de células en suspensión sometidos a un estrés del 25% de nitratos en presencia y ausencia de peróxido.

En los carriles 2 y 4 son muestras que no presentaron estrés de nitratos y únicamente la muestra 2 se agregó peróxido en donde puede observarse que el porcentaje de transformación para estas muestras fue de 0.42 y 73 respectivamente, lo que indica que se obtuvo un mejor rendimiento en un 72.6% con respecto al carril 2, es decir que fue mejor el tratamiento de la muestra ya que en ausencia de peróxido hay un mejor rendimiento y lo que se esperaba era que al adicionar peróxido éste, al ser el cofactor de las peroxidasas favoreciera la formación del dímero lo cual no sucedió y esto puede explicarse debido a que posiblemente la cantidad de peróxido agregada fue excesiva lo que ocasionó que

se inhibiera la enzima y la transformación fue casi nula ya que se tiene reportado que a altas concentraciones de isoeugenol disminuyen los rendimientos de la transformación (Takemoto et al, 2002). La cantidad de isoeugenol residual fue en los dos casos pequeña lo que indica que en los dos casos se transformó casi por completo el isoeugenol que se agregó inicialmente, por tanto para la muestra del carril 2 en donde si fue adicionado peróxido el isoeugenol de esta muestra posiblemente se transformó hacia la formación de otros compuestos poliméricos. Sin embargo, la cantidad de vainillina producida para las muestras anteriores fue muy similar a la que indican estas muestras, que la cantidad producida no es significativa respecto a los controles.

En las muestras de los carriles 6 y 8 se tienen extractos enzimáticos de células en suspensión sometidas a un estrés nutritivo al 25% de nitratos en presencia y ausencia de peróxido respectivamente. La muestra del carril 6 fue en la que se adicionó peróxido, en donde puede observarse que el porcentaje de transformación para estas muestras fue de 45.8%, mientras que en ausencia de peróxido fue de 77.4%, lo que corresponde a un 31.6 % de rendimiento. Esta diferencia se puede observar en el tratamiento del carril 8 (tabla 14). Lo que se esperaba era que al adicionar peróxido éste, al ser el cofactor de las peroxidases favoreciera la formación del dímero lo cual no sucedió y esto puede explicarse debido a que posiblemente la cantidad de peróxido agregada fue excesiva lo que ocasionó que se inhibiera la enzima y la transformación fue casi nula, como se mencionó anteriormente (Takemoto et al, 2002). La cantidad de isoeugenol residual fue más pequeña para la muestra en presencia de peróxido (3%), y fue mayor para la muestra en ausencia de peróxido (11%), lo que indica que en la

muestra con peróxido se transformó el isoeugenol casi por completo y posiblemente una parte se llevó hacia la formación de otros compuestos de polimerización y para la muestra con peróxido la mayor parte del isoeugenol se transformó hacia el dímero del isoeugenol. La cantidad de vainillina producida para las muestras anteriores fue muy similar lo que indica que en estas muestras, la cantidad producida no es significativa respecto a los controles.

En resumen los resultados de las biotransformaciones realizadas para este ensayo indican que, la condición utilizada para el carril 8 (Tabla 14) la cual es un estrés nutritivo al 25% de nitratos de un extracto enzimático de células en suspensión de *Bouvardia ternifolia*, la cantidad del dímero fue mayor para el extracto en ausencia de peróxido.

8. Conclusiones

- ✓ Se estableció la línea celular de *Bouvardia ternifolia* en callo y suspensión, a partir de explantes de hojas jóvenes e inflorescencias, sembrados en un medio MS, con 3% de sacarosa; como reguladores de crecimiento el 2,4-D y Cinetina.
- ✓ Se obtuvo un cultivo viable con diferentes características, entre ellas; que es un cultivo friable, con actividad de peroxidasas, además de un gran desarrollo en cuanto a su crecimiento y proliferación.
- ✓ La cinética de crecimiento que se realizó mostró un comportamiento exponencial, obteniendo el doble de biomasa con respecto a la cantidad inicial conservando las características deseables del callo para la transformación
- ✓ Se confirmó por CCF que en los ensayos cualitativos con el cultivo de células de *Bouvardia*, se llevó a cabo la biotransformación hacia la formación de productos.
- ✓ Se demostró que el cultivo de células de *Bouvardia ternifolia*, contiene las enzimas necesarias para la transformación; las cuales poseen la capacidad de producir el dímero del isoeugenol como producto principal de la transformación.
- ✓ Se obtuvieron extractos totales y extractos enzimáticos en callo, suspensión y esta última con y sin estrés nutritivo.
- ✓ Se logró que el cultivo de células de *Bouvardia* llevará a cabo la transformación del isoeugenol a su dímero en extractos totales y extractos enzimáticos con y sin peróxido de hidrógeno.

- ✓ Se analizó y cuantificó el dímero de isoeugenol, vainillina e isoeugenol residual, obteniendo como producto mayoritario de la transformación al dímero del isoeugenol (dehidrodiisoeugenol).
- ✓ Se determinó la estructura del dímero de isoeugenol por espectroscopia de RMN, obteniendo el dehidrodiisoeugenol.
- ✓ En los extractos enzimáticos, los rendimientos de la transformación son mayores en comparación con los extractos totales.
- ✓ Los extractos enzimáticos de las células en suspensión fueron aún mejores, en cuanto al rendimiento de la transformación
- ✓ El estrés nutritivo al 25% de nitratos favoreció la transformación del isoeugenol en los extractos enzimáticos de células en suspensión, incrementando el rendimiento del dímero con respecto al control.
- ✓ El mejor rendimiento del dímero fue de 77.4% en el extracto enzimático de células en suspensión, en condiciones de estrés nutritivo al 25% de nitratos, sin peróxido.

Anexos

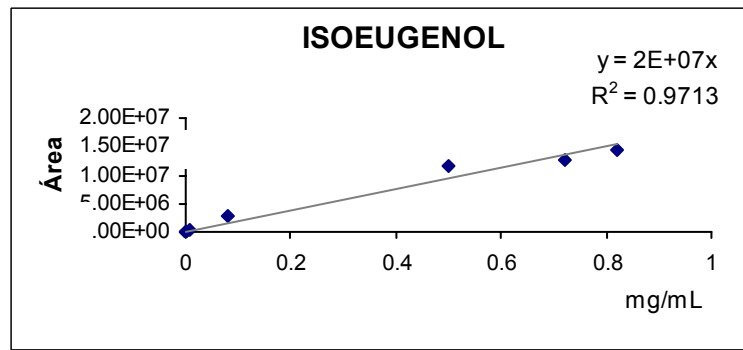
Medio Básico (Murashige & Skoog 1962)

Compuesto	mg/L	PM (g)	mM/L
MACRONUTRIENTES			
KNO ₃	1900	101.108	18.8
NH ₄ NO ₃	1650	80.04	20.6
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	147.02	2.99
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	246.48	1.5
KH ₂ PO ₄	170	136.09	1.25
MICRONUTRIENTES			
MnSO ₄ · H ₂ O	16.9	169.01	0.1
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	287.3	0.029
H ₃ BO ₃	6.2	61.86	0.1
KI	0.83	166.01	4.90E-03
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	249.68	1.00E-04
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	241.95	1.00E-03
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	237.93	1.05E-04
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	237.93	0.1
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.3	372.3	0.1

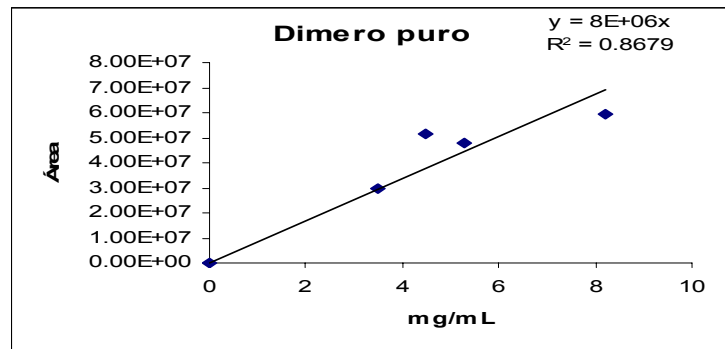
Regulador	Fórmula	PM (g)	mg/L	μM/L
2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	1	4.52

Curvas Patrón

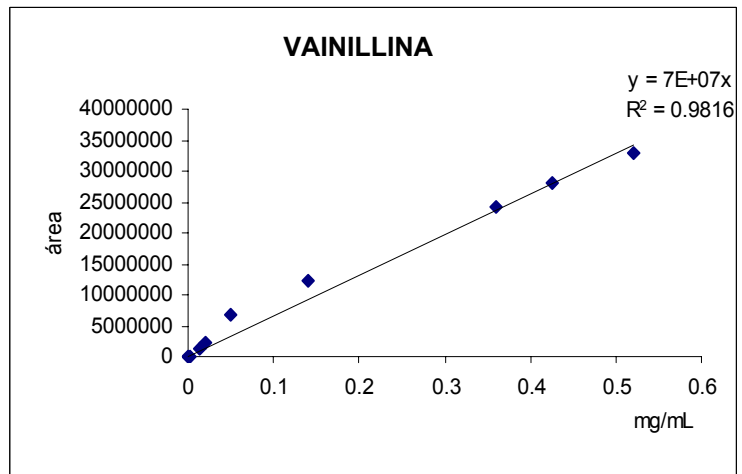
ISOUGENOL	
mg/mL	área
0	0
8.00E-04	2.84E+04
8.00E-03	4.19E+05
8.00E-02	2.64E+06
0.5	1.15E+07
0.72	1.26E+07
8.20E-01	1.46E+07



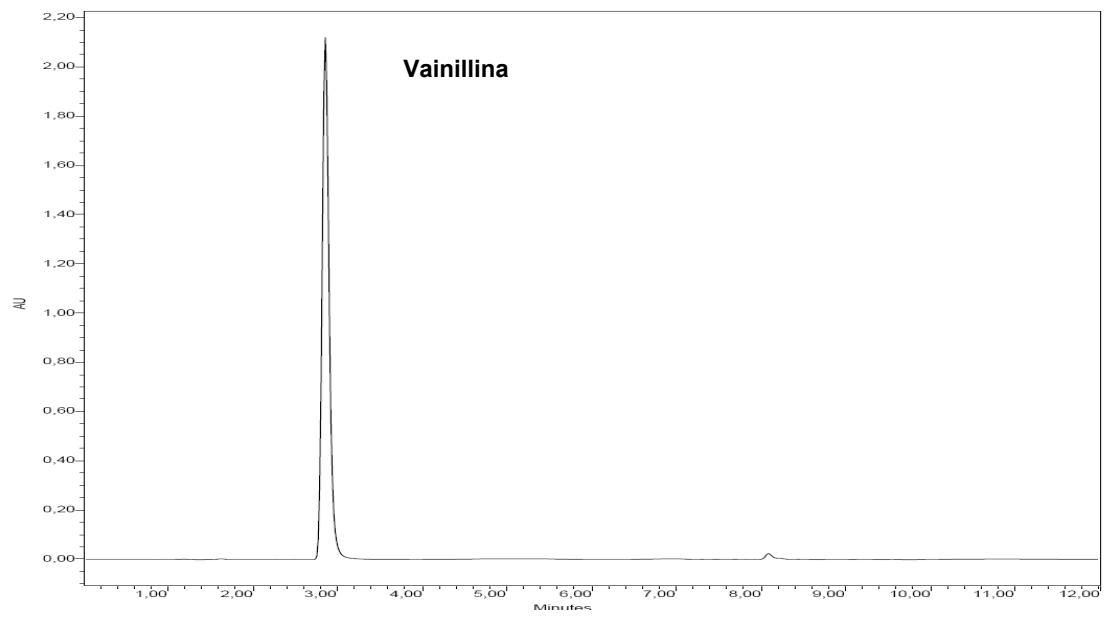
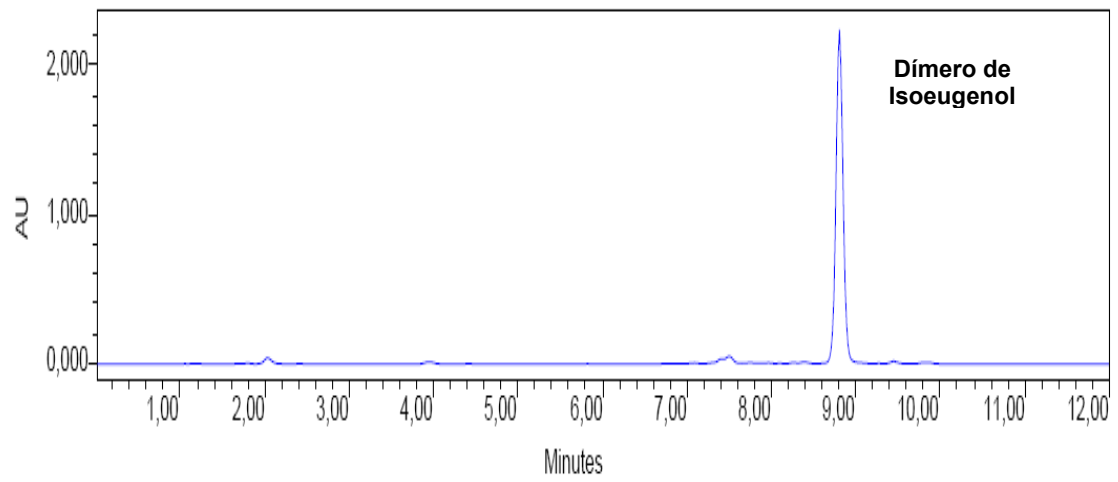
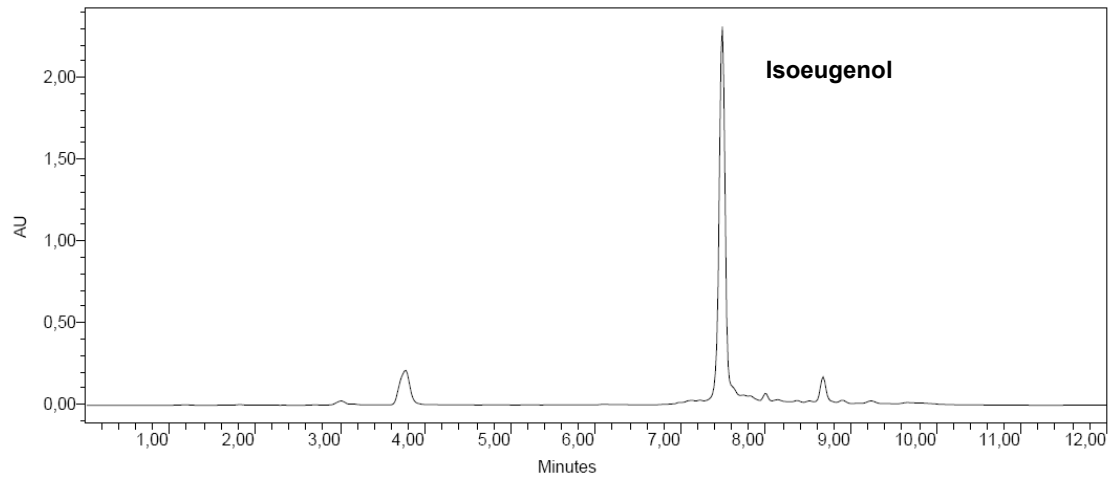
DÍMERO ISOEUGENOL	
mg/mL	área
0	0
3.5	2.96E+07
4.5	5.18E+07
5.3	4.78E+07
8.2	5.93E+07



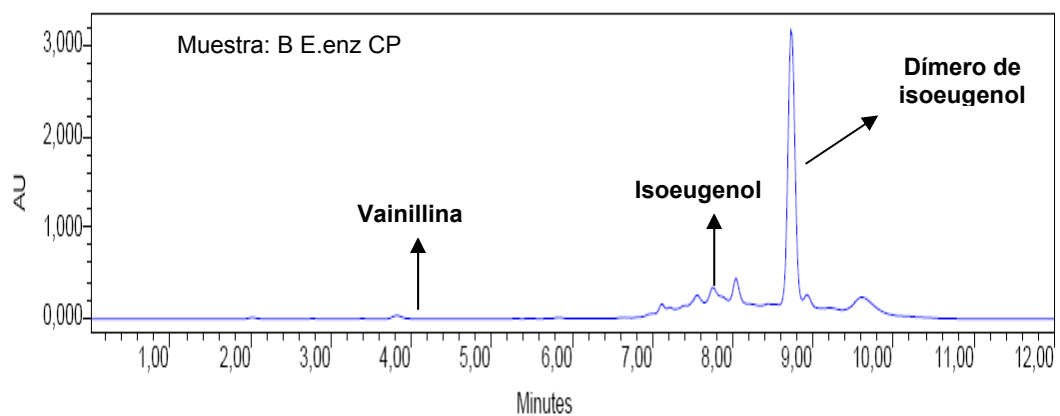
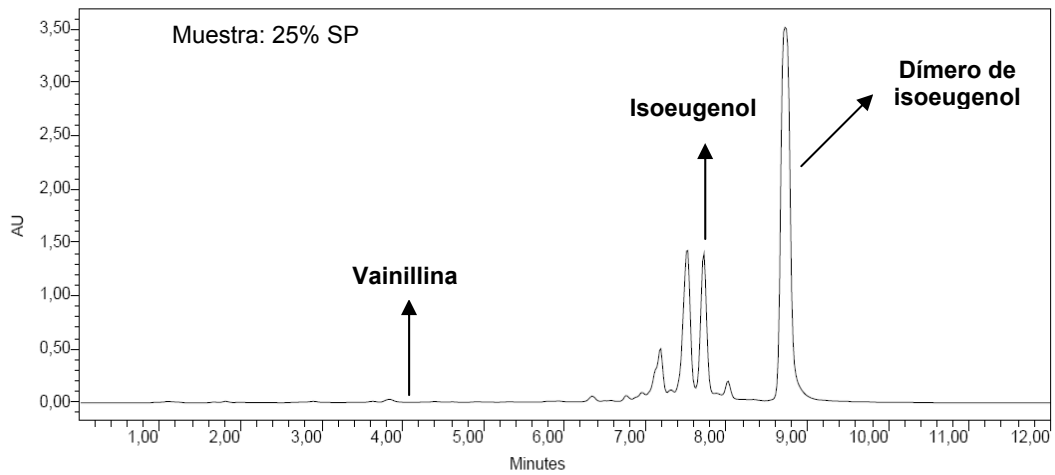
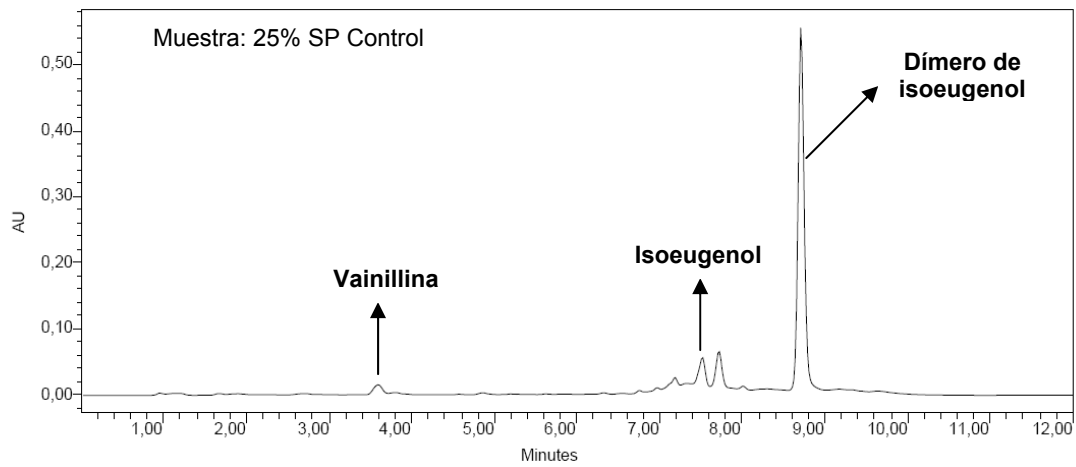
VAINILLINA	
mg/mL	área
1.40E-04	3.53E+04
1.40E-03	1.38E+05
1.40E-02	1.38E+06
2.00E-02	2.41E+06
5.00E-02	6.85E+06
1.40E-01	1.22E+07
3.60E-01	2.41E+07
4.26E-01	2.79E+07
0.52	3.29E+07



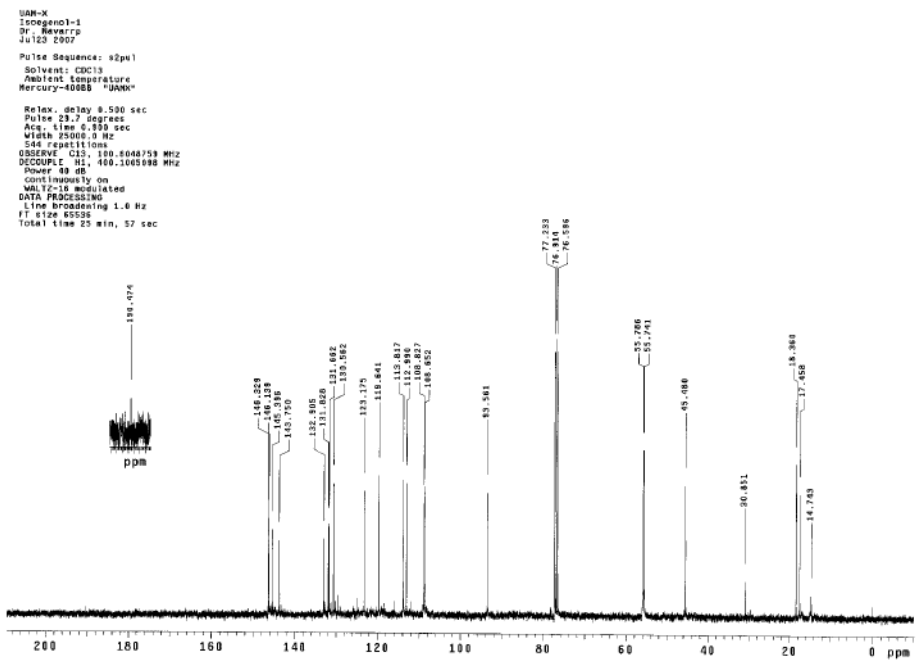
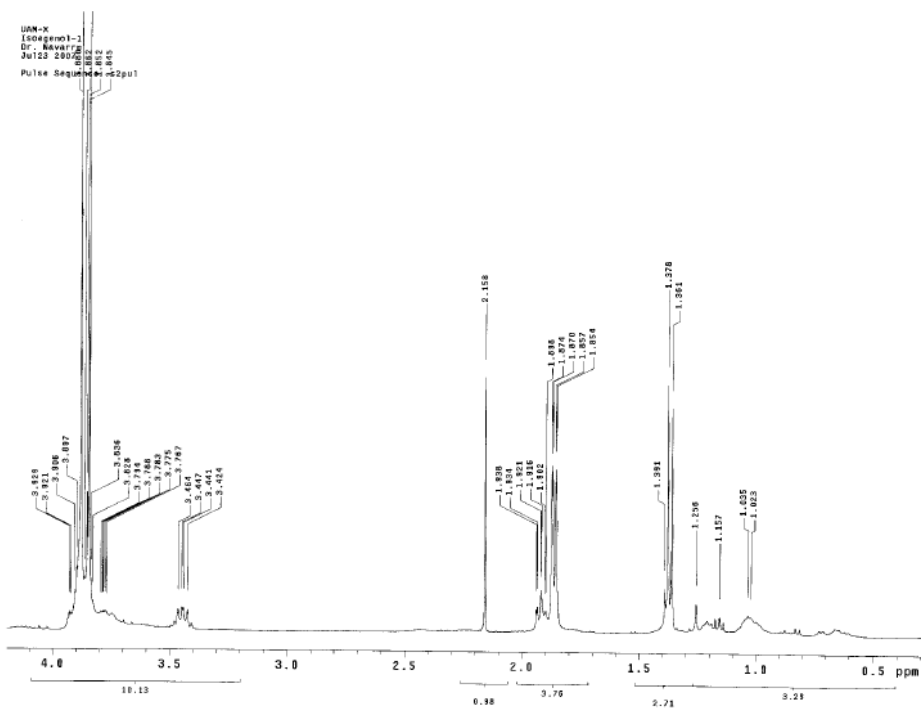
Cromatogramas de estándares

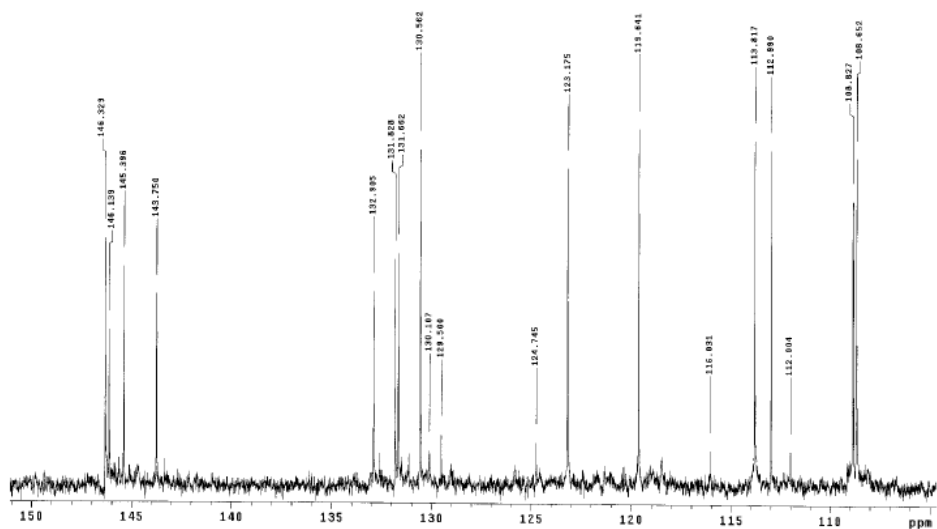


Cromatogramas de muestras de extractos después de la biotransformación

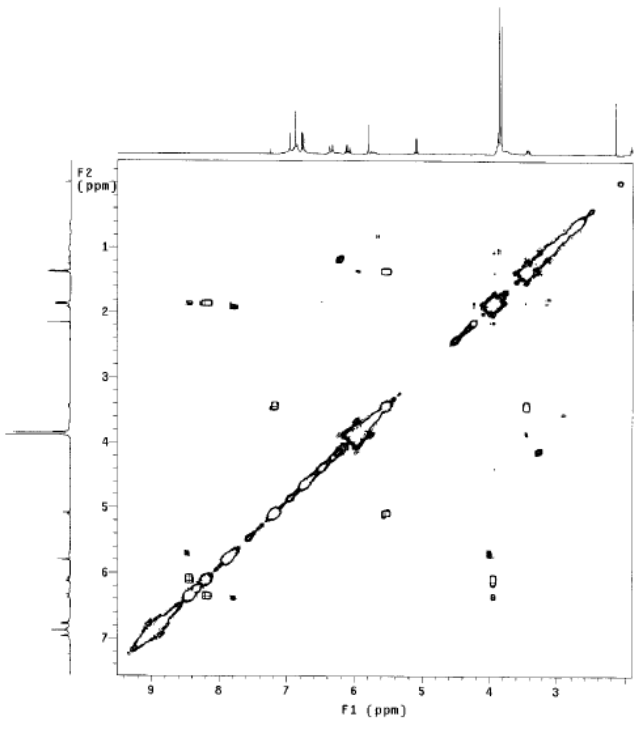


Espéctros RMN del dímero de isoeugenol (dehidrodi-isoeugenol)

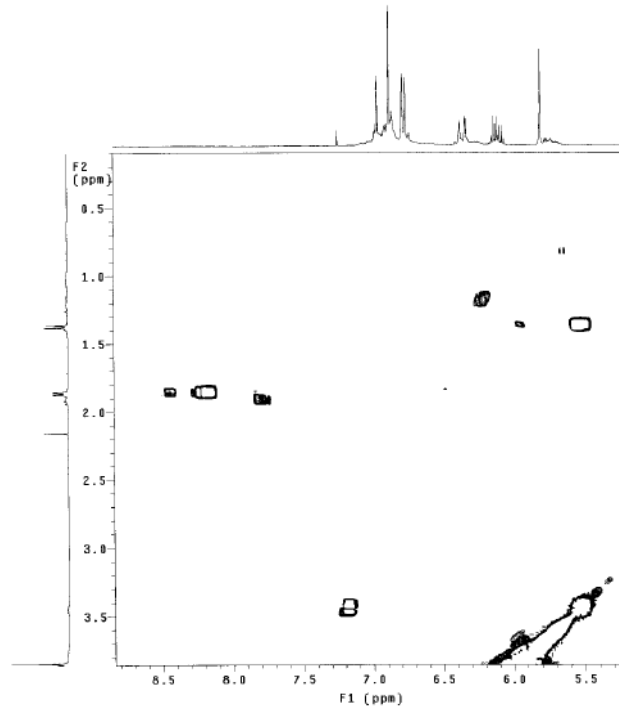




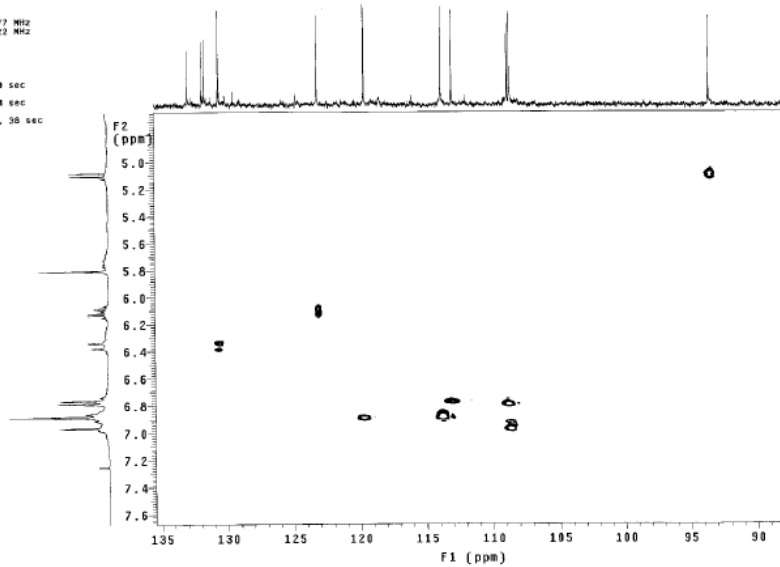
UAM-X
 Isoegenol-1
 Dr. Nawroo
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: CDCl3
 Ambient Temperature
 Mercury-400MS "UAMX"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.170 sec
 Width 5086.0 Hz
 20 Width 6086.0 Hz
 8 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1 400.0965100 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.885 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.021 sec
 FT size 3248 x 2048
 Total time 21 min, 56 sec



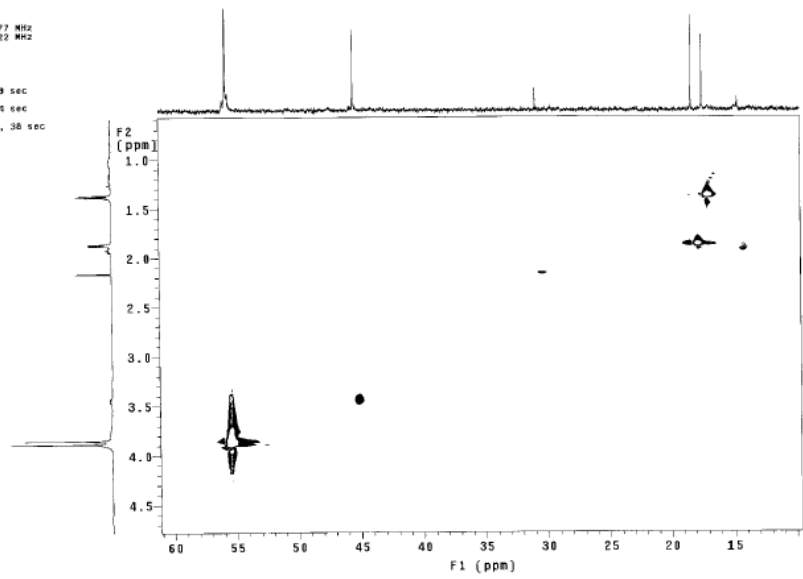
UAM-X
 Isoegenol-1
 Dr. Nawarrp
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-400SB "UAMX"
 Relax delay 1.000 sec
 Acq. time 9.173 sec
 Width 8996.0 Hz
 2D width 8996.0 Hz
 8 repetitions
 128 increments
 OBSERVE F1: 400.0985120 MHz
 DATA PROCESSING
 Size 6411 x 1021 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Size 6411 x 1021 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 21 min, 56 sec



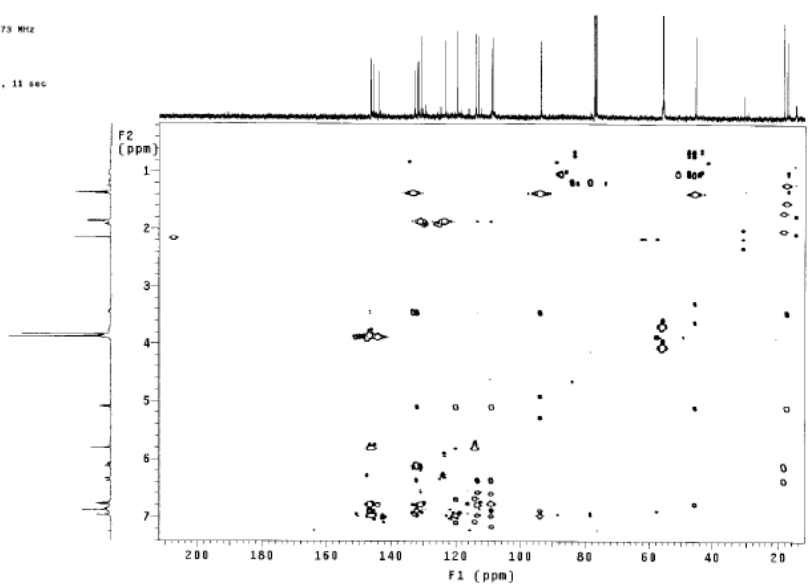
UAM-X
 Isoegenol-1
 Dr. Nawarrp
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gHSQC
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-400SB "UAMX"
 Relax delay 1.000 sec
 Acq. time 9.173 sec
 Width 2770.7 Hz
 2D width 18407.0 Hz
 16 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE F1: 400.0985077 MHz
 DECOUPLE C13: 100.624422 MHz
 Power 14 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.079 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.014 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 1 hr, 27 min, 38 sec



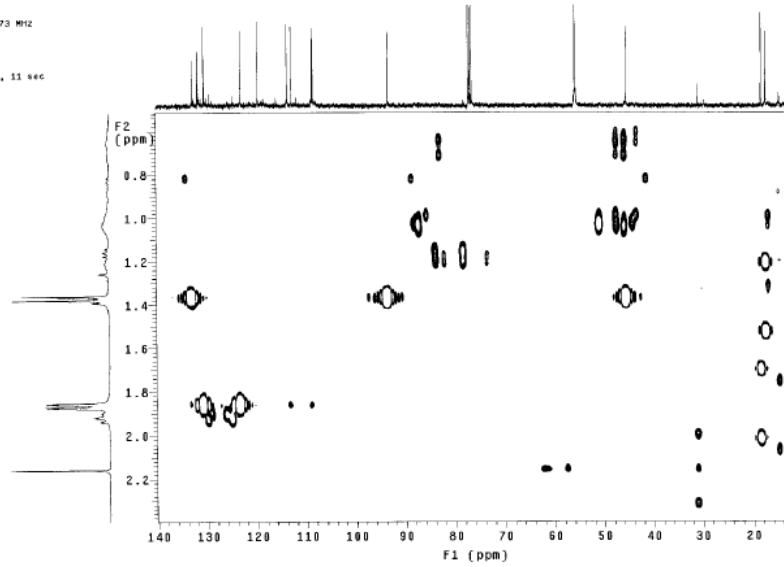
UAM-X
 Isoegemol-1
 Dr. Navarro
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: CDCl3
 Ambient Temperature
 Mercury-400B5 "UAMX"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.171 sec
 Width 3776.7 Hz
 2D width 18567.4 Hz
 18 repetitions
 2 x 320 increments
 OBSERVE F1, 400.0985977 MHz
 FIDUPLES C13, 100.6124422 MHz
 Power 44 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.079 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.014 sec
 F1 size 2048 x 2048
 Total time 1 hr. 27 min. 38 sec



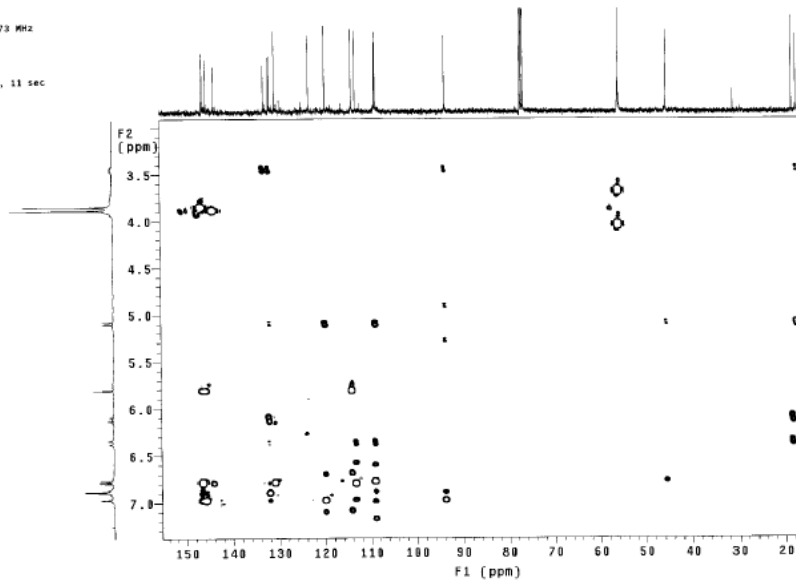
UAM-X
 Isoegemol-1
 Dr. Navarro
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: CDCl3
 Ambient Temperature
 Mercury-400B5 "UAMX"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.138 sec
 Width 3776.7 Hz
 2D width 24154.6 Hz
 18 repetitions
 320 increments
 OBSERVE F1, 400.0985073 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.068 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.008 sec
 F1 size 1024 x 9132
 Total time 2 hr. 16 min. 11 sec



UAM-X
 Isoegenol-1
 Dr. Navarro
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gHMQC
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-400BB "UAMK"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.156 sec
 Width 3770.7 Hz
 ZD Width 24154.6 Hz
 IS repetitions
 400 Increments
 OBSERVE H1 400.0805073 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.008 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.008 sec
 FT size 1024 x 8192
 Total time 2 hr, 16 min, 11 sec



UAM-X
 Isoegenol-1
 Dr. Navarro
 Jul23 2007
 Pulse Sequence: gHMQC
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-400BB "UAMK"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.156 sec
 Width 3770.7 Hz
 ZD Width 24154.6 Hz
 IS repetitions
 400 Increments
 OBSERVE H1 400.0805073 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.008 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.008 sec
 FT size 1024 x 8192
 Total time 2 hr, 16 min, 11 sec



Abreviaturas

HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
kPa	kilo Pascales
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
Pd-C	Paladio-Carbono
C.C.V	Cultivo de Células Vegetales
g	gramos
L	litro
mL	mililitro
μL	microlitro
λ	longitud de onda
t _R	tiempo de retención
h	hora
M	molar
mM	milimolar
mM/L	milimolar sobre litro
mg/L	miligramos sobre litro
μEm ² s ⁻¹	Microeinstein por metro cuadrado sobre segundo (unidad de intensidad lumínica)
rpm	Revoluciones por minuto
R _f	Frente de referencia
pH	potencial de hidrógeno
p.e.	por ejemplo
°C	grados Celsius
cm	centímetro

mm	milímetro
CCF	Cromatografía en capa fina
kg/cm ²	kilogramo sobre centímetro cuadrado
min	minuto
pI	punto isoeléctrico
µm	micrometro
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Vol	volumen

Bibliografía

1. Adam, W.; Hoch, U.; Lazarus, M.; Saha-Moller, C.R.; Schreier, P. **1995**. J. Am. Chem. Soc., 117, 11898-11901.
2. Alatorre, S.S.A. **2001**. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F.
3. Alvarado, Y. **1998**. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. Pp. 81-104.
4. Álvarez, A. **1994**. Cultivo de callos. En: Hurtado, D y M. Merino (Eds.). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México. pp. 93-100.
5. Atsumi, T.; Fujisawa, S.; Tonosaki, K. **2005**. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. Toxicology in Vitro 19, 1025-1033.
6. Aoshima, Y.; Takemoto, M. **2006**. Increase in peroxidase activity in tea callus in response to darkness, 2,4-diclorophenoxyacetic acid and carbohydrates. Plant Biotechnol. 23, 405-408.
7. Barceló, A.; Pomar, F.; **2002**. Plant peroxidases: Versatile catalysts in the synthesis of bioactive natural products. Atta-ur-Rahman (Ed) Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 27 Elsevier Science B.V., 735-791.
8. Barratt, M.D.; Basketter, D.A. **1992**. Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds. (I). Preliminary studies of potential reaction mechanisms. Contact Dermatitis 27, 98-104.

9. Bowers, **1992**. En: Alatorre, S.S.A. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F.
10. Byoung H. **2000**. Fundamentos de Biotecnología de alimentos; Ed. Acribia; España.
11. Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; Bruyne, T.D.; Hermans, N.; Totte, J.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. **2002**. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharm. 79, 213-220.
12. Dausch, A.; Pastore, G. **2005**. Ontencao de Vanilina: Oportunidade Biotecnológica. Quim. Nova. Vol 28, No. 4, 642-645.
13. Dhingra. V. **1982**. En: Alatorre, S.S.A. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F.
14. Dignum, M.J.W.; Kerler, J.; Verpoorte, R. **2001**. Vanilla Production: Technological, Chemical, and Biosynthetic aspects. Foods Reviews International. 17(2), 199-21,
15. Endress R. **1994**. Plant Cell Biotechnology, Springer-Verlag,. Citado en Hernández, T.A.M. Determinación de los metabolitos secundarios producidos por *Psacalium peltatum*.
16. Esau, K. **1985**. Anatomía vegetal. Omega. Barcelona. 779 pp.

17. Faber K, **2000**. En: Alatorre, S.S.A. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F.
18. Faber K. **2000**. Biotransformations. Ed.Springer, Germany.
19. Flores, H.A. **2004**. Establecimiento de cultivo de células en suspensión de Cassia sp. Para su uso como catalizador. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México D.F.
20. Fossard, **1977**. En: R.L.M.Pierik. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, 3ª edición ., España.
21. Frosch, P.J.; Pilz, B.; Andersen, K.E. **1995**. Patch testing with fragrance: results of a multicenter study of the European Environmental and Contact Dermatitis Research Group with 48 frequently used constituents of perfumes. Contact Dermatitis 33, 333-342.
22. Gacesa P, y Hubble J. **1990**. Tecnología de las enzimas. Editorial Acribia, 1ª edición., Zaragoza España. p.p. 1-7.
23. García G.M, Quintero R.R, López-Munguía C.A. **1993**. Biotecnología Alimentaria. Limusa, Noriega Editores, 1ª edición., México. p.p. 460-463.
24. Gaspar. **1982**. En: Alatorre S.S.A. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales.
25. Geng, Z.; Jagannadha Rao.; Bassi, A.S.; Gijzen, M.; Krishnamoorthy, N. **2001**. Investigation of biocatalytic properties of soybean seed hull peroxidase. Catalysis Today 64 233-238.
26. George, E.; P. Sherrington. **1984**. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics Limited. Inglaterra. 709 pp.

27. Giri, A.; Dhingra, V.; Giri, C.C.; Singh, A.; Ward, O.P.; Narazu, M.L. **2001**. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes systems: current trend and future prospects. *Biotechnology Advances* 19 175-199.
28. Gulcin, I.; Ahmet, H.; Cesur, M. **2004**. Determination of *in Vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. *Chem. Pharm. Bull.* 53(3) 281-285.
29. Hamada, H.; Miyamoto, Y.; Nakajima, N.; Furuya, T. **1998**. Highly selective transformation by plant catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5, 187-189
30. Hernández, T.A.M. **1991**. Determinación de los metabolitos secundarios producidos por *Psacalium peltatum*. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F.
31. Hurtado, D. y M. Merino. **1994**. "Cultivo de tejidos vegetales"; Ed. Trillas; México.
32. Intra, A.; Nicotra, S.; Riva, S.; Daniela, B. **2005**. Significant and Unexpected Solvent Influence on the Selectivity of Laccase-Catalyzed Coupling of Tetrahydro-2-naphtol Derivatives. *Adv. Synth. Catal.* 347, 973-977.
33. Ishihara, K.; Hamada, H.; Hirata, T.; Nakajima, N. **2003**. Biotransformation using plant cultured cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23 145-170.
34. Ito M, Murakami K, Yoshino M. **2005**. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology* 43 461-466.

35. Juven, B.J.; Kanner, J.; Schved, F.; Weisslowicz, H. **1994**. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626-631.
36. Khafagi, I.; Dewedar, A.; Amein, M. **2003**. Opportunities of finding novel anti-infective agents from Plant Cell Cultures. *Curr. Med. Chem – Anti-Infective Agents*, 2 191-211.
37. King, L.; Brown, G. **1998**. Biomimetic Synthesis of Illicium Oligomeric Neolignans. *J. Chem. Research (S)*, 476-477.
38. Kishore, D.; Kannan, S. **2004**. Double bond migration of eugenol to isoeugenol over as-synthesized hydrocalcites and their modified forms. *Applied Catalysis A; General* 270, 227-235.
39. Krawczyk, A.; Lipkowska, E.; Wróbel, J.T. **1991**. Horseradish peroxidase-mediated preparation of dimers from eugenol and Isoeugenol. *Collect. Czech. Chem. Commun*, Vol. 56, 1147-1150.
40. Kutney J. **1997**. Plant cell culture and synthetic chemistry routes to clinically important natural products. *Gazzeta Chimica Italiana*, 127 293-303.
41. Lee BH. **1996**. *Fundamentos de biotecnología de los alimentos*. Editorial Acribia, 1ª edición., Zaragoza España. p.p. 389-393.
42. Leuengerger H. **1984**. *Methodology Biotechnology*. Verlag Chemie; 5.
43. Lindsay, K. y M. Jones. **1989**. *Biotecnología vegetal agrícola*. Ed. Acribia. España. 273 pp.
44. Loughlin, W. **2000**. *Biotransformations in Organic Chemistry*. *Bioresource Technology* 74, 49-62.

45. Luckner, M. **1986**. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer, Berlin. En: Endress,R. in Plant Cell Biotechnology.
46. Mastelic, J.; Jekovic, I.; Vincovic, M.; Dzolic, Z.; Vikić-Topić, D. **2004**. Synthesis of selected naturally occurring glucosides of volatile compounds. Their chromatographic and spectroscopic properties. Croat. Chem. Acta 77, 491-500.
47. McDonald. **1973**. En Alatorre, S.S.A. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F.
48. Murakami Y, Shoji M, Hirata A, Tanaka S, Yokoe I, Fujisawa S **2005**. Dehydrodiisoeugenol, and isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa β activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. Biochemistry and Biophysics. 434, 326-332.
49. Murashige, T.; Skoog, F. **1962**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
50. Mustafa, R.; Muniglia, L.; Rovel, B.; Girardin, M. **2005**. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. Food Research International. 38, 995-1000.
51. Nagababu, E.; Lakshmaiah, N. **1992**. Biochem. Pharmacol., 43, 2393-2400.
52. Navarro, S.; Vera, R. **1994**. Historia Del cultivo de tejidos vegetales. "Cultivo de tejidos vegetales". Editado por D. Hurtado y M.E. Merino. Capítulo1, pp.15-34.

53. Ogata, M.; Hoshi, M.; Urano, S.; Endo, T.; **2000**. Antioxidant Activity of Eugenol and related Monomeric and dimeric compounds. Chem. Pharm. Bull. 48 (10), 1467-1469.
54. Orihara, Y.; Furuya, T.; Hashimoto, N.; Deguchi, Y.; Tokoro, K.; Kanisawa, T. **1992**. Biotransformation of isoeugenol and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. Phytochemistry, Vol. 31, No, 3. pp.827-831.
55. Pierik, R.L.M. **1990**. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, 3ª edición ., España.
56. Pomar, F. et al., **1997**. En Alatorre SSA. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México, D.F.
57. Priefert, H.; Babenhorst, J.; Steinbüchel, A. **2001**. Biotechnological production of Vanillin. Appl Microbiol Biotechnol. 56: 296-314.
58. Ramachandra, R.S. and Ravishankar, GA. **2000**. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *J. Sci Food Agric.* 80: 289-304.
59. Ramachandra, R.S. and Ravishankar, GA. **1999**. Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of β -cyclodextrin and fungal elicitor. Process Biochemistry 35, 341-348.
60. Ramos, R.T.M. **2006**. Regeneración de melon (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones in vitro como modelo biológico. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Ciencias, México, D.F.
61. Roberts, S. M. **1999**. Preparative Biotransformations. J. Chem .Soc. 1, 1-21.

62. Sánchez de Jiménez, E. **1985**. En Hernández, TAM. Determinación de los metabolitos secundarios producidos por *Psacalium peltatum*. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Ciencias, México, D.F.
63. Sarkanen, K.V. and Wallis, A.F.A. **1973**. Oxidative dimerizations of (E)- and (Z)- Isoeugenol (2-Methoxy-4-propenylphenol) and (E)- and (Z) – 2,6 – Dimethoxy - 4 – propenylphenol. J.S.S. Perkin I, 1869-1878.
64. Segura, J. **2000**. Citoquininas. En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. España. pp. 343-360.
65. Shimoda K, Kondo Y, Nishida T, Hamada H, Nakajima N, Hamada H. **2006**. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry* xxx, xxx-xxx.
66. Shimoni E, Ravid U, Shoham Y. **2000**. Isolation of *Bacillus* sp. Capable of converting isoeugenol to vanillin. *J Biotechnol*; 78: 1-9. Citado en Li-Qing Zhao in *Process Biochemistry*.
67. Sies, **1991**. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, London.
68. Street, **1973**. Citado en R.L.M.Pierik. Cultivo in vitro de las plantas superiores.
69. Street, HE. **1988**. Citado en Hernández, TAM Determinación de los metabolitos secundarios producidos por *Psacalium peltatum*.
70. Suga and Hirata, **1990**. Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures. *Phytochemistry* 29, 2393-2406.
71. Suzuki, Y. **1985**. Eugenol-mediated superoxide generation and cytotoxicity in guinea pig neutrophils. *Japan Journal of Pharmacology* 39, 381-386.

72. Syono, **1965a, 1965b, 1965c**. Citado en R.L.M.Pierik. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, 3ª edición ., España.
73. Syrjanen K, Brunow G. **1998**. Oxidative cross coupling of p-hydroxycinnamic alcohols with dimeric arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds. The effect of oxidation potentials. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 3425-3429.
74. Takemoto, M.; Aoshima, Y.; Stoynov, N.; Kutney, J.P. et al., **2002**. Establishment of *Camellia sinensis* cell culture with high peroxidase activity and oxidative coupling reaction of dibenzylbutanolides. Tetrahedron Letters. 43, 6915-6917.
75. Takemoto, M.; Suzuki, Y.; Tanaka, K. **2002**. Enantioselective oxidative coupling of 2-naphtol derivatives catalyzed by *Camellia sinensis* cell culture. Thetrahedron Letters. 43, 8499-8901.
76. Thomas y Street, **1970**. Citado en R.L.M.Pierik. Cultivo in vitro de las plantas superiores.
77. Turner, N.J. **1994**. Recent advances in the use of Enzymes-Catalysed Reactions in Organic Síntesis. Nat. Prod. Rep., 11, 1-15.
78. Tzeng, S.; Liu, Y. **2004**. Peroxidase-catalyzed synthesis of neolignan and its anti-inflammatory activity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 32, 7-13.
79. Uribe, L. **1998**. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento in vitro de Ceiba (*Ceiba pentandra*). Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM. 69 pp.

80. Van der Plas L.H.W.; Eijkelboom, C.; Hagendoorn, M.J.M. **1995**. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. Department of Plant Physiology, Agricultural University Wageningen, Arboretumlaan 4, 6703 BD Wageningen, The Netherlands Plant Cell Tissue and Organ Culture 43: 111-116.
81. Van Deurzen, M.P.J.; Rantwijk, F.; Sheldon, R. **1997**. Selective Oxidations Catalyzed by Peroxidases. Tetrahedron Report. Vol. 53, No. 39, 13183-13220.
82. Vazquez, B.I.; Fente, C.; Franco, C.M.; Vazquez, M.J.; Cepeda, A. **2001**. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrium* strains in culture media and cheese. Int. J. Food Microbiol. 67, 157-163.
83. Venturini, M.E.; Blanco, D.; Oria, R. **2002**. *In vitro* antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. J. Food Prot. 65, 834-839.
84. Vitali, A.; Monache, G.; Zappia, G.; Misita, D.; Gacs-Baitz, E.; Botta, B. **1998**. En: Alatorre S.S.A. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales.
85. Walton, N.J.; Mayer, M.J.; Narbad, A. **2003**. Vanillin. Phytochemistry. En prensa.
86. Washisu, Y.; Tetsushi, A.; Hashimoto, N.; Kanisawa, T. **1993**. Manufacture of vanillin and related compounds with *Pseudomonas*. JP52279. En: Li-Qing Zhao in Process Biochemistry.

87. Williamson, G.; Pluma, G.; García-Conesa, M. **1999**. En: Alatorre, SSA. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales.
88. Zhao, L-Q.; Sun, Z.H.; Zheng, P.; He, J,Y. **2006**. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. Process Biochemistry. 41, 1673-1676.

Páginas en red:

- <http://www.healthtoch.com>, www.rxlist.com
- <http://www.micro.magnet.fsu.edu>
- <http://www.departamento.us.es/dbiovege/bioqaplicada/tema1.ppt>
- http://www.unia.es/nuevo_inf_academica/visualizar_file_Adjunto.asp?iD=1597