

6
-ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales " Z A R A G O Z A "

EFFECTO DEL MEDIO NUTRITIVO Y DEL ACIDO INDOL
ACETICO EN UN CULTIVO HIDROPONICO DE
Digitalis Purpurea PARA LA PRODUCCION
DE GLUCOSIDOS CARDIACOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
CONSUELO BAUTISTA ARAGON
NORMA GUADALUPE ESCOBAR VALENCIA

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
A. Antecedentes de <u>Digitalis purpurea</u> .	2
B. Descripción y Localización.	2
C. Glucósidos Cardiacos.	3
1. Estructura.	3
2. Biosíntesis.	3
3. Farmacología.	5
4. Métodos de identificación y cuantificación.	7
a. Identificación.	7
b. Cuantificación.	7
D. Cultivo Hidropónico.	8
1. Antecedentes.	8
2. Nutrición vegetal.	9
3. Ventajas y desventajas.	10
4. Tipos de cultivo hidropónico.	10
E. Cinética de Crecimiento de las Plantas.	11
F. Auxinas.	13
1. Métodos de aplicación de las auxinas en agricultura.	14
2. Persistencia del AIA en la plantas.	15
G. Crecimiento de Digitalis y Producción de Cardiotónicos.	15
H. Cultivo de Digitalis "In vitro".	17

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV.	OBJETIVOS	19
V.	HIPOTESIS	19
VI.	MATERIALES Y METODOS	20
	A. Material.	20
	B. Material Biológico.	20
	C. Reactivos.	20
	D. Equipo.	21
	E. Diagrama General de Trabajo.	22
	F. Métodos.	23
	1. Tratamiento previo de los elementos de las camas de cultivo.	23
	2. Preparación de los medios nutritivos.	
	a. Medio Hoagland.	23
	b. Medio Schenk-Hildebrant.	23
	c. Medio Schenk-Hildebrant-Modificado.	24
	d. Esterilización de los medios nutritivos.	24
	3. Siembra.	24
	a. Desinfestación de las semillas.	24
	b. Preparación de las camas de cultivo.	26
	c. Colocación de las semillas en las camas de cultivo.	26
	4. Riego.	26
	5. Aplicación del Acido Indol Acético.	26
	a. Preparación de la solución madre.	26
	b. Aplicación a las camas de cultivo.	26
	6. Cosechas.	27
	7. Extracción de cardiotónicos totales.	27
	8. Cuantificación de cardiotónicos totales, por el método colorimétrico del picrato alcalino.	28

VII. RESULTADOS Y DISCUSION	30
A. Plantas Cultivadas en los Medios Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant-Modificado.	30
1. Crecimiento de la planta.	30
2. Coeficiente de Area Foliar.	37
3. Contenido de Cardiotónicos Totales.	37
B. Plantas Cultivadas en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de AIA.	44
1. Crecimiento de la planta.	44
2. Coeficiente de Area Foliar.	44
3. Contenido de Cardiotónicos Totales.	49
VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.	55
BIBLIOGRAFIA	56

INDICE DE TABLAS

	Página
1. Composición de los medios nutritivos.	25
2. Cantidad de iones contenidos en cada medio.	36
3. Coeficiente de Área foliar (CAF). Medios H-0, SH y SHM.	38
4. Contenido máximo de glucósidos cardíacos. Medios H-0, SH y SHM.	43
5. Coeficiente de área foliar (CAF). Medios H-0, H-1, H-2 y H-3.	49
6. Contenido máximo de glucósidos cardíacos. Medios H-0, H-1, H-2 y H-3.	54

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estructura base de los cardiotónicos en <u>D. purpurea</u> .	4
2. Posibles rutas biosintéticas para la producción de cardenólidos en <u>D. lanata</u> (tomado de Nánasi).	6
3. Crecimiento característico de las plantas.	12
4. Estructura del Acido Indol Acético.	14
5. Curva estándar Digoxina + Digitoxina.	29
6. Curvas de peso seco de <u>D. purpurea</u> cultivada en los medios Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant Modificado.	31
7. Curvas del ln de peso seco de <u>D. purpurea</u> cultivada en los medios Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant-Modificado.	33
8. Curvas del área foliar de <u>D. purpurea</u> cultivada en los medios Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant Modificado.	34
9. Curvas del ln de área foliar de <u>D. purpurea</u> cultivada en los medios Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant Modificado.	35
10. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de <u>D. purpurea</u> , cultivada en el medio Hoagland.	39
11. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de <u>D. purpurea</u> , cultivada en el medio Schenk-Hildebrant.	40
12. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de <u>D. purpurea</u> , cultivada en el medio Schenk-Hildebrant-Modificado.	41
13. Curvas de peso seco de <u>D. purpurea</u> cultivada en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de ácido indol acético AIA: testigo H-0, 1ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3.	45

14. Curvas del ln de peso seco de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de ácido indol acético: Testigo H-0, 1ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3. 46
15. Curvas del área foliar de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de ácido indol acético: Testigo H-0, 1 ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3. 47
16. Curvas del ln de área foliar de *D. purpurea*, cultivada en medio Hoagland con diferentes concentraciones de ácido indol acético: Testigo H-0, 1 ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3. 48
17. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con 1 ppm de ácido indol acético. 50
18. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con 10 ppm de ácido indol acético. 51
19. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con 100 ppm de ácido indol acético. 52

I. INTRODUCCION

En los últimos años, los países desarrollados han dado gran importancia a la producción de plantas a través de sistemas de cultivo hidropónico, debido a las ventajas que ofrece respecto al cultivo tradicional en tierra.

Entre ellas está la posibilidad de cultivar casi todo tipo de plantas en regiones con cualquier tipo de clima; mantener el contenido de nutrientes homogéneo; probar y reajustar las sustancias nutritivas de acuerdo a los requerimientos del productor; el medio nutritivo y el soporte se pueden esterilizar, evitándose la contaminación y enfermedades de las plantas; utilizar menos agua, etc. Además resulta ser un gran instrumento de investigación para estudiar los factores ambientales y nutricionales que afectan la producción de los principios activos.

Hasta la fecha las plantas son una fuente insustituible de los principios activos y de las materias primas para la elaboración de medicamentos, entre las cuales cabe destacar el género Digitális, de donde se obtienen los fármacos llamados glucosidos cardíacos o cardiotónicos, los cuales tienen una acción poderosa sobre el miocardio de inigualado valor para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Se usan casi exclusivamente con dos fines: para restablecer una circulación adecuada en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, o para disminuir la frecuencia ventricular en pacientes con fibrilación o aleteo auricular.

El hecho de importar este tipo de principios activos así como el de contar en nuestro país con plantas de la especie Digitális purpurea, nos permite considerar la importancia de cultivar esta especie bajo condiciones controladas, para su posible explotación.

En el presente trabajo se ha desarrollado el estudio básico del comportamiento de Digitális purpurea en cultivo hidropónico con el fin de determinar el crecimiento óptimo para la producción de principios activos, así como el efecto de una fitohormona como el ácido indol acético (AIA) sobre el contenido de estos.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. Antecedentes de Digitalis purpurea.

La primera descripción académica de la Digitalis fue publicada en 1542 por Leonhard Fuchs, desconociendo aún las virtudes medicinales de esta (36). Hacia 1650 aparece en la London Pharmacopeia e incrementa su popularidad en 1775 con los trabajos del Dr. William Withering quien editó su monografía en base a investigaciones clínicas (15). Schieman en 1780 y John Ferrier en 1799 hicieron estudios sobre su efecto terapéutico mediante experimentos efectuados en gatos, mostrando una acción retardante sobre el corazón (24, 33). La purificación de los extractos galénicos fue efectuada hasta 1844 por Homolle y Quevenne, debido a los problemas de pérdida de actividad cardiotónica; finalmente en 1869 Nativelle logró purificar y cristalizar muestras de digitalina, poniendo de manifiesto su naturaleza glucosídica.

B. Descripción y Localización.

La Digitalis purpurea comúnmente llamada Digital, pertenece al género Digitalis de la familia Escrofulariaceae. Es una planta herbácea bional o perenne, la cual durante el primer año forma un rosetón de hojas al ras del suelo y en el segundo desarrolla un tallo florífero que puede alcanzar de 1 a 1.5 metros de altura. Las hojas tienen forma variable; las de la base son lanceoladas y pubescentes, mientras que las del tallo son ovales y oblongas de 10 a 35 cm de longitud y de 4 a 11 cm de ancho, el ápice obtuso o redondeado y abruptamente contraídas hacia el peciolo, la orilla dentada o crenada y nervación reticular (11, 15, 36); su olor es débil y su sabor amargo y acre (35). Las flores se agrupan en la sumidad del tallo; tienen forma de dedo de guante, de tres a cinco cm; son colgantes de color púrpura con manchas blancas y rojas en su interior. El fruto es una cápsula ovoide de dos cavidades y contiene numerosas y diminutas semillas (15, 35). Florece de abril a septiembre.

Esta planta es nativa de Europa Central y Sur, naturalizada en varias partes de Europa, así como en el Norte y Oeste de Estados Unidos y Canadá. Su cultivo comercial se ha extendido a Inglaterra, Estados Unidos, Holanda, Canadá e India (6, 36, 41). Las características comunes de estas regiones son los bosques aclarados con clima atlántico, suelos silíceos o descalcificados y elevada humedad en el aire (15, 41).

En México la Digital fue introducida como planta de ornato, y las pequeñas poblaciones formadas han sido el resultado de indi-

viduos escapados de control. Actualmente se localizan poblaciones de Digitalis purpurea, distribuidas en los Estados de Hidalgo, Puebla, Distrito Federal, Guerrero y Chiapas, donde crecen en comunidades de bosques de pino, bosque mesófilo de montaña y en zonas de cultivo de maíz, cuya vegetación primaria corresponde a las comunidades anteriores.

C. Glucósidos Cardiacos.

Los glucósidos cardiacos son producto del metabolismo secundario de la planta y se localizan principalmente en las hojas. El contenido de cardiotónicos totales varía de 0.15 a 0.4 %, de los cuales los glucósidos primarios, púrpuros glucósido A y B, representan el 60 % de la mezcla, digitoxina el 12 %, gitoxina y gitaloxina un 10 % cada uno; la digitoxina y gitoxina se forman de la desglucosilación de los glucósidos primarios (38).

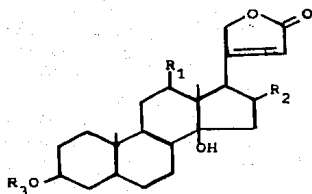
1. Estructura.

La fórmula estructural de los glucósidos cardiacos de la Digital se muestra en la figura 1. (36).

Los cardenólidos son mezclas de cicloacetales de azúcares y alcohol esteroideal. La porción de la molécula sin el azúcar es llamada aglicona o genina. Todas las geninas de los glucósidos cardioactivos tienen grupos hidroxilo unidos a C-3 y C-14, grupos metilo en C-10 y C-13; un anillo lactona de 5 miembros (cardenólido) en C-17. El núcleo esteroideal de los glucósidos cardiacos difiere del esteroide perteneciente a hormonas sexuales, en la fusión CIS/TRANS/CIS de los anillos A/B, B/C y C/D respectivamente, (en las hormonas sexuales el arreglo es CIS/TRANS/TRANS). Todos los sustituyentes sobre el anillo esteroideal están en configuración β (8, 19).

2. Biosíntesis.

La biosíntesis de digitoxigenina ha sido recientemente estudiada en D. purpurea y se ha establecido que el núcleo esteroideal se origina a partir del ácido mevalónico vía escualeno, dicho ácido se obtiene a su vez de acetilcoenzima A, la cual puede ser obtenida por varias rutas metabólicas. Así mismo, se ha confirmado que al alimentar plantas de D. purpurea con ácido mevalónico- $^3\text{-}^{14}\text{C}$, se logra aislar e identificar a la digitoxigenina marcada en C-20. Tschesche y colaboradores, encontraron que los esteroides C-21 con un grupo ceto en C-20 son precursores específicos de cardenólidos en plantas (5).



	R ₁	R ₂	R ₃
Purpurea glucósido A	H	H	(digitoxosa) ₃ -glucosa
Purpurea glucósido B	H	OH	(digitoxosa) ₃ -glucosa
Glucogitaloxina	H	OCHO	(digitoxosa) ₃ -glucosa
Digitoxina	H	H	(digitoxosa) ₃
Gitoxina	H	OH	(digitoxosa) ₃
Gitaloxina	H	OCHO	(digitoxosa) ₃
Gitalina	H	OH	(digitoxosa) ₃
Digitoxigenina	H	H	H
Gitoxigenina	H	OH	H
Gitaloxigenina	H	OCHO	H

Fig. 1. Estructura base de los cardiotónicos en D. purpurea.

También ha sido propuesta la ruta biosintética mostrada en la fig. 2, para la formación de digitoxigenina, gitoxigenina y digoxigenina en D. lanata (28).

Los resultados obtenidos hasta ahora han indicado que principalmente la pregnenolona y la progesterona así como el 5 β -pregnan-3,20-diona; pregnan-3 β -ol-20-ona; pregnan-3 β ,14 β -diol-20-ona; pregnan-3 β ,14 β ,21-triol-20-ona; marcados, han sido incorporados a cardenólidos, comprobando así su participación en la ruta biosintética (10, 20, 23, 26).

El anillo de lactona característico de los cardenólidos se origina de una unidad de acetato, como se demostró al alimentar la planta con acetato-1- 14 C, el cual originó la digitoxigenina marcada en C-20 y C-23. La existencia de un camino alternativo, vía derivados del ácido norcolanoico para la biosíntesis de la lactona de los cardenólidos, ha sido confirmada (10, 26).

Los estudios de biogénesis referidos a la cadena lateral indican que la glucosa es el precursor más eficaz de la digitoxosa (26).

3. Farmacología.

La principal propiedad farmacodinámica de los glucosidos cardíacos es su capacidad de aumentar la fuerza de contracción del miocardio (efecto inotrópico positivo), la segunda propiedad importante de estos fármacos es que pueden disminuir la frecuencia ventricular. Por ello, están indicados para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y la fibrilación o aleteo auricular principalmente; siendo la digoxina y digitoxina los cardiotónicos de mayor uso actual. Los mecanismos responsables de estos efectos son complejos, varios autores coinciden en que el efecto inotrópico positivo se debe a la inhibición de la Adenosin trifosfatasa ligada a la membrana, activada por Na $^{+}$ y K $^{+}$; incrementándose la captación de Ca $^{2+}$ por las fibras cardíacas y aumentando en consecuencia la contractilidad. Sin embargo publicaciones más recientes mencionan que la inhibición de la ATP asa-Na $^{+}$ K $^{+}$ por los digitales es responsable del efecto tóxico pero no del inotrópico.

Por otra parte su actividad farmacológica reside en las glicinas, sin embargo, los azúcares modifican la hidrófilia y liposolubilidad e incrementan el poder de fijación al músculo cardíaco.

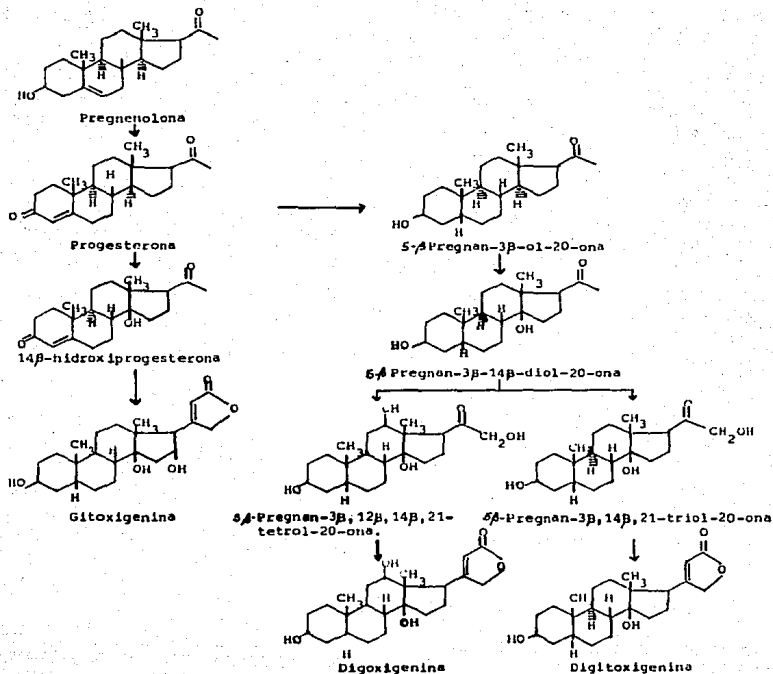


Fig. 2 Posibles rutas biosintéticas para la producción de cardenólidos en *Beta lappaceo* (tomado de Nájera [28]).

Se ha intentado determinar qué elementos estructurales son absolutamente indispensables para una respuesta inotrópica y cuales intensifican el efecto tóxico, pretendiendo de esta manera conocer algunas propiedades de los receptores de estos fármacos (17, 18, 19).

Tamm y Chem propusieron que los glucósidos cardiacos deberían poseer ciertas características en su estructura química, para presentar actividad cardiotónica, entre ellas: un esqueleto esteroideal en el cual los anillos A/B están unidos en configuración cis, B/C en trans y C/D en cis; una lactona insaturada en posición 17 con orientación β y un grupo funcional oxigenado en orientación β en el C-3 (grupo hidroxilo o unión glucosídica). Investigaciones recientes muestran que de estos postulados sólo aquellos concernientes a la configuración 17 β de la cadena lateral y a la configuración cis de los anillos C/D son aun válidos (19).

4. Métodos de identificación y cuantificación de cardiotónicos.

a. Identificación.

La reactividad que presentan los glucósidos cardiacos y sus geninas desde el punto de vista químico, es la base de numerosas reacciones de color desarrolladas para su identificación (36). Los reactivos empleados en la detección de glucósidos pueden ser divididos en:

- 1) Reactivos basados en la reactividad del anillo butenólido de los cardenólidos, por ejemplo el ácido 3,5 dinitrobenzoico en medio alcalino dá color rojo a violeta con los cardenólidos, esta reacción depende del grupo metileno activado del anillo butenólido.
- 2) Reactivos que atacan el núcleo esteroideal, por ejemplo la cloramina-T-ácido tricloroacético en presencia de glucósidos y geninas con una función en C-16 dá los derivados 14,16 di-anhidro con intensa fluorescencia azul en luz ultravioleta (365 nm).
- 3) Reactivos que reaccionan con la parte carbohidrato, por ejemplo el Xanhidrol que reacciona con los 2-deoxiazucáres dando un color rojo carmin.

b. Cuantificación.

Actualmente existen una serie de técnicas con alto poder re-

solutivo que van desde la polarografía, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos a alta presión, hasta radioinmunoanálisis. Sin embargo, es importante señalar el uso de técnicas colorimétricas, debido a su simplicidad de manipulación y mínimos requerimientos de equipo. La cuantificación colorimétrica de los glucósidos cardíacos se basa en las reacciones coloridas de la genina, que de acuerdo a Frerejaque y Graeve se clasifican en reacciones en medio ácido y en medio básico (36).

Las reacciones en medio ácido son específicas para el anillo esteroidal de la genina, siendo el reactivo principal el ácido sulfúrico.

Las reacciones coloridas en medio básico son específicas para la lactona $\alpha:\beta$ -insaturada, debido a que el metileno activo en dicho medio forma complejos de Meisenheimer en presencia de un compuesto nitroaromático según las investigaciones de Kovar y colaboradores. Entre los compuestos nitroaromáticos más empleados está el ácido picrico cuya reacción fue descrita por Baljet en 1918. Esta técnica ha sido objeto de diversos estudios y en la actualidad aparece como el método oficial para la cuantificación de digitoxina en diversas Farmacopeas (36).

D. Cultivo Hidroponico.

En la agricultura comercial moderna se ha desarrollado una técnica de cultivo llamada "Hidroponia", que ha experimentado un gran auge en los países desarrollados. La hidroponia es un método para cultivar plantas sin tierra, utilizando solo un medio de sosten inerte para las raíces, a través del cual se irriga una solución que contiene los elementos minerales esenciales para su crecimiento. Con esta técnica se pueden cultivar casi todos los tipos de plantas, como las medicinales, que requieren de condiciones climáticas y edáficas muy especiales, algunas de éstas pueden ser proporcionadas por un sistema de producción hidropónico (30, 32).

Otros términos que se han usado para nombrar a este proceso son: "cultivo sin suelo", "nutricultura", "agricultura en charolas", "cultivos artificiales", etc. (22, 32).

1. Antecedentes.

El desarrollo de la técnica del cultivo, comenzó hace tres siglos, utilizando solamente agua, y a mediados del siglo XIX los botánicos y químicos establecieron que las plantas están constituidas de elementos químicos obtenidos de tres fuentes: aire, agua y suelo, y por la combinación de estos las plantas

crecen e incrementan su tamaño. Al químico francés Jean Boussingault (1851-1856) se le adjudica el crédito de ser el iniciador de la experimentación en este campo; es considerado como el fundador de los métodos modernos para la experimentación vegetal. Ya que desde antes de 1840 uso suelos artificiales (arena, cuarzo y carbón) regados con soluciones de composición conocida: sus resultados verificaron la teoría de la nutrición mineral de las plantas por Liebig (1840). Este método fue utilizado después por muchos otros investigadores como Salm-Hortman (1856-1860), hasta idear técnicas a gran escala en camas de arena con propósitos experimentales y comerciales (22, 32).

2. Nutrición vegetal.

Después de sucesivos cultivos en medio artificial Sachs y Knop en 1960, publicaron las primeras soluciones nutritivas para el cultivo en agua, que fueron ampliamente usadas en estudios de la nutrición de las plantas. Otras formulas fueron propuestas por Tollens (1882), Schimper (1890), Pfeffer (1900), Cronq (1902), Tottingham (1914), Shisel (1915), Hoagland (1920) y otros. Por más de tres décadas el uso de la técnica hidroponica se condujo a investigaciones de los problemas en la nutrición de las plantas, pero el Dr. Gericke W. (1929) concibió la idea de que el método podría ser empleado y adaptado para uso comercial, procediendo a idear las técnicas especiales para este propósito (22, 32).

Cerca del 90% de la materia seca de la mayoría de las plantas esta constituida de tres elementos: carbono, hidrogeno y oxígeno, que están disponibles en el aire y el agua; además de éstos, las plantas contienen otros elementos que son obtenidos del suelo: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y magnesio; son requeridos en cantidades relativamente grandes, por lo que se llaman "macronutrientes". El hierro, manganeso, boro, cobre, zinc, molibdeno y cloruro se requieren en pequeñas cantidades y son llamados "micronutrientes". Otros elementos son requeridos por algunas especies pero no por otras (8, 22).

Las concentraciones de los elementos en la solución nutritiva cambian en función de muchos factores tales como la estación del año, la edad de la planta, el tipo de planta, la luminosidad, la parte de la planta que se recolecta, etc. En general existe una concentración mínima, máxima y óptima que según sus autores, aseguran el crecimiento satisfactorio de las plantas (28). No existe una solución nutritiva que sea superior a otra solución. Varias soluciones pueden ser usadas con buenos resultados. La solución nutritiva de Hoagland (ver tabla 1) ha sido satisfactoria con varias especies de plantas, por lo que ha sido ampliamente usada.

3. Ventajas y desventajas.

Con el sistema de cultivo hidropónico se pueden optimizar las funciones que el suelo desempeña, tratando de proporcionar a las plantas las condiciones (fundamentalmente edáficas) óptimas para superar su calidad. Las principales ventajas que ofrece un cultivo hidropónico respecto al tradicional son: abre la posibilidad de cultivar casi todo tipo de plantas en regiones con cualquier tipo de clima; el contenido de nutrientes se mantiene homogéneo, teniéndose la posibilidad de probar y reajustar sustancias nutritivas de acuerdo a las especies de plantas y a los requerimientos del productor; el medio nutritivo y de soporte se pueden esterilizar, evitándose algunas enfermedades de las plantas; se utiliza menos agua; es de fácil manejo, evita las labores del cultivo en suelo que son pesadas (preparación del terreno, abonado, deshierbes, etc.); uso mínimo de herbicidas, plaguicidas, pesticidas, etc.; requiere de pocas horas hombre de trabajo. Otra ventaja del cultivo hidropónico es su capacidad para soportar una gran densidad de plantas en un mínimo de espacio, incrementándose la producción. La desventaja más importante es la gran inversión económica que se requiere inicialmente, pero esto puede ser redituable después de un tiempo (2, 30, 32).

4. Tipos de cultivo hidropónico.

Existen una gran cantidad de métodos diferentes para realizar un cultivo hidropónico, Sánchez y Escalante de acuerdo con otros autores agrupan los métodos en cuatro tipos: cultivo en solución nutritiva, cultivo en agregado, cultivo en grava y técnicas miceláneas diversas. Estos métodos van desde arreglos caseros muy sencillos en tinas de materiales inertes, hasta grandes diseños complejos y sofisticados en invernaderos para cultivos comerciales o a gran escala. Todos los cultivos hidropónicos de cualquier tipo, necesitan básicamente de una solución nutritiva, tinas o macetas (de concreto hasta cartón asfaltado), soporte (arena, grava, carbón, etc.) y sistemas de riego y drenaje que van desde inundación y vertido, hasta sistemas complejos de acuerdo al diseño de la producción.

En México, se han realizado algunas investigaciones sobre cultivos hidropónicos y se han hecho intentos por comercializar la técnica, como en otros países donde existen grandes complejos comerciales hidropónicos para la producción de hortalizas. Los sistemas de cultivo artificiales, combinados con condiciones de invernadero, pueden ser creados para proporcionar la demanda fisiológica de las diferentes especies de plantas, con el objetivo de optimizar la producción tanto primaria como secundaria (30).

E. Cinética de crecimiento de las plantas.

El desarrollo de la planta involucra crecimiento y diferenciación. El término crecimiento se aplica a los cambios cuantitativos que ocurren durante el desarrollo y pueden definirse como un cambio irreversible en el tamaño o talla de la célula, órgano y organismos completos. La forma externa de un órgano es primeramente el resultado de un crecimiento diferencial a través de ciertos ejes, apareciendo diferencias cualitativas entre las células, tejidos y órganos, a lo cual se le aplica el término diferenciación.

Puesto que el crecimiento involucra esencialmente incremento en el número de células, se puede usar este criterio como una medida del crecimiento. Este incremento en el número de células, que está acompañado por crecimiento celular, conduce a un incremento en el tamaño o la longitud sobre un intervalo de tiempo (39).

Dos tipos de mediciones son necesarios para el análisis de crecimiento:

- 1) El peso de la planta. Usualmente el peso seco (Kg), pero puede ser la materia orgánica o el contenido de energía calorífica.
- 2) El tamaño del sistema asimilatorio. Este es usualmente el área foliar, pero puede ser la proteína de la hoja o el contenido de clorofila (12).

La curva de crecimiento de tipo sigmoideo que presentan las colonias de los organismos unicelulares es característica también del crecimiento de las plantas fig.3, al menos durante la fase exponencial. V.H. Blackman (1919) indica que durante esta fase inicial de crecimiento las plántulas siguen la "ley del interés compuesto". La cual establece que si la tasa de asimilación por unidad de área de la superficie de la hoja y la tasa de respiración permanecen constantes, y el tamaño del sistema de la hoja sostiene una relación constante a el peso seco de la planta completa, entonces la tasa de producción del nuevo material, medido como el peso seco, seguirá la ley del interés compuesto (12). Este postulado ha sido la base para el desarrollo de las técnicas del análisis del crecimiento de las plantas, y esta dado por la ecuación:

$$W = W_0 e^{rt}$$

que linealizada se tiene:

$$\ln W = \ln W_0 + rt;$$

donde W es el peso de la planta al tiempo t , W_0 es el peso inicial de la planta, r es el porcentaje o tasa proporcional de incremento. Si se grafica \ln del peso contra el tiempo debe obtenerse una línea recta, (por lo menos para la fase inicial del crecimiento que es la que se considera).

La proporción de incremento representa la eficiencia de la planta para producir material nuevo y fue llamado por Blackman "el índice de eficiencia" de la producción de peso seco, que es otra forma de expresar la velocidad de crecimiento relativo $dw/w \cdot dt$, que permanece constante a través de la fase de crecimiento exponencial. En las últimas fases, la tasa de crecimiento decrece gradualmente (como en una colonia bacteriana) resultando una curva de tipo sigmoideo (39).

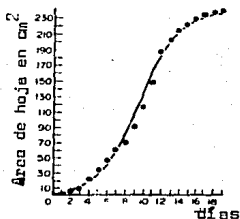
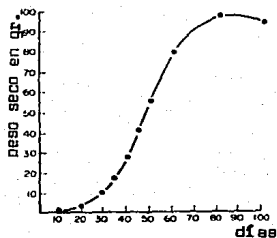


Fig. 3 Crecimiento característico de las plantas

El poder de la planta para sintetizar el material nuevo (y de aquí el incremento del peso seco), depende de su área foliar, por lo tanto así como la planta crece e incrementa su área foliar, la velocidad o tasa a la que el nuevo material es asimilado, también se incrementará proporcionalmente. En otras palabras la tasa de crecimiento relativo consiste en dos componentes que miden la eficiencia de la planta o del cultivo como productores de peso seco y como productores de área foliar.

Potter asumiendo que la capacidad fotosintética dentro del área foliar nueva es un componente importante del crecimiento, desarrolló una expresión para medir el coeficiente del área foliar CAF, encontrando que correlacionaba mejor con el crecimiento y presentaba mayores ventajas que otros parámetros. Establece una relación causa-efecto entre la expansión del área foliar y el crecimiento. CAF es el cambio diario del área foliar relativa dividido por el peso total de la planta a cualquier tiempo. Contiene información acerca de la velocidad y disposición de la producción de materia seca, así como de la velocidad de expansión del área foliar.

$$CAF = Ka * Am / Kw * Wm$$

Donde, A_m y W_m son los valores para el área y el peso, calculados como el punto medio del período de crecimiento. Son puntos sobre las líneas de regresión, puesto que los límites de confianza en esta línea son más estrechos en el punto medio de la recta. K_a es la tasa de expansión de área foliar relativa y K_w es la tasa de crecimiento relativo (29).

F. Auxinas.

Como se sabe las fitohormonas juegan un papel vital en el control del crecimiento, no solo dentro de la planta como un todo, sino también dentro de los órganos individuales. Pueden tener un amplio intervalo de respuestas, dependiendo del tipo de órgano o tejido en el cual actúan, por lo que son llamadas reguladores del crecimiento o sustancias del crecimiento. Son activas en cantidades muy pequeñas (9).

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas que se descubrieron, están presentes en todas las plantas superiores en cantidades extremadamente pequeñas. La primera auxina que se descubrió fue el ácido indol acético, fig 4, y por medio de estudios fisicoquímicos se ha observado que se encuentra en todas las plantas. Hay otras sustancias indólicas que también poseen actividad auxínica pero no se han encontrado en todas las especies.

La auxina es sintetizada en la punta de los tallos o cerca de los meristemas terminales y en tejidos jóvenes. Sus actividades incluyen la estimulación (principalmente elongación) e inhibición del crecimiento, dependiendo de la concentración. También, sola o con otras hormonas estimula o inhibe una gran variedad de otros eventos, como las reacciones enzimáticas para la división celular y la formación de órganos, o como la respiración celular; por ejemplo concentraciones de 0.3 a 200 mg/l del ácido 2,4-diclorofenoxiacético estimulan la respiración en avena y de 0.0001 a 10 mg/l en chicharo (Kelly y Alvery 1949) y como un

efecto tal vez de la estimulación de la respiración se presenta mayor actividad en el crecimiento. Muir y colaboradores (1949) encontraron una correlación entre los efectos del ácido indolacético y de otras auxinas sintéticas sobre el crecimiento del coleótilo de avena, observando que con el ácido indolacético a una concentración de 0.0001 Molar se presentaba un alargamiento mayor que con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el ácido fenilacético. Thiamann y Garcidueñas observaron que tanto el 2,4-diclorofenoxiacético como el ácido indolacético a bajas concentraciones estimularon el crecimiento del talluelo de plántulas de trigo y las más altas lo deprimieron.

Por sus acciones y aplicaciones en la agricultura las auxinas han sido ampliamente usadas: para retardar la salida de brotes de los tubérculos de papa en almacenes y de las yemas de los frutales, ya que provocan un letargo en el crecimiento de órganos de reproducción vegetativa; para la caída o retención, según las dosis, de flores y frutos; para el mejor desarrollo de frutos normales, etc. Otro proceso indirectamente conectado con el crecimiento y en el cual tienen efecto las auxinas es principalmente el metabolismo de los glúcidos (31).

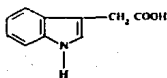


Fig.4 Estructura del Acido Indolacético

1. Métodos de aplicación de las auxinas en agricultura.

El mecanismo usual de aplicación de las auxinas, es en solución acuosa, por esta razón las sales son más comunmente usadas en los experimentos que requieren altas concentraciones de éstas. La acidez de una solución de auxina, influye grandemente en su efectividad así como en su solubilidad, afectando la entrada de ésta a las células de la planta. La aplicación de la auxina es más eficaz en soluciones ácidas de pH de 3 a 5.5. Las técnicas de aplicación son: soluciones rociadoras sobre el follaje; infiltración dentro de las hojas; inyección dentro de las partes frescas de la planta; inmersión de las partes de la planta dentro de la solución de auxina. Otros métodos descritos son la aplicación de auxina, sobre todo en invernadero, por volatilización de ésteres y por aerosoles (9).

Cuando la auxina se aplica al suelo o a soluciones nutritivas es movilizada por el xilema, Dhillon y colaboradores (1950) observaron que al aplicar la sal disodica del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en concentraciones de 500 y 100 ppm, fue movilizada por el xilema en forma de ácido y cuando se aplicó a las hojas el movimiento fue por el floema (comprobado por Hauser y Young 1952) y el parénquima y parcialmente por el xilema, por lo que el movimiento se hace junto con los líquidos de la planta de manera multidireccional y no polar (31).

2. Persistencia del AIA en las plantas.

Esta bien establecido que el AIA es fácilmente inactivado por la mayoría de los tejidos de la planta; aparentemente la concentración del AIA en las plantas esta regulado tanto por su producción de síntesis como por los mecanismos de inactivación que son: fotooxidación, oxidación enzimática y, por esterificación y conjugación enzimática (39).

Los sistemas enzimáticos de la planta que destruyen a las auxinas, son más específicos para el AIA, y por esta razón otras auxinas son frecuentemente más efectivas y persistentes (9).

G. Crecimiento de *Digitalis* y Producción de Cardiotónicos.

Durante más de tres décadas se han estado realizando investigaciones del efecto nutricional sobre el crecimiento de la "*Digitalis*" y la producción de los cardiotónicos. Del primero que se tiene referencia es Tsao (1952) quien hace un estudio del cultivo de *D. purpurea* en campo y en Hidroponia (utilizando medio nutritivo Hoagland), concluye que las plantas cultivadas en solución dan mejor producción de cardiotónicos (estimados por su actividad en aurícula de pichón) entre 120 y 136 días de edad, mientras que las cultivadas en campo producen la cantidad óptima entre 141 y 156 días. Además establece que la cosecha de las plantas debe hacerse en el primer año de su crecimiento, y reporta que la velocidad de crecimiento entre los dos tratamientos no presenta ninguna diferencia significativa.

Balboa (1971) reporta que la *D. lanata* crecida en Egipto contiene arriba de 1.8 % de cardiotónicos cuando se cosechan las hojas cerca de la etapa de floración y que la aplicación de fertilizantes amoniacales favorece el crecimiento de la planta pero no afecta la naturaleza ni el porcentaje de los cardiotónicos. En 1976 Weiler E. W., reporto que el contenido promedio del glucosido digoxigenina incrementa con la edad de la hoja en *D. lanata*, así mismo un pequeño pero consistente descenso se encuentra en las hojas muy viejas.

Evans en 1972, reporta la distribución y composición de los cardiotónicos durante el ciclo de crecimiento de la D. purpurea, estableciendo que las concentraciones más altas ocurren en los órganos jóvenes de las plantas del segundo año y en las plantas del primer año donde las hojas crecen activamente; también reporta que durante los primeros siete meses hay un aumento en la concentración de los cardiotónicos (115.6 ug/g de peso fresco) y en los siguientes 3 meses el crecimiento de la planta es lento y la concentración de los cardiotónicos decrece (11 ug/g de peso fresco), además las hojas maduras de la roseta basal de la planta contenían menos de la mitad de cardenolidos que en las hojas jóvenes.

En 1982 Kartnig (23) realiza un estudio comparativo sobre los cardiotónicos y flavonoides en hojas de D. purpurea durante diferentes etapas de su desarrollo, encontrando que su contenido cambia durante el período de crecimiento y que en el comienzo de la etapa de floración la concentración decrece; también reporta que las plantas cultivadas al aire libre contienen menor cantidad de los compuestos que cuando crecen en invernadero.

En una recopilación sobre trabajos realizados en la producción de metabolitos secundarios, Craker puntualiza que en años recientes se ha dado más atención a aumentar la producción de metabolitos secundarios por medio del incremento en la producción de biomasa, así mismo se ha dicho que la producción primaria de las plantas no puede adaptarse directamente a la producción de productos secundarios. La mayoría de los trabajos concernientes a la biosíntesis de productos secundarios indican que los factores ecológicos son muy importantes para la acumulación de éstos, y los trabajos para encontrar los mecanismos reguladores de la producción secundaria no son satisfactorios. Reporta que para algunas especies de plantas y para la D. lanata la producción de compuestos secundarios puede ser modificada por la influencia de la producción de materia seca; bajo condiciones controladas un incremento al triple de nitrógeno, provoca una doble producción de materia seca y una acumulación más grande de cardiotónicos en D. lanata. Por otra parte Milletti observa que las variaciones en el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio influye significativamente en la producción de materia seca pero no en el contenido de cardiotónicos (13).

En resumen, de acuerdo a lo reportado es de esperarse que en plantas y hojas jóvenes de la Digitalis se obtenga el mayor contenido de cardiotónicos y respecto a la relación crecimiento/producción de cardiotónicos, esto aun es una controversia.

H. Cultivo de *Digitalis* "in vitro".

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han llegado a ser de suma importancia para investigar una gran variedad de metabolitos secundarios. Así el cultivo de células vegetales representa una nueva alternativa para la producción de materias primas tradicionalmente obtenidas de fuentes naturales.

Existe una gran cantidad de literatura reportada acerca del cultivo "in vitro" de *Digitalis* tanto de la especie lanata como de la purpurea, que van desde ensayos para la obtención de tejido calloso, hasta la creación de bioreactores para la transformación de los cardiotónicos. Autores como Hirotsani, Hagimori y Garve (18, 20, 21) han reportado que el tejido calloso obtenido de explantes tales como, el tallo de una planta floreciendo, cotiledones y tejido de anteras, al cambiarse de un medio de alta concentración a un medio de baja concentración de auxina se forman estructuras globulares verdes, embroides, brotes; las cuales acumulan cantidades más grandes del cardiotónico.

Estudios preliminares dentro del cultivo de tejidos de D. purpurea para obtener tejido calloso (4), mostraron que los cotiledones (explanete) cultivados en medio Schenk-Hildebrandt (tabla 1) en presencia de la fitohormona ácido indolacético (AIA) a 1, 3 y 5 ppm regeneraba la planta y que la cantidad de cardiotónico en hoja (0.7297 mg/g de peso seco) era muy similar a la de la planta adulta (0.8026 mg/g de materia seca) cultivada en tierra en el Estado de México. De acuerdo a estos resultados surgió el interés de cultivar la D. purpurea en un medio hidropónico, para estudiar el efecto de los nutrientes y del ácido indolacético sobre el crecimiento y la producción de cardiotónicos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, los glucosidos cardiacos (cardiotónicos) son los fármacos que se utilizan en clínica para los tratamientos cardiovasculares, por ser los más activos, eficaces y presentar un margen de seguridad un poco más amplio.

Mundialmente, los cardiotónicos se obtienen de plantas del género "digitalis", ya que todavía no se han encontrado alternativas de síntesis convenientes.

México importa éstos fármacos en su totalidad, porque no existen cultivos de D. purpurea con fines comerciales para la obtención de los cardiotónicos, solo se encuentra de manera silvestre en varias regiones del país.

En los últimos años varios países desarrollados han establecido sistemas agrícolas artificiales para proteger a las plantas medicinales y aumentar la producción de sus metabolitos.

Por lo anterior se consideró importante cultivar a la D. purpurea en un medio hidropónico, como una alternativa para la obtención de los cardiotónicos y de ésta manera la posibilidad de abastecer a la industria farmacéutica.

La realización del cultivo hidropónico de D. purpurea, además de las ventajas que presenta, se puede desarrollar en el área urbana, en cualquier espacio disponible y por lo tanto se podría establecer en la propia industria, evitándose los problemas gubernamentales que implica un cultivo en tierra.

El cultivo hidropónico es importante porque representa un modelo experimental donde se pueden efectuar estudios básicos para obtener información para mejorar la especie, en cuanto a aumentar la resistencia de la planta y la producción de sus metabolitos. Así también puede servir de base para el desarrollo de otros sistemas de cultivo, o para estimular esfuerzos posteriores que lleven a la creación de tecnologías eficaces para el cultivo de D. purpurea o de otras plantas medicinales, para expandir su investigación en la obtención de fármacos y de materias primas.

En base a lo anterior y a trabajos publicados tendientes a mejorar la producción de cardiotónicos, se propuso cultivar la D. purpurea ensayando los medios nutritivos Hoagland y Schenk-Hildebrandt, para determinar en cual se efectuaba el mejor desarrollo de la planta y el mayor contenido de cardiotónicos. Así mismo observar si la fitohormona ácido indol acético (AIA) tenía alguna influencia sobre la producción de los cardiotónicos.

IV. OBJETIVOS

- A. Seleccionar el medio nutritivo adecuado para el desarrollo de la planta Digitalis purpurea en un cultivo hidropónico.
- B. Evaluar el efecto de los medios nutritivos Hoagland, Schenk-Hildebrandt y Schenk-Hildebrandt modificado sobre la producción de glucósidos cardíacos durante el crecimiento de D. purpurea.
- C. Evaluar el efecto del ácido indol acético sobre la producción de glucósidos cardíacos durante el crecimiento de D. purpurea.

V. HIPOTESIS

La fuente nutricional es esencial para el desarrollo vegetal y este lleva implícito la producción de metabolitos secundarios, por lo que al modificarse, el crecimiento de la D. purpurea y la producción de glucósidos cardíacos serán diferentes.

Con el medio nutritivo Hoagland y la adición de una fitohormona como el AIA a las plantas de Digitalis purpurea, puede modificarse la producción de glucosidos cardíacos.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Material.

- Agrolita
- Charolas de acrílico, 40cm X 15cm X 10cm de altura.
- Matraces aforados de 1000 y 100 ml.
- Pipetas volumétricas y graduadas de 10, 5, 2 y 1 ml.
- Matraces balón de 100 ml.
- Embudos de filtración de 125ml.
- Matraces Erlenmeyer de 4, 2, 1 y 0.5 lt.
- Tubos de ensayo de 10 X 1.5 cm y de 15 X 1.5 cm.
- Gradillas metálicas.
- Soporte universal.
- Perilla de seguridad.
- Mortero con pistilo
- Vasos de p.p. 500, 250 y 100 ml.
- Probeta de 50 ml.
- Parrillas de agitación
- Barras magnéticas
- Vortex
- Tijeras
- Pinzas de disección
- Algodón
- Block de papel milimétrico
- Cinta masking-tape
- Papel aluminio.

B. Material biológico.

- Semillas de Digitalis purpurea, cosechadas 15 meses antes de iniciar el experimento. Las plantas de donde se obtuvieron las semillas fueron cultivadas en Tepetlixpa, Edo. de México.

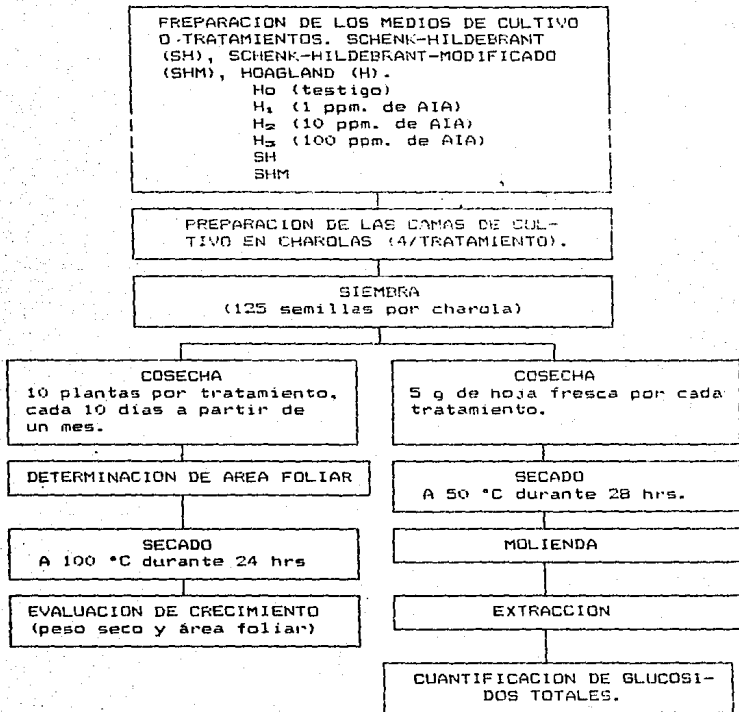
C. Reactivos.

- Solución madre de AIA. (1 mg/ml).
- Cloroformo G.A. Merck
- Metanol G.A. Merck
- Heptano G.T. Reasol
- Solución de ácido picrico al 0.6 %
- Solución de Hidróxido de sodio al 3 %
- Etanol absoluto Merck
- Solución de hipoclorito de sodio (1:1)
- Agua destilada
- Para los reactivos utilizados en la preparación de los medios nutritivos véase la tabla 1,

D. Equipo.

- Espectrofotometro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 3A)
- Autoclave (AESA, modelo 300)
- Campana de flujo laminar (VECO)
- Potenciometro (Conductronic pH 20)
- Estufa para temperatura de 50 grados centigrados (RIOSSA)
- Estufa para temperatura de 95 grados centigrados (RIOSSA)
- Rotavapor (Büchi)
- Bomba para vacio (Felisa, modelo 1500)
- Balanza analitica (Bosch-S200)
- Balanza granataria (Ohaus)

E. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



F. METODOS.

1. Tratamiento previo de los elementos de las camas de cultivo.

Se lavó la agrolita cuatro veces con agua destilada (aproximadamente 15 l para las camas de cuatro charolas).

Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lb/plg durante 20 minutos.

Las charolas se lavaron perfectamente y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 1:1 (24 charolas fueron utilizadas para este experimento).

En un cuarto aséptico, se vació la agrolita esterilizada en cada una de las charolas, aproximadamente hasta el borde; se taparon y mantuvieron en condiciones de asepsia hasta el momento de la siembra.

2. Preparación de los medios nutritivos.

Los medios empleados en el presente estudio fueron: Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant-Modificado, cuya composición se resume en la tabla 1.

a. Medio Hoagland. En un matraz aforado de 1 l, se agregaron 800 ml de agua destilada, después se adicionaron los volúmenes de las soluciones madre indicadas abajo.

SOLUCIONES MADRE :

ALICUOTA

- Nitrato de calcio tetrahidratado 1 M	5 ml
- Nitrato de potasio 1 M	5 ml
- Sulfato de magnesio heptahidratado 1 M	2 ml
- Cloruro Ferrico hexahidratado eq. a 5 mg de Fe ³⁺	1 ml
- Solucion de micronutrientes	1 ml
Composicion:	
Acido bórico	2.86 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	1.81 g
Cloruro de zinc	0.11 g
Molibdato de sodio dihidratado	0.025 g
Agua destilada c.b.p.	1 l
- Agua destilada c.b.p.	1000 ml

b. Medio Schenk-Hildebrant. En un matraz aforado de 1 lt se agregaron 500 ml de agua destilada, se adicionaron las siguientes sustancias: sulfato férrico heptahidratado (15 mg) y etilendiamintetracetato de sodio (20 mg) con agitación hasta su completa disolución, posteriormente se adicionaron los volúmenes

de las soluciones A y B; y se llevó al aforo con agua destilada.

- Solución A -----	100 ml
Composición:	
Nitrato de potasio	25 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	4 g
Fosfato monobásico de amonio	3 g
Cloruro de calcio dihidratado	2 g
Agua destilada c.b.p.	1 l
- Solución B -----	50 ml
Composición:	
Sulfato de manganeso	200 mg
Acido bórico	100 mg
Sulfato de zinc heptahidratado	20 mg
Yoduro de potasio	20 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	4 mg
Molibdato de sodio dihidratado	2 mg
Cloruro de cobalto hexahidratado	2 mg
Agua destilada c.b.p.	1 l

c. Medio Schenk-Hildebrant Modificado. La composición de este medio solo varía del medio Schenk-Hildebrant mencionado anteriormente (b), en la concentración de los siguientes compuestos:

Para la solución A:

Nitrato de potasio	9.3 g
Fosfato monobásico de amonio	1.0 g

Para la solución B:

Sulfato de manganeso	20 mg
----------------------	-------

d. Esterilización de cada uno de los medios nutritivos. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb/plg durante 20 min. El volumen utilizado aproximadamente para cada tratamiento fue de 5 litros (para las camas de cuatro charolas).

3. Siembra

a. Desinfestación de las semillas. Se contaron 125 semillas para cada una de las camas, se envolvieron en papel filtro asegurándolas con un clip. Se colocaron los paquetes de las semillas en una solución de hipoclorito de sodio (1:1). Se agitaron por 15 min. Bajo condiciones asepticas (campana de flujo laminar) se lavaron las semillas tres veces con agua destilada estéril y se dejaron remojando por 24 h en agua estéril. Se decantó completamente el agua volviéndose a desinfestar con la

TABLA 1. COMPOSICION DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS.

HOAGLAND mg/l		SCHENK-HILDEBRANT mg/l		SCHENK-HILDEBRANT MODIFICADO mg/l	
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1181	CaCl ₂ · 2H ₂ O	200	CaCl ₂ · 2H ₂ O	200
KNO ₃	506	KNO ₃	2500	KNO ₃	970
MgSO ₄ · 7H ₂ O	492	MgSO ₄ · 7H ₂ O	400	MgSO ₄ · 7H ₂ O	400
KH ₂ PO ₄	136	NH ₄ H ₂ PO ₄	300	NH ₄ H ₂ PO ₄	100
H ₃ BO ₃	2.86	H ₃ BO ₃	3.0	H ₃ BO ₃	3.0
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0.25	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1	Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0.1
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.8	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.5	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
ZnCl ₂	1.1	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
FeCl ₃ · 6H ₂ O	24	FeSO ₄ · 7H ₂ O	15	FeSO ₄ · 7H ₂ O	15
		KI	1	KI	1
		MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	MnSO ₄ · 4H ₂ O	1
		Na ₂ EDTA	20	Na ₂ EDTA	20

solución de hipoclorito de sodio durante 5 min., se enjuagaron perfectamente y se mantuvieron en asepsia.

b. Preparación de las camas. En un cuarto aséptico se agregó el medio nutritivo correspondiente a cada tratamiento sobre las camas de agrolita de cada una de las charolas identificadas previamente; una vez que la agrolita quedó perfectamente cubierta con el medio nutritivo el exceso fue decantado quedando así listas para la siembra.

c. Colocación de las semillas en las camas de cultivo. Bajo condiciones de asepsia (campana de flujo laminar), con ayuda de unas pinzas se tomó un paquete de semillas, se abrió y las semillas se esparcieron al azar en cinco surcos marcados sobre la agrolita. Esto se facilita si se toma agua destilada con una pipeta estéril, y se va goteando sobre las semillas adheridas al papel. Las charolas tapadas fueron colocadas en la mesa de experimentación con luz solar y a temperatura ambiente de laboratorio (28- 30 grados centígrados).

4. Riego.

Se comenzó a regar 30 días después de la siembra. En un principio se realizó cada tercer día con un volumen de 50 ml de medio nutritivo estéril, para cada charola. Conforme las plantas fueron creciendo, el volumen se fue aumentando dependiendo de la humectación observada en la agrolita. Se realizaron dos riegos seguidos con medio nutritivo y el siguiente con agua destilada estéril. La esparción del medio nutritivo a las charolas se realizó con un matraz Erlenmeyer con tapón de hule con dos orificios en los cuales se colocaron dos tubos de vidrio.

5. Aplicación del Ácido Indol Acético (AIA).

a. Preparación de la solución madre 1 mg/ml. Se pesaron 100 mg de AIA, se disolvieron en agua destilada con adición de unas gotas de hidróxido de sodio (0.1 N) hasta la disolución completa. Se vació a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con agua destilada. El AIA es inactivado en solución, por lo que debe prepararse al momento de su uso.

b. Aplicación a las camas de cultivo. La adición del AIA se realizó en cultivos mantenidos con medio Hoagland. Para cada tratamiento se prepararon cuatro soluciones de 1 ppm, 10 ppm y 100 ppm respectivamente, de las cuales fueron aplicadas volúmenes de 100 ml a cada charola en los primeros cuatro meses y de 250 ml en los meses posteriores. Estas soluciones fueron aplicadas a las camas de cultivo de la misma manera que para el riego,

incluso se aforaron con el medio nutritivo. A todas las soluciones se les ajustó el pH de a 5.5.

La aplicación de esta hormona se realizó solamente cada dos meses, durante el tiempo que se mantuvo el cultivo.

6. Cosechas.

Para determinar el crecimiento se estimó el peso seco y el área foliar. Diez plantas por cada tratamiento, se cosecharon al azar. Cada planta fue separada en hojas, tallo, peciolo y raíz. Para el área foliar, todas las hojas de las plantas cosechadas por tratamiento se dibujaron en papel milimétrico, se recortaron y posteriormente se pesaron en una balanza analítica, comparando el peso respecto al de 1 cm² de papel milimétrico. En charolas de papel aluminio (taradas a peso constante) las partes de las plantas se pusieron a secar a 75 °C por 24 h por separado y fueron pesadas en balanza analítica.

Por otro lado, para la extracción y cuantificación de cardiotónicos totales, se cosecharon aproximadamente 5 g de hoja de cada tratamiento y se secaron en charolas de papel aluminio (taradas a peso constante) a 50 °C de 24 a 28 hrs. Estas cosechas se realizaron solo al medio día.

Las cosechas tanto para el crecimiento como para la cuantificación de cardiotónicos se realizaron cada diez días, a partir de los 30 días después de la siembra.

7. Extracción de cardiotónicos totales.

Por cada gramo de hoja seca y molida obtenida para la extracción, se adicionaron 7 ml de mezcla cloroformo-metanol(1:1), se dejaron en oscuridad por 18 hrs. perfectamente tapadas. Se filtraron sobre algodón directamente al matraz balón, la torta fue lavada con aproximadamente 20 ml de la mezcla cloroformo-metanol (1:1) hasta que desapareció el color verde de esta y del algodón; el filtrado se evaporó a sequedad (en un rotavapor a no más de 60 °C), se disolvió el residuo con 12 ml de heptano y se vació en un embudo de separación, se enjuagó el matraz con 25 ml de agua destilada y se vació al mismo embudo (las cantidades de ambos disolventes se utilizaron de forma fraccionada y alterna hasta que el matraz quedó completamente limpio). Se agitó el embudo de separación durante 30 seg., se separó la fase acuosa en el matraz bola que se utilizó anteriormente y la fase orgánica fue desechada. Se hicieron 2 extracciones de la fase acuosa con 10 ml de heptano cada una (el matraz balón debe enjuagarse previamente con el disolvente), desechandose toda la fase orgánica.

La fase acuosa fue extraída con 10 ml de cloroformo 3 veces, evaporándose el cloroformo a sequedad (en un rotavapor), el residuo se disolvió con 1 ml de mezcla cloroformo-metanol (1:1). Se tomó 0.5 ml colocándolos en un tubo de ensaye y se dejó evaporar el disolvente.

8. Cuantificación de cardiotónicos totales por el método colorimétrico del picrato alcalino.

Hecha la extracción y evaporado el disolvente de la muestra en el tubo de ensaye, se adicionó 1 ml de la mezcla cloroformo-metanol (1:1), se tomó una alícuota de 0.2 ml (con duplicado) la cual fue depositada en un tubo de 15 x 1.5 cm y evaporado el disolvente. Posteriormente se adicionaron 5 ml de etanol para redissolver el residuo, y 5 ml del reactivo picrato alcalino mezclándose y dejando en reposo durante 30 min. para desarrollar la reacción. En seguida se determinó la absorbancia a 495 nm. La concentración se calculó mediante una curva estándar (fig. 5), previamente realizada con una mezcla digoxina-digitoxina, con los siguientes valores:

CONCENTRACION (mg/ml)	ABSORBANCIA (nm)
0.04	0.084
0.08	0.172
0.12	0.265
0.20	0.428
0.28	0.590

Preparación de la solución de Picrato Alcalino. En un matraz aforado de 100 ml se agregó 10 ml de la solución de hidróxido de sodio al 3 % y 20 ml de la solución de ácido picrico al 0.6 %. Se mezcló y se aforó al volumen con agua destilada. Se preparó antes de su uso.

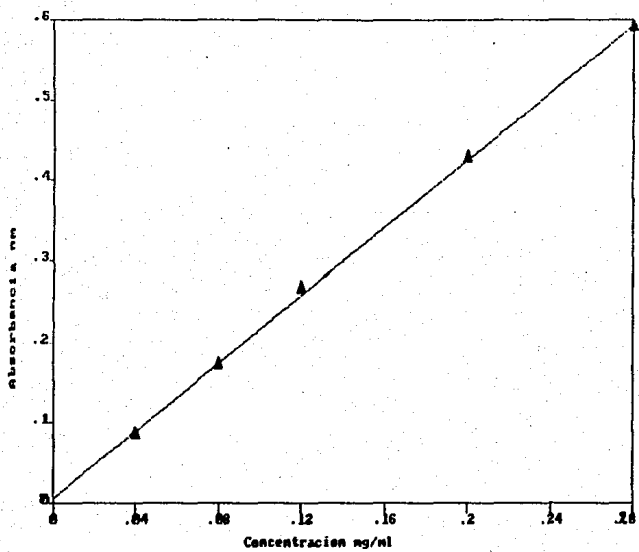


Fig. 5. Curva estándar DIGOXINA + DIGITOXINA

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se presentan en el siguiente orden: el crecimiento de la planta, el coeficiente de área foliar CAF y el contenido de cardiotónicos totales de las plantas desarrolladas en el medio Hoagland (H), Schenk-Hildebrant (SH) y Schenk-Hildebrant Modificado (SHM), con su análisis correspondiente. En segundo lugar el crecimiento de la planta, el coeficiente de área foliar CAF y el contenido de cardiotónicos totales de las plantas desarrolladas en el medio Hoagland con las diferentes concentraciones del ácido indol acético (AIA): testigo (Ho), con 1 ppm (H-1), con 10 ppm (H-2) y con 100 ppm (H-3), con su análisis correspondiente. Cada evaluación es el promedio de 2 muestras.

Ya que las hojas son los órganos más directamente relacionados con la síntesis del nuevo material, se puede establecer una relación causa-efecto entre el área foliar y el crecimiento, para analizar la inversión del peso ganado dentro de la expansión diaria del área foliar. La expresión desarrollada por Potter: $CAF = K_a * A_m / K_w * W_m$, indica la eficiencia de la planta o cultivo como productor de materia seca. De esta forma se puede establecer una diferencia cuantitativa entre los tratamientos evaluados.

Con el fin de determinar algún parámetro que diferenciara cual de los medios ofrecía más garantías para la obtención de los cardiotónicos, se calculó la media y la desviación estándar del total de los datos obtenidos durante el período experimental. Con la media de la producción se pretendía saber con cuál medio se obtenía la mayor cantidad de cardiotónicos en promedio durante el período evaluado, y con la desviación estándar observar con cual medio existía una producción más uniforme durante el período evaluado, de tal manera que se pudiera establecer un período de tiempo para la recolección de material biológico que garantice un buen rendimiento de cardiotónicos.

A. Plantas cultivadas en los medios H, SH y SHM.

1. Crecimiento de la planta.

El peso seco de las plantas obtenidas en los medios Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant-Modificado, se muestran en la figura 6, obteniéndose las curvas características del crecimiento de las plantas durante la primera etapa de su desarrollo.

Con el medio SH se observó una mayor producción de materia seca a lo largo del período de crecimiento, seguido del medio SHM y por último del H. El comportamiento se puede apreciar má-

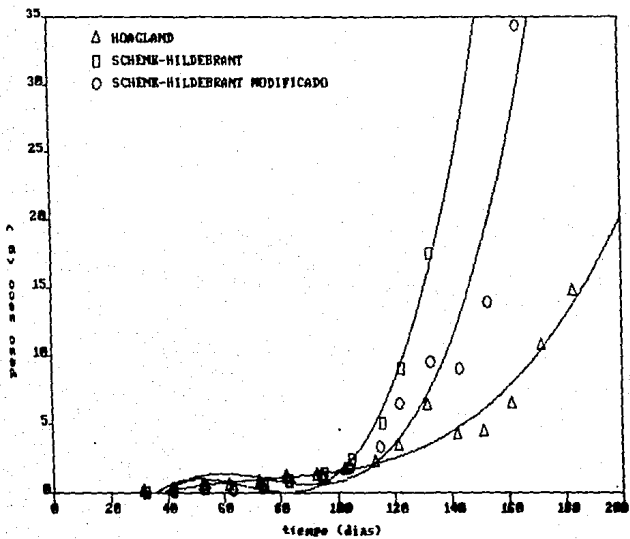


Fig. 6. Curvas de peso seco de *D. purpurea* cultivada en los medios Hoagland (H); Schenk-Hildebrandt (SH) y Schenk-Hildebrandt-Modificado (SHM).

jor en la figura 7, donde se presentan las mismas curvas en forma linealizada (ln peso seco). Durante la fase inicial de crecimiento o fase de adaptación (30 a 80 días), en el medio H el contenido de materia seca es mayor y despues disminuye considerablemente respecto a los otros medios.

Respecto a las curvas del área foliar figura 8, el comportamiento general en los 3 medios fue similar al de las curvas de peso seco. Sin embargo en las curvas logarítmicas figura 9, durante la fase inicial de crecimiento (30 a 70 días) se observó una inversión en el comportamiento de los medios SH y SHM respecto a las curvas de peso seco. Esto es, el medio SH al inicio presentó menor producción de peso seco, el cual despues de los 80 días se mantuvo por encima de los otros medios, mientras que el área foliar desde el inicio fue superior al del medio SHM, y así se mantuvo durante todo el periodo de crecimiento. (130 días en este caso).

El parámetro de peso seco permitió observar una diferencia más marcada en cuanto a la cantidad de materia producida (peso seco), en cambio con el área foliar las curvas de los medios SH y SHM se observaron casi traslapadas. El comportamiento del medio H fue el mismo tanto en el parámetro de peso seco como con el de área foliar.

Es probable que el medio SH haya mostrado mayor crecimiento debido a que el número de plantas fue considerablemente menor respecto a los otros medios, esto es a causa del bajo porcentaje de germinación (porcentaje de viabilidad esperado 82-83%); además, algunas plántulas despues de algún tiempo murieron, por lo tanto hubo menor competencia nutritiva y de espacio, razón por la que la cinética de crecimiento sólo se evaluó hasta los 130 días. Cabe señalar que la composición del medio SH (vease tabla 2) es más rica tanto en macro como en micronutrientes, ya que es un medio establecido para cultivos "in vitro" (heterótrofos), lo que pudo afectar el proceso de germinación y provocar intoxicación de las plántulas.

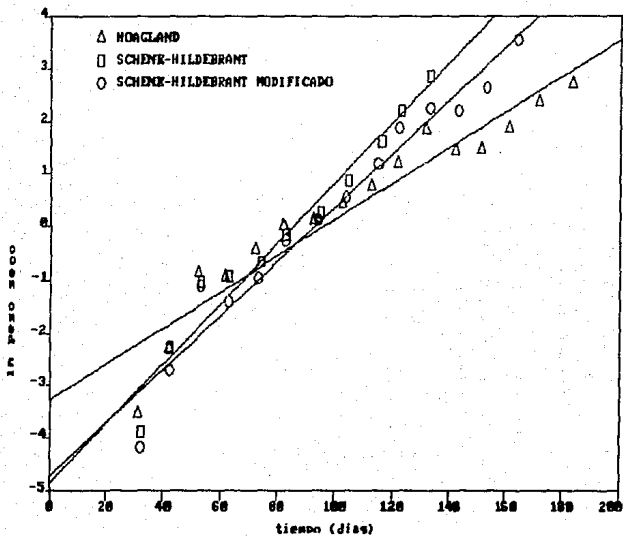


Fig. 7. Curvas del ln de peso seco de *D. purpurea* cultivada en los medios Hoagland (H); Schenk-Hildebrandt (SH) y Schenk-Hildebrandt-Modificado (SHM).

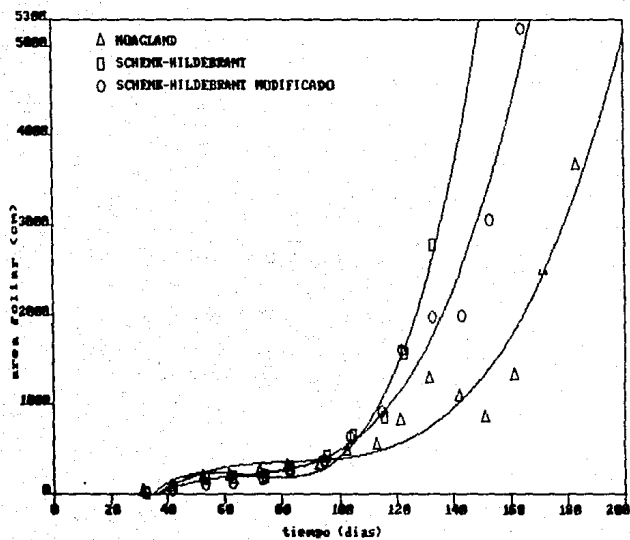


Fig. B. Curvas de área foliar de *D. purpurea*, cultivada en los medios Hoagland (H); Schenk-Hildebrant (SH) y Schenk-Hildebrant-Modificado (SHM).

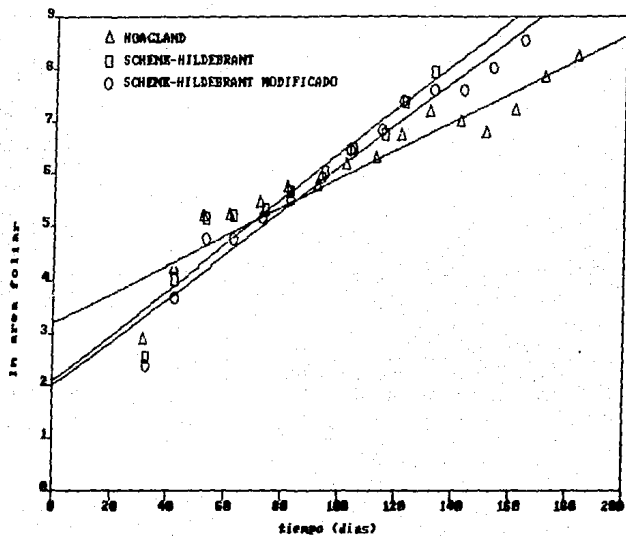


Fig. 9. Curvas del ln de área foliar de *D. purpurea*, cultivada en los medios Hoagland (H); Schenk-Hildebrand (SH) y Schenk-Hildebrand-Modificado (SHM).

TABLA 2. CANTIDAD DE IONES CONTENIDOS EN CADA MEDIO (mg/l).

ION	HOAGLAND	SCHENK-HILDEBRANT	SCHENK-HILDEBRANT MODIFICADO
Ca ⁺⁺	200.502	54.536	54.536
K ⁺	234.779	967.130	360.000
Cl ⁻	11.8329	96.5038	96.5038
NO ₃	930.6155	1533.105	570.89
SO ₄	191.83	165.8571	160.1358
Mg ⁺⁺	48.564	39.48	39.48
PO ₄	96.92	253.032	82.60
I ⁻	-	0.7644	0.7644
NH ₄	-	46.968	15.65
BO ₃	2.721	2.8543	2.8543
Co ⁻	-	0.0248	0.0248
MoO ₄	0.165	0.0661	0.0661
Na ⁺	0.0475	2.755	2.755
Mn ⁺⁺	0.4998	2.4642	0.246
Zn ⁺⁺	0.5276	0.227	0.227
Cu ⁺⁺	0.1909	0.049	0.049
Fe	4.9604 Fe ³⁺	3.0149 Fe ²⁺	3.0149 Fe ²⁺
EDTA	-	17.264	17.264

2. Coeficiente de área foliar.

En la tabla 3 se presentan los resultados del coeficiente del área foliar CAF, que es un buen indicador del crecimiento, ya que involucra la ganancia de peso seco dentro de la hoja, siendo esta el órgano de mayor peso dentro de la planta. Se observó que con el medio SH se produjo mayor cantidad de área foliar (312.202 cm² por gr), seguido del medio SHM (301.088 cm² /gr) y por último el H (269.06 cm² /gr); sin embargo éste último fue más eficiente como productor de materia seca, ya que dentro de su menor área foliar tuvo el mismo peso que los otros dos medios con mayor área foliar; en otras palabras, los medios SH y SHM están más orientados a la expansión del área foliar que a la producción de materia. Puede ser que ocurra un alargamiento celular y no una división celular o síntesis del nuevo material, y esto sin duda debe ser efecto de los nutrientes y su concentración en cada uno de los medios.

En la tabla 2 se encuentra la composición en iones de los medios H y SHM, se puede ver que hay variaciones en la concentración de los macronutrientes; por ejemplo el Ca²⁺ se presenta en mucho mayor cantidad en el medio H que en el SHM. Este elemento al igual que los iones fosfato es muy necesario para la formación de polímeros estructurales, aunque la diferencia en el contenido de este último ion es mínima, puede ser de gran importancia para la planta.

Además el medio H contiene mayor cantidad de nitrato, favoreciéndose más la biosíntesis de aminoácidos con este medio. El medio SHM a pesar de tener como otra fuente de nitrógeno al amonio no iguala la concentración de éste elemento en el medio H. En suma se puede decir que la composición nutritiva y la concentración del medio Hoagland puede ser la más apropiada para la producción de materia seca en Digitalis purpurea. Se ha reportado que para D. lanata el nivel nutricional es importante para la producción de materia seca. (13)

3. Contenido de cardiotónicos totales.

El contenido de cardiotónicos evaluados durante la etapa de crecimiento de D. purpurea en los medios Hoagland (H), Schenk-Hildebrandt (SH) y Schenk-Hildebrandt-Modificado (SHM), se muestran en las figuras 10, 11 y 12. En los medios SHM y H se observa un comportamiento muy similar en un principio aumenta el contenido de cardiotónicos casi uniformemente, hasta llegar a un punto (110 días) en el cual se inician una serie de fluctuaciones. Esto puede explicarse debido a que el contenido de los cardiotónicos en las hojas de una misma planta varía aparentemente de acuerdo a su edad. Evans encuentra que las concentraciones

TABLA 3. COEFICIENTE DE AREA FOLIAR (CAF).

MEDIO NUTRITIVO	CAF cm ² /g	Kw dias ⁻¹	Wm g	Ka dias ⁻¹	Am cm ²
HOAGLAND	269.06	0.0362	0.830	0.0228	86.75
SCHENK-HILDE - BRANT	312.202	0.0570	0.340	0.0429	140.83
SCHENK-HILDE - BRANT MODIFICADO	301.088	0.0506	0.588	0.0412	217.54

Kw = Tasa de crecimiento relativo

Ka = Tasa de expansión de área foliar relativa

Wm = Peso seco en el punto medio de la curva

Am = Área foliar en el punto medio de la curva.

Datos obtenidos de la correlación lineal realizada en las curvas logarítmicas de los dos parámetros medidos (W y A) para cada tratamiento.

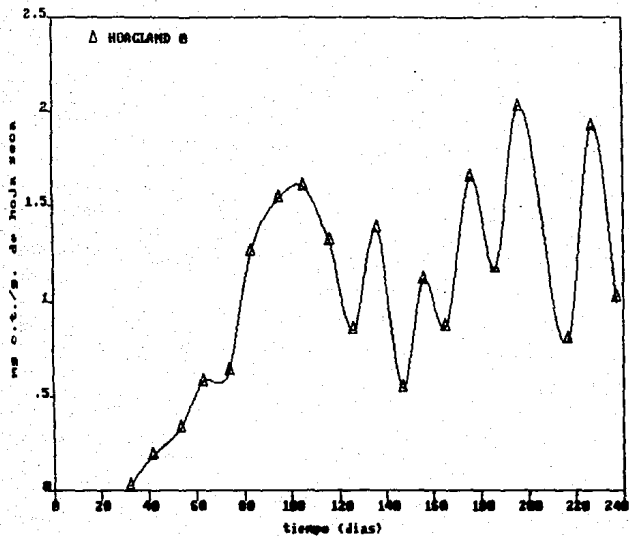


Fig. 10. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland (H).

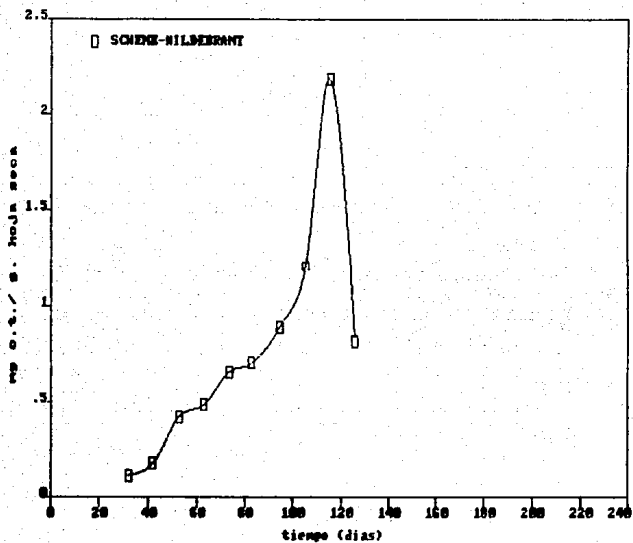


Fig. 11. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Schenk-Hildebrandt (SH).

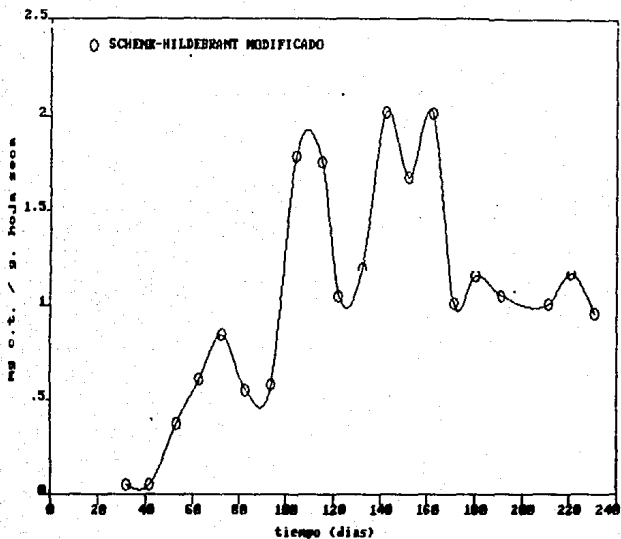


Fig. 12. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Schenk-Hildebrandt-Modificado (SHM).

más altas de cardiotónicos en D. purpurea, aparecen en hojas jóvenes y en plantas del primer año donde existe un crecimiento activo de las hojas; también Weiler, E.W., (40) analiza el contenido de digitoxina en las diferentes hojas y partes de una misma planta de D. lanata, encontrando que el contenido es diferente en cada una de las hojas y en las partes de esa misma hoja. De acuerdo a lo anterior es probable que durante las primeras evaluaciones realizadas, las hojas obtenidas para la extracción de los cardiotónicos hayan tenido el mismo desarrollo (casi todas jóvenes) con un crecimiento acelerado, por lo que el comportamiento al inicio del periodo de cuantificación haya sido más uniforme, tendiendo a aumentar, y después de los 110 días las hojas cosechadas presentaban diferentes tamaños, puesto que la planta por tener más edad contenía tanto hojas jóvenes como maduras, por lo tanto el contenido ya no siguió la misma tendencia ascendente, ya que algunas muestras tenían tanto hojas jóvenes como adultas y por consiguiente la respectiva variabilidad en el contenido.

En la tabla 4 se presenta el valor máximo obtenido del contenido de cardiotónicos totales en los medios evaluados durante todo el periodo experimental. En los medios H y SHM la cantidad obtenida es muy similar (no existe una diferencia importante), sin embargo esto se presenta a diferentes tiempos, siendo más largo para el medio Hoagland (196 días). Por el comportamiento ya mencionado, estos datos no son representativos para indicar cual sería el tiempo apropiado para la cosecha de las plantas. En esta misma tabla se presentan los resultados de la media y la desviación estándar del total de datos obtenidos durante el periodo experimental, y de acuerdo a estos parámetros no hay una diferencia significativa entre los medios H y SHM.

En resumen se puede decir que el medio nutritivo no tiene efecto sobre la producción de los cardiotónicos y tampoco existe relación entre la producción de materia y la de los cardiotónicos, pues podría pensarse que al existir mayor eficiencia en la producción de materia existiría también mayor producción de cardiotónicos o tal vez un comportamiento inversamente proporcional pero ninguno de los dos casos se observa. Esto mismo se ha reportado para D. lanata (13)

Ya que a partir de los 110 días comienza la variación en el contenido de los cardiotónicos, y puesto que Evans reporta mayor contenido de éstos a partir de los 120 días y a hasta los 320, se puede decir que un tiempo adecuado para cosechar las plantas de D. purpurea para la obtención de los cardiotónicos sería a partir de los 110 días después de la germinación.

TABLA 4. CONTENIDO MAXIMO DE GLUCOSIDOS CARDIACOS.

Medio nutritivo	GT mg/g hoja seca	t dias	x	st
HOAGLAND	2.0156	196	1.0399	0.5596
SCHENK-HILDEBRANT MODIFICADO	2.0211	142	0.966	0.5392
SCHENK-HIL-DEBRANT	2.1824	116	0.7640	0.5958

(GT) glucósidos totales mg/g de hoja seca, valor máximo obtenido durante el periodo experimental; (t) tiempo en días; (x) media y (st) desviación estandar del total de valores de cardiotónicos obtenidos en todo el periodo experimental.

B. Plantas cultivadas en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de AIA.

1. Crecimiento de la planta.

En la segunda parte de este trabajo se observó el efecto de la fitohormona ácido indol acético (AIA) en la producción de biomasa y de los cardiotónicos en el medio Hoagland, por ser el más adecuado en la producción de materia. Las curvas de crecimiento se presentan en la figura 13; se puede observar que presentan el comportamiento característico de las plantas durante la primera etapa de desarrollo, y en la figura 14 se presentan las mismas curvas en forma linealizada (\ln del peso seco). Durante la primera mitad del periodo de crecimiento se observa que con H-0 hay una mayor cantidad de peso seco, seguido de H-3; los tratamientos H-1 y H-2 al inicio crecen muy juntos separándose posteriormente, y al final del crecimiento H-1 es el que presenta mayor cantidad de peso seguido de H-3 después de H-2 y por último de H-0.

Con el área foliar, figura 15, el comportamiento de los tratamientos es muy similar al de peso seco a excepción del medio H-3 que es el que presenta más crecimiento en la etapa final. En las curvas del \ln de área foliar, figura 16, se puede observar que en aproximadamente la primera mitad del periodo evaluado, H-0 presenta mayor área foliar seguido de H-3, H-2 y por último de H-1; en la segunda mitad del periodo se observa mayor área con H-3 traslapándose al final con H-1; H-2 presenta la menor área foliar y también se llega a traslapar al final con H-0. En general se puede ver que las curvas de los cuatro tratamientos no presentan diferencias muy grandes entre ellas.

2. Coeficiente de área foliar.

El cálculo del CAF, tabla 5, tampoco muestra grandes diferencias entre H-1, H-2 y H-3, solo entre éstos y H-0. Con H-3 se obtuvo mayor producción de área foliar ($338.669 \text{ cm}^2 / \text{g}$) en segundo lugar el tratamiento H-1 ($311.3094 \text{ cm}^2 / \text{g}$) en tercer lugar el H-2 ($303.8011 \text{ cm}^2 / \text{g}$) y por último H-0 ($269.06 \text{ cm}^2 / \text{g}$). sin embargo la eficiencia en producción de materia seca es completamente a la inversa de lo obtenido en el área foliar, va que dentro de una expansión menor de área foliar se obtiene la misma cantidad de peso seco. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el efecto del ácido indol acético durante el crecimiento de la planta, es de aumentar la expansión del área foliar y no en la producción de peso seco, sobre todo en el tratamiento con mayor concentración de la fitohormona (H-3).

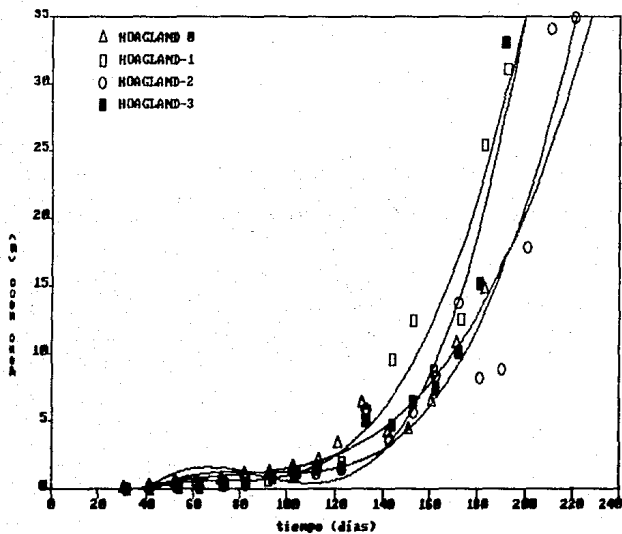


Fig. 13. Curvas de peso seco de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA): testigo H-0, 1 ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3.

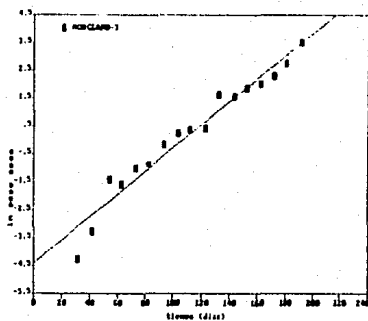
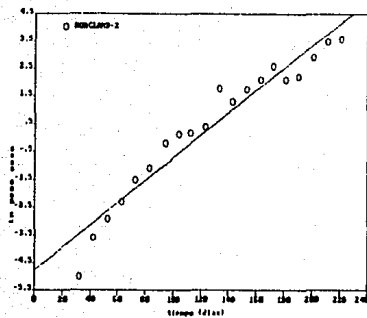
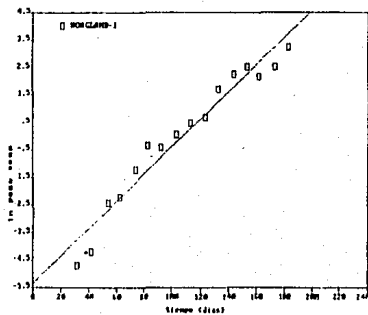
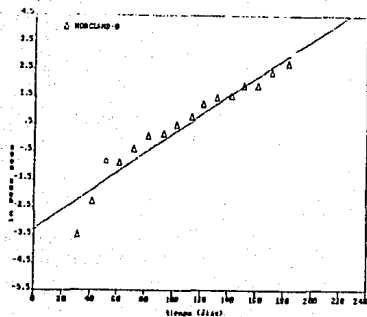


Fig. 14. Curvas del ln de peso seco de *D. purpurea*, cultivada en el medio Howland con diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA): testigo H-0, 1 ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3.

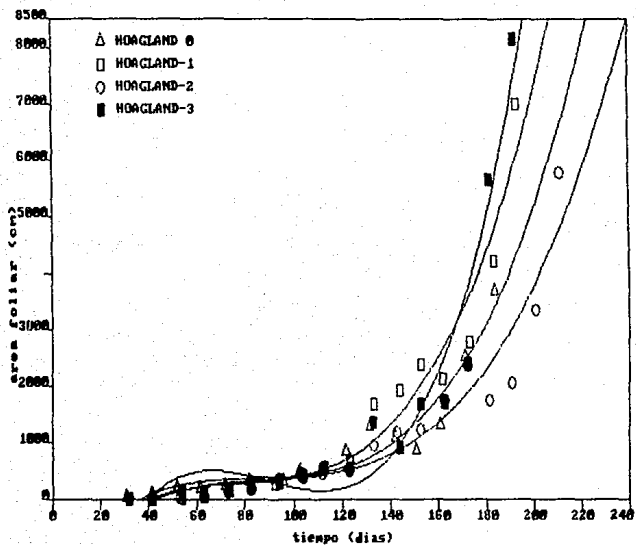


Fig. 15. Curvas del Área foliar de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA): testigo H-0, 1 ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3.

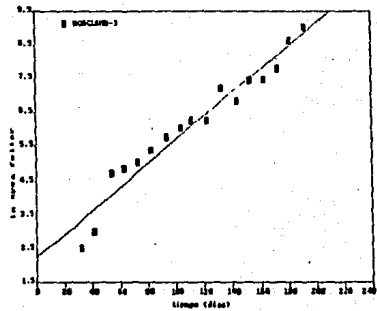
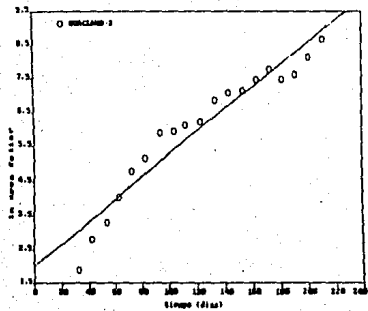
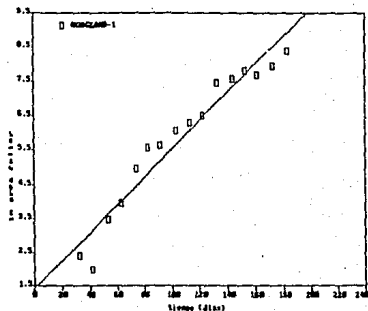
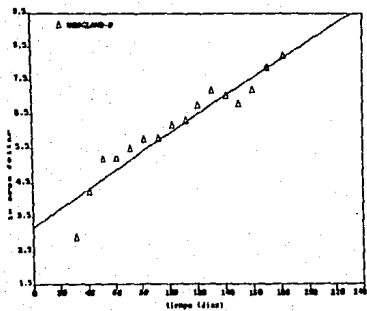


Fig. 16. Curvas del ln de área foliar de *D. purpurea* cultivada en el medio Hoagland con diferentes concentraciones de Ácido indol acético (AIA): testigo H-0, 1 ppm H-1, 10 ppm H-2 y 100 ppm H-3.

TABLA 5. COEFICIENTE DE AREA FOLIAR (CAF).

MEDIO NUTRITIVO	CAF cm ² /g	Kw dias ⁻¹	Wm g	Ka dias ⁻¹	Am cm ²
HOAGLAND	269.06	0.0362	0.830	0.0282	264.76
HOAGLAND 1 ppm	311.3094	0.0481	0.563	0.0399	211.40
HOAGLAND 10 ppm	303.8011	0.0404	0.742	0.0329	276.62
HOAGLAND 100 ppm	338.669	0.0411	0.526	0.0344	255.93

- (Kw) Tasa de crecimiento relativo ;
 (Ka) Tasa de expansión de área foliar relativa ;
 (Wm) peso seco en el punto medio de la curva ;
 (Am) Área foliar en el punto medio de la curva .

Datos obtenidos de la correlación lineal realizada en las curvas logarítmicas de los dos parámetros medidos (W y A) para cada tratamiento.

3. Contenido de cardiotónicos totales.

En las figuras 10, 17, 18 y 19 se presentan las curvas del contenido de cardiotónicos durante el período experimental; observándose que el comportamiento en todos los tratamientos es muy semejante, con fluctuaciones a lo largo del período; la diferencia más marcada entre los cuatro tratamientos se observa con el tratamiento H-2, el cual presenta un contenido promedio más bajo durante todo el período evaluado, en comparación de los otros tres; esto se puede observar comparando los puntos obtenidos respecto a los puntos de los otros tratamientos y con la media aritmética de la producción total (Tabla 6), en donde se observa que el medio H-2 es el que presenta el valor de la media más bajo seguido en forma ascendente del H-3, H-1 y por último del H-0.

Comparando los tratamientos H-1, H-2 y H-3 con el testigo se puede observar lo siguiente: H-1 presenta el comportamiento más

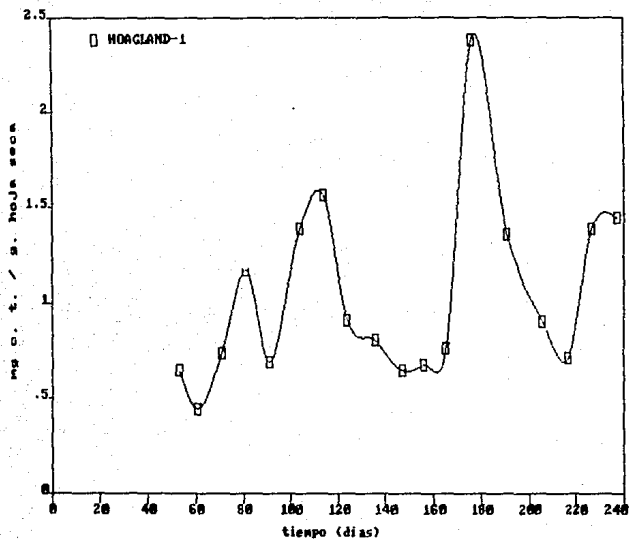


Fig. 17. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea* cultivada en el medio Hoagland con 1 ppm de ácido indol acético (H-1).

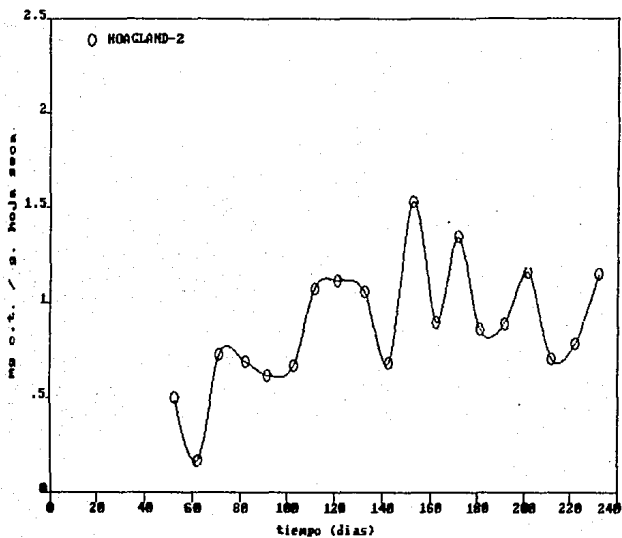


Fig. 18. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con 10 ppm de ácido indol acético (H-2).

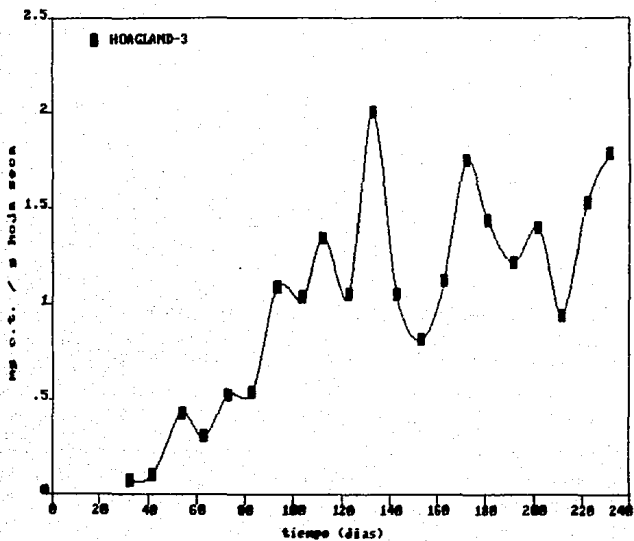


Fig. 19. Variación en el contenido de cardiotónicos totales de *D. purpurea*, cultivada en el medio Hoagland con 100 ppm de ácido indol acético (H-3).

similar a este; durante la primera mitad del periodo experimental (hasta 110 días), ascenso en el contenido de cardiotónicos, y posteriormente una disminución con otro aumento aproximadamente hasta los 180 días. Con H-2 se observa que el contenido de cardiotónicos obtenido es casi la mitad del presentado por H-0, además los puntos de mayor contenido se presentan a tiempos más largos. Con H-3 también se observa un desplazamiento en el tiempo de aparición de los puntos de mayor contenido con respecto al testigo.

Las cantidades máximas y el promedio de la producción (véase la tabla 6), fueron menores en los tratamientos con mayor concentración de fitohormona (H-2 y H-3), mientras que los valores más altos se observaron en los tratamientos H-1 y H-0. El valor de las desviaciones estándar muestran que con el medio H-2 se obtiene un comportamiento más uniforme, seguido de H-1, H-3 y por último del testigo.

En relación a la mayor producción de cardiotónicos H-1 o H-0 serían los más convenientes, pero presentan la mayor variabilidad en el contenido, lo mismo ocurre en el tratamiento H-3. En el medio H-2 se obtiene la menor variabilidad en el contenido de los cardiotónicos, pero el promedio general de su producción y el valor máximo son menores. La variabilidad como ya se explicó en la primera parte de los resultados se cree que se debe al tamaño y edad de las hojas cosechadas, las cuales fueron más homogéneas en el H-2 debido a su lento crecimiento.

En base a los resultados puede establecerse que el AIA tiene un efecto negativo sobre la producción de cardiotónicos y de materia seca, ya que al modificar de alguna manera el crecimiento de la planta también se ve afectada la producción de metabolitos secundarios.

TABLA 6. CONTENIDO MAXIMO DE GLUCOSIDOS CARDIACOS.

Medio nutritivo	GT mg/g hoja seca	t dias	x	st
HOAGLAND	2.0156	196	1.0399	0.5576
HOAGLAND 1 ppm	2.3856	176	1.0362	0.4791
HOAGLAND 10 ppm	1.5281	153	0.8229	0.3499
HOAGLAND 100 ppm	1.9987	133	1.0242	0.5445

(GT) Glucósidos totales mg/g de hoja seca, valor máximo obtenido durante el período experimental; tiempo en días (t); media (x) y desviación estándar (st) del total de valores de cardiotónicos obtenidos en todo el período experimental.

VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.

1. El cultivo hidropónico de D. purpurea permitió evaluar el efecto de los medios nutritivos Hoagland, Schenk-Hildebrant y Schenk-Hildebrant modificado sobre el crecimiento y la producción de cardiotónicos de la planta.

2. Los medios nutritivos Hoagland y Schenk-Hildebrant modificado, no presentaron diferencia significativa sobre la producción de los cardiotónicos, tampoco se observó relación entre la producción de éstos y la de peso seco.

3. El único efecto diferente entre los medios Hoagland y Schenk-Hildebrant modificado fue sobre el tiempo de máxima producción de los cardiotónicos, por lo tanto se considera que los dos medios son apropiados para el cultivo de D. purpurea.

4. Se sugiere que la cosecha en el medio SHM se realice a la edad de tres meses y medio y no más de 170 días; para el medio H-O la cosecha debe hacerse a partir de los 100 días y no más de 200 días. A este tiempo se puede obtener una cantidad adecuada de cardiotónicos: 1.6 mg/g de hoja seca para el medio Hoagland y 1.78 mg/g de hoja seca para el SHM.

5. La adición de AIA en diferentes concentraciones (1, 10 y 100 ppm) al medio Hoagland, retarda y disminuye la producción de cardiotónicos.

6. Se sugiere que las semillas utilizadas para el experimento sean de una misma planta de tal manera que exista mayor uniformidad genética dentro de las plantas cultivadas.

7. Se recomienda disminuir el número de semillas por charola, con el fin de proporcionar una mayor área para el crecimiento de las plantas.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcántara A. Tesis Q.F.R. "Desarrollo de una técnica colorimétrica para la cuantificación de tevetósidos cardiotónicos." UNAM. México, (1982).
2. Arnon D. I. and Hoagland D. R.; "Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients". Soil Sci. 50, 463-84, (1940).
3. Balbaa S., Hilal S. and Haggag M.; "The effect of irrigation and nitrogenous fertilizers on the growth and glycosidal content of Digitalis lanata". Planta Medica 20, suppl. 54-59, (1971).
4. Beltrán P. E. (1989). Tesis Maestría. "Estudio Sobre la implementación de un cultivo de células vegetales de D. purpurea para la biotransformación de glucosidos cardíacos. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.
5. Bhaqirath S. and Rastogi R. P.; "Cardenolides-Glycosides and Geninas". Phytochemistry, 2 (1970), 315-331.
6. Bhat B. K. and Pandita P. N.; "Digitalis a medicinal plant". Regional Research Laboratory (Branch). Sinagar, Jamm & Kashmir. p. 26-27.
7. Bidwell R.G.S. Plant Physiology. Ed. Collier Macmillan International. 2nd. ed. London 1974. pp. 247-407, 705- .
8. Bowman W.C. Textbook of Farmacology. Ed. Blackwell Sci. 2nd. ed. London, 1970, pp.22.70-22.71
9. Carl A. L. Auxins and Plant Growth. University of California Press. Barkeley and Los Angeles. USA, 1955.
10. Caspi E. and Hornby G. M.; "Biosynthesis of plants sterols-III mechanism of saturation of ring B Pregnenolone during its conversion to digitoxigenin in Digitalis lanata". Phytochemistry, 7, 423-427 (1968).
11. Claus E. P. Tyler V. E. Jr. Pharmacognosy. Fifth ed. Lea and Febiger, 1977.
12. Coombs J., et. al.; Técnicas en fotosíntesis y bioproduktividad. Colegio de Postgraduados Chapingo, Edo. de Mex. Editorial Futura, S.A. México 1988. pp 17-20.

13. Craker L. E. and Simon J. E. Herbs, Spices and Medicinal Plants: Recent Advances in Botanic, Horticulture and Pharmacology. Vol. 1. Oryx Press, USA, 1986, pp 185-205.
14. Evans F. J. and Cowley P. S.; "Cardenolides and spirostanoles in Digitalis purpurea at various stages of development". Phytochemistry, 11, pp. 2971-2975 (1972).
15. Font P. Dr. Plantas Medicinales. 6a. ed. Labor. México 1980, pp. 619-623.
16. Garve R., Luckner M.; "Growth, morphogenesis and Cardenolide formation in long-term cultures of Digitalis lanata". Planta Medica, 40, pp 92-103 (1980).
17. Goldstein A. K. Farmacologia. Ed. Limusa. Mexico, 1979, pp. 210-212 y 880-882.
18. Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 6a. ed. Ed. Medica Panamericana. México, 1982, pp. 721-747.
19. Gunter Th. W. and Linden H. H.; "Cardiac glycosides: prerequisites for the development of new cardiotoxic compounds". Experientia, 33(6), 697-836, (1977).
20. Hagimori M., Matsumoto T. and Ohi Y.; "Effects of mineral salts, initial pH and precursors on digitoxin formation by shoot-forming cultures of Digitalis purpurea L. growth in liquid media". Agric. Biol. Chem., 47 (3), 565-571, (1983).
21. Hirotsani M. and Furuya T.; "Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of Digitalis purpurea". Phytochemistry 16, 610-611 (1977).
22. Hoagland D. R. and Arnon D. I.; "The water-culture method for growing plants without soil". California Agricultura Experiment Station. Circular 347. January 1950.
23. Kartnig T.; "Comparative studies on the cardenolide and flavonoid-patterns in leaves of Digitalis purpurea different stages of development". Planta Biochem. 98, 403, (1983).
24. Korolukovas A. Compendio Esencial de la Química Farmacéutica. Ed. Reverté. Barcelona España. (1979). pp. 389-395.

25. Ludn M. El. *Digitalis* y Otras Drogas Cardiotonicas. 2a. ed. Oxford Medical Publications. New York, 1949.
26. Maier M. S., Seldes A. M. y Gros E. G.; "Biosynthesis of the butenolide ring of cardenolides in *Digitalis purpurea*". Phytochemistry, 25(6), 1327-1329 (1986).
27. Moore T. C. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer Verlag. New York Inc. USA, 1979, pp. 43-50.
28. Fál Nanası and Béla Lenkey; "Cardenolide glycoside production in *Digitalis lanata*". Phytochemistry, 14, 1755-1757, (1975).
29. Potter J. R. and Jones J. W.; "Leaf area partitioning and important factor in growth". Plant Physiol. 59, 10-14, (1977).
30. Reyes C.A. Hidroponia Guia para el Principiante. Corporación Hidroponica de México S.A. de C.V. México. D.F. 1984
31. Rojas M. La Acción Fundamental de las Auxinas. Publicaciones del Tecnológico y Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey Mexico, 1963.
32. Sánchez F. y Escalante E. Un Sistema de Producción de plantas, Hidroponia Principios y Metodos de Cultivo. U.A.Ch., México, 1983.
33. San Martín C.R. Farmacognosia Descriptiva. Ed. Científica-Médica. Barcelona España. (1967). pp. 87-98.
34. Stohs S.J. and Rosenberg H.; "Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures". Lloydia, 30(3), 181-194, (1975).
35. The United States Pharmacopeia Convention. "The Pharmacopeia of United States of America". 21th rev. Mack Printing Company, Easton Pa. 18042.
36. Trease G.E. y Evans W. C. Tratado de Farmacognosia, 12a. ed. Ed. Interamericana. México, D.F. 1987.
37. Tsao and Yougken; "Studies of the effects of seasons, temperature, and plant age on glycoside production in *Digitalis purpurea*". J. Am. Pharm. Ass. 41(1), 19-22, (1952).
38. Wagner H., et al., Plant Drug Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany 1984, pp 198-211.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

39. Wareing P.F. and Phillips I.D.J. Growth and Differentiation in Plants. Ed. Pergamon Press. 3a. ed., Great Britain, 1981, pp. 40-57.
40. Weiler, E. W.; "Radioimmunoassay for determination of digoxin and related compounds in Digitalis lanata". Phytochemistry **15**, 1537-45 (1976).
41. Younken H. W. Tratado de Farmacognosia. Ed. Atlanta S.A. Mexico. (1961). pp. 1020-1033.