

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Células Vegetales en Biotransformaciones:  
Tamizado de la reacción de oxidación de  
eugenoles/ácidos hidroxicinámicos y  
dimerización oxidativa del eugenol con  
cultivos de nueve plantas.**

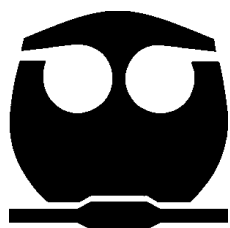
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

IVON AYALA VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado Asignado:**

Presidente: Prof. Raúl Aguilar Caballero

Vocal: Prof. María de los Angeles Valdivia López

Secretario: Prof. Arturo Navarro Ocaña

1er. Suplente: Prof. Amanda Gálvez Mariscal


2º. Suplente: Prof. Francisco Ruiz Terán

**Sitio en donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 321 y 116 del Departamento de Biotecnología y Alimentos,  
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

**Asesor del tema:**

Dr. Arturo Navarro Ocaña



---

**Supervisor técnico:**

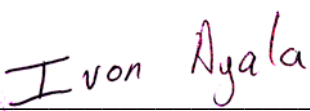
M.C. María Teresa de Jesús Olivera Flores



---

**Sustentante:**

Ivon Ayala Vázquez



---

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi asesor el Dr. Arturo Navarro Ocaña por su paciencia y confianza en la finalización de este trabajo.
- ❖ A mi asesora Mayte, muchas gracias por hacer de ese laboratorio nuestra casa, por tú comprensión, por tu disposición, por guiarme en el sendero de la investigación y por tu amistad.
- ❖ A mi jurado María de los Angeles Valdivia López por todo el apoyo y recomendaciones pertinentes y constructivas, me fueron de gran utilidad.
- ❖ A mi jurado Raúl Aguilar Caballero por sus comentarios para la corrección del texto.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México por enseñarme tanto durante estos años, por contribuir en mí desarrollo personal, por el honor y privilegio de ser universitaria.

Deseo aprovechar esta ocasión para dar las gracias a todos los que han estado a mi lado, antes que nada al Señor, gracias por esta nueva oportunidad.

Me siento muy feliz pues al empezar este agradecimiento me falta espacio para todos aquellos a los que de alguna forma han hecho que esto se cumpla, por el apoyo, los ánimos, los desvelos, los regaños, la risas, el llanto, las caricias, los besos, la confianza, la paciencia pero sobre todo el amor que me han regalado. He de agradecer a todos los que me dieron la bienvenida en esta nueva etapa, 1000 gracias!, por aparecer y permanecer en mi vida.

A mi familia: Carmelita gracias por esas manos sabias que siempre han estado ahí y por volverme a dar la bienvenida, por que a pesar de las malas experiencias vividas, me has enseñado a tener valor; Rosito, Alicia, Rosita (va por ustedes) los mejores abuelos del mundo!, a mis hermanos Alfredo y Jenny por su peculiar forma ser y estar mi lado en todo momento.

A mis amigos: Claudia, Erika, Penélope gracias por enseñarme lo que es la amistad y saber que si puede ser por siempre; Elizabeth “Coco”, Alejandra, Tanya, Olivia, Nataly, Andrés, Moi, Edgar; en las donas a Cynthia mi alma gracias por acompañarme, crecer y tolerarme tanto tiempo, Angel, Chinito, Arturo, Miguel “Pelón” sabes que Te Amo, Roberto, Nancy, Laurita. A Lupita, Mary, Caro, Alex por que me enseñaron que si se puede obtener lo que se quiere. A Poncho (sobran las palabras), Reynita gracias por las horas de alegría y por escucharme, Davicho, Orgugu, Chucho (enfermo) claro no podrías faltar Juan. Carlos, Esau, Checo, Olivier (ya hace falta un congreso!); Innan, Mauricio, Aida, Ara, Cris, Mary, Celeste, Erick, Lore por ser mi “familia” todo este tiempo. A Sergio por enseñarme lo más hermoso de la vida, el Amor, siempre estarás en mi corazón. “Don Iván” mi súper hombre; Leo gracias por devolverle el color a la vida. A Miguelito, Verdiguél y Villegas Gracias sino fuera por ustedes no estaría aquí, Pilo y Roberto claro ustedes también cooperaron (Si tienen reclamos ya saben a quien dirigirse). Silvia, por darme siempre tranquilidad y esperanza, Héctor Jiménez, Alfredito, Memo te veo en Cozumel, Manuel gracias por llenarme de flores.

TODO EL MUNDO SUFRE CONTRATIEMPOS EN LA VIDA,  
CUANTO MAS NUMEROSOS SON MAS APRENDEMOS Y  
MADURAMOS



## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	I
<b>RESUMEN</b> .....	II
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	
2.1 Biotransformación.....	3
2.2 Biotransformaciones con células vegetales.....	4
2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales .....	7
2.2.2 Cultivo de tejidos callosos.....	9
2.2.3 Cultivo de células en suspensión.....	11
2.3 Tipos de reacciones que llevan acabo los CCV.....	16
2.3.1 Dimerización oxidativa.....	20
2.4 Sustratos y productos de las transformaciones.....	22
<b>III. OBJETIVOS</b>	
3.1 General .....	28
3.2 Particulares .....	28
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>PARTE I: OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES</b>	
4.1 Material biológico.....	30
4.1.1 Preparación de medios de cultivo.....	30
4.1.2 Condiciones de incubación.....	31
4.1.3 Germinación y obtención de explantes.....	31
4.1.4 Inducción y formación de callo.....	33
4.1.5 Mantenimiento y proliferación de callos.....	34
4.1.6 Establecimiento y proliferación de células en suspensión.....	35

**PARTE II: BIOTRANSFORMACIONES**

4.2 Biotransformación.....	36
4.2.1 Homogenizado de CTV.....	36
4.2.2 Biotransformación.....	36
4.3 Extracción de productos.....	37
4.4 Evaluación cualitativa de la biotransformación.....	37
4.5 Identificación y cuantificación del producto por HPL.....	37
4.5.1 Curvas de calibración.....	38
4.5.2 Preparación de la muestra.....	38
4.5.3 Cálculo de la concentración.....	38

**V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN****PARTE I: OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES**

5.1 Germinación y obtención de explantes.....	39
5.2 Inducción y formación de callo.....	43
5.3 Proliferación de callo.....	49
5.4 Establecimiento de células en suspensión.....	53

**PARTE II: BIOTRANSFORMACIÓN**

5.5 Biotransformaciones Cualitativas.....	56
5.5.1 Eugenol.....	56
5.5.2 Isoeugenol.....	59
5.5.3 Ácido cumárico.....	62
5.5.4 Ácido ferúlico.....	63
5.6 Biotransformaciones Cuantitativas.....	67
5.6.1 Eugenol.....	67

**VI. CONCLUSIONES.....77****VII. BIBLIOGRAFÍA.....79****VIII. ANEXOS.....85**

## ABREVIATURAS

### **Medios de Cultivo:**

MS Medio de Cultivo Murashige- Skoog (1962)

Myt Medio de Cultivo Murashige- Skoog modificado

SH Medio de Cultivo Sheik- Hilderrandt (1972)

### **Reguladores de Crecimiento Vegetal:**

AIA ácido 3-indoleacético

2,4-D ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

BAP 6-Bencil amino purina

Kin cinetina

### **Peso:**

mg miligramos

g gramos

### **Volumen:**

mL mililitros

L litro

### **Otros:**

CCF Cromatografía en capa fina

CCV Cultivo de células vegetales

CTV Cultivo de Tejidos Vegetales

CV Cultivo vegetal

cc cultivo de callo

cs cultivo en suspensión

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ácido sulfúrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peróxido de hidrógeno



## RESUMEN

Las biotransformaciones cada vez se están volviendo más importantes por su versatilidad. Esta técnica utiliza las enzimas situadas en el interior de las células, las cuales actúan sobre los grupos funcionales de los compuestos químicos suministrados exógenamente. Los sistemas de biotransformación basados en plantas brindan un medio adecuado para producir grandes cantidades de productos nuevos o modificados con interés comercial. En particular, los cultivos *in vitro* son uno de los mejores sistemas, ya que pueden expresar una gran cantidad de productos muy variados en concentraciones relativamente altas, además de ser recuperados de manera sencilla.

En este trabajo se utilizaron como biocatalizadores nueve diferentes cultivos vegetales tanto en callo homogenizado como en células en suspensión *in vitro*, para realizar biotransformaciones de eugenol, isoeugenol, ácido cumárico y ácido ferúlico. La investigación se llevó a cabo en dos partes, la primera consistió en la obtención de los biocatalizadores a utilizar. Se inició con el establecimiento de callo de capulín (*Prunus serotina*) y zanahoria (*Dacus carota*), para lo cual se determinaron las condiciones adecuadas de germinación de las semillas, evaluando distintos métodos de esterilización y lográndose la obtención de plántulas donadoras de explantes para utilizarlos en la producción de callo y después en el establecimiento de cultivos en suspensión. Para mamillaria (*Mammillaria hutzilopochtli*), se partió de cultivos *in vitro* de la planta, con que contaba el lab. 116, así que sólo se indujo el callo; mientras que otros 6 cultivos: alfalfa (*Medicago sativa* L.), trompetilla (*Bouvardia ternifolia*), cilantro (*Coriandrum sativum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), matarique (*Psacalium pentatum*) y melón (*Cucumis melo*); sólo se proliferaron de acuerdo a los medios ya utilizados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.


La segunda parte fue la biotransformación de los sustratos (eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico y ácido cumárico) por medio de los nueve cultivos celulares obtenidos, tanto en callo homogenizado como en células en suspensión para evaluarlos como biocatalizadores en reacciones de oxidación. Se observó en la cromatografía de capa fina (CCF) su transformación cualitativa, lo que mostró que todos los cultivos de callo homogenizado y suspensión llevaron a cabo la conversión para cada uno de los sustratos de prueba, encontrando diferencias en la biotransformación entre las especies y el tipo de cultivo utilizado.

Además se tomó al eugenol como modelo para la cuantificación de la biotransformación por medio de HPLC; logrando la obtención de su dímero el bis-eugenol, producto de la transformación de las nueve especies y típico de las reacciones de dimerización oxidativa. El sistema que tuvo mayor rendimiento para callo fue alfalfa con un 30.90% y para células en suspensión el mayor fue cilantro con un rendimiento del 28.67%.

## I. INTRODUCCIÓN

La química no sólo copia e imita a la naturaleza, sino que también sintetiza miles de sustancias que la naturaleza desconoce con propiedades muy útiles e importantes para la vida humana. Así la química sintética ha pretendido elaborar compuestos de origen natural que por sus propiedades únicas y actividad biológica se utilizan como: medicamentos, saborizantes, colorantes, aromatizantes, antioxidantes, plaguicidas, etc (Ramachandra, 2002), sin embargo, a nivel industrial algunos de estos procesos son complicados y costosos; incluso existen sustancias que no se han podido sintetizar químicamente. Por esta razón se han intentado nuevos métodos de obtención y se ha recurrido a los organismos vivos, haciendo uso de su maquinaria enzimática para llevar a cabo dichos procesos de síntesis (Archana, 2001). Los organismos en cuestión pueden ser animales, plantas o microorganismos (sistemas biológicos); su utilización para realizar una síntesis química se llama biotransformación (un compuesto es transformado a un producto diferente). Esta técnica biotecnológica ha tenido una amplia aceptación ya que exhibe altos niveles de especificidad y selectividad quimio, regio y estereoquímica (Anderasen, 1999), además de que se trabaja en condiciones fisiológicas, es decir, no demandan condiciones extremas, suelen dar altos rendimientos y son capaces de producir nuevos compuestos a partir de distintos sustratos a los que generalmente transforma a nivel celular (Pierik, 1990, Flores, 2004).

Las biotransformaciones sirven para producir compuestos de interés industrial como alternativa a métodos tradicionales de síntesis; incluso para producir nuevos compuestos o modificar los ya existentes mejorando su bioactividad o reduciendo los efectos secundarios de las mismos (Archana, 2001), representan una forma natural de síntesis de aditivos alimentarios y farmacéuticos. Algunas biotransformaciones se realizan por medio de cultivos de células vegetales (CCV) que consiste en crecer células bajo condiciones asépticas en condiciones ambientales controladas. Con esta técnica se ha logrado aumentar el rendimiento de los principios activos presentes en las plantas, así como controlar adecuadamente su producción. Las transformaciones con CCV han llamado la



atención entre otras cosas por realizar reacciones de oxidación, reducción, metilación, acetilación, isomerización, glicosilación y esterificación de manera selectiva, permitiendo así su uso como catalizadores en la síntesis de otros compuestos que no estén presentes en ellos, gracias a la capacidad catalítica de sus enzimas. De igual forma se utilizan para eliminar la dependencia de la fuente natural; debido a los problemas climáticos, ecológicos, económicos, etc, que éstas presentan.

Ante el gran interés que se ha mostrado en los últimos años (Alatorre, 2001, Sosa, 2003, Flores 2004) por los compuestos con actividad antioxidante, por el efecto benéfico que se les atribuye en la salud y al estudio de que algunos de ellos (BHA y BHT) pueden tener propiedades carcinógenas (Sosa, 2003); surge la inquietud de investigar fuentes alternas de antioxidantes a las que ya se conocen, así como utilizar y consumir compuestos de origen natural lo que ha fomentado la investigación de los productos naturales. De esta manera la biotecnología vegetal es un área que ha adquirido gran importancia en los últimos años por facilitar el análisis de plantas y extractos, a la par de desarrollar nuevas técnicas para la obtención de productos a partir de éstas (Reinert, 1977, Robards, 1999).

A nivel industrial en el campo de los aditivos destacan los antioxidantes, entre los cuales están compuestos dimericos derivados de eugenoles y ácidos hidroxicinámicos (los cuales presentan mayor capacidad antioxidante que sus monómeros), su síntesis hasta ahora requiere muchos pasos y es poco cuantitativa, por lo que se han buscado nuevos caminos para su obtención, de tal manera, que este trabajo pretende comprobar que los cultivos vegetales tienen la capacidad de ser catalizadores de las reacciones de oxidación que dan lugar a este tipo de compuestos antioxidantes, logrando así nuevas y naturales fuentes de obtención. Además de observar si existe diferencia en la producción del antioxidante entre las especies estudiadas y sus respectivos tipos de cultivo (callo y suspensión).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Biotransformación

La biotecnología es la disciplina que se enfoca en la exploración de las propiedades metabólicas de los organismos vivos para la producción de productos de diferentes estructuras y niveles de organización que benefician al hombre (Wiseman, 1991); los productos pueden ser los mismos organismos o parte de su cuerpo, productos celulares de su metabolismo (enzimas, metabolitos), o productos formados por sustratos endógenos o exógenos con la ayuda de una simple enzima o complejas rutas metabólicas (Wiseman, 1991, Hiroki, 1998, García, 1999).

A todo cambio en la estructura de un compuesto químico realizado por seres vivos completos, parte de ellos o sus enzimas aisladas se le llama biotransformación. Estos catalizadores naturales ofrecen muchas ventajas para la producción de sustancias tradicionales o nuevas (Lee, 2000, Archana, 2001). Entre las ventajas que presentan sobre los procesos químicos se encuentran: su alta regio, quimio y estereo-especificidad con respecto a los sustratos sobre los que actúan; se trabaja en condiciones fisiológicas, es decir, no demandan condiciones extremas; dan altos rendimientos, incluso en productos enantioméricos puros, no forman subproductos y son capaces de producir compuestos nuevos a partir de sustratos distintos a los que suelen transformar (Wiseman, 1991, Alatorre, 2001); se llevan a cabo generalmente en medio acuoso, que produce menos contaminación que los solventes orgánicos utilizados en las conversiones químicas (Flores, 2004) y suelen reemplazan varias etapas químicas en un solo paso (Roberts, 1999).

Hay básicamente dos estrategias para llevar a cabo biotransformaciones:

- ❖ Usando enzimas puras o parcialmente puras
- ❖ Usando células completas

En algunos casos es necesario emplear enzimas con alto nivel de purificación, esto se debe a que: o bien hay una difusión inapropiada de los precursores a través de la membrana de las células, o bien que el producto de la transformación no se difunda una vez producido. El uso de estas enzimas puede ser en su forma libre o inmovilizada.

En otras ocasiones los procesos de separación y purificación de enzimas son largos y costosos. Por lo que resulta en estos casos más barato y conveniente utilizar toda la maquinaria enzimática de las células para llevar a cabo una transformación. Esto ha motivado ha que las células completas sean los biocatalizadores que más se usen en la preparación de una amplia gama de especialidades químicas (Lee, 2000, Ramachandra, 2002).

La biocatálisis se ha establecido a nivel industrial en la producción de químicos específicos. En años recientes un gran número de compañías han adoptado la biocatálisis para la producción de estereoisómeros y nuevos o mejores métodos para la síntesis de enantiómeros puros de  $\alpha$ -y  $\beta$ - aminoácidos, aminas, amidas, péptidos, nitrilos, alcohol, ácidos orgánicos (Panke, 2004). Por lo que uno de los desafíos de la química incluye el descubrimiento y desarrollo de compuestos naturales como materia prima o intermediarios para la producción de nuevos medicamentos, biomateriales y productos de catálisis (Delogu, 2004).

## **2.2 Biotransformaciones con células vegetales**

Al igual que el uso de microorganismos, los cuales se han utilizado por mucho tiempo en la industria, para la obtención de sustancias de interés comercial como la penicilina, estreptomycin, etc, las plantas también han sido una fuente importante de todo tipo de sustancias desde inicios de la civilización (por su uso medicinal), la adquisición de esta información le ha permitido al hombre utilizar su entorno para su propio beneficio. Así de forma análoga a como se hace con los microorganismos, se han realizado varios intentos para obtener sustancias como medicamentos, agroquímicos, saborizantes, colorantes, biopesticidas y aditivos alimentarios a partir de las plantas; ya sea por acumulación de dichas sustancias en el interior sus células, o por su liberación al

medio; siendo importante la implementación de nuevas estrategias que permitan la utilización de los recursos naturales además de su conservación para acceder a dichos productos (Linsey, 1989, Herrera, 2001).

Ya que las plantas tienen un número de estructuras químicas que se estima cuatro veces mayor que las de los microorganismos, se ha incrementado el interés por estudiarlas. Por ejemplo en 1985 de 3500 nuevas estructuras químicas identificadas, 2600 fueron de origen vegetal. Lo que indica que las plantas continuaran proporcionando nuevos productos, así como modelos químicos de nuevos medicamentos en los siguientes años, porque el análisis químico y la caracterización de las estructuras moleculares de la mayoría de las especies vegetales todavía están siendo identificadas (Ramachandra, 2002). En la tabla 1 se presentan algunos derivados vegetales usados en farmacia.

Tabla 1: Derivados vegetales usados en farmacia.

<b>Producto</b>	<b>Uso</b>	<b>Especie</b>	<b>Costo dolares*Kg</b>
Ajmalicine	Antihipertensivo	Cath. Roseus	37,000
Artemisinin	Antimalarial	Artemisia annua	400
Berberine	Enfermedad intestinal	C. japonica	3250
Camptothecin	Antitumoral	Camptotheca acuminata	432,000
Capsaicin	Antistaminico	Ca. Frutencens	750
Codeine	Sedante	P. somniferum	17,000
Colchicine	Antitumoral	Colchium autumnale	35,000
Digoxin	Estimulante cardiaco	Di. lanata	3,000
Diosgenin	Precursor esteroidal	Dioscorea deltoidea	1,000

Continuación de la Tabla 1

<b>Producto</b>	<b>Uso</b>	<b>Especie</b>	<b>Costo dolares*Kg</b>
Ellipticine	Antitumoral	Orchrosia elliptica	240,000
Morfina	Sedante	P. somniferum	340,000
Quinine	Antimalarial	Cinchon. Ledgeriana	500
Sanguinarine	Antiplaquetario	Sanquinaria canadensis	4,800
Shikonin	Antibacterial	L.erytrorhizon	4,500
Taxol	Anticancerígeno	Taxus brevifolia	600,000
Vincristine	Antileucemia	Cath. roseus	2,000,000
Vinblastine	Antileucemia	Cath. roseus	1,000,000

Fuente: Ramachandra 2002.

Otro aspecto interesante en la búsqueda de nuevos productos es el hecho de que las plantas poseen un gran potencial genético para la formación y acumulación de productos que se expresan durante su crecimiento bajo condiciones “anormales”. Bajo estrés (calor, frío, altas concentraciones de sal, etc) las plantas tienden a formar un gran espectro de metabolitos secundarios o nuevos productos dependiendo de sustrato que se le añade (Kohji, 2003).

Algunos metabolitos secundarios son responsables de diferentes actividades fisiológicas en organismos animales, siendo muchos de ellos los principios activos que se utilizan en farmacia (Ramachandra, 2002, Kohji, 2003), su compleja estructura hace que a pesar de los avances científicos y tecnológicos su síntesis química sea todavía inviable, por lo que se estima que muchos de estos compuestos continuarán obteniéndose a partir de las plantas durante algún tiempo (Archana, 2001). Como es el caso de la síntesis del Taxol que se conoce desde 1993, pero éste en su mayoría es aislado de la fuente natural, porque su síntesis involucra muchos pasos y aun es incosteable a nivel industrial (Evans, 2003).



Varios metabolitos secundarios son únicos del reino vegetal, es decir, no son producidos por microorganismos ni animales lo que indica su importancia; además que con el avance en investigaciones transgénicas, es posible producir compuestos y moléculas, que no son sintetizadas originalmente en las plantas, éstas tienen las ventajas de ser producidas a bajo costo y dar estabilidad a los productos dentro del tejido (Dörnenburg, 1995, Ramachandra, 2002). Aunado al interés de conocer sus funciones biológicas, el conocimiento del metabolismo secundario ha sido impulsado por la creciente demanda de nuevas sustancias en las áreas química, farmacéutica, agrícola y alimentaria.

De esta manera la biotecnología vegetal es una disciplina que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años, ya que permite explotar a la célula vegetal para manipularla y obtener el diseño de nuevos compuestos, ofreciendo así una alternativa real para la solución de problemas, tales como incrementar la cantidad y calidad de los alimentos de origen vegetal; así como, para obtener productos de interés comercial ya sea convirtiendo compuestos orgánicos abundantes y de bajo costo, en compuestos escasos y costosos o produciendo nuevos compuestos (Suga, 1999, Panke, 2004), dentro de esta disciplina se encuentra el cultivo de tejidos vegetales .

### **2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) consiste en una serie de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas (Pérez M, 1999). Los cultivos de células y tejidos vegetales *in vitro* constituyen actualmente una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial; cuya producción comercial por los métodos convencionales (síntesis química o extracción de las plantas que las sintetizan) resulta difícil o económicamente desfavorable (Ramachandra, 2002, Archana, 2001). Estos cultivos constituyen una promesa para aumentar el rendimiento de los principios activos de interés presentes en las plantas, así como para controlar más adecuadamente su producción, además de permitir la oportunidad de utilizarlos como catalizadores en la síntesis de otros compuestos

que no estén presentes en ellos, gracias a su capacidad catalítica (Hurtado, 1999, Flores, 2004), así como ser una herramienta utilizada en la modificación estructural de moléculas para obtener compuestos con características diferentes y propiedades benéficas (Ramachandra, 2002).

Esto es posible ya que el CTV se basa en la totipotencialidad celular, es decir, cada célula contiene en el genoma la información completa requerida para dar lugar a una copia exacta de la planta parietal, así como presentar todo su repertorio enzimático, lo cual se expresa con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales (Pérez M, 1999).

Inicialmente el CTV se utilizó para la multiplicación masiva de plantas élites o micropropagación, sin embargo ha adquirido una mayor proyección en:

- ❖ La clonación *in vitro* de plantas.
- ❖ La generación de plantas libres de enfermedades.
- ❖ La producción *in vitro* de compuestos naturales de alto valor (enzimas, metabolitos, aminoácidos, etc.).
- ❖ La obtención de materiales mejorados mediante la selección *in vitro* u otras técnicas.
- ❖ La conservación de germoplasma vegetal mediante criopreservación.
- ❖ La transferencia directa de genes a las plantas con la ayuda de la ingeniería genética (Hernández, 1991, Pérez P, 1998, Archana, 2001, Marja, 2002, Ramachandra 2002, Panke, 2004).

Los principios básicos de los cuales depende el éxito o fracaso del trabajo con cultivos de tejidos vegetales son:

1. La elección del explante (que es el segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo) en base a sus condiciones fisiológicas, bioquímicas, genéticas; así como la posición que guarda en la planta.
2. La elección del medio y condiciones de cultivo tomando en cuenta sales inorgánicas, compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento, fuente de carbono necesarios para el óptimo desarrollo, así como las condiciones

físicas requeridas (fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura, humedad).

3. Condiciones asépticas del material vegetal, se debe desinfectar (generalmente se lleva a cabo con soluciones de hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 80%) y eliminar patógenos superficiales y sistémicos, teniendo en cuenta que si ésta es muy drástica se puede afectar la viabilidad del material y dificultar el establecimiento del cultivo; así como esterilizar el medio de cultivo e instrumentos que se utilicen para evitar contaminación (Pierik, 1990, Olivera, 2003).

Entre las ventajas que presenta el CTV se encuentra que se requiere de poco espacio para mantener un gran número de plantas, se trabaja libre de patógenos al trabajar en medios asépticos y condiciones controladas; su producción es continua, es decir, no se requiere estacionalidad de las plantas tropicales o alpinas (Pérez P, 1998); se pueden mantener por periodos largos. Entre las desventajas encontramos que las células vegetales presentan paredes rígidas, lo que obliga a emplear sistemas de agitación apropiados, su tiempo de duplicación es mayor que el de microorganismos (Flores, 2004), que las instalaciones y equipo debe ser especializado al igual que la mano de obra, el desarrollo de protocolos especializados requiere de largos tiempos de trabajo y fuerte inversión; las plantas utilizadas pueden presentar variación somaclonal (Pierik, 1990).

Se han desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de tejidos, órganos, células y protoplastos vegetales; los cuales constituyen una forma de mantener y propagar células vegetales. Uno de ellos es el cultivo de tejido calloso.

### **2.2.2 Cultivo de tejido calloso**

El callo es una masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación que puede ser obtenido a partir de órganos y tejidos diferenciados, que posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular

(Pérez M, 1999, Olivera, 2003, Flores, 2004), su crecimiento es lento y heterogéneo, al existir zonas de actividad formadora de embriones, raíces, brotes, etc (Olivera, 2003) necesitan de auxinas y citocininas para tener una mayor proliferación.

Las características más importantes del callo son:

- ❖ La totipotencialidad de sus células: capacidad de desarrollar brotes raíces, embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plántulas completas. Proliferación continua.
- ❖ Proliferación acelerada en algunos casos.
- ❖ Apariencia desorganizada.

Las características del callo dependen de los reguladores del crecimiento utilizados, de la especie y órgano de que fue tomado el explante inicial, y de las condiciones físicas de incubación. Para la inducción de callo se requieren medios ricos como el MS o el B5, con la concentración adecuada de reguladores de crecimiento (Pérez P, 1998, Pérez M 1999, Azcon-Bieto, 2000, Olivera 2003).

Los reguladores de crecimiento son de suma importancia, ya que éstos estimulan, inhiben o modifican de algún modo los procesos fisiológicos en las plantas, se utilizan en concentraciones variadas de 0.01-2.0 mg/L y en términos generales la inducción de callo se ve estimulada por concentraciones elevadas de auxinas con respecto a las citocininas, en ocasiones sólo se requiere de auxinas (Olivera, 2003). Las auxinas están implicadas en muchos procesos que afectan la división, crecimiento y diferenciación de las células; inducen la elongación celular debido a que aumentan la plasticidad de la pared y la penetración del agua a la célula (George, 1984, Hurtado, 1994, Azcon-Bieto, 2000), mientras que las citocininas promueven la división y expansión celular, el desarrollo de los cloroplastos, el alargamiento de las hojas y la floración, actúan en el retraso de la senescencia, e inducen la morfogénesis, al igual que el crecimiento de yemas, también inhiben el crecimiento de raíces (Hurtado, 1994, Pérez M, 1999, Azcon-Bieto, 2000).

El callo tiene una característica que lo hace importante para su utilización en la iniciación de cultivos en suspensión y es su friabilidad (tendencia de las células a separarse unas de otras, o sea, disgregarse fácilmente). A altas concentraciones de auxinas favorecemos la friabilidad del tejido y de acuerdo a su friabilidad los callos se clasifica como:

- ❖ Friable: Característica en la que las células están asociadas unas a otras de manera relativamente laxa, siendo esponjosos y con gran cantidad de espacios intercelulares.
- ❖ Compacto: Si las células se agregan más densamente, siendo masas celulares duras, compacta, íntimamente ligadas y con un espacio intercelular más limitado.

Los callos también se pueden clasificar por su coloración ya sea que carezca de pigmentación o presente diferentes tonos: verde, amarillo, café, rojo (Pérez M 1999, Evans, 2003). Esto se debe a los tipos de compuestos que sintetizan (clorofila, carotenos, antocianinas) por ejemplo el callo de mammillaria presentan una coloración púrpura debido a que sintetiza betalinas (Robles, 1999).

### **2.2.3 Cultivo de células en suspensión**

Se define al cultivo de células en suspensión como el crecimiento constante de células o agregados celulares en medio líquido bajo condiciones de agitación permanente y de asepsia. Estos cultivos se utilizan para establecer poblaciones celulares homogéneas tanto bioquímica como morfológicamente con crecimiento constante y sincronizado, durante un periodo corto, también estimulan un mayor crecimiento de la masa celular (Pierik, 1990, Hurtado, 1994, Pérez M, 1999).

Entre las aplicaciones de las células en suspensión para la investigación con vegetales, éstas constituyen una técnica muy valiosa particularmente en:

- ❖ Estudios sobre el ciclo celular.
- ❖ Estudios fisiológicos y bioquímicos.
- ❖ Formación de metabolitos secundarios.

- ❖ Inducción enzimática y expresión génica.
- ❖ Aislamiento de mutantes.
- ❖ Como fuente de protoplastos para fusiones o manipulación genética.
- ❖ Embriogénesis somática.
- ❖ Bioremediación.

Entre las ventajas que presenta este tipo de cultivos están: lograr poblaciones más o menos homogéneas de células, es decir, que presentan el mismo tamaño, ya que se tiene un control total sobre las condiciones de cultivo; en algunas reacciones se pueden parar en un momento determinado (sincronizar) y se utilizan pocas cantidades de material vegetal. Al tenerse células provenientes de tejidos específicos se eliminan interacciones con otros tejidos o efecto de la fenología que se presenta en plantas completas. Mientras que entre las desventajas que muestran se encuentran que los cultivos en suspensión no se pueden mantener por periodos largos, y usualmente se requieren preparar con tejido fresco en cada experimento. El manejo de los cultivos en suspensión se debe hacer con el mayor cuidado y se requiere de una infraestructura más sofisticada (George, 1984). Una característica fundamental en el crecimiento de los cultivos en suspensión es la capacidad de separación de sus células, la cual se puede promover por varios factores entre los que se encuentran una mayor concentración de auxina que de citocinina, al sustituir la sacarosa por glucosa, al adicionar vitaminas como la B<sub>12</sub>, tiamina o B<sub>1</sub> al incrementar los niveles de algunas sales minerales como el calcio, el hierro, incluso por la incorporación de enzimas degradantes de la pared celular (Pierik, 1990, Hurtado, 1994, Pérez P, 1998).

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de un inóculo, o bien, lo que se hace generalmente, se transfiere un fragmento de callo al medio líquido, el cual se mantiene en agitación durante el periodo de cultivo. El mejor inóculo para la iniciación de células en suspensión es un callo friable con un alto ritmo de división celular (Pérez M, 1999, Evans, 2003). El tamaño del inóculo varía según el tipo de callo y la especie, algunos ejemplos se presentan en la tabla 2:

Tabla 2: Relación entre el tipo de callo y su tamaño de inóculo

<b>Especie</b>	<b>Tipo de callo</b>	<b>Tamaño inóculo (en 60 ml)</b>
Bouvardia	Callo friable	6.0 - 8.0 g
Zanahoria	Callo friable	6.0 - 8.0 g
Mammillaria	Callo compacto	8.0 – 10.0 g
Haba	Callo compacto	8.0 – 10.0 g

Fuente: Olivera 2003.

La obtención de líneas celulares se logra pasando la suspensión de los cultivos madre por dispersores de distinto tamaño y verificando su tamaño, en algunos casos también se determina la cantidad de ADN contenido en dichas células (George, 1984, Olivera, 2003). Al presentar un crecimiento constante se requiere de subcultivos más frecuentes en comparación con los cultivos de callos de los cuales derivaron (Hurtado, 1994, Olivera, 2003). Las células en suspensión pueden inducirse para la formación de embriones, los que potencialmente pueden producir plántulas completas al colocarlos en medios sólidos; para la obtención de metabolitos secundarios y recientemente se han purificado sus enzimas para su utilización en biotransformaciones.

Aunque es grande el número de especies vegetales que se han trabajado en CTV aún es poca la información sobre muchas de las especies que podrían ser de interés para su utilización en biotransformaciones, a continuación se muestra una tabla con algunas de las enzimas que se han aislado de cultivos vegetales y han sido utilizadas en biotransformaciones.

Tabla 3: Enzimas purificadas de cultivos in vitro utilizadas en biotransformaciones

<b>Especie</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Tipo de cultivo</b>
<i>C.roseus</i>	Peroxidasa	Callo
<i>C. roseus</i>	AMP deaminase	Suspensión
<i>C. roseus</i>	Kinase	Suspensión
<i>C. robusta</i>	Strictosidine	Suspensión
<i>C. robusta,</i> <i>Morinda</i>	Isopentanyl diphosphate isomerase	Callo
<i>Digitalis lanata</i>	Digitoxin	Suspensión
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	18 $\beta$ -glycyrrhetic	Suspensión
<i>Hyoscyamus</i>	Hyoscyamine	Suspensión
<i>Medicago sativa</i>	O-glucosyl-transferase	Suspensión
<i>Mucura pruinens</i>	Phenoloxidase	Suspensión
<i>Solanum Kahasianum</i>	Cytochrome P450	Callo
<i>P. somniferum</i>	Salutaridine	Suspensión
<i>P. somniferum</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	Suspensión
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Raucaffricine-O- $\beta$ -D-glucosidase	Suspensión
<i>Taxus chinensis</i>	10-Hydroxytaxane-O-acetyltransferase	Suspensión
<i>Zea mays</i>	Pyruvate carboligase	Callo

Fuente: Archana 2001

Existen muchos factores que pueden afectar el rendimiento de las bioconversiones por cultivo de células, por ejemplo: la solubilidad de los precursores, la cantidad de enzima activa presente en el medio, la localización de las enzimas, la presencia de reacciones que producen moléculas no deseadas, la existencia de enzimas que degraden el producto deseado, la elicitación, la permeabilización, las variaciones de pH y los efectos osmóticos.



Por otro lado las biotransformaciones con CCV han evolucionando a medida que se diseñan y desarrollan nuevos procesos de transformación: el manejo de hormonas, de medios de cultivo, la obtención de líneas celulares de crecimiento eficiente, la selección de líneas celulares de alto crecimiento y productora del metabolito de interés –células mutantes o mayor rendimiento-, inmovilización de células y enzimas para aumentar la estabilidad y operación continua, los sistemas de fase reversa para la transformación de sustratos insolubles en agua y la producción de bioreactores adecuados (Dörnenburg, 1995, Archana, 2001, Evans, 2003). En este contexto se tienen ejemplos claros sobre la variación que existe en la producción de compuestos debidos al manejo del cultivo: Berberine producida por *Coptis japonica* incrementa su rendimiento al adicionarle giberelinas en contraste con shikonina producida por cultivos celulares de *Lithospermum erythorhizon* los cuales son inhibidos por la adición de giberelina (Hurtado, 1994, Marja, 2002, Ramachandra, 2002); al incrementar la glucosa en cultivos de *Choisya ternata* se presenta un incremento en su producción de alcaloides (Herrera, 2001) y un último ejemplo es que se han aislado células mutantes sobreproductoras de taxol hasta en un 100% (Evans, 2003).

También es probable que el desarrollo de nuevos métodos para el crecimiento de CCV a gran escala en los que se puedan obtener metabolitos secundarios, y el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos a partir de especies aún no estudiadas, influyan notablemente en el desarrollo de la industria química basada en productos naturales, de aquí que sea necesario incrementar la producción de los compuestos vegetales *in vitro* por encima de los niveles alcanzados por estos organismos en condiciones naturales y por otro lado preservar el inventario químico de las mismas (Herrera, 2001). Además de poder modificar su actividad biológica por la introducción de partes hidrofílicas en el sustrato y la acción terapéutica puede ser prolongada por la introducción de grupos protectores (Kohji, 2003). Esto es posible debido a que los CCV llevan a cabo transformaciones de sustratos muy variados (Tabla 4).

Tabla 4: Sustratos transformados por CCV.

<b>Especie</b>	<b>Substrato</b>	<b>Producto</b>
<i>Hy.niger</i>	Hiosciamina	Escopolamina
<i>Cintron.ledgeriana</i>	Triptofano	Quinina
<i>Nicotiana spp.</i>	Lisina, cadaverina	Nicotina
<i>Duboisia myoporoides</i>	Cadaverina, espermidina	Hiosciamina
<i>Panax ginseng</i>	Digitoxigenina	Digitoxina
<i>Pranax ginseng</i>	Acido 18 $\beta$ -gliciretínico	Glucosidos
<i>Pranax ginseng</i>	Acido fenolito	Compuestos fenólicos glicosilados
<i>P. somniferum</i>	Codeinota	Codeína
<i>Muc. Pruriens</i>	L-tirosina	L-DOPA
<i>Capsicum spp.</i>	Acido ferúlico	Vainillina
<i>C. roseus</i>	Acido ferúlico	Capsiacina
<i>Capsicum spp.</i>	Acido ferúlico	Vainillina
<i>C. roseus</i>	Acido ferúlico	Capsiacina
<i>Coffea arabica</i>	Teobromina	Cafeína
<i>Va. Planifolia</i>	Acido ferúlico	Vainillina
<i>Eucalyptus perriniana</i>	Isoeugenol, eugenol	Isoeugenil yeugenil $\beta$ -glucosidos
<i>G. jasminoides</i>	Acetofenona	Alcohol aromático
<i>Eucalyptus perriniana</i>	Mentil acetato	Mentol

Fuente: Ramachandra, 2002.

Como se observa en la tabla 4, la variedad de productos que se pueden obtener son de amplio espectro ya que se encuentran, compuestos que se utilizan como medicamentos, metabolitos secundarios y saborizantes.

### 2.3 Tipos de reacciones que llevan a cabo los CCV

Como se ha mencionado las células vegetales contienen enzimas que producen diversos productos químicos tales como: antocianinas, cumarinas, flavonoides, derivados hidroxicinámicos, isoflavonoides, proantocianidinas, taninos, betalainas, indoles, purinas, piridinas, carotenoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos triterpenos, antroquinonas, benzoquinonas,

naftoquinonas, esteroides, etc (Ramachandra, 2002); al ser tan variados sus productos las reacciones que éstas llevan a cabo son muy diversas, por lo que los CCV se han usado por su potencial en la producción de dichos compuestos, algunas de estas reacciones son:

#### Hidroxilación:

Esta reacción se han utilizado principalmente en la preparación de precursores útiles en la síntesis de compuestos naturales, con regio y estereoselectividad de dobles enlaces C-C en la posición alilica; así mismo el CCV puede diferenciar entre enantiomeros e hidroxilar sólo uno selectivamente. Se utiliza en la transformación de sustratos exogenos generalmente. La biotransformación de la waferina a su alcohol correspondiente por *Catharanthus roseus* ha sido reportada por Hamada en 1993, así como se han reportado hidroxilaciones con CCV de *N. tabacum*, *Mentha piperita*, *Strophanthus gratus*, *Strophanthus intermedius*, *Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea*, *Peganum harmala*, *C. roseus* entre otras (Archana, 2001, Ramachandra, 2002, Gwon-Soo, 2002, Flores, 2004

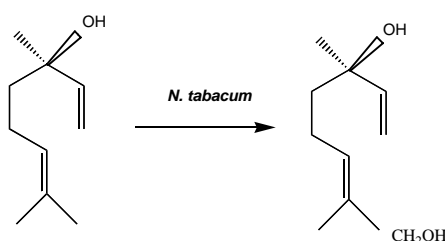


Figura 1: Hidroxilación con CCV

#### Glicosilación

Es de gran interés ya que es difícil ejecutarla por microorganismos o por síntesis química; además de facilitar la solubilidad en agua de compuestos insolubles y servir en la preparación de compuestos quirales; igualmente extienden la vida media y prolongan la actividad de algunos fármacos; incluso producen compuestos biológicamente activos. Entre los CCV que se han

estudiado para llevar a cabo glicosilaciones se encuentran: *Nicotiana plumbaginifolia*, *Glycyrrhiza echanata*, *Aconitum japonicum*, *Discoreophyllum cumminssi*, *Panax ginseng*, *Coffea arabica*, *Coronilla varia*, *Mallous japonicus*, *Datura innoxia*, *Perilla frutencens*, *Gardenia jasminoides* *Cannabis sativa*, *Citrus limon*, *Eucalyptus perriniana*. El eugenol se ha glucosilado en el grupohidroxilo mediante cultivos celulares de *Eucalyptus perriniana* (Shimoda, 2006).

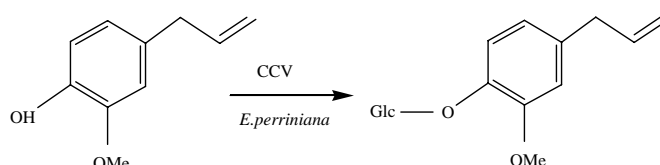


Figura 2: Glicosilación del eugenol mediante CCV

### Reducción

Sirve para preparar compuestos quirales (Archana, 2001), se reducen cetonas proquirales como acetofenonas,  $\alpha$ -acidoarilcetonas,  $\beta$ -cetoesteres, carvones y cetonas ciclicas a su correspondiente alcohol secundario con excelente rendimientos, muchos de estos alcoholes sirven en la síntesis de moléculas farmacéuticas y lignanos quirales asimétricos que son difíciles de preparar y costosos ya que utilizan condiciones extremas y metales pesados (Syadav, 2002). Dentro de las células vegetales que se han utilizado para este fin se encuentran *N. tabacum*, *Gardenia jasminoides*, *G. max*, *V. minor*, *Mentha piperita*, *Medicago sativa*, *Astasia longa*, *C. roseus*, *N. sylvestris*, *Daucus carota*. También se reporta el uso de células en suspensión de frijol de soya para transformar el ácido cumárico y ferúlico a su respectivo alcohol (Gwon-Soo, 2002, Ramachandra 2002, Maczka, 2002, Kohji, 2003).

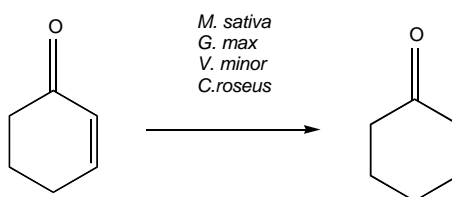


Figura 3: Reducción de dobles enlaces C-C con CCV

## Oxidación

Se lleva a cabo enantioselectivamente y de igual forma son útiles para la preparación de compuestos quirales; alcoholes son convertidos a su correspondiente cetona. Los cultivos vegetales estudiados en estas reacciones son: *Glycine max*, *Spirodela oligorrhiza*, *N. tabacum*, *Dendrobium phalaenopsis*, *M. polymorpha*, *C. roseus*. También se menciona la oxidación que presenta el ácido ferúlico a vainillina mediante cultivos de *Dacus carota* la cual es precedida de una descarboxilación, esta reacción ha sido ampliamente estudiada por su importancia comercial (Archana, 2001, Ramachandra 2002, Maczka, 2002, Kohji, 2003).

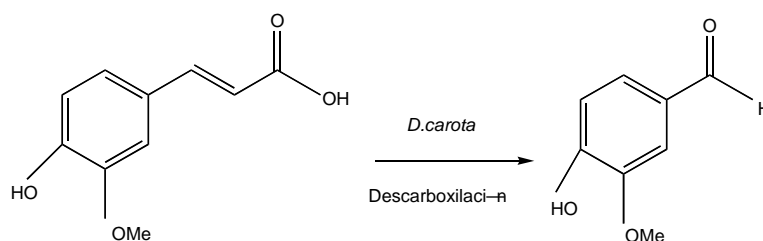


Figura 4: Oxidación por CCV

## Esterificación

Por enzimas, células completas, CCV o aislados de plantas. Se han preparado ésteres de ácidos hidroxicinámicos con acetilcoenzima A (CoA) mediante CCV de perejil (*Petroselinum hortense Hoffm*); empleando ácido cinámico, ferúlico, cumárico, metocicinámico. También se han formado enlaces éster de derivados del propianato y algunos azúcares como glucosa, xylosa, inositol por medio de células de *Panax ginseng*, *N. Tabacum*, *Dioscoreophyllum cummensii*, *coffea arabica* y *Coronilla varia* (Ramachandra, 2002).

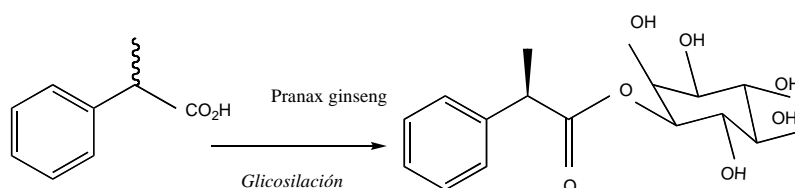


Figura 5: Esterificación con CCV

### 2.3.1 Dimerización oxidativa

Y por último la reacción que es de interés para este trabajo, la dimerización oxidativa que es la formación de enlaces  $C_{aromático}-C_{aromático}$ , reacción que se encuentra clasificada dentro de la síntesis química como reacción de acoplamiento fenólico. A pesar de que se han realizado esfuerzos por mejorar y desarrollar nuevos métodos sintéticos de acoplamiento oxidativo fenólico, las condiciones drásticas usadas en los procedimientos requieren de extensas protecciones y desprotecciones de grupos sensibles presentes en las moléculas madre y se obtienen rendimientos modestos de los productos deseados. Por décadas se han empleado compuestos de hierro como  $FeCl_3$ ,  $K_3Fe(CN)_6$ ,  $FeSO_4$ , así como  $CuCl(OH)$  (Murakami, 2005), y también pirimidina entre otros para su síntesis química. En la figura 6 se presenta una de las formas de síntesis química del bis-eugenol.

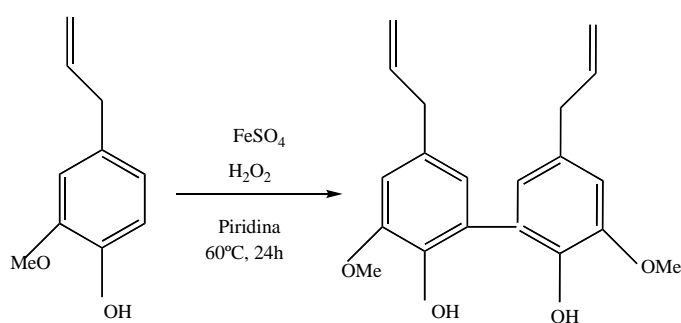


Figura 6: Síntesis química del bis-eugenol

El uso de ensayos *in vitro* se ha revelado como un medio idóneo para el estudio del metabolismo fenólico y más concretamente, en los procesos de acoplamiento oxidativo que sufren este tipo de compuestos para dar lugar a la formación de dímeros, trimeros o polímeros de alto peso molecular (Flores, 2004), muchos productos, incluyendo alcaloides, flavonoides, péptidos cíclicos, antibióticos glicopeptídicos, antioxidantes y algunas otras moléculas complejas, presentan enlaces C-C o C-O, característicos de acoplamiento fenólico (Williamson, 1999).

El uso de enzimas para llevar a cabo reacciones de oxidación ha aumentado considerablemente en los últimos años siendo las peroxidasas efectivos catalizadores de reacciones para oxidaciones orgánicas e inorgánicas.

Recientemente estas enzimas ha llamado la atención por llevar acabo reacciones de enantioselectividad (Masumi, 2002), además de estar implicadas en procesos de lignificación, diferenciación y crecimiento; también están involucradas como indicadores primarios en la organogénesis y embriogénesis, en la regulación de niveles de auxina, en la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos (I Yu, 1999), así como en el entrecruzamiento de polisacaridos de la pared celular, protección superficial y metabolismo de hormonas y alcaloides (Xu, 19998, Masumi, 2002).

A estas enzimas se les puede encontrar tanto en plantas como en microorganismos y por su amplio rango de pl se pueden clasificar como alcalinas y ácidas. Además catalizan la deshidrogenación de una gran cantidad de compuestos aromáticos y poseen una gran variedad de usos industriales (esterilización de la leche, remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el blanqueado de textiles, conservación de trigo), en el campo de la bioquímica analítica (Archana, 2001), actualmente cerca de un 90% de los kits para análisis inmunoenzimáticos se preparan a partir de peroxidasas (I Yu, 2001), entre otros usos. Sin embargo, su extensa aplicación es limitado por su alto costo. Así un eficiente método para la producción de peroxidasas debe encontrarse y el CCV puede ser una alternativa potencial para obtenerlas. Se ha reportado que la adicción de elicitores fúngicos muestran un efectivo aumento en la producción de peroxidasas sin ser tóxico para las células (Pereira, 2000). Por otro lado, la utilización de suspensiones celulares tiene la ventaja de que las peroxidasas ligadas ionicamente pueden ser liberadas en el medio y pueden ser separadas de las peroxidasas de células intactas.

En la literatura encontramos que (Wallace, 1995, Wende, 1999, Alatorre, 2001, Archana, 2001, Kohji, 2003) se han enfocado en las oxidaciones enzimáticas que sufren ácido ferúlico y caféico; muchos de estos estudios se dirigen hacia la obtención de lignina pero conjuntamente han sido obtenidos productos de acoplamiento oxidativo cuando se emplea una peroxidasa de rábano. Igualmente se han sintetizado dímeros derivados de naftol, tirosina, hidroxifenilglicina, eugenol y alcoholes coniferílicos con rendimientos

satisfactorios (Tzeng, 2004); además de quercitina por medio de CCV de *Senna angustifolia*, mientras que *Capsicum annum* transforma capsaicina en su dímero 5-5'- dicapsaicina mediante el acoplamiento oxidativo (fig.7) (Ramachandra S, 2000, Martínez, 2004).

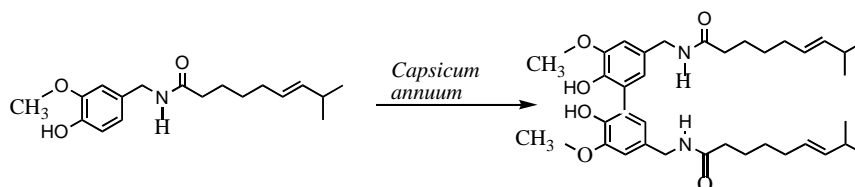


Figura 7: Dimerización de capsaicina

Al llevar a cabo reacciones de acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos, que dan pauta a la dimerización de este tipo de compuestos; los CCV son de gran importancia en la química de los productos naturales, ya que se puede considerar como una manera de sintetizar antioxidantes especialmente cuando los sustratos presentan grupos sensibles (Alatorre, 2001). En las pasadas décadas se ha hecho mucho énfasis por los antioxidantes naturales, esto se debe a la relación del antioxidante y su protección contra enfermedades crónicas (Hitoshi, 2005). Cambios en el estilo de vida en el mundo moderno y por otro lado el desarrollo de conciencia en que los ingredientes de los alimentos puedan modificar favorablemente problemas relacionados con la dieta, han llevado a que se incremente el uso de antioxidantes naturales en alimentos algunos de éstos son: el  $\beta$ -caroteno, el ácido rosmarínico, tocoferoles, ác. ascorbico entre otros. Esta situación alimenta la búsqueda de compuestos con características especiales en su estructura que permitan obtener alternativas de aditivos antioxidantes (Sosa, 2003).

### 2.1.3 Sustratos y Productos de transformación

Sustrato es el compuesto a modificar, que deberá estar en contacto con el biocatalizador, éste debe ser soluble en el medio de reacción, que puede ser orgánico o acuoso. Aunque las plantas no produzcan algunos de estos compuestos, las células cultivadas *in vitro* se pueden usar como bioreactores para transformarlas.



La biotransformación de precursores mediante cultivo de tejidos vegetales ha permitido elucidar varias vías de biosíntesis (Ramachandra, 2002). El potencial de esta técnica para producir moléculas marcadas específicamente en alguna posición clave o producto estereo químicamente puros, permite suponer que habrá un incremento muy marcado en el estudio de los productos secundarios.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios con una amplia variedad de estructuras y funciones, generalmente poseen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo; se encuentran en la mayor parte de las frutas y en muchos casos contribuyen al color y sabor de los mismos (Louli, 2003).

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas mediante la ruta del shikimato a partir de tirosina y fenilalanina usualmente como o-glúcidos y o- metilos conjugados; juegan un papel central en el metabolismo de fenoles en las plantas. Forman parte de la pared celular de la mayoría de las células vegetales; además de ser metabolitos secundarios que existen en altos niveles en la dieta humana; comúnmente se les puede encontrar en el café, cereales -salvado de trigo, maíz, avena y cebada-, y en algunas frutas. Son de los principales antioxidantes constituyentes de frutas, vegetales y bebidas como cerveza y algunos vinos (Robards, 1999). Incluso los fenoles derivados de los ácidos hidroxicinámicos son sustratos para la producción de nuevos sabores y fragancias. Se ha reportado la utilización de ácido ferúlico como sustrato de los cultivos celulares vegetales de *Capsicum spp.*, *Ca. Frutescens* y *Va. planifolia* para la producción de vainillina (Ramachandra, 2000).

Los ácidos hidroxicinámicos han sido empleados como sustratos para la obtención de nuevos productos mediante la transformación con diferentes microorganismos (Alatorre,2001, Ramachandra 2002, Panke, 2004) y CCV; obteniendo una diversidad de productos, que van desde esterres de dichos ácidos a productos como alcoholes y monómeros para polímeros (hidróxiestirenos),

entre otros más. Se han descrito una gran variedad de reacciones de biocatálisis a las que han sido sometidos los ácidos hidroxicinámicos (Alatorre, 2001).

Ácido cumárico (figura 8) en la naturaleza se encuentran varios tipos de ácidos cumáricos meta, orto y para-cumárico. Se puede encontrar en frutas y en los vegetales. Rara vez se encuentra de forma libre en la naturaleza, generalmente se encuentra unido mediante un enlace ester a ácidos orgánicos, lípidos, azúcares o dimerizado en la pared celular de algunos cereales, en residuos industriales procedentes de la elaboración de sidra de manzana, jugos y en algunos granos agotados procedentes de la elaboración de cerveza, se sabe que existe como dehidrodímero o polimerizado dentro de la lignina.

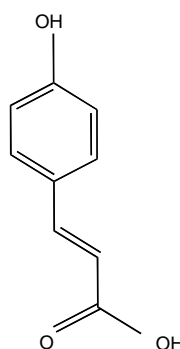



Figura 8: Ácido cumárico

Ácido ferúlico (figura 9) es el hidroxicinámico más abundante en las paredes celulares de las plantas, se encuentra unido covalentemente a polisacaridos por enlaces ester, se encuentra en la mayoría de las plantas y en la mayor cantidad en los cereales, también es posible encontrarlo en el café, donde forma parte de la pared celular y constituye un puente de unión entre polisacaridos, así como en frutas y en productos derivados de éstos, algunos vinos y en la cerveza donde tiene una gran participación en el sabor de la misma (Alatorre, 2001).

En las plantas el ácido ferúlico juega un papel muy importante, ya que proporciona la rigidez de las mismas mediante enlaces cruzados (Alatorre, 2001), proporcionando protección contra la invasión de patógenos y al daño que pueda



ser causado por los radicales libres de oxígeno; es precursor de una gran variedad de compuestos antimicrobianos, moléculas receptoras de señales y fitotoxinas, las cuales juegan un papel importante en la respuesta de defensa de la planta (Wallace, 1995); dado que éstas son susceptibles a daños causados por la luz UV, el ácido férulico juega un papel primordial en la protección del contenido celular, evita también la peroxidación de los lípidos. A nivel industrial su importancia radica en su actividad antioxidante y por ello es empleado como antioxidante natural en alimentos, además de que tiene la capacidad de funcionar como inhibidor de sabores amargos (Flores, 2001), es un ingrediente activo en las lociones y cremas que protegen contra los rayos UV, al ser un fotoprotector que preserva de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Wallace, 1995). Así como ayudar en la textura de los alimentos derivados de vegetales y a que mantengan su textura durante la cocción (Anderasen, 1999, Alatorre, 2001).

También se le ha asociado con actividad antihepática, antiestrogénica, antitumoral, antimicótica e hipocolesterolemica, incluso cierta actividad anticancerígena; además se utiliza en suplementos alimenticios, como los complejos vitamínicos y los productos naturistas (Rivera, 2004). Entre los derivados más importantes del ácido ferúlico se encuentran dímeros y ésteres, la mayoría de ellos con propiedades antioxidantes, pero también son empleados como anti-inflamatorios en la medicina herbolaria en China.

Se ha comprobado que los dímeros del ácido tienen una mejor actividad antioxidante que el ácido en sí, esto se debe principalmente a que los dímeros tienen una mejor solubilidad en la parte lípida, ello implica una mayor distribución del antioxidante en la parte grasa y una mayor protección a la misma. Se han reportado ésteres del ácido ferúlico con alcoholes primarios (del metanol al undecanol), los cuales tienen propiedad antioxidante.

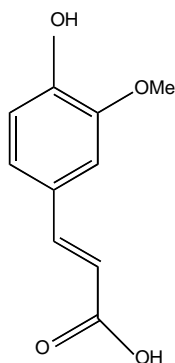


Figura 9: Ácido ferúlico

El eugenol (figura 10) es un o-metoxifenol con una pequeña cadena hidrocarbonada, componente principal del aceite de clavo, presente también en canela, nuez moscada, pimienta inglesa (Masae, 2005); usado como un material de relleno dental, además de desinfectante (Yukio, 2003), antifungal (Kwang, 2001), antiséptico (Delogu, 2004), antioxidante, antiinflamatorio (Fujisawa, 1999) y anestésico local, también presenta propiedades antígenotóxicas y anticarcinogénicas (Yukio, 2003); a concentraciones altas tiene adversos efectos antiinflamatorios (Delogu, 2004), actividad citotóxica y reacciones alérgicas como dermatitis (Seiichiro, 2002), también se ha empleado para la preparación de nuevos bifenilos con interesantes características y actividades biológicas. Además de ser materia prima para la síntesis de aromas y sabores, tanto en cosméticos como en alimentos (Kwang, 2001), algunos estudios muestran que el eugenol puede ser biotransformado al componente esencial de la vainilla mediante algunos microorganismos.

Los compuestos dimericos del eugenol presentan mayor actividad antioxidante que sus monómeros; el eugenol y el bis-eugenol (Figura 11) tienen diferentes mecanismos de antioxidación, es decir, el eugenol puede inhibir la peroxidación lipídica a niveles de iniciación mientras que el compuesto dimérico puede inhibir a niveles de propagación y radicales libres como el  $\alpha$ -tocoferol (Masahiro, 2005). El bis-eugenol está presente en bajas concentraciones en productos naturales (Masae, 2005).

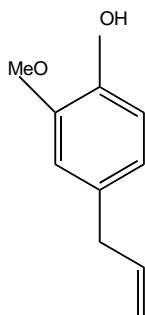


Fig 10: Eugenol

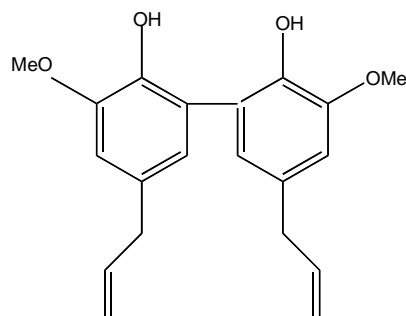


Fig 11: Bis-eugenol

El isoeugenol (figura 12) al igual que el eugenol es componente del aceite de clavo, presente también en algunos vegetales, nuez moscada (Yan, 2002) y naranjas. Inhibe la peroxidación de lípidos mejor que el eugenol (Masae, 2004). Usado como un aditivo en alimentos (Yukio, 2003), como agente saborizante en cosméticos y productos alimenticios. Igualmente el isoeugenol es materia prima para la producción de algunos químicos, como insecticidas para hormigas y escarabajos (Yan, 2002)

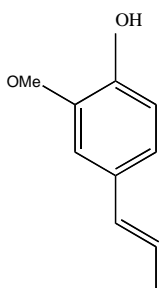


Fig 12: Isoeugenol

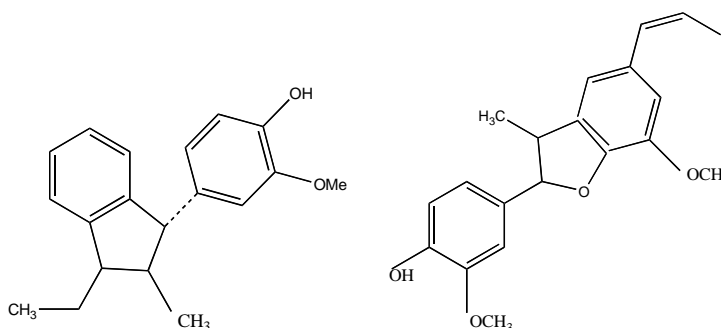


Fig 13: Dimeros de isoeugenol

Los dímeros de eugenol e isoeugenol (figura 13) son importantes ya que estos son materia prima para preparar nuevos bifenilos con estructuras difíciles y con actividad biológica importante para farmacia principalmente; algunos de estos son utilizados en las terapias antibacteriales en pacientes con sida (Delogu, 2004).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar que los cultivos vegetales de *Medicago sativa*, *Bouvardia ternifolia*, *Prunus serotina*, *Coriandrum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Mammillaria hutzilopochtli*, *Psacalium peltatum*, *Cucumis melo* y *Daucus carota* tienen la capacidad de ser catalizadores en las reacciones de oxidación para la producción de dímeros de algunos antioxidantes naturales (eugenol, isoeugenol, ácido cumárico y ácido ferúlico).

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Establecer un protocolo para cultivos asépticos de Capulin (*Prunus serotina*) y zanahoria (*Daucus carota*) e inducir y proliferar callos de estas especies. Proliferar callos de Alfalfa (*Medicago sativa*), Trompetilla (*Bouvardia ternifolia*), Frijol (*Phaseolus vulgaris*), Matarique (*Psacalium peltatum*) y Melón (*Cucumis melo*).
- ❖ Establecer cultivos en suspensión de todas las especies antes mencionadas.
- ❖ Probar que los cultivos vegetales realizan la conversión de sustrato.
- ❖ Observar diferencias en la biotransformación de los sustratos para callo y células en suspensión.
- ❖ Descubrir cuales cultivos llevan a cabo una mayor conversión de sustrato.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Como ya se mencionó éste trabajo se realizó en dos partes: la primera es la obtención de biocatalizadores y la segunda parte es la biotransformación de los sustratos por medio de los biocatalizadores obtenidos, a continuación se muestra el diagrama general de trabajo (Fig 14) que se llevó acabo.

#### DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

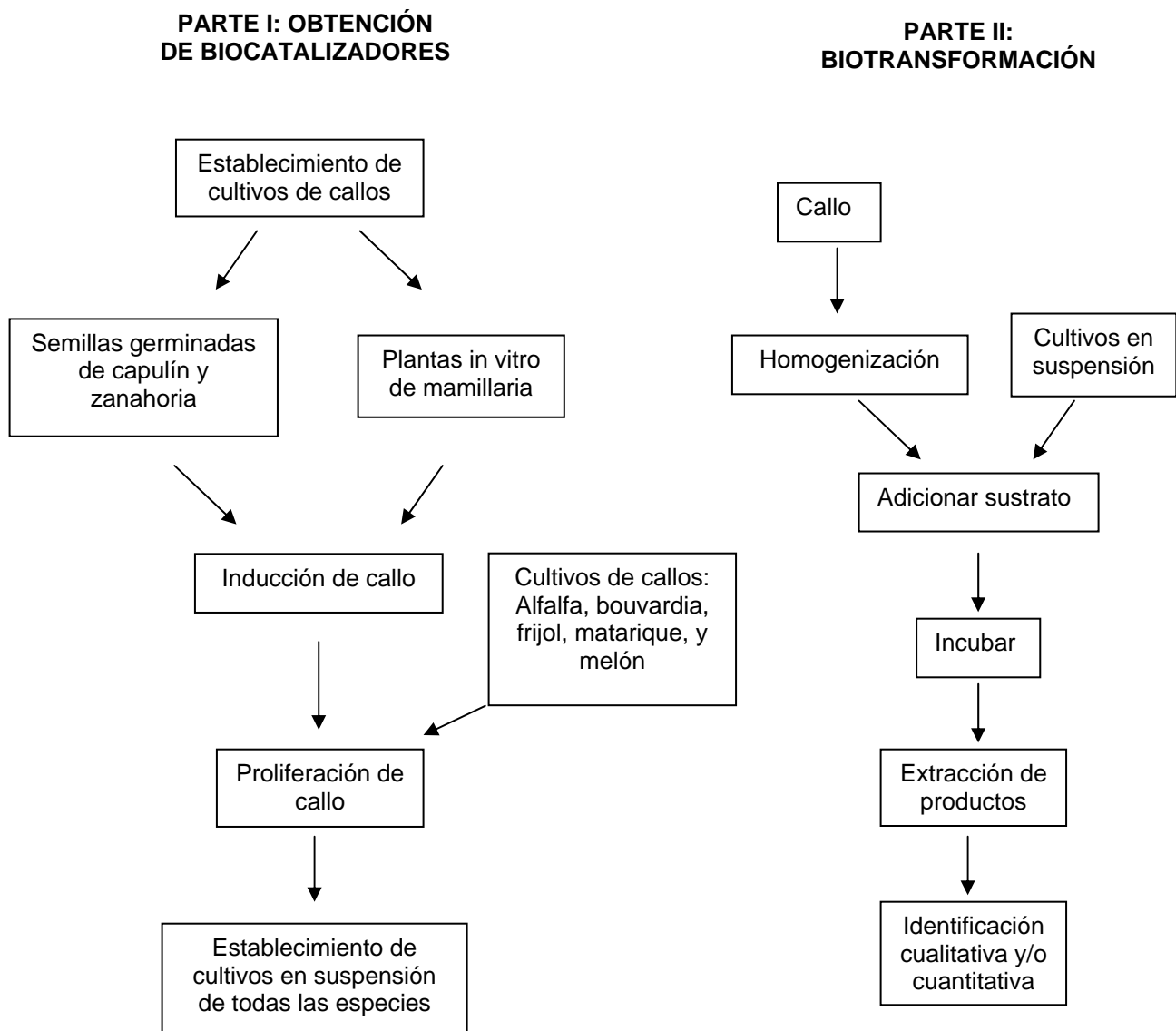


Fig 14: Diagrama general de trabajo.

## PARTE I: OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES

### **4.1 Material biológico.**

Se utilizaron cultivos de callo previamente establecidos a partir de distintos explantes de plántulas, bajo condiciones *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa* L.), trompetilla (*Bouvardia ternifolia*), cilantro (*Coriandrum sativum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), matarique (*Psacalium peltatum*) y melón (*Cucumis melo*); los cuales se subcultivaron en los medios ya establecidos en el Lab. de Cultivo de Tejidos. Así mismo se establecieron los cultivos de callo de capulín (*Prunus serotina*) y zanahoria (*Dacus carota*) a partir de semillas y cultivos de callo de mammillaria (*Mammillaria hutzilopochtli*) empleando plántulas *in vitro*.

#### **4.1.1 Preparación de medios de cultivo.**

##### **Medios sólidos.**

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X\*, se usaron medios en base a las sales inorgánicas: SH\* y MS\*; así como, reguladores de crecimiento auxinas: 2,4-D, MCPP; citocininas: BAP y cinetina; además se adicionaron vitaminas SH\*, MS\* y una mezcla de aminoácidos y vitaminas\* y L-prolina dependiendo de la especie. Todos los medios fueron suplementados con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa como fuente de carbono. El pH fue ajustado antes de su esterilización con NaOH 1N a 5.7±0.1 para todos los medios. Como agente gelificante se utilizó Gellan a razón de 2.5 g.L<sup>-1</sup>. Los medios de cultivo se vertieron en frascos de alimento infantil, depositando 30 mL en cada recipiente. Finalmente los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una presión de 1.3 kg.cm<sup>-2</sup> o 18 lb.pulg<sup>-2</sup> durante 18 minutos. \* Ver anexos.

##### **Medios líquidos**

Se prepararon igual que los medios sólidos pero sin agente gelificante y se vertieron 60 ml de medio en cada matraz Erlenmeyer de 250 ml; éstos se taparon con papel aluminio.



#### **4.1.2 Condiciones de incubación.**

##### Germinación de semillas y callos.

Los cultivos se incubaron en un cuarto de ambiente controlado con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 h de oscuridad, una temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  y una intensidad luminosa de  $24 \text{ W.m}^{-2}$ . A excepción de matarique que se incubó en oscuridad a la misma temperatura.

##### Cultivos en suspensión

Estos cultivos se incubaron en una incubadora rotatoria a  $25^{\circ}\text{C}$  por 7 días a una velocidad de 150 rpm.

#### **4.1.3 Germinación y obtención de explantes**

##### Germinación

Métodos de esterilización.

Para la obtención de los callos de zanahoria y capulín, fue necesario esterilizar las semillas. Se probaron diferentes tratamientos para cada especie variando la concentración y tiempo de las sustancias desinfectantes. Así como la escarificación química y manual para capulín. Como se muestra en las siguientes tablas 5 y 6.

A continuación se dan las claves que se utilizaran para los desinfectantes utilizados:

OH %: Por ciento v/v de alcohol

dH<sub>2</sub>O: Enjuagues con agua destilada estéril

Cl %: Porcentaje de cloro

A: Por cada 100ml se adiciona 1 gota de tween 20 y 5 gotas de una solución coloidal de plata(microdyn<sup>R</sup>).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno al 3.0%.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfurico concentrado.

Para zanahoria se utilizaron 100 semillas aproximadamente por tratamiento:

Tabla 5: Tratamientos probados en el proceso de desinfección de zanahoria

No. Tratamiento	Tratamiento
1	OH 50% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 30% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
2	OH 50% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 40% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
3	OH 50% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 50% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
4	OH 60% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 30% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
5	OH 60% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 40% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
6	OH 60% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 50% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
7	OH 70% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 30% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
8	OH 70% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 40% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O
9	OH 70% x 1 min, 3 dH <sub>2</sub> O, Cl 50% + A x 15 min, 2 dH <sub>2</sub> O

B) Para capulín se utilizaron 25 semillas por tratamiento

Tabla 6: Tratamientos probados en el proceso de desinfección de capulín

No. Tratamiento	Tratamiento
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 5 min sin escarificar
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 10 min sin escarificar
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 15 min sin escarificar
4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x 5 min sin escarificar
5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x 10 min sin escarificar
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x 15 min sin escarificar
7	Cl 10 % + tween +mycrodyn con escarificación
8	Cl 20 % + tween +mycrodyn con escarificación
9	Cl 30 % + tween +mycrodyn con escarificación

### Obtención de explantes

Una vez esterilizadas las semillas, se sembraron en frascos de alimento infantil con 30 mL de medio MS a razón de 30 semillas por frasco para zanahoria y 5 semillas para capulín; y se mantuvieron bajo condiciones de incubación antes mencionadas. Con el fin de obtener los explantes necesarios.

Para la proliferación de mamillaria ya que se contaba con planta *in vitro*, se utilizó medio MS adicionado con BAP 1mg/L para la obtención de brotes, se subcultivo por tres meses en este medio, hasta obtener la cantidad de plantas necesarias de las cuales se tomaron los explantes para la inducción de callo.

#### **4.1.4 Inducción y formación de callo.**

Zanahoria y capulín.

Transcurridos los 15 días de la germinación de las semillas, los explantes se obtuvieron disectando hojas, pecíolos, raíces y tallos de las plántulas. Para las hojas se realizó un corte en la parte superior e inferior, mientras que para el tallo, raíz y peciolo se cortaron fragmentos de 0.5 cm de longitud aproximadamente. Posteriormente, los explantes se colocaron en contacto con el medio de inducción, en cada frasco se sembraron entre 10 y 15 explantes; con el propósito de ver cual de estos explantes producía mayor cantidad de callo. Ya obtenidos los callos los subcultivos se realizaron cada 21 días y/o de acuerdo a la producción de éste, eliminando las partes que presentaron oxidación y el tejido que dio origen a éstos. Se observó su tipo de crecimiento por dos subcultivos para determinar cual sería el callo a utilizar.

Además para capulín se probaron cuatro medios de inducción de callo diferentes tabla 7, buscando el medio óptimo, ya que no se encontraron reportes que propusieran algún medio en especial.

Tabla 7: Medios de inducción de callo de capulín

No. medio	MS adicionado con *
1	1 mg 2,4-D
2	1 mg 2,4-D + 5 mg antioxidante
3	2 mg 2,4-D + 5 mg antioxidante
4	2 mg 2,4-D + 10 mg antioxidante

\* concentraciones en litro de medio.

Igualmente se trabajó en condiciones de oscuridad y fotoperiodo, con los callos de capulín, para encontrar las mejores condiciones de inducción de callo respecto a este parámetro. Se observaron los resultados de este experimento por dos subcultivos haciendo una evaluación cualitativa.

#### Mammillaria

A partir de cultivos *in vitro* de *Mammillaria huitzilopochtli* se obtuvieron los explantes, se hicieron cortes de aproximadamente 1cm de longitud a los cactus, los cuales se sembraron en frascos de alimento infantil con 30 mL de medio MS adicionado con glicina 10mg/L, 1mg/L de 2,4-D y 0.2mg/L de cinetina, a razón de 5 cortes por frasco y se mantuvieron bajo condiciones de incubación (Robles, 1999).

#### 4.1.5 Mantenimiento y proliferación de callo

Los callos se subcultivaron cada 21 días en el medio adecuado (Tabla 8), seleccionando fragmentos con un aspecto sano eliminando las partes que presentaban oxidación, así como el tejido madre con la ayuda de un bisturí y se trasladaron a medio nuevo.

Tabla 8: Composición de Medios de Cultivo

	Alfalfa	Bouvardia	Cilantro	Frijol	Matarique	Melón
<b>Sales</b> MS SH	*	*	*	*	*	*
Vitaminas MS SH Mezcla	*	*	*	*	*	*
Glicina	20.0	20.0		20.0		20.0
Cinetina	0.2	0.05		1.0		6.0
BAP			0.3		0.3	
AIA					1.0	
2,4-D	1.0	1.0	3.0	3.0		3.0
<b>Antioxidante</b> Ac. Ascórbico Ac. cítrico		0.25 0.25	1.5 1.5	0.75 0.75	100	0.40 0.40

Todas las concentraciones están dadas en  $\text{mgL}^{-1}$ . \*(Ver anexos).

#### 4.1.6 Establecimiento de células en suspensión

Para todas las especies se siguió el mismo procedimiento:

1. Se pesaron 10g de callo limpio de cada especie.
2. Se disgregaron en fragmentos lo más pequeño posible.
3. Se inoculó cada matraz depositando el callo pesado.
4. Se incubó bajo las condiciones antes descritas.

#### Proliferación de cultivos en suspensión

Los subcultivos de las células en suspensión se realizaron a intervalos de 7 días de la siguiente manera: Se preparó el medio adecuado para cada especie y se tomó la suspensión a la cual se le agregó un volumen igual de medio fresco, posteriormente el volumen final se llevó a dos matraces y se incubaron en las condiciones antes mencionadas.

## PARTE II: BIOTRANSFORMACIÓN

### 4.2.1 Homogenizado de CTV

Los callos fueron homogenizados de la siguiente manera:

1. Se pesaron 10 g del callo
2. Se adicionaron 50 mL de buffer de fosfatos con un pH = 6.5
3. Se homogenizaron durante 5 min. a una velocidad de 8000 rpm, excepto con *Mammillaria huitzilopochtli* cuyo material celular es más duro por lo que se requirió de 13500 rpm.
4. Se hicieron tres repeticiones para eugenol, una para ác. ferúlico, ác. cumárico e isoeugenol y un blanco para cada especie.

Los cultivos en suspensión no fueron homogenizados, dado que se encontraban lo suficientemente disgregados.

### 4.2.2 Biotransformación

#### Callos

Una vez homogenizados se adicionaron 50 mg del sustrato: eugenol, ác. ferúlico, ác. cumárico e isoeugenol (disuelto previamente en 1 mL de acetona) por matraz. Posteriormente los matraces se taparon con papel aluminio y se colocaron en incubación y agitación durante 5 días.

#### Cultivos en suspensión

Se filtraron las células y se pesaron 10 g a los cuales se agregó 50 mL de buffer de fosfatos a pH = 6.5 y se adicionaron 50 mg del sustrato (disuelto previamente en 1 mL de acetona) por matraz. Una vez adicionado el sustrato, los matraces se taparon con papel aluminio y se colocaron en incubación y agitación por 5 días.

### 4.3 Extracción de productos

Transcurrido el tiempo de biotransformación, a los cultivos se les adicionó 25mL de acetato de etilo, se filtraron al vacío con ayuda de un embudo Büchner con papel filtro de porosidad 40 y se volvió hacer una extracción con otros 25mL de acetato de etilo. El filtrado se colocó en un embudo de separación de 500 mL, recuperando la fase orgánica y secándola con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se concentró en rota-vapor, se transvasó a un frasco bial donde se llevó a sequedad (extracto crudo).

### 4.4 Evaluación cualitativa de la biotransformación

Se confirmó la desaparición del sustrato y la aparición del producto mediante cromatografía de capa fina (CCF). A los extractos crudos se les adicionó 0.5 mL de acetato de etilo, para disolver el producto y poder usarlo en la CCF; a cada carril se le hicieron seis aplicaciones con un tubo capilar. La cromatografía se realizó con una mezcla de disolventes hexano: acetato de etilo (4:6) teniendo el sustrato original como referencia.

Para confirmar que el compuesto fue producido por la biotransformación del sustrato, se realizó un blanco, el cual consistió en un cultivo tratado de la misma forma pero sin sustrato. El proceso de extracción y monitoreo fue el mismo que se realizó a los demás.

### 4.5 Identificación y cuantificación del producto de biotransformación utilizando HPLC.

La identificación y cuantificación se realizaron por medio de un cromatógrafo de líquidos con bomba isocrática y un loop de 20µL, utilizando una columna C-18 a una temperatura de 30 °C un detector programable UV Waters, operando en la región UV a 230 y 280. La fase móvil o eluyente utilizado fue agua: metanol (70:30). El agua utilizada fue acidificada con 2 g/L de ácido trifluoroacético. La fase móvil se desgasificó en un sonicador durante 20 min. El flujo fue de 1 mL/min.

#### **4.5.1 Curvas de calibración**

Se realizaron dos curvas de calibración, una para el eugenol y otra para el bis-eugenol bajo las condiciones mencionadas. Se manejaron 5 y 6 concentraciones diferentes para cada curva, inyectándose por triplicado cada una. Para lo que se identificaron los tiempos de retención de cada producto, su respectiva área y absorbancia. Estas nos sirven para calcular la concentración de eugenol consumido y la concentración de bis-eugenol formado.

#### **4.5.2 Preparación de la muestra**

A partir de las extracciones se obtuvo un sólido el cual se disolvió en metanol, llevándolo a un aforo de 10 mL, de esta dilución se tomó 1 mL y se llevó a un aforo de 10 mL. El volumen inyectado fue de 20  $\mu$ l, cada muestra se realizó por triplicado.

#### **4.5.3 Cálculo de la concentración**

Una vez que se obtuvieron los tiempos de retención para el eugenol y el bis-eugenol, se determinaron las áreas correspondientes y a través de la ecuación de las curvas patrón, se extrapolaron las áreas, obteniéndose una concentración, multiplicando después por los factores de dilución se obtuvo la concentración real.





## V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### PARTE I: OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES

#### 5. 1 Germinación y Obtención de explantes

Se recomienda trabajar con semillas para la obtención de explantes en la inducción de callo, ya que el trabajar con material vegetal in vivo puede presentar muchos problemas de contaminación, aunque las bacterias y hongos en éstos no presenten daños a la planta; se convierten en patógenos en condiciones *in vitro* (Pérez, 1999), lo cual implica un método de esterilización más fuerte y los explantes que se obtengan de éstos suelen ser más susceptibles a la oxidación (Pierik, 1990). Así para la obtención de los explantes de capulín y zanahoria se optó por utilizar semillas.

#### Zanahoria (*Dacus carota*).

Para la desinfección de semillas de zanahoria se probaron nueve tratamientos diferentes. Los resultados se presentan en la tabla 9; se observó que en ocho de los nueve tratamientos propuestos se presentó contaminación, con hongo y bacteria y no se logró eliminar la contaminación. Ningún procedimiento afectó la viabilidad de las semillas ya que su germinación en todos los casos fue mayor al 90%. La efectividad de la desinfección y germinación se evaluó en por ciento tomando en cuenta la presencia o ausencia de contaminación. El tratamiento que permitió la desinfección al 100% de las semillas de zanahoria fue el más agresivo, consistió en someter la semilla a alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 50%. Siendo éste el utilizado para la obtención del cultivo en el trabajo. En la figura 15 se observan las plántulas obtenidas mediante el tratamiento número nueve de esterilización, utilizado para el establecimiento de los cultivos de callo.

Tabla 9: Resultados de los tratamientos de desinfección y germinación utilizados para las semillas de zanahoria.

No. Tratamiento	Tratamiento*	Contaminación	Germinación
1	OH 50% x 1 min, Cl 30% x 15 min	100.0 %	95 %
2	OH 50% x 1 min, Cl 40% x 15 min	100.0%	95%
3	OH 50% x 1 min, Cl 50% x 15 min	70.0%	95%
4	OH 60% x 1 min, Cl 30% x 15 min	70.0%	98%
5	OH 60% x 1 min, Cl 40% x 15 min	70.0%	98%
6	OH 60% x 1 min, Cl 50% x 15 min	70.0%	98%
7	OH 70% x 1 min, Cl 30% x 15 min	20.0%	95%
8	OH 70% x 1 min, Cl 40% x 15 min	20.0%	95%
9	OH 70% x 1 min, Cl 50% x 15 min	0.0%	98%

\*OH Porcentaje de alcohol por tiempo, Cl porcentaje de hipoclorito por tiempo

Los datos obtenidos se deben a que factores físicos y químicos como la agitación y adición de desinfectantes, tienen efectos determinantes e intensos en todas las actividades de los microorganismos. Se utilizó alcohol en la esterilización debido a que éste disuelve la capa epicular de las semillas, ejerciendo un efecto de permeabilidad, además desnaturaliza las proteínas y disuelve lípidos dañando las membranas celulares bacterianas, pero no afecta a las esporas; por esta razón se emplea hipoclorito de sodio, éste presenta hidróxidos de sodio que deshidratan y desnaturalizan las proteínas de esporas bacterianas, hongos y virus; además desnaturaliza productos tóxicos (enzimas microbianas) así como actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos, oxidando grupos –SH, aminos, indoles y hidróxifenol de la tirosina. Para asegurar la desinfección, se empleó tween 20, un detergente neutro soluble en agua, alcohol, acetato de etilo y en aceites vegetales que disminuye la tensión superficial, permitiendo la penetración de las otras sustancias desinfectantes (Maclejko, 1982, Pierik 1999, Ramos, 2006). El Microdyn es plata coloidal que contiene partículas suspendidas que al reaccionar con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben la respiración, causando entonces su intoxicación, logrando así matar a las bacterias, hongos y virus presentes en la superficie de las semillas (Lantage, 2001, Mere, 2003, Ramos, 2006).

Al aumentar el tiempo de exposición de la mezcla desinfectante con las semillas se logró una mayor penetración de ésta, lo que aseguró la eliminación de los patógenos, como se observó en el tratamiento nueve logrando así unas plantas aptas para la obtención de callo.



Figura 15: Plantas obtenidas in vitro de zanahoria

#### Capulín (*Prunus serotina*).

Para la desinfección de las semillas de capulín también se trabajaron nueve diferentes métodos de esterilización, como se observa en la tabla 10. En ocho de ellos se presentó contaminación; en los tratamientos del uno al seis no se presentó germinación, lo que demuestra que el tiempo de escarificación con ácido sulfúrico y agua oxigenada no fue suficiente para remover la testa, impidiendo el paso del agua a la semilla y con ello su germinación. Sólo en los tratamientos siete, ocho y nueve se observó una germinación del 80% a los cinco días de haberse realizado la siembra, debido a que éstos tuvieron una escarificación mecánica; es decir, se eliminó la testa (por medio de navajas) que es la barrera de recubrimiento seminal (Flores, 2004) y se logró obtener las semillas desnudas; las cuales se sometieron a tres métodos de desinfección, encontrándose una tendencia de disminuir su contaminación a la par que se aumentaba la concentración de hipoclorito de sodio en el tratamiento, el mejor de ellos fue el nueve con una concentración al 30% de cloro ya que no presentó contaminación; por lo que se utilizó para la obtención de los cultivos (Figura 16).

Tabla 10: Resultados de los tratamientos de desinfección y germinación utilizados para las semillas de capulín

No. Tratamiento	Tratamiento *	Germinación	Contaminación
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 5 min	0.0	100.0%
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 10 min	0.0	100.0%
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 15 min	0.0	50.0%
4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x 5 min	0.0	100.0%
5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x 10 min	0.0	100.0%
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x 15 min	0.0	80.0%
7	Cl 10 % + tween +mycrodyn x 15 min	80 %	80.0%
8	Cl 20 % + tween +mycrodyn x 15 min	80 %	30.0%
9	Cl 30 % + tween +mycrodyn x 15 min	80 %	0.0%

\*Cl porcentaje de hipoclorito de sodio por tiempo

Aunque el porcentaje de germinación fue alto 80% para las semillas de capulín, se esperaría un 100% de germinación, esto se pudo deber a que las semillas estuvieran perdiendo viabilidad por el tiempo transcurrido entre su cosecha y su utilización. Ya que las semillas tienen un periodo de latencia donde alcanzan su máximo vigor y después declina su poder germinativo así como su vigor en plántula (Pérez, 1999, Olivera, 2003).

Se utilizó peróxido de hidrógeno para ayudar a desinfectar las semillas ya que es un método utilizado años atrás, incluso se ha utilizado para acelerar la germinación, debido a que acelera la respiración durante la fase anterior a la movilización de sustancias de reserva. Varios mecanismos explican esto: por ejemplo se puede considerar que hay una destrucción directa del peróxido por acción de la catalasa, lo que provocó la liberación de oxígeno molecular el cual a su vez incrementó la tasa de respiración y facilitó la oxidación de sustancias grasas; otra pudo ser que la peroxidasa reaccionara con el peróxido para oxidar inhibidores de crecimiento, presentes en los tejidos (Hernández, 1991).



Figura 16: Plantas de Capulín in vitro

Mammillaria (*Mammillaria huitzilopochtli*).

Para la obtención de callos de mammillaria se contaba con un cultivo de planta estéril de Mammillaria (figura 17) el cual se tuvo que sembrar en medio de proliferación de brotes adventicios, ya probado previamente (Robles, 1999) que fue medio MS adicionado con BAP 1mg/L, a partir de estos brotes adventicios y después de varios subcultivos (3 meses) se obtuvo la cantidad necesaria de masa celular para iniciar el cultivo de callo.



Figura 17: Mammillaria in vitro

## 5.2 Inducción y formación de callo

El callo normalmente se obtiene de un tejido vegetal sometido a estrés como una herida por exposición a reguladores de crecimiento, luz, etc; es una masa de células con actividad mitótica constante debido a que éstas crecen de manera descontrolada (Pérez, 1999). La parte central que une a las periferias muere,

haciendo posible que las capas exteriores formen grupos de células que a la vez crecen, se dividen y repiten el ciclo (Mere, 2003).

### Zanahoria

Cuando las plantas de zanahoria tuvieron 15 días y un tamaño de 10 cm, con el objeto de determinar que explante mostraba mayor capacidad de formar callo se realizó un ensayo en el cual se probaron explantes de: tallo, hoja, pecíolo y raíz, (figuras 18 y 19). Los datos obtenidos se compararon entre explantes de manera cualitativa por dos subcultivos, es decir, por seis semanas, se realizaron diez repeticiones para cada explante (tabla 11). Los mejores callos fueron los inducidos por el explante de pecíolo ya que éstos presentaron una mayor proliferación y menor oxidación; por lo que se eligió éste para la realización de los siguientes experimentos. Se observó un crecimiento rápido de callo, a los 4 días ya presentaba los primeros hinchamientos, además de presentar color verde cristalino; el callo más prolifero fue el del explante de pecíolo, por lo que se eligió éste para la realización de los siguientes experimentos, que son congruentes con lo reportado por Mere.

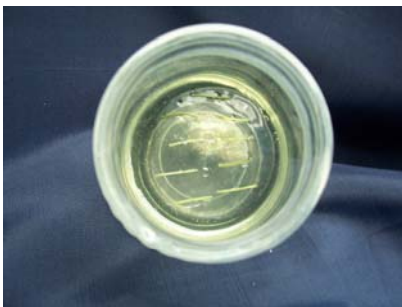


Fig. 18: Inducción de callo a partir de pecíolo



Fig. 19: Inducción de callo a partir de hoja

Tabla 11: Formación de callo a partir de los diferentes explante

<b>Explante</b>	<b>Crecimiento</b>
Pecíolo	Abundante y poca oxidación
Tallo	Poco y media oxidación
Hoja	Medio y poca oxidación
Raíz	Poco y media oxidación

### Capulín

Al igual que zanahoria después de 15 días de germinación se tomaron explantes de varias partes de la planta de capulín: tallo, raíz, hoja y pecíolo, (figuras 20, 21, 22). El callo del tallo de capulín tomó una coloración roja casi en su totalidad, el de hoja y raíz no presentó esta característica de inicio aunque con el paso del tiempo también presentaban un color rojizo. Se observó de manera cualitativa por dos subcultivos, es decir, por seis semanas, la formación de callo de dichos explantes, se realizaron diez repeticiones para cada explante (Tabla 12). Los mejores callos fueron los inducidos por el explante de pecíolo ya que éstos presentaron una mayor proliferación y menor oxidación; por lo que se eligió éste para la realización de los siguientes experimentos.

### Inducción de Callo de Capulín a partir de diversos explantes



Fig 20: Hoja

Fig 21: Pecíolo

Fig. 22: Raíz

Tabla 12: Formación de callo a partir de los diferentes explantes

<b>Explante</b>	<b>Crecimiento</b>
Pecíolo	Abundante y poca oxidación
Tallo	Poco y media oxidación
Hoja	Medio y poca oxidación
Raíz	Poco y media oxidación

Un factor importante para la inducción y proliferación de callos además de la anatomía del explante, son los medios de cultivo, los cuales son importantes para su formación (Margara, 1998). Al inicio se trabajó con un medio MS adicionado con 2,4-D (1mg/L) pero el callo obtenido se oxidaba rápidamente, además de tener poca proliferación, por lo que se probaron cuatro medios para la inducción del callo buscando el medio óptimo de inducción. Ya que la oxidación es una limitante para el cultivo y hace que el tejido tome una coloración café debido a la liberación de sustancias fenólicas en la superficie de los explantes, que pueden debilitarlo y provocar su muerte, se optó por adicionar antioxidantes al medio para que la oxidación fuera mínima. Los antioxidantes comúnmente utilizados son: el ácido ascórbico, ácido cítrico y cisterna, además de compuestos con alta afinidad por sustancias fenólicas como pirogalol y carbón activado (Pérez, 1998). En este caso se utilizó una mezcla de ác, cítrico-ascórbico 50:50; el ác ascórbico es una lactona, potente reductor que pierde con facilidad átomos de hidrógeno, protege a las células vivas contra la acción destructiva de los agentes oxidantes que se forman a partir del oxígeno; mientras que el cítrico es un ác. carboxílico ampliamente distribuido en tejidos animales y vegetales cuyos grupos polares ácidos e hidroxilo le permiten tener propiedades antioxidantes (Uribe, 1998). Se evaluaron los callos considerando el aumento de tamaño y el grado de oxidación en los mismos (Tabla 13), con base en los resultados obtenidos en este ensayo se descartaron los medios uno, dos y tres; encontrando que los mejores resultados se obtuvieron con el medio cuatro el cual tiene la más alta concentración tanto de reguladores de crecimiento como de



antioxidante lo que le permitió al cultivo proliferar más y oxidarse menos. Se tomó como referencia para la elección del medio el descrito por Hammatt, 1998.

Tabla 13: Medios de inducción de callo de capulín

<b>Medio</b>	<b>MS adicionado con *</b>	<b>Características del callo</b>
1	1 mg 2,4-D	poca proliferación y mucha oxidación
2	1 mg 2,4-D + 5 mg antioxidante	poca proliferación y mediana oxidación
3	2 mg 2,4-D + 5 mg antioxidante	mayor proliferación y mediana oxidación
4	2 mg 2,4-D + 10 mg antioxidante	mayor proliferación y poca oxidación

\* concentraciones en litro de medio.

Además se trabajó en condiciones de obscuridad y fotoperiodo (tabla 14), con los callos de pecíolo; ya que este factor físico puede presentar diferencias significativas en la obtención de callo (Pierik, 1990, Pérez, 1999,), debido a que las plantas responden a las alteraciones de los periodos de luz y obscuridad de diferente manera como floración, crecimiento, alargamiento de entrenudos, germinación, caída de hojas, etc (Pérez, P, 1998). Se llevó a cabo este experimento por dos subcultivos, la evaluación se hizo de manera cualitativa; los explantes que presentaron mayor proliferación fueron los expuestos a luz, por los que se desecharon los inducidos en condiciones de obscuridad. Se ha reportado (Alatorre, 2001) que muchos cultivos vegetales son estimulados con luz, tanto en el crecimiento como en la formación de compuestos secundarios incluyendo polifenoles, flavonoides y carotenoides (Pierik, 1990).

Tabla 14: Resultados de inducción de callo de capulín en luz y obscuridad

<b>Medio</b>	<b>Características de callo</b>
Con luz	Buena proliferación y poca oxidación
Sin luz	Poca proliferación y poca oxidación

### Mammillaria

Para mammillaria se utilizó el medio reportado por Robles (1999) obteniéndose resultados favorables. El cultivo de callo de Mammillaria fue más lento que capulín y zanahoria ya que éste mostró hinchamiento a los seis días de la siembra en el medio y a los 15 días sólo presentaba un poco de formación de callo, aunque después de los primeros dos subcultivos su proliferación mejoró considerablemente fig. 23.

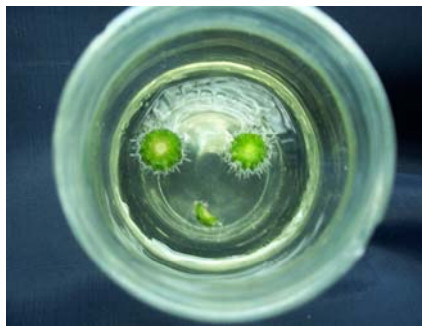



Figura 23: Inducción de callo de Mammillaria

Para los callos de capulín y zanahoria se observó la formación de callo en cada explante utilizado lo que demostró que su formación se puede iniciar de cualquier órgano vegetal, pero su respuesta celular a la formación de callo depende de otros factores, como las condiciones fisiológicas y bioquímicas de los tejidos, la composición de los medios de cultivo y las condiciones ambientales (Álvarez, 1994). Así en estos ensayos se pudo observar que la respuesta en cuanto a la producción de callo de estos cultivos se debió más a su composición celular, ya que hubo proliferación de callo a partir de explantes con zonas altamente meristemáticas. Las plantas poseen varios tipos de meristemas: las hojas tienen un meristemo foliar de funcionamiento simultáneo o secuencial que es de funcionamiento limitado en tiempo y cesa cuando la hoja ha alcanzado su forma y dimensiones definidas; el pecíolo presenta meristemas marginales e intercalares que están situados entre dos regiones de tejidos diferenciados y permiten una elongación importante; tallo presenta meristemas intercalares y caulinares permitiendo la elongación, de



crecimiento limitado; raíz meristemas radicales y adventicios (Margara,1998). Para estos cultivos se indujo mayor cantidad de callo con explantes de pecíolo, en las cuales se favoreció la división celular (Mere, 2003) produciendo la dediferenciación del órgano haciendo que las células adultas sean capaces de pasar a su forma juvenil aumentando su potencial de división. Mientras que su crecimiento in vitro fue regulado por la interacción y balance de los reguladores de crecimiento suplementados en el medio y las sustancias de crecimiento producidas endógenamente por el cultivo de células (Flores, 2004).

Las auxinas son frecuentemente usadas en el medio para promover el crecimiento de callo (Pierik, 1990); éstas ayudaron al aumento del volumen celular provocado por la absorción de agua debido a que la pared celular disminuyó su grosor y resistencia, esto también ayuda para que se diera la mitosis. De acuerdo a Mere el 2,4-D a razón de 1 a 2 mgL<sup>-1</sup> aporta los requerimientos necesarios para la inducción de callos de zanahoria. La presencia de éste produce una proliferación de callo no diferenciado, mientras que su remoción provocaría que las masas no diferenciadas siguieran un patrón de organización que resultara en la formación de algún órgano o embrión. También se han usado altas concentraciones de 2,4-D para la formación de callo debido a que suprimen la morfogénesis y da por resultado la rápida proliferación del mismo, por la actividades sistema de señales, es por ello que para la inducción de callo de capulín se obtuvo una exitosa proliferación a mayor concentración de ésta. Y las citocininas fueron necesarias para que se llevara a cabo la división celular, es decir, la síntesis de ADN (Ramachandra, 2002), la mitosis por la activación de cdc2 y la citocinesis, también participan en la expresión del gene Kn1 que regula la función de los meristemas (Pérez, 2007).

### **5.3 Proliferación de callo**

En la tabla 15 se presentan las características morfológicas de los callos utilizados identificándolos por su consistencia ya sea como callos compactos o friables, así como por su coloración, éstos se subcultivaron en los medios ya

utilizados por el Laboratorio de CTV, para cada especie realizandoló cada 15 días y se eliminó la mayor cantidad de tejido madre y callo oxidado. Se partió de 10 frascos por especie (3 g por frasco aprox.). Se estuvieron proliferando por alrededor de 5 meses para obtener la cantidad necesaria de biomasa.

Tabla 15: Características morfológicas de los callos de las diferentes especies

<b>Cultivo</b>	<b>Características del callo</b>	<b>Referencia</b>
Alfalfa	friable y color crema	Castañeda, 2003
Bouvardia	friable y color blanco	Lab.CTV
Capulín	Friable y color amarillo claro y rojo	Hammatt, 1998
Cilantro	friable y color verde	Lab. CTV
Frijol	friable y color crema	Perez, 2007
Mammillaria	compacto y color blanco y verde	Robles, 1999
Matarique	friable y color blanco	Hernández, 1991
Melón	friable y color verde	Ramos, 2006
Zanahoria	friable y color verde	Mere, 2003

De la figura 24 a la 41 se presentan los callos obtenidos tras la inducción de los mismos, aquí se pueden apreciar las características antes mencionadas en la tabla 7 de cada uno de ellos.



Figura 24: Callo Alfalfa 1



Figura 25: Callo Alfalfa 2



Figura 26: Callo Bouvardia 1.



Figura 27: Callo Bouvardia 2

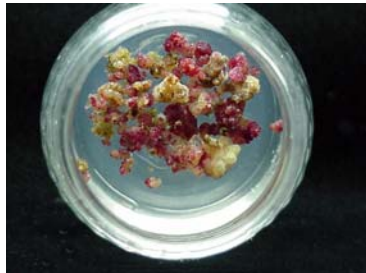


Figura 28: Callo Capulín 1

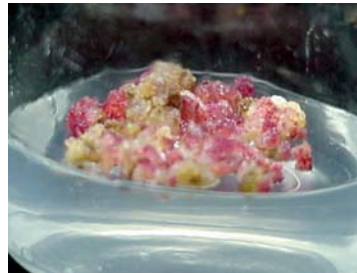


Figura 29: Callo Capulín 2



Figura 30: Callo Cilantro 1



Figura 31: Callo Cilantro 2



Figura 32: Callo Frijol 1



Figura 33: Callo Frijol 2

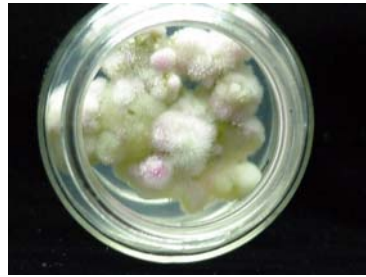


Figura 34: Callo Mammillaria 1    Figura 35: Callo Mammillaria 2



Figura 36: Callo Matarique 1    Figura 37: Callo Matarique 2



Figura 38: Callo Melón 1    Figura 39: Callo Melón 2



Figura 40: Callo Zanahoria 1    Figura 41: Callo Zanahoria 2

#### 5.4 Establecimiento de células en suspensión

Para el establecimiento de las células en suspensión se utilizó callo; todos los cultivos excepto el callo de mamillaria se disgregaron fácilmente obteniendo así un cultivo celular heterogéneo que presentaba fragmentos de callo dispersos en el medio, situación que se fue controlando por la subsecuente filtración de las células para permitir el paso sólo de las más pequeñas, haciendo el cultivo uniforme. En el caso del cultivo en suspensión de mamillaria se requirió el doble de tiempo para obtener unas células homogéneas, ya que su callo es compacto y duro presentando células íntimamente unidas. Finalmente estos cultivos se utilizaron para realizar las biotransformaciones de eugenoles y ácidos hidroxicinámicos.

Al iniciarse un cultivo en suspensión el comportamiento que presentó la población de células en crecimiento es típicamente sigmoide, igual que el crecimiento bacteriano. Durante la fase de reposo o latente el inóculo no presentó ninguna señal de división celular, ya que únicamente se estaban adaptando a las nuevas condiciones para posteriormente iniciar e incrementar la velocidad de la división celular durante las fases exponencial y lineal. En estas fases a medida que el crecimiento continuó, las células alcanzaron su tasa máxima de división, es decir, se encontraban jóvenes y biológicamente activas (Hernández, 1991). El callo en un medio líquido con agitación formó una suspensión compuesta de células libres y agregados celulares que varían desde muy pocas hasta cientos de células, dependiendo de su friabilidad.

El subcultivo fue necesario ya que el material celular llegó a una fase de saturación después de la cual ya no hay aumento en el número de células, el alto número de células determina que se vayan agotando los nutrientes del medio, los residuos tóxicos se acumulan, el pH se modifica, las células se obstaculizan mutuamente lo que provoca que la velocidad de división vaya disminuyendo (Pierik, 1990). El crecimiento puede expresarse cualitativamente (tabla 16), pues conforme

las células se multiplican se observó un aumento en la viscosidad y turbidez del medio de cultivo.

Tabla 16 : Crecimiento cualitativo de las células en suspensión

<b>Especie</b>	<b>Crecimiento</b>
Alfalfa	Disgregación rápida del callo, crecimiento abundante, poca oxidación, aumento de turbidez a los 3 días
Bouvardia	Disgregación rápida del callo, poca oxidación, crecimiento muy abundante, aumento de turbidez a los 2 días
Capulín	Disgregación media, poca oxidación, crecimiento abundante, aumento de turbidez a los 3 días
Cilantro	Disgregación media, poca oxidación, crecimiento abundante, aumento de turbidez a los 3 días
Frijol	Disgregación rápida, poca oxidación, crecimiento muy abundante, aumento de turbidez a los 3 días
Mamilaria	Disgregación lenta, poca oxidación, crecimiento lento aumento de turbidez a los 5 días
Matarique	Disgregación rápida, poca oxidación, crecimiento rápido aumento de turbidez a los 3 días
Melón	Disgregación media con algunos agregados, poca oxidación, crecimiento rápido aumento de turbidez a los 4 días
Zanahoria	Disgregación rápida, poca oxidación, crecimiento rápido aumento de turbidez a los 3 días

De las figuras 42 a la 50 se presentan las fotos del inicio de los cultivos en suspensión de las 9 especies trabajadas. En la figura 46 se aprecian las características deseables en el cultivo en suspensión, esto es, que no vean agregados celulares grandes, ya que se debe tener células homogéneas; que exista gran turbidez en el medio, lo que asegura un crecimiento rápido del cultivo; que no



se presente oxidación, para que el cultivo no muera y que no exista contaminación, ya que el cultivo debe ser aséptico (Olivera, 2003).

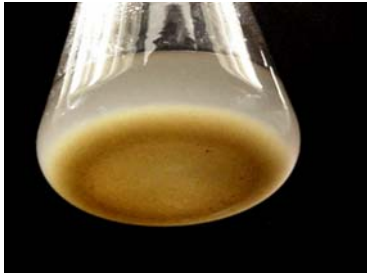


Figura 42: cs Alfalafa



Figura 43: cs Bouvardia

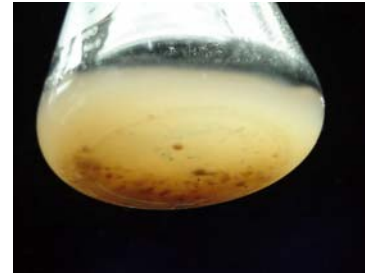


Figura 44: cs Capulín

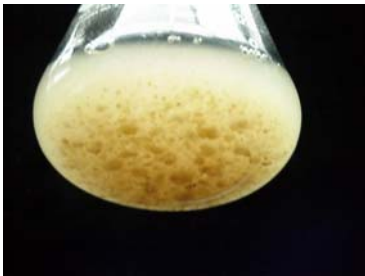


Figura 45: cs Cilantro

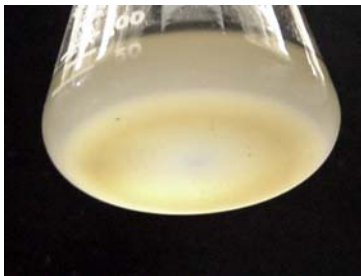


Figura 46: cs Frijol

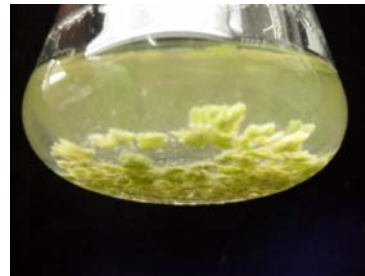


Figura 47: cs Mammillaria



Figura 48: cs Matarique

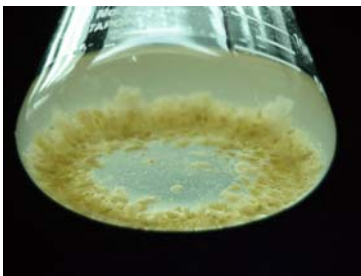


Figura 49: cs Melón



Figura 50: cs Zanahoria

El objetivo de dejar el callo crecer en un medio líquido con agitación fue el de obtener una suspensión de células libres, homogéneas en el mejor de los casos (Pérez M, 1999). Como ya se mencionó durante el cultivo hay un punto máximo de mitosis que es aproximadamente a los 7 días, por lo que el subcultivo se hizo en este momento al igual que la adición del sustrato. Se obtuvieron los cultivos en suspensión para posteriormente observar si existe diferencia entre su capacidad de biotransformación de los sustratos deseados con respecto a los callos.

## PARTE II: BIOTRANSFORMACIÓN

Los ensayos de biotransformación se realizaron usando como sustratos fenólicos eugenol (fig. 9), isoeugenol (fig. 11), ácido cumárico (fig. 7), ácido ferúlico (fig. 8). Se utilizaron como biocatalizadores nueve especies vegetales identificadas por las letras A-I, se realizó la bioconversión con los dos tipos de materiales celulares callos homogenizados y células en suspensión.

- |              |                |
|--------------|----------------|
| A. Alfalfa   | B. Bouvardia   |
| C. Capulín   | D. Cilantro    |
| E. Frijol    | F. Mammillaria |
| G. Matarique | H. Melón       |
| I. Zanahoria |                |

La biotransformación se realizó por adición del sustrato a la biomasa. Una vez terminada la biotransformación el análisis de la mezcla de reacción se llevo a cabo por cromatografía en capa fina (CCF). Para cada uno de los cultivos utilizados y con cada sustrato se realizaron testigos o blancos identificados con las letras A'-I' en los que no se adicionó sustrato. Al observar estos blancos en las CCF no presentaron formación de un producto nuevo. En todos los casos, estos blancos fueron utilizados como punto de referencia para observar la formación de los bioproductos.

### 5.5 Biotransformaciones Cualitativas

#### 5.5.1 Eugenol

Los resultados obtenidos por análisis de CCF de la biotransformación del eugenol utilizando como biocatalizadores los callos homogenizados de las diferentes especies estudiadas (A-I) se muestran en la figura 51, se adicionó al bis-eugenol, producto del acoplamiento orto-oxidativo del eugenol como referencia en el último carril. Éste fue sintetizado por el método descrito por Alatorre, 2001. Los resultados

obtenidos permitieron observar que todos los cultivos transformaron al eugenol y que sólo los cultivos de capulín, frijol y matarique consumieron todo el sustrato, ya que estos no mostraron mancha alguna en la posición del eugenol. Los blancos usados en su mayoría no presentaron ningún compuesto detectable con excepción de capulín y frijol, sin embargo estos compuestos no afectaron la identificación de los bioproductos. Para todos los cultivos probados se obtuvo un producto mayoritario que resultó ser el mismo en todos los casos, el bis-eugenol. Para frijol al ser la intensidad de la mancha mayor al resto de los cultivos permitió inferir que la cantidad de producto obtenido fue mayor a la que presentaron las otras especies. Y el que presentó menor conversión fue capulín ya que su mancha en la CCF fue la de menor intensidad, lo que permitió inferir que el sustrato fue transformado a otros compuestos no detectados bajo las condiciones de CCF realizada.

Estos resultados indican que los cultivos (A-I) fueron capaces de transformar sustratos oxidables; en todos los casos los cultivos utilizados realizaron el acoplamiento orto-oxidativo, ya que como se observó hubo presencia de bis-eugenol, producto de este tipo de reacciones.

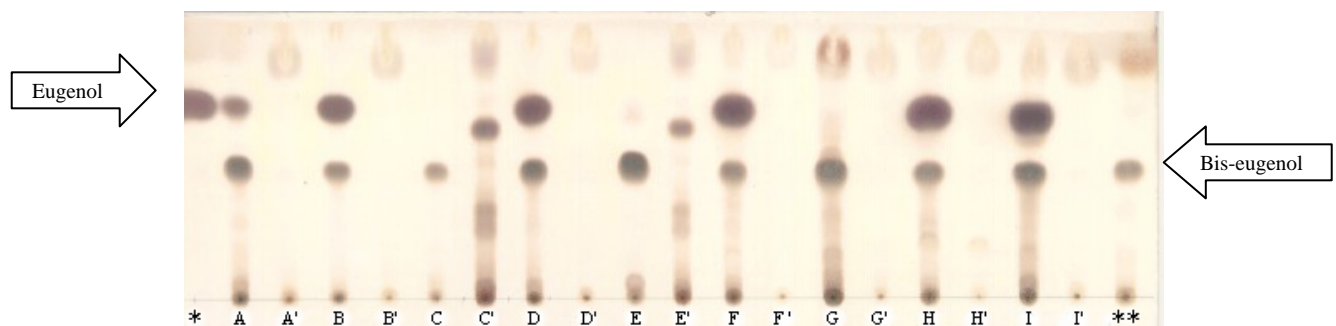



Figura 51: Biotransformación de eugenol por callo homogenizado

En la fig 52 se presentan los resultados de la biotransformación de eugenol utilizando cultivos en suspensión (cs) para las mismas especies. Los resultados mostraron que en los cultivos de capulín y matarique el sustrato fue consumido totalmente, mostrando un comportamiento similar a los cultivos de callo de dichas



especies; frijol fue consumido totalmente en cc y no en cs, lo que mostró que sí existe diferencia en el comportamiento de los cultivos dependiendo del cultivo celular, esto se puede deber a que se modifica el comportamiento de algunas enzimas por el grado de diferenciación en el cultivo. Todos los cultivos utilizados realizaron la biotransformación del sustrato dando un solo producto, excepto capulín en el cual se presentó una mancha muy tenue a la altura del eugenol, pero sí consumió totalmente el sustrato, mostrando un comportamiento similar al de cc, hubo biotransformación de eugenol pero no se detectaron los bioproductos en la CCF, lo que demostró que sus enzimas son capaces de transformar sustratos oxidables y llevar a cabo otro tipo de reacciones.

Dicha biotransformación se realizó por acoplamiento orto-oxidativo, ya que se observó la presencia del bis-eugenol. También se apreció que el cultivo que presentó mayor transformación fue el de frijol ya que la intensidad de la mancha en la posición del bis-eugenol fue mayor que en las demás especies; y el cultivo con menor conversión fue el de mammillaria. Tanto frijol como capulín presentaron un comportamiento similar para la transformación del sustrato en cultivos en callo homogenizado y células en suspensión ya que frijol fue el cultivo que presentó mayor transformación y el de capulín fue el de menor conversión. Para las demás especies se presentó un comportamiento similar en ambos cultivos (callo y suspensión), se observó la conversión del sustrato sin diferencias en las intensidades de sus manchas dentro de la CCF. Los cultivos de mammillaria, melón y zanahoria tanto en cc como en cs mostraron el mismo comportamiento ya que consumieron poco eugenol.

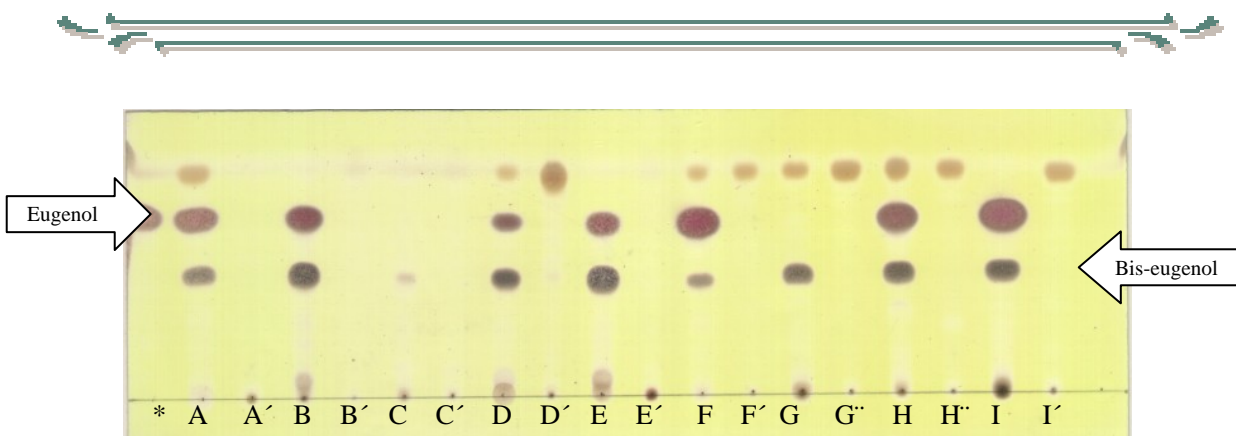


Figura 52: Biotransformación de Eugenol por células en suspensión

### 5.5.2 Isoeugenol

En la transformación de isoeugenol con callos homogenizados de las especies A-I, figura 53, se observó que todos los cultivos transformaron al sustrato, incluso lo consumieron por completo a excepción de mammilaria. Los blancos usados en su mayoría no presentaron ningún compuesto detectable con excepción de capulín y frijol, sin embargo estos compuestos no afectaron la identificación de los bioproductos. Para todos los cultivos probados se obtuvo un producto mayoritario que resultó ser el bis-isoeugenol; presentando incluso intensidades similares. Además se observó la presencia de varios bioproductos para cada una de las especies.

Al encontrar el dímero de isoeugenol se demostró que todos los cultivos llevan a cabo reacciones de acoplamiento oxidativo. Para frijol y bouvardia se presentó la mayor intensidad de la mancha lo que permitió inferir que la cantidad de producto obtenido para este cultivo fue mayor a la que presentaron los otros. Los demás cultivos presentaron una conversión similar, ya que su mancha en la CCF fue de la misma intensidad.

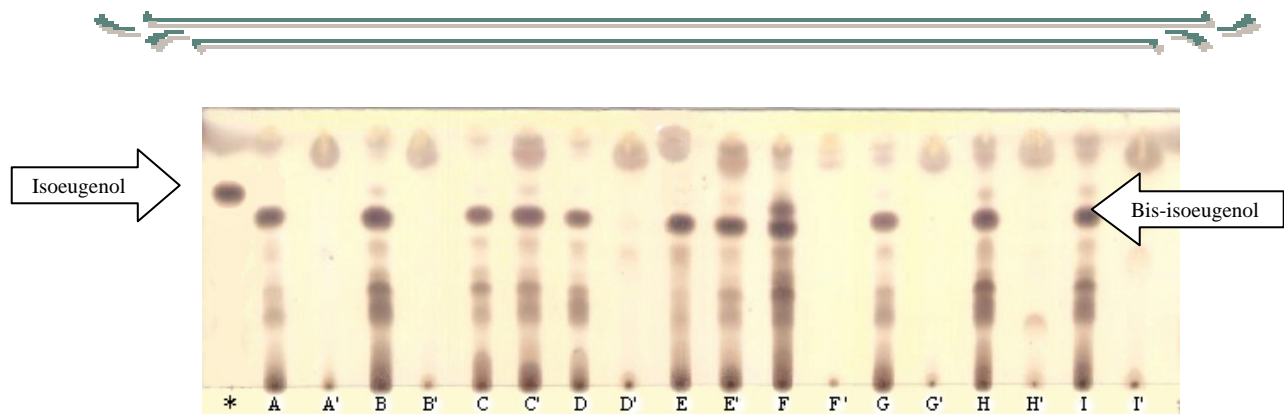


Figura 53: Biotransformación de Isoeugenol por callo homogenizado

Para la conversión de isoeugenol con células en suspensión (Figura 54) se observó que el sustrato no fue consumido totalmente por mammillaria y melón, en los demás casos se consumió completamente, presentando variación con los callos ya que en éstos melón si consumió todo el sustrato. Todos los cultivos utilizados realizaron la biotransformación del sustrato dando más de un producto, a excepción de capulín que sólo mostró uno, lo que indica que éste fue más selectivo, pero sólo en cultivos en suspensión, ya que en callo si presentó varios productos, lo que indica que si existen diferencias debidas al tipo de cultivo ya sea por su nivel de diferenciación o por el estrés que soportaron.

Los cultivos presentaron un producto mayoritario que fue el mismo en todos los casos, dicho producto fue el dímero del isoeugenol producto de reacciones de oxidación. También se observó que el cultivo que presentó mayor biotransformación fue el de bouvardia y frijol ya que la intensidad de las manchas en la posición del bis-eugenol fue similar y mayor que en las demás especies y el cultivo con menor conversión fue el capulín. Para cs se observó que se llevó a cabo la biotransformación de una manera diferencial ya que las manchas obtenidas presentaron intensidades distintas de producto, mientras que en cc no se presentó esta diferencia. Posiblemente se debió a las distintas condiciones de crecimiento de las células, así como a su etapa de crecimiento.

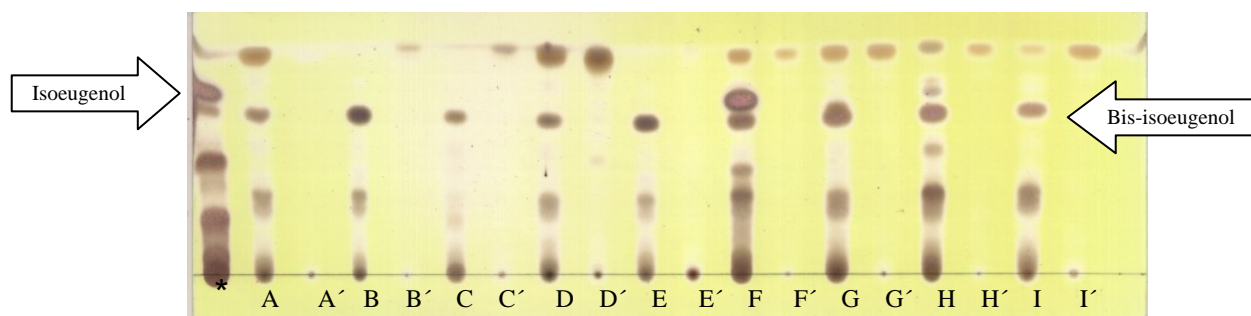


Figura 54: Biotransformación de Isoeugenol por células en suspensión

Se ha reportado la oxidación del isoeugenol con peroxidasas de rábano adicionadas con peróxido de hidrógeno y puestas a temperatura ambiente por 25 hrs, produciendo un dímero producto del acoplamiento (Fig. 55) del grupo fenol y el carbono orto de un compuesto con la cadena lateral propenil de la segunda molécula del sustrato con un 19% de rendimiento (krawczyk, 1991). Los resultados mostraron que las peroxidasas de los cultivos vegetales estudiados también son capaces de llevar a cabo este tipo de reacciones, además de algunas otras ya que se presentan varios productos en la transformación del sustrato; se tendría que hacer una caracterización e cada uno de ellos así como su cuantificación.

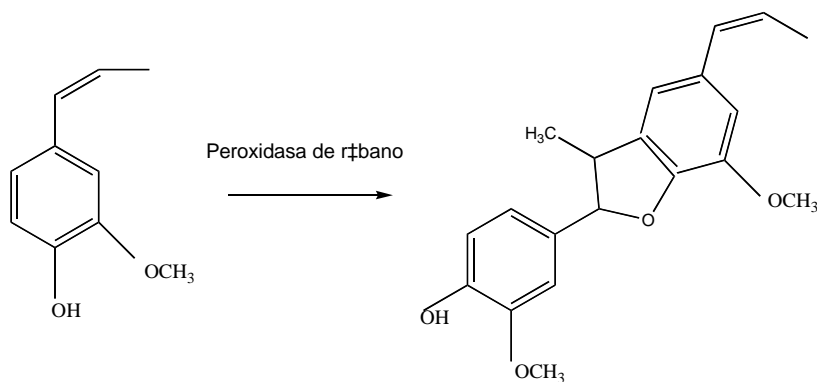


Fig. 55: Biotransformación de isoeugenol a bis-isoeugenol por Peroxidasas de rábano.

### 5.5.3 Ácido cumárico

La CCF del ácido cumárico para callos homogenizados, figura 56, mostró que todos los cultivos llevaron a cabo la conversión del sustrato y que todos lo consumieron totalmente; se observó la presencia de varios bioproductos para cada una de las especies, encontrando un producto mayoritario, que no fue el mismo en todos los casos.

El cultivo que mostró menor biotransformación en este caso fue cilantro ya que presentó manchas muy tenues en la CCF; mientras que los cultivos bouvardia, mammallaria, matarique, melón, zanahoria tuvieron un comportamiento similar en la conversión del sustrato; el cultivo capulín mostró una mejor conversión, ya que su carril sólo presentó dos productos que tuvieron manchas bien definidas y de intensidad considerable. Estos resultados indican la predilección de los cultivos (A-I) por sustratos oxidables, ya que en todos los casos los cultivos utilizados realizaron la conversión de éste.

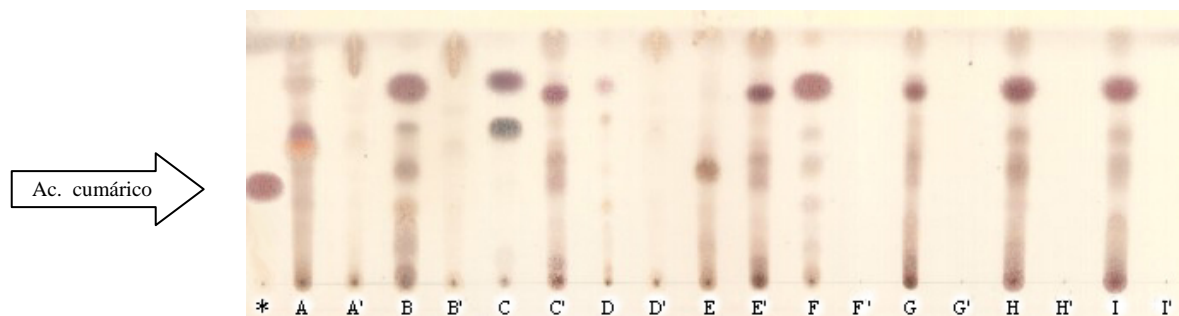


Figura 56: Biotransformación de Ácido cumárico por callo homogenizados

En la conversión de ác. cumárico con células en suspensión de A-I (Figura 57) se observó que todos los cultivos llevaron a cabo la transformación de dicho sustrato, excepto para cilantro y zanahoria los cuales no presentaron manchas observables en la CCF, pero si consumieron el sustrato; mostrando diferencias con los cc ya que para cilantro y zanahoria si presentaron conversión. Así mismo se observó que cada especie tuvo un producto mayoritario que no fue el mismo en



todos los casos, al igual que ocurrió con los cc. El cultivo que presentó una mejor conversión fue alfalfa ya que presentó una sola mancha intensa en la cromatografía; mientras que bouvardia, capulín, frijol, mammillaria, matarique y melón tuvieron el mismo comportamiento de conversión en cuanto a productos y mostraron un rendimiento de transformación diferente puesto que la intensidad de las manchas cambió. Hubo una marcada diferencia en el comportamiento de capulín y frijol, capulín realizó la transformación a dos productos muy bien definidos en cc, que no fueron los mismos que se obtuvieron en suspensión; con respecto a frijol ocurrió lo mismo, en cc se mostró la presencia de un producto bien definido el cual no correspondió a los observados en suspensión.

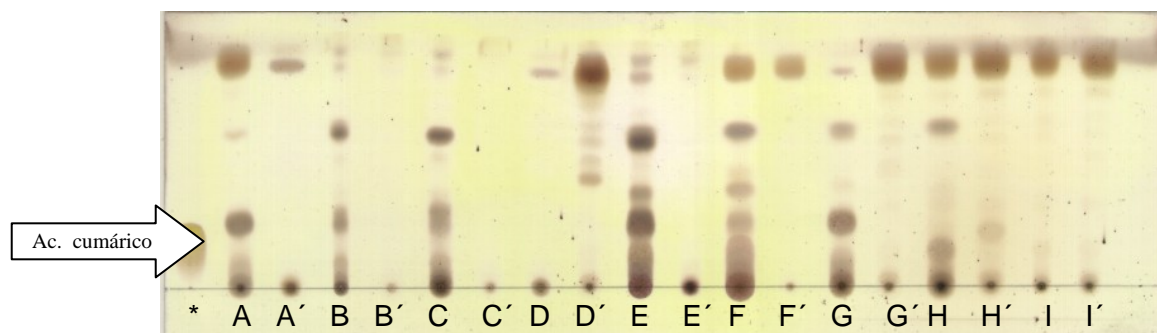


Figura 57: Biotransformación de Ácido cumárico por células en suspensión

#### 5.5.4 Ácido ferúlico

En los resultados de la biotransformación de ácido ferúlico con callo homogenizado de A-I (figura 58) se observó que todos los cultivos llevaron acabo la transformación del sustrato; que bouvardia, cilantro, melón y zanahoria, no lo consumieron por completo. Y que al igual que el ácido cumárico hubo presencia de varios bioproductos para cada una de las especies, encontrando un producto mayoritario, el cual no fue el mismo en todos los casos. Hubo cultivos que no presentaron biotransformación como capulín, frijol y matarique, puesto que no aparecieron manchas en la CCF, o en su defecto fueron muy tenues; mientras que alfalfa, bouvardia, cilantro, mammillaria, melón y zanahoria sí presentaron transformación; bouvardia, cilantro, melón, zanahoria, presentaron un

comportamiento similar de transformación en cuanto a productos pero no en cuanto a rendimientos. Estos resultados indican que los cultivos (A-I) fueron capaces de utilizar sustratos oxidables, como el sustrato, ya que tienen la maquinaria enzimática.

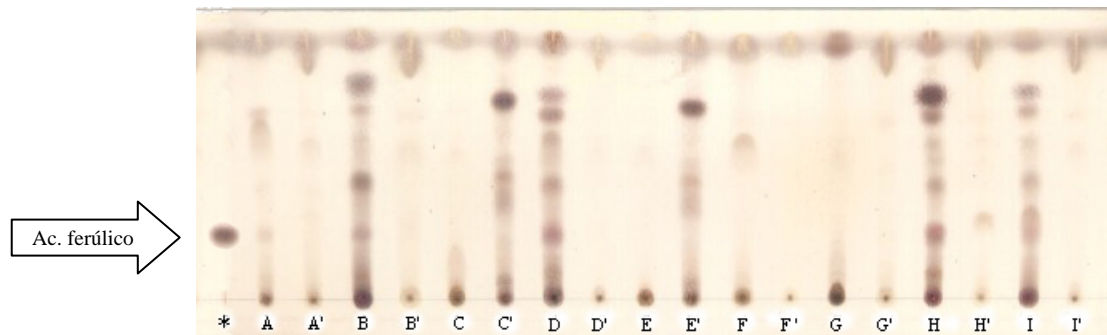


Figura 58: Biotransformación de Ácido ferúlico por callo homogenizado

Para la transformación de ác. ferúlico con células en suspensión (Figura 59) se observó que todos los cultivos A-I realizaron la transformación del sustrato ya que éste fue consumido por todas las especies. En los cultivos bouvardia, mammillaria, zanahoria hubo presencia de varios bioproductos en cada especie, encontrándose un producto mayoritario que fue el mismo en todos los casos. Así mismo mammillaria y zanahoria presentaron las mismas manchas en la CCF, mientras que en la CCF alfalfa, capulín, frijol, matarique y melón no presentaron biotransformación observable. Al comparar estos resultados con los obtenidos en callos, se observó que no tuvieron el mismo comportamiento, a excepción de capulín que fue negativo en ambos casos. Para los cultivos bouvardia, cilantro, melón en callo se tuvieron muchos productos de conversión mientras que en cs cilantro y melón no presentaron ninguna mancha en la CCF, y bouvardia sólo mostró una mancha.

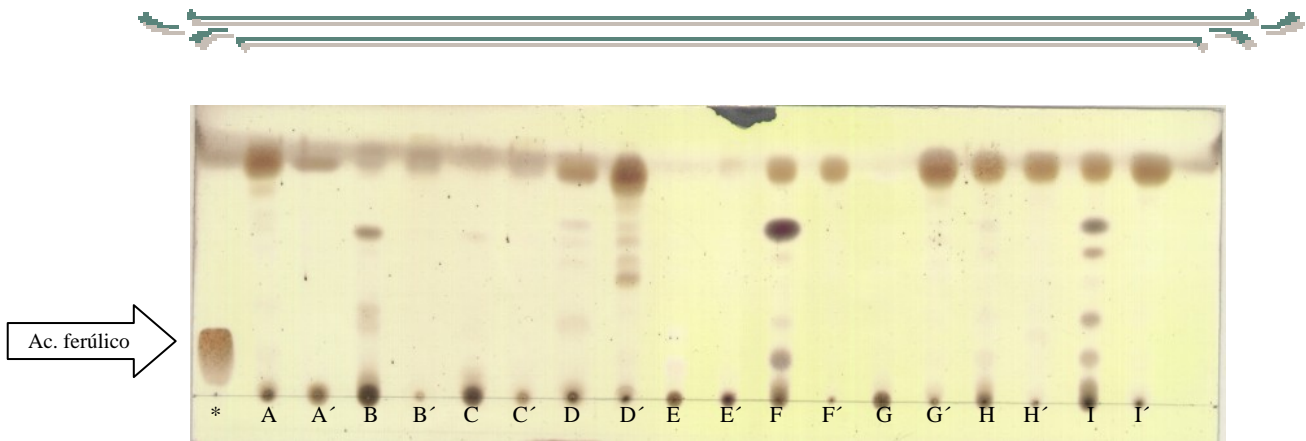


Figura 59: Biotransformación de Ácido ferúlico por células en suspensión

CCV han sido evaluadas para la transformación de el ácido férulico a vainillina uno de los sabores más consumidos por la industria, entre estos cultivos tenemos a *Capsicum Frutescens*, *C. arabica*, *Va. planifolia*, entre otras (Archana, 2001), pero la reacción de acoplamiento oxidativo del ácido férulico ha sido poco estudiada para CV. Esta reacción es importante ya que la dimerización de compuestos del tipo del ác. férulico afecta la capacidad antioxidante, siendo esta dependiente de la posición del enlace entre monómeros. Distintos diferulatos se han identificado en la pared celular de diversas especies vegetales y cada uno muestra diferente actividad (Williamson, 1999).

El único dímero de ácido férulico que se ha preparado sintéticamente vía peroxidasas es el 5-5' además de que es en esta posición en la que se encuentra esterificado. Pero al observar las CCF del ác. férulico se observó una serie de bioproductos así que se puede suponer la presencia de otros dímeros como el 4-O-8', 5-O-8', 8-5' y 8-8' (Li Ou, 2003). También se ha reportado la transformación de ác. férulico por cultivos de *P. trinervia cav*, *M. Huitzilopochtli* y *D. carota* al 12, 12 y 9% de biotransformación respectivamente a compuestos diméricos (Alatorre, 2001).

En la tabla 17 se muestra el comportamiento de biotransformación de los cultivos usando los diferentes sustratos, es decir, si presentaron o no biotransformación observable en la CCF.


Tabla 17: Biotransformación cualitativa de varios sustratos llevados a cabo por diferentes cultivos celulares.

Biocatalizador	EUGENOL		ISOEUGENOL		ÁC. CUMÁRICO		ÁC. FERÚLICO	
	Callo	Suspensión	Callo	Suspensión	Callo	Suspensión	Callo	Suspensión
Alfalfa	+	+	+	+	+	-	+	-
Bouvardia	+	+	+	+	+	+	+	+
Capulín	+	+	+	+	+	+	-	-
Cilantro	+	+	+	+	+	-	-	+
Frijol	+	+	+	+	-	+	+	-
Mammillaria	+	+	+	+	+	+	-	+
Matarique	+	+	+	+	+	+	+	-
Melón	+	+	+	+	+	+	+	-
Zanahoria	+	+	+	+	+	-	+	+

(+) realizó biotransformación (-) no realizó biotransformación

Ya se ha mencionado que las enzimas responsables de reacciones de acoplamiento oxidativo son las peroxidasas y estas han sido reportadas en varios cultivos vegetales como *N. Tabacum*, *Monstera deliciosa*, *Theobromacacao*, *Coffea arabica*, *Cocus mucifera*, *Cyphomandra betacca* (I Yu, 1999), *Dacus carota* (Mere, 2003), *Cassia sp* (Flores, 2004), *Hippocraea excelsa* (Herrera, 2001), entre otras. De igual manera se ha reportado que la actividad de la peroxidasa varía ampliamente de una especie a otra, incluso de su grado de madurez y del órgano que se trate (I.Yu, 1999). Lo que explica el comportamiento observado en los cultivos utilizados, es decir, porque algunas especies muestran mayor transformación que otras.

Así como que el patrón de los compuestos producidos es más complejo en callo con diferenciación que en un tejido completamente desdiferenciado (Herrera, 2001) como son las células en suspensión; por lo tanto los cultivos de callo fueron más productivos que los cs para el mismo sustrato; esto se hizo muy evidente para la biotransformación del ácido ferúlico en cs ya que en la CCF no se presentó conversión para todas las especies, incluso se obtuvo un mayor número de compuestos en la biotransformación para los cultivos de callo homogenizado; del mismo modo se observó este comportamiento en ác. cumárico. Lo que mostró que el tipo de cultivo sí influye para la transformación del sustrato. Esto abre un amplio



panorama de investigación ya que la mayor parte de las especies vegetales no han sido estudiadas ni biológica ni químicamente para su uso como catalizadores de reacciones de oxidación.

Con estos resultados se decidió realizar la cuantificación para la transformación del eugenol, debido a que fue en este en donde se observó un mayor porcentaje de transformación y fue el que presentó un sólo producto de transformación.

## **5.6 Biotransformaciones Cuantitativas**

### **5.6.1 Eugenol**

Se realizó la cuantificación de la biotransformación con los dos tipos de materiales celulares callos homogenizados y células en suspensión. Para realizar la cuantificación de los productos se utilizaron 2 curvas patrón, la del eugenol y la del bis-eugenol gráfica 1 y 2 respectivamente (Ver Anexos). La cantidad del producto en cada uno de los cultivos se calculó mediante la extrapolación de los datos obtenidos en cada una de las inyecciones (se realizaron 3 inyecciones de cada cultivo por duplicado) con los datos de las curvas ajustadas mediante regresión lineal. Se realizaron los cálculos correspondientes obteniéndose la concentración tanto de los mg de eugenol no transformado (Tabla 18) como mg del biseugenol producido (Tabla 19) en estas tablas se muestran los valores obtenidos en cada muestra tratada. Mientras que en la tabla 20, sólo se muestra el promedio de cada especie en cuanto a su rendimiento de transformación para bis-eugenol y el por ciento de sustrato no consumido.

Una fuente de dímeros de eugenol es el cultivo vegetal (Fig 60), el cual proporciona condiciones de reacción más suaves que los métodos convencionales.

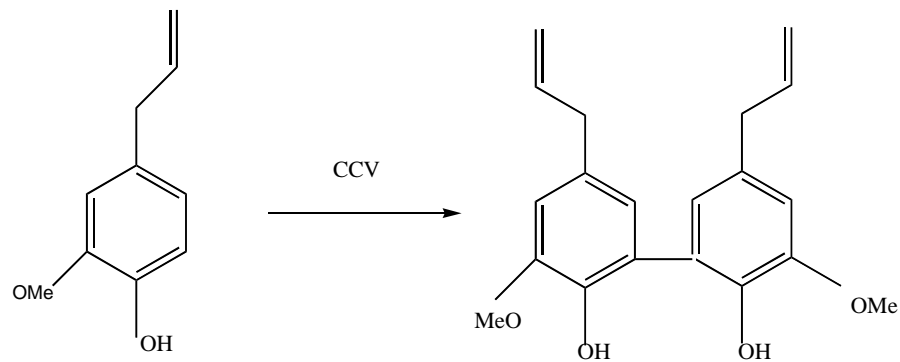


Fig 60: Biotransformación de eugenol a bis-eugenol por CCV

Tabla 18: Cuantificación en mg de eugenol no transformado

Cultivo		mg de eugenol residual en callo	mg de eugenol residual en cs
Alfalfa	1	9.6	22.4
	2	9.0	22.1
	3	9.2	22.3
Bouvardia	1	18.5	17.3
	2	18.0	17.1
	3	18.2	17.9
Capulín	1	5.8	0.5
	2	5.5	0.4
	3	5.6	0.4
Cilantro	1	16.0	7.7
	2	15.8	7.4
	3	16.2	7.6
Frijol	1	1.1	7.6
	2	1.3	7.4
	3	1.0	7.7
Mamilaria	1	29.5	35.5
	2	29.4	34.7
	3	29.0	35.0
Matarique	1	0.2	0.6
	2	0.1	0.5
	3	0.2	0.8
Melón	1	19.8	18.8
	2	20.0	19.0
	3	19.7	18.4
Zanahoria	1	17.6	32.5
	2	17.3	30.1
	3	17.0	31.1



Tabla 19: Cuantificación en mg de la transformación a biseugenol

<b>Cultivo</b>		<b>mg de biseugenol/ 10 g callo</b>	<b>mg de biseugenol / 10 g células en suspensión</b>
Alfalfa	1	15.409	5.833
	2	15.408	5.890
	3	15.459	5.900
Bouvardia	1	11.480	14.31
	2	12.250	14.50
	3	11.650	15.02
Capulín	1	1.306	0.136
	2	1.320	0.147
	3	1.347	0.139
Cilantro	1	5.594	14.35
	2	5.710	14.29
	3	5.605	14.09
Frijol	1	12.570	10.97
	2	12.236	10.53
	3	12.460	10.46
Mamilaria	1	1.673	0.767
	2	1.504	0.696
	3	1.514	0.737
Matarique	1	2.388	1.958
	2	2.492	1.949
	3	2.336	1.781
Melón	1	2.133	4.978
	2	2.022	4.918
	3	1.808	4.970
Zanahoria	1	1.803	4.329
	2	2.005	4.593
	3	1.896	4.444

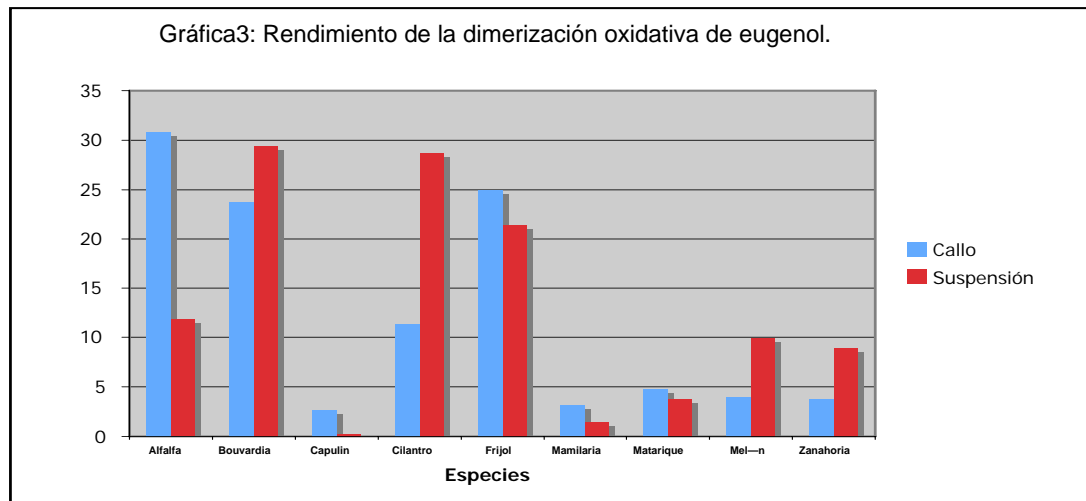


Tabla 20: Porcentajes de la transformación cuantitativa

Cultivo	% EUGENOL NO TRANSFORMADO		% BISEUGENOL FORMADO	
	Callo	Suspensión	Callo	Suspensión
Alfalfa	18.53	44.53	30.90	11.82
Bouvardia	36.46	34.86	23.73	29.41
Capulín	2.81	0.86	2.66	0.28
Cilantro	32.00	15.13	11.34	28.67
Frijol	2.26	15.33	24.99	21.44
Mammillaria	58.6	70.1	3.14	1.47
Matarique	0.33	1.26	4.84	3.81
Melón	39.66	37.46	4.00	9.96
Zanahoria	34.60	62.46	3.82	8.96


Los cultivos de callo que presentaron un buen rendimiento fueron alfalfa, bouvardia y frijol mientras que los de menor conversión fueron capulín, mamillaria y matarique. Para los cultivos en suspensión cilantro, bouvardia y frijol presentaron mayor transformación y los que mostraron menor conversión mamillaria y capulín. A pesar de que el rendimiento de algunas de las especies tratadas no fue muy alto se corrobora la presencia del dímero del eugenol; lo que indicó que todos los cultivos estudiados son capaces de realizar la dimerización oxidativa del eugenol. Al igual que en los resultados cualitativos se mostró una diferencia en el comportamiento entre especies y entre callo y células en suspensión (Gráfica 3). El pobre rendimiento en la formación del bis-eugenol pudiera deberse a una baja concentración de la enzima en el cultivo, o bien que existiera una relación de concentraciones muy diferente entre enzima y sustrato.





Como se observó en la gráfica 3 los resultados de la cuantificación de la biotransformación fueron muy variados. Se presentaron rendimientos entre el 0.28% hasta el 30.9% como ya se mencionó esto se debió a que los cultivos vegetales presentan actividades de peroxidasa diferentes de acuerdo a su especie (I Yu,1999); mientras que las diferencias en el tipo de cultivo callo o suspensión mostraron diferencia debido a que el medio líquido introdujo un gran cambio ambiental, el cual se vio reflejado en una modificación de la actividad enzimática, en este caso mayor actividad de las peroxidasas (Masumi, 2002) quizá debido al aumento de estrés que tienen que soportar las células en suspensión. Ya se había mencionado que los cambios ambientales son muy importantes para el desarrollo del cultivo (Hurtado, 1994, Archana, 2001, Flores, 2001).

Los resultados mostraron que los callos de alfalfa, capulín, mamillaria y matarique presentaron un rendimiento de transformación mayor que en suspensión, incluso mayor del 100%. Mientras que para cultivos de bouvardia, cilantro, frijol, melón y zanahoria la conversión fue mayor en suspensión; para cilantro, melón y zanahoria presentaron casi el doble de producto que en callo; esto pudo deberse a que la cantidad de peroxidasas presentes en estos cultivos fuera mayor por el estrés que presentan.




Para *mammillaria* podrían esperarse mejores resultados con una lisis mayor del material celular, ya que como se mencionó fue difícil de homogenizar. Aunque al parecer al igual que capulín sus enzimas prefirieron transformar el sustrato en otro compuesto que no fue el dímero esperado producido por el acoplamiento oxidativo.

Se ha reportado la presencia de peroxidasas en cultivos en suspensión de zanahoria (*Dacus carota*) y de Mamilaria (*M. huitzilopochtli*) pero no se encontraron reportes de la presencia de éstas en las demás especies estudiadas, pero como se mencionó los datos obtenidos en este trabajo mostraron que las especies utilizadas contienen peroxidasas, ya que llevaron a cabo la dimerización del eugenol. Tampoco se tenían reportes de su utilización como fuente de peroxidasas para el acoplamiento oxidativo, excepto para zanahoria y *mammillaria*. Además de *Capsicum annum*, *P. trinervia* que también reportaron síntesis de dímeros por peroxidasas presentes en el cultivo vegetal (Alatorre, 2001).

Entre los pocos reportes que se tienen con CV en el acoplamiento oxidativo están. La peroxidasa de rábano catalizan el enlace C-C con dibencilbutanolidos cerrando anillos produciendo lignanos los cuales son intermediarios para la síntesis de compuestos antitumorales (Masumi, 2002). De igual manera la incubación de células en suspensión de *Catharanthus roseus* con dibencilbutanolidos llevan a cabo el acoplamiento oxidativo de estos compuestos a análogos de picropodofilotoxinas que es un precursor de un medicamento anticancer (Archana, 2001).

El acoplamiento oxidativo ha sido usado recientemente para sintetizar dímeros derivados de naftol, tirosina, hidroxifenilglicina, eugenol y alcoholes coniferilicos con rendimientos satisfactorios (Tzeng, 2004)). Sin embargo no hay muchos reportes que hablen del potencial de los cultivos vegetales para llevar acabo esté tipo de reacciones. Los ensayos con CCV que se han realizado utilizando el eugenol como precursor, han sido orientados a glicosidarlos en el grupo hidroxilo



(Orihara, 1992) y no a su utilización como catalizadores de reacciones de oxidación. Compuestos heterocíclicos como: alcaloides, glicopéptidos o ciclopéptidos (Dhingra, 1982), así como la dimerización de compuestos como flavonoides e hidroxicinamatos (Willianson, 1999) son sintetizados gracias a la formación de enlaces C-C o C-O que catalizan este tipo de enzimas. Por lo que es importante establecer que tipo de cultivos son capaces de realizar de una manera eficiente éste tipo de reacciones, para de esta manera encontrar en un futuro una aplicación real de estos cultivos y/o sus enzimas.

Y de igual forma se ha reportado (Evans, 2003, Kohji, 2003) que dímeros de ác. ferúlico y eugenol presentan una mayor actividad antioxidante que es de gran importancia en la química de los aditivos alimentarios. La mayor actividad antioxidante del biseugenol frente al eugenol puede deberse a la presencia de dos átomos de O por mol, además de la presencia de dos anillos bencénicos, que vuelve a la molécula más estable en la dislocación del radical que genera la peroxidación; además que la presencia de un grupo sustituyente grande en posición orto con respecto al grupo hidroxilo es importante en su acción antioxidante (Anderasen, 1999).

El mecanismo por el cual ocurre el acoplamiento oxidativo del eugenol utilizando CCV, sugiere un mecanismo de deslocalización electrónica (fig 61) comenzando con la formación del radical O• del grupo hidroxilo, a partir de la acción de la peroxidasa. Esto ocasiona la dislocación electrónica que se estabiliza dentro del fenilo, provocando distintas estructuras de resonancia. Una posee un radical C• en el C<sub>5</sub> del anillo(B), el cual se puede estabilizar al compartir el electrón libre de otra estructura tipo B, formando así el enlace 5-5' que da pie a la dimerización.

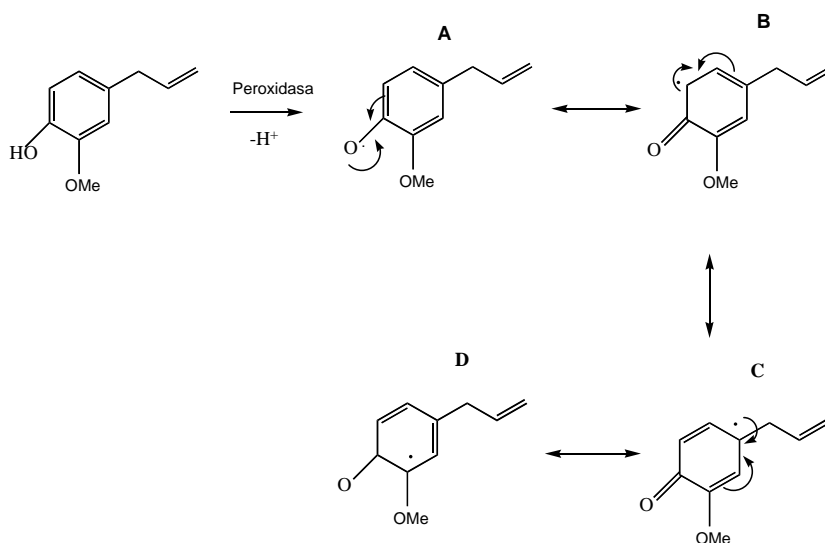


Fig 61: Mecanismo de deslocalización electrónica para la formación de bis-eugenol.

Posteriormente, por efecto electroatractor de los átomos de O en posición orto al nuevo enlace, el par electrónico de enlace del C<sub>5</sub> es atraído hacia el anillo, formando de nueva cuenta un anillo bencénico. Los átomos de O enlazados al C<sub>4</sub> del anillo vuelven a formar un grupo hidroxilo al formar un enlace con los hidrógenos que habían quedado como protones dentro del medio de reacción (fig 62).

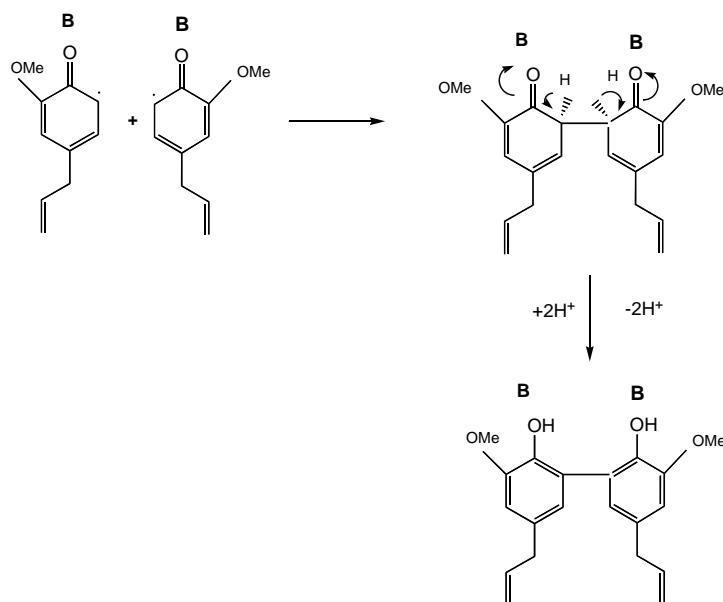




Fig 62: Formación de bis-eugenol a partir de radicales de eugenol.



Con respecto a las ventajas que presenta la transformación con células vegetales en la formación del bis-eugenol a partir del eugenol, frente a la síntesis química tradicional que consiste en oxidar al eugenol disuelto en piridina, con una mezcla de agua oxigenada y sulfato férrico; a una temperatura de 60°C por 24hrs, el producto se extrae con AcOEt y se recristaliza con etanol (Ogata, 2000); podemos mencionar que este proceso requiere de más pasos en la formación del dímero, que el realizado con CV. Además de llevarse a cabo en condiciones más suaves y no tóxicas. La síntesis química presenta un 35.6% de rendimiento, que en comparación con los obtenidos por CV es menor, excepto para alfalfa que fue de 30.9%, pero estos resultados son alentadores ya que los rendimientos obtenidos son buenos; aunado a que se necesita optimizar el sistema en general.

Por otro lado se ha estudiado la dimerización oxidativa del eugenol por medio de peroxidasa de rábano y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 25 hrs, dando como resultado la obtención del bis-eugenol con un rendimiento del 22% (Krawczyk, 1991) lo que indica que el CCV si puede ser un buen método de síntesis de este tipo de compuestos; ya que en este trabajo se obtuvieron rendimientos mayores a los reportados por peroxidasa de rábano. También se han realizado estudios del isoeugenol con peroxidasas de rábano, produciendo su oxidación y dimerización. Lo que demuestra que las especies vegetales pueden ser establecidas como un eficaz biocatalizador para reacciones de oxidación, por dimerización con sistemas fenólicos.

Los resultados obtenidos mostraron que la biotransformación con células vegetales para la dimerización de eugenol fue satisfactoria y que es un buen sistema para la producción de dicho compuesto a pesar de no ser mayor en rendimiento que la síntesis química, éste se puede optimizar para los cultivos de alfalfa, bouvardia, cilantro, frijol ya que son los que presentan mayor conversión; por varias técnicas, como mejorar el método de extracción, minimizar perdidas, seleccionar cultivos sobreproductores, adicionándoles un elicitor, incluso poniendo las células en estrés.



Ya que en la actualidad los aditivos alimentarios y medicamentos de mayor auge y relevancia están siendo los de origen biológico, por los menores efectos adversos que presentan sobre el medio ambiente, en este sentido es importante, poder ampliar los resultados aquí obtenidos, pues serán de vital interés para evaluar completamente la posibilidad de utilizar a los cultivos vegetales como catalizadores de reacciones de dimerización oxidativa en un futuro cercano. Y así diversificar las fuentes de este tipo de reacciones. Incluso se esperaría poder aislar las peroxidasas de cada uno de los cultivos y caracterizarlas. Ya que su uso como catalizadores en sistemas orgánicos son limitadas por su disponibilidad, estabilidad y baja productividad.

## VI. CONCLUSIONES

- ❖ La germinación de semillas de zanahoria para la obtención de explantes, se logró después de utilizar etanol al 70% y una mezcla de microdyn, tween 20 y NaClO<sub>2</sub>. En medio MS suplementado con sacarosa al 3% e incubado a 25 +/- °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.
- ❖ La germinación de semillas de capulín para la obtención de explantes, se logró después de escarificar las semillas seguido de un baño en hipoclorito de sodio al 30% con tween y mycrodyn. En medio MS suplementado con sacarosa al 3% e incubado a 25 +/- °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.
- ❖ Se estableció y prolifero callo friable de zanahoria tomando como explantes los pecíolos. Se sembró en medio MS modificado, suplementado con adenina, BAP, MCPP, antioxidante y sacarosa al 3%.
- ❖ Se estableció y prolifero callo friable de capulín tomando como explantes los pecíolos; sembrados en medio MS adicionado con 2,4-D, antioxidante y sacarosa al 3%.
- ❖ Se logró establecer las células en suspensión de cada una de las nueve especies trabajadas de manera satisfactoria utilizando los mismos medios que su respectivo callo, pero sin la adición del gelificante.
- ❖ Tanto las células de callo como las de suspensión de alfalfa, bouvardia, capulín, cilantro, frijol, mammillaria, matarique, melón y zanahoria realizaron la transformación oxidativa de eugenol, isoeugenol, ácido cumárico y ácido ferúlico.
- ❖ Existe diferencias en la capacidad de biotransformación para las reacciones de oxidación entre los cultivos de callo y suspensión.




- ❖ Para eugenol e isoeugenol se llevo a cabo el acoplamiento oxidativo en todos los cultivos celulares de callo y células en suspensión.
  
- ❖ El callo que resultó ser el mayor biocatalizador en reacciones de dimerización oxidativa fue el de alfalfa con rendimiento del 30.90%. Mientras que el de menor transformación fue capulín con un 2.66% de rendimiento.
  
- ❖ El cultivo en suspensión que presentó mayor oxidación dimérica para eugenol fue bouvardia con un 29.41% de rendimiento, mientras que el cultivo con menor conversión fue capulín con un 0.28%.
  
- ❖ Los cultivos de células vegetales resultaron ser buenos catalizadores de reacciones de oxidación.





## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alatorre S. Biotransformación de ácido ferúlico y eugenol con cultivos de células vegetales. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2001**.
2. Álvarez, A. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed.Trillas, México, **1994**, 93-100.
3. Anderasen M., Christensen L., Meyer A., y Hansen A. Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. J Sci Food Agric, **1999**, 79:411-413.
4. Archana Giri, Vikas Dhingra, CC. Giri, etal. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. Biotechnol Adv, **2001**, 19:175-199.
5. Azcón-Bieto J, Talón M. Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. Mc Graw Hill. España, **2000**,305-323.
6. Castañeda L., Gil M. Establecimiento de Cultivos embriogénicos de alfalfa para su posterior transformación con el gen de la proteína G del virus de la rabia. Tesis Lic. Facultad de Química, UNAM, **2003**.
7. Delogu G., Fabbri D., Dettori M., Forni A. y Casalone G. Enantiopure 2,2`-dihydroxy-3,3`-dimetoxo-5,5`-diallyl-6-6`-dibromo-bifhenyl: a conformationally stable C<sub>2</sub>- dimmer of a eugenol derivative. Tetrahedron Asym, **2004**, 15:275-282.
8. Dong W.,Hong-Tao Z., Ying-Ju Z., Chong-Ron Y. A carbon-carbon-coupled dimeric bergenin derivative biotransformed by *Pleurotus ostreatus*. Bioorg and Med Chem Letters, **2005**, 15:4073-4075.
9. Dörnenburg H., Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microb Techn, **1995**, 17(8):674-684.
10. Evans D, Coleman O. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publishers 2ª edición, **2003**, 201-250.
11. Flores A. Establecimiento de cultivo de células en suspensión de *Cassia sp.* Para su uso como biocatalizador. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2004**.

- 
12. Fujisawa S., Kashiwagi Y., Atsumi T., Ueha T., Hibino Y. y Yokoe I. Application of bis-eugenol to zinc oxide eugenol cement. *J Dentistry*, **1999**, 27:291-295.
  13. García G. *Biología Alimentaria*. Ed. Limusa 2ª Edición, **1999**, 254-260.
  14. Hamada H., Fuchikami Y., Jansing. Regioselective hydroxylation of waferin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochem*, **1993**, 33:599-600.
  15. Hammatt N., NJ. Grant. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina Ehrh.* (black cherry) and *P. avium L.* (wild cherry). *Plant Cell Reports*, **1998**, 17:526-530.
  16. Hernández, M. Determinación de los metabolitos secundarios producidos por *Psidium pentatum*. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **1991**.
  17. Herrera J. Estudio comparado de la producción de metabolitos secundarios de *Hippocratea excelsa Kunth* en condiciones in vitro e in vivo. Tesis de maestría en ciencias, Facultad de Química, UNAM, **2001**
  18. Hiroki H., YuKa M., Nobuyoshi N y Toshifumi F. Highly selective transformation by plant catalysts. *J Mol Catal, B Enzym*, **1998**, 5:187-189.
  19. Hurtado M Daniel, Merino M.E. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editorial Trillas, México, **1994** pag. 150-178.
  20. I.Yu S., Bautista G., I. Sakharova, Rojas A., Yu O.P. Peroxidasa de plantas tropicales. **1999**, 97-104.
  21. I.Yu S., Vesga M., Yu G., I.V. Sakharova. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science*, **2001**, 161:853-860.
  22. Kohji I, Hiriki H., Toshifumi H. y Nobuyoshi N. Biotransformation using plant cultured cells. *J Mol Catal, B Enzym*, **2003**, 23:145-170.
  23. Krawczyk, A., Lipkowska, E. y Wróbel T. Horseradish peroxidase-mediated preparation of dimmers from eugenol and isoeugenol. *Collect Czech Chem Commun*, **1991**, 56:1147-1150.
  24. Kwang-Geun y Takayuki S. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds (*Syzygium aromaticum* Merr. Et Perry). *Food Chem*, **2001**, 74:443-448.

- 
25. Lantagne S. Investigation of the potrees for peace colloidal silver impregnated ceramic filter, **2001**, Order Number 524-0-00-01-00014-5362.
26. Lee. Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Ed Acribia, España, **2000**, pag. 50-65.
27. Linsey K, Jones M. Biotecnología vegetal agrícola. Ed Acribia, España, **1989**, 273-280.
28. Li Ou, Ling Y.K., Xian-Ming Z., Masatake N. Oxidation of acid by *Momordica charatia* peroxidase and related anti-inflammation activity changes. Biol Pharm Bull, **2003**, 26(11):1511-1516.
29. Louli V., Ragoussis N. y Magoulas K. Recovery of phenolic antioxidant from wine industry by-products. Bioresource Technol, **2003**
30. Maclejko J. and Mao J.T. Radioinmunoassay of apolipoprotein A-I. Applications of a non-ionic detergent (tween-20). Clinc Chem, **1982**, 28:1-23.
31. Maczka W., Mironowicz A. Enantioselective hydrolysis of 1-aryl ethyl acetates and reduction of aryl methyl ketones using carrot, celeriac and horseradish enzyme systems. Tethahedron Asym, **2002**, 13:2299-2302.
32. Margara, J. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogenesis. Ediciones Mundi-Prensa, España, **1998**, 230-235.
33. Marja K, Oksman K. Plant biotechnology and transgenic plants. Ed. Marcel Dekker Inc. NY. **2002**, 1-21.
34. Martínez V., Ochoa N., Lozoya E., Villareal L., Ariza A., Esparza F. y Calva G. Specific synthesis of 5,5'- dicapsaicin by cell suspension cultures of *Capsicum annum* Var. *Annum* (chili jalapeño chigol) and their soluble and NaCl-extracted cell wall protein fractions. J Agric Food Chem, **2004**, 52:972-979.
35. Masae I., Keiko M., Masataka Y. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. Food Chem Toxicol, **2005**, 43:461-466.
36. Masahiro O., Kazuo S., Shiro U., Tososhide E. Antioxidant activity of propofol and related monomeric and dimeric compounds. Chem Pharm Bull, **2005**, 53 (3):344-346.

- 
37. Masumi, T., Youichi A. y Nikolay S. Establishment of *Camelia sinensis* cell culture with high peroxidase activity and oxidative coupling reaction of dibenzylbutanolides. *Tetrah Letters*, **2002**, 43:6915-6917.
38. Mere G., Vázquez V. Bombardeo de callos embriogénicos de zanahoria (*Dacus carota*) y su regeneración con la proteína G del virus de la rabia. Tesis de Lic. Facultad de Química, UNAM, **2003**.
39. Olivera M.T. Resúmenes de Diplomado: El cultivo de tejidos, una técnica de la biotecnología vegetal. UNAM, **2003**.
40. Orihara, Y., Furuya, T., Hashimoto, N, Deguchi, Y., Tokoro, K. Biotransformación of isoeugenol and eugenol by culture cells of *Eucalyptus perianiana*. *Phytochemistry*, **1992**, 31(3):827-831.
41. Panke S., Held M. y Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, **2004**, 15: 272-279.
42. Pérez M. Obtención de líneas celulares transgénicas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes a un herbicida (basta). Tesis Lic. Facultad de Ciencias, UNAM, **2008**.
43. Pérez M.B., Ramírez M.R, Núñez P.H. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, **1999**.
44. Pérez P., Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Cuba, **1998**, 1-56.
45. Pierik R.L.M. Cultivo in Vitro de las plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, **1990**, pag.37-47,
46. Ramachandra R. y Ravishankar G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, **2002**, 20:101-153.
47. Ramachandra S., Gokare A. R. Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *J Biotech*, **2000**, 76:137-146.
48. Ramos T. Regeneración de melón (*Cucumis melo*) bajo condiciones in vitro como modelo biológico. Tesis de Lic. Facultad de Ciencias, UNAM, **2006**.
49. Reinert J. y Bajaj Y.P. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Ed. Springer-Verlag, **1977**, 650-690.

- 
50. Robards K., Prenzler P., Trucker G., Swatsitang P. y Glover. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* **1999**, 66:401-436.
51. Roberts, M. Preparative Biotransformations. *J Chem Soc*, **1999**, 1:1-21.
52. Robles Zepeda R. Establecimiento del Cultivo in Vitro de *Mammillaria huitzilpochtli*. Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM, **1999**.
53. Seiichiro F., Tosiko A., Yoshiniri K y Hiroshi S. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicol* **2002**, 177:39-54.
54. Shimoda K., Kondo Y., Nishida T., Hamada H., Nakajima N. Biotransformation of thymol, carvacrol and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochem*, **2006**, 123-130.
55. Sosa T. Evaluación de la actividad antioxidante de compuestos aislados de plantas mexicanas y su aplicación para la conservación de cacahuete tostado. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2003.
56. Suga, H. Biotransformation of exogenous substrates by plant cultures. *Phytochemistry*, **1990**, 29:2393-2406.
57. Tzeng, S., Liu, Y. Peroxidase-catalysed synthesis of neolignan and its anti-inflammatory activity. *J Mol Catalysis*, **2004**, 32:7-13.
58. Uribe I. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento in vitro en ceiba. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 1998.
59. Wallace G., Fry S.C. In vitro peroxidase-catalysed oxidation of ferulic acid esters. *Phytochem*, **1995**, 39(6):1293-1299.
60. Wende G., Waldron K., Smith A. y Brett Ch. Developmental changes in cell-wall ferulate and dehydrodiferulates in sugar beet. *Phytochem*, **1999**, 52:819-827.
61. Wiseman, A. Manual de Biotecnología de las Enzimas. Ed. Acribia, España, **1991**, 142-178.
62. Xu J., Sun Y. y Su Z. Enhanced peroxidase production by suspension culture of carrot compact callus aggregates. *J Biotechnol*, **1998**, 65:203-208.



63. Yan H., Shuit-Hung H., Hsien-Chieh L y Yen-Ling Y. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* motsch. and *Tribolium castaneum*. J Stored products Research, **2002**, 38:403-412.
64. Yukio M., Masao S., Shigemasa H., Shoji T. y Seiichiro F. Preventive effect of bis-eugenol, a eugenol *ortho* dimer, on lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. Biochem Pharmacology, **2003**, 66:1061-1066.

## VIII. ANEXOS

Aquí se presentan las soluciones de las que se partieron para preparar los medios de cultivo utilizados

### SOLUCIONES MADRE 100X

#### Medio MS

<b>Solución 1:Nitratos</b>	<b>mg/L</b>
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Solución 2: Sulfatos</b>	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	25x10 <sup>-3</sup>
<b>Solución 3: Halogenos</b>	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
KI	0.83
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	25x10 <sup>-3</sup>
<b>Solución 4:</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	250x10 <sup>-3</sup>
<b>Solución 5:</b>	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	37.3

Vitaminas MS

<b>Compuestos</b>	<b>mg/L</b>
Myoinositol	100
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1

MEDIO SH

<b>Solución A: nitratos</b>	<b>mg/L</b>
KNO <sub>3</sub>	2500
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
<b>Solución B: Sulfatos</b>	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.2
<b>Solución C: Halógenos</b>	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200
KI	1.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1
<b>Solución D:</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.1
<b>Solución E:</b>	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.054
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> ·Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.054



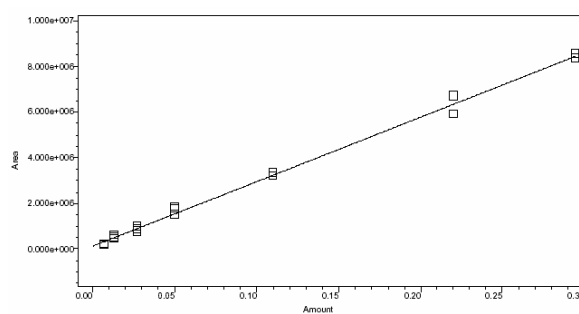
## Vitaminas SH

Compuesto	mg/L
Myoinositol	1000
Tiamina -Hcl	5.0
Ac. Nicotínico	5.0
Piridoxina	0.5

## Curvas patrón

### Curva patrón de Eugenol

Área	Concentración (mg/mL)
7458503	0.2200
3215401	0.1100
1580261	0.550
723395	0.275
463626	0.013

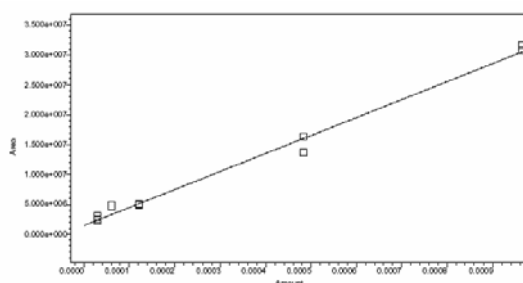


Gráfica 1: Curva patrón de eugenol

$$r = 0.99714 \quad m = 2.92 \times 10^{-8} \quad b = 6.68 \times 10^{-3}$$

### Curva patrón de bis eugenol

Área	Concentración (mg/ml)
2204072	$3.00 \times 10^{-5}$
4567727	$6.03 \times 10^{-5}$
10859734	$1.206 \times 10^{-4}$
18965025	$2.412 \times 10^{-4}$
30071013	$4.825 \times 10^{-4}$
57508294	$9.65 \times 10^{-4}$



Gráfica 2: Curva patrón de bis-eugenol

$$r = 0.99647 \quad m = 1.172 \times 10^{-11} \quad b = -3.95 \times 10^{-5}$$