



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN
DE *Hippocratea excelsa* Kunth SOMETIDOS A
DOS TIPOS DE ESTRÉS Y SU RESPUESTA
EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSEFINA HERRERA SANTOYO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

México, D. F.

SEPTIEMBRE, 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.

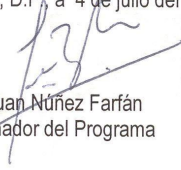
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de diciembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna JOSEFINA HERRERA SANTOYO con número de cuenta 80147932, con la tesis titulada: "Cultivos de células en suspensión de *Hippocratea excelsa* Kunth sometidos a dos tipos de estrés y su respuesta en la producción de metabolitos secundarios", bajo la dirección de la Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón.

Presidente:	Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Vocal:	Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Vocal:	Dr. Federico García Jiménez
Vocal:	Dr. Eduardo Aranda Escobar
Secretario:	Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón
Suplente:	Dr. Héctor Guillermo Barrios López
Suplente:	Dr. Guillermo Delgado Lamas

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de julio del 2007.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por todas las facilidades otorgadas para que este trabajo llegara a su término.

Al Comité Tutorial:

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón **Directora de la Tesis.**

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Dr. Guillermo Delgado Lamas

por todos estos años de acompañamiento, enseñanzas, dirección y dedicación.

A la M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores por su dirección, siempre acertada, del trabajo en el cultivo de tejidos, por su incondicional apoyo y múltiples enseñanzas.

A los Miembros del Jurado:

Dr. Barbarín Arreguín Lozano

Dr. Federico García Jiménez

Dr. Eduardo Aranda Escobar

Dr. Héctor Guillermo Barrios López

por todas las observaciones y comentarios que hicieron del trabajo, por su tiempo, paciencia y experiencia.

Al Dr. Humberto López Delgado del INIFAP Metepec, Estado de México, por el estrés oxidativo.

A todos los que estuvieron y también a *los que no estuvieron*

Gracias por la confianza

ÍNDICE GENERAL

1..	RESUMEN.	1
1.1.	resumen	1
1.2.	abstract	2
2..	INTRODUCCIÓN.	4
3..	ANTECEDENTES.	12
3.1.	Estrés	13
3.2.	Estrés oxidativo	17
3.3.	Obtención de metabolitos secundarios en cultivo de tejidos	20
3.4.	<i>Hippocratea excelsa</i>	29
3.4.1.	<i>Usos en la medicina tradicional de la especie.</i>	29
3.4.2.	<i>Estudios de Actividad Biológica.</i>	31
4..	JUSTIFICACIÓN.	36
5..	OBJETIVOS.	39
6..	MATERIALES Y MÉTODOS.	41
6.1.	Material Biológico.	41
6.1.1.	<i>Recolectas</i>	41
6.2.	Cultivo de tejidos vegetales.	41
6.2.1.	<i>Aspectos generales.</i>	41
6.2.2.	<i>Cultivo de semillas.</i>	42
6.2.3.	<i>Establecimiento del callo.</i>	42
6.3.	Ensayo preliminar de estrés en callo.	45
6.3.1.	<i>Estrés oxidativo.</i>	45
6.3.2.	<i>Cuantificación de canofilol.</i>	47
6.4.	Establecimiento del cultivo de células en suspensión.	49
6.4.1.	<i>Obtención de la cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión.</i>	50
6.5.	Aplicación del estrés a los cultivos de células en suspensión.	51
6.6.	Análisis químico.	52
6.6.1.	<i>Separación cromatográfica del extracto hexánico de la corteza de raíz.</i>	52
6.6.2.	<i>Obtención de extractos de los cultivos de células en suspensión.</i>	53
6.6.3.	<i>Análisis cromatográfico de los extractos.</i>	54

7.	RESULTADOS.	56
7.1.	Cultivo de tejidos.	56
7.1.1.	<i>Actividad de la enzima catalasa y contenido de H_2O_2 en callos.</i>	57
7.2.	Ensayo preliminar de estrés en callo.	59
7.2.1.	<i>Estrés oxidativo en los tratamientos con estrés nutricional.</i>	59
7.2.2.	<i>Estrés oxidativo en los tratamientos con estrés osmótico.</i>	60
7.2.3.	<i>Relación peso fresco/ peso seco.</i>	61
7.2.4.	<i>Rendimiento de los diferentes extractos obtenidos.</i>	63
7.2.5.	<i>Cuantificación de canofilol.</i>	64
7.3.	Cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión.	65
7.4.	Cultivos de células en suspensión sometidos a estrés.	66
7.5.	Análisis químico.	69
7.5.1.	<i>Separación cromatográfica del extracto hexánico de la corteza de raíz.</i>	69
7.5.2.	<i>Obtención de extractos de los cultivos de células en suspensión.</i>	71
7.5.3.	<i>Análisis cromatográfico de extractos.</i>	72
8.	DISCUSIÓN.	81
8.1.	Ensayo preliminar de callo.	83
8.1.1.	<i>Actividad de la enzima catalasa.</i>	84
8.1.2.	<i>Contenido de canofilol.</i>	85
8.1.3.	<i>Estrés nutricional.</i>	86
8.1.4.	<i>Estrés osmótico.</i>	87
8.2.	Estrés en células en suspensión.	88
9.	CONCLUSIONES.	92
9.1.	Perspectivas.	93
	ABREVIATURAS.	95
	BIBLIOGRAFÍA.	96

1. RESUMEN.

1.1. resumen

Las especies vegetales son reconocidas como importantes fuentes de una amplia gama de compuestos que, potencialmente pueden ser usados como drogas, insecticidas, saborizantes y fragancias. Estas sustancias han sido extraídas de plantas que crecen en sus ambientes naturales, sin embargo, la producción es limitada y sujeta a las variaciones del propio ambiente. El cultivo de tejidos vegetales provee alternativas a la producción de metabolitos secundarios y puede ser una herramienta muy atractiva bajo ciertas condiciones, como por ejemplo, cuando la planta es difícil de cultivar, cuando la especie tiene un largo periodo de cultivo, un bajo rendimiento del compuesto de interés, o si la síntesis química no es factible, tecnológica o económicamente. Aunque los cultivos celulares han mostrado una capacidad limitada para la acumulación de metabolitos secundarios, en muchos trabajos se ha mostrado un incremento en los rendimientos como resultado de algún estrés inducido.

En este trabajo se utilizó como modelo biológico el cultivo *in vitro* de callos y células en suspensión de *Hippocratea excelsa*, para determinar el efecto de dos diferentes tipos de estrés; nutricional (por disminución de nitrógeno) y osmótico (con polietilenglicol) sobre la producción de algunos metabolitos secundarios, teniendo como principal objetivo evidenciar una posible relación entre un estado de estrés del organismo con el incremento en la producción de compuestos secundarios en cultivos celulares de *H. excelsa*.

Se realizaron experimentos con dos intensidades para cada estrés. Los resultados mostraron

que los callos de *H. excelsa* respondieron diferencialmente dependiendo del tipo de estrés al que se sometieron, tanto en la producción de canofilol, como en la actividad de la enzima catalasa, enzima relacionada a factores de estrés. En estos cultivos de callo, la mayor deficiencia de nitrógeno (25%), si resultó ser una condición de estrés, mientras que todas las demás condiciones experimentadas (tanto nutricionales como osmóticas) sólo fueron una tensión ambiental que no modificaron la armonía de los cultivos con su ambiente. El incremento del canofilol (metabolito secundario) sólo se observó en el estrés nutricional, en el estrés osmótico no se observó incremento de este compuesto. En los cultivos de células en suspensión la respuesta, en la producción de compuestos secundarios, dependió del tipo de estrés al que fueron expuestos; en los extractos obtenidos de los cultivos sometidos a estrés nutricional se observó una mayor cantidad de terpenos, mientras que en los extractos del estrés osmótico el incremento se observó en los alcaloides.

1.2. abstract

Plants are considered as important sources of a wide variety of compounds that possess interesting activities and find applications, such as drugs, insecticides, flavors and fragrances. These compounds have been extracted from plants grown in their environment, however, the production is limited and depends also on the environmental conditions. The plant tissue culture provides alternatives to the production of secondary metabolites and should be an attractive tool under certain conditions, such as, when the plant is difficult to cultivate, has a long period of culture, or if the chemical synthesis is not feasible, technological and economical. Even though the plant cell cultures have shown a limited capacity to accumulate secondary metabolites, many works have reported an increase in their production as a result of any type of stress. In this work, cells and callus cultures of *H. excelsa* were used as a model to determine the effect of two stresses: nutritional (by reducing the amount of nitrogen) and

osmotic (using polyethylene glycol) on the production of some secondary metabolites. The main objective was to evidence a possible relationship between a kind of stress with the enhance of the secondary metabolites production in cells cultures of *H. excelsa*. Two amounts were applied. The results showed that the responses of canophyllol production and catalase activity in *H. excelsa* callus were different according to the different stress factors applied

In the callus culture, the highest nitrogen deficit (25%) was a really stress condition, whereas the other experimental stress conditions (such as nutritional and osmotic) were only an environmental tension that did not modify the harmony of the cultures. The canophyllol increment was only observed in the nutritional stress. In the plant cell cultures, the secondary metabolites production depends on the kind of stress. The extracts obtained of cell cultures submitted to nutritional stress showed a highest amount of terpenes, whereas in the extracts submitted to osmotic stress, an increment in the alkaloids production was observed.

2. INTRODUCCIÓN.

Los productos del metabolismo secundario vegetal son de gran interés para el hombre por sus diferentes actividades biológicas, desde antibióticas, insecticidas, hormonales así como importantes actividades farmacológicas, farmacéuticas, etc. Los productos naturales también llamados metabolitos secundarios, están restringidos a familias, géneros e incluso a especies; estos compuestos en su mayoría no son importantes para el metabolismo primario de la planta, pero en muchos casos son de gran importancia para la sobrevivencia de la planta en su ambiente, ya que contribuyen significativamente en medidas de defensa contra condiciones adversas, bióticas o abióticas (Alfermann y Petersen 1995). Grime (1981) define a estas condiciones adversas o estrés, como las restricciones externas que limitan la producción de peso seco de toda o parte de la vegetación, por ejemplo falta de agua, luz, nutrientes, minerales y temperaturas subóptimas, así como exceso de luz UV, ataque por microorganismos o agentes químicos, o manipulación genética. Estas limitantes pueden ser una característica inherente al ambiente, o pueden ser inducidas o intensificadas por la misma vegetación. La palabra estrés se usa para definir una limitante externa en la producción de peso seco difiere de la de otros fisiólogos, quienes han usado el término para describir el estado fisiológico de la planta. La definición de Grime podría ser aplicada al cultivo de tejidos; estrés, en este caso, sería cualquier tipo de limitante que reduce el peso seco de los cultivos.

DiCosmo y Towers (1984) definen el estrés cómo las condiciones limitantes externas en un cultivo celular las cuales modifican la producción normal de metabolitos secundarios, denominándolo estrés fitoquímico para ser absolutamente específicos. Existe una extensa

literatura con evidencias que indican como diferentes tipos de estrés, afectan notablemente la fisiología y el metabolismo secundario de cultivos de tejidos vegetales (ver tabla 2.1); sin embargo, el efecto no siempre es predecible.

Tab. 2.1: Efecto de diferentes tipos de estrés en la producción de metabolitos secundarios.

Tipo de Estrés	Incremento de:	Especie	Referencias
Incremento de glucosa	alcaloides	<i>Choisya ternata</i>	Gras y col., 1982
	antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i>	Zenk y col, 1977
Incremento de sucrosa	fenoles	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Westcoot y Henshaw, 1976
	alcaloides y fenoles	<i>Catharanthus roseus</i>	Zenk y col., 1977, Knobloch y col., 1982, Doller, 1978 y Knobloch y Berlin, 1980
	ácido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	Zenk y col., 1977
	diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Tal y col., 1982
	antraquinonas	<i>Galium mollugo</i>	Bauch y Leistner, 1978
	taninos	<i>Juniperus communis</i>	Constabel, 1968
	shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Mizukami y col., 1977
	antocianinas	<i>Populus sp.</i>	Matsumoto y col., 1973

Continúa en la siguiente página

Tipo de Estrés	Incremento de:	Especie	Referencias
	solasodina	<i>Solanum laciniatum</i>	Chandler y Dodds, 1983
Decremento de sucrosa	escopoletina y escopolina	<i>N. tabacum</i>	Okazaki y col., 1982
Eliminación de nitrógeno mineral	alcaloides, antocianídicos y fenólicos	<i>C. roseus</i>	Knobloch y Berlin, 1982
	solasodina	<i>Solanum laciniatum</i>	Chandler y Dodds, 1983
Adición de fenilalanina	ácido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	Zenk y col, 1977
	alcaloides	<i>Scopolia acutangula</i>	Kuang-Chich y Cheng, 1981
Adición de triptofano	alcaloides indólicos	<i>Catharanthus roseus</i>	Khanna y col., 1978
Incremento de P_i	alcaloides	<i>Catharanthus roseus</i>	Carew y Krueger., 1977
Decremento de P_i	alcaloides, antocianídicos y fenólicos	<i>C. roseus</i>	Knobloch y col., 1982 y Knobloch y Berlin, 1980
	alcaloides	<i>Paganum harmala</i>	Nettleship y Slaytor, 1974 y Sasse y col., 1982
	solasodina	<i>Solanum laciniatum</i>	Chandler y Dodds., 1983

La presencia y cantidad de numerosos metabolitos secundarios en plantas son dependientes de diversos factores como: la etapa fisiológica, la edad y las condiciones de crecimiento (Wink, 2003). La capacidad de síntesis de algunos compuestos secundarios ha sido seleccionada durante el curso de la evolución en diferentes linajes vegetales cuando estos compuestos favorecieron la solución de alguna necesidad específica, por ejemplo, las esencias florales y pigmentos han evolucionado para atraer insectos polinizadores y han mejorado la tasa de fertilización, la biosíntesis de compuestos tóxicos ha evolucionado a prevenir a las especies vegetales de algunos patógenos y herbívoros (desde bacterias y hongos hasta insectos y mamíferos) o a inhibir el crecimiento de plantas vecinas. Las soluciones químicas a problemas comunes pueden ser distintas en los diferentes grupos taxonómicos, vemos como ejemplo que los compuestos que constituyen los aceites esenciales varían entre las especies vegetales, estos diferentes aromas pueden atraer a la misma clase de polinizadores (Pichersky y Gang, 2000). El metabolismo primario no sólo proporciona precursores al metabolismo secundario, sino que muchos de estos precursores son también importantes para la síntesis de constituyentes celulares. Por esta razón, existe frecuentemente una competencia por estos precursores entre procesos de crecimiento y metabolismo secundario. Como una consecuencia, la síntesis de metabolitos secundarios ocurre especialmente cuando el crecimiento es lento o ausente, frecuentemente después de completar los procesos de diferenciación. En cultivo de tejidos vegetales la síntesis de metabolitos secundarios puede ser baja (Van der Plas y col., 1995), sin embargo, los rendimientos obtenidos por los cultivos celulares o de tejidos pueden ser significativamente más altos que los que se obtienen de las plantas completas (ver tabla 3.2 de la página 25). Además, se puede obtener de los cultivos *in vitro*, nuevos compuestos que no se han aislado de las plantas y que se sintetizan *de novo* (ver tabla 2.2 de la página 8) o en mayor cantidad en cultivos celulares (Hippolyte y col., 1992; Zhong y col., 1994; Verpoorte y col., 2000).

Tab. 2.2: **Compuestos producidos en cultivos celulares no detectados en la especie respectiva.**

Compuesto	Especie	Referencia
Panicúlidos A, B y C	<i>Andrographis paniculata</i>	Butcher y Connolly, 1971
Equinona	<i>Echium lycopsis</i>	Tabata y col., 1982
Equinofurano	<i>Echium lycopsis</i>	Tabata y col., 1982
19- <i>epi</i> -ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>	Stockigt y col, 1976
Pericina	<i>Picralima nitida</i>	Arens y col., 1982
Aromolina	<i>Stephania cepharantha</i>	Akasu y col., 1976
Homodeoxyharringtonina	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Delfel y Rothfus, 1977

Factores de estrés como patógenos, deficiencia de nutrientes, deficiencia de agua, temperatura e iluminación pueden afectar significativamente la química de las plantas. (Harborne, 1988 en Julkunen-Tiitto y col., 1996). Sin embargo, poco se conoce sobre la relación que existe entre la producción de metabolitos secundarios y los mecanismos que la desencadenan. La síntesis de muchos compuestos secundarios en las plantas está asociada frecuentemente con la respuesta de defensa de las mismas, a infecciones de patógenos y a estímulos ambientales, esta respuesta involucra una cascada de eventos fisiológicos en las células involucradas, tales como, cambios en el potencial de membrana y flujos iónicos, inducción del estallido oxidativo, activación de genes relacionados con la defensa y síntesis de metabolitos secundarios (Low y Merida, 1996). El estallido oxidativo es uno de los primeros eventos de la respuesta de defensa en las plantas, lo que corresponde a una producción transitoria de especies reactivas de oxígeno (Ye y col., 2004). El metabolismo secundario vegetal tiene múltiples funciones en todo el ciclo de vida de las plantas y forma parte del sistema de defensa vegetal, por ejemplo, la producción de compuestos con actividad antialimentaria y fitoanticipinas, así como la

producción inducible de fitoalexinas, un grupo de gran diversidad estructural de compuestos de defensa que incrementa de 2 a 3 veces después de la inoculación de un patógeno o por elicitación, en muchos casos, estos compuestos no son detectados en plantas no estimuladas (Poulev y col., 2003).

El conocimiento de los mecanismos que regulan la producción de metabolitos secundarios, además de ayudar a comprender las diferentes respuestas de las plantas, ante los estímulos ambientales, es una herramienta potencial para la producción comercial de los mismos. Algunas hipótesis sugieren que las plantas tienen un mecanismo centralizado de respuesta a los diferentes tipos de estrés (Chapin, 1991); sin embargo, poco se ha hecho para determinar si las respuestas son específicas del tipo de estrés, debido a la complejidad de estímulos que las especies enfrentan en su ambiente natural.

La tecnología del cultivo de tejidos ha sido central para estudios básicos y para intentar una explotación industrial de ciertos metabolitos secundarios, ya que permite el control de las condiciones ambientales para observar el efecto de uno o varios estímulos. Sin embargo, cuando se mantienen los cultivos bajo condiciones óptimas de crecimiento se origina frecuentemente el "apagado" de la producción de metabolitos secundarios. La producción puede activarse de nuevo por alteraciones en los niveles nutricionales u hormonales, modificando las condiciones de luz o el régimen de temperatura, por selección genética y por manipulación de factores ambientales y también se hace posible, por otra parte, obtener rendimientos de productos secundarios en cantidades comparables o mayores de las que se producen en la planta *in vivo* (DiCosmo y Towers, 1984). Sin embargo, el uso comercial de estos cultivos no es rutinario debido a falta de logros aceptables, tales como niveles reproducibles del producto en periodos razonables de tiempo. Un incremento en la productividad en volumen es crucial para una comercialización potencial. Los cultivos de células vegetales son un sistema flexible, fácilmente manipulable para incrementar los rendimientos del producto (Roberts y Shuler, 1997), provee alternativas a la producción de metabolitos secundarios y puede ser una

herramienta muy atractiva bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, cuando la planta es difícil de cultivar; cuando la especie tiene un largo periodo de cultivo o tiene un bajo rendimiento del compuesto; o si la síntesis química no es factible, tecnológica o económicamente (Rao y Ravishankar, 2002).

Generalmente los cultivos celulares muestran una curva de crecimiento sigmoideal caracterizado por un metabolismo balanceado de todos los nutrientes esenciales con una pequeña acumulación de productos secundarios, seguido de la terminación de este flujo metabólico por la disminución de nutrientes o por alteración del medio. Es posible que cuando la velocidad de crecimiento disminuye, los aminoácidos, nucleótidos y precursores se acumulen. La reducción del flujo metabólico primario provoca un estrés en las células, las cuales disminuyen su crecimiento y provocan perturbaciones enzimáticas específicas. Algunas evidencias sugieren que la síntesis de productos secundarios es mayor cuando la velocidad de crecimiento, la cantidad de minerales, carbohidratos y oxígeno disminuyen, aunque en algunos otros ejemplos la acumulación de aminoácidos y otros precursores se encuentran involucrados en la estimulación del metabolismo secundario (DiCosmo y Towers 1984). En relación a la producción de metabolitos secundarios respecto al crecimiento, se han propuesto dos modelos, en el primero, se observa una relación inversa entre el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios, es decir a mayor crecimiento menor producción de compuestos secundarios, en el segundo modelo la relación entre el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios es directa (Baiza y col., 1998).

Una de las metas del estudio del metabolismo secundario en cultivo de tejidos es la de activar secuencias metabólicas específicas que conduzcan a la producción de compuestos químicos de interés industrial o medicinal.

Dentro de la gran cantidad de plantas medicinales usadas en México, se encuentra *Hippocratea excelsa* Kunth conocida como "cancerina". Es una especie que tiene una distribución restringida en el país, y de la cual se utiliza la corteza del tallo y de la raíz, esta última con

mayor frecuencia, situación que hace que la especie sea devastada de sus ambientes naturales. La forma de crecimiento de la especie, la utilización que de ella hace el hombre, la restricción en la distribución geográfica, así como el número de individuos que se han observado en las diferentes recolectas, han hecho reflexionar en la problemática de establecimiento y permanencia que esta especie tendrá en un futuro próximo dentro de los ecosistemas. Por estas razones, se hacen necesarios estudios que permitan la conservación y manejo de este tipo de recursos.

En este trabajo se utilizó como modelo biológico a *H. excelsa* por ser una especie medicinal, utilizando al cultivo de tejidos como herramienta para evaluar el efecto de dos diferentes tipos de estrés, nutricional y osmótico, en la producción de metabolitos secundarios.

3. ANTECEDENTES.

En general, en la obtención de medicinas naturales de especies vegetales se involucran procesos de extracción que son frecuentemente costosos debido a los bajos rendimientos, y a que el compuesto deseado frecuentemente se encuentra disponible sólo en ciertas estaciones del año (Zobayed y col., 2003).

Los metabolitos secundarios están presentes en todas las plantas superiores, por lo general en una gran diversidad estructural. Como regla general, un solo grupo de metabolitos secundarios domina dentro de un taxón determinado.

Asumiendo que las condiciones necesarias de cultivo *in vitro* para el crecimiento vegetal, no son inhibitorias para la producción de los metabolitos secundarios, la elicitación es una de las aproximaciones más efectivas para incrementar los rendimientos de los metabolitos secundarios, debido a que asemeja las condiciones ambientales adversas a las que las plantas responden con la producción de estos compuestos. En muchos casos, la inducción de metabolitos por elicitación resulta de una activación transcripcional de genes que codifican las enzimas de una ruta metabólica particular, como parte de un interruptor masivo en el metabolismo.

El estímulo es percibido por los receptores, lo que produce entonces una activación de mensajeros secundarios; estos transmiten la señal a la célula a través de rutas de transducción que impactan primero en la expresión génica y después en cambios bioquímicos. Son varios los componentes involucrados desde la percepción de la señal hasta el establecimiento de la respuesta, entre estos compuestos encontramos a las poliaminas, al calcio, los jasmonatos, los

salicilatos, al etileno, a las hormonas, a las especies reactivas de oxígeno así como a los oligo y polisacáridos. El papel de estos compuestos en la respuesta a los estímulos ambientales y su interacción dentro de la célula está siendo establecida (Sudha y Ravishankar, 2002).

3.1. *Estrés*

Las plantas de climas templados, viven en ambientes que cambian, no sólo con las estaciones, sino de un momento a otro. Estos rápidos cambios ambientales en gran parte involucran fluctuaciones en luz, temperatura y están asociados íntimamente con procesos metabólicos, por ejemplo, la variación en la luz, la cual suministra energía para la fotosíntesis y tiene efectos inmediatos en el metabolismo, mientras que el déficit de agua disminuye la apertura de los estomas y por lo tanto limita la entrada de dióxido de carbono y cambia el balance entre fotosíntesis y fotorespiración. La fuente y concentración de nitrógeno (nitratos *vs* amonio) influye en la localización de aminoácidos (raíz o tallo) y velocidad de asimilación; por lo tanto, requiere un balance dinámico entre fotosíntesis, partición del carbono y asimilación del nitrógeno (Smirnoff, 1995). Cada cambio de un factor ambiental influye en el crecimiento y desarrollo de la planta. Pero cada desviación de un factor de su condición óptima no es necesariamente un estrés para una planta aclimatada a este ambiente. El estrés comienza con una presión (biótica o abiótica) o con una gran fluctuación impredecible impuesta en un patrón metabólico regular, que causa tensión física. Estrés, en el sentido de un estresor o inductor de estrés (Cassells y Curry, 2001), es un factor usual o extraño, del ambiente biótico o abiótico modificado de tal manera (exceso o déficit), que tiene la capacidad de causar daño físico, enfermedad, o fisiología aberrante. La enfermedad es considerada como una condición del organismo (animal o planta) o una de sus partes que perjudica la realización de una o varias funciones vitales, como una respuesta a factores ambientales o defectos genéticos inherentes. Estrés en el sentido del estado fisiológico, es una condición causada por factores

que tienden a alterar el equilibrio (Nilsen y Orcutt, 1996).

Debido a que las plantas están confinadas al lugar donde crecen, tienen una capacidad limitada para evitar cambios desfavorables impredecibles en sus ambientes (confrontación de temperaturas extremas, escasez de agua, insuficiente o excesiva luz o nutrientes minerales, ataque por bacterias patógenas, hongos y virus). Ellas han desarrollado estrategias moleculares para defenderse contra los diferentes tipos de estrés, bióticos o abióticos, combinadas frecuentemente con una alteración del crecimiento y patrones de desarrollo. Esto explica por qué el concepto de estrés está íntimamente asociado con las condiciones externas que afectan adversamente el crecimiento de la planta, su desarrollo y productividad (Lutts y Kinet, 1998).

Otros autores definen al estrés como cambios en la fisiología que ocurren cuando las especies son expuestas a condiciones extraordinariamente desfavorables que no necesariamente representan una amenaza de vida, pero que inducirán una respuesta de alarma (Larcher, 1980). Las respuestas de alarma son defensivas o adaptativas al estímulo. Esta definición puede ser difícil de usar, por ejemplo, si las plantas son expuestas a radiación solar excesiva y el agua es retenida dentro de la planta, las hojas pueden marchitarse. El marchitamiento puede ser perjudicial para la planta a corto plazo porque la ganancia de carbono es inhibida, pero el marchitamiento puede ser importante para la sobrevivencia a largo plazo porque la temperatura de la hoja puede mantenerse suficientemente baja por la evapotranspiración para evitar el daño permanente. Por lo tanto, el marchitamiento es tanto perjudicial como una respuesta ventajosa ante una baja disponibilidad de agua y ante grandes cantidades de luz (Nilsen y Orcutt, 1996). Esta distinción, poco clara, entre mecanismos adaptativos y efectos perjudiciales en la fisiología apunta a la consideración del término adicional de tensión (Levitt, 1980).

La diferencia entre estrés y tensión viene de aplicar el significado utilizado en ingeniería de este término a sistemas biológicos. La definición biofísica de estrés es: la fuerza aplicada al sistema dividida por el área en la que se aplica la fuerza (presión). El término estrés, en un

sentido fisiológico, es por lo tanto reflejo de la cantidad de cambios ambientales que afectan la fisiología de un organismo. La tensión es definida como cualquier cambio fisiológico en un organismo como consecuencia del estrés y puede ser caracterizada como un cambio fisiológico que ocurre en respuesta al estrés ambiental que no provoca una reducción significativa de crecimiento o de la reproducción (Levitt, 1982).

De acuerdo a Strasser (1988), la tensión es un cambio físico y/ o químico producido por un estrés; es aquella condición que mueve al organismo de su estado termodinámico óptimo. El estado es llamado óptimo cuando el sistema biológico está en total armonía con su ambiente y esto se da cuando el sistema no cambia en absoluto alguna actividad o conformación. Para resumir, el término estrés puede ser usado para indicar el agente estresor (que es el factor usual o extraño modificado de tal manera, exceso o déficit, que tiene la capacidad de causar daño físico o enfermedad), o para nombrar la acción que provoca una respuesta de alarma para condiciones extraordinariamente desfavorables, en general relacionada al estado fisiológico alterado que daña la realización de una función vital (Kevers y col., 2004).

Los mecanismos que permiten sobrevivir al estrés son llamados mecanismos de resistencia y permiten al organismo tolerar o evadir el estrés (figura 3.1). Estas respuestas fisiológicas a los estresores pueden dividirse en tres opciones:

- 1) Tolerancia, en la cual las plantas tienen mecanismos que mantienen una actividad metabólica alta bajo condiciones de estrés moderado (similar a la que hay en ausencia del estrés) y reducen dicha actividad bajo estrés severo.
- 2) En contraste, los mecanismos de evasión involucran una reducción de actividad metabólica, dando como resultado un estado latente, bajo exposición a estrés extremo (Osmond y col., 1987). Comúnmente, una especie vegetal puede tener distintos mecanismos de tolerancia o evasión, o una combinación de ambos.
- 3) La tercera opción es el daño inmediato o retrasado a través de variación somaclonal,

mutación, progresión neoplástica, y por último, la muerte, vía necrosis y/ o apoptosis (Gaspar y col., 2002).

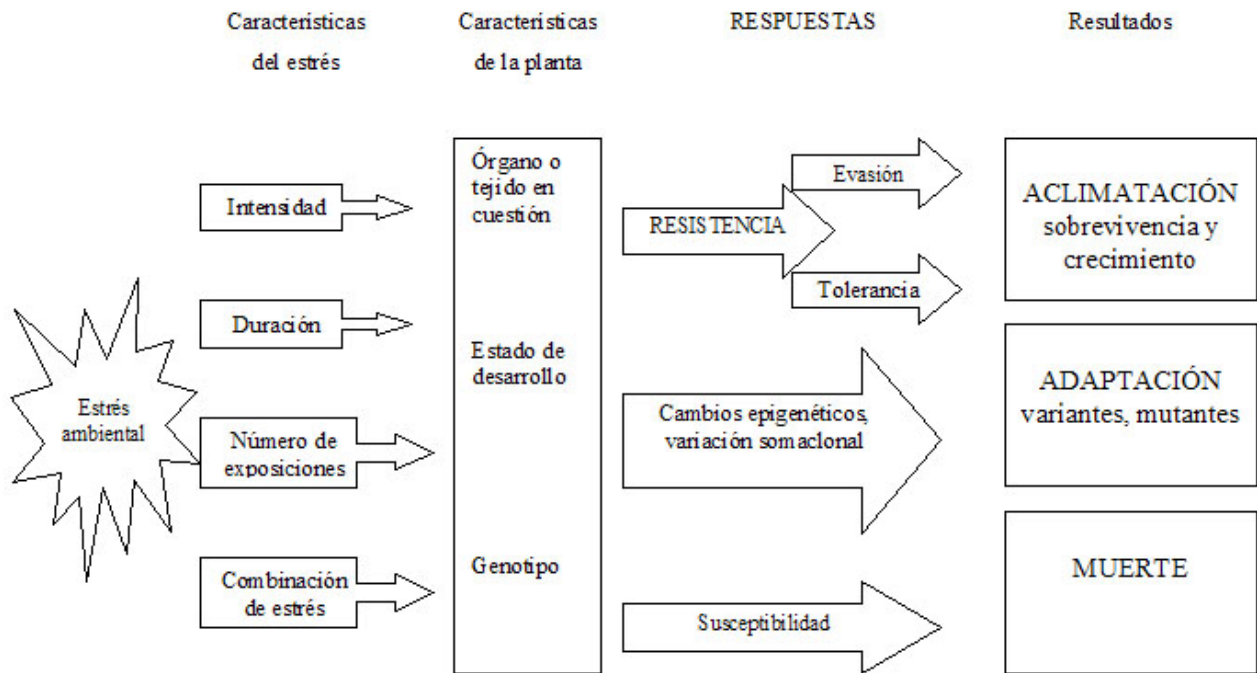


Fig. 3.1: Respuestas de las plantas a estrés ambiental en correspondencia con las características de las plantas y del estrés (Gaspar y col., 2002).

En la fisiología de las plantas estresadas, se puede hacer una diferencia importante entre respuestas finales (adaptación) y respuestas próximas (aclimatación). La adaptación ocurre por diferentes mecanismos a nivel genético en las poblaciones durante muchas generaciones, procesos micro evolutivos cambian las frecuencias génicas de una población en el tiempo. En un ambiente estresado es lógico asumir que genotipos específicos con combinaciones génicas apropiadas (aquellas que le confieren la capacidad de sobrevivir y reproducirse) son dominantes en la población. Las combinaciones génicas particularmente favorables en las plantas que habitan ambientes estresados son llamadas adaptaciones.

Las poblaciones que se han adaptado en un proceso evolutivo continuo en un régimen climático particular no son sistemas estáticos. Por lo contrario, las plantas tienen una ca-

pacidad increíble para ajustar características fisiológicas y estructurales rápidamente con un solo genotipo, esto es: aclimatación. En otras palabras, durante la aclimatación un organismo altera su homeostasis, su estado fisiológicamente estable, para ajustar cambios en sus ambientes externos. La aclimatación es una respuesta fenotípica a combinaciones diferentes de características ambientales. La plasticidad fenotípica es un índice de la cantidad de aclimatación que es posible dentro de un genotipo (Nilsen y Orcutt, 1996).

El concepto de estrés de Strasser (1988) dice que "todo organismo experimenta estrés, aunque la manera en la cual éste es expresado difiere de acuerdo a su nivel de organización. Desde el punto de vista botánico, el estrés puede ser descrito como un estado en el cual se incrementan las demandas hechas en una planta que lleva a una desestabilización de sus funciones, seguida por normalización y resistencia mejorada. Si el límite de tolerancia es excedido se produce un daño permanente o la muerte. El concepto de estrés entonces, contiene tanto elementos destructivos como constructivos, es tanto una factor de selección como una fuerza directriz para mejorar la resistencia y la evolución adaptativa" (Kevers y col., 2004).

3.2. *Estrés oxidativo*

Diversos factores de estrés causan la producción de especies reactivas de oxígeno (*ERO*) en las células, generando un estrés oxidativo en ellas (Bowler y col., 1992). El estrés oxidativo se manifiesta como el aumento en exceso de radicales libres y peróxidos como son: los singuletes (1O_2), el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^\bullet), el radical hidroperóxido (HO_2^\bullet) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), junto con una disminución de los sistemas antioxidantes enzimáticos de defensa como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la catalasa, la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa y los mecanismos no enzimáticos, como el incremento de: glutatión, alfa-tocoferol, ascorbato, carotenoides, flavonoides y/ o alcaloides,

dependiendo de la especie de que se trate (Foyer y col., 1994), y que finalmente también requieren enzimas para su aparición o aumento.

Los radicales libres son especies químicas (de átomos y moléculas) altamente reactivas porque tienen uno o más electrones desapareados, por lo que pueden afectar a otras moléculas como los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos y por lo tanto, al organismo en su totalidad (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las *ERO* pueden ser generadas por situaciones endógenas y exógenas. Las primeras son producto del metabolismo normal de los organismos aerobios (mitocondria y cloroplasto) o por reacciones de detoxificación (peroxisoma). Las situaciones exógenas incluyen algún tipo de estrés (Scandalios, 2002).

La catalasa es una enzima tetramérica que contiene un grupo *hemo* y se encuentra en organismos aeróbicos, ubicada exclusivamente en el peroxisoma. Entre sus funciones se encuentran las reacciones peroxidativas y catalíticas. El grupo *hemo* de la catalasa interactúa con el H_2O_2 para degradarlo, esta enzima transforma el peróxido sin ayuda de ningún agente reductor y tiene como productos de la reacción $H_2O + O_2$ (Mallick y Mohn, 2000). La participación de las catalasas en la fotorrespiración es un factor determinante en la protección de estrés oxidativo en el fotosistema I de la célula así como en la defensa al estrés en plantas *C3* (Willekens y col., 1995). Esta enzima elimina al H_2O_2 en procesos fisiológicos normales; sin embargo, bajo condiciones de estrés, la actividad de la enzima disminuye, permitiendo con esto un incremento en la concentración de H_2O_2 .

El H_2O_2 es un oxidante fuerte que puede iniciar un daño por la interrupción de funciones metabólicas y pérdida de la integridad celular en los sitios donde se acumula. Puede difundirse a distancias cortas y cambiar el estatus redox. Los principales reguladores de este compuesto son las enzimas catalasa y peroxidasas. Se ha observado que incrementos en las células de H_2O_2 inducen la expresión de catalasa (de una o varias isoenzimas) dando evidencia circunstancial de que la regulación de la catalasa puede involucrar la percepción de los niveles de

H_2O_2 en las células (Willekens y col., 1995).

El H_2O_2 juega un papel central en los mecanismos de defensa en la interacción planta-organismo, como son: la Respuesta Hipersensitiva (*RH*), la resistencia sistémica, la inducción de fitoalexinas y la muerte celular en la *RH*, así como también el incremento de la actividad de las poliaminas. La generación de especies reactivas de oxígeno (particularmente de peróxido de hidrógeno) se reconoce como la primera respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés y actúa como segundo mensajero en la cascada de señales de estrés de la célula para activar diversas respuestas como son; la inducción de genes de defensa, la estimulación de la biosíntesis de fitoalexinas y la promoción de la respuesta hipersensitiva (Low y Merida, 1996; Dörnenburg y Knorr, 1998; Sudha y Ravishankar, 2002). Las *ERO* han sido propuestas como un componente central de la adaptación al estrés. Bajo esta condición las *ERO* pueden jugar dos papeles excluyentes muy diferentes:

- 1) Exacerbando el daño.
- 2) Señalando la activación de respuestas de defensa.

Para poder tener esta función dual, los niveles celulares de las *ERO* deben ser severamente controlados. El complejo sistema antioxidante provee la flexibilidad necesaria para tener estas funciones. Aunque las *ERO* se forman en el metabolismo normal de la célula y su regulación es un evento común, el daño oxidativo está frecuentemente asociado con situaciones de estrés. Muchas condiciones de estrés abiótico, si no es que todas, son exacerbadas por el efecto de la acumulación de las *ERO* (Dat y col., 2000).

Se ha relacionado a los factores ambientales como la causa de la respuesta de las plantas ante presiones selectivas, todos estos estímulos ambientales son traducidos en la planta como señales químicas que pueden derivar en compuestos implicados en la defensa de la planta y que además pueden ser útiles para el hombre, estos compuestos se conocen como productos naturales o metabolitos secundarios.

3.3. *Obtención de metabolitos secundarios en cultivo de tejidos*

En las dos últimas décadas se ha incrementado el interés de los científicos por el conocimiento de las funciones de los metabolitos secundarios en la planta, así como también en la bioquímica y biología molecular de su síntesis y control. La tecnología del cultivo de tejidos vegetales ha sido central para ambos estudios y es una alternativa para la explotación industrial de tales compuestos (Zenk, 1991; Ravishankar y Rao, 2000).

Los elicitores son compuestos capaces de inducir una respuesta de defensa contra infecciones, en particular la producción de fitoalexinas. Éstas se definen como compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana que se forman y acumulan en células vegetales después de una infección. Un cultivo celular se obtiene de callo que fue generado de una parte de la planta (hoja, raíz o tallo). Un callo es una masa o cúmulo de células sin diferenciación, en activa división celular que es subcultivado continuamente, este tipo de células subcultivadas puede formar fácilmente fitoalexinas. Este principio ha sido aplicado en estudios de biosíntesis de fitoalexinas, así como para mejorar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares. Sin embargo, esta inducción está restringida a ciertas rutas, pues cada especie vegetal probablemente tiene una clase de compuestos que se produce después de un estímulo externo determinado y está ausente en la planta que no ha sido estimulada, por lo que muchos compuestos de interés, producidos constitutivamente en la planta, no son sensibles para la inducción por elicitores. Por ejemplo, se ha observado que la producción de algunos compuestos de importancia farmacológica como la quinina y la morfina no es afectada por elicitación. Sin embargo, otros compuestos si han sido inducidos como son las antraquinonas en cultivos de varias especies de *Cinchona* y la sanguinarina en cultivos de *Eschscholtzia californica* (Verpoorte y col., 1999).

El cultivo de tejidos representa una herramienta valiosa para el estudio de los metabolitos secundarios (Verpoorte y col., 2000). Su independencia de las condiciones ambientales permite

el uso de diversas estrategias que activen las rutas específicas de síntesis de estos compuestos; sin embargo, la baja productividad es todavía un gran problema.

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (*CICY*) se han estudiado en los últimos 20 años, diferentes especies vegetales con el objetivo de incrementar la producción de metabolitos secundarios, tabla 3.1 (Vázquez-Flota y Loyola-Vargas, 2003).

Líneas celulares de *Catharanthus roseus* han sido expuestas a factores de estrés, como homogenados fúngicos de *Aspergillus niger*, o choques osmóticos con manitol y se ha incrementado la producción de alcaloides totales en 60 y 300 % respectivamente. Una combinación de ambos tipos de estrés produjo un efecto aditivo en la producción de alcaloides totales. Este resultado sugiere que los mecanismos celulares que llevan a la síntesis de alcaloides en respuesta al estrés, son diferentes (Godoy y Loyola, 1991).

Tab. 3.1: **Especies estudiadas por su producción de metabolitos secundarios en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.**

Especie	Familia	Tipo de cultivo	Metabolito secundario
<i>Datura stramonium</i>	<i>Solanaceae</i>	Raíces transformadas	Alcaloides del tropano
<i>Tagetes patula</i>	<i>Asteraceae</i>	Callos transformados	Tiofenos
<i>Stenocereus queretanoensis</i>	<i>Cactaceae</i>	Células en suspensión	Betalaínas
<i>Coffea arabica</i>	<i>Rubiaceae</i>	Células en suspensión	Alcaloides purínicos
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Apocynaceae</i>	Células en suspensión callos transformados	Alcaloides indólicos
<i>Bixa orellana</i>	<i>Bixaceae</i>	Callos	Carotenoides

La principal ventaja del cultivo de tejidos como herramienta para la obtención de metabolitos secundarios es que se puede incrementar la masa en tiempos relativamente pequeños, com-

parados con el crecimiento en condiciones naturales de las especies de interés; sin embargo, aunque se logre incrementar el crecimiento de biomasa *in vitro* de la especie, no siempre se ha logrado el incremento de los compuestos secundarios buscados. Para mejorar esta producción, se han modificado las condiciones de cultivo, sometiendo a los tejidos obtenidos a diferentes condiciones de estrés y bajo estas nuevas condiciones en algunas ocasiones, los cultivos *in vitro* han incrementado la producción de productos naturales de manera exitosa. Ejemplos de la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* se mencionan a continuación.

Se establecieron cultivos de callos y de células en suspensión de *Morinda elliptica* para obtener antraquinonas modificando las condiciones de iluminación; se logró incrementar el rendimiento de estos compuestos de $2.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, el incremento fue de 10 veces en base al peso seco, comparado con el obtenido en plantas *in vivo* (Abdullah y col., 1998).

El ácido rosmarínico ha sido acumulado en células en suspensión de *Ocimum basilicum*, habiéndose obtenido un rendimiento de 10 mg por *gramo* de peso seco. De esta misma especie también se han aislado antocianinas y aceites esenciales (Kintzios y col., 2003).

De *Lavandula vera* también se obtuvo ácido rosmarínico en cultivo de células en suspensión, en los cuales se probó el efecto de la temperatura. El rendimiento fue de 90 mg por *gramo* de peso seco y la temperatura óptima para la obtención del compuesto fue de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (Georgiev y col., 2004).

De *Erythrina americana* se obtuvieron de células en suspensión, eritroidinas y otros alcaloides con un rendimiento de $89 \text{ } \mu\text{g}$ por *gramo* de peso seco (San Miguel-Chávez y col., 2003).

La elicitación ha sido una estrategia eficiente para mejorar la producción de algunos compuestos de importancia comercial tales como el taxol de *Taxus spp*, la vincristina y vinblastina de *Catharanthus roseus* y los ginsenósidos de *Panax ginseng*. En *Morinda elliptica* se realizó un estudio en el cual se relacionó el efecto de un elicitador (ácido jasmónico) con la producción de antraquinonas así como la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática asociada a

la producción de estos compuestos. El ácido jasmónico genera un estrés que desencadena una serie de respuestas entre las que se encuentra el incremento de las antraquinonas (Chong y col., 2005).

Algunos trabajos muestran el efecto de diferentes tipos de estrés en la producción de metabolitos secundarios. Dörnenburg y Knorr (1998) determinaron el impacto de presiones altas en la biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos celulares de *Vitis vinifera*, los tratamientos aplicados funcionaron como elicitores físicos e incrementaron la producción de antocianinas y polifenoles.

En las plantas superiores, la acumulación de metabolitos secundarios generalmente se observa en tejidos específicos o células durante un estado específico. En otras palabras, la expresión de metabolitos secundarios está estrechamente relacionada con el crecimiento celular y la diferenciación. En cultivos celulares, se ha observado que la máxima acumulación de muchos metabolitos secundarios se obtiene durante la fase estacionaria. El patrón de acumulación en medios deficientes de nutrientes, en particular de fosfatos, indica que existe una correlación negativa entre los fosfatos y la producción de ciertos metabolitos secundarios: alcaloides en *Catharanthus roseus* y antocianinas en cultivos de *Vitis* (Kakegawa y col., 1995).

Se han estudiado cultivos de células en suspensión de *Camptotheca acuminata* para mejorar el rendimiento de camptotecina. Al reducir la fuente de nitrógeno en el medio, se logró un incremento de 280 % en el contenido de camptotecina (monoterpeno derivado del indol). En cultivo de tejidos la fuente de nitrógeno puede afectar significativamente el crecimiento y la formación de muchos alcaloides (Pan y col., 2004).

La reducción de nitrógeno total ha mejorado la producción de capsaicina en cultivos de *Capsicum frutescens*, de antraquinonas en *Morinda citrifolia* y de antocianinas en especies de *Vitis*. Los cultivos celulares pueden producir compuestos secundarios que no se encuentran en la naturaleza y posiblemente algunos podrían ser de utilidad al hombre. La formación

de compuestos no encontrados anteriormente, puede ser inducida en cultivo de tejidos por elicitación biótica o abiótica (Rao y Ravishankar, 2002).

DiCosmo y Towers (1984) hacen una recopilación de los principales factores que se han modificado en los cultivos *in vitro* con la intención de mejorar la producción de metabolitos secundarios, las modificaciones han sido hechas en: aspectos de nutrición, variación de luz, temperatura, fitohormonas, pH, oxigenación, adición de antibióticos, efectos de microorganismos y virus, así como elicitores fúngicos.

En cultivos celulares de *Papaver somniferum* se acumularon alcaloides de la benzofenanthridina: sanguinarina y dihidrosanguinarina, solamente después de la elicitación (Alfermann y Petersen, 1995).

Por otro lado se sabe que los principales componentes del medio nutritivo que influyen en la disponibilidad de agua son: la concentración de agar y la fuente de carbono. Se ha usado al polietileno glicol (*PEG*) y al manitol en el cultivo de tejidos para disminuir el potencial de agua del medio. El *PEG* es más usado que el manitol porque su posible movimiento a través de las paredes celulares hacia el citoplasma puede afectar el metabolismo celular. Un agente osmótico ideal no deberá alterar directamente procesos osmóticos y metabólicos celulares por entrar hacia el simplasto. Si el *PEG* entra a las hojas, esto disminuye el potencial osmótico de la solución del xilema. Como resultado el *PEG* podría interferir con el metabolismo de la planta y bloquear la transpiración. A este respecto, el alto peso molecular del *PEG* previene la penetración al plasmalema y su entrada al simplasto (Kang y col., 2003).

En la tabla 3.2 se hace referencia a los compuestos obtenidos en cultivo de tejidos de diferentes especies, en cantidades similares o superiores a las encontradas en la planta completa y el tipo de cultivo que fue utilizado para su obtención (Vanisree y col., 2004).

Tab. 3.2: Metabolitos secundarios bioactivos obtenidos de cultivos *in vitro*.

Especie	Compuesto	Tipo de cultivo
<i>Agave amaniensis</i>	Saponinas	Callo
<i>Ailanthus altissima</i>	Alcaloides	Suspensión
<i>Allium sativum</i>	Alliína	Callo
<i>Aloe saponaria</i>	Glucósidos del tetrahydroantra-ceno	Suspensión
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Altamisina	Callo
<i>Anclusa officinalis</i>	Ácido rosmarínico	Suspensión
<i>Brucea javanica</i>	Alcaloides	Suspensión
<i>Blupearum falcatum</i>	Saikosaponinas	Callo
<i>Blupearum falcatum</i>	Saikosaponinas	Raíz
<i>Camillia sinensis</i>	Tiamina γ -glutamil derivados	Suspensión
<i>Canavalia ensiformis</i>	L-Canavanina	Callo
<i>Capsicum annuum</i>	Capsaicina	Suspensión
<i>Cassia acutifolia</i>	Antraquinonas	Suspensión
<i>Catharanthus roseus</i>	Alcaloides indólicos y catarantina	Suspensión
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Alcaloides eméticos	Raíz
<i>Chysanthemum cinerariaefolium</i>	Piretrinas	Callo
<i>Chysanthemum cinerariaefolium</i>	Piretrinas y ácido crisantémico	Suspensión
<i>Cinchona</i>	Alcaloides	Suspensión
<i>Cinchona robusta</i>	Robustaquinonas	Suspensión
<i>Cinchona succirubra</i>	Antraquinonas	Suspensión

Continúa en la siguiente página

Especie	Compuesto	Tipo de cultivo
<i>Citrus sp</i>	Naringina Limonina	Callo
<i>Coffea arabica</i>	Cafeína	Callo
<i>Corydalis ophiocarpa</i>	Alcaloides isoquinolínicos	Callo
<i>Croton sublyratus</i>	Plaunotol	Callo
<i>Cruciata glabra</i>	Antraquinonas	Suspensión
<i>Cryptolepis</i>	Critosina	Callo
<i>Digitalis purpurea</i>	Cardenólidas	Suspensión
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Diosgenina	Suspensión
<i>Dioscorea doryophora</i>	Diosgenina	Suspensión
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Alcaloides del tropano	Callo
<i>Ephedra spp.</i>	L-Efedrina D-pseudoefedrina	Suspensión
<i>Eriobotrya japonica</i>	Triterpenos	Callo
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Esterol y compuestos fenólicos	Callo
<i>Fumaria capreolata</i>	Alcaloides isoquinolínicos	Suspensión
<i>Gentiana sp</i>	Secoiridoides y glucósidos	Callo
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginggólido A	Suspensión
<i>Glehnia littoralis</i>	Furanocumarinas	Suspensión
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Flavonoides	Callo
<i>Glycyrrhiza glabra var. Glandulifera</i>	Triterpenos	Callo
<i>Hyoscyamus niger</i>	Alcaloides del tropano	Callo
<i>Isoplexis isabellina</i>	Antraquinonas	Suspensión
<i>Linum flavum</i>	5-Metoxipodofilotoxina	Suspensión
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Derivados de la shikonina	Suspensión
<i>Lycium chinense</i>	Cerebrósidos	Suspensión

Continúa en la siguiente página

Especie	Compuesto	Tipo de cultivo
<i>Mentha arvensis</i>	Terpenoides	Tallo
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinonas	Suspensión
<i>Mucuna pruriens</i>	L-DOPA	Suspensión
<i>Mucuna pruriens</i>	L-DOPA	Callo
<i>Nandina domestica</i>	Alcaloides	Callo
<i>Nicotiana rustica</i>	Alcaloides	Callo
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina	Suspensión
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Camptotecina y alcaloides relacionados	Callo
<i>Panax ginseng</i>	Saponinas y Sapogeninas	Callo
<i>Panax notoginseng</i>	Ginsenósidos	Suspensión
<i>Papaver bracteatum</i>	Tebaina	Callo
<i>Papaver somniferum</i>	Alcaloides	Callo
<i>Papaver somniferum</i>	Morfina y Codeina	Suspensión
<i>Peganum harmala</i>	Alcaloides β -Carbolina	Suspensión
<i>Phytolacca americana</i>	Betacianina	Suspensión
<i>Picrasma quassioides</i>	Quasina	Suspensión
<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podofilotoxina	Suspensión
<i>Polygala amarella</i>	Saponinas	Callo
<i>Polygonum hydropiper</i>	Flavonoides	Suspensión
<i>Portulaca grandiflora</i>	Betacianina	Callo
<i>Ptelea trifoliata</i>	Alcaloides	Callo
<i>Rauwolfia sellowii</i>	Alcaloides	Suspensión
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Reserpina	Suspensión

Continúa en la siguiente página

Especie	Compuesto	Tipo de cultivo
<i>Rauwolfia serpentina x Rhazya stricta</i> (planta híbrida)	3-Oxo-rhazinilam	Callo
<i>Rhus javanica</i>	Galotaninos	Raíz
<i>Ruta sp</i>	Alcaloides acridona y furoquinolina y cumarinas	Callo
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Ácido litospérmico y rosmarínico	Callo
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Criptotanshinona	Suspensión
<i>Scopolia parviflora</i>	Alcaloides	Callo
<i>Scutellaria columnae</i>	Fenoles	Callo
<i>Solanum chysotrichum</i>	Saponina espirostanol	Suspensión
<i>Solanum laciniatum</i>	Solasodina	Suspensión
<i>Silybum morianum</i>	Flavonolignano	Raíz
<i>Solanum paludosum</i>	Solamargina	Suspensión
<i>Tabernaemontana divaricata</i>	Alcaloides	Suspensión
<i>Taxus spp</i>	Taxol	Suspensión
<i>Taxus baccata</i>	Taxol baccatin III	Suspensión
<i>Thalictrum minus</i>	Berberina	Suspensión
<i>Torreya nificera var. Radicans</i>	Diterpenoides	Suspensión
<i>Trigonella foenumgraecum</i>	Saponinas	Suspensión
<i>Withaina somnifera</i>	Witaferina A	Tallos

La cubierta vegetal de México es una de las mas variadas del planeta. La gran diversidad biológica se debe, por un lado, a las condiciones fisiográficas, geológicas y climáticas, que presentan una amplia gama de variación y combinaciones, generando un mosaico de nichos ecológicos. La región mesoamericana ha sido identificada como una de las principales

áreas del mundo en cuanto a diversidad genética vegetal. Pocas áreas del trópico de tamaño similar muestran tal diversidad de topografía, clima, suelos y vegetación. Las acciones de conservación y mejoramiento genético se han limitado a unas cuantas especies de reconocida importancia económica; sin embargo, existe una vasta gama de especies de características y valor desconocidos, y que podrían tener un gran potencial en el futuro para producción de madera y una infinidad de otros productos, incluyendo quizás medicinas para la cura de enfermedades presentes y futuras.

3.4. *Hippocratea excelsa*

3.4.1. *Usos en la medicina tradicional de la especie.*

Es una planta cuya corteza pardo-rojiza se vende en numerosos mercados nacionales debido a las múltiples propiedades curativas que se le atribuyen; los usuarios la emplean para el tratamiento de varias enfermedades entre las que destacan: afecciones de la piel, úlcera gástrica, padecimientos renales, amenorrea e infecciones uterinas. En todos los casos, se prepara una infusión a partir de la corteza machacada, sola o combinada con otras hierbas medicinales; esta infusión es consumida diariamente hasta por períodos de tres meses (Bye, 1988 en López Cedeño, 1989). También se le considera un insecticida muy efectivo, de ahí el sobrenombre de "matapiojo".

López Cedeño (1989) aisló e identificó seis metabolitos secundarios de *H. excelsa*, cuatro de ellos triterpenos pentacíclicos del tipo friedelano: la friedelina, canofilol, canofilal y el ácido canofílico (ver fig. 4.2), β -sitosterol (ver fig. 4.4) y poli-isopreno del tipo de la guta. Mata y col. (1990) aislaron tres alcaloides sesquiterpénicos: hippocrateína I (ver fig. 4.5), hippocrateína II y emarginatina A de la corteza de raíz y tallo de la misma especie, éste fue el primer trabajo en el que se reportó la presencia de alcaloides en la familia de las Hippocratáceas y sugirió una relación estrecha con la familia de las Celastráceas; la hippocrateína fue probada

contra *Artemia salina* y mostró una escasa actividad letal.

También de *H. excelsa* Calzada y col. (1991), obtuvieron de la corteza de tallo y de la raíz quinonas triterpénicas, tingenona, celastrol, pristimerina y excelsina, que probaron contra *A. salina*, siendo activas la tingenona, la pristimerina (ver fig. 4.3) y el celastrol. En algunos estudios químicos que se han realizado sobre la especie, se aislaron y caracterizaron diversos compuestos, que se enlistan en la tabla 3.3.

Tab. 3.3: **Algunos compuestos químicos presentes en corteza de tallo y raíz de *H. excelsa*. -(Banco de datos NAPRALERT, 1997)-.**

Nombre	Grupo	Rendimiento (%)	Referencia
Canofilol	Triterpeno	0.02101	Calzada y col., 1991
Canofilal	Triterpeno	0.013633	Calzada y col., 1991
Ácido Canofílico	Triterpeno	0.00152	Calzada y col., 1991
Celastrol	Triterpeno	0.0049	Calzada y col., 1991
Excelsina	Triterpeno	0.00112	Calzada y col., 1991
Friedelina	Triterpeno	0.00157	Calzada y col., 1991
Pristimerina	Triterpeno	0.00126	Calzada y col., 1991
Tingenona	Triterpeno	0.00242	Calzada y col., 1991
Hippocrateína I	Alcaloide sesquiterpénico	0.00577	Mata y col., 1990
Hippocrateína I	Alcaloide Sesquiterpénico	0.0009	Mata y col., 1990
Hippocrateína III	Alcaloide Sesquiterpénico	0.001	Calzada y Mata,1995
Mayteína	Alcaloide Sesquiterpénico	0.0005	Calzada y Mata,1995
Trans-poliisopreno	Poliprenoide	9.87719	Palacios y col., 1989

Furukawa y col. (2002) aislaron de extracto etanol-acuoso al 70 %, 19 alcaloides sesquiter-

pénicos piridínicos, 17 de los cuales fueron compuestos nuevos, emarginatina A e hippocrateína I. Encontraron que este extracto tuvo una fuerte actividad insecticida en *Nephotettix cincticeps* y en *Nilaparvata lugens*.

3.4.2. Estudios de Actividad Biológica.

Los extractos acuoso y metanólico de la corteza de raíz mostraron un importante efecto gastroprotector en varios modelos experimentales contra úlcera en ratas. La friedelona, el canofilol y el canofilal fueron aislados de las fracciones activas, pero fueron inactivas como compuestos gastroprotectores. Los compuestos que presentaron actividad gastroprotectora fueron el sitosterol-3-O- β glucósido (93.4 %), el β -sitosterol (85.7 %), la (-) epicatequina (72.1 %), así como una mezcla de α y β amirina (50 %). Los compuestos con actividad gastroprotectora tienen un grupo hidroxilo en la posición C-5 de la estructura triterpénica o esteroidal, mientras que la friedelina, el canofilol y el canofilal no presentan este grupo. El extracto etanólico también mostró actividad anti-inflamatoria (Navarrete y col., 2002).

Extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y metanol fueron probados contra cultivos celulares KB (carcinoma nasofaríngeo), HCT-15 COLADCAR (carcinoma de colon), y UIISO-SQC-1 (carcinoma escamoso de cerviz). Los tres extractos mostraron fuerte actividad contra las diferentes líneas celulares siendo el extracto más activo el de éter de petróleo. Los rendimientos de los extractos fueron: 0.8, 3.4 y 5.7 %, respectivamente (Popoca y col., 1998).

El extracto de éter de petróleo contiene varios triterpenos tales como: friedelina, canofilol, canofilal, y ácido canofílico, también contiene quinonas metiladas como pristimerina, celastrol, tingenona y excelsina. El extracto clorofórmico contiene β -sitosterol y *trans*-poliisopreno. El extracto metanólico contiene alcaloides sesquiterpénicos: hipocrateína I, II y III, emarginatina A y mayteína.

Los rendimientos de los extractos hexánico, acetónico, metanólico y acuoso fueron 0.73, 0.94, 4.19 y 7.48 % respectivamente. Todos los extractos redujeron drásticamente la ali-

mentación e incrementaron moderadamente la mortandad de *Sitophilus zeamais*, una plaga de granos almacenados. Los compuestos responsables fueron la pristimerina y una mezcla de alcaloides sesquiterpénicos (Reyes-Chilpa y col., 2003).

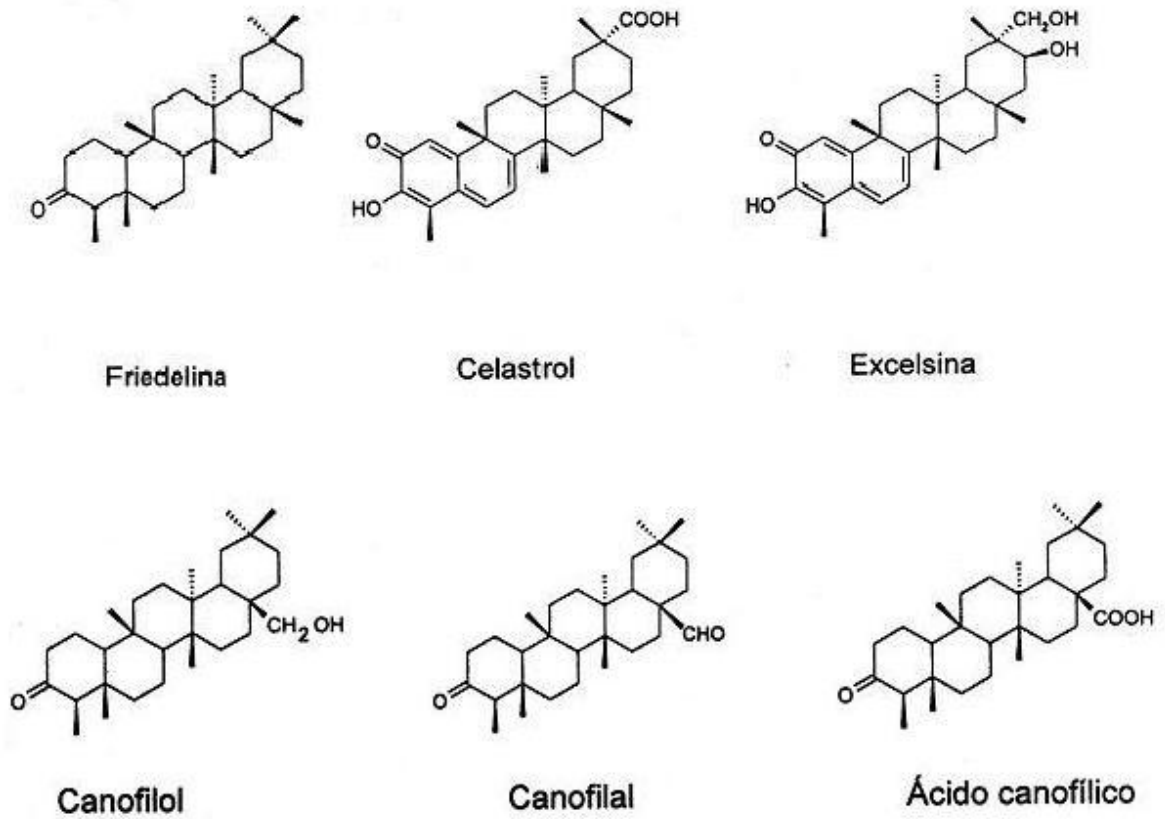
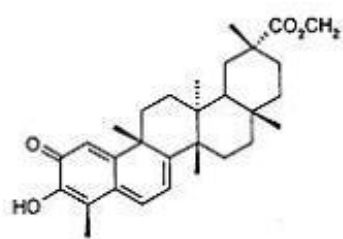
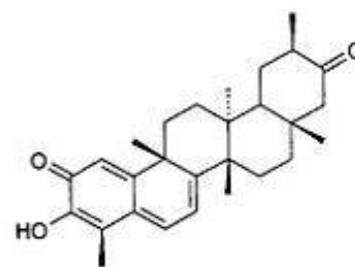


Fig. 3.2: Diagramas de las estructuras de la Friedelina, del Celastrol, de la Excelsina, del Canofilol, del Canofilal y del Ácido Canofílico.



Pristimerina



Tingenona

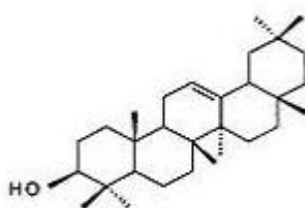
 β -Amirina

Fig. 3.3: Diagramas de las estructuras de la Pristimerina, de la Tingenona, y de la β -Amirina.

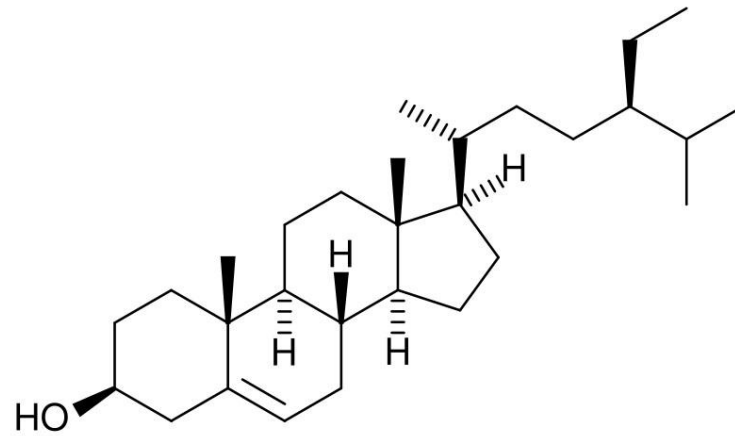
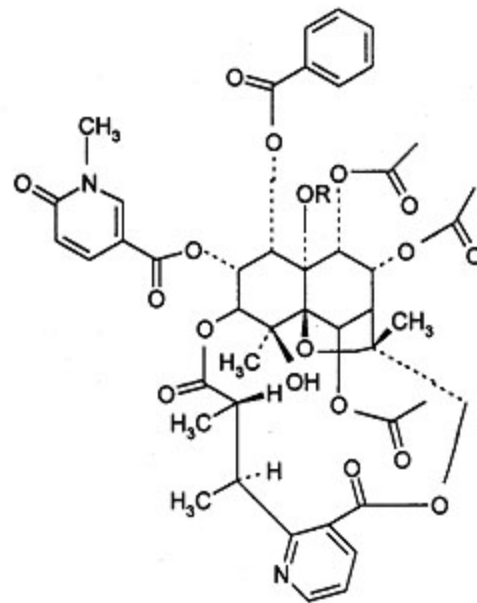


Fig. 3.4: Diagrama de la estructura del β -Sitosterol.



Hippocrateina I

Fig. 3.5: Diagrama de la estructura de la Hippocrateina I.

4. JUSTIFICACIÓN.

El estudio de las plantas medicinales ha sido de gran interés en los últimos años debido a que son una importante fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos. El uso de cultivos vegetales celulares a gran escala puede ser una buena alternativa para la producción de estos compuestos. Sin embargo, son pocos los metabolitos secundarios que han alcanzado una producción comercial. Entre éstos se han mencionado (Alfermann y Petersen, 1995) a la shikonina, obtenida de cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, a la purpurina, obtenida de cultivos de *Rubia alane* y a los ginsenósidos obtenidos de *Panax ginseng*. En los últimos años se ha realizado una intensa investigación para la obtención del paclitaxel a partir de cultivos *in vitro* de diferentes especies del género *Taxus* dando como resultado la producción comercial de este compuesto por este método (Verportee y col., 2000) para uso en tratamientos antitumorales. Además del interés industrial, los cultivos celulares son un modelo muy útil para el estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios, son sistemas convenientes y fáciles de manipular para el estudio de la regulación de rutas secundarias, en particular cuando se modifican condiciones ambientales que alteran la producción de estos compuestos. Muchos productos del metabolismo secundario están involucrados en la interacción de la planta con su ambiente, es por eso que se ha planteado que al estresar al cultivo de manera controlada, la biosíntesis de productos naturales se incrementará. Sin embargo, los mecanismos que llevan a la síntesis de un compuesto determinado no son predecibles fácilmente, esto debido a que las especies vegetales tienen una compleja red de sistemas de regulación genética que desencadena la producción de enzimas específicas que transfor-

man un sustrato específico en un metabolito secundario. Cada especie tiene una distribución restringida de metabolitos secundarios, y no sólo se biosintetiza un compuesto secundario como respuesta al ambiente. ¿Cuáles se producen? La respuesta no es simple. La falta de información de las rutas de biosíntesis así como también del regulamiento de las señales que son recibidas y transmitidas intra e intercelularmente y de toda la cascada de respuestas bioquímicas que conlleva a la producción de metabolitos secundarios, impide hacer una predicción acertada.

Por esta razón es necesario empezar a armar el gran rompecabezas de la biosíntesis de los metabolitos secundarios como respuesta a estímulos ambientales y obtenerlos en el laboratorio en condiciones que permitan, por un lado, preservar los recursos vegetales y que, por otro lado, se obtengan los beneficios que estos recursos nos proveen, sin que se vean afectadas las especies en sus ambientes naturales por la recolecta excesiva que de ellas hace el hombre.

H. excelsa es una especie utilizada en la medicina tradicional, de crecimiento lento y de distribución geográfica restringida (México y Centroamérica), se le ha encontrado en vegetación de bosque tropical caducifolio (Fonseca, 1995). Estas características hacen del uso del cultivo de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios una técnica viable. La especie es recolectada por los nativos debido al valor comercial que tiene en los mercados; por consiguiente, las poblaciones se han reducido y en algunos casos incluso han desaparecido; esta situación amenaza la permanencia de la especie en los ecosistemas. En esta condición se encuentran muchas especies vegetales con usos medicinales, ornamentales, industriales, etc. que no son cultivadas, las poblaciones silvestres de estas especies están disminuyendo intensamente hasta llegar al peligro de la extinción. La conservación y manejo de la biodiversidad y los recursos genéticos de nuestro país para su conocimiento y aprovechamiento adquieren gran importancia en la investigación científica.

El presente estudio sobre la *H. excelsa* pretende aportar conocimientos que permitan su aprovechamiento racional y conservación. Estos conocimientos se ubican en los siguientes

rublos:

1. La aplicación específica de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales a esta especie para el establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares y
2. la manipulación de las condiciones ambientales para incrementar la producción de metabolitos secundarios.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general:

- Evidenciar una posible relación entre un estado de estrés con el incremento en la producción de compuestos secundarios en cultivos celulares de *H. excelsa*.

Objetivos particulares:

- Evaluar la producción específica de compuestos secundarios en cultivos celulares de *H. excelsa* en función del tipo de estrés experimentado.
- Estudiar, mediante un análisis cromatográfico, la producción de metabolitos secundarios y su identificación en cultivos celulares de *H. excelsa* sometidos a dos diferentes tipos de estrés:
 - osmótico con polietilen-glicol (*PEG*).
 - nutricional con deficiencia de nitrógeno.
- Para cada tipo de estrés, determinar la variación en la concentración de algunos metabolitos secundarios en función de la intensidad del mismo.
- Registrar las diferentes respuestas en la concentración y presencia de algunos metabolitos secundarios que se generen en los cultivos celulares en los dos tipos de estrés aplicados.

Para el cumplimiento de los objetivos se siguió el diagrama operativo que se muestra en la figura 5.1.

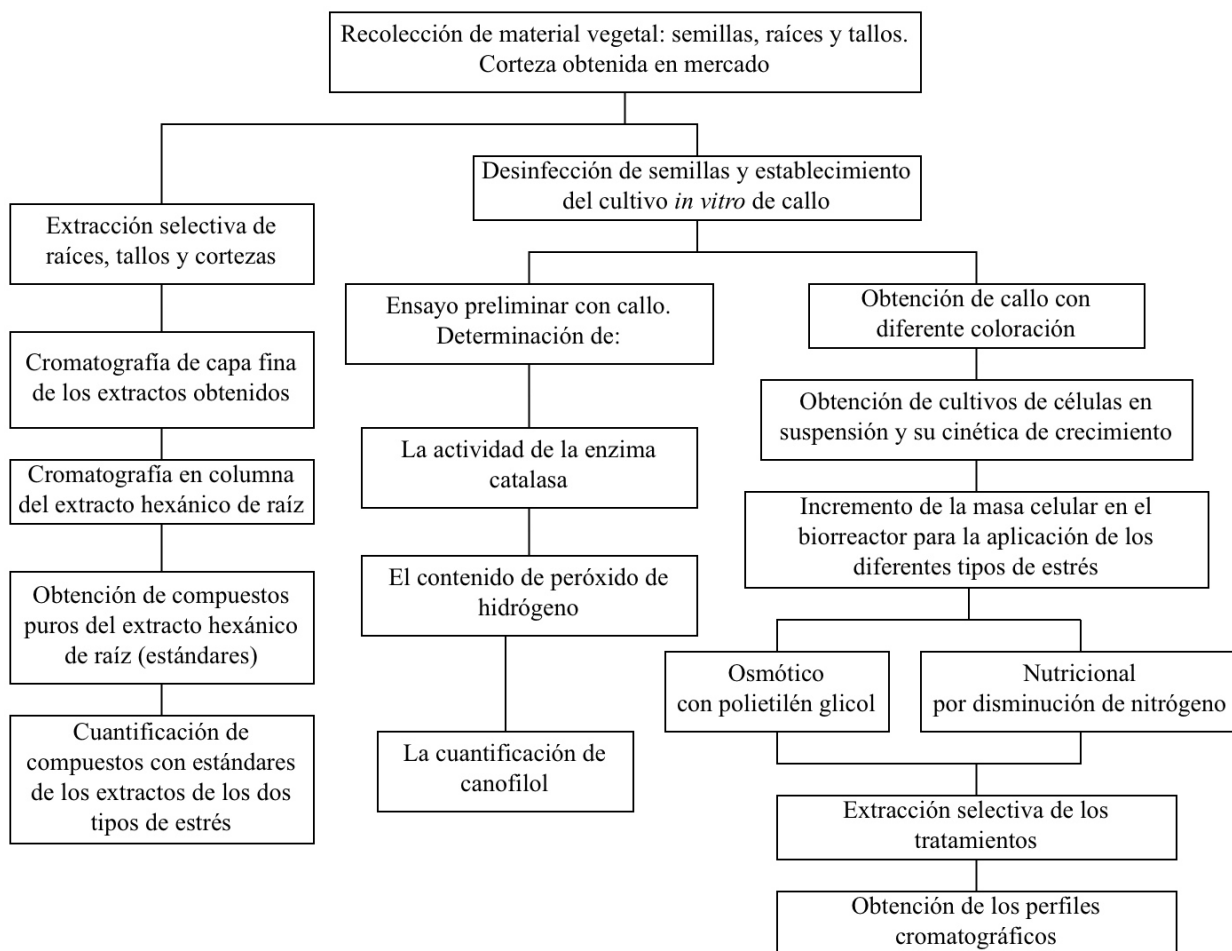


Fig. 5.1: Diagrama Operativo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. *Material Biológico.*

6.1.1. *Recolectas*

El material biológico se recolectó en una localidad ubicada en San Miguel Teutla, Municipio de Jolalpan (Puebla), (latitud: 18° 17' 21.1", longitud: 98° 56' 30.1") a una altitud de 960 m. En la zona de recolecta se encontró vegetación derivada de bosque tropical caducifolio *sensu Rzedowski* (1984), perturbada por actividades agrícolas. Se recolectaron tallos y raíces para el análisis químico y semillas para el cultivo de tejidos, así como ejemplares para su inclusión posterior en el Herbario de la Universidad Autónoma de Puebla. La determinación taxonómica fue realizada por el Biólogo José Luis Contreras Jiménez, curador del Herbario de la Universidad Autónoma de Puebla.

6.2. *Cultivo de tejidos vegetales.*

6.2.1. *Aspectos generales.*

Los cultivos *in vitro* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M en C. Teresa de Jesús Olivera Flores.

6.2.2. Cultivo de semillas.

Se embebieron 74 semillas durante 48 h: las primeras 24 h en agua destilada y posteriormente en peróxido de hidrógeno al 3 %. Se eliminó manualmente la testa y se aplicó el siguiente método de esterilización superficial (Herrera 2001):

- 1).- Lavado con agua y jabón durante 20 minutos.
- 2).- Exposición a una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 10 % (v/v), durante 10 minutos.
- 3).- Tres enjuagues con agua desionizada estéril, de cuatro minutos cada uno.
- 4).- Exposición a una solución de un fungicida comercial "captán" al 0.04 %, durante 10 minutos.
- 5).- Cuatro enjuagues con agua desionizada estéril, durante 4 minutos.

Las semillas (tres por cada frasco de cultivo) se sembraron completas en medio nutritivo *MS* (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de *BAP*, $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de *ANA* y $10 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de una mezcla de vitaminas y aminoácidos (*myo*-inositol $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido nicotínico $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, piridoxina $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y tiamina $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Se sembraron 25 frascos de cultivo. Las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y oscuridad.

6.2.3. Establecimiento del callo.

Después de 30 días de la siembra se generó un tejido amorfo (callo) sobre los cotiledones; éste fue separado del tejido madre y fue subcultivado cada 28 días. En cada subcultivo se eliminó el tejido oxidado. La siembra se realizó en frascos de diferentes capacidades, 250, 120, 50 y 20 mL, así como en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Después de 10 subcultivos

se obtuvieron callos con diferentes colores: pardo, azul y blanco. Cuando se tuvo una cantidad importante de callo (después de 20 subcultivos aprox.) y para determinar el grado de oxidación en los callos que presentaron diferente coloración, se realizó la medición de la actividad de la enzima catalasa y el contenido de peróxido de hidrógeno en los callos, de acuerdo a López-Delgado (1998), las mediciones se realizaron cuando el tejido tenía 21 días de subcultivo.

Actividad de la enzima catalasa.

Determinación de la actividad en tejido.

Muestras de 100 mg de callo fueron congeladas en nitrógeno líquido y luego maceradas hasta formar un polvo para extraer la proteína de estas muestras, se usaron 0.4 mL de buffer *HEPES – KOH* (100 mM pH 7.4, Sigma). La proteína soluble se separó por centrifugación a 11 000 gravedades durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se usó para medir la actividad catalasa en un electrodo de oxígeno (Hansatech, UK). La transformación a oxígeno ($2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2 + O_2$) se siguió en una reacción de volumen total de un mililitro que contenía 60 μ L de H_2O_2 530 mM, buffer *HEPES – KOH* (900-930 μ L) y sobrenadante diluido (1/10 y 1/100) de la muestra (10 μ L). La actividad catalasa se registró en un graficador (The Recorder Company, USA) donde se calculó velocidad y tiempo de reacción de la actividad catalasa, que fue expresada con relación a gramos de tejido. Se tomaron tres muestras por cada tipo de callo (según la coloración) y cada muestra se leyó 3 veces. Los promedios de los datos obtenidos de este análisis fueron graficados.

Curva patrón de oxígeno.

La curva patrón se determinó en un electrodo de oxígeno, de acuerdo al método utilizado

por Dat y col. (1998), en el cual a 1 mL de agua se le adicionaron 50 mg de hidrosulfito de sodio, la curva obtenida se registró en un graficador y se determinó el tiempo y la velocidad de reacción en los cuales se liberaron 0.276 micromoles de oxígeno.

Contenido de H_2O_2 .

El contenido de H_2O_2 se cuantificó usando el método de quimioluminiscencia de Warm y Laties (1982), utilizando un luminómetro (MGM instruments Optocomp-p USA) y tubos de poliestireno (12 x 75 mm, Fisher USA).

Curva patrón de H_2O_2

Se prepararon diferentes concentraciones de H_2O_2 (4.41 a 882 μM); de cada concentración se hizo una dilución (1/7) con ácido tricloroacético (*ATC*) al 5% (Baker) y nuevamente se realizó otra dilución (1/8) con *ATC*. De la última dilución se tomaron 500 μL , se adicionaron 4.5 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH 0.2 M pH 9, Baker) y 500 μL de luminol (0.5 mM en NH_4OH 0.2 M pH 9, Sigma). Para la lectura en el luminómetro se toman 450 μL de la última solución obtenida. La quimioluminiscencia se inició por inyección de 50 μL de ferrocianuro de potasio (0.5 mM en NH_4OH 0.2 M pH 9) y se registró la emisión de fotones a los 5 segundos.

Cuantificación del contenido de H_2O_2 en tejido.

El contenido de H_2O_2 fue estimado en muestras de 200 mg de callo de *H. excelsa* que fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente molidas hasta formar un polvo. Cada muestra fue extraída con 1.2 mL de *ATC* y posteriormente centrifugada (10 minutos a 11,000 gravedades, 4 °C); 0.5 mL de la fracción sobrenadante se filtraron a través de una resina Dowex-1 x 10 (Fluka) en una columna para cromatografía (1.5 x 10 cm, Sigma) de la

siguiente manera:

- 1.- Se acondicionó la resina por adición de 3.5 mL de *ATC* a la columna que se desecharon lentamente por goteo.
- 2.- Se agregaron en este orden; 0.5 mL de la muestra y 0.5 mL de *ATC*, se recolectaron por goteo.
- 3.- Se adicionaron 3 mL de *ATC* (para enjuagar la columna) y se recolectaron junto con la muestra anterior, la muestra se homogenizó en un vortex.
- 4.- A 0.5 mL de cada muestra se agregaron 0.5 mL de luminol y 4.5 mL de *NH₄OH*, se agitó.
- 5.- Para la lectura en el luminómetro se tomaron 450 μ L de la muestra anterior y se adicionaron 50 μ L de ferricianuro de potasio.

Cada muestra fue filtrada adicionalmente en la columna en presencia de 0.5 mL de *H₂O₂* 441 μ M (solución de estándar interno). Para cada coloración del callo se tomaron 3 muestras y cada muestra se leyó 6 veces. Los promedios de los datos obtenidos de este análisis se procesaron y graficaron.

6.3. *Ensayo preliminar de estrés en callo.*

6.3.1. *Estrés oxidativo.*

Antes de realizar el experimento en los cultivos celulares y para comprobar el estado de estrés en el tejido, así como para optimizar las condiciones experimentales se realizó un ensayo preliminar con el callo, el cual se sometió a los dos tipos de estrés, nutricional y osmótico en dos diferentes concentraciones. Se determinó la actividad catalasa y el contenido de peróxido de hidrógeno en el tejido expuesto al estrés, así como la cantidad de canoflilol

acumulada en el tejido, como un ejemplo de la modificación de los metabolitos secundarios en estas condiciones de estrés. En este ensayo, los callos de *H. excelsa* fueron trasladados al laboratorio de cultivo de tejidos del INIFAP, Metepec Estado de México. El material vegetal se encontraba creciendo en medio *MS* adicionado con *ANA* 1.5 mg·L⁻¹ y *BAP* 2.0 mg·L⁻¹. Una vez establecidos (7 días después), los cultivos de callo fueron sometidos al estrés, se aplicaron las siguientes condiciones experimentales:

Tratamiento de estrés nutricional por disminución de nitrógeno total.

Los cultivos de callo fueron sometidos al estrés nutricional, que consistió en reducir la concentración de nitrógeno del medio *MS* mediante la disminución del *KNO*₃ (1900 mg·L⁻¹, 0.021M) y del *NH*₄*NO*₃ (1650 mg·L⁻¹, 0.019M). En el primer tratamiento la disminución fue del 50 % y en el segundo de 25 %, teniendo como control el medio *MS* completo (100 %). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se pesaron 4 g de callo, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 40 mL de medio líquido (*MS* + *ANA* + *BAP*) y se incubaron en condiciones de oscuridad y en agitación orbital constante (100 rpm) durante 11 días. Debido a que el tiempo de duplicación del tejido que se ha reportado es de 7 días (Herrera, 2001), se pretendió completar por lo menos un ciclo celular. Al término de los 11 días de incubación, las muestras (para la medición de *H*₂*O*₂; para la determinación de la actividad catalasa y para la cuantificación de canofilol) fueron filtradas, pesadas y congeladas.

Del material vegetal de cada tratamiento previamente filtrado, se tomaron 3 muestras de 100 mg cada una para la medición de catalasa y 3 muestras de 200 mg para la medición de peróxido de hidrógeno, el material restante fue utilizado para la cuantificación del metabolito secundario (canofilol).

3 muestras de 100 mg → actividad de la enzima catalasa

3 muestras de 200 mg \longrightarrow *contenido de H_2O_2*

Material restante \longrightarrow *cuantificación de canofilol*

Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido para su procesamiento y medición. Los métodos para la medición de la actividad catalasa y el contenido de peróxido de hidrógeno fueron los mismos que los utilizados en los callos con diferente coloración. Los resultados fueron promediados y analizados por una prueba de intervalo múltiple de Tukey, para determinar diferencias significativas.

Tratamiento de estrés osmótico con PEG.

Para determinar el efecto del estrés osmótico se adicionó polietilen glicol (PEG 8000) en tres diferentes concentraciones 1%, 2% y 3%. Las cantidades de tejido y medio nutritivo, así como las condiciones de incubación fueron iguales al tratamiento de estrés nutricional.

De cada tratamiento se tomaron, también a los once días, muestras para la medición de: la actividad de la enzima catalasa, el contenido de peróxido de hidrógeno y la cuantificación del canofilol, respectivamente. Las muestras se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Los métodos para la medición de la actividad catalasa y el contenido de peróxido de hidrógeno fueron los antes descritos. Los resultados fueron promediados y analizados por una prueba de intervalo múltiple de Tukey, para determinar diferencias significativas con una $p \leq 0.05$.

6.3.2. Cuantificación de canofilol.

El tejido restante de cada uno de los dos tratamientos previos se pesó y posteriormente se liofilizó, se obtuvo la relación peso fresco/peso seco. Ya seco el material, se realizó una extracción selectiva con hexano, acetato de etilo y metanol. Se realizó el cálculo de los rendimientos de los diferentes extractos.

Para correlacionar los parámetros de estrés (previamente medidos) con el metabolismo secundario se cuantificó el canofilol en el mismo tejido sometido a estrés, de la siguiente manera.

Se desarrolló una placa cromatográfica en capa fina con todos los extractos hexánicos (extracto en el que se ha reportado la obtención del canofilol) obtenidos de los diferentes tratamientos, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación del canofilol en la placa, por densitometría.

Para lo cual, se prepararon soluciones de 1 mg/mL de los extractos (disueltos en cloroformo) y se aplicaron 50 μL de cada una de ellas a una placa cromatográfica de gel de sílice de 20 \times 10 cm. La aplicación se llevó a cabo mediante un aplicador automático *CAMAG TLC4*, en bandas de 6 mm. El estándar de canofilol (previamente purificado y corroborada su identidad por punto de fusión y *RMN* de hidrógeno) se preparó en la misma concentración que los extractos hexánicos y se aplicaron diferentes volúmenes (10, 20 y 30 μL) de esta solución en la placa para realizar la curva de calibración para la cuantificación del compuesto en las muestras. Las diferentes cantidades de canofilol y todas las muestras de los diferentes experimentos fueron aplicadas en la misma placa.

El eluyente en el cual se desarrolló la placa cromatográfica fue una mezcla de hexano: acetato de etilo 8:2 (*v/v*), la separación se llevó a cabo en una cámara saturada a temperatura ambiente. La distancia de desarrollo del cromatograma fue de 9 cm. Después del desarrollo, la placa se secó a temperatura ambiente en una campana de extracción por 15 min (aprox.), posteriormente se roció reactivo de Liebermann-Burchard (Stahl, 1969) como revelador y se calentó a 90° *C* hasta que no aparecieran nuevas manchas en la placa. Después del calentamiento la placa fue escaneada utilizando un densitómetro *CAMAG TLC Scanner3*, operado por software *winCATS* versión 1.1.3.0. Se realizó, en el mismo equipo, un espectro de absorción de la mancha del canofilol en la placa y se encontró que la longitud máxima de absorción fue a los 450 nm, en esa λ se realizó la cuantificación del canofilol.

La concentración del canofilol en las muestras se determinó de acuerdo al área bajo la curva que mostraron las manchas que tuvieron el mismo Rf y espectro de absorción del canofilol, en referencia a la curva de calibración del mismo. Cada una de las diferentes cantidades de canofilol aplicadas en la placa tuvo una diferente área bajo la curva que el densitómetro registró, con estas áreas se hizo una regresión lineal. Las áreas que el densitómetro detectó en las muestras fueron interpoladas en esta curva para obtener la concentración de canofilol en cada una de los diferentes tratamientos. Para calcular la concentración del canofilol en las diferentes muestras se utilizaron los siguientes datos: la cantidad de canofilol en una zona determinada de la placa (calculada por el equipo), la concentración del extracto utilizado, el volumen aplicado a la placa del extracto y el rendimiento del mismo en relación al peso seco del tejido, en las operaciones necesarias para obtener la cantidad de canofilol por gramo de tejido seco (callo).

Con los resultados obtenidos del ensayo preliminar, se ajustaron las condiciones que serían aplicadas a los cultivos de células en suspensión. Debido a que los cultivos en suspensión son de crecimiento más rápido, se esperaba que la biomasa se incrementara en un tiempo menor y así poder tener una mayor cantidad de metabolitos secundarios.

6.4. Establecimiento del cultivo de células en suspensión.

El establecimiento de las células en suspensión se realizó en dos intentos. En el primero se realizaron cultivos de callos en matraces Erlenmeyer de 500 mL, que contenían 125 mL de medio líquido con 12.5 g de callo (10 %) de cada una de las diferentes coloraciones. Los cultivos fueron puestos en agitación constante a 100 *rpm*. A los 7 días de incubación los cultivos fueron filtrados en gasa para eliminar el tejido madre (callo no disgregado) y se adicionaron 125 mL de medio líquido fresco cada 7 días hasta obtener 1 L de células en suspensión. De esta manera se tuvieron cultivos celulares derivados de callo color azul, pardo

y blanco, los cultivos derivados del callo blanco tomaron una coloración verdosa. Con la intención de incrementar el volumen celular los cultivos se colocaron en varios biorreactores de aspa de 15 L (según la coloración de los cultivos). Al pasar los cultivos celulares a los biorreactores todos los cultivos se contaminaron y se perdió el material por defecto en la manipulación de los mismos.

En el segundo intento del establecimiento del cultivo de células en suspensión y para evitar una excesiva manipulación del tejido y posibles contaminaciones, se procedió a inocular el callo directamente en un biorreactor. Después de 16 *meses* de subcultivo de los callos en medio sólido, se estableció el cultivo de células en suspensión inoculando 310 g de callo de todas las coloraciones obtenidas, en un biorreactor de 15 L de capacidad, con 4 L de medio nutritivo líquido *MS*. Se incubó en agitación constante (por medio de una aspa que contenía el biorreactor movida por un agitador magnético), a temperatura de 25 ± 2 °C y en condiciones de oscuridad durante 14 días. Transcurrido este tiempo, se adicionó medio nutritivo fresco (4 L) cada 14 días hasta obtener 2 biorreactores con 15 L cada uno de células en suspensión. Uno de los biorreactores(en el cual se inoculó el callo), tuvo mayor densidad celular debido a que en el trasvase del cultivo celular al segundo reactor hubo sedimentación de las mismas y no se logró una perfecta homogenización. Con estos dos cultivos celulares se realizaron los experimentos de estrés.

6.4.1. *Obtención de la cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión.*

La cinética de crecimiento se obtuvo con los cultivos celulares de diferente coloración que se establecieron en matraces Erlenmeyer (primer intento). Cuando los cultivos celulares alcanzaron los 500 mL se iniciaron las mediciones de peso fresco, para lo cual se tomaron 3 alícuotas de 10 mL de cada matraz con cultivos celulares de diferente coloración, cada una de estas alícuotas fueron filtradas al vacío en papel Whatman # 1 y se registró el peso de cada muestra inmediatamente, este procedimiento se repitió cada tercer día durante 14 días,

las medidas obtenidas cada día se promediaron y graficaron. Para obtener el peso seco, las diferentes muestras (obtenidas después del filtrado de los cultivos) fueron colocadas en una estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h y posteriormente fueron pesadas, de la misma manera que con los datos de peso fresco, los datos obtenidos se promediaron y graficaron.

6.5. Aplicación del estrés a los cultivos de células en suspensión.

Con la información obtenida del ensayo preliminar se decidió modificar la intensidad del estrés osmótico y mantener los mismos niveles para el estrés nutricional. Las concentraciones de *PEG* para el estrés osmótico y de N_2 para el estrés nutricional fueron las siguientes:

Tipo de estrés	Nivel de estrés
Nutricional	50 % del N_2 del medio <i>MS</i> 25 % del N_2 del medio <i>MS</i>
Osmótico	4 % de <i>PEG</i> 8 % de <i>PEG</i>

Se determinó que el tiempo de incubación para los tratamientos fuera de 28 días, en función de los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento, para completar 3 ó 4 ciclos celulares. Las condiciones de incubación fueron las mismas del ensayo preliminar en callo ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y oscuridad). Los tratamientos se aplicaron por duplicado y para iniciar los tratamientos se tomaron muestras de 3 litros de los dos diferentes biorreactores:

El volumen final de los cultivos fue de 5.5 L, 3 L del cultivo celular más 2.5 L de medio nutritivo fresco con las modificaciones necesarias de acuerdo al tipo e intensidad del estrés. Los tratamientos que provinieron del biorreactor con menor densidad celular fueron marcados con un símbolo (−), y los que provinieron del reactor con mayor densidad celular marcados con el símbolo (+).

Biorreactor	Estrés
Menor densidad celular (-)	Control 50 % de N_2 25 % de N_2 4 % <i>PEG</i> 8 % <i>PEG</i>
Mayor densidad celular (+)	Control 50 % de N_2 25 % de N_2 4 % <i>PEG</i> 8 % <i>PEG</i>

Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos celulares se decantaron para eliminar el medio líquido y las células sedimentadas fueron congeladas y liofilizadas para obtener el peso seco de cada tratamiento e iniciar el análisis químico de los mismos.

6.6. Análisis químico.

6.6.1. Separación cromatográfica del extracto hexánico de la corteza de raíz.

Para tener disponibles (como estándares) algunos de los compuestos que la planta produce en su condición natural, las raíces previamente recolectadas fueron secadas, molidas y extraídas en frío con hexano para realizar una separación cromatográfica y purificar algunos de los compuestos de la raíz. Se realizaron 4 extracciones de 72 horas cada una, que se filtraron y concentraron a presión reducida, hasta sequedad. La separación del extracto se llevó a cabo en una columna cromatográfica, se utilizó gel de sílice como fase estacionaria en una proporción de 1:80 (extracto: gel de sílice), y como fase móvil se adicionaron mezclas de hexano con acetato de etilo en diferentes proporciones de tal manera que se fue incrementando la polaridad del sistema de elución.

La elución se inició con hexano y terminó con metanol, se colectaron alícuotas de 50 mL.

El incremento de la polaridad se manejó como se muestra en la tabla 6.1.

*Tab. 6.1: Eluyentes utilizados consecutivamente en la cromatografía en columna del extracto hexánico de la corteza de raíz de *H. excelsa*.*

Sistemas de elución
Hexano
Hexano:AcOEt 9:1
Hexano:AcOEt 8:2
Hexano:AcOEt 7:3
Hexano:AcOEt 6:4
Hexano:AcOEt 4:6
Hexano:AcOEt 2:8
AcOEt
AcOEt:MeOH 5:5
MeOH

Las fracciones que se obtuvieron de la separación, fueron cromatografiadas en placa fina para reunirse según su factor de retención (R_f) en el perfil cromatográfico. Algunas fracciones fueron purificadas y analizadas por espectrometría de RMN¹H para identificar su estructura.

6.6.2. Obtención de extractos de los cultivos de células en suspensión.

Cuando las células de los cultivos celulares de los diferentes tratamientos se secaron (por liofilización) y fue medido su peso, se extrajeron en frío (por 24 h, tres veces) con hexano, acetato de etilo y metanol. Los extractos obtenidos se filtraron y concentraron a presión reducida llevándose a sequedad. Se calcularon los rendimientos de los diferentes extractos de cada tratamiento.

6.6.3. Análisis cromatográfico de los extractos.

Extracto hexánico.

Una vez obtenidos los extractos de los diferentes tratamientos celulares, se pesaron 5 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 mL de disolvente (cloroformo) para ser aplicados en cromatografía en capa fina mediante un aplicador automático *CAMAG TLC4*, en bandas de 6 mm. Se aplicaron 20 μL de cada extracto, en una placa cromatográfica de gel de sílice de 20 x 10 cm. Los estándares purificados fueron: friedelina, pristimerina, canofilol y canofilal. Estos se prepararon en una solución de 1 mg/mL y de ellos se aplicaron 10 μL a la placa cromatográfica.

El eluyente, las condiciones del desarrollo de la placa, el revelado y el escaneo fueron las mismas que se emplearon para la cuantificación del canofilol, en el ensayo preliminar con callo. Las concentraciones de los compuestos identificados fueron obtenidas en un densitómetro *CAMAG TLC Scanner3* por comparación con los estándares, a una longitud de onda de 450 nm.

Extracto de acetato de etilo.

Los extractos de acetato de etilo de los diferentes tratamientos fueron disueltos en la misma concentración de los extractos hexánicos para ser aplicados en la placa cromatográfica. La aplicación se llevó a cabo con el mismo equipo y en las mismas condiciones. En esta placa cromatográfica no se aplicaron estándares, en su lugar se aplicaron los extractos de acetato de etilo de raíz y de tallo de la especie (en las mismas concentraciones) para comparar los metabolitos secundarios obtenidos en estos extractos. El sistema de elución fue acetato de etilo: metanol 8:2. La placa también fue revelada con reactivo de Liebermann-Burchard y, en este caso, se aplicó otra placa (con características idénticas) que se corrió en el mismo sistema de elución pero que fue revelada con un reactivo para evidenciar alcaloides (reactivo de

Dragendorff; Stahl, 1969) puesto que en la especie se ha encontrado este tipo de compuestos.

Extracto metanólico.

Al igual que en el extracto de acetato de etilo, los extractos metanólicos se prepararon en las mismas concentraciones que el extracto hexánico y la aplicación de los extractos en la placa cromatográfica fue la misma que para el extracto de acetato de etilo. Para este extracto se analizaron dos sistemas de elución que fueron 1) acetato de etilo: metanol 8:2 y 2) etanol. También se desarrollaron dos placas en cada uno de los sistemas de elución, una de ellas se reveló con reactivo para terpenos y esteroides (reactivo de Liebermann-Burchard) y la otra con reactivo para alcaloides (reactivo de Dragendorff).

7. RESULTADOS.

7.1. *Cultivo de tejidos.*

A los 30 días de incubación se obtuvo un tejido amorfo (callo) sobre los cotiledones de la semilla. Este callo fue subcultivado en medio nutritivo fresco cada 28 días; después de algunos subcultivos (7 u 8) se observó una diferencia de coloración entre el tejido: parda, blanca y azul. La coloración del callo se presentó solamente como un patrón de crecimiento ya que el tejido no mantuvo la misma coloración a través del tiempo, es decir, el callo que presentó una coloración parda tenía crecimiento de tejido color azul y posteriormente blanca, todos los callos obtenidos fueron friables, esto es disgregables y totalmente amorfos (figuras 7.1 y 7.2).

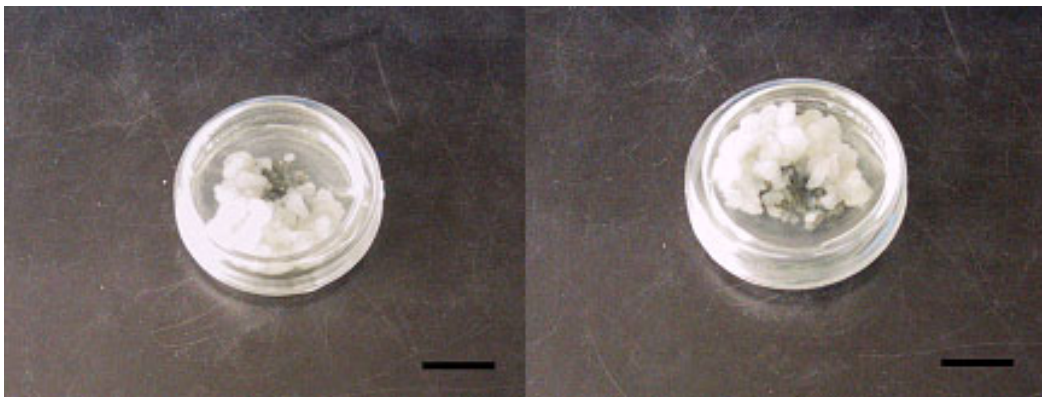


Fig. 7.1: Callo de *Hippocratea excelsa* con diferente coloración, después de 21 días del subcultivo, la caja de Petri de 5 cm de diámetro contiene 5 g de callo aproximadamente. La barra negra equivale a 2 cm.

El crecimiento del callo se hizo más eficiente cuando el subcultivo se realizó en frascos de

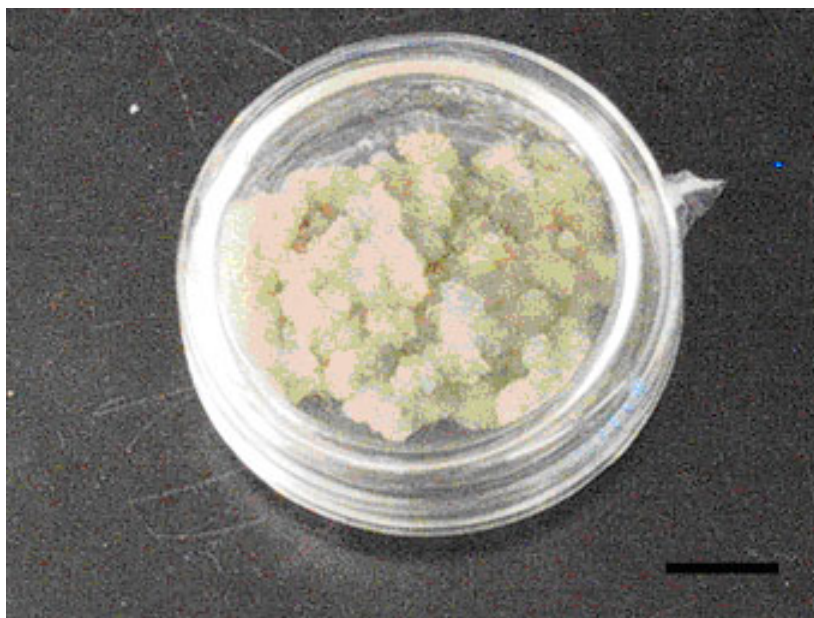


Fig. 7.2: Callo de *H. excelsa* de color blanquecino, después de 28 días del subcultivo, la caja de Petri de 5 cm de diámetro contiene 10 g de callo aproximadamente. La barra negra equivale a 1.5 cm.

menor capacidad (50 y 20 mL, así como en cajas Petri de 5 cm de diámetro) que la empleada inicialmente (240 mL). Cuando se realizó el subcultivo en frascos de 240 mL el crecimiento del callo a los 28 días fue pequeño (figura 7.3); mientras que cuando se redujo el tamaño del frasco el crecimiento de la biomasa se incrementó notablemente (figura 7.2); en cada subcultivo se sembró todo el tejido obtenido durante el periodo de incubación, la cantidad de tejido que se desechaba por muerte u oxidación fue muy pequeña (menor al 10 %). Con esta forma de sembrar el tejido, se incrementó la cantidad de callo obtenida en los 28 días de incubación (figura 7.4). Una vez obtenidos los callos con diferente coloración, se midió la actividad catalasa y el contenido de peróxido de hidrógeno.

7.1.1. *Actividad de la enzima catalasa y contenido de H_2O_2 en callos.*

El análisis de los resultados de la actividad catalasa (Figura 7.5) indicó que no hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los callos de color azul, blanco y pardo. El callo de



Fig. 7.3: Callo de *Hippocratea excelsa*, después de 28 días del subcultivo, en frascos de 240 mL.

color pardo presentó la mayor fluctuación en las mediciones (mayor error estandar).

El contenido de peróxido de hidrógeno para estos mismos callos (figura 7.6) mostró semejanzas en los callos de color azul y los callos de color blanco, el callo pardo mostró un mayor contenido de H_2O_2 .

Los resultados de la actividad catalasa (figura 7.5) y del contenido de H_2O_2 (figura 7.6) no mostraron diferencias entre el tejido de color azul y blanco. En relación al callo color pardo, aunque no se observó una diferencia significativa con respecto a los callos de otras coloraciones en la actividad catalasa, si se observó un incremento de contenido de peróxido de hidrógeno, lo cual indicó una mayor oxidación del callo que presentó esta coloración.

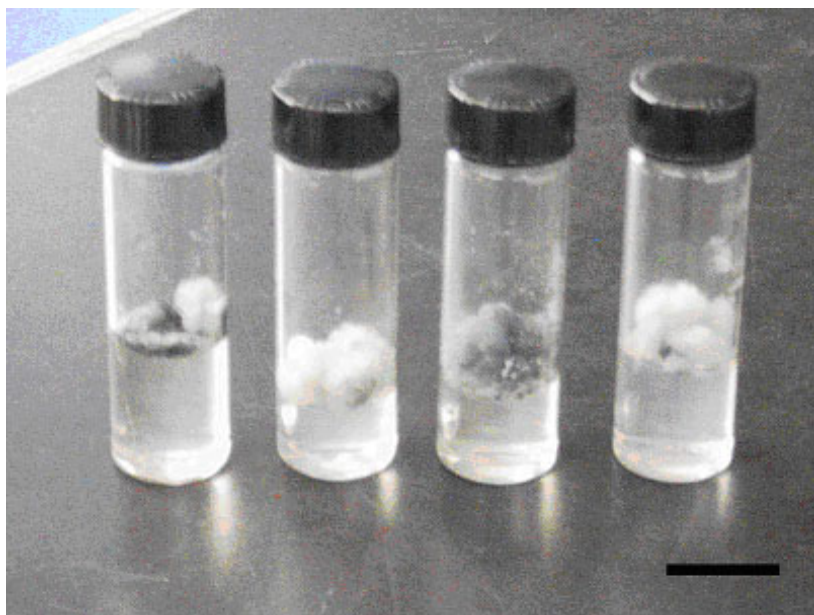


Fig. 7.4: Crecimiento de callos de diferente coloración de *H. excelsa* en frascos de 20 mL. De izquierda a derecha frasco 1) cultivo de 7 días de incubación, 2, 3 y 4) frascos de 21 días de incubación, con callos de diferente coloración. La barra negra equivale a 2 cm.

7.2. Ensayo preliminar de estrés en callo.

7.2.1. Estrés oxidativo en los tratamientos con estrés nutricional.

El contenido de H_2O_2 que mostró el tratamiento de 50 % de N_2 fue muy parecido al del control, sin embargo, en el tratamiento de 25 % de N_2 se observó un incremento significativo de este compuesto en el tejido, con respecto a los dos tratamientos anteriores (figura 7.7).

Para este estrés, la actividad de la enzima catalasa (figura 7.8), se comportó de manera contraria que el contenido de peróxido de hidrógeno en el tratamiento de mayor intensidad de estrés, es decir, la actividad de la enzima fue menor en este tratamiento (25 % de nitrógeno) que en cualquier otro, mientras que el contenido de H_2O_2 mostró la mayor concentración en dicho tratamiento. En el tratamiento de estrés medio (50 % de nitrógeno), se observó que la actividad de la enzima catalasa fue la más alta de todos los tratamientos que se aplicaron. Sin embargo, aunque se mostraron las tendencias antes mencionadas, hay que hacer notar que

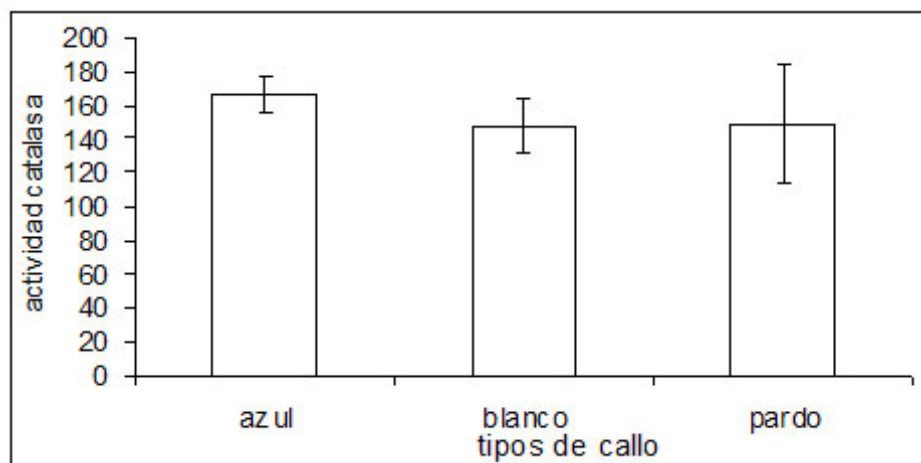


Fig. 7.5: Actividad catalasa ($\mu\text{mol}\cdot\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco) de los callos de *H. excelsa* en medio *MS* a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad después de 21 días de subcultivo. Los valores son promedios de 3 mediciones \pm error estandar.

estadísticamente las diferencias entre los tratamientos y el control no fueron significativas.

Estos resultados indicaron que no existió una respuesta directa de la actividad catalasa en los tratamientos de estrés nutricional en función de la intensidad del estrés, ya que se observó que en el tratamiento de mayor intensidad de estrés la enzima tendió a disminuir su actividad, esta disminución podría explicar el incremento del contenido de peróxido de hidrógeno en ese tratamiento.

7.2.2. Estrés oxidativo en los tratamientos con estrés osmótico.

En la figura 7.9 se observa que la cantidad de H_2O_2 aumentó en función del incremento de *PEG*, aunque sólo se encontraron diferencias significativas con respecto al control en el tratamiento de mayor intensidad de estrés (3% de *PEG*).

Por otro lado la actividad catalasa se mantuvo sin cambios en los tratamientos con 1 y 2% de *PEG* con respecto al control, pero incrementó significativamente en el tratamiento con 3% de *PEG* (figura 7.10).

Tanto en el control como en los tratamientos con 1 y 2% de *PEG*, la actividad catalasa

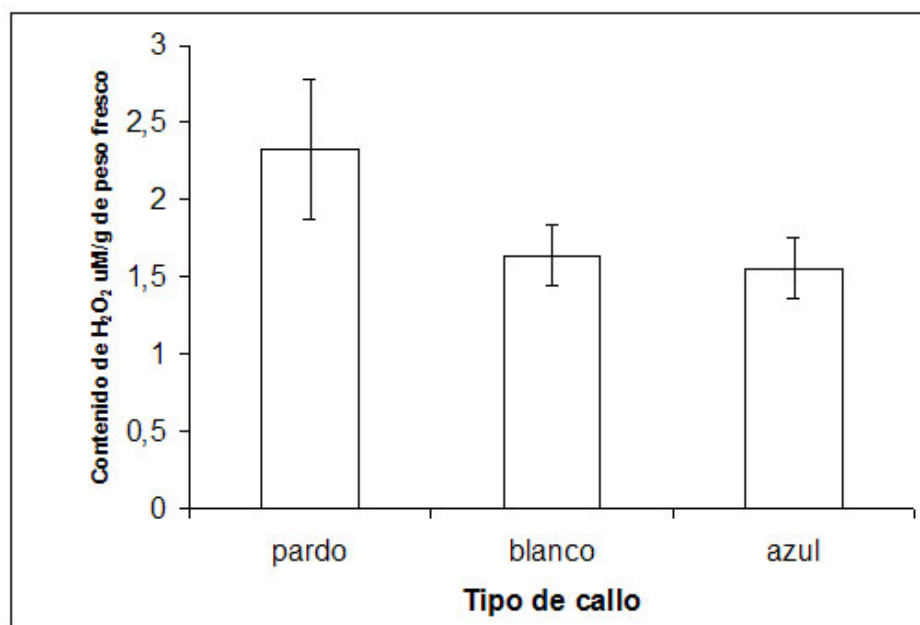


Fig. 7.6: Contenido de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{mol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco) en callos de *H. excelsa* que crecieron en medio *MS* a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad después de 21 días de subcultivo. Los valores son promedios de 3 mediciones \pm error estandar.

se podría correlacionar con la cantidad de peróxido de hidrógeno encontrada en las células, por otro lado, en el tratamiento con 3% de *PEG*, aunque la actividad catalasa incrementó, la cantidad de peróxido de hidrógeno no disminuyó sino que también aumentó, sin que exista realmente una correlación entre la actividad catalasa y el contenido de peróxido de hidrógeno.

7.2.3. Relación peso fresco/ peso seco.

Con el callo restante de los tratamientos que se liofilizó, se obtuvo el peso fresco y seco, se sometió a extracción selectiva con hexano, acetato de etilo y metanol, las cantidades se muestran en la tabla 7.1.

En el estrés nutricional se observó que, tanto en el control como en el tratamiento de 50% de nitrógeno, la relación peso fresco/peso seco se mantuvo constante (cerca a 9), es decir, no hay una modificación en el crecimiento del cultivo cuando se encuentra con la mitad de

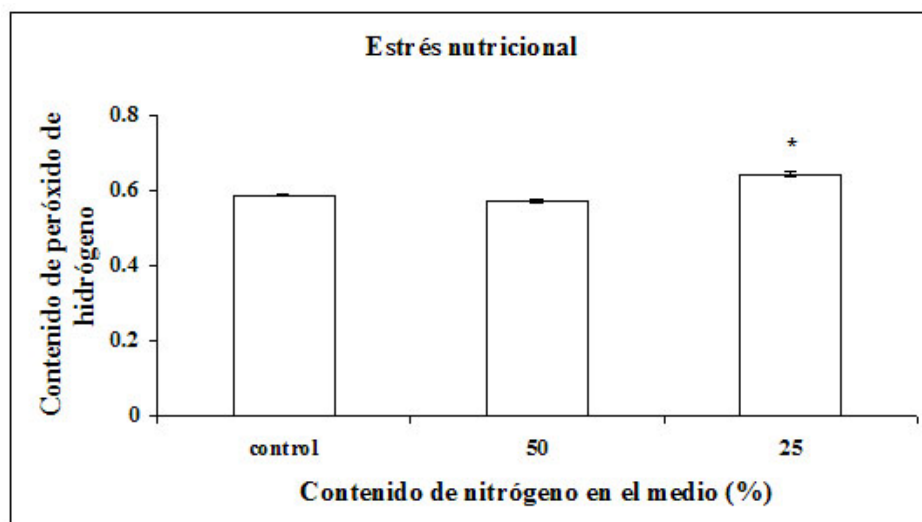


Fig. 7.7: Efecto del estrés nutricional en el contenido de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{mol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco) de los diferentes tratamientos de callos de *H. excelsa* después de 11 días de incubación. (*) Muestra diferencia significativa con respecto al control ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios de 3 mediciones \pm error estandar.

nitrógeno del medio *MS*. Sin embargo, en el tratamiento de 25% de nitrógeno la relación peso fresco/ peso seco incrementó (9.8). Esta modificación en el crecimiento celular (disminución de peso seco), aunque ligera, fue debida a la disminución de nitrógeno en el medio.

En el estrés osmótico no hubo una respuesta directa en la relación peso fresco/peso seco, en función de la intensidad del estrés. En el tratamiento de 1% de *PEG* se observó un ligero incremento de la relación peso fresco/ peso seco (9.5), contrariamente, en el tratamiento de 2% de *PEG* se observó una disminución con respecto al control, posiblemente debida a una deshidratación excesiva al filtrar el tejido cuando se tomó el peso fresco. Aunque los tratamientos no mostraron una tendencia uniforme con respecto a la intensidad del estrés, si se observó la disminución en el crecimiento de los cultivos estresados vista a través de esta relación (peso fresco/ peso seco).

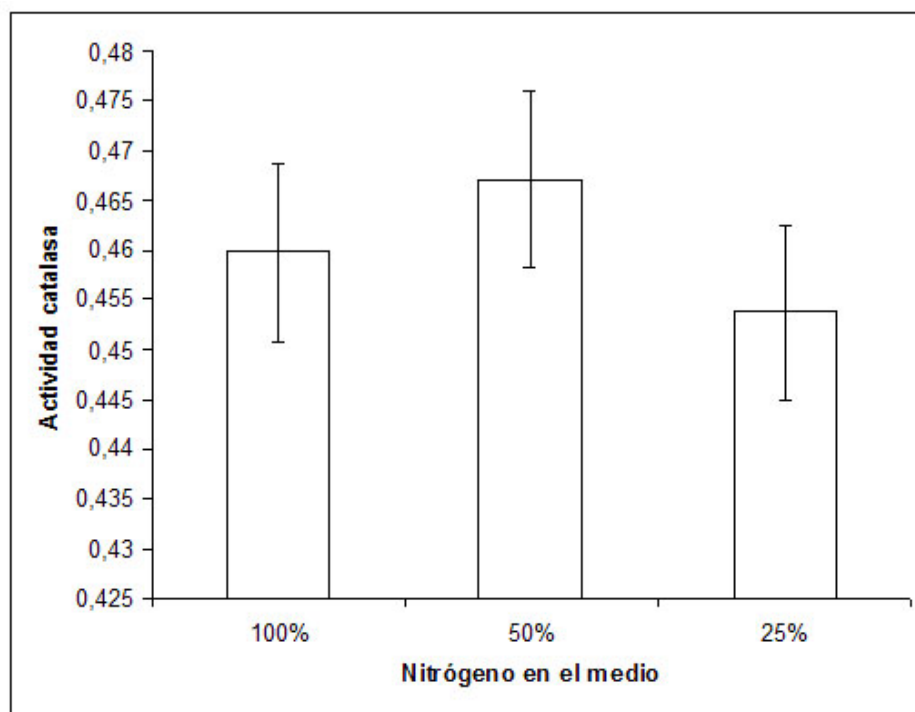


Fig. 7.8: Efecto del estrés nutricional por nitrógeno en la actividad catalasa ($\mu\text{mol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco) de callos de *H. excelsa*, después de 11 días de incubación. Los valores son promedios de 3 mediciones \pm error estandar.

7.2.4. Rendimiento de los diferentes extractos obtenidos.

Los extractos de los tratamientos con estrés nutricional mostraron para el extracto hexánico, el mayor rendimiento en el tratamiento de 25 % de nitrógeno, incrementándose 13 veces (en peso) con respecto del control. En el estrés osmótico se obtuvo un ligero incremento en el rendimiento de los extractos hexánicos con respecto al de su control, siendo el tratamiento de 2 % de PEG en donde se observó el mayor incremento.

En los extractos de acetato de etilo se observó que para el estrés nutricional hubo una disminución de los rendimientos de los extractos con respecto a su control, mientras que en el estrés osmótico se ve un incremento del rendimiento en el tratamiento con 3 % de PEG.

Los extractos metanólicos mostraron el mismo comportamiento que los extractos hexánicos para el estrés nutricional. En el estrés osmótico se observó una disminución de los

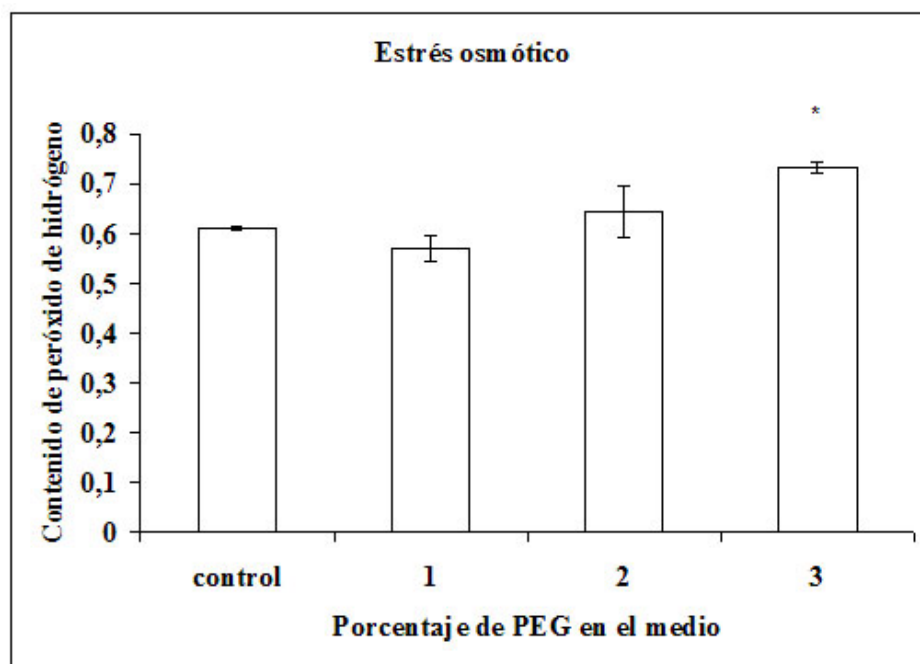


Fig. 7.9: Efecto del estrés osmótico en el contenido de peróxido de hidrógeno ($\mu\text{mol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco) de callos de *H. excelsa*, después de 11 días de incubación. (*) Muestra diferencia significativa con respecto al control ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios de 3 mediciones \pm error estandar.

rendimientos de todos los tratamientos.

7.2.5. Cuantificación de canofilol.

Se realizó la cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos obtenidos, y se realizaron las operaciones necesarias para calcular el contenido de canofilol por gramo de peso seco de material vegetal.

En la tabla 7.2 se observa el contenido de canofilol para cada uno de los tratamientos del estrés nutricional. En los dos tratamientos del estrés nutricional, se encontró una mayor cantidad de canofilol en el extracto con respecto a su control, la mayor cantidad de canofilol se encontró en el extracto del tratamiento de mayor estrés (25% de nitrógeno).

En el estrés osmótico (tabla 8.3) no se registraron incrementos significativos en el contenido de canofilol en ninguno de los tratamientos aplicados, observándose cantidades infe-

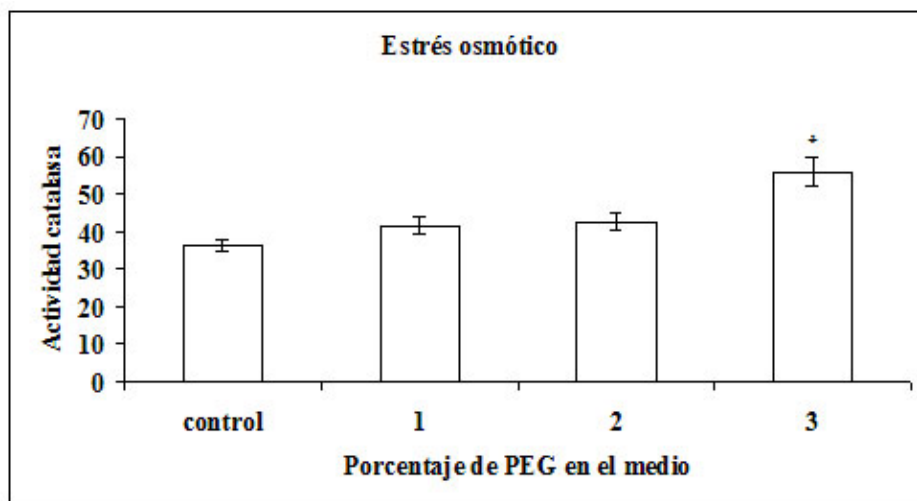


Fig. 7.10: Efecto del estrés osmótico en la actividad catalasa ($\mu\text{mol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco) de callos de *H. excelsa*, después de 11 días de incubación. (*) Muestra diferencia significativa con respecto al control ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios de 3 mediciones \pm error estandar.

riores a las encontradas en el control en todos los tratamientos.

Estos resultados fueron fundamentales para incrementar la concentración de *PEG* en los tratamientos con los cultivos de células en suspensión.

7.3. *Cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión.*

La cinética de crecimiento de los cultivos mostró que en el día 8 se encontraron los máximos pesos tanto frescos como secos para los cultivos de color azul, verde y pardo. Las células azules mostraron un mayor peso fresco y seco, le siguieron las células pardas y las de menor peso fueron las células verdes, que provenían del callo blanco (figura 7.11).

La cinética de crecimiento de las células en suspensión, indicó que la fase estacionaria de los cultivos se encuentra entre el día 8 y el día 10. Es en esta fase en donde se espera la producción más intensa de compuestos secundarios, ya que el crecimiento ha disminuido y los precursores pueden ser utilizados para la síntesis de metabolitos secundarios y estos contribuyen muy poco al peso seco. En los 28 días de exposición al estrés se esperaba que

Tab. 7.1: **Peso fresco y seco de callos expuestos a estrés después de 11 días de incubación, así como sus controles y rendimiento de los diferentes extractos obtenidos.**

	Peso fresco	Peso seco	Relación PF/PS	Extracto Hexánico g (%)	Extracto AcOEt g (%)	Extracto MeOH g (%)
Control	2.4198	0.2694	8.98	0.0018 (0.67)	0.0192 (7.1)	0.1037 (38.5)
50 % de N_2	2.2898	0.2537	9.02	0.0041 (1.62)	0.0113 (4.4)	0.0874 (34.4)
25 % de N_2	2.3352	0.2388	9.78	0.0217 (9.1)	0.0096 (4.0)	0.0982 (41.1)
1 % PEG	2.2375	0.2365	9.46	0.0023 (0.97)	0.0068 (2.9)	0.0841 (35.6)
2 % PEG	2.0339	0.2665	7.63	0.0039 (1.5)	0.0144 (5.4)	0.0816 (30.6)
3 % PEG	1.2290	0.1416	8.68	0.0017 (1.2)	0.0146 (8.2)	0.0473 (33.4)

Tab. 7.2: **Contenido de canofilol detectado en extractos hexánicos de callos de *H. excelsa* expuestos a estrés nutricional después de 11 días de incubación y referido al peso seco (g) de material vegetal.**

Tratamientos	μg de canofilol	Veces que incrementó con respecto al control	%
Control	340	1	0.034
50 %	480	1.4	0.048
25 %	2710	7.97	0.271

los cultivos cumplieran dos ciclos completos y se pudiera dar una mayor acumulación de los metabolitos secundarios producidos por las células.

7.4. *Cultivos de células en suspensión sometidos a estrés.*

La densidad inicial de los cultivos estuvo entre 23 y 28 mg/mL de medio nutritivo para los biorreactores que tuvieron mayor densidad celular (+) y entre 5 y 11 mg/mL en los biorreactores con densidad celular baja (-). Una vez que los cultivos fueron sometidos a los diferentes tratamientos durante 28 días, se dejaron de agitar para sedimentar las células y se eliminó el medio nutritivo por decantación. Las células se congelaron y posteriormente se

Tab. 7.3: Contenido de canofilol detectado en extractos hexánicos de callos de *H. excelsa* expuestos a estrés osmótico después de 11 días de incubación y referido al peso seco (g) de material vegetal.

Tratamientos	μg de canofilol	Veces que incrementó con respecto al control	%
Control	442.2	1	0.044
1% PEG	64.02	0.14	0.0064
2% PEG	347.5	0.78	0.0035
3% PEG	235.2	0.53	0.0235

lioofilizaron para obtener el peso seco de cada uno de los tratamientos. Debido al gran volumen de los cultivos no se consideró confiable la medida del peso fresco ya que mostraba una gran variación por las condiciones de filtración. En las tablas 7.4 y 7.5 se observan los pesos secos de los diferentes tratamientos y las densidades finales de los cultivos expresada en g de peso seco/mL de medio nutritivo, respectivamente.

Tab. 7.4: Pesos secos de los tratamientos de las células en suspensión expuestas a diferentes condiciones de estrés después de 28 días de incubación.

Tratamiento	Peso seco (g)
Control (+)	26.4911
Control (-)	4.8245
50 % de N_2 (+)	6.5138
50 % de N_2 (-)	2.3802
25 % de N_2 (+)	14.0316
25 % de N_2 (-)	7.0271
4% PEG (+)	12.7978
4% PEG (-)	10.3878
8% PEG (+)	32.8918
8% PEG (-)	36.1619

Se puede observar en los tratamientos que tuvieron mayor densidad (+), que aunque el peso de las células de los diferentes tratamientos se incrementó en relación directa al aumento del estímulo tanto nutricional como osmótico, los incrementos no alcanzaron el peso

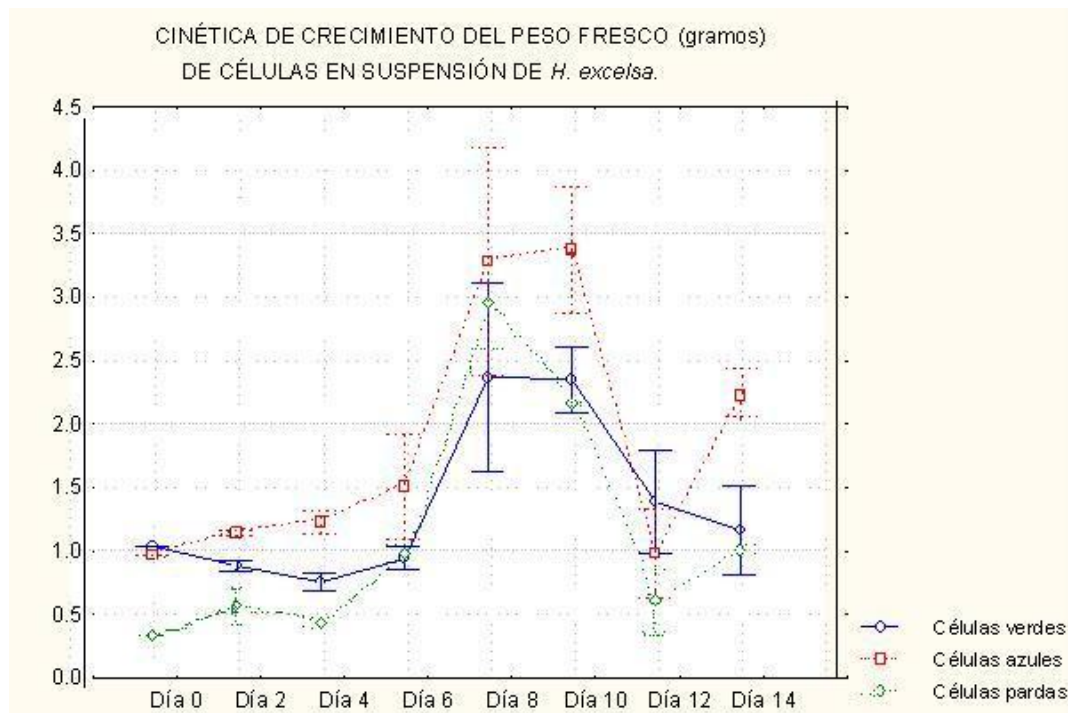


Fig. 7.11: Curvas de la cinética de crecimiento de células en suspensión de *H. excelsa* obtenidas de diferentes tipos de callo. Peso fresco (g).

Tab. 7.5: Densidad final de los tratamientos, expresada en g de peso seco de las células/mL de medio nutritivo.

Tratamiento	Densidad final (mg/mL)
Control (+)	4.8
Control (-)	0.87
50 % de N_2 (+)	1.2
50 % de N_2 (-)	0.43
25 % de N_2 (+)	2.6
25 % de N_2 (-)	1.3
4 % PEG (+)	2.3
4 % PEG (-)	1.9
8 % PEG (+)	4.6
8 % PEG (-)	5.0

del control, debido a que el biorreactor control conteniendo el cultivo original presentó una sedimentación celular que no permitió una distribución uniforme. Para los tratamientos que tuvieron menor densidad celular (-) el comportamiento fue similar, pero en este caso la

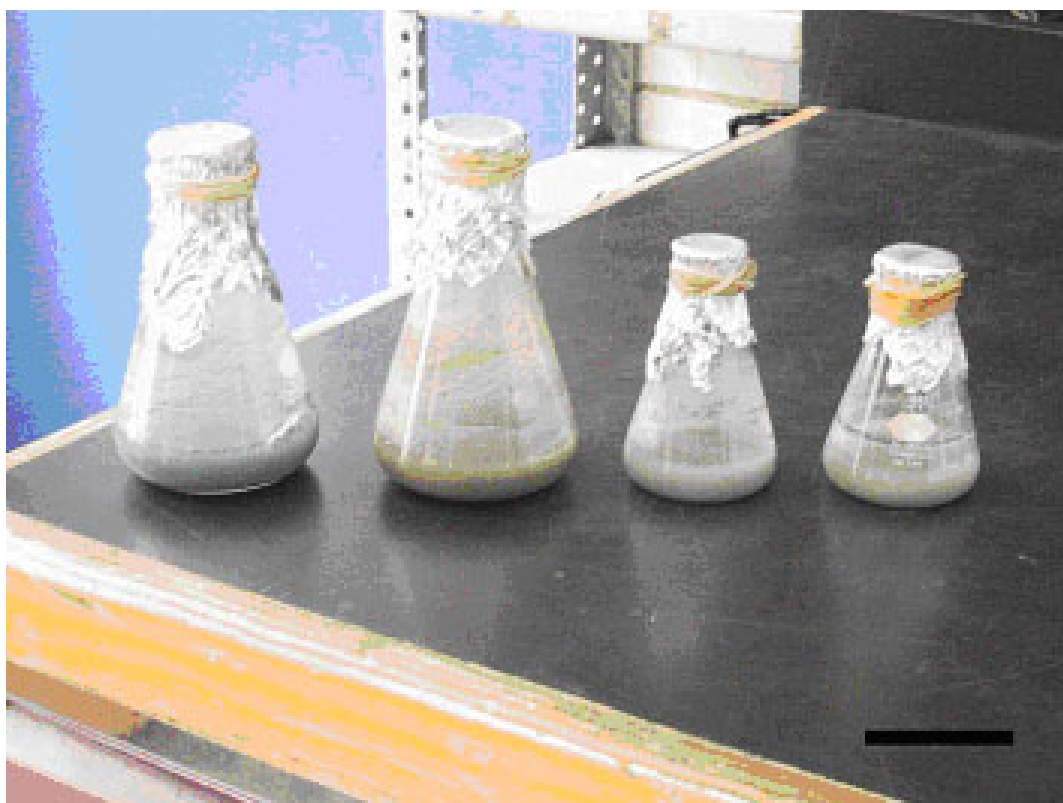


Fig. 7.12: Cultivos de células en suspensión de color azul, pardo y verde, estas últimas provenían de callo color blanquecino, cultivos después de 7 días de agitación a 100 rpm, matraces de 125 y 50 mL.

mayoría de los tratamientos rebasó el peso observado en el control correspondiente, excepto el tratamiento de 50 % de nitrógeno. Esto sugirió un mayor crecimiento celular cuando la densidad fue menor ya que en esas condiciones las células tuvieron una mayor disponibilidad de nutrientes y espacio.

7.5. *Análisis químico.*

7.5.1. *Separación cromatográfica del extracto hexánico de la corteza de raíz.*

La separación cromatográfica del extracto hexánico de la raíz (5.5086 g) arrojó un total de 279 fracciones, las fracciones fueron clasificadas de acuerdo al eluyente de separación y en

la tabla 7.5.1 se observa esta clasificación.

Tab. 7.6: Fracciones obtenidas en la cromatografía en columna del extracto hexánico de raíz, con su eluyente de separación.

Eluyente	Intervalo de fracciones
Hexano	1-20
Hexano: <i>AcOEt</i> 9:1	21-33
Hexano: <i>AcOEt</i> 8:2	34-88
Hexano: <i>AcOEt</i> 7:3	89-100
Hexano: <i>AcOEt</i> 6:4	101-117
Hexano: <i>AcOEt</i> 4:6	118-160
Hexano: <i>AcOEt</i> 2:8	161-201
<i>AcOEt</i>	202-241
<i>AcOEt:MeOH</i> 5:5	242-257
<i>MeOH</i>	258-279

Las fracciones se analizaron en capa fina y se reunieron por semejanza del perfil cromatográfico de la siguiente manera:

1-8	9-10	11-27	28-42	43-49	51-60	61-74	75-90	91-94	95-100
101-108	109-116	117-132	133-137	138-145	146-155	156-162	163-168	169-175	176-184
185-194	195-203	204-212	213-221	222-230	231-243	244-251	252-255		

Se obtuvieron 2 sustancias presumiblemente puras, a las cuales se les tomó el punto de fusión y se realizó un análisis espectroscópico de *RMN* de hidrógeno y carbono, estos compuestos fueron identificados; uno como pristimerina y el otro como canofilol. Las características de los compuestos son las siguientes:

Punto de fusión °C	Compuesto
222-226	Pristimerina
255-260	Canofilol

Los extractos hexánicos de los diferentes tratamientos se cromatografiaron en capa fina con los compuestos purificados, además de canofilal y friedelina, que fueron proporcionados por la Dra. Aída Nelly García Argáez (**Facultad de Ciencias**, UNAM) y el Dr. Guillermo Delgado Lamas (Instituto de Química, UNAM), respectivamente.

7.5.2. Obtención de extractos de los cultivos de células en suspensión.

Para llevar a cabo el análisis químico de los cultivos celulares, se realizaron extracciones selectivas con hexano, acetato de etilo y metanol, los extractos se llevaron hasta sequedad y se calculó el rendimiento (tabla 7.7).

Tab. 7.7: Rendimiento en g y en % de los extractos obtenidos de cada uno de los tratamientos aplicados.

Tratamientos	Peso seco g	Extracto Hexánico g (%)	Extracto de AcOEt g (%)	Extracto metanólico g (%)
Control (+)	26.4911	0.2045 (0.77)	0.2504 (0.94)	4.5734 (17.26)
Control (-)	4.8245	0.0305 (0.63)	0.0651 (1.35)	1.0131 (21)
50 % de N_2 (+)	6.5138	0.0358 (0.55)	0.1136 (1.74)	1.5329 (23.53)
50 % de N_2 (-)	2.3802	0.0154 (0.65)	0.2030 (8.53)	0.643 (27.01)
25 % de N_2 (+)	14.0316	0.1282 (0.91)	0.1486 (1.06)	3.3747 (24.05)
25 % de N_2 (-)	7.0271	0.0382 (0.54)	0.0698 (0.99)	1.6037 (22.82)
4 % PEG (+)	12.7978	0.0965 (0.75)	0.1591 (1.24)	5.9045 (46.14)
4 % PEG (-)	10.3878	0.0612 (0.59)	0.0579 (0.56)	4.2875 (41.27)
8 % PEG (+)	32.8918	0.2619 (0.80)	0.2521 (0.77)	18.3625 (55.83)
8 % PEG (-)	36.1619	0.0347 (0.096)	0.1289 (0.36)	21.516 (59.50)

En el estrés nutricional de las células en suspensión se observó, al igual que lo obtenido en el ensayo preliminar con callo, que en el tratamiento con mayor intensidad de estrés (25 % de nitrógeno) es donde se obtuvo el mayor rendimiento del extracto hexánico, sólo para los tratamientos con mayor densidad celular (+). En los tratamientos con menor densidad celular (-) no se observó incremento en algún tratamiento. En el estrés osmótico no hubo modificación en el rendimiento obtenido en los dos tratamientos con respecto del control.

En los extractos de acetato de etilo se observó, en el estrés nutricional, un incremento importante en el tratamiento de 50 % de nitrógeno tanto en el biorreactor de mayor densidad celular como en el de menor densidad, no se detectó un incremento real en el tratamiento de 25 % de nitrógeno.

Para el estrés osmótico el incremento en el rendimiento del extracto de acetato de etilo dependió de la densidad celular del tratamiento, en 4 % de *PEG* y en el biorreactor de mayor densidad celular se obtuvo un incremento del rendimiento del extracto, mientras que, en el cultivo que tuvo menor densidad celular no se observó este incremento sino por el contrario hubo una disminución del mismo. En los extractos metanólicos se observó en todos los tratamientos, tanto nutricionales como osmóticos, un incremento de los rendimientos con respecto al control.

7.5.3. *Análisis cromatográfico de extractos.*

Extracto hexánico de las células en suspensión.

El perfil cromatográfico de este extracto (figura 7.13) mostró que existe una pequeña diferencia entre los controles (carriles 1 y 2). Los tratamientos que provinieron del biorreactor con menor densidad celular fueron marcados con un símbolo (-), y los que provinieron del reactor con mayor densidad celular marcados con el símbolo (+).

En donde los carriles de izquierda a derecha representan: 1.- Control (+), 2.- Control (-), 3.- 50 % de N_2 (+), 4.- 50 % de N_2 (-), 5.- 25 % de N_2 (+), 6.- 25 % de N_2 (-), 7.- 4 % de *PEG* (+), 8.- 4 % de *PEG* (-), 9.- 8 % de *PEG* (+), 10.- 8 % de *PEG* (-), 11.- pristimerina, 12.- canofilal, 13.- friedelina y 14.- canofilol.

En el control que tuvo mayor densidad celular (carril 1) se observó una mayor intensidad en los compuestos de menor polaridad (figura 7.14).

Los tratamientos con estrés nutricional del 50 % de nitrógeno (carriles 3 y 4), mostraron en la cromatoplaça mayor intensidad en todas las manchas (figura 7.15) que los controles,

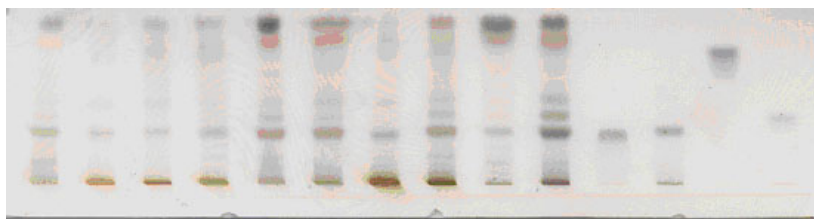


Fig. 7.13: Perfil cromatográfico del extracto hexánico de los tratamientos de las células en suspensión, y de cuatro estándares, sistema de elución hexano: acetato de etilo 8:2, revelado con reactivo de Liebermann-Burchard.

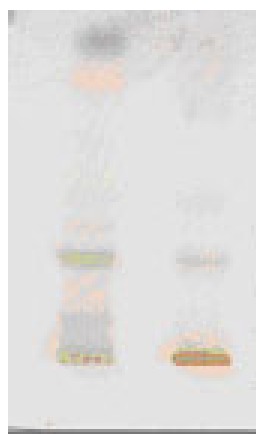


Fig. 7.14: Placa cromatográfica del extracto hexánico de los controles (células en suspensión), carriles 1 y 2.

aunque fue en el tratamiento de 25 % de nitrógeno, en donde se observó la mayor cantidad en las manchas observadas (carriles 5 y 6).

En el estrés osmótico, con el tratamiento de 4 % de *PEG*, carriles 7 y 8 de la figura 7.16, se observó un perfil cromatográfico semejante al que se presentó con 25 % de N_2 (carriles 5 y 6), en la banda de aplicación del estrés osmótico se observó una mayor concentración de compuestos que no eluyeron.

En el tratamiento de estrés osmótico con 8 % de *PEG* (–) (figura 7.13; carril 10), se observó el mayor número de manchas con la mayor intensidad.

La mayor diferencia entre los tratamientos la encontramos en la zona de menor polaridad, en el estrés nutricional están más concentrados los compuestos menos polares que en el estrés osmótico. La placa fue analizada por el densitómetro después de revelarla con el reactivo

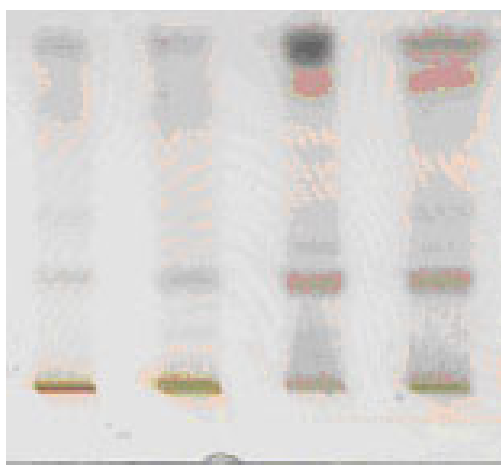


Fig. 7.15: Placa cromatográfica del extracto hexánico de las células en suspensión carriles 3, 4 (50 % de N_2) 5 y 6 (25 % de N_2).

de Liebermann-Burchard y se muestra en la figura 7.17 el cromatograma de los compuestos detectados a 450 nm.

La cuantificación de los compuestos en el extracto hexánico se muestra en la tabla 7.8.

Tab. 7.8: Cuantificación de compuestos en los extractos hexánicos de los diferentes tratamientos aplicados $\mu\text{g}/(\text{gramo de peso seco})$. *nd* = no detectado

Tratamiento	Friedelina	Pristimerina	Canofilal	Canofilol
Control (+)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	772	<i>nd</i>
Control (-)	<i>nd</i>	107,7	<i>nd</i>	<i>nd</i>
50 % de N_2 (+)	<i>nd</i>	678,2	80,6	<i>nd</i>
50 % de N_2 (-)	<i>nd</i>	473,5	<i>nd</i>	<i>nd</i>
25 % de N_2 (+)	<i>nd</i>	2243,2	<i>nd</i>	8338,1
25 % de N_2 (-)	<i>nd</i>	1451,3	<i>nd</i>	6960,6
4 % PEG (+)	<i>nd</i>	1029,4	<i>nd</i>	<i>nd</i>
4 % PEG (-)	616,3	<i>nd</i>	1056,7	2178,6
8 % PEG (+)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	427,4	<i>nd</i>
8 % PEG (-)	<i>nd</i>	329,2	<i>nd</i>	3178,7

Además de la identificación de los estándares en los extractos hecha por el densitómetro, se pudieron observar otras manchas en cada uno de los diferentes tratamientos. En el estrés nutricional se observaron 3 manchas en el control y 3 manchas en el estrés de 50 % de N_2 ; en el

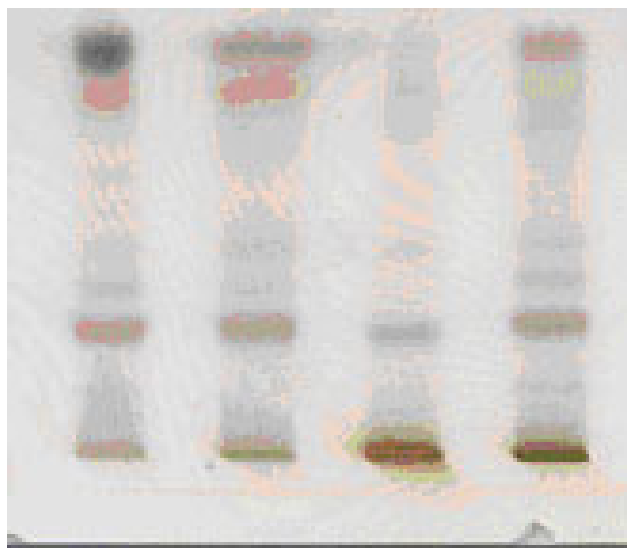


Fig. 7.16: Placa cromatográfica de extracto hexánico (células en suspensión) carriles 5, 6 (25 % de N_2) 7 y 8 (4 % de PEG).

tratamiento de 25 % de N_2 se detectaron 8 manchas. Esto sugiere un incremento en el número de compuestos en este tratamiento debido al estrés aplicado. Para el estrés osmótico también se observó un incremento de compuestos en los dos tratamientos aplicados (7 manchas).

Extracto de acetato de etilo de las células en suspensión.

Para el análisis de los extractos de acetato de etilo no se aplicaron estándares, por lo que se utilizaron los extractos de acetato de etilo de raíz y de tallo, para comparar los metabolitos secundarios obtenidos en estos extractos.

En donde los carriles de izquierda a derecha representan: 1.- Control (+), 2.- Control (-), 3.- 50 % de N_2 (+), 4.- 50 % de N_2 (-), 5.- 25 % de N_2 (+), 6.- 25 % de N_2 (-), 7.- 4 % de PEG (+), 8.- 4 % de PEG (-), 9.- 8 % de PEG (+), 10.- 8 % de PEG (-), 11.- extracto de acetato de etilo de tallo de *H. excelsa* y 12.- extracto de acetato de etilo de raíz de *H. excelsa*.

La cromatoplaça del extracto de acetato de etilo revelada con Liebermann-Burchard mostró, en el tratamiento de 50 % de N_2 (figura 7.18 carriles 3 y 4) una disminución de

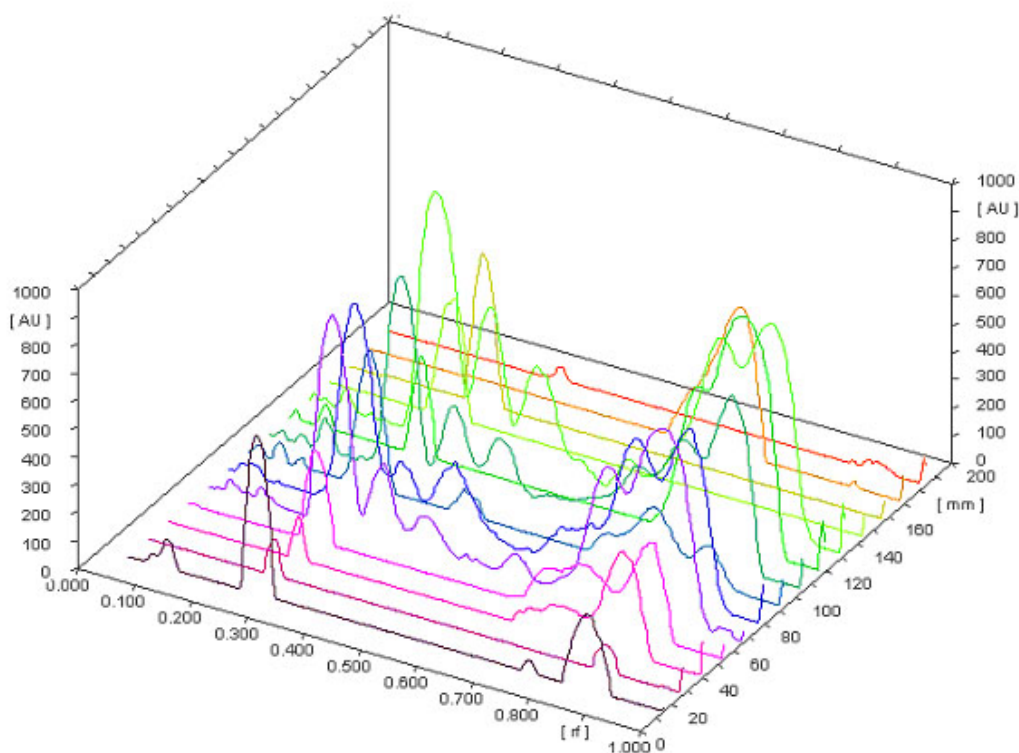


Fig. 7.17: Cromatograma de los extractos hexánicos obtenida en el densitómetro, En donde las líneas de adelante hacia atrás representan: 1.- Control (+), 2.- Control (-), 3.- 50 % de N_2 (+), 4.- 50 % de N_2 (-), 5.- 25 % de N_2 (+), 6.- 25 % de N_2 (-), 7.- 4 % de PEG (+), 8.- 4 % de PEG (-), 9.- 8 % de PEG (+), 10.- 8 % de PEG (-), 11.- pristimerina, 12.- canofilal, 13.- friedelina y 14.- canofilol.

los compuestos más polares, pero los compuestos menos polares del extracto se observaron con mayor intensidad que los controles. En el tratamiento de 25 % de N_2 (figura 7.18 carriles 5 y 6) la placa mostró una mayor intensificación de todas las bandas desarrolladas. En este último carril se puede ver un incremento de todos los compuestos separados y revelados en la placa cromatográfica. Se puede decir que el estrés nutricional medio, promovió la acumulación de un tipo de compuestos (no polares), y cuando el estrés se intensificó la respuesta de las células generó la producción de compuestos tanto polares como no polares. En el estrés

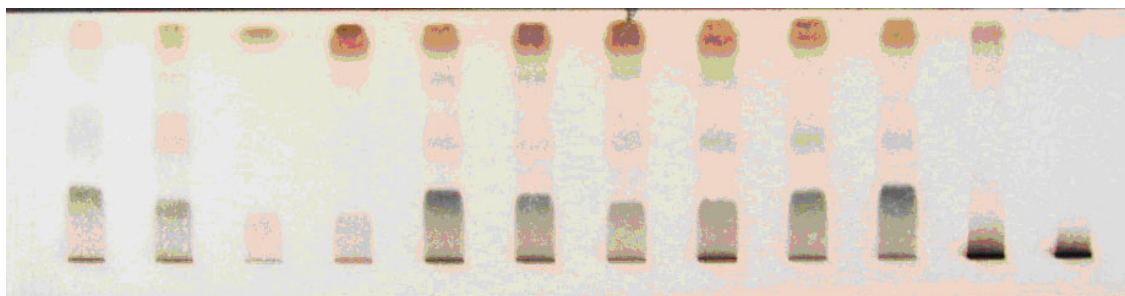


Fig. 7.18: Placa cromatográfica del extracto de acetato de etilo, eluyente acetato de etilo: metanol 8:2 revelada con reactivo de Liebermann-Burchard.

osmótico (4 y 8 % de *PEG*) el perfil que se observó en la placa es muy semejante en los dos tratamientos y nuevamente se observó una mayor cantidad de compuestos no polares en el tratamiento de menor intensidad (4 % de *PEG*. figura 7.18 carriles 7 y 8), mientras que en el tratamiento de mayor intensidad se observó un ligero incremento de los compuestos polares del extracto (figura 7.18 carriles 9 y 10).

Los perfiles de los tratamientos fueron diferentes a los perfiles de los extractos de tallo y raíz, sólo hubo un compuesto del extracto de tallo que se encontró en todos los tratamientos.

En la tabla 7.9 se muestran los porcentajes de las manchas que registró el densitómetro a una longitud de 254 nm y los *R_f* que presentaron las manchas.

En donde los carriles de izquierda a derecha representan: 1.- Control (+), 2.- Control (-), 3.- 50 % de N_2 (+), 4.- 50 % de N_2 (-), 5.- 25 % de N_2 (+), 6.- 25 % de N_2 (-), 7.- 4 % de *PEG* (+), 8.- 4 % de *PEG* (-), 9.- 8 % de *PEG* (+), 10.- 8 % de *PEG* (-), 11.- extracto de tallo de *H. excelsa* y 12.- extracto de raíz de *H. excelsa*.

En la placa revelada con reactivo de Dragendorff (figura 7.20) se observó la presencia de alcaloides en los controles. Para el estrés nutricional se observó una diferencia entre el tratamiento con la mitad del nitrógeno y el tratamiento con la cuarta parte del mismo, en el primero no se observaron estos compuestos, mientras que en el tratamiento de mayor intensidad si se detectaron (carriles 5 y 6). En el estrés osmótico sucedió algo similar, la

Tab. 7.9: Porcentaje de aparición de las diferentes manchas observadas en el extracto de acetato de etilo.

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.07	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-
0.09-0.10	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	0.6	1.3
0.13-0.16	34	14	2	3.2	17.4	12	7.8	10	16	22	1.3	0.3
0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.51
0.23-0.26	-	-	-	-	0.8	0.7	0.8	-	0.2	-	2	1.1
0.29-0.30	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	2.3	1.4
0.33-0.37	2.3	8.2	-	-	0.3	0.6	4	4.5	2.3	1.2	1.7	1
0.40-0.44	2.8	12	-	3	1.6	4.2	1.6	3.2	1.9	1.2	1.5	-
0.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.4	-
0.52-0.53	-	-	-	-	23.2	12.4	-	-	-	-	-	-
0.58-0.69	19	21	5.4	56	13	22	45	29	-	37	35	26.2
0.71-0.76	27	45	93	38	32	36.4	38	26.3	56	18.4	22.2	-
0.81	-	-	-	-	-	-	-	-	24	20	30	68

intensidad de las bandas de estos compuestos estuvo en relación con la intensidad del estrés aplicado, a mayor intensidad de estrés mayor concentración de alcaloides (carriles 7, 8, 9 y 10). Los compuestos de naturaleza alcaloídica que se presentaron en este extracto, no están presentes en los extractos de tallo y de raíz.

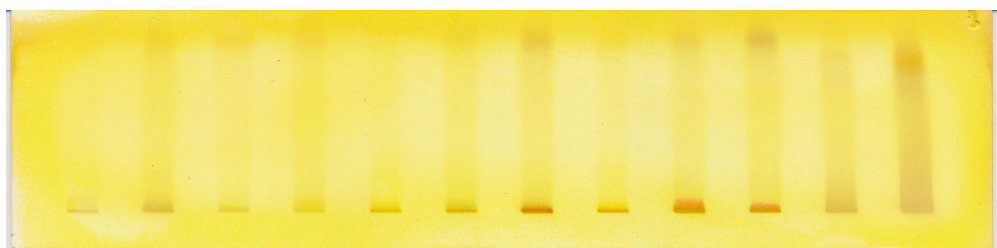


Fig. 7.19: Placa cromatográfica del extracto de acetato de etilo revelada con reactivo de Dragendorff. Sistema de elución acetato de etilo: metanol 8: 2.

Extracto metanólico de las células en suspensión.

En la placa cromatográfica del extracto metanólico (figura 7.21), se observó que el estrés nutricional fue el tratamiento que incrementó de manera más intensa la producción de com-

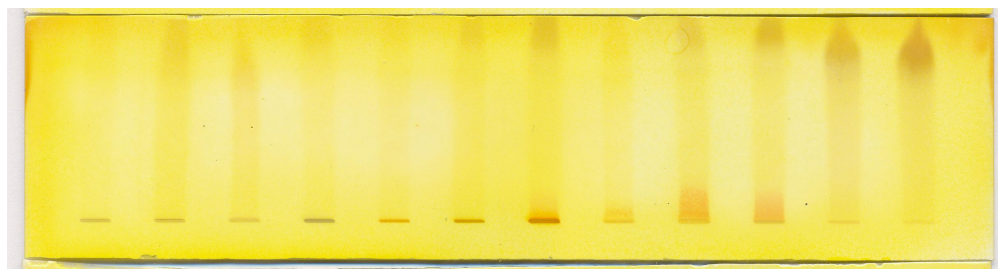


Fig. 7.20: Placa cromatográfica del extracto de acetato de etilo revelada con reactivo de Dragendorff. Sistema de elución: metanol.

puestos terpénicos de naturaleza polar, tanto con 50 % de N_2 (carriles 3 y 4), como con 25 % (carriles 5 y 6), al compararse este incremento con los datos del control (carriles 1 y 2). En el estrés osmótico también se observó un incremento de estos compuestos con respecto del control; lo cual no fue tan evidente como en los tratamientos de estrés nutricional. Nuevamente el perfil cromatográfico de los extractos obtenidos con los tratamientos, es muy diferente al perfil cromatográfico del extracto metanólico de raíz.

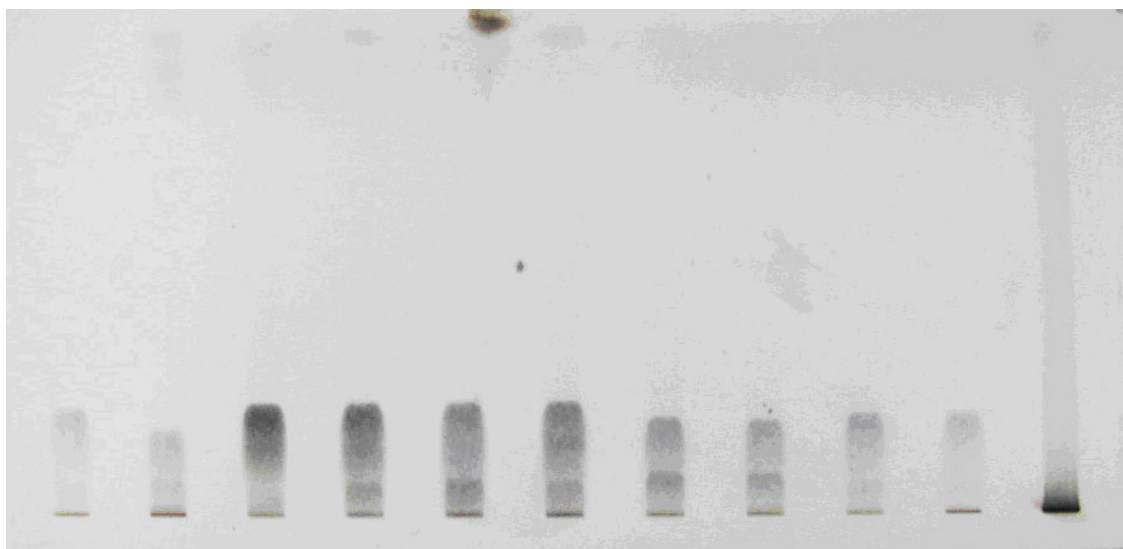


Fig. 7.21: Placa cromatográfica del extracto metanólico, revelada con reactivo de Liebermann-Burchard. Sistema de elución acetato de etilo: metanol 8: 2.

En las cromatoplasmas del extracto metanólico reveladas con reactivo de Dragendorff (figura 7.22 y figura 7.24) se destacó la diferencia de compuestos alcaloídicos que tuvieron los

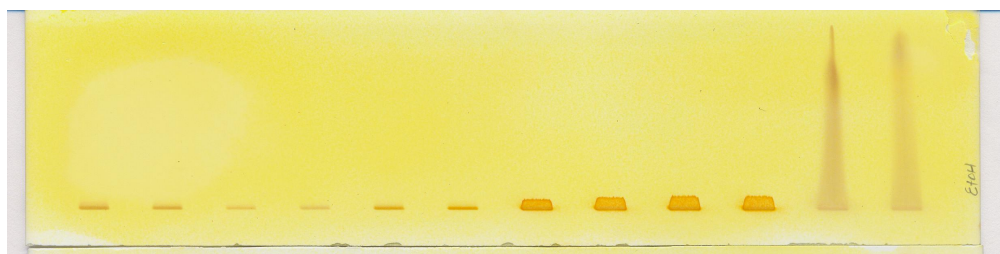


Fig. 7.22: Placa cromatográfica del extracto metanólico, revelada con reactivo de Dragendorff. Sistema de elución acetato de etilo: metanol 8: 2.

tratamientos en función del tipo de estrés al que fueron sometidos. En los tratamientos de estrés nutricional, se observó la presencia de alcaloides en el extracto metanólico, tanto en el tratamiento de estrés medio como en el de mayor intensidad. En los tratamientos de estrés osmótico no se observaron los compuestos presentes en el estrés nutricional; aunque se encuentran presentes otros, de naturaleza más polar.

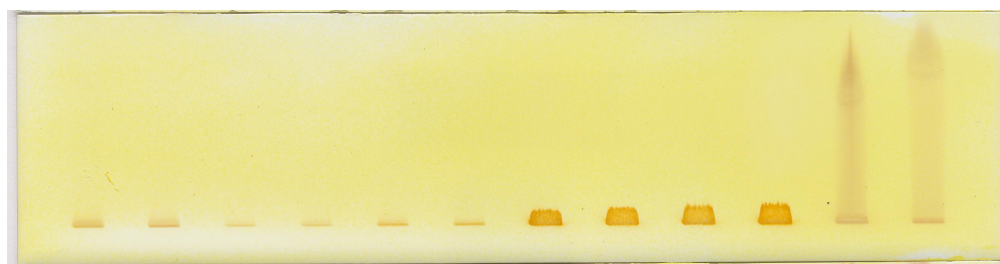


Fig. 7.23: Placa cromatográfica del extracto metanólico, revelada con reactivo de Dragendorff. Sistema de elución: etanol.

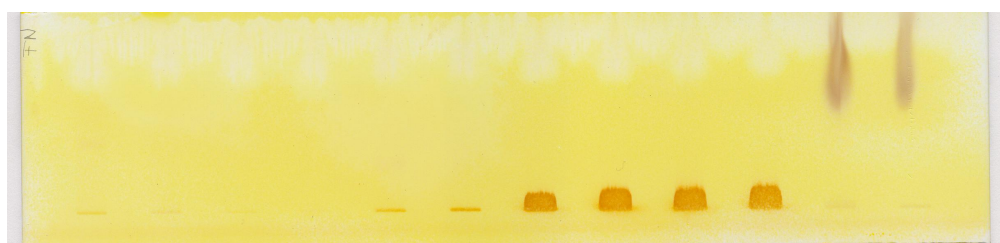


Fig. 7.24: Placa cromatográfica del extracto metanólico, revelada con reactivo de Dragendorff. Sistema de elución: butanol: ácido acético: agua: 4: 1: 1.

8. DISCUSIÓN.

Una de las limitantes más importantes para la obtención de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos es la cantidad de biomasa que se obtiene en un cultivo determinado, además de encontrar las condiciones idóneas para optimizar la acumulación del producto de interés, regularmente asociadas con algún tipo de estrés, biótico o abiótico. En el caso de *H. excelsa* se sabe que la producción (o acumulación) de compuestos secundarios con actividad biológica se encuentra en la raíz, sin embargo, en trabajos previos (Herrera, 2001) se encontró que los cultivos de callo, provenientes de los cotiledones de la semilla, son capaces de producir algunos metabolitos secundarios presentes en la raíz. Aunque en ese trabajo se obtuvo el establecimiento del callo, el crecimiento fue muy lento y la obtención de una gran cantidad de biomasa requirió de mucho tiempo.

En este trabajo la proliferación del callo fue mejorada. Principalmente cuando el tejido se sembró en frascos de menor capacidad (50 y 20 *mL* e inclusive en cajas Petri de 5 *cm* de diámetro, figura 7.2) a las originalmente utilizadas 250 y 120 *mL* (figura 7.3).

El incremento de la biomasa fue significativo. La cantidad de callo que fue sembrada en cada frasco también fue proporcionalmente mayor. Es posible que este incremento en la biomasa se haya debido a la disminución en la cantidad de oxígeno disponible en el cultivo o de manera indirecta a un ligero incremento en la temperatura del mismo, por lo que parecería recomendable para la proliferación del callo de esta especie, el uso de frascos de estas capacidades para obtener grandes cantidades de biomasa en el menor tiempo posible.

Las coloraciones que se obtuvieron en los cultivos de callo (blanco, azul y pardo) son

semejantes a las que se obtuvieron en el trabajo de Nakano y col. (1997) en el que se utilizaron como explantes, hojas de *Tripterygium wilfordii*, especie de la misma familia (y que ha sido usada contra cáncer y como insecticida por los Chinos), para establecer el cultivo de callo. En dicho trabajo el tejido fue subcultivado cada 4 semanas y después de 8 meses obtuvieron callo de color verde, negro y blanco, el medio nutritivo y las condiciones de incubación fueron diferentes a las manejadas en este trabajo.

Debido a la diferencia de coloraciones encontrada en los cultivos se llevó a cabo una cuantificación del H_2O_2 (compuesto indicador del grado de oxidación de un tejido), así como también de la actividad de la enzima catalasa, relacionada con la eliminación de H_2O_2 en los callos de diferente coloración. Los resultados mostraron que el callo que presentó una coloración azulada o blanca tuvo menor contenido de H_2O_2 que el callo con coloración parda (figura 7.6). Es posible que esto se haya debido a la edad del tejido, ya que el mismo tejido presentó las tres diferentes coloraciones como un patrón de crecimiento; primero blanco y posteriormente azul y pardo; en estados de reciente generación del callo, la cantidad de peróxido de hidrógeno es menor que en estadios de madurez (Neill y col., 2002). El callo pardo, que fue el más abundante, no mostró una diferencia significativa en actividad catalasa con respecto a los callos que presentaron las otras coloraciones (figura 7.5). Una modificación de la actividad de la enzima catalasa es un importante indicador de estrés (Willekens y col., 1995). Con estos dos resultados podemos decir que aunque el callo de color pardo presenta una mayor cantidad de H_2O_2 , esta condición no fue una limitante para su utilización en los experimentos, debido a que la actividad catalasa no se vio modificada significativamente, sin embargo es recomendable el uso del callo blanco o el azulado.

Hay que hacer notar que todo el callo que se obtuvo presentó la característica de ser hiperhídrico (es decir presentó una gran cantidad de agua intracelular) y por eso presentó una gran disgregabilidad. Esta característica ya significa una condición de estrés en el tejido. El alto grado de disgregabilidad de algunos callos está relacionado con la capacidad de ruptura

de órganos vitrificados (Kevers y col., 2004).

8.1. *Ensayo preliminar de callo.*

En relación a los resultados obtenidos en el ensayo preliminar con callo se observó que el contenido de H_2O_2 que mostraron los callos de *H. excelsa* sometidos a estrés osmótico fue semejante al de los callos sometidos a estrés nutricional. En los dos tipos de estrés se observó un incremento de peróxido de hidrógeno, este compuesto se genera durante procesos como la fotosíntesis y la respiración. Ciertos niveles de *ERO* son necesarios para algunas funciones fisiológicas tales como la biosíntesis de pared celular y el crecimiento celular. Sin embargo, un exceso de estos compuestos debido a alteraciones ambientales puede provocar un estrés y una serie de daños como la desnaturalización de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos así como llegar a ser muy tóxicos. La eliminación de estos compuestos está a cargo de mecanismos enzimáticos y antioxidantes (Ganesan y Thomas, 2001). Cuando las plantas se encuentran sometidas a estrés, los niveles de *ERO* se incrementan y los mecanismos reguladores son menos eficientes (Bolwell y Wojtaszek, 1997), generándose entonces el estrés oxidativo. Debido a que la producción de metabolitos secundarios se relaciona con mecanismos de defensa la relación entre las *ERO* y la producción de estos compuestos ha sido investigada (Zhao y col., 2005). En los resultados del presente trabajo se observó que en los dos tipos de estrés se incrementaron las concentraciones de H_2O_2 , lo que indica que los cultivos recibieron un estímulo externo adverso, este incremento del peróxido de hidrógeno pudo haber sido una señal (Dat y col., 2000, Neill y col., 2002) para desencadenar la producción de metabolitos secundarios (Chong y col., 2004), como lo ha reportado Zhao y colaboradores en su trabajo del 2005, en donde se observó un incremento en la producción de β -thujaplicina en cultivos en suspensión de *Cupressus lusitanica*, relacionado al aumento en la concentración de H_2O_2 en los cultivos.

En los dos tipos de estrés aplicados se observó una relación directa entre la intensidad del estrés y la cantidad de peróxido de hidrógeno detectada en los tratamientos (figura 7.7 y figura 7.9). Debido a que el contenido de peróxido de hidrógeno incrementó significativamente en el tratamiento con 25 % de nitrógeno en el medio nutritivo (figura 7.7) y fue en este tratamiento donde se detectó la mayor cantidad de canofilol, se puede decir que el peróxido de hidrógeno generado en este tratamiento pudo haber actuado como una señal de estrés y desencadenar respuestas de defensa en la planta, entre las que se encuentra la producción de metabolitos secundarios (en particular de canofilol). Por otro lado, aunque la cantidad de H_2O_2 también incrementó significativamente en el tratamiento de mayor intensidad del estrés osmótico, no se detectó un incremento en la concentración de canofilol, en este caso se hacen necesarios los resultados de la actividad de la enzima catalasa para poder explicar porqué este tratamiento no se comporta como el estrés nutricional.

8.1.1. *Actividad de la enzima catalasa.*

En el estrés nutricional no se observaron diferencias estadísticas significativas de la actividad de la enzima catalasa entre los diferentes tratamientos; sin embargo, se observó la menor actividad de la enzima en el tratamiento de mayor intensidad (figura 7.8), en este caso es posible suponer que el error estándar de las medias de cada tratamiento, no permitieron detectar la diferencia entre los tratamientos, y que el tamaño del error estándar se debió a la variación que presentó el tejido, presumiblemente por ser callo de color pardo, ya que este tejido fue el que presentó la mayor variación tanto de la actividad de la enzima catalasa, como del contenido de H_2O_2 (figura 7.5 y figura 7.6). Contrariamente a lo observado en el estrés nutricional, en el estrés osmótico se observó un incremento significativo de la actividad de la enzima para el tratamiento de mayor intensidad (3 % de *PEG*). Este resultado permite explicar porqué en el estrés osmótico no se detectó un incremento de canofilol aunque se haya registrado un incremento de H_2O_2 , sugiriendo una pronta regulación del peróxido de

hidrógeno producido en las células por la enzima CAT, que es parte de un sistema de defensa para eliminar al H_2O_2 (Bowler y col., 1992) y por lo tanto no se activaron los mecanismos genéticos que desencadenan la producción de los compuestos secundarios, ya que la catalasa es una enzima que se encuentra involucrada en los mecanismos de señalización del peróxido de hidrógeno (Chen y col., 1993).

8.1.2. Contenido de canofilol.

El contenido de canofilol se incrementó con el estrés nutricional en el tratamiento de mayor intensidad, mientras que con el estrés osmótico el compuesto se detectó en los tres tratamientos en cantidades inferiores a las del control. Es posible que el tiempo de exposición al estrés osmótico no fuera el suficiente para el incremento de este compuesto secundario. Lo cual podría implicar una mayor tolerancia de la especie al estrés osmótico que al estrés nutricional, situación factible ya que en su hábitat natural, la especie se encuentra distribuida en selvas bajas caducifolias y en estos ecosistemas hay largas temporadas de sequía. Por esta razón es posible suponer que los tratamientos aplicados en el estrés osmótico a los callos de *H. excelsa* no constituyeron un estrés realmente, sino que fueron un estímulo adverso que sólo se tradujo como una tensión ambiental que no desencadenó los mecanismos de defensa del cultivo (metabolismo secundario). En el estrés nutricional (en el tratamiento de menor concentración de nitrógeno) el estímulo fue suficiente para desencadenar la producción de compuestos secundarios que se han planteado como sustancias de defensa. Para incrementar la acumulación y evitar la disminución de la biomasa, es importante optimizar el tipo de estímulo, la concentración y el tiempo de estimulación. La intensidad y duración del estímulo de estrés determina el tipo de respuesta que la planta tiene (Kim y col., 2004).

Estos resultados del ensayo preliminar, fueron fundamentales para modificar la concentración de *PEG* en los tratamientos de estrés osmótico, con los cultivos de células en suspensión, así como también para prolongar los tiempos de exposición al estrés.

8.1.3. Estrés nutricional.

En este estrés se observó un incremento de canofilol; en condiciones de mayor estrés (25 % de nitrógeno) el compuesto se acumuló casi 8 veces más que en el control, y fue también en esta condición de estrés en la que se observó un incremento significativo de peróxido de hidrógeno, éste fue el único tratamiento en el cual se logró correlacionar el contenido de peróxido de hidrógeno con la cantidad de canofilol detectada en los tejidos. Además del incremento del canofilol, se registró un incremento del rendimiento del extracto hexánico, lo que sugirió que el extracto modificó su composición por un incremento de otros metabolitos presentes en este extracto, o por la síntesis de compuestos *de novo*. Esta información es acorde con otros experimentos en los que al reducir el nitrógeno total se incremento la producción de metabolitos secundarios, tales como la capsaicina en *Capsicum frutescens*, antraquinonas en *Morinda citrifolia* y antocianinas en diferentes especies del género *Vitis* (Rao y Ravishankar, 2002).

Por otra parte, la relación peso fresco/ peso seco indicó (en este mismo tratamiento y de manera indirecta), una ligera disminución del crecimiento, situación que se relaciona estrechamente con la producción de metabolitos secundarios.

En el tratamiento de 50 % de nitrógeno no se observaron las mismas respuestas, en los diferentes parámetros medidos, aunque las tendencias fueron las mismas (incremento de peróxido y disminución de la actividad de la enzima catalasa) que en el tratamiento de 25 % de nitrógeno. Esto sugiere que este tratamiento no fue realmente un estrés para el cultivo, posiblemente porque el medio *MS* tiene una gran cantidad de nitrógeno y aunque se haya reducido a la mitad, las necesidades de la especie hayan sido menores para ese periodo de incubación (11 días). Por esta razón se alargó el periodo de estrés a 28 días en las células en suspensión.

8.1.4. Estrés osmótico.

En el estrés osmótico hubo un incremento significativo de peróxido de hidrógeno sólo en el tratamiento de 3 % de PEG, también en ese tratamiento se observó un incremento significativo de la actividad catalasa. Esto sugirió que el peróxido de hidrógeno producido en esta condición de estrés fue eliminado por la enzima catalasa, evitando que se desencadenaran las respuestas de defensa de la planta. El contenido de canofilol en estos tratamientos no aumentó, ni se incrementaron los rendimientos de los extractos, ni se modificó la relación peso fresco/ peso seco. Toda esta información indicó también que ninguna de estas concentraciones resultó una condición real de estrés. Aunque la señal se produjo (peróxido de hidrógeno), los cultivos *in vitro* de la especie pudieron regular las condiciones para que no se desencadenaran mecanismos de respuesta; al parecer el estímulo sólo funcionó como una tensión y no como un estrés. La adaptación de la especie en su ambiente natural a condiciones de sequía pudo permitir que el cultivo realizara los ajustes necesarios para mantener la homeostasis. Comparando estos resultados se hace evidente que los callos de *H. excelsa* responden de manera diferente dependiendo del tipo de estrés y a la intensidad del estímulo al que se hayan sometido, en la producción de canofilol y en la actividad de la enzima catalasa. La deficiencia de nitrógeno al 25 %, resultó ser una condición de estrés, mientras que todas las demás condiciones que se probaron sólo fueron una tensión ambiental que no modificaron la armonía de los cultivos con su ambiente.

Las respuestas al estrés aplicado en este trabajo a callos y células en suspensión de *H. excelsa* fueron diferentes. En los callos se observó la presencia de canofilol tanto en el control como en los diferentes tratamientos aplicados y el incremento en la cantidad de canofilol estuvo asociado a la disminución de nitrógeno en el medio de cultivo, en el control se detectó con un rendimiento del 0.034 %, mientras que con el tratamiento del 50 % de nitrógeno se detectó 0.048 % y en el tratamiento de 25 % de nitrógeno con un 0.271 % (ver tabla 7.2 de la

página 66). En el trabajo de Calzada y col. (1991) se menciona un rendimiento de 0.021 % para este compuesto. Esto indicó un mayor rendimiento del compuesto en cualquiera de los tratamientos realizados en callo en comparación al dato obtenido por dichos autores. Cuando las mismas condiciones se aplicaron a las células en suspensión las respuestas no fueron iguales, en los cultivos celulares no se detectó canofilol ni en el control, ni en el tratamiento con 50 % de nitrógeno, la detección de canofilol sólo se tuvo cuando el estrés fue del 25 % de nitrógeno; sin embargo, la cantidad de canofilol detectada en este último tratamiento es mayor al que se obtuvo en callos (0.70 %). Para los tratamientos con estrés osmótico se detectó la presencia de canofilol en las dos concentraciones de *PEG*, los rendimientos fueron del 0.22 % y 0.32 % en 4 y 8 % de polietilen glicol respectivamente (ver tabla 7.8 de la página 74). Es posible que el tejido (callo) cuando estuvo en medio sólido se haya encontrado en una condición de estrés más intensa debida a que los nutrientes no estuvieron disponibles para todo el tejido de la misma manera. En los cultivos de las células en suspensión la disponibilidad de los nutrientes en todo el tejido no provocó una respuesta de estrés sino hasta el tratamiento de 25 % de nitrógeno en el estrés nutricional y en el estrés osmótico en los dos tratamientos, la diferencia en los rendimientos pudo deberse al tiempo de estrés de los cultivos que en las células en suspensión fue de 28 días mientras que en el callo fue de 11 días.

8.2. *Estrés en células en suspensión.*

En el análisis de los rendimientos del extracto hexánico no hubo diferencias de los tratamientos con respecto al control, excepto para los tratamientos de 25 % de nitrógeno (+) y 8 % de *PEG* (+), en los que se observó un incremento. Aparentemente; en este caso, el estímulo dependió de la densidad celular. En los biorreactores con mayor densidad celular y con estrés nutricional, se logró ver un patrón semejante al que se obtuvo en callo con respecto al

rendimiento del extracto hexánico: sólo se incrementó en el tratamiento de 25 % de nitrógeno. Esto implica que los compuestos de naturaleza no polar incrementaron su producción con este estímulo pues en los biorreactores donde había menor densidad celular no se observó este comportamiento. Es posible que con una densidad celular baja, la competencia disminuyera y la condición de estrés aplicada no haya sido suficiente para obtener la respuesta observada en los biorreactores de mayor densidad celular, es decir que no existió una condición limitante del crecimiento y por lo tanto tampoco hubo repercusión en la producción de metabolitos secundarios.

En el estrés osmótico se observó un incremento en el extracto hexánico sólo en el tratamiento de 8 % de *PEG*, indicando que ya existió una condición de estrés que repercutió en el incremento de la producción de metabolitos secundarios de baja polaridad, situación que no se había observado en el ensayo preliminar con callo. Para los extractos de acetato de etilo, en el estrés nutricional se encontró una respuesta diferente a la del extracto hexánico, es decir, en el tratamiento de 50 % de nitrógeno fue donde se observó el mayor rendimiento del extracto, tanto en el biorreactor de alta densidad celular como en el de baja densidad, sugiriendo esto que dentro de un mismo tipo de estrés la respuesta en la producción de metabolitos secundarios es diferente dependiendo de la intensidad del estímulo. En los rendimientos de los extractos obtenidos de los tratamientos con estrés osmótico, también se observó una respuesta diferente; es ahora en el tratamiento de 4 % de *PEG* (+) donde se observó un incremento de este rendimiento. En los extractos metanólicos, la respuesta es un incremento en el rendimiento de todos los tratamientos con respecto al control. Sin embargo, el incremento es menor en los tratamientos con estrés nutricional, mientras que en los tratamientos con estrés osmótico se observó el mayor incremento de estos extractos.

Tomando en consideración la información que proporcionan Reyes-Chilpa y col. (2003) acerca de extractos obtenidos de raíz de la misma especie, el extracto hexánico contiene varios triterpenos y también contiene quinonas metiladas. El extracto clorofórmico (semejante en

polaridad al acetato de etilo) contiene β -sitosterol y *trans* poliisopreno. El extracto metanólico contiene alcaloides sesquiterpénicos.

Con esta información se puede decir que el estrés nutricional, en cultivos celulares de *H. excelsa* provocó un incremento de compuestos de mediana polaridad como el β -sitosterol y *trans* poliisopreno encontrados en la raíz de la misma especie, cuando la intensidad del estrés fue del 50 % de nitrógeno. Cuando el nitrógeno se disminuyó (25 % de nitrógeno) la respuesta de los cultivos fue un aumento de compuestos tanto de baja polaridad (triterpenos) como también de alta polaridad (alcaloides).

Las respuestas del estrés osmótico fueron semejantes a las del estrés nutricional en lo referente a la intensidad, estímulos suaves provocaron el incremento de compuestos de mediana polaridad, pero a diferencia del estrés nutricional, en el estrés osmótico se observó de manera contundente una respuesta sólo en la producción de compuestos polares (alcaloides) tanto en el tratamiento de menor como en el de mayor intensidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Godoy-Hernández y col. (2000) quienes reportaron que cuando se expusieron cultivos celulares de *Catharanthus roseus* a homogenados fúngicos de *Aspergillus niger*, hubo un incremento del 60 % en la producción de alcaloides totales en comparación con cultivos no tratados, sin embargo, cuando las células en suspensión recibieron un choque osmótico con manitol, la producción de alcaloides incrementó más del 300 % en comparación también con el control. Por otro lado, cuando se adicionó ácido acetil salicílico a líneas celulares de *Catharanthus roseus* no se modificó la producción de alcaloides pero si incrementó la producción de fenoles, antocianinas y furanocumarinas (Vázquez-Flota y Loyola-Vargas, 2003). Esto indica que no todos los estímulos desencadenan la producción de un tipo de compuesto específico, sino que las respuestas dependen de la forma en que el estímulo es traducido y señalizado a nivel celular y de los mecanismos que la célula tiene para regular estas señales.

Los rendimientos que reportaron Reyes-Chilpa y col. (2003) de los extractos hexánico, acetónico, metanólico y acuoso fueron 0.73, 0.94, 4.19 y 7.48 % respectivamente. Estos

rendimientos fueron semejantes a los que se obtuvieron en este trabajo, en las células en suspensión (controles) para el extracto hexánico 0.70 % y el extracto de acetato de etilo 1.15 %. Por otro lado, el extracto metanólico incrementó fuertemente el rendimiento en los cultivos de la células en suspensión a un 19.1 % comparado con el 4.19 % obtenido en el trabajo de Reyes-Chilpa y col., lo cual implica que en estos cultivos es posible que haya una mayor síntesis de alcaloides e inclusive una síntesis de novo. Los perfiles cromatográficos apoyan esta observación. Además se observó un incremento en el número de manchas de los tratamientos tanto nutricional como osmótico, con respecto al control. Es posible que se hayan producido compuestos *de novo*. En algunos casos el uso de cultivos vegetales celulares está enfocado a la producción de productos naturales valiosos, tales como: compuestos de interés farmacológico, saborizantes y fragancias. Más de 20,000 compuestos son producidos por plantas, y alrededor de 1600 son descubiertos cada año (Sajc y col., 2000). A pesar de las ventajas potenciales de la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*, sólo la shikonina, los ginsenósidos y la berberina han sido producidos a gran escala (Bourgaud y col, 2001). Es por esto que el estudio de los factores que desencadenan la producción de metabolitos secundarios cobra interés desde el punto de vista económico y, por supuesto, desde el punto de vista científico.

9. CONCLUSIONES.

Los resultados mostraron que la respuesta en la producción de metabolitos secundarios fue diferente cuando se aplicó un estrés nutricional (deficiencia de nitrógeno) que cuando se aplicó estrés osmótico.

La respuesta de los cultivos celulares al estrés nutricional generó principalmente incremento en los rendimientos del extracto hexánico y en particular se pudo detectar un incremento en la cantidad de canofilol. Para el callo se incrementó 8 veces este compuesto en el tratamiento de mayor intensidad y para las células en suspensión este tratamiento fue el único en donde se logró cuantificar dicho compuesto.

El estrés osmótico generó principalmente, un incremento de los rendimientos de los extractos polares.

En el estrés nutricional no se encontró una respuesta contundente en la producción de metabolitos secundarios con el estrés de 50 % de nitrógeno, mientras que con el estrés de 25 % de nitrógeno se generó una respuesta evidente en la producción de éstos. En el estrés osmótico la respuesta fue más uniforme al comparar los dos tratamientos.

Se puede decir que el estrés nutricional incrementó la producción de terpenos, mientras que el estrés osmótico incrementó la producción de alcaloides

9.1. *Perspectivas.*

El estudio de los metabolitos secundarios y su producción ha representado un área de gran interés para muchos científicos, en la actualidad, se encuentran disponibles una gran cantidad de herramientas biotecnológicas capaces de aportar los conocimientos necesarios par el manejo en el laboratorio de estos recursos.

El cultivo de tejidos vegetales ha permitido el manejo de las condiciones ambientales que favorecen la producción de metabolitos secundarios, sin embargo, todavía no se cuenta con la información necesaria para obtener todos los resultados deseados.

Actualmente se sabe que los diferentes tipos de estrés ambientales pueden incrementar la producción de metabolitos secundarios; sin embargo, la historia evolutiva de las diferentes especies vegetales les ha proporcionado una serie de adaptaciones a las condiciones limitantes ambientales que enfrentan en sus hábitats, por lo que, cada especie puede responder de manera diferente ante un cierto tipo de estrés, dando como resultado diferentes respuestas fisiológicas y por lo tanto diferentes respuestas en la producción de metabolitos secundarios. Si además sabemos de la restricción de las especies para biosintetizar estos compuestos a ciertas etapas del desarrollo o a ciertos órganos, localidades o estaciones del año y relacionamos esta biosíntesis con estímulos ambientales, el diseño experimental con el que deberemos trabajar en el laboratorio contará con una gran cantidad de variables y relaciones muy complejas entre ellas.

Para tratar de simplificar este modelo se hace necesario, el conocimiento de los mecanismos por los cuales las células perciben los estímulos ambientales y los transforman en señales que activen las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios, como por ejemplo: el incremento de la concentración de peróxido de hidrógeno en el medio para generar un estrés oxidativo o la adición de moléculas señales tales como las poliaminas, los jasmonatos y salicilatos, entre otros.

Esto ofrecería alternativas para la obtención de compuestos de interés industrial sin arriesgar las poblaciones en los ecosistemas, de esta manera se podrían preservar estos recursos naturales evitando las recolectas masivas que hacen actualmente diferentes compañías que utilizan productos naturales para la fabricación de distintos productos de interés comercial. Esta situación favorecería, sobre todo, a las especies que no son cultivadas para tales propósitos.

Los recursos invertidos en esta tarea no han sido pocos, sin embargo, la utilización de los conocimientos que se están generando al respecto para generar modelos que permitan incrementar la biosíntesis de compuestos secundarios promete ser una herramienta redituable: científica y económicamente.

La meta será entonces, elegir aquellas especies de interés fitoquímico, que presenten una problemática de crecimiento o establecimiento en sus ecosistemas y que sean utilizadas por sus componentes químicos. Utilizar el cultivo de tejidos vegetales para establecer líneas celulares de rápido crecimiento y aplicar el estrés necesario para incrementar la biosíntesis de estos compuestos. Optimizar los procesos de extracción, separación y purificación del análisis fitoquímico, para obtener los compuestos puros en el menor tiempo posible y al costo mas bajo. Y de esta manera ponerlos a disposición de la gente que los necesite, evitando la sobreexplotación de recursos vegetales.

9. ABREVIATURAS.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
PEG	Polietilen glicol
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ATC	Ácido Tricloro Acético
MS	Murashige y Skoog (1962)
BAP	Bencil-Amino-Purina
ANA	Ácido Naftalén-Acético
NH_4OH	Hidróxido de amonio
HEPES	Hidroxi-etil-piperazina ácido etano-sulfónico
CAT	Catalasa
R_f	Factor de retención
HRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RH	Respuesta Hipersensitiva
KNO_3	Nitrato de potasio
NH_4NO_3	Nitrato de amonio
rpm	revoluciones por minuto
N_2	Nitrógeno

9. BIBLIOGRAFÍA.

Alfermann A. W. and Petersen M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **43**: 199-205

Abdullah M. A., Ali M. A., Marziah M., Lajis N. H. and Ariff A. B. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **54**: 173- 182.

Akasu M., Itokawa H. and Fujita M. 1976. Biscolaurine alkaloids in callus tissues of *Stephania cepharantha*. *Phytochemistry*. **15**: 471-473.

Arens H., Borbe H. O., Ulbrich B., Stockigt J. 1982. Detection of pericine, a new CNS-active indole alkaloid from *Picralima nitida* cell suspension culture by opiate receptor binding studies. *Planta Med* **46**: 210-214

Baiza A. M., Quiroz A., Ruiz J. A., Maldonado-Mendoza I and Loyola-Vargas V. M. 1998. Growth pattern and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **54**: 123-130.

Bauch H-J. and Leistner. 1978. Aromatic metabolism in cell suspension cultures of *Galium mullugo*. *Planta Med* **33**: 105-123.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., and Gontier E., 2001, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* **161**: 839-851.

Bowler C., Van Montagu M. and Inzé D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 83-116.

Butcher D.N. and Connolly J. D. 1971. An investigation of factors which influence the production of abnormal terpenoids by callus cultures of *Andrographis paniculata* Nees. *J Exp Bot* **22**: 314-322.

Calzada F., Mata R., López R., Linares E., Bye R., Barreto V. M. and Río F. 1991. Friedelanes and triterpenoid quinone methides from *Hippocratea excelsa*. *Planta Medica* **57**: 194-195

Calzada F. and Mata R. 1995. Hippocrateine III, A sesquiterpene alkaloid from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry* **29**: 2027-2029.

Carew D. P. and Krueger R. J. 1977. *Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. *J. Nat Prod* **4**: 326-336.

Cassells A. C. and Curry R. F., 2001. Oxidative stress and physiological epigenetic and genetic variability in plant tissue culture implication for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **64**: 145-167.

Chandler S. F. and Dodds J. H. 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant*

Cell Reports. **2**: 205-208.

Chapin F. S III. 1991. Integrated Responses of Plants to Stress. A centralized system of physiological responses. *BioSci*. **41**: 29-36.

Chen Z., Silva H., Klessing D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Sci* **262**:1883-1886.

Chong T. M., Abdullah M. A, Fadzillah N. M, Lai O. M. and Lajhis N.H. 2004. Anthraquinones production, hydrogen peroxide level and antioxidant vitamins in *Morinda elliptica* cell suspension cultures from intermediary and production medium strategies. *Plant Cell Rep*. **22**: 951-958.

Chong T. M., Abdullah M.A., Fadzillah N. M. , Lai O. M. and Lajhis N. H. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme and Microbial Technology* **36**: 469-477.

Constabel F. 1968. Gerstoffproduktion der Calluskulturen von *Juniperus communis* L. *Planta*. **79**: 58-64.

Dat J., López-Delgado H., Foyer C. and Scott I. 1998. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedling. *Plant Physiol*. **16** 1351-1357.

Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., and Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life*

Sci. **57**: 779-795.

Delfel N. E. and Rothfus J. A. 1977. Antitumor alkaloids in callus cultures of *Cephalotaxus harringtonia*. *Phytochemistry*. **16**: 1595-1598.

DiCosmo F. and Towers G. H. N., 1984, Stress and Secondary Metabolism in Cultured Plant Cells. In B. A. Timmermann, B. A. Steelink, C., and Loewus F. A. (Eds) *Phytochemical adaptations to stress (Recent Advances in Phytochemistry)*. Springer. 334 pp.

Doller G. 1978. Influence of the medium on the production of serpentine by suspension cultures of *Catharanthus roseus* L G. Don. In *Production of natural compounds by cell culture methods* (Alfermann A. W. and Reinhard E. eds). Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Munich pp 109-116.

Dörnenburg H and Knorr D, 1998, Monitoring the impact of high-pressure processing on the biosynthesis of plant metabolites using plant cell cultures. *Trends in Food Science and Technology* **9**: 355-361

Fonseca R. M. 1995. No. 3 *Hippocrateaceae* en Flora de Guerrero. Editores Diego-Pérez N y Fonseca R. M. **Facultad de Ciencias**, UNAM, Las Prensas de Ciencias. México. 12 p.

Foyer C. H., Descourvieres P. and Kunet K. J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* **17**: 507-523.

Furukawa M., Makino M., Uchiyama T., Ishimi K., Ichinohe Y. and Fujimoto Y. 2002.

Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry* **59**: 767-777.

Ganesan V and Thomas G. 2001. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H_2O_2 accumulation and oxidative stress. *Plant Sci.* **160**: 1095-1106.

Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J. F. and Dommes J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* **37**: 263-285.

Georgiev M., Pavlov A. and Ilieva M. 2004. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: the effects of temperature. *Biotechnology Letters* **26**: 855-856.

Godoy Hernández G. and Loyola Vargas V. M. 1991. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **10**: 537-540.

Gras M., Creche J., Chenieux J. C., et Rideau M., 1982. Etude comparee des effects de la selection et des facteurs de l'environnement sur l'acumulation alcaloidique des souches de *Choisya ternata*. *Planta Med.* **46**: 231-235.

Grime J. P. 1981. Plant strategies in shade. In *Plants and the Daylight Spectrum* (H Smith, ed) Academic Press New York pp. 159-186.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1989. *Free radicals biology and medicine*. Clarendon, Press Oxford. 543 pp.

Herrera Santoyo J. 2001. Estudio comparado de la producción de metabolitos secundarios de *Hippocratea excelsa* Kunth (Hippocrateaceae), en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Vegetal), UNAM.

Hippolyte I, Marin B, Baccou J. C. and Jonard R, 1992, Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. *Plant. Cell. Rep.* **11**: 109-112.

Julkunen-Tiitto R, Rousi M, Bryant J, Sorsa S, Keinänen M. and Sikanen H., 1996 Chemical diversity of several Betulaceae species: comparison of phenolic and terpenoids in northern birch stems. *Trees.* **11**: 16-22.

Takegawa K., Suda J., Sugiyama M. and Komamine A. 1995. Regulation of anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis* in relation to cell division. *Physiol Plant.* **94**: 661-666.

Kang T. J., Yang M. S. and Deckard E. L., 2003, The effect of osmotic potential on anther culture in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **75**: 35-40.

Kevers C., Franck T., Strasser R. J., Dommes J., and Gaspar T., 2004, Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **77**: 181-191.

Khanna P. Khanna R. and Sharma M. 1978. Production of free ascorbic acid and effect of exogenous ascorbic acid and tyrosine on production of major opium alkaloids from *in vitro* tissue cultures of *Papaver somniferum* Linn. *Indian J. Exp. Biol.* **16**: 110-112.

Kim Y. S., Hahn E. J., Niranjana Murthy H. and Paek K. Y. 2004. Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1619-1622.

Kintzios S., Makri O., Panagiotopoulos E. and Scapeti M. 2003. *In vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) *Biotechnology Letters* **25**: 405-408.

Knobloch K. H., Bast G., and Berlin. 1982. Medium and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry.* **21**: 591-594.

Knobloch K. H. and Berlin. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L G. Don. *Z. Naturforsch.* **35**: 551-556.

Kuang-Chich C. and Cheng L. 1981. Callus cultures of the three well-known Chinese herbs and their medicinal contents. *In Plant Tissue Culture.* (H Hu ed) Pitman Publishing Ltd London pp 469-479.

Larcher W. 1980. *Physiological Plant Ecology.* Springer, New York.

Levitt J. 1980. *Responses of Plant to Environmental Stresses.* Vol I. Academic Press, New York.

Levitt J. 1982. Stress terminology. In: Turner N. C. and Kramer P. J. (eds). *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress* (pp. 437-439). Wiley Interscience, New York.

Li-Men Chen, Chuan Chi Lin and Huei Kao. 2000. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H_2O_2 level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**: 99-103

López Cedeño R. 1989. Estudio Fitoquímico preliminar de la *Hippocratea excelsa*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.

López-Delgado H, Dat JF, Foyer CH and Scott IM. 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H_2O_2 . *J. Exp. Bot.* **49**: 713-720.

Low P. S. and Merida J. R. 1996. The oxidative burst in plant defense. Function and signal transduction. *Physiol Plant.* **96**: 533-542.

Lutts S and Kinet J. M., 1998, Les effects des stress sur la croissance et le développement: vue synoptique. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège* **67**: 117-136.

Mallick N. and Mohn F. H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Plant physiol.* **157**: 183-193.

Mata R., Calzada F., Díaz E., and Toscano R. 1990. Chemical studies on Mexican plants used in tradicional medicine XV. Sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.* **53**: 1212-1219.

Matsumoto T., Nishida K., Noguchi M. and Tamaki E. 1973. Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 561-

567.

Mizukami H., Konashima M. and Tabata M. 1977. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus culture. *Phytochemistry*. **16**: 1183-1186.

Monforte G. M., Ayora T. T., Maldonado M. Y. E. and Loyola V. V. M., 1992 Quantitative Analysis of Serpentine and Ajmalicine in Plant Tissues of *Catharanthus roseus* and Hyoscyamine and Scopolamine in Root Tissues of *Datura stramonium* by Thin Layer Chromatography-Densitometry. *Phytochemical Anal.* **3**: 117-121

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*; **15**:473-497.

Nakano K, Oose Y, Masuda Y, Kamada H and Takaishi Y, 1997, A diterpenoid and triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii*, *Phytochemistry* **45**:293-296.

NAPRALERT. 1997. Natural Products ALERT (Database by the Board of Trustees Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences. Dept. of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy. College of Pharmacy of the University of Illinois at Chicago, USA. 833 South Wood St. Chicago, III 60612 USA.

Navarrete A., Trejo-Miranda J. L. and Reyes-Trejo L. 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology* **79** (3):383-388.

Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., and Hancock. 2002. Hydrogen peroxide

and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 1237-1247.

Nettleship L. and Slaytor M. 1974. Adaptation of *Peganum harmala* callus to alkaloid production. *J Exp Bot* **25**: 114-123.

Nilsen E. and Orcutt D. M., 1996, The Physiology of Plants Under Stress. Abiotic Factors. Wiley, New York. P. 689.

Okazaki M., Hino F., Nagasawa K. and Miura Y. 1982. Effects of nutritional factors on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 601-607.

Osmond C. B., Austin M. P., Berry J. A., Billings W. D., Boyer J. S., Dacey J. W. H., Nobel P. S., Smith S. D. and Winner W. E. 1987, Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience* **37**: 38-48.

Palacios J., Mata R., López R., Linares E., and Bye R. 1989. Notes on economic plants. *Econ. Bot.* **43**: 508-509

Pan X. W., Xu H. H., Liu X., Gao X. and Lu Y. T. 2004. Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Biotechnology Letters* **26**: 1745- 1748.

Pichersky E. and Gang D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science, Perspectives*.**5**: 439-445

Popoca J., Aguilar A., Alonso D, and Villarreal M. L. 1998. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **59**: 173-177.

Poulev A., O'Neal J. M., Logendra S., Pouleva R. B., Timeva V., Garvey A. S., Gleba D., Jenkins I. S., Halpern B. T., Kneer R., Cragg G. M. and Raskin I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.* **46**: 2542-2547.

Ravishankar G. A. and Rao S. R. 2000. Biotechnological production of phytopharmaceuticals. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **4**: 73-102.

Rao S. R. and Ravishankar G. A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **20**: 101-153.

Reyes-Chilpa R., Jiménez-Estrada M., Cristóbal-Telésforo E., Torres-Colín L., Villavicencio M. A., Pérez-Escandón B. E., and Mercado-González R. 2003. Natural Insecticides from *Hippocratea excelsa* and *Hippocratea celastroides*. *Economic Botany* **57**(1): 54-64.

Roberts S. C. and Shuler M. L, 1997. Large-scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*. **8**: 154-159.

Rzedowski J. 1984. Vegetación de México. Limusa. México. 397 p.

Sajc L., Grubisic D. and Vunjak-Novakovic G., 2000, Biorreactors for plant engineering: An outlook for further research. *Biochem. Eng. J.* **4**: 89-99

San Miguel-Chávez R., Soto-Hernández M., Ramos-Valdivia A. C., Kite G., Martínez-Vázquez M., García M. R. and Terrazas T. 2003 Production of alkaloids by in vitro culture of *Erythrina americana* Miller. *Biotech. Lett.* **25**: 1055-1059.

Sasse F., Heckenberg U. and Berlin J. 1982. Accumulation of β -carbonile alkaloids and serotonin by cell cultures of *Peganum harmala* L. *Plant Physiol.*: **69**:400-404.

Scandalios J. G. 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences.* **27** (9): 483-486.

Smirnoff N., 1995, Environment and plant metabolism flexibility and acclimation. Bios. Scient. Publ. Ltd., Oxford.

Stahl E. 1969. Thin layer chromatography. Springer-Verlag. Berlín N. York. pp 873.

Stockigt J., Treimer J and Zenk M. H. 1976. Synthesis of ajmalicine and related indole alkaloids by cell free extracts of *Catharanthus roseus* cell suspension. *FEBS Lett* **70**:267-270.

Strasser R. J. 1988. A concept for stress and its application in remote sensing. In: Lichtenthaler, HK (ed) Applications of Chlorophyll Fluorescence (pp. 333-337). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Sudha G. and Ravishankar G. A., 2002 Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **71**: 181-212.

Tabata M., Tsukuda M. and Fukui H. 1982. Antimicrobial activity of quinone derivatives from *Echium lycopsis* callus cultures. *Planta Med* **44**:234-236.

Tal B., Gressel J. and Goldberg I. 1982. The effect of medium constituents on growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoides* cells grown in batch cultures. *Planta Med* **44**: 111-115.

Van der Plas Linus H. W, Eijkelboom Conny and Hagendoorn J. M. Marc, 1995, Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **43**: 111-116

Vanisree M., Lee C. Y., Lo S. F., Nalawade S. M., Lin C. Y., and Tsay H. S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **45**: 1-22.

Vázquez-Flota F. A. and Loyola-Vargas V. M. 2003. *In vitro* plant cell culture as the basis for the development of a research institute in México: Centro de Investigación Científica de Yucatán. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. **39**: 250-258.

Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H. J. G., and Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolites pathways for the production of fine chemicals. *Biotech. Lett.* **21**: 467-479.

Verpoorte R., van der Heijden R. and Memelink J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*. **9**:323-343.

Warm E. and Laties G. G. 1982. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry*. **21**: 827-831.

Westcoot R. J., and Henshaw G. G. 1976. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* **131**: 67-73.

Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., and Van Camp W. 1995. Catalases in plants. *Mol Breed.* **1**: 207-228

Wink M., 2003, Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. **64**: 3-19.

Ye H., Huang L., Chen S. and Zhong J. 2004. Pulsed electric field stimulates plant secondary metabolism in suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology and Bioengineering* **88**: 788-795.

Zenk M. H., El-Shagi H., and Schulte U., 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med Suppl.* **79**: 79-101.

Zenk M. H., El-Shagi H., Arens H., Stockigt H. Weiler E. W. and Deus B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz W., Reinhard W., and Zenk M. H. eds). Springer-Verlag, Berlín, New York. pp. 27-43.

Zenk M. H, 1991. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell cultures as a

pot of gold. *Phytochemistry*. **30**: 3861-3863.

Zhao J, Fujita K and Sakai K. 2005. Oxidative stress in plant cell culture: A role in production of beta-thujaplicin by *Cupressus lusitanica* suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **90**: 621-631.

Zhong J. J., Konstantinov K. B. and Toshida T., 1994, Computerized on-line monitoring of physiological variables in suspended cell cultures of a *Perilla frutescens* in a bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 445-447.

Zobayed S. M. A., Murch S. J., Rupasinghe H. P. V. and Saxena P.K., 2003, Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **75**: 143-149.